

酵素合成トレハロース脂質の生理機能を活用した 付加価値の高いリポソーム化粧品の開発

東京都市大学工学部エネルギー化学科

黒 岩 崇

Synthesis of a trehalose lipid via lipase-catalysed condensation between trehalose and myristic acid in low-water organic media was investigated. A trehalose lipid (monomyristoyl trehalose) was obtained using immobilized lipase B from *Candida antarctica* (Novozym 435). The product yield was significantly affected by reaction conditions, such as the initial water concentration in organic solvents, the initial water and the amount of added molecular sieves. The product yield varied in the range 0–25%. The effects of the reaction conditions were discussed in relation to the quantitative distribution of water in the reaction system, *i.e.*, water adsorbed onto immobilized enzymes, water adsorbed onto molecular sieves, and free water dissolved in the organic solvent. We developed a comprehensive method for evaluating the effects of water on the product yield.

1. 緒 言

機能性糖質として注目されているトレハロースに中～長鎖脂肪酸が結合したトレハロース脂質は、抗菌性や抗腫瘍性を有する機能性物質である^{1, 2, 3)}。このトレハロース脂質と、既に化粧品分野で利用されている脂質二分子膜小胞体リポソームとを組み合わせることで、トレハロース脂質の生理機能と、リポソーム化粧品の特長である浸透性・安全性・良好な使用感を合わせ持つ、付加価値の高い化粧品素材の開発が期待できる。

トレハロース脂質を合成する際、トレハロースへの脂肪酸導入に使われる水酸基は、トレハロース1分子中に8個も含まれているため、通常の化学合成法では得られるトレハロース脂質の構造を厳密に制御することは容易ではない。一方、反応の位置選択性が高い酵素反応を利用してトレハロース分子内の特定の水酸基だけに脂肪酸鎖を導入できれば、安全性や選択性に優れた合成プロセスを構築でき、人体に直接使用する化粧品としての諸特性を制御しやすいというメリットが期待できる。

酵素を用いた合成反応においては、反応平衡の観点から、水を含まない、あるいは水の含有量が非常に少ない非水溶媒中での反応が有利である。既往の研究において、有機溶媒中の微量水分の影響が重要であることが指摘されている^{4, 5, 6)}。しかし、効率的な合成プロセスの構築に向けて、反応系での水の存在状態を考慮して反応操作因子と合成収率の関係を定量的かつ統一的に評価する手法は十分確立されているとはいえない。



Development of value-added liposomal cosmetics based on physiological activities of enzymatically synthesized trehalose lipids

Takashi Kuroiwa

Department of Chemistry and Energy Engineering, Faculty of Engineering, Tokyo City University

そこで本研究では、トレハロース脂質を利用した高機能化粧品の開発を目指し、酵素を利用したトレハロース脂質の合成条件を検討した。効率的な反応操作を行うための条件設定に関する基礎的知見を得ることを目的とし、反応系の微量水分の影響に着目して行った研究について報告する。

2. 実 験

2. 1. 有機溶媒中での酵素反応によるトレハロース脂質の合成

酵素としては、Novo Nordisk社製の固定化リパーゼ“Novozym 435”を用いた。本酵素は*Candida antarctica*由来のリパーゼ(フラクシオンB)を粒径0.3～0.9 mmの多孔性アクリル樹脂担体に固定化したものである。

トレハロース二水和物およびミリスチン酸(各0.05 mol)とNovozym 435(100 mg)、さらに脱水剤としてモレキュラーシーブ3A(0–400 mg)を30 mL容のフラスコに入れ、種々の有機溶媒5 mLを加えて40℃でインキュベートして合成反応を行った。所定の時間反応させた後、溶媒をエバポレートして除去し、残渣にクロロホルム/メタノール混合液(体積比2:1)を加え、不溶物をろ過により除去した。減圧下で溶媒を蒸発除去した残渣を分析に供した。

2. 2. Novozym 435 およびモレキュラーシーブ3Aへの水の吸着挙動評価

所定量のNovozyme 435およびモレキュラーシーブ3Aを所定の水分濃度に調整した有機溶媒中に投入し、密閉しながら40℃でインキュベートした。100 h後、液相の水分濃度をカルフィッシャー水分計により定量し、(1)式を用いて吸着水分量を求めた。

$$q_e = q_i + V(C_i - C_e)/m \quad (1)$$

ここで q は吸着水量[g-water/g-solid]、 V は溶媒の体積[L]、 C は液相の水分濃度[g/L]、 m は添加した固体の質量[g]である。添え字 i は実験開始時の初期値、 e は実験終了

