

アブラヤシから得られる植物油の脂肪酸から調製される トレハロース脂肪酸エステルの利用性開拓

Usability development of Trehalose Fatty Acid Esters Prepared with Natural Fatty Acids Extracted from Oil Palm

小河 重三郎*
Shigesaburo Ogawa

Abstract

The oil derived from the oil palm plant has become one of the most contested agricultural commodities in Southeast Asia, and development of novel uses for it is in high demand. Trehalose fatty acid esters have begun attracting attention due to their specific potent applications (based on the exceptional intrinsic properties of the hydrophilic trehalose part) and their amphiphilicity. In order to enhance the usability of palm products and trehalose fatty acid esters, in this present study we focused on the use of trehalose fatty acid monoesters (TMEs) prepared with natural fatty acids extracted from oil palms as cryoprotectants. Both saturated fatty acid and unsaturated fatty acid (e.g., oleic acid) could be used as the lipid substrate for the solvent-free enzymatic synthesis of trehalose fatty acid esters, using Novozym®435 as the enzyme catalyst. Additionally, three pure TMEs with fatty acid substitutions (e.g., lauric acid, palmitic acid, oleic acid, and mixtures of these) were assessed for their ability to maintain the enzymatic activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the freeze/thaw processes. While 6-*O*-dodecanoyl trehalose (TME12) exhibited a much higher effect for preserving LDH activity than 6-*O*-hexadecanoyl trehalose (TRE16), substituting TME12 with TRE16 retained LDH activity up to a molar ratio of about 1:1 caused no distinct loss in the LDH's enzymatic activity, which indicates the effectiveness of a mixing strategy for the stabilizer, and that the concept is important for the use of TME product prepared with natural fatty acid extracted from oil palms.

背景

豊かで健康的な生活を行うため、食品・化粧品・医薬品産業では、きびしい国際競争のなか、新しいライフスタイルに適合した製品を提供するため、製品の多角化や技術開発等の発展が求められている。さらに、国連サミットで採択された17の持続可能な開発目標（SDGs）に含まれる“天然資源の持続可能な管理及び効率的な利用を達成すること”は、強靱（レジリエント）

* 成蹊大学理工学部 Faculty of Science and Technology, Seikei University
E-mail: s.ogawa@st.seikei.ac.jp

な産業化の促進及びイノベーションの推進を図るうえで重要になってきている。年々増産されている植物油は食品・化粧品・医薬品産業に広く利用され、かつ環境問題に密接に関係する天然資源であり、その有効な新規利用法開発は重要である。

アブラヤシの果実の果肉部や果実の核（種子）から得られる植物油をそれぞれパーム油、パーム核油という。マレーシアやインドネシアなどの東南アジア地域ではアブラヤシの栽培の急速な拡大に伴い、それぞれの植物油は年々増産され、特にパーム油は、2004/2005年度以降生産量第一位となり、日本での消費量も、2009年に大豆油を抜いて、なたね油に次ぐ第2位となっている（戸谷 2015）。このようなプランテーションの拡大に際して、アブラヤシから得られる天然資源である植物油の新しい応用性開拓や生産に付随する廃棄物の有効利用法の開発はサステイナブルエンバイロメントの観点から急務であると考えられている。一つの興味深い最近の取り組みとして、マレーシアのマラヤ大学の研究グループは、還元性糖質原料と反応させることで、脂質素材を製造する上での原材料として利用する試みを展開している（Aripin 2013, Yusoff 2018）。それらの取り組みでは天然油脂脂肪酸はアルコールに変換され、また糖脂質素材は薬物を内包する脂質キャリアとしての利用が注目されていた。一方、我々は環境に優しいバイオテクノロジーを活用することで、天然油脂脂肪酸をアルコールに変換させるコストを掛けずに、さらにタンパク質製剤の効果的な安定化剤として利用できる糖脂質素材が開発できると着想した。

