ミニレビュー

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol.69, No.6, pp.719~724, 1995]

酵素的変換による有用油脂類生産†

山根 恒夫

(名古屋大学農学部)

リパーゼによる油脂変換反応の分類

油脂に作用する酵素としては、リパーゼが最も広く知られている。この酵素はトリアシルグリセロールを加水分解して部分アシルグリセロール、さらにグリセリンと脂肪酸にするエステラーゼの一種であり、学名は, Triacylglycerol acylhydrolase, E.C.3.1.1.3 と命名されている。しかし、油脂の加水分解以外にも種々の興味深く、かつ産業上有用な反応を触媒することがわかってきて、ここ数年、多くの研究者が注目するようになってきた。いくつかの優れた総説が発表されている^(1,2)。著者も短いレビューを発表している^(3,4)。

著者は、1987年に油脂に限定せず脂肪酸エステル一般に対してリパーゼが触媒する反応の分類を提案したが⁽⁵⁾、現在ではこれが標準的分類法として認められている。このミニレビューでは、油脂生産がテーマであるので、リパーゼによる油脂変換反応の分類を図1に示す。もとよりこれは1つの試みであり、もっと良い分類法があるかも知れない。本ミニレビューでは、図1に従って現在工業的に注目されているいくつかの反応を紹介しよう。

油脂の加水分解

油脂から脂肪酸を工業的に生産するには、現在はコルゲート・エメリー法と呼ばれる高温 (250°C)・高圧 (50 atm) 条件下での連続的な化学的加水分解が実施されている。これをリパーゼによってより穏和な条件下で実施する希望がしばしば述べられ、それをめざしたいくつかの研究がある。しかしながら、コルゲート・エメリー法は反応後の蒸留による分離操作と一体化されエネルギーの回収再利用効率がきわめて高く、酵素の価格が大幅に低下しない限り、酵素法が近い将来実

用化される可能性は少ない⁽⁶⁾。しかしながら、少量ではあるが高純度のオレイン酸やリノール酸の生産 (バッチ式) にはリパーゼが用いられている。

一般にリパーゼはグリセリドのうち高度不飽和脂肪酸 (PUFA) のエステル結合を切断しにくいとされている。この性質を利用して、リパーゼにより魚油を部分加水分解して PUFA 含量の高い部分グリセリドを得るという研究が発表されている^(7,8)。

脂肪酸エステルの合成

部分グリセリドと脂肪酸を微水系で反応させると、トリグリセリド (TG) となる。パームの果実にはリパーゼ活性があり、これにより搾油の段階でパーム油が加水分解を受けて若干 (約 8%) ジグリセリド (DG) が含まれている。蔵重らは、水分 100 ppm 以下の超微水系で、固定化細菌リパーゼにより、この DG を TG にするバイオリクターシステムについて発表している⁽⁹⁾。

糖類の脂肪酸エステルはシュガーエステルと称され、工業的界面活性剤および食品用乳化剤として多量に生産されている。現在は高温でのアルカリ触媒による化学的合成法によって製造されている。糖類は分子内に多くの水酸基を有しているので、得られる脂肪酸は種々の位置の水酸基がエステル化された異性体の混合物であり、その中には健康上安全とは言えない異性体も含まれているようである。リパーゼによる糖エステル合成の試みは2通りある。1つは alkylglucoside から合成する方法⁽¹⁰⁾であり、他の1つは糖の隣接する第2級水酸基をアセタールとして保護し、次いで第1級水酸基 (5位もしくは6位の水酸基) をリパーゼで脂肪酸によりエステル化し、最後に脱アセタールを行う方法である (図2)⁽¹¹⁾。

どちらも無溶媒系で実施され収率は85%以上と非常に高い。

リシノール酸は分子内に COOH 基と OH 基を有する代表的ヒドロキシ脂肪酸であり、ヒマ種子から得られ

† Enzymatic Production of Usefull Fats and Oils
Tsuneo YAMANE (Department of Applied Biological
Sciences, Faculty of Agriculture, Nagoya University)

1) Hydrolysis of Fat

2) Synthesis of Fat

3) Transesterification of Fat

3.1) Acidolysis of Fat

3.2) Alcoholysis of Fat

Glycerolysis of Fat:

3.3) Ester Exchange (Interesterification) of Fat

図1 リパーゼによる油脂変換反応の分類

る。リシノール酸を分子間で4~5分子脱水縮合したものはエストリド(図3)と呼ばれ、工業的に多くの用途を持つ高粘性の有用物質である。現在は220°C以上に加熱することにより化学に合成されており、着色や臭いの問題が存在する。リパーゼにより常温近くでこの重縮合反応を実施すると非常に高品質のエストリドが得

