ノ ー ト

酵素によるステロールグリコシドのアシル化

無類井建夫・辻 宏明・新井 有里

日清製油株式会社研究所 (〒221 横浜市神奈川区千若町 1-3)

Enzymatic Acylation of Sterylglycosides

Tateo MURUI, Hiroaki TSUJI, and Yuri ARAI

Research Laboratory, The Nisshin Oil Mills Ltd.

(1-3, Chiwaka-chow, Kanagawa-ku, Yokohama-shi, 〒221)

Specific acylation of sterylglucosides with enzyme was carried out for 20 commercially available lipases. Lipase OF from *Candida cylindracea* indicated the highest acylation in chloroform and phosphate buffer (pH 7.0). In chloroform, lipase OF introduced saturated and unsaturated fatty acids with 8 to 18 carbons introduced into the hydroxyl group at the 6-position of sugar moiety. But the acylation of fatty acids branched at carbon adjacent to the carboxyl group proceeded with considerable difficulty. In phosphate buffer, unsaturated fatty acids were introduced to a greater extent than in chloroform, but still the acylation of saturated fatty acids proceeded to a lesser degree owing to low solubility in phosphate buffer. Reaction time longer than 96 h caused the formation of di-acylated sterylglucosides. A standard substance for determining acylated sterylglucosides could be prepared by the present method.

1 緒 言

ステロールグリコシドはリン脂質と共に細胞膜の構成成分として植物界に広く分布している。天然には糖部の6位のヒドロキシル基に脂肪酸の結合したステロールグリコシド (acylated sterylglucoside, 以下 ASG) と遊離状態 (non-acylated sterylglucoside, 以下 NASG) の2種類の存在が知られている。製油の工程ではこれらの物質は油脂と共に油糧種子から抽出されるが、大部分は脱ガム工程でリン脂質と共に油さい¹⁾として濃縮される。ステロールグリコシドはこれまで油脂の品質や物性に影響しない物質と見なされていたことから、製油において注目されることは少なかった。しかし近年その生理的活性²⁾が見いだされたことにより、医薬品や健康食品への利用の可能性に興味を持たれるようになり、その品質管理に係わる分析法の必要性も高まりつつある。筆者らが先に開発した ASG の分析法³⁾では、濃縮大豆リン脂質から単離した ASG を標準物質に用いて定量した。この方法は操作が煩雑なばかりでなく、ASG を構成する脂肪酸が単一でないため、クロマトグラフが複雑になり、定量計算には不便であった。このような事情か

連絡者：無類井建夫

ら特定の脂肪酸を有する ASG を入手する方法の開発が望まれていた。NASG のアシル化については Kiributi ら⁴⁾の化学的方法が報告されているが、導入するアシル基の数や結合位置の制御が難しく、分析用の標準物質調製法として利用することは困難であった。筆者らは酵素により NASG の6位炭素のヒドロキシル基にアシル基を導入し、天然品と同じ構造の ASG を調製する方法を検討したところ、一部の市販のリパーゼには有機溶剤中でその作用のあることを見いだした。本報では ASG 定量分析用の標準物質の調製を目的として、酵素の選別及びそれを用いて濃縮大豆リン脂質から単離した NASG に、種々の脂肪酸を導入する条件について調べた結果を報告する。

2 実 験

2・1 試料及び装置

2・1・1 NASG 及び ASG の調製

濃縮大豆リン脂質 180 g をアセトン 2500 mL にかくはんしつつ滴下し、不溶物を汙過して集めた。室温減圧下で脱溶剤した不溶分 100 g をヘキサン約 1000 mL に分散し、ヘキサンの調製したシリカゲルカラム (ワコーゲル C-100, 200 g, 和光純薬) に注入し、続いてヘキ

サン 300 mL を流した。さらにエタノールを流して最初の 300 mL を区分 F-1 とし、脱溶剤として ASG (4.5 g) を得た。さらにエタノール 1000 mL を続けて流して区分 F-2 とし、脱溶剤として NASG (3.1 g) を得た。NASG 区分をシリカゲル薄層クロマトグラフィーに供して、クロロホルム/メタノール/ギ酸 (90 : 15 : 1, vol/vol) で展開後希硫酸を噴霧して 120℃ の乾燥機中で加温する。ステロールに由来する呈色が単一であることを確認してアシル化試験用の NASG とした。また ASG 区分はクロマトグラフィー及び NMR 用の標準 ASG とした。

2・1・2 リパーゼ及び脂肪酸

本報では市販のリパーゼ 20 種類を対象にアシル化作用の有無を調べ、各酵素の名称及び起源を Table-1 に示した。導入するアシル基としては以下に示す 13 種の脂肪酸について検討し、特に精製等をせずにそのまま用いた。

Table-1 Comparison of acylation of non-acylated-sterylglycoside with commercially available lipases.