時の最終値であることを示す。

2. 3. 生成物の定量

反応生成物は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて定量した。オクタデシルシリカを充填した逆相カラムを用い、メタノール/水混合液 (体積比 85 : 15) を移動相としてカラム温度 40℃、移動相流速 1.0 mL/min の条件で分析を行った。既往の方法⁷⁾により化学的に合成したトレハロース脂質を標準物質とし、示差屈折検出器によるピーク面積からトレハロース脂質の生成量を求めた。

3. 結果および考察

3. 1. 固定化リパーゼを用いたトレハロース脂質の合成

今回検討した反応は、トレハロースの水酸基とミリスチン酸のカルボキシル基との脱水縮合によりトレハロース脂肪酸エステルを形成させるものである。油脂をはじめとする脂肪酸エステルの加水分解反応を触媒するリパーゼは、水が極端に少ない条件下では加水分解の逆反応である脱水縮合によるエステル化反応を触媒する。そこで、有機溶媒中でリパーゼを用いてトレハロースとミリスチン酸からのトレハロース脂質の合成を行った。種々の有機溶媒を用いて検討した結果、2-メチル-2-ブタノール (*tert*-アミルアルコール) およびアセトンなどの溶媒中で反応の進行が認められた。図 1 に、2-メチル-2-ブタノール中で反応を行った際の生成物の HPLC クロマトグラムを示す。酵素反応サンプル中にも、化学的に合成されたトレハロース脂質 (トレハロース 1 分子に 1 分子のミリスチン酸が結合したもの) と同一の保持時間のピークが検出された。

3. 2. トレハロース脂質の収率に対する操作因子の影響

トレハロース脂質の収率に対する各種操作因子の影響について、2-メチル-2-ブタノールを溶媒とする反応系で検討した。その結果、トレハロース脂質の収率は、溶媒初期水分濃度およびモレキュラーシープ添加量により顕著に変化することを明らかにした (図 2)。これら以外にも、反応系内の水分濃度およびその分配に関連すると考えられる操作因子が生成物の収率に影響を及ぼす結果が得られたが、いずれの因子の影響もそれぞれ独立したものではなく、相互に影響しあっていることが示唆された。

3. 3. 合成収率に対する微量水分の影響評価

反応系の水は反応の平衡に影響を及ぼすばかりでなく、酵素活性にとっても重要な役割を果たすことが知られている⁴⁾。すなわち、加水分解の逆反応である脱水縮合反応では、過剰な水の存在は合成を妨げる方向に作用する。一方、酵素の水和状態は活性の発現に大きくかわり、全くの“無水”状態では酵素活性が著しく低下してしまう場合がある^{8, 9)}。

従って、反応系の水の影響を考慮して操作条件を決定することが重要となる。本研究では、各操作因子の影響を統一的に評価するため、反応系における水の分布状態に着目した。本反応系は、溶媒 (液相)、固定化酵素 (固相) 及びモレキュラーシープ (固相) が共存する多相反応系であり、反応系に含まれる水は各相に分配した状態で存在していると考えられる (図 3)。そこで、各相間の水の分配挙動を明らかにし、系内の水の物質収支に基づいて反応系における水の分布状態を定量化することを試みた。

