◇◇◇ 原著論文 ◇◇◇

リパーゼによる魚油由来ドコサヘキサエン酸の加水分解に対する レシチンを用いた W/O マイクロエマルジョンの調製条件の影響

小池秀明, 今井正直[†], 鈴木 功

日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻

Hydrolysis of Docosahexaenoic Acid from Fish Oil in Lecithin Based W/O Microemulsion

Hideaki KOIKE, Masanao IMAI[†], and Isao SUZUKI

Course in Bioresource Utilization Sciences, Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon University,
1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan

Lipase catalyzed hydrolysis reaction of fatty acid bonding with triglyceride docosahexaenoic acid (DHA) was attained with the aid of soybean lecithin based W/O microemulsion. This reaction was fruitful as a pretreatment of enrichment of DHA in triglyceride from marine bioresources. Ester-bonded DHA was hardly hydrolyzed by *Candida rugosa* lipases due to their steric hindrance. On the other hands, mono unsaturated fatty acid in triglyceride was easily hydrolyzed by lipase specificity. Phosphate buffer ($6.0 \leq \text{pH} \leq 7.5$) was used as an aqueous phase and 2,2,4-trimethylpentane was employed as an organic solvent. Molar ratio of water to lecithin presented by W_0 was used as a measure of water content. Initial reaction rate was strongly depended on the W_0 value and appeared a maximum at *ca.* $W_0 = 10$. The optimal lecithin concentration was found to be 12 mM, which was almost same as the critical micelle concentration. Soybean lecithin was superior to AOT to obtain higher initial reaction rate due to moderate electrostatic interaction. Temperature dependency obviously appeared under the suitable water content and the lecithin concentration.

Key words: Docosahexaenoic Acid, Lipase, *Candida rugosa*, Soybean Lecithin, W/O microemulsion

1. 緒 言

ドコサヘキサエン酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) は機能性が高く、健康食品などに幅広く用いられている。なかでもトリグリセリド型 DHA は人体へ吸収されやすいことから、その応用が期待されている[1]。

しかし、トリグリセリド型 DHA は、側鎖に脂肪酸が共存するため、その濃縮工程を容易にする必要がある。リパーゼを用いた位置選択性による加水分解反応を利用して、側鎖の脂肪酸を除去する試みが報告されている[2,3]。Tanaka ら[4]は、6 種類の異なる起源のリパーゼを用いた加水分解反応によって魚油中の DHA 濃縮を行っている。とくに *Candida rugosa* 由来のリパーゼにおいて魚油中の DHA を天然に比して約 3 倍に濃縮している。Wanasundara ら[5]は 8 種類のリパーゼの反応活性を比較し、その結果 *Candida cylindracea* がもっと

も高い反応活性を示した。また、Yan ら[6]は 0.1 M のリン酸、クエン酸およびマレイン酸-トリス-NaOH 緩衝液を用いた油水二相系にて、*Candida rugosa* 由来のリパーゼを用いてマグロ油を基質として加水分解反応を行い、緩衝液の影響を検討している。加水分解率は 85% 以上を示している。上記の反応はいずれも基質を含む有機相と酵素を含む水相を攪拌し、単なる油水二相分散系で加水分解反応を行ったものである。

また、Gómez-Meza ら[7]は TritonX-100 を用いてエマルジョン系を生成し、5 種類のリパーゼによって魚油の加水分解を行い、反応活性を比較するとともに、反応終了時に尿素を添加し、高度不飽和脂肪酸の分離に効果があったことを報告している。

W/O マイクロエマルジョン系は、疎水性基質を用いる酵素にとって有効な反応媒体として知られている。基質濃度が高く、かつ有機溶媒による酵素の失活がない点で優れている。リパーゼを用いた脂質の加水分解反応やエステル交換反応を行った研究は多く報告されているが、魚油を基質とし、加水分解反応の反応活性の最適

条件に関する研究例は見当たらない。

本研究の目的は、魚油由来の DHA の濃縮操作として重要な加水分解反応を W/O マイクロエマルジョン系で行う。反応活性を支配する主たる因子として、有機相に可溶化される水分量、両親媒性成分としてのレシチン濃度と反応活性の相関を求めるとともに、反応活性の温度依存性と活性化エネルギーについて基礎的検討を行った。