Name	Origin	Yield of ASG* (%)	
		solvent 1	solvent 2
OF	<i>Candida cylindracea</i>	12.5	25.1
AY	<i>Candida rugosa</i>	0.0	0.0
L	<i>Candida lipolytica</i>	0.0	0.0
G	<i>Penicillium camembertii</i>	6.0	18.1
R	<i>Penicillium roqueforti</i>	0.0	0.0
P	<i>Pseudomonas</i> sp.	2.1	17.5
AK	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.0	0.0
MF	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.0	2.5
D	<i>Rizopus delemar</i>	0.0	0.0
F	<i>Rizopus javanicus</i>	0.0	0.0
N	<i>Rizopus niveus</i>	0.0	0.0
A 5	<i>Rizopus japonicus</i>	0.0	0.0
M	<i>Mucor javanicus</i>	1.0	3.0
L 60	<i>Mucor miehei</i>	0.0	0.0
GC	<i>Geotrichum cadidum</i>	5.0	5.2
TY	<i>Chromobacterium viscoum</i>	1.0	2.0
PEG	<i>Peragastric esterse</i>	0.0	0.0
A	<i>Asperagillus niger</i>	0.0	0.0
PL	<i>Alcaligenes</i> sp.	0.0	0.0
QL	<i>Alcaligenes</i> sp.	0.0	0.0

solvent 1 : chloroform containing 0.5% ethanol
solvent 2 : phosphate buffer (pH 7.0)

non-acylated sterylglycoside (50 mg) was incubated with oleic acid (508 mg) and lipase (50 mg) at 60℃ for 96 h.

* : acylated sterylglycoside

酪酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、12-ヒドロキシオクタデカン酸、2-ヘプチルウンデカン酸、2-(1, 3, 3-トリメチルブチル)-5, 7, 7-トリメチルオクタン酸

2・2 アシル化

クロロホルム (安定剤としてエタノールを約 0.5 % 含有) 5 mL をバイアル瓶に採り、NASG 50 mg、オレイン酸 1270 mg、リパーゼ 50 mg を分散する。ヘッドスペースを窒素で置換して密栓した。マグネチックスターラーでかくはんしながら、60℃ の恒温槽に保持した。経時的に 0.1 mL を取り出し、脱溶剤としてピリジン 0.1 mL に溶解し、PTFE フィルター (0.2 μ m) を通してアシル化率測定用検液とした。また水系でのアシル化では、クロロホルムに代えて 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 4.75 mL 及び *t*-ブタノール 0.25 mL を加え、以下同様に操作した。またオレイン酸以外の脂肪酸を導入する場合も、NASG と脂肪酸のモル比を 1 : 50 とした。

2・3 アシル化率の測定

アシル化率測定用検液を以下の条件でゲル浸透クロマトグラフィーに供し、ASG と NASG のピーク面積の合計に対する ASG ピーク面積の百分率をアシル化率とした。なおクロマトグラフィーの構成は、ポンプシステム (600 E, Waters) に、示差屈折計検出器 (RID-6 A, 島津製作所) 及びカラム PL Gel (50 A, 7.5 $\times$ 300 mm, 2 本連結, Polymer Laboratories) を接続して用いた。移動相にはテトラヒドロフランを流速 0.5 mL/min で流し、カラム温度は室温とした。

2・4 ASG の精製

クロロホルム中で NASG 1 g をアシル化した時の反応物を減圧下で脱溶剤し、残さ (約 28 g) にアセトン 200 mL を加えて不溶分 (約 2 g) を集める。クロロホルム/エタノール (1 : 1, vol/vol) 約 50 mL に分散してシリカゲルカラム (ワコーゲル C-100, 25 g, 和光純薬) に供する。エタノール 100 mL を流して溶出する区分を集め、脱溶剤して ASG を得た。

3 結果及び考察

3・1 酵素と反応系の選別

市販の酵素の中からアシル化作用を有するリパーゼの選別を目的として、各酵素をクロロホルム及びリン酸緩衝液中でアシル化反応に供した。NASG をオレイン酸 (モル比 1 : 20) と 60℃ で 96 h 反応したときのアシル化率を Table-1 に示した。アシル化の程度は酵素の起源により大きな差異は見られ、リパーゼ OF, P, G, GC の反応物ではゲル浸透クロマトグラム上に NASG (24.9 min) より早く溶出する新たな成分 (24.3 min)

Conditions : column PL Gel, detection refractive index, mobile phase tetrahydrofuran, flow rate 0.5 mL/min

Fig.-1 Gel permeation chromatograms of reaction mixture.