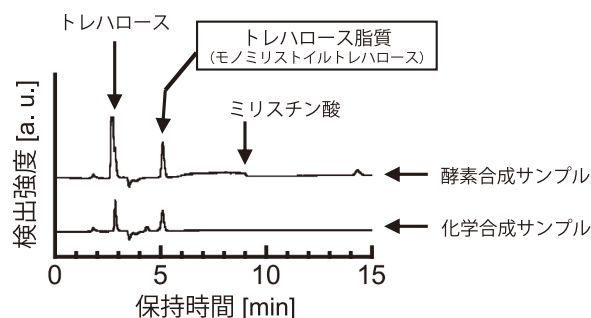


図 1 酵素反応により合成したサンプルと化学的に合成したサンプルの HPLC クロマトグラム

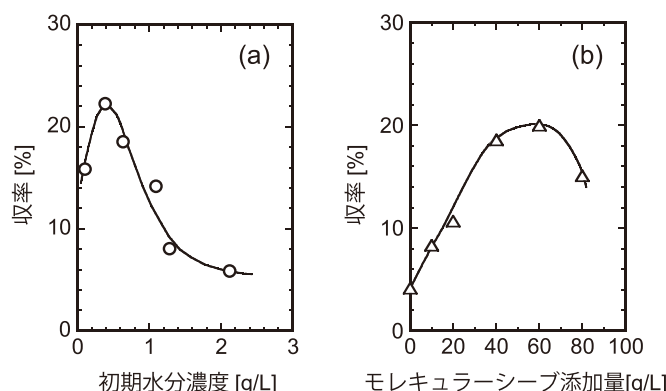


図 2 トレハロース脂質の合成収率に対する (a) 初期水分濃度および (b) モレキュラーシープ添加量の影響 (反応時間 72 h)

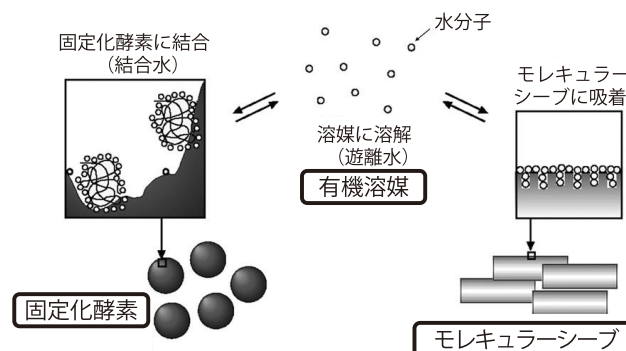


図 3 反応系における水の分布状態の模式図

図4に、40℃の2-メチル-2-ブタノール中におけるNovozym 435およびモレキュラーシーブ3Aに対する水の吸着等温線を示す。いずれも、液相の水分濃度の増大に伴い固相への吸着水量が増大し、水分濃度の高い領域では吸着水量は飽和する挙動を示した。実験データ(図中のプロット)は、式(2)で表わされるLangmuir型の吸着モデル(図中の実線)によく一致した。

$$q_e = q_s C_e / (K + C_e) \quad (2)$$

ここで、 K は吸着定数 [g/L]であり、添え字 s は飽和状態における値であることを示す。

図4の結果からカーブフィッティングにより式(2)中の吸着パラメーター(q_s および K)を求め、これを用いて反応系における水の物質収支をとると、反応開始時の諸条件から反応終了時の各相への水の分布状態を推算することができる。図5には、反応開始時の溶媒中の初期水分濃度および反応終了時の溶媒中の最終水分濃度(水の分布状態を考慮して推算)と、反応時間72 hにおけるトレハロース脂質の合成収率との関係を示す。本反応系では、初期水分濃度が同じ場合であっても、例えば図2(b)のようにモレキュラーシーブの添加量など他の操作因子を変えることで水の分布状態が変化するため、初期水分濃度だけでは合成収率の最適条件を評価することはできない(図5(a))。これに対し、反応系の水の分布状態を考慮して求められた最終水分濃度と合成収率のとの間には良好な相関関係が認められた(図5(b))。トレハロース脂質の合成収率は、最終水分濃度0.1 g/L付近で最も高く、この値より低い条件でも高い条件でも合成収率が低下することが分かった。この結果から、反応系の水の分布状態を考慮することで合成収率に対する操作因子の影響を定量的に評価することができることが示された。このアプローチはスケールアップ時など

における操作条件の最適化にも有用な指針を与えると期待できる。

4. 総括

本稿では、付加価値の高い化粧品素材の開発に向けて、酵素反応を利用したトレハロース脂質の合成における各種反応条件の影響について検討した結果を報告した。トレハロースとミリスチン酸のエステル化反応によるトレハロース脂質の合成を、有機溶媒中で固定化リパーゼを用いて行い、種々の操作因子がトレハロース脂質の収率に影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、各操作因子を個別に評価するのではなく、反応系における水の分布状態に着目して考察することで、操作因子の影響を定量的・統一的に評価し最適化の指針を示すことができた。