クマムシのアンハイドロバイオシス（乾燥環境下に置かれると仮死状態に陥るが、再び水を添加すると生命活動を再開すること）が非還元性のオリゴ糖であるトレハロースの蓄積に起因していると考えられたことから（Crowe 1998）、トレハロースに対する関心は著しく高まり、今日までトレハロースに関する基礎研究は革新的な発展を遂げている。その結果、これまでにショ糖には無い、あるいはより優れた多くの素晴らしい物理化学的特性を有していることが明らかとされている（図1）（Kilburn 2006, Ogawa 2017, Oku 2003, Singh 2011, etc.）。そして、このようなトレハロースに脂肪酸を導入した化合物であるトレハロース脂肪酸エステルもまた最近基礎研究が大きく進んでいる糖脂質である。例えば、トレハロース脂肪酸ジエステル（TDE）（図2左上）は、マイコバクテリア細胞壁に存在するトレハロース脂肪酸ジミコール酸エステル（図2右上）と類似の化合物として、免疫系に影響を与える化合物として広く研究がなされている（Decout 2017, Kallerup 2017）。また、トレハロース脂肪酸モノエステル（TME）（図2左下）は界面活性剤や生体活性脂質として注目を集めている（Chen 2007, Raku 2003, Matsumoto 2013, Matsumoto 2016）。その中において、我々はTMEが数々の興味深い液晶状態を形成し、さらに液晶の親水部がガラス化することを見出してきた（ここで、TMEのガラス化については、洗剤が飴（糖ガラス状態）のようになったものと理解して頂けると幸いである）（Ogawa 2016, Ogawa 2018, Ogawa 2020）。この糖脂質類のガラス状態の形成は、凍結乾燥過程におけるタンパク質に対する糖脂質の優れた安定化能の科学的根拠の一つと考えられる（小河 2020a）。

糖脂質のガラス形成能の観点において、TMEは工業製品であるショ糖脂肪酸エステルに比べて高く（図2下）（Ogawa 2016）、製剤の安定化剤としてショ糖脂肪酸エステルより高い機能性を示すことが期待できる。そのため、アブラヤシから得られる植物油を原料として製造することは安価なTMEの提供を可能とし、強靱な産業化の促進及びイノベーションの推進に寄与する可能性が考えられた。