られる⁽¹²⁾。必要な重合度を達成するためには反応中微水分を約4000 ppmから約300 ppmへと順次減らしてゆく必要があり、固定化酵素カラムと薄膜式真空脱水装置を連結したバイオリクターシステムが提案されている。

対称性トリグリセリドの合成

チョコレート類は、年間200万トン以上消費されている代表的な菓子類であるが、その原料はカカオ脂である。主要構成TGは、1位と3位に飽和脂肪酸が、2位に不飽和脂肪酸が結合している(SOS, SOP; S=Stearoyl, P=Palmitoyl, O=Oleoyl, など)という特徴を有している。そこで、1, 3位に特異性を有するリパーゼを用いて、パーム油のような安価な油脂からカカオ代替脂を生産する開発研究が多くの油脂会社で行なわれ、一部は工業化もされている。対称性TG(1位と3位が同じ脂肪酸組成の油脂)を高含量に含む油脂の製造法としては、いくつかの選択肢が考えられる⁽³⁾。

- (a) 油脂と反応させる脂肪酸として、遊離の脂肪酸を用いるか、脂肪酸のエチルエステルを用いるか？前者はアシドリシスであり、後者はエステル交換となる。
 - (b) 使用するリパーゼの形態として、固定化リパーゼを用いるか、リパーゼ活性を有する乾燥菌体(固定化乾燥菌体)を用いるか？
 - (c) 反応系として、基質類をn-ヘキサンのような溶媒に溶解して反応を行うか、無溶媒系として高温で油脂と脂肪酸(あるいはそのエステル)とを均一な溶液にして反応を行うか？
- (b)については、菌体を用いる利点はリパーゼを生産する微生物を培養し、その培養液からリパーゼを単離・

図2 リパーゼによる糖エステル合成スキーム(アセトニド経由法)⁽¹¹⁾

Ricinoic Acid **Estolide** 図 3 エストリド合成反応⁽¹²⁾ 図 4 *Rhizopus chinensis* の固定化乾燥菌体によるエステル交換反応の長期連続反応(自由水分=100 ppm)⁽¹³⁾

精製する手間を省略することにより、また実際の連続反応時には菌体中に存在するリパーゼの方が固定化遊離リパーゼより操作安定性がよい、という2点により触媒コストが低減することにある。実際、長期連続反応におけるこの形態のリパーゼの微水系(水分約100 ppm)における安定性が調べられ、半減期は約58日と判明した(図4)⁽¹³⁾。このことから、リパーゼ活性を有する糸状菌の乾燥固定化菌体は優れた触媒であることが理解される。

他の有用な対称形 TG としては、BOB(2-oleo-1, 3-dibehen), および OPO(1, 3-dioleoyl-2-palmytoyl-glycerol) が知られている。これらの対称性 TG の合成

スキームを図5に示す。前者はチョコレートが、流通あるいは店頭陳列の過程で往々にして高温に晒されたり長時間保存された時、表面が艶と滑らかさを失い白っぽくなる現象(bloomingと言われている)を防ぐ効果があり、抗ブルーム剤としてチョコレートに5%程度添加されている⁽¹⁴⁾。後者は、最近ユニリヴァー社が商品名「BETAPOL」として販売を開始した新規機能性油脂である⁽¹⁵⁾。C₁₆以上の飽和脂肪酸は、sn-1,3位にあるよりsn-2位にある方が腸管吸収に優れており、人の母乳に含まれる油脂ではそれ故に飽和脂肪酸がsn-2位にエステル化された油脂が多い。そこで、OSOを牛乳由来の人工ミルクに添加してできるだけ人の母乳に近づけようという考えである。

モノグリセリドの合成

脂肪酸モノグリセリド(monoacylglycerol, MG)は、法規上食品に添加が認められている6種類の乳化剤のうち最も多く使用されている。また、化粧品用その他にも少量でもあるが使用されている。現在実施されている工業的なMGの生産法は油脂のグリセロリシス反応であり、安価な油脂(牛脂もしくはパーム油)をグリセリンと混合し、アルカリ触媒存在下で220℃以上の高温で連続的に反応させている。高温で反応させるため、着色、こげつき臭があり、これら不純物を除くために、またMGの含量を高めるため分子蒸留が行

