リパーゼ反応を利用した油脂加工

Oil and Fat Processing by Lipase-Catalyzed Reactions

島田 裕司

大阪市立工業研究所
〒536-8553
大阪市城東区森之宮 1-6-50

Yuji SHIMADA
Osaka Municipal Technical
Research Institute
1-6-50 Morinomiya, Joto-ku,
Osaka 536-8553, JAPAN

永尾 寿浩

大阪市立工業研究所
〒536-8553
大阪市城東区森之宮 1-6-50

Toshihiro NAGAO
Osaka Municipal Technical
Research Institute
1-6-50 Morinomiya, Joto-ku,
Osaka 536-8553, JAPAN

渡辺 嘉

大阪市立工業研究所
〒536-8553
大阪市城東区森之宮 1-6-50

Yomi WATANABE
Osaka Municipal Technical
Research Institute
1-6-50 Morinomiya, Joto-ku,
Osaka 536-8553, JAPAN

論文要旨：リパーゼは基質特異性（脂肪酸特異性，アルコール特異性，位置特異性など）を有し，加水分解，エステル化，エステル交換反応を触媒する。この基質特異性と触媒する反応を組み合わせる構築したりリパーゼ反応系は，化学反応では達成できない，あるいは達成しにくい油脂加工技術として利用できる。本稿では，リパーゼ反応を利用した機能性油脂の製造，油糧資源から有用物質の精製，および未利用油糧資源のバイオディーゼル燃料への変換について述べる。

Abstract: Lipases have substrate specificities, such as fatty acid specificity, alcohol specificity, positional specificity and so on, and catalyze hydrolysis, esterification, and transesterification. Combination of the substrate specificity and catalyzed-reaction creates a valuable process for oil and fat processing, which can not be achieved by chemical processes. In this paper, production of functional oils and fats, purification of useful materials from natural oil resources, and conversion of unutilized oil resources to biodiesel fuel by lipase-catalyzed reactions are described.

Key words: lipase, substrate specificity, lipase-catalyzed reaction, functional oil and fat, polyunsaturated fatty acid, structure lipid, monoacylglycerol, tocopherol, sterol, biodiesel fuel

1 はじめに

1856 年，Bernard が臍臓の破碎物中にトリアシルグリセロール（TAG）を脂肪酸とグリセリンに分解する活性があることを発見し，リパーゼの存在が確認された。以来，リパーゼはアミラーゼ，プロテアーゼと並び三大消化酵素と呼ばれている。しかし，基質が水に溶けないため，反応を解析する系の構築が難しく，基礎および応

用研究はアミラーゼやプロテアーゼの研究に比べると著しく遅れていた。このリパーゼに関する研究が活発化したのは 1980 年代の中頃である。基礎研究では，Klibanov が 84 年に有機溶媒中での反応にリパーゼが利用できることを示した。また，産業界ではリパーゼ反応を利用したカカオ脂代替脂の生産が始まり，洗剤用酵素としてのリパーゼの利用も始まった。この頃は遺伝子操作技術が飛躍的な発展を続けていたときでもあり，リパーゼも遺伝子のクローン化，一次構造の決定，結晶構造の解析の対象となっていた。この研究成果は 1990 年

連絡者：島田 裕司
E-mail: shimaday@omtri.city.osaka.jp

代に入って結実する。積年の疑問であったリパーゼの油-水の界面活性化現象が、酵素分子の活性中心を覆っている両親媒性のヘリックスの存在によって解決された。また産業界では、91年にエイコサペンタエン酸エチルエステルが医薬品として認可され、高度不飽和脂肪酸が一躍注目されるようになり、酵素法による油脂加工に拍車がかかる。この研究成果が、酵素法によるDHA高含有油、母乳代替脂、ジアシルグリセロール、中鎖脂肪酸含有油の製品化へと導いている。

このような時代の下にあって、リパーゼの油脂加工への利用が注目されたのはリパーゼの基質特異性と触媒する多彩な反応である。本稿では、リパーゼの基質特異性と反応をうまく組み合わせて確立された機能性油脂の製造、有用油脂関連化合物の精製、および未利用油糧資源からのバイオディーゼル燃料生産について述べる。なお、ここで述べる油脂加工技術のうち、われわれが開発した反応系の詳細は大阪市立工業研究報告（第117回と第129回）にまとめてある^{1,2)}。興味をお持ちの方はこれらの報告書も参照していただければ幸いである。

