

リパーゼによる高度不飽和アシルグリセリン混合物の内部エステル交換反応

細川 雅史・堀井 亜希・高橋是太郎
北海道大学水産学部 (〒041-8611 函館市港町 3-1-1)

Lipase-mediated Interesterification of a Highly Unsaturated Fatty Acid-containing Acylglycerol Mixture

Masashi HOSOKAWA, Aki HORII, and Koretaro TAKAHASHI

Faculty of Fisheries, Hokkaido University

(3-1-1, Minato-cho, Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611)

Abstract : The triacylglycerol (TG) molar ratio was augmented by Lipozyme IM-mediated interesterification of docosahexaenoic acid (DHA) rich (72.0%) partial acylglycerol mixtures (DHA-70 G). DHA-70 G used as substrate contained TG at 49.3%. Through interesterification mediated by Lipozyme IM previously dried with phosphoric anhydride prior to reaction, TG increased to 64.5% by 24 h.

The addition of molecular sieves in the reaction system at this point was effective by further increased TG in the reaction product. This content finally reached 81.0% at 48 h interesterification. DHA content dominated for 73.7% of the fatty acids in TG thus obtained.

Key words : docosahexaenoic acid, interesterification, acylglycerol mixture, docosahexaenoic acid-enriched triacylglycerol, Lipozyme IM

1 緒 言

ドコサヘキサエン酸 (DHA) は多彩な生理機能を有し¹⁾, 多くの食品中に利用されている。そのため, リパーゼ剤の特異性を利用した部分加水分解反応^{2),3)}やグリセリド合成反応^{4),5)}, エステル交換反応^{6)~8)}による DHA 高含有トリアシルグリセリン (TG) の調製法が多く報告されている。これらの反応過程では, 量の差はあるものの副生成物としてジアシルグリセリン (DG) やモノアシルグリセリン (MG) といった部分アシルグリセリン (PG) の生成も認められる。そのため田中ら^{9),10)} は魚油の加水分解によって生じた PG とあらかじめ DHA を高濃度化した遊離脂肪酸 (FFA) から TG をエステル合成する反応について詳細に報告している。本研究では新たな方法として, アシルグリセリン混合物のみを反応基質とし, PG 中の脂肪酸残基を他の PG 中に移行するエステル交換反応により, 高度不飽和 TG の高含有化を試みた。なお, 本論文ではこのようなエステル交換反応を, 特に「内部エステル交換反応」と表記した。

連絡者: 高橋是太郎

2 実 験

2-1 試料及び試薬

高度不飽和アシルグリセリン混合物 (DHA-70 G) は, 日本化学飼料(株)より入手した。酵素は, *Rhizomucor miehei* 由来の固定化リパーゼ, リポザイム IM (ノボ・ノルディスク社製, EC 3.1.1.3, 79.2 BIU/g) を使用した。その他の試薬は, 全て市販の特級品を用いた。

2-2 内部エステル交換反応

DHA-70 G 20-200 mg を含むヘキサン溶液 2 mL (ヘキサンはモレキュラシーブにより使用前に脱水) にリポザイム IM を加え, 40°C の恒温下にて 75 strokes/min で攪拌しながら 24 h 反応を行った。有機溶媒中では微量の水分によってリポザイム IM が活性化される^{11),12)}。そのため, 水の添加による水分量の調節が困難であることから, リポザイム IM 30 mg をあらかじめ五酸化リンで脱水するか, 又は水分活性を指標 (K_2CO_3 ($a_w=0.44$), K_2SO_4 ($a_w=0.97$)) に水分量を調整し反応に供した。

2-3 モレキュラシーブの添加

反応系内の酵素近傍に存在する水分を除去するため、五酸化リンで脱水したリポザイム IM を用いて 24 h 反応を行った後、常圧加熱乾燥モレキュラシーブ (2 mm, E. Merck 社製) 120 mg を添加し、更に 24 h 反応を行った。

