

加水分解におけるリパーゼの脂質選択性

峰本康正*、後谷美穂、山岸祐介、北村友二、村井拓朗、稲田桃子、塩屋真史、藤田亮治、中島栄次*、米谷正*

The selectivity of lipase in lipid hydrolysis

MINEMOTO Yasumasa*, GOSHITANI Miho, YAMAGISHI Yusuke, KITAMURA Yuji, MURAI Takuro, INADA Momoko, SHIONOYA Masashi, FUJITA Ryoji, NAKAJIMA Eiji* and KOMETANI Tadashi*

The selectivity of lipase in lipid hydrolysis was evaluated by the enantioselectivity method and Michaelis constant calculated from the hydrolysis process of the lipid. The lipids used in this study were aliphatic methyl esters. In the enantioselectivity method, the selectivity of the enzyme was observed for the lipid, its extent was small. In another method, Michaelis constant, also indicated the same result. Therefore, the enzyme used here is not able to be used industrially of having the lipid selectivity.

Key words: Lipase, Lipid, Hydrolysis, Selectivity

1. 緒言

生体触媒である酵素には基質特異性があり、反応系に種々の物質が混在しても特定の物質の反応に関与する。生体内ではこの特異反応が頻繁に行われ、生命活動を維持している。他方、工業的立場から酵素を利用している例も多く、特定の物質の生産から分離・精製まで幅広く利用されている¹⁾。酵素の実用例の1つとして、脂質から脂肪酸の分離反応（加水分解反応）がある。リパーゼは、主にトリグリセリドを加水分解することで3つの脂肪酸とアルコールに分離することに利用されている。その際、基質特異性から特定の脂肪酸のみを選択的に加水分解している可能性がある。しかし、

その選択性を明確に示した研究例は少ない。

そこで、本実験では高純度の脂肪酸メチルをモデル脂質とし、光学異性体における立体選択性を示す選択度を用いて酵素の脂質選択性を評価した。また、酵素の脂質選択性が脂質分解（加水分解）途中においても十分に認められるか否かを加水分解過程およびミカエリス定数を用いて再評価した。

2. 実験方法

2-1. 使用試薬

本実験では基質であるモデル脂質としてパルミチン酸メチル (C16:0、>95%)、ステアリン酸メチル (C18:0、>95%)、オレイン酸メチル (C18:1、>99%)、リノール酸メチル (C18:2、>95%) を用いた。これらはすべて東京化成工業株式会社よ

*物質化学工学科

e-mail: mine@nc-toyama.ac.jp

り購入した。酵素は市販のリパーゼ OF、リパーゼ PS、リパーゼ AP、リパーゼ PPL、CHIRAZYME を使用した。リパーゼ OF は名糖産業、リパーゼ PS とリパーゼ AP は天野製薬、リパーゼ PPL はシグマアルドリッチ社、CHIRAZYME は Roche Molecular Biochemicals からそれぞれ購入した。その他、実験に用いた試薬は和光純薬株式会社より購入した特級試薬を使用した。

2-2. 選択性の評価

本研究の目的は、加水分解時におけるリパーゼの脂質選択性を評価することである。酵素の基質選択の評価方法はいくつかあるが、本研究では酵素が光学異性体を選択的に酸化するときの選択度による評価法を採用した²⁾。また、その結果が加水分解過程においても同様な傾向になるかを加水分解過程およびミカエリス定数により再評価した。

2-2-1. 選択度による評価

2種の脂肪酸メチルをそれぞれ約3 mmol ずつ採取し、ヘキサン 15 mL に溶解したものを基質溶液とした。三角フラスコに市販リパーゼを 10~400 mg 取り、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 10 mL、ヘキサン 9 mL、基質溶液 1 mL を混合し、室温下、スターラーで攪拌した。ある程度加水分解が進んだことを薄層クロマトグラフィーで確認後、5% (v/v) HCl 10 mL で酸性とし、酢酸エチル 20 mL を加えた。遠心分離後、有機層をデカンテーションで分液漏斗移し、飽和食塩水で洗浄し、水層を除いた。MgSO₄ で乾燥後、減圧下で溶媒を除去した。得られた有機物を溶出液 (ヘキサン:酢酸エチル=100:1) を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離し、脂肪酸メチル (未反応エステル) を分離した。エステルが溶出した後、酢酸エチルを溶出液として用い、脂肪酸 (加水分解物) を得た。それぞれを遠沈管に移し、減圧下で溶媒を除去した後、重量を測定した。アルミホイルとゴムで密封後、-10 °C で保存した。加水分解により生成した脂肪酸は、メチルエステル化した後、ガスクロマトグラフィーで測定した^{3, 4)}。

