総 説

高度不飽和脂肪酸を有効利用
するためのリパーゼ反応工学

小 杉 佳 次

生命工学工業技術研究所 (〒305 つくば市東 1-1)

Lipase Reaction Engineering for Utilizing Polyunsaturated Fatty Acids

Yoshitsugu KOSUGI

National Institute of Bioscience and Human-Technology (1-1 Higashi, Tsukuba-shi, 〒305)

High FFA rice bran oil was continuously converted to an oil containing more than 74 % of triacylglycerol (TG) by immobilized lipase. The synthesis with evaporation by heating was not suitable because of the increasing peroxide value of the oil. The process can be industrialized if the enzyme cost is reduced less than 5~10 % the value added by the synthesis. More than 95 % of polyunsaturated fatty acid (PUFA) or ethyl ester of the fatty acid such as docosahexaenoic acid (DHA) was converted to TG. Continuous lipolysis system is constructed consisting of a loop connecting a fixed-bed reactor containing immobilized lipase from *Pseudomonas fluorescens* biotype I and an oil-water separator. The feasibility of PUFA production was discussed by using the lipolysis reactor.

はじめに

リパーゼは、両親媒性物質である脂質の疎水基と親水基の結合として重要な位置を占めるエステル結合に働く酵素である。反応条件を変化させることによりエステル分解、エステル合成あるいはエステル交換反応の触媒として働く。そのため、油化学工業においては多くの利用分野が考えられている。しかし、基礎素材を提供する油化学工業への応用例は、カカオ脂様油脂生産¹⁾が工業生産されているだけで、高純度オレイン酸、6-*O*-acyl-glucopyranoside 等はパイロット的に生産されているにすぎない。

現在の油化学工業は高温高压プロセスにより大量生産することにより製造原価を減少させている。一方、リパーゼプロセスは常温常圧反応であるため、簡易な設備で実施でき、しかも高度不飽和脂肪酸 (PUFA) の変性も起きにくい。先に固定化リパーゼによる油脂の合成および分解について総説²⁾したが、PUFA の有効利用という観点に立ち最近の成果を紹介させて戴く。

1 リパーゼリアクターにおける過酸化物の影響

固定化リパーゼによる油脂の高収率合成の先駆的研究は、カナダのグループが報告している³⁾。彼らは、トリ

アシルグリセリン (TG) 合成のための化学量論量の脂肪酸とグリセリンおよびリゾムコール属の固定化リパーゼを入れた試験管を 60℃ で振とうして油脂合成している。モレキュラーシーブや乾燥空気脱水方法は、複雑で、コスト高であり、加熱による自然乾燥法が効果的であると指摘していた。そこで、加熱自然乾燥法を用いた Fig.-1 のようなリアクターで TG 合成を行った⁴⁾。反応によって生じた水を加熱して脱水する脱水槽と固定化リパーゼカラムからなるループに、TG を合成するための化学量論量の基質を 24 h 循環させて反応させた。60℃ から 70℃ に脱水温度を上げると、脱水量も多くなり TG 合成量も増加した。ところが脱水温度を 80℃ に上げると水分量は減少したものの、反応液も黄色くなり TG 合成量が減少した。生産物の過酸化物価も上昇していた。その後脱水温度を 60℃ に戻しても収率は回復しなかった。用いた基質は、リノール酸を多く含む高酸価な米ぬか油である。従って酸化生成物がリパーゼを失活させていると考えられた⁴⁾。

次に、Fig.-2 のようなモレキュラーシーブで乾燥した窒素を通気し脱水する方法を採用した⁴⁾。脱水槽内の基質の飛散については邪魔板をつけ、発泡については吹き出し口の形状あるいは大きさを調整した。また、酸化に対しては窒素圧を陽圧にすることにより対処した。特

1. Fixed-bed reactor at 60°C; 2. dehydrator; 3. 1.25 g of Lipozyme IM 60 (Novo Nordisk, Chiba); 4. reaction mixture containing 25 g high FFA rice bran oil and glycerol; 5. hot stirrer; 6. thermostat at 60°C; 7. liquid pump at a flow rate 5 mL/min and 8. thermometer. The solid line represents the path of the reactant.

Fig.-1 Reactor with heating for dehydration.