2・4 分 析

反応混液 2 μ L をシリカゲル TLC プレート (E. Merck 社製) に供し、ヘキサン：エチルエーテル：酢酸 (70:30:1, vol/vol/vol) で展開後、3% 酢酸銅 8% リン酸¹³⁾を噴霧し、160 $^{\circ}$ C で 20 min 加熱した。発色したスポットをデンストメーター (F 808 型, コスモ社製) およびデジタイザーによって定量し、脂質組成を算出した。また、クロロホルム：メタノール (1:1, vol/vol) 30 mL を用いて孔径 0.45 μ m のフィルターにより、反応混液からリポザイム IM をろ別し、メチルエステル化後、ガスクロマトグラフィー (GC) により脂肪酸組成を分析した。更に、反応生成物を調製用シリカゲル TLC プレート (E. Merck 社製) に供し、ヘキサン：エチルエーテル (3:2, vol/vol) で展開後、TG 画分及び PG 画分 (MG+DG) を分離し、同様に脂肪酸組成を分析した。なお、収率は別途 10 倍容量の系で同様の反応を行った後、重量を測定することにより基質 DHA-70 G 重量に対する回収率 (%) として算出した。

3 結果及び考察

3・1 リポザイムの水分活性の影響

エステル交換反応では、完全な無水状態ではリパーゼ

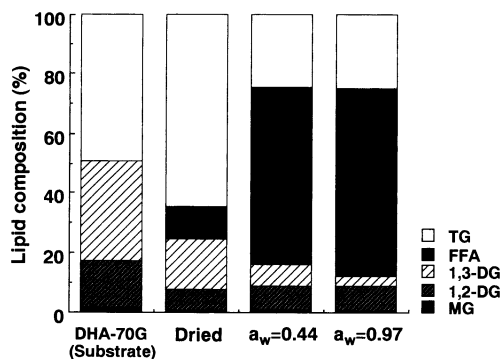


Fig. 1 Effect of Water Activity of Lipozyme IM on Interesterification of DHA 70G, Designated as "Substrate".

Reaction conditions : DHA-70 G (20 mg) containing hexane 2 mL, Lipozyme IM 30 mg (initial weight 30 mg), 40 $^{\circ}$ C, 24 h, 75 strokes/min.

Abbreviations : TG ; triacylglycerol, FFA ; free fatty acid, 1,3-DG ; 1,3-diacylglycerol, 1,2-DG ; 1,2-diacylglycerol, MG ; monoacylglycerol.

が活性化されず反応が進行しないものの、水分が過剰になると副反応である加水分解反応が進行する。そのため、内部エステル交換反応における至適水分量を明らかにする目的で、水分活性 (a_w) を指標としてリポザイム IM の水分量を調整し¹²⁾, 24 h 反応を行った。その結果、五酸化リンで可及的に脱水したリポザイム IM を用いた場合に PG が最も減少し、TG 含有率が 49.4% から 64.5% まで上昇した (Fig. 1)。リポザイム IM を $a_w=0.44$ 及び $a_w=0.97$ に調整した場合は、水分が過剰となり TG 並びに PG の加水分解反応が進行し、多量の FFA が生成した。

3・2 モレキュラシーブの添加

前記のように、五酸化リンで脱水したリポザイム IM を用いて内部エステル交換反応を行った場合に、TG 含有率の上昇がみられたが、同時に 10% 程度の FFA の生成も認められた。そのため、更に酵素近傍に存在する水分を除去することが必要であると考えた。そこで、24 h 反応を行った後に脱水剤としてモレキュラシーブ 120 mg を添加し、更に 24 h 反応することにより、残存する PG と生成した FFA から TG への変換反応を試みた。その結果、モレキュラシーブの添加により TG 含有率が更に上昇し、合計反応時間 48 h 後に 81.0% に達した (Fig. 2)。

田中ら¹⁴⁾は PG と FFA を 1:2 (mol/mol) の割合で含む反応系中にモレキュラシーブを添加することで、PG を完全に TG へ変換できることを報告している。本反応系においても、モレキュラシーブの添加により FFA の含有率が低下したことから、エステル交換過程

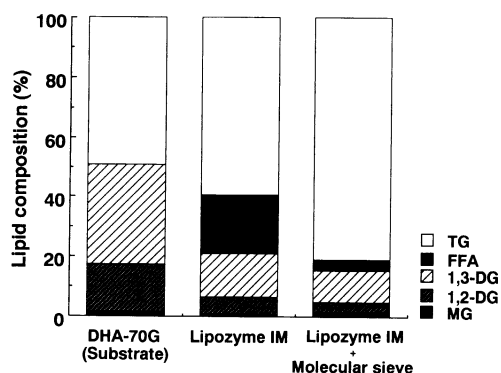


Fig. 2 Effect of Molecular Sieve on Lipozyme IM-mediated Interesterification of DHA 70G.

