HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	リパーゼを用いて合成した高度不飽和脂肪酸含有油脂の分子種
Author(s)	長田, 恭一; 高橋, 是太郎; 羽田野, 六男 他
Citation	日本水産学会誌, 57(1), 119-125 https://doi.org/10.2331/suisan.57.119
Issue Date	1991
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/52078
Rights	© 1990 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	JSFS57_119.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Nippon Suisan Gakkaishi 57(1), 119-125 (1991)

リパーゼを用いて合成した高度不飽和脂肪酸含有油脂の分子種

長田恭一，高橋是太郎，羽田野六男，細川雅史

(1990年6月20日受付)

Molecular Species of the Enzymatically Synthesized Polyunsaturated Fatty Acid Rich Triglyceride

Kyoichi Osada,[*1,2] Koretaro Takahashi,[*2] Mutsuo Hatano,[*2] and Masashi Hosokawa[*2]

Enzymatic glyceride synthesis and acid interchange using icosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), γ-linolenic acid (GLA), and EPA and DHA concentrated saponified fatty acid mixture obtained from sardine oil were carried out through the use of four kinds of microbial lipases.

Lipase TOYO (*Chromobacterium viscosum*) was the most effective enzyme for glyceride synthesis as well as acid interchange of triglyceride (TG) rich in polyunsaturated fatty acids. There was a general tendency, except with Lipase TOYO, that DHA was difficult to be incorporated into a glycerol molecule compared to the other fatty acids.

Fatty acid composition of TG synthesized from a highly concentrated fatty acid mixture (EPA+DHA: 68.8%) by the use of Lipase TOYO and Lipase OF (*Candida cylindracea*), directly reflected that of the substrate fatty acid flixture (i.e. EPA+DHA was more than 65%). And the TG molecular species having combination of only EPA and DHA such as (EPA, EPA, EPA), (EPA, EPA, DHA), (EPA, DHA, DHA), and (DHA, DHA, DHA) were dominant accounting for the half of the obtained TG.

ω-3系高度不飽和脂肪酸(PUFA)のもつ重要な生理作用は既に一般にも知られるところとなったが，その誘導形態によって生体利用吸収率に大きな差があることが明らかにされたのは最近のことである。Lawson と Hughes[1] は，ヒトにイコサペンタエン酸(EPA)とドコサヘキサエン酸(DHA)を遊離脂肪酸(FFA)，トリグリセリド(TG)およびエチルエステル(EE)の3種類の誘導形態で投与し，FFAが最も吸収がよく，TGがこれに次ぎ，EEは最も吸収利用率が低いことを認めている。その後，同氏らは高脂肪食においてはその差が著しくなくなることを認めているものの，TGの方がEEよりも吸収率が優れていることに変わりのないことを確かめている。[2] しかし，FFAは安定性を欠くことから，食品としては不適切であり，EEは医薬品としての利用は見込めるものの，食品としての利用は今のところ考えられていない。したがって，EPAやDHAを効率的に利用するためにはTGが最も適切な利用形態ではないかと考えられる。

本研究ではEPAやDHAを高濃度に含むグリセリドを微生物源リパーゼを用いて合成し，得られたTGの分子種を分析することにより，単酸型はもとより，新たな機能性の発現をも期待できる混酸型TGの生成状態を明らかにしようとした。

実験方法

供試リパーゼ 位置特異性のないものについては，Lipase OF (*Candida cyclindracea*) を名糖産業より，Lipase TOYO (*Chromobacterium viscosum*) を東洋醸造より購入した。1，3位位置特異性のものについては，Lipase A (*Aspergillus* sp.) を天野製薬より購入し，Palatase (その固定化酵素名を Lipozyme という) (*Mucor miehei*) は Novo industri より供与を受けた。

グリセリド合成ならびにエステル交換(アシドリシス)における至適水分量と至適酵素量の決定 グリセリド合成は辻坂ら[3] の方法に準じ，次のように行った。グリセロール (nakarai tesque, 蛍光分析用) 4 ml とオレイン

*1 現住所：大洋漁業(株)大洋研究所 (Taiyo Central R & D Institute, Taiyo Fisheries Co., Ltd., Tsukuba, Ibaragi 305, Japan).