1. Fixed-bed reactor at 60°C; 2. dehydrator at 60°C; 3. 250 g of molecular sieves, 5 A; 4. 1.25 g of Lipozyme IM 60; 5. reaction mixture containing 25 g high FFA rice bran oil and 0.55 g glycerol; 6. nitrogen cylinder; 7. liquid pump at a flow rate of 6 mL/min; 8. air pump; 9. needle valve; 10. flow meter; 11. outlet for product and 12. inlet for substrate. The solid line represents the path of the reactant and the dotted line indicates the path of the nitrogen gas.

Fig.-2 Reactor with dry-nitrogen dehydrator.

に窒素圧は重要で飽和させた後、窒素圧を止めることはループ内のシールが漏れ空気中の酸素がループ内に入る危険があり、過酸化油脂の上昇を招き用いたリパーゼを失活させた⁴⁾。過酸化油脂の発生は、用いる酵素触媒の寿命を縮めるばかりでなく、食用にすると有害である物質が生じることがあり、今後充分留意しなければならない問題である。

2 米ぬか油の酵素的リファインングの酵素コスト

世界の米の生産量からすれば、綿実油や落花生油に相当する米ぬか油の生産が期待できる。しかし、米作地帯の東南アジア地域では集荷方法が遅れているため、遊離の脂肪酸を多く含む食用にならない高酸価油に変性してしまい余り利用されていない。高酸価の米ぬか油から、食用油成分である TG を生産する酵素的リファインングの連続反応リアクターを構築した⁵⁾。

酵素的リファインングの反応経過を観察すると、ジアシルグリセリン (DG) は初期に急速に合成され、反応液中のグリセリンをほとんど消費した。その後、DG 生成は減少し続け、それに伴い TG が増加し、水分濃度 5 ppm 程度の超微水系においても TG の生成が観察された。反応経過中モノアシルグリセリン (MG) の生成はほとんどなかった。また、脱水速度とほぼ等しい速度で脂肪酸 (FA) が減少していたので、本 TG 合成の主反応は

の 2 段階の逐次反応と考えられた。反応速度を比較すると、式 (1) が式 (2) よりほぼ一けた速い速度で進行していた。

Fig.-3 のようにループを二組連結させ、最初の反応系には高酸価油およびグリセリンを供給し、最初の反応系より最後の反応系に反応液を転送し、最後の反応系から低酸価油を連続的に採取した。最初の反応系では、式 (1) に示した主反応が進行していると考えられ、DG が約 30 % 合成され 50 % あった FA が 16~20 % に減少していた。最後の反応系は式 (2) に示した反応が主反応と考えられ、水分濃度は 40~70 ppm、滞留時間は約 24 h であった。最後の反応系から、71~77 % の TG が、一か月余りにわたり、定常的に生産された⁵⁾。

脱水は乾燥窒素で行い、窒素乾燥はモレキュラーシーブで行い、その再生は電気加熱で行えるので、エネルギーコスト及び設備費等は、あまり高くない。本リアクターの実用化の可能性は、固定化リパーゼのコストで決まる。酵素コストは、この固定化リパーゼが一日に生産する TG 量を基礎とした生産性、酵素寿命及び酵素価格で計算される。すなわち本リアクターの生産性は、

$$\begin{aligned} \text{生産性} &= (0.00431 \times 24) \times 0.742 / (0.005 + 0.00125) \\ &= 12.3 \text{ (kg of TG)} \\ &\quad / [\text{day} \times (\text{kg of Lipozyme})] \end{aligned}$$

ここで 0.00431 (kg/h) は、本リアクター生産物の回収速度、0.742 は、生産物中の TG の生産割合の平均値、0.005 (kg) および 0.00125 (kg) は、両反応系で使った

1. Glycerol vessel ; 2. high FFA rice bran oil vessel ; 3 and 4. fixed bed reactors at 60°C (Amounts of Lipozyme IM 60 packed into 3 and 4 were 1.25 g and 5.0 g respectively.) ; 5 and 6. dehydrator (Working volumes for 5 and 6 were about 25 mL and 100 mL respectively.) ; 7. 250 g of molecular sieves 5 Å ; 8. liquid pump for glycerol at a flow rate 0.228 g/h ; 9. liquid pump for high FFA oil at a flow rate 4.2 g/h ; 10 and 11. liquid pumps for circulation in the loops at 6 mL/min ; 12. liquid pump for pumping reactants from the first loop to the second loop at 4.34 g/h ; 13. air pump ; 14. needle valve ; 15. nitrogen cylinder ; 16. nitrogen damper or cold trap of water ; 17. outlet valve for product at 4.31 g/h and 18. three way valve.