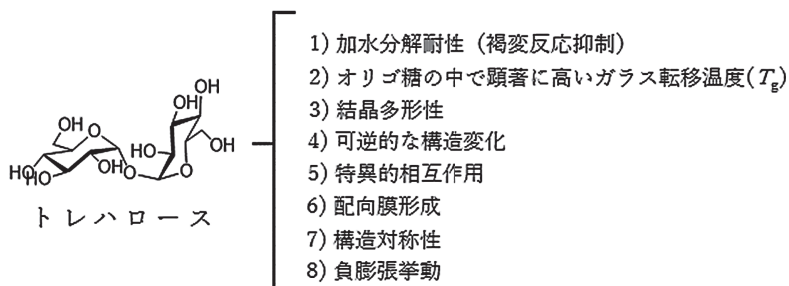


図1. トレハロースの構造と物理化学的特性

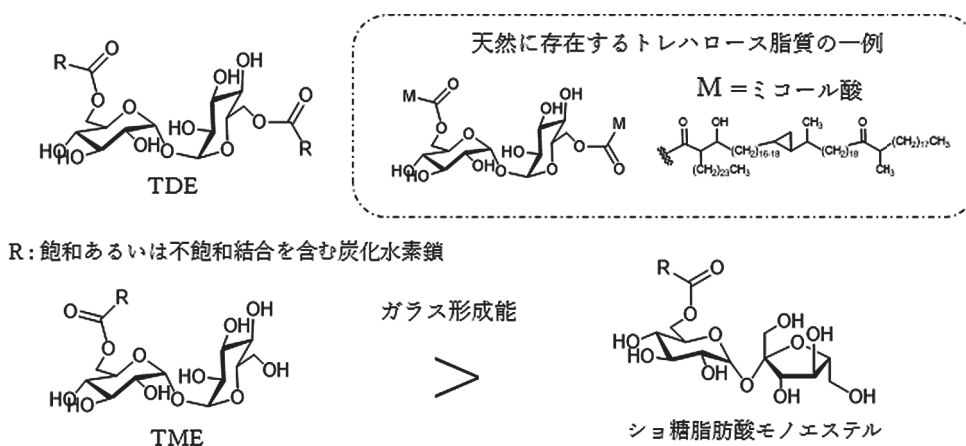


図2. トレハロース脂肪酸エステルとシヨ糖脂肪酸モノエステルの構造

そこで我々は2019年度成蹊大学アジア太平洋パイロット研究において、パーム油やパーム核油に含まれる天然脂肪酸を結合させたTME製品のバイオテクノロジーを活用した調製と、アブラヤシから得られる植物油の脂肪酸から調製されるTME製品が実際に優れたタンパク質安定化効果を与えるかについて調査することを試みた(小河2020b)。具体的には、パーム油やパーム核油に多く含まれるパルミチン酸(16)、オレイン酸(18:1)、ラウリン酸(12)等の脂肪酸(図3)を疎水鎖として有するTMEをリパーゼ触媒Novzym®435を用いて調製し、さらに単一のみならず異なる脂肪酸を有するTMEを混合した際の水溶性タンパク質の凍結保護剤として効果的に作用するかについて検討した。

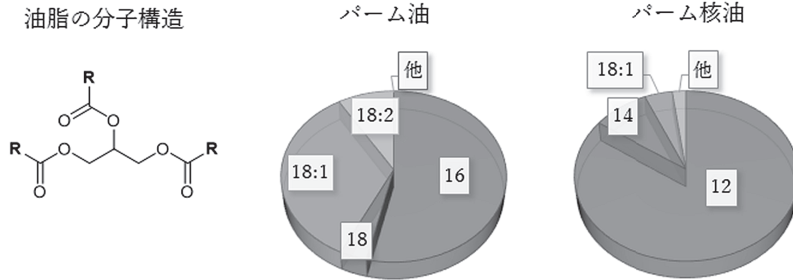


図3. パーム油とパーム核油の脂肪酸の組成。

実験方法

1. 試薬

油脂

- ・トリパルミチン，富士フィルム和光純薬株式会社

トレハロース脂肪酸モノエステル (TME)

- ・トレハロース C12 (TME12)，同仁化学研究所株式会社
- ・トレハロース C16 (TME16)，同仁化学研究所株式会社

これらの商品が高純度品であることは重ジメチルスルホキシド（重DMSO）溶媒を用いた核磁気共鳴分光法（¹H-NMR）とメタノール／クロロホルム／酢酸／水（10／85／4／1（v/v/v/v））混合溶媒を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー－水素炎イオン化検出器（TLC-FID）（LSIメディアエンス株式会社）による解析により決定した。

リパーゼ触媒

- ・Novozym[®] 435，株式会社ミックファーム

トレハロース脂肪酸エステル調製のための原料試薬

- ・トレハロース二水和物，富士フィルム和光純薬株式会社
- ・オレイン酸，植物由来，98.0+％，富士フィルム和光純薬株式会社
- ・ラウリン酸，98.0+％，富士フィルム和光純薬株式会社

酵素活性試験に利用した試薬

- ・L-乳酸デヒドロゲナーゼ ウサギ筋肉由来，Sigma-Aldrich
- ・β-ニコチンアミドアデニンジスクレオチド，還元型 二ナトリウム塩，Sigma-Aldrich
- ・ピルビン酸ナトリウム，≥99％，Sigma-Aldrich

その他の溶剤・試薬

日本産業規格（JIS）における一級規格以上の製品を使用した。

2. TMEの合成

200 mLナスフラスコにトレハロース二水和物 (4 mmol) を加え 8 mLの水に溶解させ、Novozym®435 (トレハロース無水和物と同重量) を加えた。減圧濃縮することで水を留去し、各種脂肪酸 (8 mmol) を溶解したジエチルエーテル溶液をナスフラスコに加えた後、再び減圧濃縮により溶媒を留去し無溶媒状態とした。その後、ナスフラスコ口を非密閉状態の塩化カルシウム管に繋げたナスフラスコを、予め 110°Cまで加温していた油浴中に浸漬させ無溶媒反応を開始した。24 h後、常温まで冷却し、ヘキサンで洗浄し、さらに残渣から目的物をメタノール/クロロホルム (1/2 (v/v)) 混合溶媒で回収した。抽出溶媒を減圧濃縮により留去することで得た残渣についてメタノール/クロロホルム/アセトン/水 (4/9/4/1 (v/v/v/v)) の混合溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製することでTMEとTDEを得た (それぞれ20%以上の収率を得た)。これらの構造は重DMSOによる¹H-NMR測定により決定した。