Reaction conditions : Hexane 2mL which contains DHA-70 G (20 mg), dried Lipozyme IM (initial weight 30 mg), and molecular sieve 120 mg (added after 24 h), 40 $^{\circ}$ C, 48 h, 75 strokes/min.

Abbreviations are same as in Fig. 1.

中に酵素近傍に存在した過剰の水分がモレキュラシーブによって除去され、その結果、反応平衡がエステル合成方向へ傾いてTG含有率が更に上昇したものと考えられる。

3.3 DHA-70 G 添加量の検討

一般に、酵素剤に対し基質量が多いほど経済的効果は大きい。そこで、リポザイム IM 30 mg に対し DHA-70 G の添加量を 200 mg まで増加させて同様の反応を行った。その結果、先のように DHA-70 G 添加量が 20 mg のときは TG 含有率が 81.0% であったのに対し、5 倍量(100 mg) では 75.9%、10 倍量(200 mg) では 71.8% に低下した (Fig. 3)。このように至適基質量の 10 倍の DHA-70 G の添加に対しては TG 含有率が 10% 程度低下したが、酵素剤が高価なときはやむを得ないと考える。本研究で使用したリポザイム IM は TG の 1, 3 位に特異性を有する酵素であり、エステル化反応による TG の合成では、1, 3-DG から 1, 2-DG への

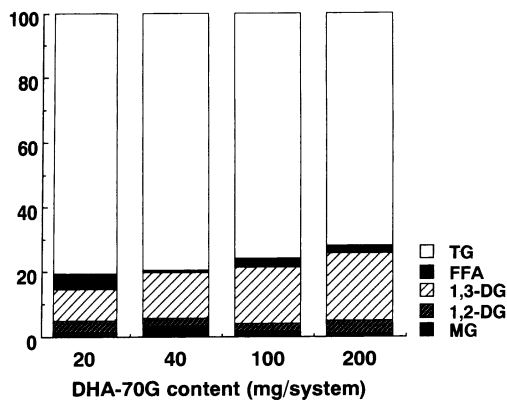


Fig. 3 Effect of DHA-70G Content on Lipozyme IM-mediated Interesterification.

Reaction conditions : Hexane 2mL which contains selected concentration of DHA-70 G, Lipozyme IM (initial weight 30 mg), and molecular sieve 120 mg, 40°C, 75 strokes/min.

Abbreviations are same as in Fig. 1.

Table 1 DHA Content (%) of the Substrate (DHA-70 G) and the Reaction Product after Lipozyme IM-mediated Interesterification.

	Substrate DHA-70 G	Reaction product
Total	72.0	71.9
TG fraction	65.3	73.7
PG fraction	87.0	69.9

Abbreviations : DHA-70G ; acylglycerol mixture, TG ; triacylglycerol, PG ; partial acylglycerol.

異性化が律速段階となることが報告されている^{15),16)}。基質 DHA-70 G の添加量を増加させたのにもない、反応生成物中に占める 1, 3-DG の割合が上昇したことから、本反応においてもアシル基転移過程が律速となっていることが推察された。

3.4 脂肪酸組成の分析及び回収率の算出

反応生成物の脂肪酸組成における DHA の組成比は、基質 DHA-70 G 中の DHA 組成比に比べ変化がなかった。しかし TG に限って見た場合、基質 DHA-70 G の TG 中の DHA 組成比は 65.3% であったのに対し、反応生成物の TG 中には DHA が 73.7% 存在していた (Table 1)。これは内部エステル交換反応の進行にともない DHA 組成比が高い PG が TG に変換され、TG 中の DHA 組成比が増加したためであると考えられる。生成物の回収率を算出した結果、リポザイム IM 300 mg に対し基質 DHA-70 G 200 mg 添加では 88.7 重量%、2000 mg 添加では 94.6% になった。

以上の結果より、リポザイム IM の水分を可及的に除去し、且つ反応系にモレキュラシーブを添加することにより、高度不飽和アシルグリセリン混合物からより DHA 組成比の高い TG を得られることが明らかとなった。

(受付 : 1998 年 7 月 22 日, 受理 : 1998 年 10 月 28 日)

