



Title	微生物由来固定化リパーゼによるいわし油の改質
Author(s)	長田, 恭一; Osada, Kyoichi; 高橋, 是太郎 他
Description	報文
Citation	油化学, 39(7), 467-471
Issue Date	1990-07-20
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/42709">https://hdl.handle.net/2115/42709</a>
Type	journal article
File Information	takahashi_JJ0CS39_467.pdf



## 報 文

## 微生物由来固定化リパーゼによるいわし油の改質

長田恭一・高橋是太郎・羽田野六男

北海道大学水産学部食品化学第一講座 (〒041 函館市港町 3-1-1)

## Modification of Sardine Oil by Immobilized Bacterial Lipase

Kyoichi OSADA, Koretaro TAKAHASHI, and Mutsuo HATANO

Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University,  
(3-1-1 Minato-cho, Hakodate-shi, 〒041)

Determination was made of the rates of icosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) incorporation into triolein and sardine oil triglyceride (TG).

Three kinds of lipases (Lipase OF from *Candida cylindracea*, Lipase A from *Aspergillus* sp. and Lipase TOYO from *Chromobacterium viscosum*) were first immobilized onto Celite 545. A preliminary study was then performed to determine optimum conditions for acidolysis by conducting this process between triolein and palmitic acid, using these immobilized lipases including Lipozyme<sup>TH</sup> (*Mucor miehei* lipase was immobilized on a macroporous anion exchange resin). Optimum water contents for Lipase OF, Lipase A, Lipozyme, and Lipase TOYO reaction systems were 20.38%, 10.24%, 6.38~10.38%, and 5.18%, respectively, and the optimum immobilized lipase amount was about 250 mg for any of the four lipases.

Under the above conditions, the acidolysis of triolein between pure EPA and then DHA was carried out. EPA incorporation rate was found highest in the system using Lipase OF (25.09%), whereas in the case of DHA, it was highest in the system using Lipase TOYO (23.02%).

Finally, acidolysis of sardine oil TG with an EPA, DHA concentrated free fatty acid mixture (EPA+DHA : 68.83%) was carried out and the results examined.

As a result of the low incorporation rates of EPA and DHA into the original sardine oil TG, the percentage of DHA in the reactant TG doubled in the reaction systems using Lipase TOYO and Lipozyme.

## 1 緒 言

魚油中のイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) を濃縮する目的で、ウィンタリングなどの物理的処理が広く行われているが、グリセリドのままでは収率が悪く、濃縮率も低い。そこで、欧米では魚油を加水分解して混合脂肪酸を調製し、これをウィンタリング<sup>1)</sup>、尿素付加法<sup>2)</sup>、塩形成法<sup>1)</sup>などの化学的方法によって、EPA ならびに DHA を濃縮し、エチルエステルに変換して動物投与試験あるいはヒトにおける臨床実験が行われており、その生理的効果が確認され、製剤や健康食品として製品化されつつある。しかし、1988年に Lawson と Hughes<sup>3)</sup> によってヒトにおいては、EPA や DHA が血しょう(漿)中に吸収される割合は、エチルエステル型で摂取した場合よりもトリグリセリド

(TG)型で摂取した場合の方が、約 2.7~3.5 倍も高いことが明らかにされたことにより、EPA や DHA を TG の形で摂取する方が望ましいことが明確となった。すでに田中ら<sup>4)</sup>は EPA, DHA を濃縮するために微生物源リパーゼの基質特異性を利用した加水分解反応による魚油の改質を試みているが、本研究では EPA と DHA を生体利用率の優れた形に変換することを目的として、微生物源リパーゼのアシドリシスによるいわし油の改質について検討した。

## 2 実 験

## 2-1 供試リパーゼとリパーゼの固定化

Table-1 に示す供試リパーゼのうち Lipase OF, Lipase A 及び Lipase TOYO は, Coleman と Macrea の方法<sup>5)</sup>に従って Celite 545 に固定化した。すなわち、

Table-1 Lipase examined.