Fig.-3 Schematic diagram of continuous refining reactor.

固定化リパーゼ量である。固定化リパーゼのコストは、

$$\text{酵素コスト} = \text{酵素価格} / (\text{生産性} \times \text{酵素寿命})$$

一方、現在わが国では、高酸価の米ぬか油は、酸価 25 を基準として、一ドラム (181.5 kg) あたり、酸価が一上昇するごとに 150 円のペナルティーをかけられる。

$$\text{ペナルティー} = (\text{酸価} - 25) \times 150 / 181.5$$

すなわち酸価が一上昇するごとにキロあたり大体一円のペナルティーが生ずる。本実験では酸価 101.5 から 14.8 になった。上式から計算すると、60 円余りのペナルティーをクリアーして付加価値を生じたことになる。設備費、運転費等を総合的に考えると、工業的に酵素プロセスを実施するには、酵素コストを付加価値の 5~10 % 程度に抑える必要がある⁵⁾。

3 PUFA からなる TG の合成

PUFA の摂取形態についてはエチルエステルよりも TG の方が消化吸収がよく効果的である^{6),7)}。イコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) は、各種の生理活性が報告されている。しかし魚介類を大量に食べると激しい栓球 (血小板) 減少症を示す例が報告され、その原因として魚介類に多く含まれる長鎖のモノエン酸が推定されている^{8),9)}。一方、生理活性のある純粋かつ単一の PUFA から合成された TG は機能食品としてばかりでなく医薬としても注目されている。高度

に精製された EPA の TG が心臓病の研究のために静注された例がある¹⁰⁾。リパーゼを用いた PUFA の TG 合成は固定化酵素反応の特徴を生かしたもので、PUFA の TG の場合には、付加価値が高いために酵素コストの問題も生じない¹¹⁾。

TG 合成するために、化学量論量の DHA とグリセリンをモレキュラーシーブを用いて、60°C で Fig.-4 のように真空乾燥しながら *Candida antarctica* 由来の固定化リパーゼ (sp 382 ノボノルデスクバイオインダストリ社製) 反応を行うと、Table-1 にあるように TG が 84.5 % 合成された。副産物として分子量千以上のポリマーが検出された。このポリマーは 40°C でも同じく検出され、収率の向上は重合化を防ぐよりは、DG を減少させることであると考え、化学量論量に対しグリセリンの添加量を減少させると、ポリマーの量を増やすことなく DG を減少させ、TG 収率を向上させることに成功した。その結果 95 % 以上の収率で DHA の TG が合成されることになった¹¹⁾。DHA エチルエステルからの合成に際しては、DHA エチルエステルとグリセリンとの混合がしにくいいため激しいかくはんをする必要があった。しかし、Table-2 にあるように反応中の副産物であるポリマーの合成もなく化学量論量の基質が高収量を与え、工業的合成法として興味のあるものである¹¹⁾。

リパーゼの基質特異性を検討すると、DHA, EPA,

アラキドン酸、ガンマーリノレン酸の生理活性の期待される脂肪酸の TG も合成できることがわかった。トリ DHA あるいは、PUFA エチルエステルは、*R. miehei* の固定化リパーゼでは TG が合成しにくく、*C. antarctica*

の固定化リパーゼを用いて合成する必要がある¹¹⁾。

4 油脂分解リアクター

非酵素的な油脂分解は 250~260℃, 50~55 atm の高温高压処理を必要とし、中小規模の分解には適さないものである。一方、酵素的油脂分解法は常温常圧で進行し、地球環境に調和したプロセスであり PUFA の製造や途上国のセッケン製造等への応用が期待されるものである。けれども、常温においては油脂は粘性を帯び、且つ水と油という本来混じりにくい二相に分かれる基質となる。しかも、高価なリパーゼを用いているので、反復使用するために酵素は固定化しなければならない。更に不均一な基質と生産物を固定化リパーゼに効率良く物質移動させるのである。これらの問題点があるため、従来多くの研究がなされているが実用に耐えるものは報告されていない。

1. Reaction mixture ; 2. test tube shaker ; 3. heater at 60℃ ; 4. ethylene glycol ; 5. water trap, packed with molecular sieves 5 A and silica gel, or ethanol trap, packed with granular activated charcoal ; 6. manometer to adjust the vacuum at 5~10 Torr and 7. vacuum pump.