*2 北海道大学水産学部食品化学第一講座 (Laboratory of Food Chemistry I, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan).

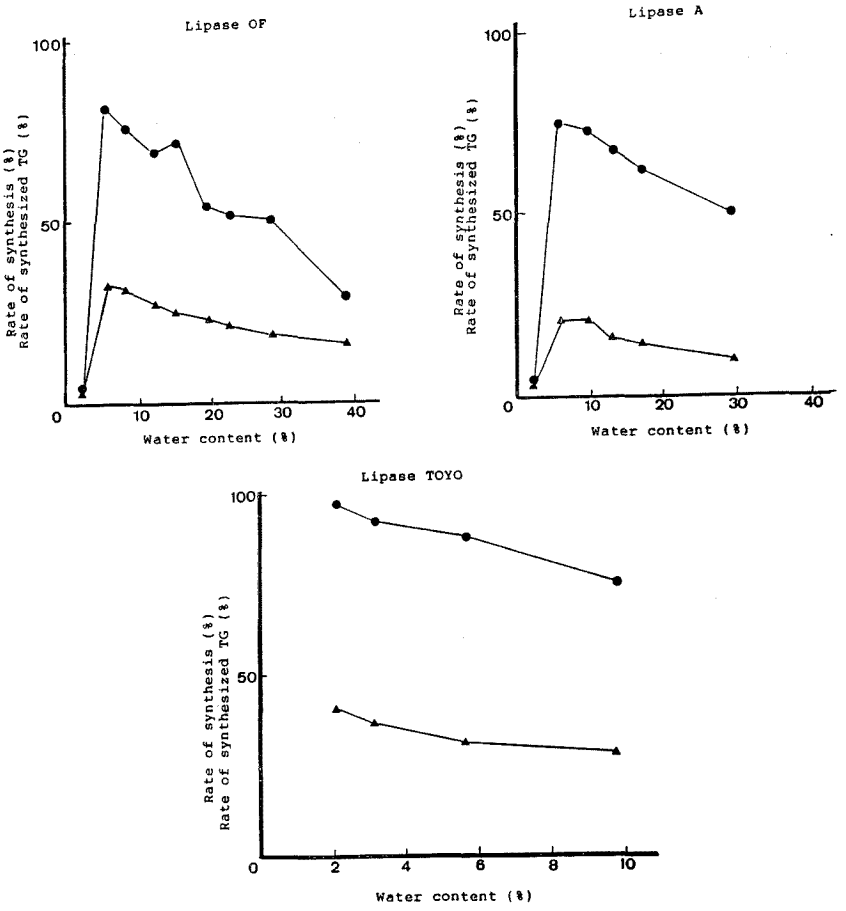

Fig. 1. Optimum water content for glyceride synthesis by microbial lipases.
Symbols indicate ●: degree of synthesis (%), ▲: rate of synthesized TG (%).
Reaction time: Lipase OF, 12 h; Lipase TOYO, 24 h; Lipase A, 24 h.