Product	Origin	Source	Specificity
Lipase OF	<i>Candida cylindracea</i>	Meito Sangyo Co., Ltd., Nagoya	Random
Lipase A	<i>Aspergillus</i> sp.	Amano Pharmaceutical Ltd., Nagoya	1, 3-Specific
Lipase TOYO	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Toyo Jozo Co., Ltd., Tokyo	Random
Lipozyme	<i>Mucor miehei</i>	Novo industri A/S., Copenhagen	1, 3-Specific

リパーゼ 1 g を冷水 20 mL によく懸濁させて、0°C で Celite 545 2.5 g をかくはんしながら加え、次いで 30 mL の冷アセトンを 5 min にわたり徐々に添加した。その後、30 min かくはんして濾過を行い、減圧下で乾燥させた。市販の固定化酵素である Lipozyme は、すでに多孔性陰イオン交換樹脂に *Mucor miehei* のリパーゼが固定化されているので、そのまま使用した。

## 2.2 アシドリシスに及ぼす水分量の影響の検討

固定化リパーゼを水和する水分量が脂肪酸の導入率と平衡状態に達する時間に著しく影響することから、それぞれの最適水分量について調べた。水分量は、リパーゼを水和する時に加えた水分と溶媒 (*n*-ヘキサン) 中の水分を加えたものとした。*n*-ヘキサン中の水分量は、等量のイソプロピルアルコールを加えてよく混合し、熱伝導度型検出器 (TCD) による気-固クロマトグラフィー (GSC) を用いて水分量とイソプロピルアルコール量を測定し、次いで水素炎イオン化検出器 (FID) により *n*-ヘキサンとイソプロピルアルコールの混合の割合を求め、両者のイソプロピルアルコールの面積を媒介値として算出した。なお、これらの測定条件は以下の通りである。装置、日立 164 形及び 163 形ガスクロマトグラフ; カラム, Porapak Q 80~100 mesh 2 m ステンレスカラム; カラム温度, 164 形は 80°C, 163 形は 150→240°C (5°C/min); 注入口及び検出器温度, 164 形 (TCD) は 105°C, 163 形 (FID) は 330°C; キャリヤーガス, 164 形は He 40 mL/min, 163 形は N<sub>2</sub> 25 mL/min.

アシドリシスは、Novo industri AF 206<sup>6)</sup> の方法に準じて行った。すなわち、固定化リパーゼ 250 mg に対して水分量を、Lipase OF には 0.38%, 2.38%, 5.58%, 10.38%, 20.38%, 30.38%, Lipase A には 0.38%, 2.74%, 5.24%, 10.24%, 20.24%, Lipozyme には 0.38%, 2.38%, 6.38%, 10.38%, 20.38%, 30.38%, Lipase TOYO には 0.38%, 2.38%, 5.18%, 10.38%, 20.38%, 30.38% 添加し、それぞれに *n*-ヘキサン 11.4 mL, トリオレイン (純度 73%, 和光純業工業株式会社) 678 μM, パルミチン酸 (純度 97%, 和光純業工業株式会社) 678 μM を 50 mL の共栓三角フラスコに入れて脱気後、37°C でインキュベートし、Lipase OF ならびに Lipase TOYO は 3 h, Lipase A は 6 h, Lipozyme は 1 h 反応させた。反応停止は、反応混液 1 mL を塩基性活性

アルミナカラム 2 g (Alumina 90 Activated, Basic, Activity I; Merck 社, 50 g に水を 1 g 加えて活性化させたもの) 上にのせ、3 mL のジエチルエーテルで TG を溶出させることにより行った。得られた TG を Prevot と Mordret<sup>7)</sup> のエステル化改良法でメチルエステル化した後、次の条件で気-液クロマトグラフィー (GLC) に供して脂肪酸組成を検討した。装置、日立 063 形ガスクロマトグラフ; カラム, Unisole 3000, Uniport C 80~100 mesh, 3 m×3 mm ガラスカラム; カラム温度, 220°C; 注入口温度及び検出器 (FID) 温度, 250°C; キャリヤーガス, N<sub>2</sub> 30 mL/min.

## 2.3 固定化リパーゼの最適量の検討

固定化リパーゼの量によって脂肪酸の導入率が異なると考えられることから、最も効率的にアシドリシスを行うための固定化リパーゼ量について検討した。Lipase OF, Lipozyme, Lipase TOYO は 50, 100, 250, 500, 750 mg, Lipase A は 100, 250, 400, 600, 800 mg をそれぞれ 50 mL の共栓三角フラスコにとり、先に求めた最適量的の水を加えて脱気後、トリオレイン (純度 73%) とパルミチン酸 (純度 97%) を基質としてアシドリシスを行い、脂肪酸の導入率を求めた。