Fig.-4 Reactor with vacuum for dehydration.

Fig.-5 のような、簡易で設備費がかからない油脂分

Table-1 Effect of glycerol concentration on conversion of DHA to TG^a.

Glycerol		Product component (area %)				
Amount (10 ⁻³ mol)	Ratio (%) ^b	Polymer	TG	DG	MG	FA
1.014	100.0	2.7	84.5	12.4	0.4	0.0
0.965	95.2	2.6	94.7	2.4	0.3	0.0
0.939	92.6	2.9	95.8	1.3	0.0	0.0
0.913	90.0	3.4	95.4	1.2	0.0	0.0
0.888	87.5	2.9	95.4	1.8	0.0	0.0
0.863	85.1	3.1	95.2	1.7	0.0	0.0

a Reaction mixtures contained 3.044×10^{-3} mol (1.0 g) of DHA (Idemitsu Materials, Tokyo), 0.1 g of immobilized lipase (SP 382) (Novo Nordisk, Chiba) and various amounts of glycerol. Reaction was carried out at 60℃ for 24 h with shaking and dehydration.

b The ratio=100×glycerol amount in the reactant (mol)/stoichiometric amount of glycerol necessary for synthesizing TG (mol).

Table-2 Effect of glycerol concentration on conversion of DHA ethyl ester (EE) to TG^a.

Glycerol		Product component (area %)				
Amount (10 ⁻³ mol)	Ratio (%) ^b	Polymer	TG	DG	MG	EE
0.374	80.0	0.0	87.7	0.0	0.5	11.3
0.421	90.0	0.0	93.6	0.8	0.0	4.9
0.467	100.0	0.0	94.9	3.7	0.7	0.7
0.514	110.0	0.0	89.8	9.6	0.5	0.0
0.561	120.0	0.0	78.3	20.3	1.3	0.0

a Reaction mixtures contained 1.402×10^{-3} mol (0.5 g) DHA EE (DHA 95 E) (Harima Kasei, Osaka), 0.05 g of immobilized lipase (SP 435) (Novo nordisk, Chiba) and various amounts of glycerol. Reaction was carried out at 50℃ for 24 h with shaking and trapping ethanol by charcoal and vacuum pump. The shaking of the EE substrate should be more vigorous than fatty acid substrate because ester was more difficult to mix with glycerol.

b See Table-1.

1. Fixed bed reactor at 60°C packed with 18 g of Enzyon PF (Rakuto Kasei, Ootsu); 2. oil-water separator; 3. pump for circulation of the reactant at 5 mL/min; 4. pump for oil substrate at 0.375 g/h; 5. pump for oil product at 0.375 g/h; 6. pump for water at 0.096 g/h; 7. pump for water soluble product at 0.096 g/h; and 8. inlet for the reactant in the loop.

Fig.-5 Continuous reactor for hydrolysis of oil.

解リアクターを構築した。ループ式リアクターによる油脂分解の試みはある^{12),13)}が、かくはん槽と固定床のループばかりで、本リアクターのような油水分離槽と固定床のループは初めてである。そのために、連続反応、生産物の連続分別、連続濃縮をインテグレートした機能を有する油水分離性能の良いリアクターを構築できた¹⁴⁾。

Pseudomonas fluorescens biotype I のリパーゼを DowexMWA-1 に固定化した¹⁵⁾、エンチロン PF (洛東化成製) を充填した固定床リアクターおよび米ぬか油および水の入った油水分離槽を用意した。油水分離槽に Fig.-5 のような基質供給口、および生産物回収口を設けた。油状基質として米ぬか油 7 に対してイソオクタン 3 を加えたイソオクタンミセラを使用した。米ぬか油のイソオクタンミセラとともに少量の水もループに載るように油水分離層の反応液を採取し、ループを循環させながら連続運転すると、米ぬか油の分解率は 82~86 % になり、ループに連続供給する油の流速を水の流速の 3.9 倍にするとグリセリンの濃度は 31 % まで濃縮した¹⁴⁾。

