報 文

リパーゼによるエステル合成反応
EPA 及び DHA のトリアシルグリセリンの合成

田中 幸久・船田 正・平野 二郎

日本油脂株式会社 筑波研究所 (〒300-26 茨城県つくば市東光台 5-10)

Esterification by Lipases

Preparation of Triicosapentaenoyl and Tridocosahexaenoyl Glycerols

Yukihisa TANAKA, Tadashi FUNADA, and Jiro HIRANO

Tsukuba Research Laboratory Nippon Oil & Fats Co., Ltd.

(5-10 Tokodai, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 〒300-26)

Triicosapentaenoyl (EPA-TG) and tridocosahexaenoyl glycerols (DHA-TG) were prepared by lipase TOYO (*Chromobacterium viscosum*)-catalyzed esterification. The FFAs (EPA and DHA) reacted with glycerol in the presence of a lipase solution to give a mixture of acylglycerols whose unreacted hydroxyl groups were subsequently esterified by the corresponding acids in the presence of the immobilized lipase on celite. 100 % of DHA-TG and 92 % of EPA-TG were obtained under optimal conditions.

1 緒 言

魚油中に含まれる EPA^{*1}, DHA^{*1} には成人病の予防¹⁾ 及びその治療や学習能の向上²⁾ などに効果があることが報告されている。魚油の EPA, DHA を濃縮する方法としてウィンタリングなどが行われているが、アシルグリセリンとして得るには効率が悪い。また、エチルエステルの形として濃縮することも可能であるが、TG^{*1} の形に比べて血しょう(漿)中の取り込みが悪いことが知られており³⁾, EPA-TG^{*1}, DHA-TG^{*1} の合成が注目されている。

Osada ら⁴⁾ は *Chromobacterium viscosum* 由来リパーゼ(リパーゼ TOYO) による EPA 及び DHA と GL^{*1} とのエステル化で 90 % の反応率を達成できると

報告しているが、生成物中の TG の組成率は約 30 % と低い。そこで、本研究では高純度の EPA-TG, DHA-TG の合成を目的として、Fig.-1 に示した Scheme に従って反応を検討した。まず、OA^{*1} からの OA-TG^{*1} 合成の最適反応条件の検討を行い、そこで得られた条件を用いて EPA-TG, DHA-TG の合成を行った。

2 実 験

2・1 試料及び試薬

OA (90 %) 及び GL (99.5 %) は日本油脂(株)製を、EPA, DHA (いずれも > 90 %) は日本化学飼料(株)製を用いた。OA-DG^{*1} (OA 含有率 75.5 %) は理研ビタミン(株)製(提供品)をシリカゲルカラムで精製したものを用いた。*Chromobacterium viscosum* 由来リパーゼ(リパーゼ TOYO) は東洋醸造(株)製(供与品)を IML^{*1} 用担体〔セライト 535〕はナカライ化学(株)製を用いた。

2・2 反応装置及び分析方法

反応は連続反応装置 MS-50 [松本製作所(株)製]を用いた。反応物は遠心分離により油層を分離し、TLC^{*1} (Merck シリカゲルプレート 5721) に展開(溶媒; クロロホルム: アセトン=96: 4 vol/vol) 後、2 波長クロマトスキャナー CS-930 [島津製作所(株)] で定量した。水分測定は微量水分測定装置 CA-05 [三菱

*1 EPA: イコサペンタエン酸, DHA: ドコサヘキサエン酸, MG: モノアシルグリセリン(モノグリセリド), DG: ジアシルグリセリン(ジグリセリド), TG: トリアシルグリセリン(トリグリセリド), OA: オレイン酸, EPA-TG: EPA のトリアシルグリセリン, DHA-TG: DHA のトリアシルグリセリン, OA-TG: オレイン酸のトリアシルグリセリン, GL: グリセリン, FFA: 遊離脂肪酸, IML: 固定化リパーゼ (Immobilized lipase), OA-DG: OA のジアシルグリセリン, TLC: 薄層クロマトグラフィー

Fig.-1 Scheme of two-step preparation of TG-rich acylglycerol by lipase catalyzed esterification between FFA*¹ and GL.