酸 (純度 70%, 和光純薬工業) 0.3 m*l* の混液に酵素液を添加し，脱気後 1500 rpm で撹拌しながら 25°C で 24 h 反応させた。反応停止はエタノール 15 m*l* を加えることによって行った。また，合成率の算出は酸価の減少率より求めた。至適水分量は一定酵素量に対して次のように水分量を変えて経時的に合成率を測定し，反応が最も早く平衡に達し，かつ最終的に合成率が最高値に達したときの水分量を至適水分量と判断した。Lipase OF は，19100U (Unit/g·protein) に対して水分量をそれぞれ 1.3%, 5.7%, 9.8%, 13.5%, 16.9%, 20.1%, 23.0%, 28.3%, Lipase TOYO は，400 U に対して 2.2%, 3.1%, 5.7%, 9.8%, Lipase A は，300 U に対して 1.3%, 5.7%, 9.8%, 13.5%, 16.9%, 28.3% に調整して検討した。なお，Palatase は水溶液タイプの酵素であったので検討しなかった。至適酵素量は求めた至適水分量で酵素量を変えて経時的に合成率を測定し，反応が最も早く平衡に達した酵素量を至適酵素量とした。このときの各リパーゼの酵素量は，Lipase OF は，380U, 3800U, 7650U, 11500U, 15300U, 19100U, Lipase TOYO は，20U, 100U, 200U, 400U, Lipase A は，120U, 300U, 450U, 600U, Palatase は，260U, 770U, 1300U, 1800U, 2600U とした。

一方，各リパーゼのエステル交換の至適水分量および至適酵素量については前報[4]の反応条件に従って行った。すなわち，*n*-ヘキサン 11.4 m*l* にトリオレインと脂肪酸をそれぞれ 673 μmol 溶解したものに水分を Lipase OF は 20.4%, Lipase TOYO は 5.2%, Lipase A は 10.2%, Lipozyme は 6.4～10.4%, 酵素をいずれも 250 mg 添加し，アルゴンガスを充填後 37°C で 24 h 反応させた。反応停止は，反応混液 1 m*l* を塩基性活性

アルミナカラム 2g (Alumina 90 Activated, Basic, Activity I; Merck 社; これを 50g に水を 1g 加えて活性化させたもの) に供し，3ml のジエチルエーテルで TG を溶出させることで行った。得られた TG を Prevot と Moderet の変法[5]でメチルエステル化後，ガスクロマトグラフィー (GLC) により脂肪酸組成を分析した。GLC は次の条件で行った。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 (ガスクロ工業)，3m×3mm ガラスカラム，カラム温度: 220°C，注入口温度および検出器 (FID) 温度: 250°C，キャリアガス: N_2 30 ml/min。なお，反応系有機溶媒中の水分定量は次の条件で行った。装置: 日立 164 型および 163 型ガスクロマトグラフ，カラム: Porapak Q, 80/100 mesh, 2m×3mm ステンレスカラム，カラム温度: 164 型は 80°C，163 型は 150→240°C (5°C/min)，注入口および検出器温度: 164 型 (TCD) は 105°C，163 型 (FID) は 330°C，キャリアガス: 164 型は He 40 ml/min，163 型は N_2 25 ml/min. 反応生成物の脂質組成の分析はグリセリド合成とエステル交換のいずれにおいても，薄層クロマトグラフィーにより行い，展開溶媒に *n*-ヘキサン/ジエチルエーテル/ギ酸 (75:25:2, v/v) を用いて，3% 酢酸銅-8% リン酸混液により発色させて TLC-デンシトメトリーによって行った。

EPA, DHA 高濃度含有 TG の調製　イワシ油を終濃度 6% KOH でケン化して得られた FFA を 7 倍量の 95% アセトンに溶解後，−20°C，−40°C および −60°C の順に冷却して飽和脂肪酸を除去[6]し，さらに 100% アセトンに溶解して 4N メタノール性 KOH を加え，−40°C で冷却後ろ過し，ろ液を中和して溶媒を留去[7]，EPA, DHA 濃縮画分を得た。これを基質として，求めた至適条件により，グリセリド合成を行った。

合成 TG の分子種組成の分析　グリセリド合成によって得られた TG を次の条件で逆相系 HPLC に供し，各主要ピークを分取，メチルエステル化後，先の方法に従って脂肪酸組成を分析し，相対保持ポテンシャルインデックス法[8,9]の併用によって TG の分子種の同定と組成の分析を行った。装置: 日立 638-50 型液体クロマトグラフ，カラム: Supersphere RP-18 250×4 mm, 溶媒:

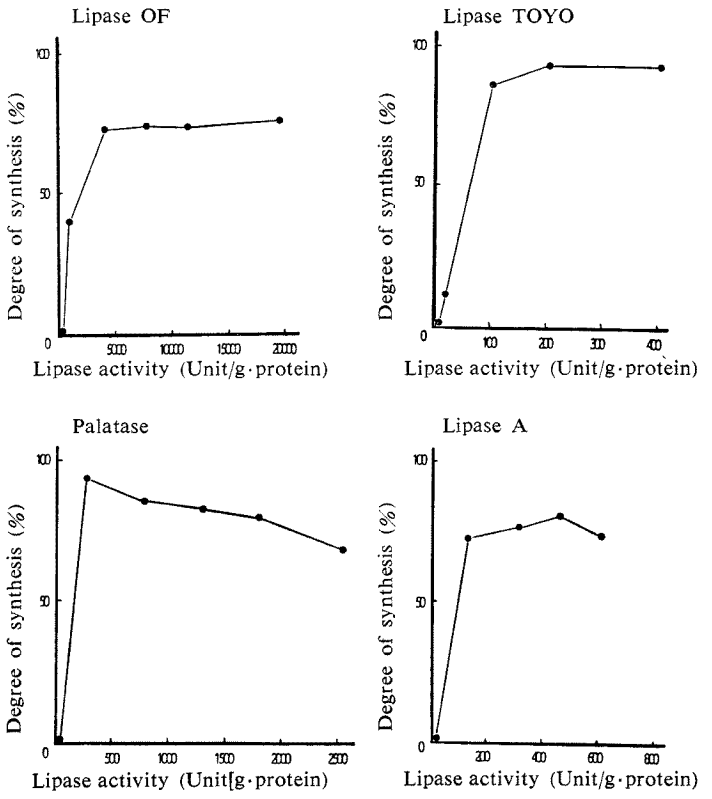

Fig. 2. Effect of lipase activity on glyceride synthesis using oleic acid as substrate.
Reaction time: Lipase OF, 30 min; Lipase TOYO, 3 h; Palatase, 12 h; Lipase A, 12 h.

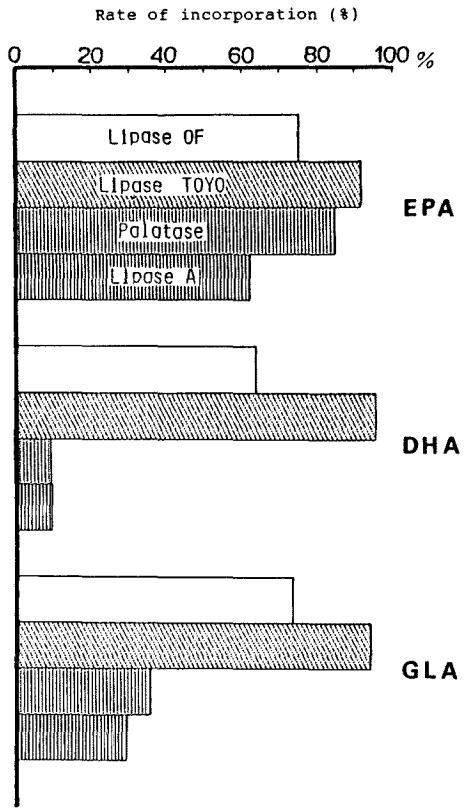

Fig. 3. Degree of incorporations of the individual EPA, DHA, and GLA on enzymatic glyceride synthesis.

Table 1. Fatty acid composition of the synthesized TG by Lipase OF and Lipase TOYO glyceride synthesis system using equal molar EPA, DHA, and GLA mixture as substrate.