上述の油脂分解で用いた固定化リパーゼも我々が開発したものである¹⁵⁾。本固定化リパーゼでいわし油を分解すると、分解率は 90 % 以上になり、分解産物中の DHA および EPA の組成も 9.6 %, 8.1 % と高く、いわし油中の DHA および EPA をほとんど完全に加水分解

できた¹⁶⁾。従って、連続分別された油状生産物を他の脂肪酸と混合し、カリウム塩にすることにより、乾せん等の皮膚疾患に有効な *n*-3 PUFA を含んだセッケンを調製できるであろう。

含油成分を浮上あるいはイソオクタン抽出等により、油分を連続的に濃縮し、酵素分解する。本リアクターは、製油工業廃水、油分濃度が 1 % 以上になるようなちゅう(厨)房廃水、食肉センター、洗毛廃水、皮革廃水などの油分処理とともに、生産された脂肪酸はセッケン原料として利用され、生物処理による廃水処理の安定性が維持される。油分は、 β -酸化による生物処理をしても、安定なスラッジ状態を保って規制値 (ヘキサン抽出物質 30 mg/L) 以下にすることが難しく、焼却あるいは埋め立ての (有償) 処理をしている事業所には有利であろう。

5 おわりに

固定化リパーゼ反応においては、微水系でエステル合成、水系でエステル分解が進行する。高度不飽和脂質の酸化に関しては、空気中では不飽和度の高い脂質ほど酸化されやすいが、水系においては不飽和度の高いもの程酸化されにくいと報告されている¹⁷⁾。固定化リパーゼの研究を、プロセス研究以外に、高度不飽和脂質の酸化機構に応用しようと試みた¹⁸⁾。

脂質は、自己集合性、界面活性等の特性を持ち、界面および表面の性質を制御する。表面に存在する脂質は酸化ストレスにさらされる。広い生理機能を有する高度不飽和脂質は、物性的にも酵素利用の側面でも興味のある対象である。〔平成 7 年 (1995 年) 4 月 12 日受理〕

文 献

- 1) 西本次雄, 泉 次夫, 久保田隼人, 油化学, 41, 960 (1992)
- 2) 小杉佳次, 化学と生物, 31, 52 (1993)
- 3) F. Ergen, M. Trani, G. Andre, *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 195 (1990)
- 4) Y. Kosugi, T. Kunieda, N. Azuma, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 445 (1994)
- 5) Y. Kosugi, N. Azuma, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 407 (1994)
- 6) H.J. Thomasson, J.J. Gottenbos, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111, 261 (1962)
- 7) L.D. Lawson, B.G. Hughes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 152, 328 (1988)
- 8) S.H.J. Goodnight, W.S. Harris, W.E. Connor, *Blood*, 58, 880 (1981)
- 9) H.M. Sinclair, *Drugs Affecting Lipid Metabolism*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam, 1982, p. 25
- 10) T. Hamazaki, S. Fisher, H. Schwer, C.O. Meese, M. Urahase, A. Yokoyama, S. Yano, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 151, 1386 (1988)

- 11) Y. Kosugi, N. Azuma, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 1397 (1994)
 - 12) Y. Kimura, A. Tanaka, K. Sonomoto, T. Nihara, S. Fukui, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 107 (1983)
 - 13) I.C. Omar, H. Saeki, N. Nishio, S. Nagai, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 99 (1988)
 - 14) Y. Kosugi, N. Tomizuka, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, in press
 - 15) Y. Kosugi, H. Suzuki, *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 369 (1992)
 - 16) 小杉佳次, C. Lopez, 東 直輝: 第 30 回油化学討論会・研究発表会講演要旨集, p. 59 (1991)
 - 17) K. Miyashita, E. Nara, T. Ota, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1638 (1993)
 - 18) 小杉佳次, 笠原勝次: 第 33 回油化学討論会・研究発表会講演要旨集, p. 111 (1994)
-