リパーゼ反応による油脂およびエステル合成と変換†

山 根 恒 夫

(名古屋大学農学部)

1. リパーゼの触媒反応の分類

リパーゼは、いうまでもなく、トリグリセリドを加水分解してグリセリンと脂肪酸にする酵素であり、triacylglycerol acylhydrolase, E. C. 3.1.1.3 と命名されている。しかし、この反応以外に種々の反応を触媒することがわかってきた。現在知られているリパーゼの触媒反応を分類すると図1のようになる。エステルの加水分解は本来の触媒反応である。この分野でも、油脂の加水分解や、エステルの立体特異的水解など、工業的に重要な反応があるが、このレビューは合成と変換を中心に行っているので、述べないことにする。リパーゼの触媒作用は可逆的であり、微水系では、エステルの合成を触媒する。リパーゼの触媒作用で興味深いのは、エステル転移である。油脂工業で付加価値の高い変換反応としては、エステルの加水分解よりも、エステル合成やエステル転移がより重要であろう。一般にエステル結合の加水分解の自由エネルギーはきわめて低く、またエステル転移の総自由エネルギーは零であるから、エステル転移は容易に起こる。リパーゼによるエステル転移反応は、エステルと反応する相手の化学種によって、図1のように、4つに細分類される。これら4タイプの反応をまとめて、‘エステル交換 (interesterification)’ と呼ぶ研究者もあるが、生化学では、官能基の転移は、trans- と呼ばれている (たとえば、transglycosylation, transpeptidylation, transphosphatidylolation など) ので、‘interesterification’ より ‘transesterification’ のほうが適切であると思う。したがって、このレビューでは、エステル交換 (interesterification) はタイプ 3.3 の反応に対してのみよぶことにする。以下、図1の分類の順に、まずエステル合成の

うち興味深い反応を紹介し、次にエステル転移の最近の研究を紹介する。

2. エステル合成

微水系で、リパーゼにより、エステルが収率よく合成できる。この分野の研究は多い。著者らは、膜型バイオリアクターを用いて脂肪酸とグリセリンよりグリセリドの連続合成を試みた^(1),2)。得られた油脂は、モノグリセリドとジグリセリドとトリグリセリドの混合物であった。食品用乳化剤として多量に使われているモノグリセリドのみをリパーゼによって合成しようとする試みがいくつかある。*Penicillium cyclopium* のリパーゼにより、脂肪酸とグリセリンから、モノグリセリドのみが生成することが報告されている⁽³⁾。また、グリセリドをあらかじめアセトンと反応させアセタールとし、これと脂肪酸とをリパーゼにより反応させてできるモノエステルを、加水分解してアセトンをはずすと、ほぼ収率 100% でモノグリセリドが得られる^(4),5)。この場合、脂肪酸とグリセリンのアセタールがよく混和し均一相となる利点がある。

糖と脂肪酸のエステルであるシュガーエステルも食品用乳化剤として多用されている。リパーゼによりシュガーエステルが合成される^(6),7)。シュ糖は水酸基を多く持っているため、エステルの混和物が得られる。

キラルな脂肪酸あるいはキラルなアルコールを用いて、リパーゼがどの程度立体特異的エステル合成を触媒するかは興味深いテーマであるが、いくつかのリパーゼは立体特異性を示す⁽⁸⁾。axial chirality を調べた研究もある⁽⁹⁾。

3. アシドリシス⁽¹⁰⁾

この反応で、現在、最も興味を持たれているのは、安価な油脂からカカオ代替脂を合成する反応である。製菓用 (主としてチョコレート) の原料として、油脂のなかでは最も高価なカカオ脂は、1, 3 位に飽和脂肪酸であるパルミチン酸あるいはステアリン酸を、2 位に不飽和脂肪酸であるオレイン酸を持つ対称性トリグリセリドであ

† Synthesis and Conversion of Fats and Esters by Lipase-catalyzed Reactions.