Lipase	Fatty acid	Fatty acid (%) composition
Lipase OF	EPA	33.3
	DHA	26.7
	GLA	40.0
Lipase TOYO	EPA	29.6
	DHA	33.6
	GLA	36.8
Chemical synthesis	EPA	32.6
	DHA	34.1
	GLA	33.3

アセトン/アセトニトリル (1:1 v/v), 流速: 0.5 ml/min, カラム温度: 18°C, 検出器: 日立 655A-30 型示差屈折計。

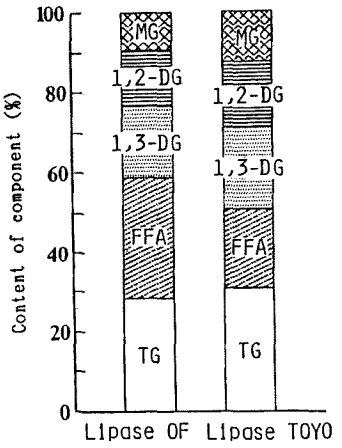

Fig. 4. Lipid composition of the synthesized oil obtained by Lipase OF and Lipase TOYO using equal molar EPA, DHA, and GLA mixture as substrate.
Abbreviations
TG: Triglyceride, FFA: Free fatty acid, DG: Diglyceride, MG: Monoglyceride.

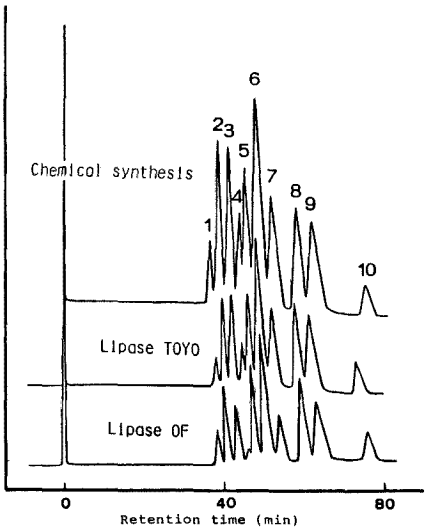

Fig. 5. Reverse phase HPLC chromatograms of the synthesized triglyceride using eqal molar EPA, DHA, and GLA mixture as substrate.
Peaks are:
1: (EPA, EPA, EPA), 2: (EPA, EPA, DHA), 3: (EPA, DHA, DHA), 4: (DHA, DHA, DHA), 5: (EPA, EPA, GLA), 6: (EPA, DHA, GLA), 7: (DHA, DHA, GLA), 8: (EPA, GLA, GLA), 9: (GLA, GLA, DHA), 10: (GLA, GLA, GLA).