化成工業 (株)] で行った。また GL 濃度は GL 濃度測定試薬 [東洋醸造 (株), 供与品] を用いて比色定量した。

2・3 リパーゼのエステル合成活性の測定*²

水分含量 10 wt % の GL (1.0 g) と等モルの FFA (OA, EPA, DHA それぞれ各 3.4 g, 3.6 g, 4.0 g) との混合物を 37℃, 500 rpm でかくはん混合し, 酵素水溶液を 100 μ L 添加して反応を開始した。60 min 後にエタノール 20 mL を加えて反応を停止し, 1/10 N KOH-エタノール溶液で滴定し, FFA の減少量より活性を算出した。OA, EPA, DHA を基質とした時のリパーゼの活性はそれぞれ 50, 34, 36 u/mg であった。

2・4 固定化リパーゼ (IML)

2・4・1 調 製

OA を基質とした場合の活性値で 1000 u に相当するリパーゼ TOYO を 10 mL の精製水に溶解し, セライト 535 を 10 g 添加し, マグネチックスターラーでかくはんした。この混合物を真空乾燥装置中で 60℃, 24 h 吸引して乾燥した。なお, IML の乾燥の完了は脱水したオリブ油 2 mL に IML 200 mg を添加し, 37℃ でかくはんして 5 h 反応を行い, 加水分解によって生じる FFA や DG がないことによって確認した。

2・4・2 活性測定*²

OA-DG と OA をそれぞれ 2.2 g 及び 3 g (モル比 1:3) を混合し, IML 500 mg を添加した。さらに反応系内の脱水のためにモレキュラシーブ 2 g を添加して 2 h 後, この反応混合液を前述と同様に処理し, 滴定より OA の減少から活性を算出した。活性は 0.3 (u/mg-IML) であった。

2・5 リパーゼ水溶液による EPA, DHA と GL とのエステル化反応

リパーゼ水溶液による GL と EPA, DHA とのエステル化の最適条件を調べるため, OA との反応について検討した結果, Fig.-2 に示したように基質比が 1:1 (モル比), GL 水分含量 10 % が良いことがわかった。

*² リパーゼのエステル合成活性は遊離リパーゼについて FFA+GL, IML については OA+OA-DG の反応から求めた。1 min に 1 μ mol の FFA を消費する酵素量を 1 u と定義した。以下の実験ではすべてこの単位を用いた。

Fig.-2 Effects of water content and OA/GL ratio on the esterification between OA and GL by lipase solution.

この条件を用いて以下のようにエステル化を行った; EPA, DHA を 14.8 g, 16.0 g と GL (4.5 g), 1000 u/mL のリパーゼ水溶液 (0.5 g) との混合物を 50℃, 500 rpm でかくはんした。この反応の経時変化 (Fig.-3) の検討より反応時間 > 48 h で平衡に達することがわかった。80 h で反応を終了し, 油層を回収, 水洗, 脱水した。Table-1 に示した組成の生成物を得, これを用いて EPA-TG, DHA-TG の合成 (2・7) を行った。

2・6 IML による TG 合成の条件検討

2・5 で調製した生成物中の DG*¹・MG*¹ からの TG 合成の最適条件を得るため, IML による OA-DG と OA とのエステル化反応に及ぼす OA/OA-DG 比及び反応系中の水分量について検討した。全体の体積を一定にし, かくはん効率による影響が少ないようにするため, 試料は OA/OA-DG (モル比)=1,2,3,5 のそれぞれについて 3.1/6.9, 4.7/5.3, 5.8/4.2, 6.9/3.1 (g/g) で混合し, OA-DG 1 mol あたり 500 u の IML を添加した。水分含量の影響を検討するためモレキュラシーブを OA-DG の重量に対して 0, 10, 20, 40 wt % 添加し, 50

Table-1 The contents of TG, DG, MG, and FFA, and the consumption of FFA and GL after the esterification between OA and GL catalyzed by lipase solution in Fig.-3^{a)}

	EPA		DHA		OA	
Content (mol %)						
TG	20		25		25	
Total DG	37		39		42	
Total MG	6		5		5	
FFA	37		31		29	
	FFA	GL	FFA	GL	FFA	GL
Consumption (mol %)	80	65	84	70	86	73

a) FFA : Free fatty acid GL : Glycerol
 OA : Oleic acid EPA : Icosapentaenoic acid
 DHA : Docosahexaenoic acid
 Reaction time was 80 h.