筆者らの研究グループでは、今回報告した検討と並行して、機能性成分を包含したリポソームの効率的製造技術の開発にも取り組んでいる。この技術と本報告の成果とを融合・発展させることで、高機能ナノリポソーム化粧品の開発が実現できると期待される。その際、トレハロース脂質とリポソームを構成する脂質分子間の相互作用を物理化学的な観点から詳細に解析することが必要になると考えている。今後は、異種分子からなる分子集合体の動的・静的な挙動という視点から、トレハロース脂質を組み込んだリポソーム化粧品の作製技術について理解を深めていきたい。

謝辞

本研究を実施するにあたりご支援をいただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり多大なご教授を賜りました筑波大学大学院生命環境科学研究科准教授 市川創作先生に心より御礼申し上げます。

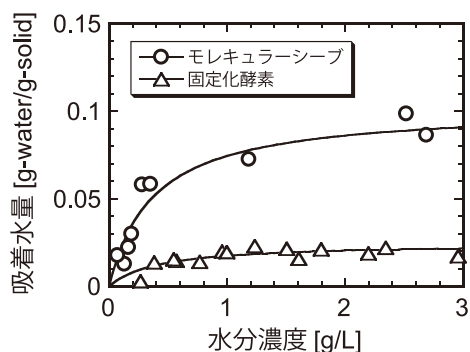


図4 2-メチル-2-ブタノール中における固定化酵素(Novozym435)およびモレキュラーシーブの吸着等温線(実験温度40℃)

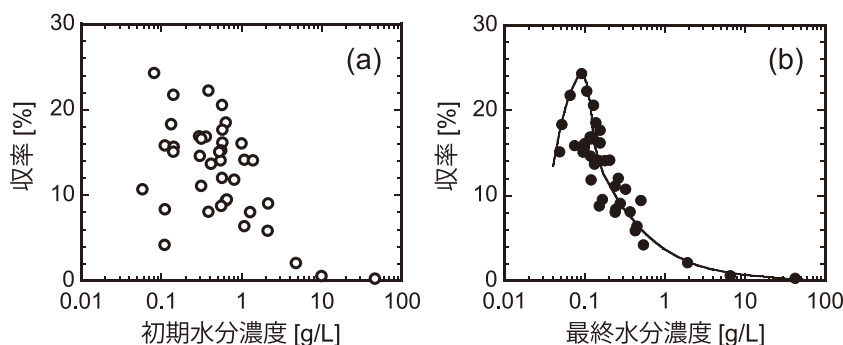


図5 トレハロース脂質の合成収率に対する(a)初期水分濃度および(b)最終水分濃度の影響(反応時間72 h)

(引用文献)

- 1) Nishikawa Y, Yoshimoto K, Okada M, *et al.*: Chemical and biochemical studies on carbohydrate esters. V. Anti Ehrlich ascites tumor effect and chromatographic behaviors of fatty acyl monoesters of sucrose and trehalose, Chem. Pharm. Bull., **25**, 1717-1724, 1977.
- 2) Kohya H, Ishii F, Takano S, *et al.*: Antitumor effect of a synthetic cord factor, 6,6'-di-O-decanoyl α , α -trehalose (SS554), in mice, Jpn. J. Cancer Res., **77**, 602-609, 1986.
- 3) Okabe S, Suganuma M, Tada Y, *et al.*: Disaccharide esters screened for inhibition of tumor necrosis factor- α release are new anti-cancer agents, Jpn. J. Cancer Res., **90**, 669-676, 1999.
- 4) Yamane T.: Importance of moisture content control for enzymatic reactions in organic solvents: a novel concept of 'microaqueous', Biocatalysis, **2**, 1-9, 1988.
- 5) Chen J, Kimura Y, Adachi S: Synthesis of linoleoyl disaccharides through lipase-catalyzed condensation and their surface activities, J. Biosci. Bioeng., **100**, 274-279, 2005.
- 6) Zhang X, Adachi S, Watanabe Y, *et al.*: Prediction of the equilibrium conversion for the synthesis of acyl hexose through lipase-catalyzed condensation in water-miscible solvent in the presence of molecular sieve, Biotechnol. Prog., **19**, 293-297, 2003.
- 7) 池本毅, 南野博美: 特開平5-168893, 1993.
- 8) Rupley JA., Gratton E. and Careri G.: Water and globular proteins, Trends Biochem. Sci., **8**, 18-22, 1983.
- 9) Affleck R, Xu ZF, Suzawa V, *et al.*: Enzymatic catalysis and dynamics in low-water environments, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 1100-1104, 1992.