Tsuneo YAMANE (Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464)

図1 リパーゼが触媒する反応の分類

る。そこで、安価な油脂と脂肪酸に 1, 3 位特異性リパーゼを作用させてカオ脂様油脂を製造する研究が多数報告されている。原料油脂としては、パーム油中間区分が使用され、脂肪酸としては、ステアリン酸、パルミチン酸が使用され、リパーゼとしては、*Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus chinensis*, *Mucor miehei* 由来のリパーゼが用いられている。酵素の使用形態は、

(1) 酵素を適当な担体に吸着固定化し、カラムに充填する方法(酵素法)⁽¹¹⁾

(2) 酵素活性を有する乾燥菌体(微量の水を含む)を適当な担体に保持し、カラムに充填する方法(菌体法)⁽¹²⁾

の2通りの方法がある。また、反応液としては、

(1) ヘキサンに油脂および脂肪酸(あるいは脂肪酸エステル)を溶解して用いる方法(溶媒法)

(2) 高温(60°~65°C)にして、油脂と飽和脂肪酸を液状に融解して行う方法(無溶媒法)

が知られている。この分野では最も技術が進んでいると思われるユニバー社では、ノボ社の固定化リパーゼを用い無溶媒法で企業化しようとしているようである。また、脂肪酸の低級アルコールエステルと油脂の反応(分類としてはタイプ 3.3 の反応に入る)による称性トリグリセリドの合成もよく研究されている。脂肪酸エステルにすると、ヘキサン中の溶解度が增大するというメリットもある。カオ脂様油脂合成反応のもう1つの重要な点は、ジグリセリドを生成する加水分解反応の抑制であ

図2 *Aspergillus niger* リパーゼと Hyflo Supercel (セライトの一種) から調製した触媒のアンドリシス反応に及ぼす水分添加の影響⁽¹⁰⁾

る。図2にみられるように、転移活性は水分が多いほど高いが、加水分解反応を抑えるためには、水分をできるだけ少なくしなければならず、最適水分は両者の妥協により決めざるをえない。

4. アルコホリシス

著者らは、アルコホリシスの一種であるグリセロリシス(油脂とグリセリンとの反応)について研究している。まず、種々の微生物起源のリパーゼのグリセロリシス活性を調べ、比較的反応性が高く、しかも入手が容易な、*Pseudomonas fluorescens* 起源のリパーゼについて詳しく実験した⁽¹³⁾。このリパーゼによる油脂のグリセロリシス反応のスキームは図3のようである。反応中、β位のエステルのα位への非酵素的アシル基転移が起こる。この反応に及ぼす一番大きな影響因子は、グリセリン中の水分である(図4)。次に、著者らが開発した微孔性薄膜型バイオリアクターを用いた連続グリセロリシス反応を実施し、酵素の操作安定性を調べ、約3週間であることがわかった^(14,15)。また、このバイオリアクターのスケールアップについても研究した⁽¹⁶⁾。この反応では、モノグリセリド 10~20%、ジグリセリド 35~45%、未反応のトリグリセリド 55~35% のグリセリド混合物が得られ、遊離脂肪酸がほとんど含まれないのが特色であり、この生成物は機能性油脂としての用途がありそうである。グリセロリシス反応は乾燥菌体でも起こる⁽¹⁷⁾。

ω-ヒドロキシルカルボン酸のカルボキシル基をメチルエステルにした化合物を基質にすると、リパーゼによるラクトン化反応(分子内エステル化)が起こる⁽¹⁸⁾。これも、OH基とエステルとの間の反応という観点からするとアルコホリシスの一種である。生成物は、たとえ

図3 *Pseudomonas fluorescens* リパーゼによる油脂のグリセロリシスの想定スキーム⁽¹³⁾

ば、シクロペンタデカノリドであり、合成ムスクとして有益な化合物である。

5. エステル交換

位置特異性のないリパーゼを用いると、化学的エステル交換と同様にランダムな油脂のエステル交換が起こる。たとえば、*Candida cylindracea* のリパーゼを用いてコナツ油とオリーブ油との間でエステル交換を行うと、アルカリ金属を触媒とした化学的エステル交換を行ったものと同じトリグリセリド組成を持つ油脂が得られる⁽¹⁹⁾。位置特異性のある *Mucor miehei* のリパーゼを用いて大豆油と牛脂のエステル交換を実施すると、両者の単なる混合物より融点特性の異なる油脂が得られる。これらの油脂は、マーガリン用油脂としての用途があるようだ。