2 機能性油脂の製造

2.1 トリアシルグリセロール (TAG)

2.1.1 高度不飽和脂肪酸 (PUFA) 高含有油

一般にリパーゼはPUFAを認識しにくいという性質を持ち、中でも *Candida rugosa* リパーゼはPUFAを認識しにくい。そこで、本酵素を用いてドコサヘキサエン酸 (DHA, 22:6n-6) を含んだマグロ油を加水分解すると、未分解アシルグリセロール画分のDHA含量を25%から50%まで高めることができる³⁾。酵素反応後、DHAを高含有するアシルグリセロールは分子蒸留、あるいはヘキサン分画により効率よく回収することができ、得られたアシルグリセロールを原料として加水分解を繰り返すと、さらに高濃度のDHAを含む油を製造することができる。この選択的加水分解を3~4回繰り返すとDHA含量を70%まで高めることができる³⁾。

本酵素は、DHAと同じように γ -リノレン酸 (GLA, 18:3n-6) やアラキドン酸 (AA, 20:4n-6) も認識しにくいという特徴を持っている。したがって、本酵素を用いてGLAを含むボラージ油やAAを含む糸状菌油を加水分解すると、1回の処理で45% GLA含有油や、55% AA含有油を製造することもできる³⁾。

2.1.2 中鎖脂肪酸含有油

大豆や菜種など多くの植物油はC₁₈の長鎖脂肪酸を主成分とするTAG分子種で構成されている。摂取されたTAGは、すい臓リパーゼにより脂肪酸と2-モノアシルグリセロール (MAG) に分解されて腸粘膜から吸収さ

れる。吸収された分解物はTAGに再構成されて脂肪組織に貯蔵された後、必要に応じて分解されてエネルギー源となる。一方、C₈、C₁₀の中鎖脂肪酸のエステル結合は胃のリパーゼでも加水分解され、TAGに再構成されることなく肝臓で分解されるため、脂肪組織に蓄積されない。この中鎖脂肪酸の特性が注目され、中鎖脂肪酸のTAGと長鎖脂肪酸のTAGをエステル交換した油が生産されている。この油は、特定保健用食品の認可を受けて2003年から発売されている。この種のエステル交換油の製造にリパーゼを利用した反応が有効であるという報告もある⁴⁾。

2.1.3 構造脂質

天然油脂はグリセロール骨格の2-位に不飽和度の高い脂肪酸が結合し、1,3-位に不飽和度の低い脂肪酸あるいは飽和脂肪酸が結合している傾向にある。しかし、結合している脂肪酸の種類と結合位置は特定されておらず、油脂を構成しているTAG種は多種多様である。一方、グリセロール骨格に結合している脂肪酸とその結合位置が特定されているTAGは構造脂質と呼ばれ、特徴のある物性や保健機能を有することが知られている⁵⁾。

既に商品化されている構造脂質としてカカオ脂代替脂 (1,3-stearoyl-2-oleoyl glycerol, SOS; 1,3-behenoyl-2-oleoyl glycerol, BOB) や、母乳代替脂 (1,3-oleoyl-2-palmitoyl glycerol, OPO) がある。SOSやBOBはカカオ脂よりも高温側に、シャープな融点を持つという優れた物性からチョコレート調剤用脂として使用されている。また、OPOは乳児のエネルギー源として優れた特性を持ち、Caの吸収阻害を起こしにくいことから育児粉乳の成分として使用されている。また、1,3-位に中鎖脂肪酸が結合し、2-位に保健機能を持った長鎖脂肪酸が結合したMLM型構造脂質は、腸粘膜からの吸収性に優れていることから高齢者向けのサプリメントとしての利用が期待されている。

これらの構造脂質は、基本的に天然油脂と脂肪酸（あるいは脂肪酸エチルエステル）を原料とし、1,3-位特異的リパーゼを触媒とした反応を行い、天然油脂の1,3-位の脂肪酸を目的脂肪酸でエステル交換することによって製造することができる。この分野での研究は、まだ商品化されていないMLM型構造脂質の製造に集中し、目的とする構造脂質を高収率、高純度に製造するために以下のようなプロセスが提案されている⁵⁾。

2.1.3.1 繰り返しエステル交換の利用

固定化1,3-位特異的リパーゼを触媒とし、天然油脂の1,3-位の脂肪酸を中鎖脂肪酸（遊離体あるいはエチルエステル体）で交換する反応において、中鎖脂肪酸の量を増やすとエステル交換率は上昇する。しかし、中鎖脂肪