文 献

- 1) 矢澤一良, 影山治夫, 油化学, 40, 974 (1991).
- 2) Y. Tanaka, J. Hirano, T. Funada, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 1210 (1992).
- 3) Y. Shimada, K. Maruyama, S. Okazaki, M. Nakamura, A. Sugihara, Y. Tominaga, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 951 (1994).
- 4) K. Osada, K. Takahashi, M. Hatano, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 39, 50 (1990).
- 5) Y. Kosugi, N. Azuma, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 1397 (1994).
- 6) T. Yamane, T. Suzuki, Y. Sahashi, L. Vikersveen, T. Hoshino, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 1104 (1992).
- 7) 豊島 尊, 原 節子, 戸谷洋一郎, 油化学, 42, 30 (1993).
- 8) 種 和彦, 原 節子, 戸谷洋一郎, 油化学, 46, 785 (1997).
- 9) Y. Tanaka, J. Hirano, T. Funada, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 331 (1994).
- 10) 田中幸久, 船田 正, 油化学, 43, 39 (1994).
- 11) R.H. Valivety, P.J. Halling, A.R. Macrae, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1118, 218 (1992).
- 12) I. Svensson, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 986 (1992).
- 13) M.E. Fewster, B.J. Burns, J.F. Mead, *J. Chromatogr.*, 43, 120 (1969).
- 14) 田中幸久, 船田 正, 平野二郎, 油化学, 41, 563 (1992).
- 15) F. Ergan, M. Tarani, G. Andre, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 412 (1991).
- 16) G.G. Haraldsson, B.O. Gudmundsson, O. Almarsson, *Tetrahedron*, 51, 941 (1995).

[ノート] 各地産アワ (*Setaria italica* Beauv.) 種子中のシトスタノール含量

阿部 文一・高津戸 秀

上越教育大学自然系化学教室 (〒943-8512 新潟県上越市山屋敷町 1 番地)

産地別のアワ (*Setaria italica* Beauv.) 種子および精白粒中のシトスタノール含量について、GC-MS 分析で比較研究をおこなった。その結果、総ステロール中のシトスタノール含有量は 20~40% の範囲で、産地によってかなりの変動がある事が分かった。また、種子と精白粒間では差がなかった。

(連絡者：高津戸秀) Vol. 48, No. 1, 41 (1999)

[ノート] 繊維基質形態の違いを考慮した洗浄力の評価法

山口 庸子*1・永山 升三*2

*1 共立女子短期大学 (〒101-8433 東京都千代田区一ツ橋 2-2-1)

*2 共立女子大学 (〒101-8433 東京都千代田区一ツ橋 2-2-1)

新素材繊維を対象に繊維基質形態の相違が洗浄力評価に及ぼす影響を検討した。繊維基質形態の影響を考慮するために Kubelka-Munk の二定数理論式および湊の計算式を織物に適用させて、従来一定数として取り扱われてきた K/S 値に代わって試料布の散乱係数 (S) と吸収係数 (K) を別々に算出した。その結果、K/S 値を一定数として取り扱う場合に比較して二定数として取り扱うことによって、「新合繊」や「テンセル」といった新素材繊維の散乱係数は通常のポリエステル布や綿布に比較して污垢付着率の増加に伴い大きく低下することを確認した。Kubelka-Munk の一定数としての K/S 値に代わって、吸収係数 (K) のみを使用した新しい洗浄力の評価方法を提案しその有効性を確認した。

(連絡者：山口庸子) Vol. 48, No. 1, 45 (1999)

[ノート] リパーゼによる高度不飽和アシルグリセリン 混合物の内部エステル交換反応

細川 雅史・堀井 亜希・高橋是太郎

北海道大学水産学部 (〒041-8611 函館市港町 3-1-1)

ドコサヘキサエン酸 (DHA) を 72.0% 含むアシルグリセリン混合物 (PG) を反応基質として外部からアシル基供与体を添加せずにリポザイム IM による内部エステル交換反応をヘキサン中で行った。可及的にトリアシルグリセリン (TG) に変換する反応条件について検討した結果、①あらかじめ五酸化リンを用いてリポザイム IM を脱水してから反応に供すること、②モレキュラシーブを用いて過剰の水分を除去することの 2 点が高 TG 組成比を得るために有効であることを認めた。すなわち基質中の TG 組成比 49.4% に対し、反応生成物の TG 組成比が①により 64.5% (反応時間 24 h) に上昇し、①且つ②の条件下 (合計反応時間 48 h) では、TG 組成比がさらに上昇し、81.0% の反応物を得ることができた。これによって得られた TG は 73.7% の DHA を含んでいた。

(連絡者：高橋是太郎) Vol. 48, No. 1, 51 (1999)