が明りょうに検出された (Fig.-1)。これを分取して 2・1・1 に示す TLC に供すると、その R_f 値は標準 ASG と一致し、アシル化物の生成が確認された。これら 4 種の酵素はクロロホルム及びリン酸緩衝液いずれにおいてもアシル化作用を示したが、リン酸緩衝液中ではより高いアシル化率が得られた。リパーゼ M, TY, MF, D にもわずかではあるが ASG の生成を認めたが、*Aspergillus*, *Pregastric*, *Rizopus*, *Alcaligenes* に由来する酵素では全く確認できなかった。*Candida cylindracea* に由来する酵素 OF による反応は、非水系かつ酵素を粉末状で分散して使用する不均一系の反応にもかかわらず、他に比べて高いアシル化率を示した。

本報ではアシル化作用を示した酵素のなかで水系及び非水系ともに特に高い反応率を示したリパーゼ OF についてさらに調べた。非水系の反応について、クロロホルム以外の有機溶剤中での反応を調べたところ、シクロヘキサン、イソプロピルエーテル、トルエン、ピリジン、アセトニトリル、及びアセトン中ではアシル化は確認されなかったが、酢酸エチル中で ASG の生成が認められた。しかし酢酸エチル中での反応物から、オレイン酸エチル及び酢酸が導入された ASG の生成が検出された。これはオレイン酸と酢酸エチルのエステル交換でオレイン酸エチルを生成し、同時に遊離した酢酸の一部がオレイン酸と共に導入されたものと考えられる。従って特定

の脂肪酸の導入を目的とする場合には酢酸エチルを反応溶媒として用いることは不適當であった。またクロロホルム中での反応物からも多量のオレイン酸エチルの生成が認められた。これは使用したクロロホルムに、安定剤として含まれるエタノールがオレイン酸と反応したものであった。エタノールを含まないクロロホルム中でのアシル化率は著しく低下したことから、エタノールにはアシル化反応を促進する作用のあることが予想された。そこで先に検討してアシル化の確認できなかった有機溶剤に、エタノールを 5~0.5 % 添加してアシル化を試みたが、促進する効果は認められなかった。

一方リン酸緩衝液中では、酵素は完全に溶解するが NASG 及びオレイン酸の溶解性は低く、クロロホルム中と同様に不均一系であった。そこで水溶性有機溶剤をリン酸緩衝液に加えて溶解度を高めた系でのアシル化率を調べた。*t*-ブチルアルコール、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトン、アセトニトリルを添加したところ、*t*-ブチルアルコールを 5 % 添加した時に、アシル化率の向上が認められた。

3・2 脂肪酸の種類とアシル化率

脂肪酸の炭素数、不飽和度及び置換基がリパーゼ OF のアシル化率に及ぼす影響について調べ、60℃で 96 h 後のアシル化率を Table-2 に示した。クロロホルム中では炭素数 10 以上の直鎖の飽和及び不飽和脂肪酸については 50 % 以上のアシル化率が得られたが、酪酸、へ

Table-2 Acylation of non-acylated steryl glycoside with various fatty acids by lipase from *Candida cylindracea*.

Fatty acid	Yield of ASG (%)	
	solvent 1	solvent 2
Butyric	4.1	0.0
Hexanoic	0.5	0.0
Octanoic	42.9	0.0
Decanoic	51.6	0.0
Lauric	53.0	0.0
Myristic	57.3	6.9
Palmitic	56.3	8.0
Stearic	52.6	8.0
Oleic	54.6	66.5
Linoleic	50.3	66.0
12-Hydroxyoctadecanoic	44.4	0.6
2-Heptylundecanoic	22.0	26.3
2-(1, 3, 3-Trimethylbutyl)-5, 7, 7-trimethyloctanoic	0.0	0.0

solvent 1 : chloroform containing 0.5% ethanol
solvent 2 : phosphate buffer (pH 7.0) containing 5% *t*-butyl alcohol