なお、反応挙動の解析においては、上述の1/4量のスケールで、かつトレハロースと各種脂肪酸のモル比は1対4とした。加えて、ヘキサン洗浄は行わずジメチルホルムアミドで反応混合物を抽出し、メタノール/クロロホルム/酢酸/水 (10/85/4/1 (v/v/v/v)) の混合溶媒を用いたTLC-FID解析を行うことで反応混合物の組成を解析した (図4)。生成物の割合 (%) は、トレハロースと各トレハロース脂肪酸エステル (TMEおよびTDE) のピーク面積の総和に対するそれぞれの成分のピーク面積比として算出した。

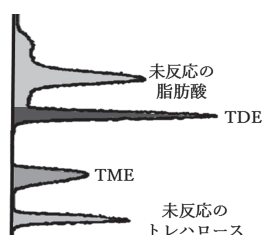


図4. TLC-FID解析結果の例。

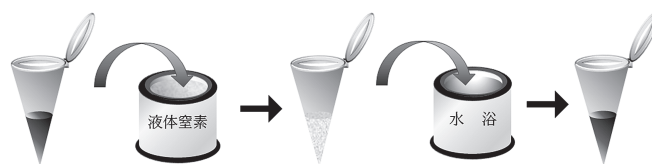


図5. 凍結融解処理の模式図。

3. 凍結融解試験 (図5)

TME添加、およびTME無添加の0.053 μ M LDH-10 mMクエン酸バッファー水溶液 (0.5 mL) を1.6 mLの滅菌済みマイクロチューブ (フナコシ株式会社製品) に加えた後、チューブを1.0 min間液体窒素中に浸漬させることで凍結させ、その後常温で5-6 min間水浴させることで完全に融解させた。解凍後のLDH水溶液残存活性は24°Cで以下の手順により評価した。

4. LDH残存活性の評価

凍結融解処理あり、なしのそれぞれにおけるTME添加、TME無添加のLDH水溶液 (0.1 mL) をNADH (0.2 mM) とピルビン酸ナトリウム (2.0 mM) を含むバッファー水溶液 (2.0 mL) を加えた石英セル中に加えピペティングで攪拌した後、セルをただちに紫外可視分光光度計V-650 (日本分光株式会社) のセルホルダーに移した。その後、NADHの吸収に相当する340 nmでの吸光度の経時変化を追跡し、反応開始直後の傾きを算出した。LDH残存活性は、凍結融解処理後の試料で得られた減衰曲線の傾きを凍結融解処理を行わなかった試料で得られた傾きで除することで相対LDH活性 (%) として算出した。

結果・考察

バイオテクノロジーを活用したトレハロース脂肪酸エステルの調製

パーム油やパーム核油それぞれに特に多く含まれているパルミチン酸 (16) やラウリン酸 (12) が導入されたトレハロース脂肪酸エステルは市販で入手できる。しかし、次に多く含まれるオレイン酸 (18:1) を含むトレハロース脂肪酸エステルは市販では入手できない。そこで、トレハロースと遊離脂肪酸の無溶媒下における Novozym®435 触媒を利用した酵素反応により、TME18:1 と TDE18:1 を調製した (図6)。予備検討として、第一にラウリン酸の場合に確立した反応条件 (Ogawa 2019) がオレイン酸にも使用できるかを調査した。その結果、110°C、24 h、トレハロース/脂肪酸基質 (1:4) の反応条件において、オレイン酸を用いた場合、ラウリン酸を用いた場合に比べて二置換体である TDE の割合が若干多く、そして未反応のトレハロースの割合がやや少なかった (図7)。これより、不飽和結合を含むオレイン酸においても、Novozym®435 触媒を利用した無溶媒反応が進行することが判明した。