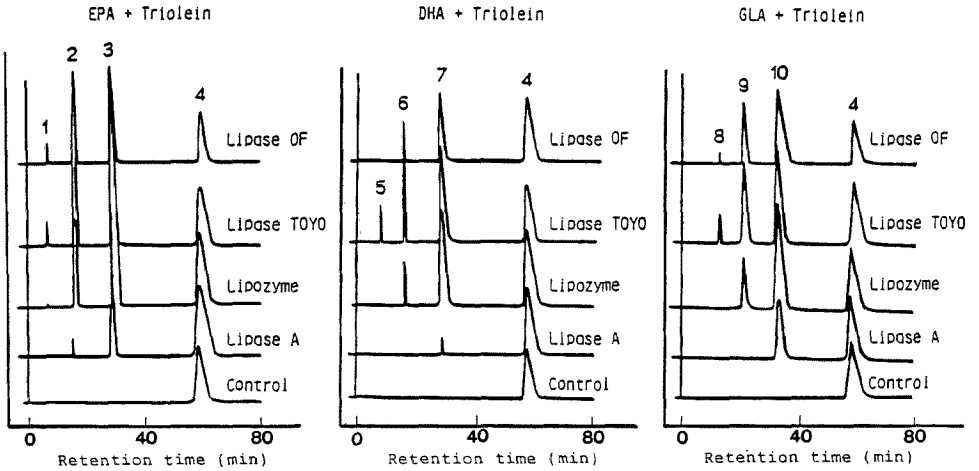

Fig. 6. Reverse phase HPLC chromatograms of the acid interchanged triglyceride prepared from triolein and EPA, from triolein and DHA, and from triolein and GLA, respectively as substrate.
Peaks are: 1: (EPA, EPA, EPA), 2: (EPA, EPA, 18:1), 3: (EPA, 18:1, 18:1), 4: (18:1, 18:1, 18:1), 5: (DHA, DHA, DHA), 6: (DHA, DHA, 18:1), 7: (DHA, 18:1, 18:1), 8: (GLA, GLA, GLA), 9: (GLA, GLA, 18:1), 10: (GLA, 18:1, 18:1).

結果および考察

グリセリド合成における至適水分量　各リパーゼの至適水分量について検討したところ各水分量における合成率は Fig. 1 のようになった。Lipase OF は，12 時間反応させたところ，水分量が 5.7% のとき合成率が 88.3% の最高値に達したが反応が平衡に達するのに 6 時間を要した。これに対して 9.8% の場合には，合成率が 79.3% であったが，僅か 30 分で反応が平衡に達した。このように最終合成率は，約 9% ほど前者の方が高いが，酸化され易い PUFA を基質として用いることを考えると，反応が速やかに平衡に達するほうが良いと考え，至適水分量は 9.8% と判断した。Lipase TOYO は，24 時間反応させたところ水分量 2.2% のとき合成率が 94.6% と最も高い値に達したので至適水分量を 2.2% と判断した。Lipase A は，24 時間反応させたところ，水分量が 5.7% のとき合成率が 81.3% に最も高い値に達しているが Lipase OF と同様の理由で水分量 9.8% (合成率は 77.8%) を至適水分量と判断した。

グリセリド合成における至適酵素量　効率的な酵素の利用を考えて各リパーゼの至適酵素量を検討した。その結果，Fig. 2 に示すように，Lipase OF は，30 分間の反応において 7650U 以上は合成率に大きな変化がなかったので 7650U を至適酵素量とした。Lipase TOYO は，3 時間の反応で 200U 以上は合成率に大きな変化がなかったので 200U を至適酵素量とした。Palatase は

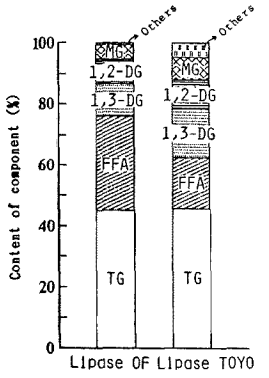

Fig. 7. Lipid composition of the synthesized oil by Lipase OF and Lipase TOYO using EPA and DHA concentrated fatty acid mixture obtained from sardine oil as substrate.
For the abbreviations, see Fig. 4.

12 時間の反応で 260U 以上は合成率が徐々に低くなることから至適酵素量を 260U とした。

EPA, DHA, GLA (γ-リノレン酸) それぞれの単品を用いたときのグリセリド合成　供試微生物源リパーゼの有用 PUFA に対する作用特性を検討するために 99% 以上の純度の EPA, DHA, GLA の単品 (いずれも出光石油化学) をそれぞれ用いてグリセリド合成を行った結果，Fig. 3 に示したように Lipase TOYO では 25°C, 24 h でどの PUFA も 90% 以上の合成率に達し，次い