測定したガスクロマトグラムから基質溶液中に

存在する 2種の脂肪酸メチルの面積値 R_1 、 R_2 を得た。同様に試料溶液中に未反応のまま残存した 2種の脂肪酸メチルの面積値 R_1' 、 R_2' 、および加水分解により生成した 2種の脂肪酸の面積値 R_1'' 、 R_2'' を得た。基質溶液における R_1 、 R_2 から補正值 α を求めた (式 (1))。選択度による評価では、基質である 2種の脂肪酸メチルの存在比が 1:1 であることを前提としている。しかし、基質溶液中での存在比が同じであっても、ガスクロマトグラムの面積値が同じになるとは限らない。ここで求めた補正值 α はクロマトグラムの面積値を同じ値にするために用い、本研究では補正值 α を未反応エステル R_2' 、加水分解物 R_2'' を乗算することで補正した。未反応エステルの面積値 R_1' 、 R_2' より式 (2) を用いて基質過剰率 e_s を算出した。同様に、加水分解物の面積値 R_1'' 、 R_2'' より式 (3) を用いて生成物過剰率 e_p を算出した。算出した e_s 、 e_p を用いて加水分解率 c (%) を得た後、式 (4) を用いて選択度 S を算出した。各酵素の脂質選択性は、選択度 S によって評価した。

$$\text{補正值 } \alpha = \frac{R_1}{R_2} \quad (1)$$

$$\text{基質過剰率 } e_s (\%) = \frac{|R_1' - R_2' \times \alpha|}{R_1' + R_2' \times \alpha} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{生成物過剰率 } e_p (\%) = \frac{|R_1'' - R_2'' \times \alpha|}{R_1'' + R_2'' \times \alpha} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{加水分解率 } c (\%) = \frac{e_s}{e_s + e_p} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{選択度 } S = \frac{\ln[(1-c)(1-e_s)]}{\ln[(1-c)(1+e_s)]} \quad (5)$$

2-2-1. 加水分解過程およびミカエリス定数による再評価

選択度による評価法は有機相-水相の 2 相系実験であるため、2 相を混ぜ合わせるための攪拌操作の程度が反応に影響を及ぼすことが考えられる。また、カラムによる基質と生成物の分離において、その回収率が充分ではないことなど不確実な要素

を含むものである。そこで、反応条件の影響を受けにくい1相系で反応を進行させ、基質である脂肪酸メチルの加水分解過程から選択性を再評価した。その選択性は反応溶液に未反応のまま残存する脂肪酸メチルの残存率の経時変化にミカエリス・メンテン式を適用し、そのミカエリス定数が脂質単体系と混合系で変化するか否かにより判断した。ただし、酵素はリパーゼPSに限定した。

脂肪酸メチルエステル 0.1 mmol をアセトニトリル 10 mL に溶解した。その溶液 1 mL にアセトニトリル 4 mL を加えて基質溶液とした。また、混合系では各脂肪酸メチルエステルを 0.1 mmol ずつ用いた。酵素であるリパーゼPS 0.02 g を蒸留水 20 mL に溶解し、これを酵素溶液とした。反応は基質溶液に酵素溶液 2 mL を加えることで開始した。その後一定時間毎に反応溶液を採取し、その採取溶液をそのままキャピラリーガスクロマトグラフィーに注入することで脂肪酸メチル(基質)および脂肪酸(生成物)を分離、定量した。

酵素反応速度式であるミカエリス・メンテン式は以下の式で与えられる ((6) 式)。

$$v = \frac{dp}{dt} = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (6)$$

ここで v は反応速度、 V_{\max} は最大反応速度、 K_m はミカエリス定数、 S は基質濃度、 P は生成物濃度を示す。酵素と脂質の反応量論比を 1 と仮定すると次のように書き直すことができる。

