

食品製造に適用可能なホスファチジルイノシトール製造法の開発

名古屋大学大学院生命農学研究科・准教授 岩崎 雄吾

■ 目的

ホスファチジルイノシトール(PI)は脂質代謝改善作用等が認められる機能性リン脂質であり、食品・医薬分野への利用が期待されている。現在のPIの製造法は大豆リン脂質等の天然物からの抽出法に依存しているが、含量があまり高くないため効率的な合成法が望まれている。

ホスホリパーゼD(PLD)のホスファチジル基転移反応を利用すると、入手容易なレシチンと水酸化化合物から様々なリン脂質を合成することができる。しかし、PIの合成に関しては有効な酵素がなく、これまでPIの酵素合成は不可能であった。申請者は微生物PLDを蛋白工学に改変し、レシチンとイノシトールからPIを合成できる改変型PLDの開発を行ってきた。

一般に、PLDによるリン脂質合成反応ではレシチンを溶解した有機溶媒(酢酸エチル、トルエン、クロロホルム等)と、酵素及び水酸化化合物を溶解した水相を混合して行うが(有機溶媒-水二相系)、食品分野に毒性の有機溶媒の使用は望ましくない。そこで本研究では有機溶媒を用いないPIの酵素合成法を開発することを目的とした。

■ 方法

PI合成型PLDとして、申請者が開発した改変型NYR-186T型PLDを用いた。本酵素は基質結合部位周辺にG186T、W187NおよびY385Rの三箇所のアミノ酸変異を有しており、嵩高いイノシトールを取り込むことができる。また、イノシトールの6つの水酸基のうち1位を優先的に認識し、天然型と同じ1-PIを異性体純度95%程度で与える。

有機溶媒を使用しない反応方法として水性懸濁系を採用した。これは水に不溶な微粉末に吸着させたレシチンを酵素およびイノシトールを含有する水性緩衝液に懸濁して反応させるものである。本研究では、微粉末の種類や量比、水性緩衝液の種類などの種々の反応条件を検討した。また反応後の生成物の回収法についても検討を行った。

■ 結果および考察

高純度ホスファチジルコリン(PC)を緩衝液に分散させ、酵素とイノシトールを加えた反応では、PI生成量は極めて低かった。また、食品製造に許容されるヘキサンと緩衝液の二相反応系では反応は全く進行しなかった。一方、PCを水に不溶な微粉末に吸着させ、緩衝液に懸濁して酵素反応を行ったところ、PIの合成効率が向上することを見出した。種々の微粉末(シリカゲル、硫酸カルシウム、活性炭など)を検討したところ、シリカゲル(粒径60 μ m)が最も優れていた。

次に、大豆レシチンと卵黄レシチンを用いて検討を行った。条件検討の結果、予め吸着操作を行うことなく、レシチンを分散させた緩衝液にシリカゲルを直接投入しても反応は進行した。投入するシリカゲルとレシチンの重量比などを最適化したところ、24時間反応後のPI含量は大豆レシチンの場合で約30%、卵黄レシチンの場合で約20%に達した。

次に反応混合物からのリン脂質の回収法を検討した。酵素反応後の混合物に希塩酸、ヘキサン及びエタノールを加え、濾過によりシリカゲルを取り除いた。濾液を相分離後、そのヘキサン相からリン脂質を回収することができた。

■ 結語

大豆レシチン及び卵黄レシチンから、食品加工で許容される物質のみを用いたPIの酵素合成法を確立した。