## 2.4 固定化リパーゼのエステル交換活性の測定

固定化リパーゼのエステル交換活性は、Novo industri AF 206 の分析法<sup>5)</sup> に従って行った。すなわち、固定化リパーゼ 1 g でトリオレインにパルミチン酸が 1 min に 1 μM 導入する単位を 1 BIU (Batch Interesterification Unit) として算出した。測定法は、固定化リパーゼの最適条件下でアシドリシスを 15 min, 30 min, そして反応平衡点の 3 点について行い、トリオレイン (純度 99%, Sigma Chemical Co.) に導入されたパルミチン酸 (純度 99%, Sigma Chemical Co.) 量を GLC で測定し、次式により BIU を算出した。

$$\text{BIU} = \text{Pinc, eq.} \cdot \ln \left( \frac{\text{Pinc, eq.}}{\text{Pinc, eq.} - \text{Pinc.}} \right) \cdot M / t \cdot W$$

Pinc, eq. : 反応平衡点における導入パルミチン酸 (%); Pinc. : 15 min または 30 min の反応で導入されたパルミチン酸 (%); *M* : 678 μM (600 mg のトリオレイン, 174 mg のパルミチン酸); *t* : 反応時間 (min); *W* : 固定化リパーゼ量 (g).

## 2.5 高度不飽和脂肪酸とトリオレインのアシドリシ

ス

固定化リパーゼを用いて、先の最適条件下でEPA及びDHA(いずれも純度99%,出光石油化学株式会社)とトリオレイン(純度99%)のアシドリシスを行い、それぞれのトリオレインへの導入率を求めた。

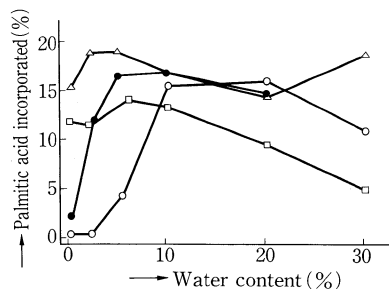
2・6 いわし油のアシドリシスによる改質

松野ら<sup>8)</sup>の方法に従っていわし油をけん化して混合脂肪酸を調製し、アセトンに溶解後-20℃、-40℃、及び-60℃と順に冷却して、低温溶媒分別<sup>9)</sup>を行った。さらに、2回のカリウム塩アセトン法による塩形成法<sup>1)</sup>を行ってEPAとDHAの濃度を高めたいわし油の脂肪酸(EPA:43.51%,DHA:25.32%)とシリカゲルカラムクロマト法によって精製したいわし油のTG(EPA:22.43%,DHA:6.71%)を基質として、先に決定した最適反応条件下で固定化リパーゼを用いてアシドリシスを行い、EPAとDHAの増加率について検討した。

3 結果及び考察

3・1 アシドリシスにおける固定化リパーゼの最適水分量

固定化リパーゼによるアシドリシスは、微水系で効率的に起こる<sup>10)</sup>ので、その水分量を調整する必要<sup>11)</sup>がある。水分量が低すぎる場合には、反応が遅く、また高い場合には、TGの加水分解が促進されてしまうことが知られている<sup>12)</sup>。そこで、一定量の固定化リパーゼを水和するのに必要な最適水分量をトリオレインに対するパルミチン酸の導入率から求めた。その結果をFig.-1に示す。Lipase OFでは、3hの反応で水分量が20.38%のとき導入率が最も高くなり、(15.93%),Lipase Aでは、6hの反応で、10.24%のとき導入率が最高値(16.81%)に達した。またLipozymeは、1hの反応で、6.38



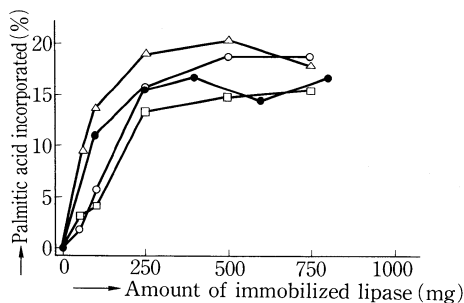
Symbols are ○ : Lipases OF, ● : Lipase A, □ : Lipozyme, △ : Lipase TOYO. Reaction times were Lipase OF and Lipase TOYO, 3 h, Lipase A, 6 h, and Lipozyme, 1 h.

Fig.-1 Effect of water content on acidolyses between triolein and palmitic acid.

