

のそれと比較すると、価格は安いとは言えない。消化剤としての価格としては、さほど高いとは言えないであろうが、油脂工業で、油脂類の変換に利用するには高すぎるようである。そこで、一層の生産性向上が望まれている。リパーゼの工業的生産の今後の動向としては、

- (1) 油脂工業に利用できるように長時間安定なリパーゼ、また牛脂の融点以上で作用できる耐熱性リパーゼのスクリーニング。
- (2) 位置特異性、脂肪酸特異性など種々の点で従来知られていないようなユニークな性質を持ったリパーゼのスクリーニング。
- (3) 遺伝子工学的手法を駆使した生産性向上、あるいは

は蛋白工学的手法を駆使した性質の改良。

などが考えられる。この総説でも、これらの諸点を意図した開発研究が述べられている。なお、(3)と関連して、シンポジウムの折には、「*Geotrichum candidum* リパーゼ遺伝子のクローン化とその蛋白質構造の解析」と題して、大阪市立工業研究所の島田裕司、杉原耿雄、富永嘉男、栗田工業㈱の飯泉太郎の諸氏に口頭発表していただいたが、未だ原報文を発表していないため、本総説には執筆していただけなかった。一日も早く詳細な報文が発表されることを期待している。

本総説が、わが国におけるリパーゼ研究開発の一助になれば幸いである。

2. リパーゼの位置特異性を定量的に表現する指数 (Positional Specificity Index: PSI)

リパーゼの利用を考えると、2つの側面からの考察が必要である。1つの側面はいわば酵素メーカーの立場であり、どのようなリパーゼを開発したらよいかを考える。もう1つの側面はリパーゼを買ってなにか新製品を製造する会社の立場であり、市場に供給されたリパーゼを試験して選択するが、そのさい酵素に添えられたリパーゼの性質を表現する指標を参考にする。もし目的の酵素が得られなければ、新酵素の開発が必要になり、自己開発するか、酵素メーカーにその要請をしなければならない。これらのことから“指標”には、リパーゼの生産を促進する効果があるとみなすことができる。

微生物のリパーゼを表現する指標として、われわれは次の9項目を選んだ。¹⁾

- 1) リパーゼの生産部位 (菌体外か菌体内か)
- 2) 反応最適 pH
- 3) 反応最適温度
- 4) 安定な pH 範囲
- 5) 加熱失活
- 6) 単酸基トリグリセリドの加水分解速度
- 7) 位置特異性
- 8) 分子量
- 9) 等電点

シンポジウムでは主に6)と7)をとりあげたが、ここでは7)にしばって話を進める。

リパーゼの特異性に関しては2つのタイプがあることが知られている。1つはトリグリセリドの1, 3位のみを加水分解するタイプ (α 型) であり、他は1, 2, 3位のいずれでも加水分解できるタイプ ($\alpha\beta$ 型) である。この2つの型を判別するためには、トリグリセリドをリパーゼで加水分解し、ホウ酸で前処理したシリカゲルの薄層を用いてジグリセリドの異性体を分別し、肉眼で1, 2-ジグリセリドのみが認められれば α 型であるとしてきた。しかしこの方法は定性的で判定に迷うこともしばしばであった。

われわれは位置特異性の定量化を試み、位置特異性を表す指数 (Positional Specificity Index: PSI) を次式により定義した。²⁾

$$\text{PSI}(\%) = \frac{1,2[2,3]\text{DG} - (1,3\text{DG}) \times 2}{1,2[2,3]\text{DG} + (1,3\text{DG}) \times 2} \times 100$$

DG はジグリセリドの略であるが、1, 2 [2, 3] DG と 1, 3 DG とを別に定量して上式に代入する。のちに述べるように、この定義には2, 3の問題点が含まれている。しかし和を分母にとり、差を分子にとるという概念は、PSIの定義をより精密にする際にも有効であると考えられる。さてこの定義を用いると α 型のリパーゼは+100%の値を、また1, 2, 3位をランダムに加水分解する $\alpha\beta$ 型のリパーゼは0%の値を示すはずである。