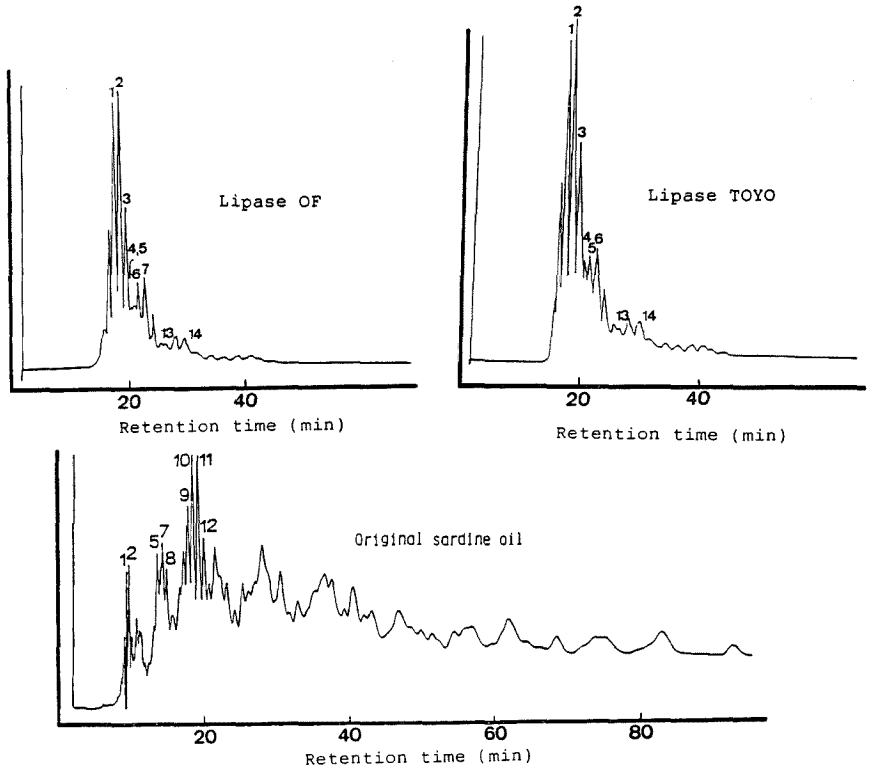

Fig. 8. Reverse phase HPLC chromatograms of the synthesized TG by Lipase OF and Lipase TOYO using EPA and DHA concentrated fatty acid mixture obtained from sardine oil as substrate.
Peaks are: 1: (EPA, EPA, EPA), 2: (EPA, EPA, DHA), 3: (EPA, DHA, DHA), 4: (DHA, DHA, DHA), 5: (19:2, EPA, EPA), 6: (19:2, EPA, DHA), 7: (16:1, EPA, DHA), 8: (14:0, EPA, DHA), 9: (18:1, EPA, DHA), 10: (16:0, EPA, EPA), 11: (16:0, EPA, DHA), 12: (16:1, 16:1, DHA), 13: (22:2, EPA, DHA), 14: (18:0, EPA, EPA).

Table 2. Fatty acid composition of the synthesized TG by Lipase OF and Lipase TOYO glyceride synthesis system using EPA and DHA concentrated fatty acid mixture obtained from sardine oil as substrate.

Fatty acid	Substrate FFA (%)	in Synthesized TG (%)	
		Lipase OF	Lipase TOYO
EPA	43.5	42.2	39.3
DHA	25.3	24.2	25.2
Total	68.8	66.4	64.5

で Lipase OF が 70% 前後の合成率に達した。全体的傾向として Lipase TOYO を除き，いずれの酵素も PUFA の中では DHA に対する作用が弱いことが明らかとなった。

EPA, DHA, GLA の等量混合基質を用いたときのグリセリド合成率 EPA:DHA:GLA を 1:1:1 のモル比に混合し，混合基質についてグリセリド合成を行った結果，Lipase OF ならびに Lipase TOYO が優れた合成能を示し，Fig. 4 に示したように約 30% の TG を得ることができた。その脂肪酸組成の内訳 (Table 1) は対照として行った化学合成区（グリセリンと脂肪酸等モル，CH_3ONa 使用，130°C, 7 h) では各 PUFA は等量であり，リパーゼ処理区では GLA がいずれも高く，Lipase OF では DHA, Lipase TOYO では EPA がやや低い傾向が認められた。事実，得られた TG の分子種組成について検討した結果，Fig. 5 に示したように Lipase OF では TG 分子内に 2 分子以上の EPA をもつ分子種である (EPA, EPA, EPA) と (EPA, EPA, DHA) が他のクロマトグラムよりも相対的に大きく，一方，Lipase