酸量を増やすほど処理できる原料油の量は減り、仕込み原料に対する目的構造脂質の収率も低くなる。天然油脂を収率よく高純度に MLM 型構造脂質に変換する際、中鎖脂肪酸でエステル交換した後、アシルグリセロールを回収し、回収アシルグリセロールを再度中鎖脂肪酸でエステル交換する繰り返し反応が効果的である。例えば、サフラワー油、アマニ油、AA 含有糸状菌油の 1,3-位の脂肪酸を中鎖脂肪酸でエステル交換するとき、反応を 3 回繰り返すと、原料として用いた TAG をほぼ完全に MLM 型構造脂質に変換することができる⁶⁾。

2.1.3.2 中間体として 2-MAG を製造する方法

天然油脂の 1,3-位の脂肪酸のエステル交換には、1,3-位特異的リパーゼが用いられている。現在報告されている 1,3-位特異的リパーゼは、程度の差はあるが PUFA、とくに DHA や GLA に対する作用性が低い。また、マグロ油やボラージ油は 1,3-位にも DHA や GLA が結合している。したがって、前項で述べた繰り返し反応を行っても、マグロ油やボラージ油の 1,3-位の脂肪酸を全て中鎖脂肪酸で交換することはできない。このようなリパーゼが作用しにくい脂肪酸を含む油を MLM 型構造脂質に変換するために、中間体として 2-MAG を用いるプロセスが開発されている (Fig. 1)。

第 1 工程：TAG の 2-MAG への変換

第 2 工程：2-MAG の MLM 型構造脂質への変換

Fig. 1 2-MAG を中間体として用いる 2 段階反応による MLM 型構造脂質の製造

第 1 工程は、天然油脂の 2-MAG への変換である。油脂を 1,3-位特異的酵素で加水分解すると反応産物として 2-MAG を得ることができると考えられがちである。しかしこの加水分解の反応中にアシル基転移が進行するため、2-MAG は反応系中に蓄積しない。一方、Irimescu ら⁷⁾は、過剰量のエタノール存在下で TAG をエタノリシスすると、顕著なアシル基転移が起こらないことを認めた。また、PUFA もよく認識する固定化 *Candida antarctica* リパーゼは、TAG の全構成脂肪酸量に対して 1/2 量のエタノールでエタノリシスすると TAG のエステル結合の位置に対する特異性は示さない⁸⁾。しかし、過剰量（全脂肪酸に対して 20 モル以上）の EtOH でエタノリシスすると、1,3-位特異性を示した^{7,9)}。これらの酵素的特徴を利用し、魚油をエタノリシスすることによ

り 2-位に PUFA を多く含む 2-MAG を調製することができる。

第 2 工程は 2-MAG の MLM 型構造脂質への変換である。反応液中のエタノールを減圧下で蒸発除去した後、中鎖脂肪酸と固定化 *R. miehei* リパーゼを加えて反応させることにより 2-位に PUFA を含有した高純度の MLM 型 TAG を合成することができた^{7,9)}。

2.1.3.3 天然油脂の選択的加水分解を含むプロセス

高純度の MLM 型 TAG を合成するには単酸基 TAG を原料として用い、1,3-位の脂肪酸を中鎖脂肪酸に交換しなければならない。天然油脂を原料としたときには、1,3-位の脂肪酸を全て中鎖脂肪酸に交換できたとしても、2-位に目的脂肪酸を持つ MLM 型 TAG の純度は天然油脂の 2-位の目的脂肪酸含量より高めることはできない。この課題は、2-位に目的脂肪酸を持たない TAG をあらかじめグリセリンと FFA に分解し、除去することによって解決できる。すなわち、2.1.1 項で述べた方法、PUFA 含有油を *C. rugosa* リパーゼで選択的加水分解することによって 2-位に PUFA を持たない TAG を脂肪酸とグリセリンに分解することができる^{10,11)}。反応後、未分解のアシルグリセロールの 2-位の PUFA 含量は飛躍的に上昇する。例えばボラージ油を選択的加水分解してアシルグリセロールを回収すると 2-位の GLA 含量は 49 から 85% まで高めることができる¹⁰⁾、AA を含有する糸状菌油を選択的加水分解すると 2 位の AA 含量を 47 から 68% まで高めることができる¹¹⁾。このアシルグリセロールを 2.1.3.1 項や 2.1.3.2 項の方法で MLM 型 TAG に変換すると、天然油脂を原料として用いても高純度の目的構造脂質を製造することができる^{10,11)}。