Lipase TOYO : 1000 u/mL,
 FFA/GL ratio was 1 : 1 (mol/mol)
 Water in GL was 10 wt %
 EPA ● DHA ■ OA △

Fig.-3 Time course of the relative AV (acid value) for the esterification between FFA and GL by lipase solution at 50°C.

℃, 500 rpm かくはんした。経時的に試料を採取し、AV の測定、試料の水分量の測定及び組成の分析を行った。

2.7 EPA-TG, DHA-TG の合成

2.5 で得られた生成物 (10 g) に共存する DG+MG の 2 倍モル (未反応の FFA も含めて) になるように EPA, DHA を添加した。EPA の反応では 2.0 g, DHA では 2.6 g であった。これら反応基質に IML (500 u/1 g-基質) を加えて反応した。反応中に生成す

る水を除去するために窒素バブリングし、さらに真空ポンプによって 5 mmHg まで吸引し、水分含量を 100 ppm 以下に抑えて 50℃ に保持し、かくはん (500 rpm) した。経時的に試料を採取し、酸価 (AV) の測定とクロマトスキャナーによる組成分析を行った。

3 結果及び考察

3.1 リパーゼ水溶液による EPA, DHA と GL とのエステル化反応

まず、予備検討として無溶媒下での OA と GL によるエステル化についてリパーゼのスクリーニング^{*3}, GL 中の水分量の及び OA/GL 比の検討を行った (Fig.-1)。その結果、リパーゼ TOYO を用い、水分量 10 wt % の GL, OA/GL=1 (モル比) が OA-TG 合成に適することがわかった。この結果得られた反応生成物の組成はこれは Osada らの結果とほぼ等しかった。

次に上記の条件下で EPA, DHA と GL とのエステル化の反応停止時間を知るために経時変化を調べた。Fig.-2 から、いずれの場合にも長時間反応させると反応は平衡に達し、それに要する時間は EPA, DHA では 42 h と OA (24 h) よりも長いことがわかった。また、平衡時におけるグリセリド組成は OA, DHA では TG 25 %, DG 40 %, MG 5 %, FFA 30 % であり、EPA では若干 TG の比率が低かった。

3.2 IML による OA-DG のエステル化反応の条件検討

3.1 の結果及び文献にみられるようにリパーゼ水溶液

*3 リパーゼ TOYO の他にリパーゼ OF [*Candida cylindracea*; 名糖産業 (株) 製], アマノ G [*Penicillium cyclopium*; 天野製薬 (株) 製] を検討した。

Reaction time was 48 h and analysis was done except FFA spot on TLC plates.

Amount of molecular sieves/OA-DG 40 wt % ●
20 wt % △ 0 wt % □
IML was 500 u/g OA-DG

Fig.-4 Effect of the OA/OA-DG ratio and amount of molecular sieves on the IML catalyzed esterification of OA-DG with OA at 50°C.

による FFA と GL のエステル化ではリパーゼがエステル合成活性を示すには特定の水分量が必要であり、この際、逆反応（加水分解反応）も生じ反応系全体は平衡に達する。このため TG の組成率を平衡時よりも高める

Analysis were done except FFA spot on TLC plates.

Fig.-5 Dependence of water content on OA-TG content in the IML catalyzed esterification of OA-DG with OA at 50°C.