The details of reaction were described in 2・2

キサン酸等の炭素数の少ない脂肪酸では著しく低下した。また置換基を有する脂肪酸の導入では、12-ヒドロキシオクタデカン酸は他の直鎖脂肪酸と同程度にNASGをアシル化した。しかし2位に置換基を有する2-ヘプチルウンデカン酸では大きく低下した。さらに複雑な構造の置換基を2位に有する2-(1, 3, 3-トリメチルブチル)-5, 7, 7-トリメチルオクタン酸は全く導入されなかった。このようにリパーゼ OF によるアシル化では、置換基がカルボキシル基から遠い位置にある脂肪酸ではその影響は少ないが、カルボキシル基に隣接する場合には酵素の作用は著しく妨害され、さらに置換基の形状も妨害の程度に大きく関係した。一方同じ脂肪酸についてリン酸緩衝液中でのアシル化率を調べると、不飽和脂肪酸はクロロホルム中より高いアシル化率を示したが、ステアリン酸及びそれより炭素数の少ない飽和脂肪酸では著しく低いアシル化率を示した。また置換基を有する脂肪酸では、2-ヘプチルウンデカン酸はクロロホルム中と同程度に導入されたが、12-ヒドロキシオクタデカン酸はほとんど導入されず、同じ酵素を用いても反応系によりアシル化率に大きな差を示した。これは炭素数の多い飽和脂肪酸や12-ヒドロキシオクタデカン酸の緩衝溶液に対する溶解性が悪いこと、及び炭素数の少ない脂肪酸では反応系 pH の低下等が原因と考えられた。

3.3 反応の速さと特異性

リン酸緩衝溶液中では約 75 h でアシル化は平衡に達したが、クロロホルム中では酵素も NASG も共に難溶性のため、平衡に達するまでにより長い時間を必要とした。またリン酸緩衝溶液中の反応ではクロロホルム中におけるよりも高いアシル化率が得られた (Fig.-2)。クロロホルム中での遅いアシル化は NASG に対する脂肪酸の比を高くする (1 : 200) ことで、リン酸緩衝液中と同程度の平衡値が得られた。しかしリン酸緩衝液中での反応では、反応時間が長くなるにつれて、クロマトグラム上の ASG のピーク幅が広く (Fig.-1) なり、ジアシル化ステロールグリコシドの生成が推定された。クロロホルム中では 200 h を越える反応でもジアシル化ステロールグリコシドの生成は認められず、長い反応時間を必要とするが、本研究の目的は有利であった。

クロロホルム中で得られた ASG の一部を重ピリジンに溶解して C-NMR に供して糖の炭素に由来するシグナルを観測した。NASG では 62.4 ppm に観測された6位の炭素のシグナルが、ASG では 64.3 ppm にシフト

The Detail of reaction was described in 2.2
Fig.-2 Yield of acylated steryl glycoside (ASG) with lipase from *Candida sylindracea*.

した。さらに 173.9 ppm にカルボニル炭素の存在を示す新たなシグナルが認められた。これらのシグナルは濃縮大豆リン脂質から単離した標準 ASG のそれと一致し、6 位の炭素にアシル基が導入されたことを示した。

4 ま と め

ステロールグリコシドを特異的にアシル化する酵素の選択とその反応条件を検討した。その結果、*Candida sylindracea* に由来するリパーゼの使用が最も効果的であった。この酵素はクロロホルムもしくはリン酸緩衝液中で用いた場合でも高いアシル化率が得られ、またクロロホルム中においては炭素数 8 から 18 の飽和及び不飽和脂肪酸を導入することができた。しかし2位に置換基を有する脂肪酸ではアシル化率は低下し、その程度は置換基の形状に大きく依存した。リン酸緩衝液中では不飽和脂肪酸はクロロホルム中よりも高率で導入されたが、飽和脂肪酸でのアシル化は著しく低下した。また長時間の反応ではジアシル化物の生成が認められた。

(平成 6 年 (1994 年) 9 月 30 日受理)

文 献

- 1) 無類井建夫, 福島朱美, 油化学, 42, 442 (1993)
- 2) M. Tateo, M. Yoshikawa, H. Takeuchi, S. Fujii, H. Mizobuchi, H. Takeuchi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 494 (1994)
- 3) 無類井建夫, 関 洋子, 油化学, 42, 984 (1993)
- 4) T. Kiributi, N. Yasumatsu, S. Funahashi, *Agr. Biol. Chem.*, 31, 1244 (1967)