

氏名(本籍)	茂木健一(群馬県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第2285号		
学位授与年月日	平成12年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	Interesterification of Oils and Fats Using Lipid-Modified Lipases (脂質修飾リパーゼによる油脂のエステル交換反応)		
主査	筑波大学教授	工学博士	向高祐邦
副査	筑波大学教授	農学博士	中原忠篤
副査	筑波大学教授	工学博士	田中秀夫
副査	筑波大学教授	工学博士	中嶋光敏

### 論文の内容の要旨

カカオ代替脂, EPA, DHA などの高度不飽和脂肪酸, 医療食としての中鎖脂肪酸トリグリセリド (MCT), 低カロリー油脂など物理的, 栄養的な特質を持った油脂が注目される。油脂の物性や栄養価は, トリグリセリドを構成する脂肪酸に影響される。トリグリセリドの脂肪酸をコントロールする方法として, リパーゼを用いたエステル交換がある。なかでも 1, 3 特異性を有するリパーゼを用いる方法は, 他の方法に比べて高品質の油脂を得ることができる。しかし, リパーゼ自体は蛋白質であり, 一般的にそれ自体の熱安定性は低く, また水溶性であるため非水溶媒系ではうまく分散せず, 活性も低い。これらの問題を解決する方法として最近, 界面活性剤修飾リパーゼ (MDL) が合成され, 有機溶媒中で高い活性を示すことが報告された。MDL はリパーゼと界面活性剤の複合体であり, 有機溶媒中でも容易に分散することができる。MDL の修飾操作は簡単であり, 特殊な機器, プロセスを必要としない。または MDL 食品グレードのリパーゼと界面活性剤で作ることができる。

本研究ではこれらいくつかの有効性を持った MDL に着目し, 修飾の最適化, 反応特性, 安定性, 連続反応等を検討した。まず活性の高い MDL を得るために, リパーゼ及び界面活性剤のスクリーニングを行った。その結果, *Rhizopus japonicus* 由来のリパーゼにソルビタンステアリン酸モノエステルを一定条件のもとに修飾することで, 活性の高い MDL を得ることができた。以後の研究はこの MDL を用いて行った。MDL のエステル交換活性は, 修飾時の pH, リパーゼと界面活性剤の配合量, 反応系の水分量に影響された。修飾操作を繰り返し行うことにより, 17.35% のリパーゼ蛋白を回収できた。修飾操作の過程で, MDL の単位蛋白あたりの活性が向上していることがわかった。この効果は加水分解活性にも現れ, その反応性は修飾前の 3 倍を示した。このことは, 界面活性剤によるリパーゼの修飾は, リパーゼの精製であることを示唆した。MDL はステアリン酸を用いても作成することができ, その回収率とエステル交換反応性は, 修飾時の pH, リパーゼとステアリン酸の配合量とに影響された。ステアリン酸-MDL の蛋白質を SDS-PAGE により分析した。修飾前のリパーゼには複数のバンドが現れたが, MDL には分子量 30000 付近のバンドのみが現れた。この結果修飾操作がリパーゼを精製していることを支持するものと考えられる。有機溶媒中 (ヘキサン) でのステアリン酸とトリパルミチンのエステル交換をモデルとし, 反応系の水分濃度と反応性, ジグリセリド, モノグリセリドの生成との関係を調べた。またこの系で反応速度論的解析を行い, 反応速度定数を求める式を得た。この式を用いたエステル交換のシミュレーションを行ったところ, 実験値とよく一致した。さらにヘキサン中でのトリステアリンとトリパルミチンのエステル交換反応を行い, 同様に反

反応速度論的解析を行った。得られた式で、シミュレーションを行った結果、実験値とよく一致した。有機溶媒系で連続反応を行うために膜を用いたバイオリアクターを検討した。耐有機溶媒性を有する中空糸膜を用いることで、酵素活性を失うことなく70時間連続的に反応させることができた。最後に無溶媒系でのトリグリセリド同志のエステル交換反応を検討した。基質としてMDL及び長鎖脂肪酸トリグリセリドを用いた。反応は50℃、48時間で平衡に達した。また、先に検討したエステル交換反応の反応速度論的解析によって得られた式を用いて、反応系全体のシミュレーションを行った結果、実験値とよく一致した。

以上の検討結果より、MDLの最適な修飾条件が明らかになり、溶媒系、無溶媒系におけるエステル交換活性の高いMDLの作成が可能となった。また、的確な反応速度論的解析ができたことから、本研究は工業的なエステル交換反応による高付加価値の油脂の生産に役立つものと考えられる。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、物理的、栄養学的な面から医療食、健康食品素材、嗜好食品素材として付加価値の高い油脂が注目されている。本論文ではこのような付加価値の高い油脂の生産を目的としたエステル交換反応が検討されている。

エステル交換反応は、反応平衡の関係から水系では効率良く反応が進行しないので、非水系での反応が望ましいと考えられるが、非水系では酵素がうまく分解せず、活性も低下する等の問題があった。しかし、酵素リパーゼを界面活性剤で修飾すると非水系でも良く分散し、活性も維持できると報告されたことから、本研究では、安定性、活性の面から有効な酵素の修飾剤を多くの界面活性剤、脂質の中からスクリーニングし、脂質ステアリン酸が最適であることを明らかにするとともに、これによる最適な修飾条件の決定も行っている。また修飾酵素を用いた非水系でのエステル交換反応の速度論的解析を行い、一つの方法パラメータによる簡単な反応モデルで反応が説明できることを示している。さらにこのような非水系のエステル交換の工業的応用のために膜リアクターによる反応が実施され、効率良く反応が進行することも実証された。

酵素の長期安定性、またリアクターの安定性については今後さらに検討されなければならないが、本論文で示された種々の知見は、実用的にも学術的にも高く評価され、食品工業の今後の発展に貢献するものである。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。