2. 実験装置および方法

2.1 試薬

両親媒性成分として、大豆レシチン（和光一級，アセトン可溶分 40% 以下，和光純薬工業（株））を用いた。大豆レシチンは生体適合性に優れ，エマルジョン形成の両親媒性成分として好適である。本研究ではリン脂質の平均的な純度を 40% とし，以下の議論では代表成分をホスファチジルコリンとして，リン脂質としての平均モル数を推算した。

有機相には W/O マイクロエマルジョン系において幅広く用いられている 2, 2, 4-トリメチルペンタン（イソオクタン，99.0%，和光純薬工業（株））を使用した。W/O マイクロエマルジョン系に用いる有機溶媒の選択基準は種々考えられるが，酵素反応の有機溶媒として高い反応活性が期待できる点[8]を重視してイソオクタンとした。魚油由来の供試 DHA オイルとして DD-OIL46（日本水産（株））を用いた。DHA 含量として約 50% である。DHA 含量として高く調製された加工魚油であるが，基礎的な反応活性を探索するための試料として採用した。リパーゼの起源として用いた *Candida rugosa* はこの分野の既往の研究でも，もっとも多く用いられており，W/O マイクロエマルジョン系における反応活性を比較検討するうえで，本研究においてもこの種の標品（2.3U/mg，Fluka）を用いた。酵素の品位は必ずしも高いとはいえないが，この反応プロセスが濃縮工程の前段階に位置付けられる経済性を考慮した。酵素水溶液の溶媒はリン酸緩衝液（pH 7.2，0.1M）とし，W/O マイクロエマルジョンの内部微水相に含まれる成分である。

2.2 酵素加水分解反応

バイアル管 130 mm × φ42 mm にレシチン 12 mM/イソオクタン溶液 45 ml を準備し，基質の DHA オイル 1 g をシリンジにて添加した（反応初期の液深 30 mm）。マグネティックスターラーにて十分に攪拌・混合した。酵素 1 mg（2.3 U 相当）を，リン酸緩衝液に溶解させ，ボルテックスミキサーで攪拌した。例えば， $W_0 = 10$ の場合，添加すべき緩衝水溶液は 0.1082 ml となる。この酵素を含む緩衝液とレシチン-イソオクタン溶液 5 ml をボルテックスミキサーにて攪拌・混合し，W/O マイクロエマルジョン生成のための一次乳化とした。この酵素を含

む一次乳化液をイソオクタン-DHA 溶液に添加した時点反応開始時とした。反応は恒温水槽で 313 K（30℃）に管理された条件下で行った。ただし，反応活性と温度の影響を求める際には 283 K ~ 328 K（10℃ ~ 55℃）の範囲で温度条件を設定した。

反応溶液は，マグネティック・スターラーにより一定強度で常に攪拌し，酵素反応の進行中には均一に分散した状態を維持できるようにした。マイクロピペットを用いて所定時間毎に 0.2 ml ずつ反応溶液からサンプリングした。酵素の加水分解反応により生成された遊離脂肪酸量を時間経過にしたがって定量することにより，初期反応速度を求め，酵素活性の指標とした。遊離脂肪酸の定量には，Lowry-Tinsley[9]による比色定量法を用いた。

2.3 Lowry - Tinsley 比色定量法

共栓試験管に酢酸銅-ピリジン溶液 1 ml，ベンゼン 5 ml を準備した。サンプルを 0.2 ml 添加し，ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌した。3000 rpm にて 2 分間遠心分離したのち，薄青色に着色した上澄みのベンゼン相を速やかにガラスセルに移し，紫外可視分光光度計（UVmini 1240，（株）島津製作所）により 715 nm における吸光度を測定した。なお，酵素添加直前のレシチンを含むイソオクタン-DHA 有機相を分取し，濃度校正のブランク試験に供した。

2.4 Karl - Fisher 滴定法

反応開始直後に反応中のエマルジョン相を 5 ml 程度分取し，Karl-Fisher 滴定装置（MKA-210，京都電子工業（株））により水分量を測定した。これより，初期設定基準の可溶化水分量と両親媒性成分のモル比 W_0 を式 (1) にしたがって算出した。

$$W_0[-] = \frac{[\text{H}_2\text{O}-\text{mol}]}{[\text{Amphiphile}-\text{mol}]} \quad (1)$$