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (7)$$

ここで反応率 X を次のように定義する。

$$X = \frac{S_0 - S}{S_0} \quad (8)$$

(7) 式を初期条件 $t = 0$ のとき $S = S_0$ として解き、

(8) 式を適用すると、

$$\ln(1 - X) - \frac{S_0}{K_m} X = -\frac{V_{\max}}{K_m} t \quad (9)$$

となる。(9) 式を時間 t について整理すると

$$t = -\frac{K_m}{V_{\max}} \left\{ \ln(1 - X) - \frac{S_0}{K_m} X \right\} \quad (10)$$

となる。(10) 式の中で S_0 は初期設定の値であり、既知である。 X は反応率であるため $0 \leq X \leq 1$ の値を取る。 V_{\max} は実験によって得られた基質濃度の経時変化から図積分によって求めた。これらの値を用いて K_m を変数とする計算値を実測データにフィティングさせることで K_m を求めた。

2-3. ガスクロマトグラフィーの測定条件

本研究は 2 つの方法で酵素の脂質選択性を評価している。それらは脂質である脂肪酸メチルおよび生成物である脂肪酸をガスクロマトグラフィーにより定量することで評価している。

選択度による評価では、ガスクロマトグラフィーに GC-8A(島津製作所)を使用した。カラムはガラスカラム(3.2 mm ϕ \times 3.00~4.2 m)に充填剤 Thermon-8A(信和化工)を充填し、分析に用いた。検出器には FID(水素炎型検出器)を用い、注入口及び検出器温度を 230 $^{\circ}$ C とした。キャリアーガスには窒素を使用した。得られたピーク面積を (1) ~ (5) に代入し、選択度を算出した。

加水分解過程による評価方法では、ガスクロマトグラフィーに GC-14A(島津製作所)を使用した。カラムには Stabilwax-DA(i.d. 0.25 mm \times 15 m)を用い、FID により検出した。このときのカラム温度は 220 $^{\circ}$ C、気化室および検出器温度は 230 $^{\circ}$ C に設定した。キャリアーガスには窒素を使用した。得られら脂肪酸メチルおよび脂肪酸の面積値をあらかじめ作成した検量線により定量した。

3. 結果と考察

3-1. 選択度による評価

2種類の脂肪酸メチルの混合物を脂質試料としたときの酵素による選択度を図1に示した。この図中で選択度1.0のときは選択性を示さず、中心から左右のどちらかに値が振れると、振れたほうの脂質を酵素が選択していることを示す。いずれの酵素を用いても脂質の組み合わせに関わらず選択度1.0にはならず、酵素がどちらかの脂質に対し選択性を有していることを示した。しかし、どの酵素についても特徴的な選択傾向は見出せなかった。

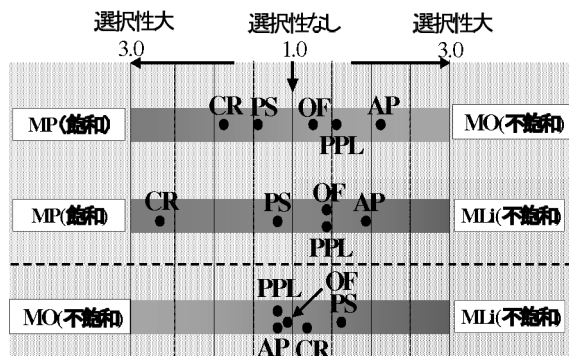


図1. 不飽和度の差異による各酵素の選択性
MO、MP、MLiはオレイン酸メチル、パルミチン酸メチル、リノール酸メチルを示す。

この評価法は光学異性体に対する酵素の立体選択性の指標として用いられるが、そのときの選択度は値として数十程度になる⁵⁾。それに対し、本研究で算出された選択度の値の大きさは必ずしも大きいものではない。また全ての選択度の値が同じオーダーの領域にある。酵素の基質選択性には工業的応用が期待されるが、それに耐えるだけの選択性を有しているか否かについてはこの結果からは判断できなかった。

3-2. 加水分解過程における選択性

本研究で使用した酵素に少なからず脂質選択性があることが示されたが(図1)、脂質の分解時にも大きな差異になって現れるのかを加水分解過程を測定することで確認した。酵素をリパーゼPSに

固定したときの脂質の加水分解過程を図2に示した。図2は脂質単体系での加水分解過程と2種類の脂質の混合系での加水分解過程を示しているが、もし酵素がどちらか一方の脂質を選択的に加水分解しているのならば、選択されない脂質の残存率はまったく変化しないことになる。しかし、いずれの組み合わせにおいても単体系と混合系の加水分解過程に大きな差異は認められなかった。