2.2 ジアシルグリセロール (DAG)

2.1.2 項で述べたように、食物として摂取された TAG は、脂肪酸と 2-MAG に分解されて小腸粘膜から吸収される。吸収された分解物は TAG に再合成されて一旦脂肪組織に蓄積された後、必要に応じて分解されてエネルギー源となる。一方、摂取された 1,3-DAG は分解・吸収された後に TAG に再合成されにくいいため、体脂肪がつきにくいといわれている。1,3-DAG は、基本的に固定化 1,3-位特異的リパーゼを触媒として用い、グリセリンに 2 モル量の脂肪酸を加えてエステル化することにより合成することができる。なお、エステル化反応によって生じた水を減圧下で除去しながら反応を行うと、1,3-DAG の純度および収率は向上する。酵素法によって生産された DAG は、1999 年に油脂関連製品で第 1 号となる特定保健用食品の認可を受けている。

2.3 モノアシルグリセロール (MAG)

食品用乳化剤として広く利用されている MAG は、高

温・高圧下でTAGをグリセロリシスすることにより製造されている。この方法は飽和脂肪酸やモノエン酸のMAGの製造に適した方法であるが、二重結合を多く含む不安定な脂肪酸のMAGの合成に適用することはできない。一方、温和な条件で反応が進行する酵素法は不安定な脂肪酸のMAG合成に適しており、TAGのグリセロリシス、TAGの加水分解、TAGのエタノリシス、グリセリンと脂肪酸のエステル化などが提案されている¹²⁾。

2・3・1 TAGの加水分解/エタノリシス

1,3-位特異的リパーゼを触媒としてTAGを加水分解すると理論的には2-MAGを作ることができる。しかしこの反応中にアシル基転移が起こり、2-位の脂肪酸は1,3-位に転移する。したがって、加水分解法を採用してMAGを効率よく製造する方法は確立されていない。

一方、2・1・3・2項で述べたように、固定化*C. antarctica* リパーゼは過剰量のEtOHの存在下で1,3-位特異性を示し、この反応条件下でアシル基転移は非常に起こりにくい。したがって、本酵素を用い、TAGをエタノリシスすると2-MAGを効率よく製造することができるが、原料として用いたTAGに対するMAGの収率は30%程度である^{7,13)}。

2・3・2 TAGのグリセロリシス

TAGをグリセロリシスする反応系中にはTAG、DAG、MAG、グリセリン、およびFFAが存在する。これらの化合物の中でMAGの融点が最も高い。また、リパーゼは液体状の基質にはよく作用するが、固体状の基質には作用しにくい。したがって、MAGが固化する温度で反応を行うとTAGを収率よくMAGに変換することができる^{14,15)}。この反応の欠点として、反応時間が長い(2週間以上)こと、および二重結合を2つ以上持つ融点の低い脂肪酸のMAGを合成するには反応温度を0度以下に設定しなければならないことが指摘されている¹⁶⁾。

2・3・3 FFAとグリセリンのエステル化

FFAとグリセリンをエステル化することによりFFAをアシルグリセロールに変換することができる。この反応において、*Penicillium camembertii* リパーゼ(MAGとDAGは認識するがTAGを認識しない)を触媒として用いると、脂肪酸のエステル化率は95%以上に達し、MAGとDAGがほぼ等量合成される^{15,17)}。

C. rugosa, *Rhizopus oryzae*, *P. camembertii* リパーゼなどを触媒とし、このエステル化を低温(MAGが固化する温度)で行うと、2・3・2項で述べたようにリパーゼはMAGを基質として認識しないためMAGのDAGへの変換反応が進行せずMAGを収率よく合成することが

できる(エステル化率、95%以上; MAGの収率、90%以上)^{18,19)}。

2・3・4 エステル化とグリセロリシスからなる2段階 *in situ* 反応

前項(2・3・3項)で述べたように、*P. camembertii* リパーゼを用いてFFAとグリセリンをMAGが固化しない条件下でエステル化すると、ほぼ等量のMAGとDAGが合成される。この反応液をそのままMAGが固化する低温で2週間以上放置しておく、DAGがグリセロリシスされてMAGに変換される。このエステル化とグリセロリシスからなる2段階 *in situ* 反応を採用するとFFAのエステル化率は95%以上に達し、MAGの収率は90%以上となる¹⁵⁾。