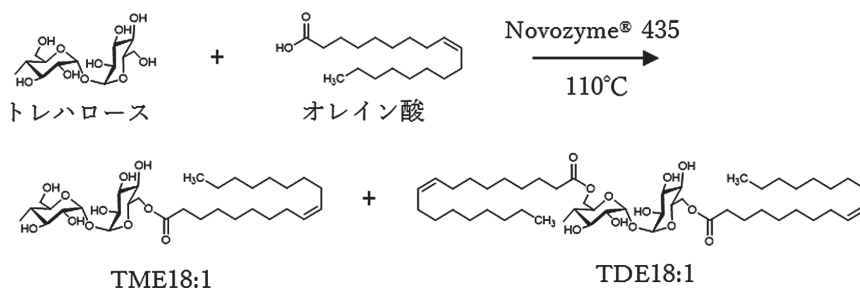


図6. TME18:1 と TDE18:1 の酵素的調製。

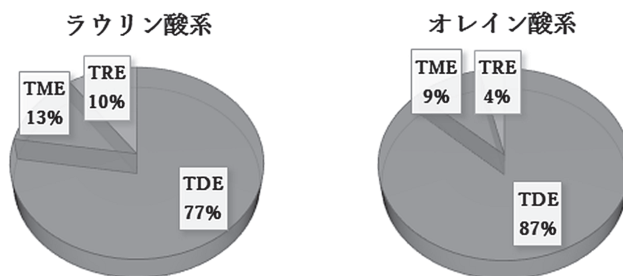


図7. ラウリン酸とオレイン酸を用いて得た反応混合物中の組成。TRE：トレハロース。

図8に精製により得たTME18:1の¹H-NMRスペクトルの結果を示した。TLC-FIDチャートから単一のピークが確認されていた上、¹H-NMRスペクトルではトレハロース構造由来のピークに加え、0.8-1.5 ppmの範囲に明瞭な炭化水素に由来するピークが適切な積分値で得られており、高純度のTME18:1が単離されたことが示された。

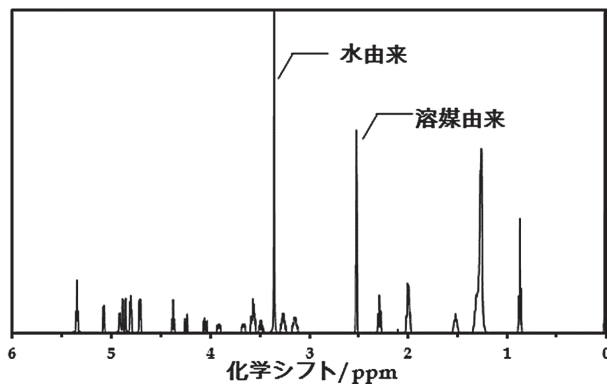


図8. TME18:1の¹H-NMRスペクトル（重DMSO）。

ところで、図6の方法では、図9aのような油脂原料から遊離脂肪酸を得る工程が想定される。しかし、以前に脂肪酸エチルエステル体からのTME12等の直接合成が可能であることを認めており（Ogawa 2019）、グリセロ脂質である油脂原料を用いた直接合成もまた可能であると期待された。実際トレハロース/油脂（1:1（mol/mol））の条件で施行したところ、若干反応の進行は認められている。今後詳細な条件検討が必要である。