1. 実験方法

PSI の測定は次のように行った。なお反応液の組成、反応方法、反応生成物の抽出などは、奥村らの方法³⁾を参照した。

30 ml のねじ口瓶 (日電理硝子, 外径 30 mm, 高さ 65 mm) にトリオレイン (シグマ, 99%) 0.5 g, 緩衝液 2 ml (pH は後出の表に示すとおり), 30 mM CaCl₂ 1 ml, 脱イオン水 2 ml をいれ, スターラーで攪拌しながら 37°C で10分間加温した。これに 0.5 ml の水に溶かした, あるいは懸濁したリパーゼ50ユニットを添加し, 37°C で30分間加水分解を行った。

反応はエチルエーテルを 20 ml 加え, 1, 2分間攪拌することによって停止させ, 同時に反応産物をエーテル層に抽出した。直ちにエーテル層の 1 μl をマイ

クロキャップ[®]に採り, 3%ホウ酸処理をしたクロマロッド[®] S-III (ヤترون) にスポットした。展開溶媒としてはベンゼン-クロロホルム-酢酸 (70:30:2) を用いた。10 cm 展開したのち溶媒を乾燥させ, イヤトロスキャン[®] TH-10 でトリオレインおよび反応産物を検出した。1, 2-ジグリセリドと1, 3-ジグリセリドに相当するピークの積分値は前出の式に代入した。

リパーゼ50ユニットを採るために必要な各酵素の比活性は, 酵素メーカーの値を用いず, 独自に同一の定量法で求めた。したがって反応 pH はそのリパーゼの最適値になるようにしたが, その他の条件は必ずしも最適となっていない。

リパーゼの定量法としては, ポリビニルアルコールを乳化剤として用いる方法⁴⁾を使用した。反応液の組

Table 1. Positional specificity index (%).

Origin	Trade name	Spec. act.(U/mg)	PSI (%)
<i>Aspergillus niger</i>	Lipase AP (Amano)	4.9 (pH 6.0)	100
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Lipase LP (Toyo Jozo)	2480 (pH 7.0)	100
<i>Mucor javanicus</i>	Lipase M (Amano)	14.1 (pH 6.0)	100
<i>Mucor miehei</i>	Palatase M (Novo)	0.61 (pH 7.0)	100
<i>Penicillium cyclopium</i>	Lipase G (Amano)	5.8 (pH 5.6)	100
Porcine pancreas	Lipase (Sigma)	70.3 (pH 7.7)	100
Porcine pancreas	Lipase (BMY)	43.1 (pH 7.7)	100
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Lipase (Sigma)	4220 (pH 7.7)	100
<i>Rhizopus delemar</i>	Lipase (Seikagaku)	197 (pH 5.6)	100
<i>Rhizopus javanicus</i>	Lipase F (Amano)	83.6 (pH 6.0)	100
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	(our laboratory)	acetone cell 1.5-2.0 (pH 8.0)	89.8
<i>Phycomyces nitens</i>	Lipase PN (Takeda)	155 (pH 7.0)	76.3
Unknown microorganism	LIPN (Toyo Jozo)	2390 (pH 7.0)	75.2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipase P (Amano)	24.5 (pH 6.0)	74.5
<i>Alcaligenes</i> sp.	Lipoprotein lipase (Meito)	883 (pH 8.0)	73.2
<i>Pseudomonas fragi</i>	Lipase B (Sapporo)	123 (pH 9.0)	72.0
<i>Pseudomonas</i> sp.	Lipoprotein lipase (Toyobo)	1160 (pH 8.0)	59.6
<i>Candida cylindracea</i>	Lipase AY (Amano)	23.9 (pH 6.0)	29.6
<i>Achromobacter</i> sp.	Alkaline lipase (Meito)	N. A. (pH 9.0)	16.0
<i>Candida cylindracea</i>	Cholesterol esterase (Meito)	N. A. (pH 7.0)	11.0
<i>Candida cylindracea</i>	Lipase (Meito)	N. A. (pH 7.0)	10.0
<i>Candida cylindracea</i>	Lipase MY (Meito)	20.1 (pH 7.0)	6.1
<i>Candida cylindracea</i>	Lipase OF (Meito)	197 (pH 7.0)	-11.2
<i>Geotrichum</i> sp.	(our laboratory)	15.9 (pH 9.0)	-24.0
<i>Aspergillus niger</i>	Palatase A (Novo)	0.17 (pH 7.0)	impossible