2・3・5 脱水反応

P. camembertii リパーゼを触媒とし、FFAとグリセリンのエステル化を脱水しながら行う。初発水分量を1~2%とし、5 mmHgの減圧下で脱水しながら反応を行うと、反応系中の水分量は1,500 ppm程度に維持され、48時間反応でエステル化率は95%以上に達し、MAG含量は90%以上に達する²⁰⁾。

この反応系は、酵素の結合水量で説明できるかもしれない。2・3・3項で述べたように脱水せずにエステル化反応を行うと、酵素は十分な(過剰量の)結合水を保持している。この状態にある酵素はMAGを基質として認識し、MAGはDAGに変換され、両産物がほぼ等量になったときに反応は平衡に達する。一方、脱水しながら反応を行うと、酵素の結合水量は減少する。制限された量の結合水しか持っていない酵素はMAGを基質として認識できなくなるためMAGからDAGへの変換反応は進行しない。

3 有用物質の精製

酵素は基質特異性を持ち、多成分からなる反応系中でも特定の基質に対する反応だけを触媒するという特徴を持つ。この酵素の特性を利用して、原料中の夾雑物質を他の分子型に変換する、あるいは目的化合物だけを他の分子型に変換することができれば目的化合物の精製効率を高めることができる³⁾。この戦略にしたがった油脂関連化合物の精製を以下に述べる。

3・1 高度不飽和脂肪酸(PUFA)の精製

2・1・1項で述べたように、PUFA含有油の選択的加水分解を繰り返しても未分解アシルグリセロール中のPUFA含量を70%以上に高めることはできない³⁾。これは、酵素の持つ脂肪酸特異性に起因し、反応条件を工夫して脂肪酸特異性をより厳密にすることができれば目的脂肪酸の更なる高純度化が可能となる。以下に選択的エ

ステル化と選択的アルコリススを利用した PUFA の高純度精製について述べる。

3.1.1 選択的エステル化を利用した PUFA の精製

PUFA 含有油脂を加水分解すると PUFA を含んだ FFA 混合物を調製することができる。この非選択的加水分解には、PUFA も比較的良く認識する *Pseudomonas* 属, *Burkholderia* 属, *Alcaligenes* 属などのリパーゼが効果的である。加水分解反応後、蒸留やヘキサン抽出法を採用することにより反応液から FFA を回収することができる。

得られた FFA 混合物にラウリルアルコール (LauOH) を加え、目的とする PUFA を認識しにくい酵素 (*C. rugosa*, *R. oryzae* リパーゼなど) でエステル化すると、目的 PUFA 以外の脂肪酸はラウリルエステル (FALE) に変換され、目的 PUFA を未反応の FFA 画分に濃縮することができる。反応系中に存在する LauOH, FFA, FALE は、蒸留法、あるいは蒸留法とヘキサン抽出法との組み合わせにより分画することができる。なお、1 回の選択的エステル化で PUFA の純度を目標値まで上げることができなければ、エステル化を繰り返すとよい²¹⁾。このプロセスを採用することにより、DHA を 91%²²⁾, GLA を 99%²³⁾, AA を 97%²⁴⁾, ジホモ- γ -リノレン酸を 95%²⁵⁾ まで精製することができる。

なお、この精製戦略は、共役リノール酸異性体 (9c, 11t-, 10t, 12c-) の分画にも採用でき、両異性体の純度を 96% 以上に高めることができる^{26,27)}。

3.1.2 選択的アルコリススを利用した PUFA の精製

最初の工程は PUFA 含有油の非選択的エタノリススである。従来この工程では、アルカリ触媒を用いた化学法が採用されていた。しかし、化学法は PUFA の異性化を誘発する危険性があり、またアルカリ廃棄物、アルカリ廃水の処理も課題となっている。これらの問題点は酵素法を採用することにより解決することができる。しかし、PUFA 含有油のエタノリススに効果的な固定化 *C. antarctica* リパーゼは、反応系中に EtOH のミセルが存在したとき、このミセルと接触すると容易に失活する。そこで、PUFA 含有油と EtOH が完全に溶解する反応条件、すなわち、PUFA 中の全脂肪酸に対して 1/3 モル量のエタノールを加えて反応を開始し、反応の進行と共に 1/3 モル量のエタノールを 2 回添加する 3 段階逐次添加法を確立した²⁸⁾。この方法によりマグロ油の 95% 以上を脂肪酸エチルエステルに変換することができる。