図 5 対称性トリグリセリド合成スキーム

図 6 リパーゼによるモノグリセリド合成の諸方式

なわれている。それ故、蒸留モノグリと通称されている。リパーゼを用いて、より低温で MG を生産するいくつかの研究がある。この研究をまとめると図 6 のようになる。(a)および(b)では単一の脂肪酸を用いれば、単酸基 MG が得られる。著者らは、(b)方式で遊離脂肪酸の代わりに脂肪酸ビニルエステルを用いると、副生するビニルアルコールがビニルアルデヒドへ互変異性化するのでモル収率は 100% となり、脱アセトニドに弱酸である硼酸を用いると、全体の収率も 100% となることを明らかにした⁽¹⁶⁾。一方、最近 A. Millqvist らは、TG とエタノールの反応（アルコールシス）を 1, 3 位特異的リパーゼ (*Rhizopus arrhizus* 由来) によって実施すると、TG 中の 1 位と 3 位の脂肪酸のみがエタノールへ転移し、2-acylglycerol (2-MG) が 97% という高収率で得られることを発表している⁽¹⁷⁾。

(c)のグリセロリシスは著者らが数年来研究している方法で一種の油脂のアルコールシスである。油脂とグリセリンとは常温では混和しないので、攪拌すると白い乳化液となる。反応中ずつと液々の乳化液のままだと MG の平衡含量は高々 30% であるが、反応開始後しばらく経過してから温度を低下させると途中でスラリーを経て反応系全体が固化する。この状態でさらにそのまま放置続けると、MG 含量が増大し最終含量は 70~95% となることを見出した。そこでこの反応を固相グリセロリシスと名付けて詳しく調べた。それぞれの油脂に対して、それより高いと MG の最終含量は低く、それより低いと MG 含量が高くなるという臨界温

度がある。市販の各種リパーゼの牛脂からの MG 合成能を調べたところ、*Pseudomonas* sp. 由来のような細菌リパーゼは合成活性が高く、*Mucor* sp. 由来のようなカビリパーゼはそれよりずっと低く、*Candida* リパーゼのような酵母リパーゼはまったく合成活性がなかった⁽¹⁸⁾。この理由としては、一部は油脂・グリセリン系という極限環境での酵素の安定性も考えられるが、それだけではなさそうである。なぜならば、トリオレインのグリセロリシス反応において中程度の最終 MG 含量を示す *R. delemar* リパーゼについて、反応中に酵

図 7 トリオレインの固相グリセロリシス反応（グリセリン/トリオレインモル比および反応温度の影響）

素を追加しても MG 含量は向上しなかったからである⁽¹⁹⁾。油脂のグリセロリシスでは、油脂対グリセリンの量論的モル比は 1:2 であるが、グリセリンの量をこの値より多くすればもちろん MG 含量は向上する。図 7 は油脂としてトリオレインを用いた場合であり、量論比 (1:2) でも 92% の MG 生成が得られている。反応特性に著しく影響を与えるもう 1 つの重要な因子は微水分である。水分が多いほど反応速度は高くなるが遊離脂肪酸の含量が高くなるので、グリセリン中の水分は数%以下に抑えることが望ましいことがわかった。オリーブ油からはこの方法で 96% 以上の収率で MG が得られるが、最適温度が低いので反応完結までに 3~4 日ほどの長時間を要するのが難点である。また、酵素を回収再使用することも今後の課題である。

また、同様な固相グリセロリシスを水素添加牛脂 (hydrogenated beef tallow) を牛脂:グリセリン=2:1 のモル比と適切な温度プログラムで実施すると、1, 3-diacylglycerol (1, 3-DG) が約 90% の収率で得られることがわかった⁽²⁰⁾。

魚油の PUFA 含量向上化

魚油は n-3 系高度不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA) を 20~30% 含み、これは他の油脂に比較してきわめて高い。n-3 PUFA のうちでもドコサヘキサエン酸 (DHA) は、記憶力向上効果などのため、最近とみに注目されている。そこで、魚油中の DHA 含量を積極的に高め、機能性油脂として利用する気運が高まっている。DHA

高有魚油 (まぐろの眼窩脂肪が最も高い) はそのままでは酸化されやすく、また、魚油特有の不快臭が残っているので、酸素分子の拡散侵入しないようなカプセル (大粒子もしくは粉末状) 内に封入した形態で健康食品的に経口摂取する。含量を高めることにより、油脂としての摂取量を減らすことができる。

魚油の DHA 含量の濃縮法としては、有機溶剤分別、低温溶媒分別 (winterization) などの物理的方法が知られているが、これらの方法では DHA 含量は約 30% 程度までであり、これ以上の濃縮は困難である。そこで、温和な条件で作用する酵素法が試みられている。

リパーゼを用いる DHA 濃縮法として、著者は図 8 のように種々の方式が考えられることを指摘した⁽³⁾。(a)の方法は 2 段階からなり、1 段階目の反応後に遊離脂肪酸を除去せねばならないので、プロセスとは複雑である。田中らは、最初の段階で得られた PUFA-enriched partial glyceride を加水分解して得られる PUFA-enriched FFA によってもとの PUFA-enriched partial glyceride を第 2 段階においてエステル合成させることにより、DHA 含量が 54% の油脂を得ている⁽²¹⁾。(b)および(c)は Haraldsson らが最初に報告した⁽²²⁾。著者らも無溶媒系にて(b)および(c)の反応について研究し、たら肝油 (n-3 PUFA 含量約 23%) から出発して、50~60% まで n-3 PUFA 含量が高められることを認めた⁽²³⁾。さらに、固定化リパーゼをカラムに充填し、別に設置した油脂と遊離脂肪酸からなる反応混合物貯槽からこ