3. 結果および考察

3.1 W_0 値の影響

酵素の初期反応速度と W_0 との相関を Fig. 1 に示す。レシチン濃度にかかわらず $W_0 = 10$ において極大値を示す傾向が認められた。レシチン濃度 12 mM の系がレシチン濃度 20.5 mM の系に比較して約 2 倍の高活性を示した。

本研究のように反応活性が特定の W_0 において極大値を示す傾向はリパーゼの反応活性の特徴的な依存性として多く報告されており，レシチンを両親媒性成分とする W/O マイクロエマルジョン系でも報告されている[10]。AOT のような陰イオン性両親媒性成分添加系では，親水基末端の静電的荷電の影響を受けて，低水分量条件

Fig. 1 Effect of W_0 on the initial reaction rate. pH7.2, 303K.

ではマイクロエマルション滴のサイズが小さいため、内部微水相の水分子が束縛された挙動を示し、いわゆる自由水が十分量ないことが指摘されている[11]。本研究で用いたリン脂質は静電的荷電の影響がAOTに比較して弱いと考えられるが、リン脂質の加水分解の反応系においても本研究と同様の反応活性の極大値を呈する依存性が報告されており[12]、一般的な傾向と考えられる。また、リン脂質系においてもマイクロエマルション滴のサイズが可溶化水分量に比例する傾向が認められる[12]。可溶化水分量が微小な条件下では、AOT系と類似の影響が酵素活性に現れていると推察することができる。一方、 W_0 の高い範囲においては、水分子の束縛が緩和され、酵素活性の回復と発現に好影響を与えるとともに、最適値を超える過剰な水の添加はミセル界面の不安定化を招き、酵素活性の低下をもたらしたと考えられる。

なお、本研究での W_0 の変域では反応媒体は懸濁を生じることなく、黄色透明をよく維持しており、W/Oマイクロエマルションは形成されたことが目視観察によっても判断することができる。

3.2 両親媒性成分濃度の影響

Fig. 1において、レシチン濃度 12 mM における反応速度がレシチン濃度 20.5 mM に比較して高い。レシチ

Fig. 2 Effect of lecithin concentration on the initial reaction rate. $W_0=10$, 303K, pH=7.2.

Fig. 3 Correlation between the lecithin concentration and the solubilized water concentration.

ン濃度と初期反応速度との相関を Fig. 2 に示す。初期反応速度は W_0 一定の条件下($W_0=10$)においても、レシチンの濃度上昇に従い約 10 倍以上の増加を示し、12 mM において初期反応速度は極大値を示した。一方、有機相可溶化水分量の測定より、レシチンの臨界ミセル濃度(CMC)は約 15 mM であることが求められた (Fig. 3)。反応活性にとって最適なレシチン濃度が CMC にほぼ一致したことから、ミセル形成と反応活性は密接に関係しており、ミセルが形成される最低限のレシチン濃度が高い反応活性をもたらすことが示唆された。

なお、レシチン濃度の高い範囲において反応活性の低下がみられたことから、レシチンの過剰添加は反応活性の発現にとって好ましくないようである。 W_0 一定の条件下では、マイクロエマルションのサイズはほぼ一定と考えることができるので、レシチン濃度の増大はマイクロエマルションの数の増加をもたらす。マイクロエマルションの数が増加することによって、酵素が入っていないマイクロエマルションの数が増えることになる。マイクロエマルションの合一・再分散の運動を考慮すると、このような空のマイクロエマルション中に基質である DHA が取り込まれたり、あるいはマイクロエマルションの微小界面に付着するような状況が考えられる。このような状況下では、酵素濃度が一定であっても実質的に反応に寄与できない基質が増える可能性を考えることができる。そのため、見かけ上反応速度が低下したと考えられる。他にも、レシチンと酵素分子の相互作用もレシチン濃度の増大によって変化し、酵素の活性点と基質分子の出会いを阻害する可能性も指摘することができる。

また、W/O マイクロエマルション相の見かけの粘度を測定した。レシチン濃度が 0 mM (イソオクタン相) から 30 mM の実験範囲で、粘度は 4.02×10^{-4} Pa·s から 5.11×10^{-4} Pa·s に線形比例して増大した。AOT 系の結果から類推すると、 W_0 値一定のもとではミセルサイズがほぼ一定と推測することができることから、レシチン濃度の増大とともに W/O マイクロエマルション相の粘度が増大することは、マイクロエマルション滴の形