マグロ油由来の脂肪酸エチルエステルを分子蒸留に供し、57% の DHA エチルエステル (DHAEE) を含有する濃縮物を得た。次いで、この FAEE に LauOH を加え、DHA を認識しにくいリパーゼ (固定化 *R. oryzae*

あるいは *Rhizomucor miehei* リパーゼ) でアルコリススした。その結果、DHA 以外の脂肪酸はラウリルエステルに変換され、DHA はエチルエステル画分に濃縮された (収率 52%, 純度 90%)。反応液から DHAEE を含む FAEE 画分は蒸留によって容易に回収することができる²⁹⁾。

3.2 トコフェロール、ステロールの精製

植物油を精製する脱臭工程からの副産物に脱臭留出物がある。この留出物から、脂肪酸のメチルエステル化 (化学法)、イオン交換クロマトグラフィー、溶媒分画、分子蒸留などの単位操作を組み合わせたプロセスを経て、トコフェロールとステロールが精製されている。ここに酵素法を導入するとトコフェロールとステロールを高収率、高純度に精製することができる (Fig. 2)。

Fig. 2 植物油脱臭留出物からトコフェロールとステロールを精製するプロセス

まず脱臭留出物を蒸留により低沸点物質画分と高沸点物質画分に分ける。低沸点物質画分の主成分は FFA, MAG, DAG, トコフェロール, ステロールで、高沸点物質画分の主成分は DAG, TAG, ステロールエステルである。まず低沸点物質画分のトコフェロールを収率よく高純度に精製するために、(1)MAG と DAG を加水分解して FFA に変換し、(2)ステロールを FFA でエステル化してステロールエステルに変換し、(3)FFA をメチルエステル化して FAME に変換すると、低沸点物質画分の主成分は FAME, トコフェロール, ステロールエステルとなる。これらの化合物の沸点は大きく異なることから分子蒸留により効率よく分画することができる。この戦略にしたがい、1 バッチで 3 つの反応を行う反応系を構築した。まず、低沸点物質画分に水を 5% になるように加え、*C. rugosa* リパーゼによる処理を開始する。

MAG, DAG は速やかに加水分解され、ステロールと脂肪酸のエステル化が始まる。反応開始直後から 20 mmHg で脱水を始めておくと、ステロールの 95%以上がステロールエステルに変換される。反応が平衡に達した後、反応液中に MeOH, 水, および *Alcaligenes* のリパーゼを添加し、反応を継続すると反応系中の FFA の 95%以上を FAME に変換することができた。反応液を回収して分子蒸留による分画を行った結果、トコフェロールは収率 88%で純度 72%まで高めることができ、ステロールはエステル体として収率 97%で純度 97%まで高めることができた³⁰⁾。

次は、高沸点物質画分に存在するステロールエステルの精製である。高沸点物質画分を *C. rugosa* リパーゼで処理すると、夾雑物質である中性脂質 (TAG, DAG) はほぼ完全に加水分解されたが、ステロールエステルはほとんど加水分解されない。したがって、反応後の反応液中には FFA とステロールエステルだけが存在し、両化合物は蒸留により容易に分画できる。一連の操作により、ステロールエステルは収率 88%で純度を 97%まで高めることができた³¹⁾。

以上のプロセスによるとトコフェロールとステロールは収率よく高純度に精製することができる。しかし、精製したステロールの分子型はエステル体である。このエステル体を遊離体に戻すのに酵素法は非常に効果的である。ステロールエステルをリパーゼで加水分解すると、加水分解率は 20 ~ 50%程度で効率よく遊離体に変換することはできない。これは加水分解とエステル化の可逆反応により、平衡に達してしまうからであると予想された。そこで、加水分解の反応産物である FFA をメチルエステルに変換し、反応の平衡をステロールエステルの分解に傾ける工夫をした。すなわち、ステロールエステル, 水, *P. aeruginosa* リパーゼからなる加水分解の反応系に MeOH を添加した反応を行った。その結果、加水分解によって生成した FFA は FAME に変換され、FFA とステロールのエステル化を抑えることができた。この反応系を利用すると、ステロールエステルの遊離体への変換率は 98%に達し、反応液からの遊離ステロールの精製にはヘキサン分画が効果的である (収率 92%, 純度 99%)³²⁾。

4 酵素法によるバイオディーゼル燃料の製造

FAME はバイオディーゼル燃料 (BDF) と呼ばれ、ディーゼルエンジンからの排ガスは軽油由来の排ガスよりクリーンである。加えて、BDF は再生可能な燃料であることからヨーロッパでは菜種油から生産されており、最近では東南アジアでパーム油からの生産が増えて