%のとき導入率が最も高くなった(14.12%)。Lipase TOYOでは、3hの反応で、水分量が5.18%のとき最も高い導入率(18.94%)を示した。

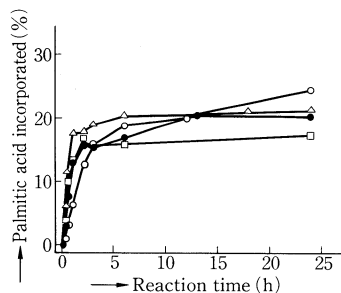
これらの結果から、固定化リパーゼの最適水分量は、Lipase OFでは20.38%,Lipase Aは10.24%,Lipase TOYOは5.18%であると判断した。Lipozymeは、6.38%が最適であるとも考えられるが、Novo社の測定条件では、10%を最適としているため、6.38~10.38%を最適水分量とした。

壇辻ら<sup>13)</sup>は、*Saccharomycopsis lipolytica*のアセトン洗浄細胞を用いてオリブ油とステアリン酸のアシドリシスを行い、反応系全体中の水分量が約1%のときに最高の導入率を得ている。また、先述のように、Novo社ではLipozyme 250 mgに対して10%の水分量で最高の導入率を得ている。これらの報告に見られるように微水系で、効率的にアシドリシスが起きていることは、著者らの結果とよく一致している。本研究により、興味ある結果としてLipase TOYOとLipozymeについては、ほとんど水の無い状態(0.38%)でもかなり高い導入率を示すことが確認された。



Symbols as well as the reaction times are the same as in Fig.-1.

Fig.-2 Effect of immobilized lipase amount on acidolyses between triolein and palmitic acid.



Symbols are the same as in Fig.-1.

Fig.-3 Rate of palmitic acid incorporated into triolein by immobilized lipase acidolyses.

### 3・2 固定化リパーゼの最適量

次に、最も効率的にアシドリシスを行うのに必要な固定化リパーゼの量について検討した。その結果、Fig.-2に示したようにいずれの固定化リパーゼともほぼ250 mg前後で平衡近くに達し、200~300 mgが最も効率の良い固定化リパーゼ量と判断した。これ以上の固定化リパーゼの添加は、酵素の最適水分量の絶対量の増加につながり、系全体の水分量の増加により、かえってTGの加水分解が促進されるものと考えられる。

以上により求めた最適条件下でアシドリシスを24 h行い、経時的に導入率(Fig.-3)を調べた結果、Lipase OFは24.51%、Lipase Aは20.63%、Lipozymeは17.34%、Lipase TOYOでは21.33%の交換率が得られた。なお、このときのBIUはTable-2に示したように、Lipase OFは2.86 BIU、Lipase Aは9.90 BIU、Lipozymeは9.58 BIU、Lipase TOYOは8.88 BIUであった。

### 3・3 トリオレインとEPA及びDHAのアシドリシス

高度不飽和脂肪酸が固定化リパーゼによってどの程度アシドリシスされるかを明らかにするために、トリオレイン(純度99%)にEPA及びDHA(いずれも純度99%)を加え、固定化リパーゼを用いて24 hエステル交換を行った。

その結果、Table-3に示したようにEPAの導入率は、Lipase OFが25.09%と最も高く、次いでLipase TOYOが21.27%、Lipozymeは21.21%であり、Lipase Aは4.34%と非常に低い導入率であった。また、DHA

の導入率は、Lipase TOYOが23.02%と最も高く、次いで、Lipozymeが15.31%であった。一方、Lipase OFは7.80%、Lipase Aは1.28%と低い導入率であった。これらの結果から、固定化リパーゼの種類によって導入率がかなり異なるが、いずれもトリオレインとEPAならびにDHAとのアシドリシスが可能であることが明らかとなった

### 3・4 アシドリシスによるいわし油の改質

低温溶媒分別法ならびに塩形成法で、EPA+DHAの濃度を68.83%にまで高めたいわし油の混合脂肪酸について、固定化リパーゼを用いて元のいわし油との間で24 hアシドリシスを行った。その結果、Table-4に示したように、Lipase OFではEPAが3.79%、DHAが4.22%、Lipase AではEPAが3.46%、DHAが0.94%、LipozymeではEPAが1.65%、DHAが6.61%、Lipase TOYOではEPAが4.21%、DHAが5.91%とそれぞれ増加した。固定化リパーゼを用いていわし油のアシドリシスを行うと、いずれの固定化リパーゼを用いてもEPAとDHAの導入率は低く、EPAとDHAを合わせた導入率でも最も高いもので約10%に過ぎなかった。その原因としては、第一に両基質とも多くの種類の脂肪酸を含んでいることから、導入されやすい他の脂肪酸が、きつ(拮)抗的に作用したことによると考えられる。すなわち、先に示したトリオレインとEPA及びDHAのアシドリシスではLipase TOYOに見られるように、両脂肪酸の導入率はそれぞれ21.27%、23.02%に達しているが、この場合は、わずか2種類の脂肪酸しか反応系に関与していないのに対して、いわし油の改質における反応系では、12種類以上の脂肪酸が反応に関与しているために、そのような作用が生じるものと推定される。第二には反応に使用したいわし油の混合脂肪酸に少量存在する過酸化物がアシドリシス反応を阻害した<sup>14)</sup>のではないかと考えられる。

しかし、Table-4より明らかかなように、とくにLipase TOYOとLipozymeでは、TG中のDHA含有率がそれぞれ改質前の6.71%から前者では12.62%、後者では13.32%と約2倍にも達しており、今回の結果から、Lipase Aのみは、EPAやDHAを基質とする反応には、不向きとも考えられるが、他の供試リパーゼ

Table-2 Optimum conditions for the immobilized lipase acidolyses.