図 8 リパーゼによる魚油の n-3 PUFA 濃縮の諸方式⁽⁴⁾

の固定化酵素カラムに反応混合物を供給し、カラムから出る液は再び反応混合物貯槽へもどすという循環システムにおいて、反応混合物貯槽を $-10^{\circ}\sim-20^{\circ}\text{C}$ に冷却すると、交換して生じた遊離飽和脂肪酸が結晶として析出して反応系から除かれることになり、油脂中のn-3 PUFA含量がさらに5~10%増加することを認めた⁽²⁴⁾。これは酵素反応とウインタリングを併用した方式と言えよう。

総括と展望

工業的に興味のある有用油脂類のリパーゼによる変換反応について述べた。今後も、脂質関連工業における新しいニーズの掘り起こしによって、新規反応が出現するであろう。酵素反応そのものについては、溶媒系で行うか、無溶媒系で行うかの選択肢がある。もちろん後者が可能ならばその方が望ましい。また、微水系で実施される合成反応やエステル転移反応では、微水分の最適制御に常に注意を払わねばならない。また、単に酵素反応のみでなく、反応後の分離・精製をも考慮に入れてトータルシステムの一部として反応系を選定することが望まれる。とくに、油脂の変換反応では100%反応することはないので、必ず相当量の残存反応成分や副生成物が存在していることを念頭に入れねばならない。

- (1) G. G. Haraldsson: *The Chemistry of Acid Derivatives*, 2, Chap. 24 (pp.1395—1473) (Ed. by S. Patai) (1992).
- (2) P. Eigtved: *Advances in Applied Lipid Research*, 1, 1—64 (1992).
- (3) 山根恒夫: 日農誌, **62**, 783—786 (1988).
- (4) 山根恒夫: 油化学, **40**, 965—973 (1991).
- (5) T. Yamane: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 1657—1622 (1987).
- (6) R. D. Schmid: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 563—570 (1987).
- (7) Y. Tanaka, J. Hirano and T. Funada: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 1210—1214 (1992).
- (8) Y. Shimada, K. Maruyama, M. Nakamura,

- S. Okazaki, A. Sugihara and Y. Tominaga: 86th AOCS Annual Meeting, San Antonio, (1995).
- (9) J. Kurashige: *Proceedings of Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry* (ed by T. H. Applewhite), p.138—141, Am. Oil Chem. Soc., (1988).
- (10) K. Adelhorst, F. Björklund, S. E. Godtfredsen and O. Kirk: *Synthesis*, 112—115 (1990).
- (11) G. Fregapane, D. B. Sarney and E. N. Vulson: *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 796—800 (1991).
- (12) 吉田安子, 川瀬三雄, 山口潮三, 山根恒夫: 油化学, **44**, 328—333 (1995).
- (13) S. Kyotani, T. Nakashima, E. Izumoto and H. Fukuda: *J. Ferment. Bioneng.*, **71**, 286—288 (1991).
- (14) 森 弘之: 混酸型油脂 (BOB), 「機能性脂質の開発と応用」(佐藤, 山根, 岩橋, 森監修), (株)シーエムシー, pp.177—178 (1992).
- (15) P. Quinlan and S. Moore: *INFORM*, 4, 580—585 (1993).
- (16) U. T. Bornscheuer and T. Yamane: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, 193—197 (1995).
- (17) A. Millqvist, P. Adlercreutz and B. Mattiasson: *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 1042—1047 (1994).
- (18) G. McNeill, S. Shimizu and T. Yamane: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 779—783 (1990).
- (19) U. T. Bornscheuer and T. Yamane: *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 864—869 (1994).
- (20) T. Yamane, S. T. Kang, K. Kawahara and Y. Koizumi: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 339—342 (1994).
- (21) 田中幸久, 船田 正: 油化学, **43**, 39—43 (1994).
- (22) G. G. Haraldsson, P. A. Höshuldsson, S. T. Sigurdsson, F. Thoreteinsson and S. Gudbjarnason: *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1671—1674 (1989).
- (23) T. Yamane, T. Suzuki, Y. Sahashi, L. Vickersveen and T. Hoshino: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 1104—1107 (1992).
- (24) T. Yamane, T. Suzuki and T. Hoshino: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 1285—1287 (1993).