いる。現在、BDF はアルカリ触媒を用いた油 (TAG) のメタノリシスにより製造されている。この化学法は、簡単で安価な製造方法であるが、グリセリンを含んだアルカリ性廃棄物の処理、アルカリ廃水の処理などの課題を抱えている。この問題を解決する方法の一つとして酵素法が提案されている。

4.1 廃食用油から BDF の製造

油 (TAG) を FAME に変換するとき少なくとも全脂肪酸に対して等モル量 (理論量という) の MeOH が必要である。一方、TAG に対する MeOH の溶解度は理論量の約 1/2 であり、理論量の MeOH を TAG に加えると MeOH の一部はミセルとして存在する。一般に酵素は短鎖アルコール (MeOH や EtOH) に対して不安定であり、ミセル状の MeOH と接触すると失活してしまう。しかし、MeOH が TAG 中に完全に溶解している状態で反応を行うと、この失活は回避できる³³⁾。

TAG をメタノリシスして FAME を製造するとき、固定化 *C. antarctica* リパーゼが効果的である。油に理論量の 1/3 量の MeOH と固定化酵素を加えて反応を開始し、MeOH が消費されてから 1/3 量の MeOH を 2 回添加する 3 段階逐次添加法を採用すると、FAME 含量は 97%以上に達する。この反応系で、酵素の失活はほとんど認められず、長期間 (少なくとも 100 日以上) 使用することができる³³⁾。このプロセスを採用すると廃食用油でも FAME に変換することができる。ただし、廃食用油は脂肪酸の酸化物や重合物を含んでいることから、FAME への変換率は精製植物油を原料としたときの変換率に比べるとわずかながら低くなる³⁴⁾。

4.2 ダーク油から BDF の製造

植物油を精製する際の脱酸工程からアルカリ油滓が副成されてくる。このアルカリ油滓を中和して回収した油分は黒褐色を呈していることからダーク油と呼ばれている。また、この油分は FFA とアシルグリセロールで構成されていることから acid oil とも呼ばれている。このダーク油に MeOH を加え、4.1 項で述べた固定化 *C. antarctica* リパーゼで処理すると、ダーク油中の FFA の 98%以上が FAME に変換される^{35,36)}。しかし、このメチルエステル化によって生じた水がアシルグリセロールのメタノリシスを完全に抑えてしまう。そこでまず、ダーク油中の FFA を FAME に変換した後、反応系中の水を減圧下で除去する。次いで、得られた脱水反応液中のアシルグリセロールをメタノリシスして FAME に変換する 2 段階反応が構築された。なお、ダーク油中には酵素反応を阻害する化合物が含まれており (未同定)、第 1 工程のメチルエステル化では MeOH を加えることにより、第 2 工程のメタノリシスでは油 (TAG) を添

加することにより酵素の阻害は解除された。また第2工程では、グリセリンの添加により酵素は著しく安定化し、固定化酵素は長期間（少なくとも100日以上）使用することができた³⁶⁾。

5 おわりに

今人類に課せられた大きな課題の一つは、環境に配慮した製造プロセスを構築し、持続可能な社会を構築していくことである。この中にあって、省エネルギー、廃棄物の低減化、環境にやさしいといった観点から生物反応は注目されている技術の一つである。しかし化学反応に比べて生物反応は時間がかかり、コストがかかりすぎるという問題点もある。この生物反応の欠点を補い、実生産プロセスとしての採用に到るには、生物反応の持つ最大の特徴、すなわち化学触媒では達成できない厳密な基質特異性を最大限に利用しなければならない。本稿では、リパーゼの基質特異性と触媒する反応をうまく組み合わせたプロセスを開発することにより、化学反応では困難な機能性油脂が製造でき、また油糧資源から効率よく有用物質が精製できることを紹介してきた。また、未利用バイオマスの再資源化にも生物反応が利用できる可能性を示す例として、酵素法による未利用油糧資源のBDFへの変換についても述べてきた。今後のものづくり産業界では、生物反応や化学反応の利点を組み合わせた複合プロセスの構築に向け、今まで以上の取り組みが求められるようになって予想される。このような状況の下で、本稿で述べたリパーゼ反応の利点が皆様の頭の片隅に残ることを願い結語とする。

