天然油脂の加水分解における リパーゼの脂肪酸特異性の表記の試み

真鳥 美輪^{注1)}・櫛田 靖^{注2)}・足立 修一・太田 安英

広島大学生物生産学部応用生化学講座
(〒724 広島県東広島市鏡山1-4-4)

Illustration of the Fatty Acid Specificity in Lipase Hydrolysis of Natural Oils and Fats

Miwa MATORI, Yasushi KUSHIDA, Shuichi ADACHI,
and Yasuhide OTA

Department of Applied Biochemistry, Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University
(1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima-shi, 〒724)

The fatty acid specificity of a lipase in the hydrolysis of natural oils and fats can be expressed by the following equation. The hydrolysis rate H_i of a fatty acid i in a fat is $H_i = (f_i/f_{oi}) \times H$, where f_i and f_{oi} are the molar fractions of fatty acid i in hydrolyzed fatty acids and that in unhydrolyzed fat, respectively. H is thus the hydrolysis rate of fat by lipase. Sardine oil was hydrolyzed by a microbial lipase and the results are presented graphically.

あるリパーゼの脂肪酸残基に対する特異性を表記するために、合成された単酸基トリグリセリドを個別に加水分解し、相対反応速度を比較する方法がよく用いられる¹⁾。しかしその結果を見て、天然油脂のそのリパーゼによる加水分解の結果を予測することは難しい。

近年リパーゼを有機合成に応用することが進むにしたがって、脂肪酸特異性に関心が集まった。Baillargeonら²⁾は、Chenら³⁾によって提案された specificity constant の比、すなわち $E = (V_{\max}/K_m)_A / (V_{\max}/K_m)_B$ を、オレイン酸メチルとパルミチン酸メチルの混合物の加水分解に応用し、*Geotrichum candidum* のリパーゼの脂肪酸特異性を論じた。さらに Chen らの E 値は、Deleuzeら⁴⁾、Rangheardら⁵⁾によって competitive factor (α) と名付けられ、有機溶媒中のリパーゼ反応に拡大適用された。後者の報文では多種の脂肪酸エチルエステルについて $1/\alpha$ が求められ、4 種のリパーゼの脂肪酸特異性が比較された。

一方石田ら⁶⁾や森岡ら⁷⁾は、天然油脂をリパーゼで加水分解したとき、どの脂肪酸が加水分解されやすいか(あるいはされにくい)を示すために、脂肪酸の濃縮

率 $F = f_H/f_O$ を計算した。ここで f_O は用いた油脂中の A 脂肪酸の含有率 (wt %) を、 f_H は分解された脂肪酸中の A 脂肪酸の含有率 (wt %) を表す。 $F > 1$ なら、A 脂肪酸は油脂中の他の脂肪酸に比べ加水分解されやすく、脂肪酸区分に濃縮されることがわかる。

われわれはリパーゼの天然油脂に対する見かけの脂肪酸特異性を知るために、全構成脂肪酸の分解されやすさを一括して図示する方法を工夫したので報告する。

油脂を構成する任意の一脂肪酸のエステルの加水分解率を H_i とすれば、

$$H_i = (f_i/f_{oi}) \times H$$

ここで f_{oi} と f_i は、任意の一脂肪酸の、未分解油脂中におけるモル分率(グリセリンを除き脂肪酸残基について考えた場合の)と、リパーゼで加水分解後遊離した脂肪酸区分中におけるモル分率とを表し、 H は油脂中全エステルの加水分解率を示す。本報告では、 f_{oi} と f_i を各脂肪酸の重量が GLC のピークの積分値にだいたい比例することから計算し、 H は使用油脂のけん化価と加水分解反応液のアルカリによる滴定値とから求めた。

次に代表的な実験法を記す。15 mL 容のガスクロバリアル(日電理化学硝子)に天然油脂 500 mg、緩衝液 1 mL, 30 mM CaCl_2 0.5 mL, 脱イオン水 2 mL をいれ、窒素ガスを吹き込みつつ、マグネチックスターラー

注1) 現在三菱油化(株)筑波総合研究所

注2) 現在(株)資生堂

連絡者: 太田安英

The hydrolysis was carried out at 30°C for 48 h using 200 units of the lipase. The hydrolysis rate was 42.1 % as measured by alkali titration.

Fig.-1 Hydrolysis of sardine oil by the extracellular lipase produced by a fungal strain FO 347-2.

でかくはんしながら、10 min 30°C に加温した。1 mL の水に溶解した一定量のリパーゼを添加後しばらく窒素ガスの通気続け、あとは密閉系でスターラーでかくはんしながら反応を進めた。実験の目的やリパーゼと油脂の性質の違いによって、酵素量と反応時間を適切に選んだ。なお加水分解は複数のバイアルで行い、一部は加水分解率の測定に、他は遊離した脂肪酸の組成の分析に供した。遊離した脂肪酸の分離法は、森岡ら⁷⁾の方法に従った。

脂肪酸のメチルエステルの調製、けん化価の測定などの実験法は、日本油化学協会編、基準油脂分析試験法によった。なお次に示すいわし油を加水分解したときの

GLC の条件及び構成脂肪酸の同定は、同協会ガスクロデータ小委員会によって発表されたデータ⁸⁾を参照した。

Fig.-1 は、未同定微生物 FO 347-2 の培養液から回収した粗リパーゼで、精製いわし油を加水分解したときの結果を示す。データベースソフト「桐」を用いてグラフ化している。この図から FO 347-2 が生産するリパーゼのいわし油に対する脂肪酸特異性を知ることができる。しかしこれはあくまでいわし油に対するものであり、油脂を換えると異なる結果になることが予想される⁷⁾。またわれわれが発案した positional specificity index (PSI)⁹⁾ で表現される位置特異性の影響も見逃すことができない。したがってここに報告する脂肪酸特異性の表記法は、リパーゼの応用を目指す研究で役立つものと考えられる。

〔平成 3 年 (1991 年) 9 月 13 日受理〕

文 献

- 1) Y. Ota, "Handbook of Microbiology", 2nd Ed., Vol. VIII, CRC Press (1987) p. 285
- 2) M.W. Baillargeon, R.G. Bistline, Jr., P.E. Sonnet, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 92 (1989)
- 3) C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7294 (1982)
- 4) H. Deleuze, G. Langrand, H. Millet, J. Baratii, G. Buono, C. Triantaphylides, *Biochim. Biophys. Acta*, **911**, 117 (1987)
- 5) M.-S. Rangheard, G. Langrand, C. Triantaphylides, J. Baratii, *Biochim. Biophys. Acta*, **1004**, 20 (1989)
- 6) 石田紀朗, 村上幸子, 平野二郎, 森岡憲祐, 船田 正, 日化, **1984** (7), 1170
- 7) 森岡憲祐, 前田皓一, 石田紀朗, 油化学, **36**, 816 (1987)
- 8) 油脂及び油脂製品試験法部会・ガスクロデータ小委員会編, 油化学, **27**, 406 (1978)
- 9) 太田安英, 真鳥美輪, 壇辻雅彦, 発酵工学, **66**, 406 (1988)