状の変化を含めた相内の微細構造のうえで変化が生じていることを反映していると考えられる。

見かけの粘度の増大によって、一般には基質の拡散抵抗の増大が予想される。しかし、反応速度の低下の原因は単に拡散抵抗の増大のみによって決まるものではなく、エマルション相を構成している微細な界面の分子層の構造変化と酵素分子の詳細な可溶化状態も加味して今後考察の必要がある。

3.3 両親媒性成分の種類の影響

両親媒性成分の選択はマイクロエマルション相の生成の難易ばかりでなく、可溶化された注目分子の活性やその応用にも影響を与える。従来、安定なマイクロエマルションを形成する優れた両親媒性成分として AOT が広く用いられ、多くの知見が集積されている。しかしながら、本研究のように食品産業のプロセスの一環として位置付けられる反応操作では AOT の利用は最終的に望めない。そこで生体適合性に優れた成分を両親媒性成分として、プロセスを構築する必要がある。本研究ではこの観点から大豆由来のレシチンを選択し、AOT 分子を用いた場合と反応活性を比較した (Fig. 4)。

それぞれの両親媒性成分は、ともに $W_0=10$ で反応活性が極大値を呈する傾向を示した。初期反応速度の極大値は、レシチン系のほうが、AOT 系のそれに比べて約 1.4 倍高い値を示したことより、レシチンを利用することは生体適合性ばかりでなく、高い反応活性の面からも有効であることが示された。

ここで、両親媒性成分の濃度はともに 12 mM に設定されているので、 $W_0=10$ 一定のもとでは各系とも可溶化水分量も等しい条件といえる。すなわち、水分量と両親媒性成分がともに等しい分子数の条件下で両親媒性成分の種類の相違が現れたことを意味する。この点を考慮すると、AOT は親水基末端が陰イオンに解離しており、

Fig. 4 Change of initial reaction rate with W_0 value. Comparison of amphiphile component used in W/O microemulsion. ○: AOT, ●: Lecithin, 303K.

Fig. 5 Effect of temperature on the initial reaction rate. The data a) – d) were used for estimation of the activation energy.

ミクロ界面近傍に存在する酵素分子に対し、レシチンに比較してやや強い静電的影響をもたらすことが予想される。一方、レシチンの親水基末端は両性イオン性を示し、水相の pH によってイオン性は異なるものの、一般に AOT に比べて静電的相互作用が低く、分子のサイズも AOT に比べて大きいので、電荷密度も低いことを指摘することができる。

3.4 反応温度の影響

初期反応速度に対する反応温度の影響を検討した (Fig. 5)。283 K (10°C) から 313 K (40°C) までの領域では温度の上昇に従い、初期反応速度は急激に増大し、約 10 倍の値に達した。316 K (43°C) 以上の温度範囲では急激に低下に転じ、熱的な失活が認められた。反応速度が上昇する変域で Arrhenius の式から算出された活性化エネルギーは $135 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ であった。この値は酵素の存在するミクロ界面の状態変化も含めたエネルギー量として理解すべきと思われるが、この種の酵素反応の活性化エネルギーとして妥当なレベルである [13]。疎水性媒体における酵素反応では、しばしば耐熱性の向上が報告されているが [14,15]、本研究では目立った影響は認められなかった。

4. 結 言

魚油由来の DHA 濃縮操作として重要な魚油の加水分解反応を W/O マイクロエマルション系で行った。反応活性に対する有機相水分量の最適値、並びに両親媒性成分としてのレシチンの最適濃度を求めた。

その結果、可溶化水分量とレシチンのモル比である W_0 値が 10 の条件で初期反応速度の極大値が存在した。 W_0 値が 10 の条件下でレシチンの最適濃度は 12 mM であった。反応温度の影響を 283 K ~ 328 K (10°C ~ 55°C) で求めたところ、温度の上昇に従い、初期反応速度は急激に増大し、316 K (43°C) で極大値 ($2.8 \times 10^{-7} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$ 、