Lipase employed	Optimum water content (%)	BIU*
Lipase OF	20.38	2.86
Lipase A	10.24	9.90
Lipase TOYO	5.18	8.88
Lipozyme	6.38~10.38	9.58

\*Batch interesterification unit; For the definition, see the text.

Table-3 Rate of EPA and DHA incorporation into triolein by immobilized lipase acidolyses.

Lipase used	EPA incorporated (%)	DHA incorporated (%)
Lipase OF	25.09	7.80
Lipase A	4.34	1.28
Lipase TOYO	21.27	23.02
Lipozyme	21.21	15.31

Table-4 Changes in EPA and DHA content of the interesterified TG after immobilized lipase acidolyses.

Fatty acid	Original sardine TG (%)	Fatty acid mixture (%)	After acidolysis for 24 h (%)			
			Lipase OF	Lipase A	Lipase TOYO	Lipozyme
EPA	22.43	43.51	26.22	25.89	26.64	24.08
DHA	6.71	25.32	10.93	7.65	12.62	13.32

はいわし油の改質に充分適用できるものと結論された。

#### 4 総 括

4種類の微生物由来のリパーゼを固定化し、その固定化リパーゼを用いてトリオレインとパルミチン酸を基質としてアシドリシスの反応最適条件を求めた。その結果、最適水分量は、それぞれ Lipase OF では 20.38%、Lipase A では 10.24%、Lipozyme は 6.38~10.38%、Lipase TOYO は 5.18% となった。一方、最適酵素量はいずれも 250 mg 前後であった。トリオレインと EPA 及び DHA とのアシドリシスにおいて、同条件下での EPA の導入率は、Lipase OF で最も高く 25.09% に達した。DHA の導入率は、Lipase TOYO で最も高く 23.02% であった。いわし油と EPA+DHA の濃度を 68.83% に高めた混合脂肪酸とのアシドリシスでは、トリオレインと EPA 及び DHA とのアシドリシスの場合よりも導入率は低かった。このときの EPA の導入率は、Lipase TOYO で最も高く 4.21%、DHA の導入率は、Lipozyme で最も高く 6.61% であった。アシドリシス後の TG 中には、Lipase TOYO ならびに Lipozyme を用いた反応系で約 2 倍の DHA の濃縮が認められた。

[平成元年(1989)9月10日受理]

#### 文 献

1) 佃 伸夫, 食品工業, 28 (18), 30 (1985)

- 2) F.D. Gunstone, J.L. Harwood, "The Lipid Handbook". (ed. by F.D. Gunstone, J.L. Harwood, F.B. Padley) Chapman and Hall, London (1986) p. 171
- 3) L.D. Lawson, B.G. Hughes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 152, 328 (1988)
- 4) Y. Tanaka, J. Hirano, R. Hashizume, T. Okuchi, T. Funada, Proceeding of Session Lectures and Scientific Presentation on ISF-JOCS World Congress (1988) Tokyo p. 1088
- 5) M.H. Coleman, A.R. Macrea, *UK Pat.*, 1,577, 933 (1976)
- 6) Novo industri A/S analytical method, #AF 206/2-GB, (1986)
- 7) A.F. Prevot, F.X. Mordret, *Rev. Fse. Corps Gras.*, 23, 409 (1976)
- 8) 松野隆男, 勝山政明, 岩崎修久, 日水誌, 41, 351(1975)
- 9) F.D. Gunstone, J.L. Harwood, "The Lipid Handbook". (ed. by F.D. Gunstone, J.L. Harwood, F.B. Padley) Chapman and Hall, London (1986) p. 171
- 10) 太田安英, "食品機能", 学会出版センター, 東京(1988) p. 157
- 11) 橋本征雄, 油脂, 4 (10), 62 (1988)
- 12) 山根恒夫, 油化学, 36, 59 (1987)
- 13) 壇辻雅彦, 太田安英, 発酵工学会大会講演要旨集, (1985) p. 157
- 14) 船田 正, 田中幸久, 食品工業, 32 (10), 20 (1989)