ためには反応条件を変えて平衡を生成物側へシフトさせる必要がある。そこで本報告では、TG 組成率をさらに高めるために、水分量を低く抑え、IML を用いて FFA と DG とのエステル化反応を検討した。

EPA (DHA)-DG や EPA (DHA)-MG から EPA (DHA)-TG を合成しようとする試みの報告はいまだない。そのため、本報告ではまず、その合成条件を検討するため OA と OA-DG とによるエステル化反応をモデルとして選んだ。まず、OA/OA-DG 比 (1~5)、脱水剤 (モレキュラシーブ) の効果を調べた。Fig.-4 に示すように、OA による OA-DG のエステル化では脱水剤の存在により反応が生成物側に反応をシフトすることができ、40 wt % (●, Fig.-3) では OA/OA-DG > 2 ではその変換率は 95 % 以上 (48 h) であった。次に、OA/OA-DG > 2 における基質中の水分量と TG 組成率との相関性を調べた。Fig.-5 に示すように TG > 95 % を達成するためには基質中の水分量を 100 ppm 以下に保つことが望ましいことがわかった。以上の結果より、DG から TG を効率的に合成するためには FFA/

The reaction was carried out under nitrogen bubbling and the reduced pressure (5 mmHg) to remove water produced during the esterification.

IML was 500 u/g OA-DG

FFA/Free OH of (DG+MG)=2 (mol/mol)

FFA-TG ● FFA-DG △ FFA-MG □

Fig.-6 Time course of TG content in the IML catalyzed esterification of MG and DG (in the reaction products in Table-1) with FFA at 50°C.

DG > 2 (mol/mol) で反応系中の水分を極力少なく制御することが重要であることが示唆された。

3.3 EPA-TG, DHA-TG の合成

3.2 で得られた結果をに従い、Table-1 で示した混合物の IML によるエステル化を検討した。また対照の反応系として OA-TG の合成も行った。反応開始時の基質試料の組成 (TG : DG : MG, mol/mol/mol) は EPA (31 : 58 : 9), DHA (36 : 57 : 7), OA (35 : 58 : 6) であった。また、FFA は DG+MG の未反応の OH 基に対して 2 倍モル量加えて反応を行った。Fig.-6 にその経時変化を示した。TG の変換速度は OA > DHA > EPA であり、OA は 90 h で、DHA は 120 h で反応は完結し、反応開始時に共存していた DG・MG はほぼ 100 % TG にエステル化されていた。しかし、EPA で反応は完全には進まず、150 h において TG : DG : MG=92 : 7 : 1 の生成物が得られた。OA のエステル合成反応が EPA, DHA に比べて早いのはエステル合成反応の逆反応である加水分解反応においてオリブ油と魚油の加水分解速度が異なるのと同様の傾向であり、これはリパーゼの基質特異性によるものと思われる。

4 総 括

EPA-TG, DHA-TG の合成をリパーゼ TOYO を用いて行った。

リパーゼ水溶液で EPA, DHA を GL とエステル化反応を行った。さらに、共存する DG, MG の 2 倍モル相当の FFA を追加して反応系の水分含量を極力抑えるように制御し、セライトの IML を用いることにより、DG, MG は、ほぼ 100 % を TG にエステル化することができた。反応終了後、EPA では 8 % の DG+MG と FFA, DHA では FFA が TG と共存するが、これらはシリカゲルカラムなどによって容易に除去することができ、100 % EPA-TG, DHA-TG を得ることができた。

[平成 3 年 (1991 年) 10 月 3 日受理]

文 献

- 1) Y. Kobatake, K. Kuroda, H. Jinnouchi, H. Nishide, S. Innam, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **30**, 357 (1984); 鹿取 信, 油化学, **34**, 91 (1985); 熊谷朗, 油脂, **34**, 78 (1981)
- 2) N. Yamamoto, M. Saito, A. Moriuchi, M. Nomura, H. Okuyama, *J. Lipid Res.*, **28**, 144 (1987); 鈴木平光, バイオサイエンスとインダストリー, **49**, 486 (1991)
- 3) L.D. Lawson, B.G. Hughes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 328 (1988)
- 4) K. Osada, K. Takahashi, M. Hatano, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (YUKAGAKU)*, **39**, 50 (1990)