$W_0=10$) を示した。反応速度が上昇する変域で Arrhenius の式から算出された活性化エネルギーは $135 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ であった。

謝 辞

本研究を行うにあたり、基質として魚油 DD-OIL46 を提供下さいました、日本水産株式会社に感謝申し上げます。

参 考 文 献

- [1] L. D. Lawson, B. G. Huges; Human absorption of fish oil fatty acid as triacylglycerols, free acids, or ethyl ester. *Biochem. and Biophys. Res. Com.*, **152**, 328–335 (1998).
- [2] T. Hoshino, T. Yamane, S. Shimizu; Selective hydrolysis of fish oil by lipase to concentrate n-3 polyunsaturated fatty acids. *Agri. Biol. Chem.*, **54**, 1459–1467 (1990).
- [3] 鈴木一昭; リパーゼによる DHA の濃縮技術. 月刊フードケミカル, **8**, 19–26, 1998.
- [4] Y. Tanaka, J. Hirano, T. Funada; Concentration of docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of fish oil with *Candida cylindracea* lipase. *JAOCS*, **69**, 1210–1214 (1992).
- [5] N. U. Wanasundara, F. Shahidi; Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in acylglycerols from marine oils. *JAOCS*, **75**, 945–951, 1998.
- [6] H. Yan, H. Noritomi, K. Nagahama; Concentration of docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of tuna oil with *Candida rugosa* lipase. *Kagaku Kougaku Ronbunshu*, **28**, 31–35 (2002) (in Japanese).
- [7] N. Gámez-Meza, J. A. Noriega-Rodríguez, L. A. Medina-Juárez, J. Ortega-García, J. Monroy-Rivera, F. J. Toro-Vázquez, H. S. García, O. Angulo-Guerrero; Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil by hydrolysis and urea complexation. *Food Res. Int.*, **36**, 721–727 (2003).
- [8] K. Naoe, S. Awatsu, Y. Yamada, M. Kawagoe, K. Nagayama, M. Imai; Solvent condition in triolein hydrolysis by *Rhizopus delemar* lipase using an AOT reverse micellar system. *Biochem. Eng. J.*, **18**, 49–55 (2004).
- [9] R. R. Lowry, I. J. Tinsley; Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *JAOCS*, **53**, 470–472 (1976).
- [10] K. Nagayama, S. Matsu-ura, T. Doi, M. Imai; Kinetic characterization of esterification catalyzed by *Rhizopus delemar* in lecithin-AOT microemulsion system; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **4**, 25–32 (1998).
- [11] D. Han, J. S. Rhee; Characteristics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil in AOT-isooctane reversed micelles. *Biotech. Bioeng.*, **28**, 1250–1255 (1986).
- [12] K. Yamazaki, M. Imai, I. Suzuki; Soybean lecithin hydrolysis using hog pancreas phospholipase A_2 influenced by the hydrophobic character of W/O microemulsion systems. *Biochem. Eng. J.*, **19**, 171–179 (2004).
- [13] M. L. M. Fernandes, N. Krieger, A. M. Baron, P. P. Zamora, L. P. Ramos, D. A. Mitchell; Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **30**, 43–49 (2004).
- [14] A. Zaks, A. M. Klivanov; Enzymatic catalysis in organic media at 100°C , *Science*, **224**, 1249–1251 (1984).
- [15] B. C. Koops, H. M. Verheij, A. J. Slotboom, M. R. Egmond; Effect of chemical modification on the activity of lipases in organic solvents, *Enz. Microb. Technol.*, **25**, 622–631 (1999).

要 旨

魚油由来 DHA の濃縮を目的として、トリグリセリド型 DHA の側鎖として存在する脂肪酸をリパーゼにより加水分解した。大豆由来レシチンを両親媒性成分とした W/O マイクロエマルション系において、初期反応速度を反応活性の指標として調製条件の影響を検討した。その結果、有機相可溶化水分量と両親媒性成分のモル比 (W_0 値) が $W_0=10$ において極大活性を得た。イオン性の両親媒性成分である AOT 系と比較して、 $W_0=10$ の条件下でレシチンを用いた系の方が約 1.4 倍高い初期反応速度を示した。初期反応速度の温度変化を求めたところ 313 K (40°C) において反応活性が極大値を示し、活性化エネルギーは $135 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ であった。