TOYO では分子内に2分子以上の DHA をもつ分子種 (DHA, DHA, DHA), (EPA, DHA, DHA), (DHA, DHA, GLA) が他のクロマトグラムよりも相対的に大きかった。これは，各リパーゼの脂肪酸特異性が反映されたためであると考えられる。

EPA, DHA, GLA それぞれの単品を用いたときのエステル交換　4種類のリパーゼを用いてエステル交換を行い EPA, DHA, GLA のトリオレイン (純度 99%, Sigma) への導入について分子種レベルで検討した結果 (Fig. 6), とりわけ Lipase OF, Lipase TOYO が高い活性を示し，単酸型の (EPA, EPA, EPA) の産生も認められた。Lipase TOYO ではさらに (DHA, DHA, DHA) の産生も認められた。Lipozyme と Lipase A は単酸型 TG の産生はほとんど認められなかったが，このことからこれらのリパーゼが 1,3-位位置特異性を有するためであると考えられた。

イワシ油ケン化物の EPA, DHA 濃縮物を基質としたグリセリド合成　イワシ油ケン化物の EPA と DHA の合計量を約 68.8% にまで濃縮したイワシ油混合脂肪酸を基質としてグリセリド合成を行った結果，Fig. 7 に示したように Lipase OF と Lipase TOYO によって約 45% の TG を得ることができた。この TG の脂肪酸組成について検討した結果 (Table 2), Lipase TOYO で EPA+DHA が約 64.5%, Lipase OF では約 66.1% にも達しており，グリセリド合成においては前報[4] のエステル交換の場合とは異なり，基質の脂肪酸組成がそのまま反映されるものと思われた。さらに，EPA と DHA のみより成る分子種，すなわち (EPA, EPA, EPA), (EPA, EPA, DHA), (EPA, DHA, DHA), (DHA, DHA, DHA) が約 50% も占めていたことは (Fig. 8), 基質の混合脂肪酸の PUFA の濃度を経済的にあげることさえできれば，Lipase OF や Lipase TOYO を用いることにより比較的容易に PUFA を高濃度に含有する TG を合成し得ることを示すものであり，この点の改良が課題になるものと考えられる。

要　約

4種類の微生物源リパーゼを用いて EPA, DHA, GLA のそれぞれの単品ならびにこれらの等量混合物を基質としてグリセリド合成を行った。Lipase TOYO と Lipase OF が優れたグリセリド合成活性を示し，エステル交換においては Lipase TOYO のみが (DHA, DHA, DHA) を生成した。これらの酵素は EPA+DHA が 68.8% の基質より約 45% の TG 収量で 65% 前後の EPA+DHA を含む TG を生成し，そのうち EPA と DHA のみより成る TG 分子種も約 50% 産生した。

文　献

1) L. D. Lawson and B. G. Hughes: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 328-335 (1988).
2) L. D. Lawson and B. G. Hughes: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **156**, 960-963 (1988).
3) Y. Tsujisaka, S. Okumura, and E. Iwai: *Biochim. Biophys. Acta.*, **489**, 415-422 (1977).
4) 長田恭一，高橋是太郎，羽田野六男：油化学，**39**, 467-471 (1990).
5) A. F. Prevot and F. X. Moderet: *Rev. Fse. Corps Gras.*, **23**, 409-423 (1976).
6) F. D. Gunstone and J. L. Hardwood: in "The Lipid Handbook", Chapman and Hall, London, 1986, pp. 171.
7) 佃　伸夫：食品工業，**28**, 30-35 (1985).
8) 高橋是太郎：油化学，**37**, 307-309 (1988).
9) K. Takahashi, T. Hirano, and M. Saito: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 523-528 (1988).