N. A.=not assayed

成はオリーブ油エマルジョン 5 ml, 緩衝液 3 ml, 30 mM CaCl₂ 1 ml, 酵素溶液 1 ml であった。反応温度 37°C。なおポリビニルアルコールとしては、クラレのポパール®117と205を9:1に混ぜたものを用いた。比活性は菌体や溶液状の酵素もすべて units/mg で表示した。リパーゼの1ユニットは上記の測定法で毎分 1 μmol の脂肪酸を遊離する酵素量である。

2. 実験結果と考察

われわれが今までに集めたリパーゼ標品25種について、PSI を求めた結果を Table 1. に示す。起源の内訳は動物2種、微生物23種である。標品の純度はさまざまである。

この表をみて多くのことを考えることができるが、まず2, 3のまとめを述べる。

1) 従来から言われているように、完全な α 特異性を示すリパーゼが多数存在した。これらのうち *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus delemar* などには、油脂の改質をエステル転移（山根の定義⁵⁾ による）で行った報告がみられる。

2) *Candida cylindracea* のリパーゼ（天野製薬製を除く）は、+11~-11%の値を示し、α と β 位をほぼランダムに加水分解することが確実になった。またこれに近い位置特異性を示すリパーゼは、調べた範囲で *Achromobacter* sp. だけであった。

3) 以上の典型的な2つのタイプのほかに、+20~+90%を示す中間的なリパーゼが多数存在した。これがないを意味するかは今後の検討を要する。

さてこのようにして求めた PSI はかなり便宜的な

ものと考えられる。その理由は、

1) 1, 2-ジグリセリドと1, 3-ジグリセリドの間の転移反応を考慮していない。

2) ジグリセリドからモノグリセリドへの反応を考慮していない。

これらの点は現在検討を進めているところである。

またリパーゼ G (*Penicillium cyclopium*) の基質特異性はトリグリセリド<<<ジグリセリドなので、PSI の測定は強引に行った。一方パラターゼ A (*Aspergillus niger*) は長鎖トリグリセリドを加水分解しないので、トリオレインでは測定が不可能であった。これらの場合の基質の選択や PSI に影響を与えるその他の因子の検討については、現在実験を行っている。

シンポジウムでは、脂肪酸特異性の表記についても触れた。発想は森岡ら⁶⁾ とたいへん似ているが、別の機会に詳しく述べる予定である。

文 献

- 1) Ota, Y.: *Handbook of Microbiology*, 2nd Ed., (Laskin, A. I., Lechevalier, H. A.), Vol. VIII, pp. 285-292, CRC Press Inc., Boca Raton (1987).
- 2) 太田安英: 食品機能-機能性食品創生の基盤, (藤巻正生監編), pp. 440-445, 学会出版センター (1988).
- 3) Okumura, S., Iwai, M., Tsujisaka, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 40, 655-660 (1976).
- 4) 山田浩一, 太田安英, 町田晴夫: 農化, 36, 860-864 (1962).
- 5) 山根恒夫: 農化, 62, 783-786 (1988).
- 6) 森岡憲祐, 前田皓一, 石田祀朗: 油化学, 36, 816-820 (1987).

3. 酵母 *Candida antarctica* の生産する耐熱性位置非特異的リパーゼ

リパーゼの工業的応用方法としては、第一に、融点の高い油脂の完全加水分解による脂肪酸やグリセロールの生産、第二に、エステルの合成、特に2級アルコールと酸からの合成、そしてエステルの交換反応が考えられる。こういったプロセスに利用できるリパーゼの性質として、以前より次の2つが要求されてきた。

1) 熱安定性 すなわち基質となる油脂や脂肪酸の融点が高いことから、最適反応温度の高いリパーゼが必要となる。最適反応温度が低いリパーゼにおいては、固体状態である基質の溶解に有機溶媒を使用しな

ければならず、反応後の溶媒回収も必要となり、工業的応用に制限が生じる。

2) 非位置特異性 これはトリグリセリドの3つのアシル基全部が関与する反応、たとえば油脂の加水分解や油脂のランダムなエステル交換、また2級アルコールを用いたエステルの合成にも利用できる。

そこで我々は、このような耐熱性に優れ、しかも位置特異性のないリパーゼを生産する微生物のスクリーニングを行い、得られた *Candida antarctica* LFO58 菌株産生リパーゼについての熱安定性試験や、固定化