文 献

- 1) 永尾寿浩, 島田裕司, 杉原耿雄ら, 大阪市立工業研究所報告, 第117回(2001).
- 2) 渡辺 嘉, 永尾寿浩, 小林 敬ら, 大阪市立工業研究所報告, 第129回(2006).
- 3) Y. Shimada, T. Nagao & Y. Watanabe, *Handbook of Industrial Biocatalysis*, (C.T. Hou edn.), CRC Press, Boca Raton, p.8-1~8-27 (2005).
- 4) S. Negishi, S. Shirasawa, Y. Arai *et al.*, *Enz. Microb. Technol.*, **32**, 66-70 (2003).
- 5) 島田裕司, 食品酵素化学の最新技術と応用—フードプロテオミクスへの展望—, (井上國世監修), シーエムシー出版, 東京, p.172-183 (2004).
- 6) Y. Shimada, A. Sugihara, H. Nakano *et al.*, *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 321-7 (1997).
- 7) R. Irimescu, K. Furihata, K. Hata *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **78**, 285-9 (2001).
- 8) Y. Shimada, Y. Watanabe, A. Sugihara *et al.*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **17**, 133-42 (2002).
- 9) R. Irimescu, K. Furihata, K. Hata *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **78**, 743-8 (2001).
- 10) A. Kawashima, Y. Shimada, T. Nagao *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, 871-7 (2002).
- 11) T. Nagao, A. Kawashima, M. Sumida *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80**, 867-72 (2003).
- 12) 島田裕司, 食品工業における科学・技術の進歩, (日本食品科学工学会編), 光琳, 東京, p.121-43 (2003).
- 13) Y. Shimada, J. Ogawa, Y. Watanabe *et al.*, *Lipids*, **38**, 1281-6 (2003).
- 14) G.P. McNeil, S. Shimizu & T. Yamane, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 1-5 (1991).
- 15) Y. Watanabe, Y. Shimada, Y. Yamauchi-Sato *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, 891-6 (2002).
- 16) P. Pinsirodom, Y. Watanabe, T. Nagao *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **81**, 543-7 (2004).
- 17) S. Yamaguchi & T. Mase, *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 162-7 (1991).
- 18) Y. Watanabe, Y. Yamauchi-Sato, T. Nagao *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80**, 909-14 (2003).
- 19) Y. Watanabe, Y. Yamauchi-Sato, T. Nagao *et al.*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **27**, 249-54 (2004).
- 20) Y. Watanabe, Y. Yamauchi-Sato, T. Nagao *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **82**, 619-23 (2005).
- 21) Y. Shimada, T. Nagao & Y. Watanabe, *Nutraceutical and Specialty Lipids and their Co-Products*, (F. Shahidi edn.) CRC Press, Boca Raton, p.365-86 (2006).
- 22) Y. Shimada, K. Maruyama, A. Sugihara *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 1441-6 (1997).
- 23) Y. Shimada, N. Sakai, A. Sugihara *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 1539-44 (1998).
- 24) A. Yamauchi, T. Nagao, Y. Watanabe *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **82**, 833-7 (2005).
- 25) T. Nagao, Y. Watanabe, T. Kobayashi *et al.*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **44**, 14-9 (2007).
- 26) T. Nagao, Y. Shimada, Y. Yamauchi-Sato *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, 303-8 (2002).
- 27) Y. Shimada, T. Nagao & T. Kobayashi, *Biocatalysis and Biotechnology for Functional Foods and Industrial Products* (C.T. Hou & J.F. Shaw edn.), CRC Press, Boca Raton, p.23-35 (2007).
- 28) Y. Watanabe, Y. Shimada, A. Sugihara *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 622-6 (1999).
- 29) K. Maruyama, Y. Shimada, T. Baba *et al.*, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **49**, 793-9 (2000).
- 30) T. Nagao, T. Kobayashi, Y. Hirota *et al.*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **37**, 56-62 (2005).
- 31) Y. Hirota, T. Nagao, Y. Watanabe *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80**, 341-6 (2003).
- 32) Y. Shimada, T. Nagao, Y. Watanabe *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80**, 243-7 (2003).
- 33) Y. Shimada, Y. Watanabe, T. Samukawa *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 789-93 (1999).
- 34) Y. Watanabe, Y. Shimada, A. Sugihara *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **78**, 703-7 (2001).
- 35) Y. Watanabe, P. Pinsirodom, T. Nagao *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **82**, 825-31 (2005).
- 36) Y. Watanabe, Y. Shimada, A. Sugihara *et al.*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **44**, 99-105 (2007).