6. アミノリシス

このタイプの反応例は非常に少ない。ヘキサン中で、豚臓器リパーゼによるメチル酪酸とブチラミンとの反応⁽²⁰⁾および *Candida cylindracea* のリパーゼによるペプチド類の合成⁽²¹⁾、が知られている。将来、微水系でアミノ酸のペプチド類がリパーゼにより合成される可能性がある⁽²²⁾。

図4 *Pseudomonas fluorescens* リパーゼによるグリセロリシスの初速度に及ぼす水分の影響⁽¹³⁾
—○—, 全モノグリセリド; —△—, 全ジグリセリド; —×—, 遊離脂肪酸; —●—, 反応率

7. おわりに

本来の触媒作用である油脂の加水分解以外に、リパーゼは、エステル結合に関連する種々の合成・変換反応を触媒することがわかってきたが、リパーゼのコストが高いので、工業的に実施されそうなプロセスは少ない。今後、リパーゼでなければならぬ高付加価値物質合成の一層の追求、およびリパーゼ生産コストの低減が望まれる。また、合成反応やエステル転移反応はいずれも微水系で実施されるので、反応系における微水分の最適制御という酵素工学的技術を確立せねばならない⁽²³⁾。

- (1) M. M. Hoq, T. Yamane and S. Shimizu: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 776 (1984).
- (2) M. M. Hoq, H. Tagami, T. Yamane and S. Shimizu: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 335 (1985).
- (3) 山口庄太郎, 松宮祐子, 間瀬民生: 日本農芸化学昭和 60 年度会大会, 講演要旨集, 1985, p. 452.
- (4) S. E. Godtfredsen: Abstract of 5th International Symposium on the Life Sciences, 1986, p. 13.
- (5) 佐伯尚史, 西尾尚道, 永井史郎: 昭和 62 年度

- 日本醸酵工学会大会講演要旨集, 1986, p.27.
- (6) H. Seino, T. Uchibori, T. Nishitani and S. Inamasu : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1761 (1984).
- (7) 中田博之, 神野和人, 近澤弥生, 森田 勇, 西尾尚道, 林 光則, 永井史郎 : 昭和 61 年度日本醸酵工学会大会講演要旨集, 1986, p.87.
- (8) S. Koshiro, K. Sonomoto, A. Tanaka and S. Fukui : *J. Biotechnol.*, **2**, 47 (1985).
- (9) G. Gil, E. Ferre, A. Meou, J. L. Petit and C. Triantaphylides : *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1647 (1987).
- (10) A. R. Macrea : "Biocatalysis in Organic Synthesis," ed. by J. Tramper, H. C. Van Derplas and P. Linko, Elsevier, 1985, p. 195.
- (11) R. A. Wisdom, P. Dunnill and M. D. Lilly : *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1081 (1987).
- (12) S. Kyotani, H. Fukuda, H. Morikawa and T. Yamane : *J. Ferment. Technol.*, **66**, 71 (1987).
- (13) T. Yamane, M. M. Hoq, S. Itoh and S. Shimizu : *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **35**, 625 (1986).
- (14) T. Yamane, M. M. Hoq, S. Itoh and S. Shimizu : *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **35**, 52 (1986).
- (15) T. Yamane, J. S. Rhee, Y. Ohta and S. Shimizu : *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **36**, 474 (1987).
- (16) Y. Koizumi, K. Mukai, K. Murakawa and T. Yamane : *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **36**, 561 (1987).
- (17) 壇辻雅彦, 太田安英 : 昭和 61 年度日本醸酵工学会大会要旨集, 1986, p.53.
- (18) A. Makita, T. Nihira and Y. Yamada : *Tetrahedron Lett.*, **28**, 805 (1987).
- (19) A. R. Macrea : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 291 (1983).
- (20) A. Zaks and A. M. Klibanov : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 3192 (1985).
- (21) J. R. Matos, J. B. West and C.-H. Wong : *Biotechnol. Lett.*, **9**, 233 (1987).
- (22) A. L. Margolin and A. M. Klibanov : *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3802 (1987).
- (23) T. Yamane : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 1647 (1987).