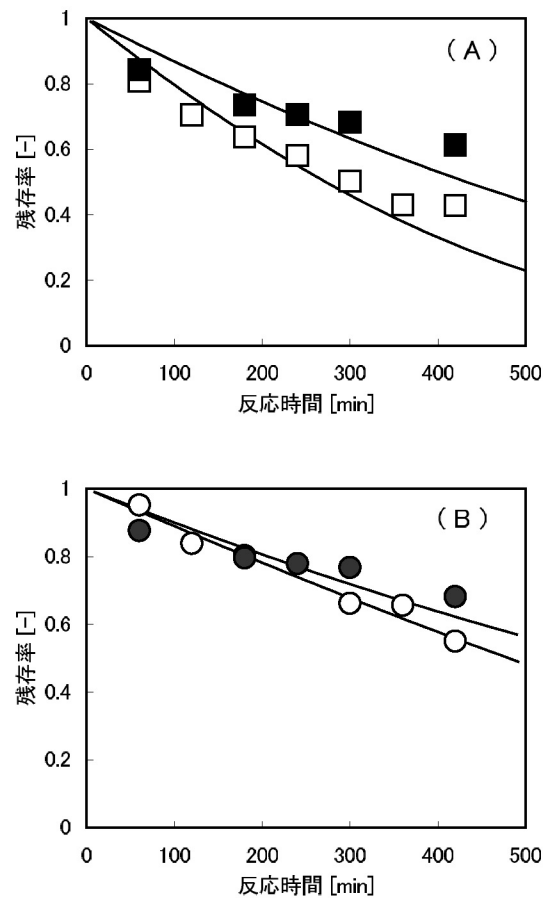


図2. 脂肪酸メチルの加水分解過程
(A) ステアリン酸メチル、(B) リノール酸メチルを示す。オープンシンボルは脂質単独系、クローズシンボルは脂質混合系

図2中の曲線はミカエリス・メンテン式による計算線である。このとき算出したミカエリス定数を表1示した。実測値と計算値が概ね一致していることから、加水分解過程がミカエリス・メンテン式で表されることが示された。表1には加水分解過程を示してはいないが、図2以外の脂肪酸を組み合わせた場合のデータも併せて示した。実験

データのばらつき具合から、算出されるミカエリス定数に幅が生じる。この幅を考慮した上で脂質単体時のミカエリス定数を基準として比較しても、混合時のミカエリス定数はいずれの組み合わせでもオーダーを超えて変化することがなかった。よって、選択性がないと否定できないまでも、加水分解過程を大きく変動させるだけの選択性はなかった。

4. まとめ

脂肪酸メチルをモデル脂質として、加水分解過程における酵素の脂質選択性を評価した。選択度による評価法と加水分解過程でのミカエリス定数の2つ方法で選択性を評価したが、選択性が認められたものの、その程度は大きくなものではなく、工

業的使用に対する十分な選択性を有しないことが明らかになった。

5. 参考文献

- 1) 海野肇、中西一弘、白神直弘：生物化学工学 pp.16-18、講談社サイエンティフィック、1992
- 2) 太田博道：生体反応論 pp.176-178、三共出版、1996
- 3) B.M. Craig, N. L. Murty: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **36**, 549, 1959
- 4) N. Hashimoto, T. Aoyama and T. Shiori: *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1475, 1981
- 5) C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas and C. J. Sih: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **102**, 7294, 1982

表 1. 加水分解過程におけるミカエリス定数

組合せ 対象物	単体	MP + MS	MS + MO	MS + ML	MS + MO + ML
MP	0.6 (0.3~0.9)	0.45 (0.4~0.5)	—	—	—
MS	0.75 (0.3~1.2)	0.5 (0.4~0.6)	1.5 (0.9~0.2)	0.8 (0.5~1.0)	0.6 (0.3~ 0.9)
MO	0.5 (0.3~2.0)	—	1.0 (0.7~2.5)	—	4.5 (3.0~9.0)
ML	0.2 (0.1~0.5)	—	—	0.8 (0.1~1.0)	1.5 (0.3~2.0)

MP：パルミチン酸メチル、MS：ステアリン酸メチル、MO：オレイン酸メチル、ML：リノール酸メチル ミカエリス定数の単位は mmol/L