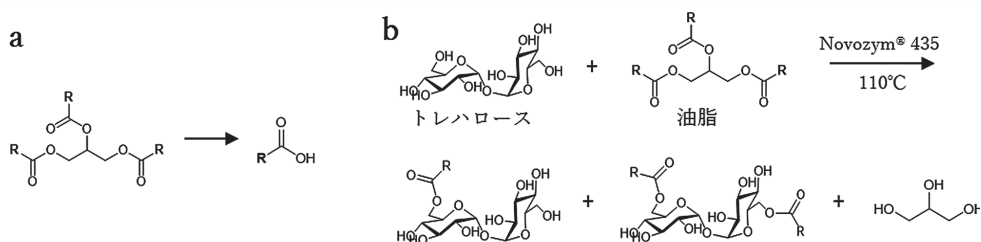


図9. (a) 油脂の加水分解による遊離脂肪酸の調製スキーム。
(b) 油脂原料を用いたトレハロース脂肪酸エステルの調製スキーム。

トレハロース脂肪酸エステルの凍結保護効果の検討

パーム油やパーム核油それぞれに特に多く含まれているパルミチン酸やラウリン酸、そしてオレイン酸を有するTMEについて、単体および混合系におけるタンパク質の凍結保存時の安定化効果を調査した。ここで混合系についての検討は、アブラヤシから得られる植物油からTME製品を調製する場合に単一成分のTMEの調製はコスト面の観点から応用利用が難しいと考えられるため、利用に際しては混合物で得られることを考慮した上での検討である。

水溶性タンパク質LDHは凍結により変性し、容易に失活することが知られている（Hillgren 2002, Izutsu 1994, Imamura 2014, Ogawa 2015）。本研究において、凍結融解処理後のLDHの残存活性は凍結をしない場合に対する相対活性として算出した結果、13.2%であった。また、TME添加によるLDH活性の向上は認められず、それはLDHが非常に高い活性作用を有したフレッシュな状態であるものと捉えられる。これらの検討から、TMEは溶液状態においてはLDH活性

に有意な影響を与えず、また安定剤なしではLDH活性は凍結操作によりほとんど活性を失うことから、TMEの安定化剤として有意な検討が可能な条件であることがわかった。

図10は総濃度0.09mMのTME添加下における凍結融解後のLDH残存活性の結果を示している。TME12が最も高い活性保持効果を示し、TME16とTME18:1はTME12に比べると大きく効果は低下した。しかしながら、TME16とTME18:1からなる混合TMEでは、それぞれのTMEの相加平均とほとんど効果は変わらなかったものの、TME12をTME16やTME18:1と混合させると、相加平均値よりも向上していることが示された。特にTME12単独とTME12とTME16の混合TMEではほとんど活性保持効果は同程度であることがわかり、これはTME16の低い活性保持効果がTME12との混合により高められたと捉えられる。

パーム油にはパルミチン酸が多く含まれており、またパーム核油にはラウリン酸が多く含まれている(図3)。そのため、パーム核油から調製されるTME製品はラウリン酸誘導体が豊富となるため、凍結保護剤として有意な効果が期待される。また、パーム油の脂肪酸から調製されるTME製品では、パーム核油から調製されラウリン酸誘導体を多く含むTME製品と適切な組成で混合させることで、優れた凍結保護剤として使用できうることが示唆された。

脂質系の凍結保護剤における混合効果の科学は十分に検討はなされておらず、TME製品の検討を交えることで、今後飛躍的に進展していくことが期待される。

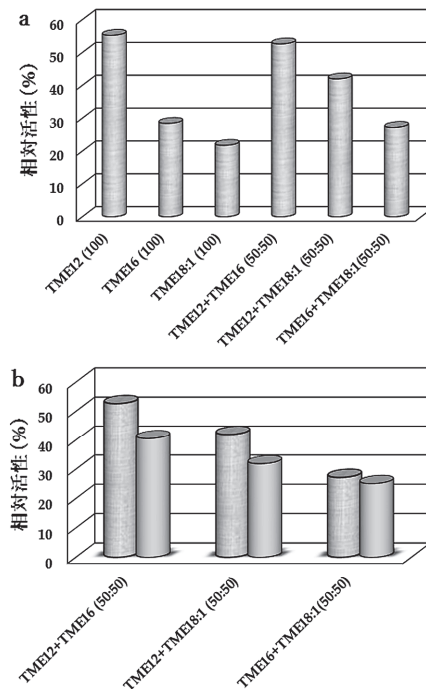


図10. 凍結融解後のLDH残存活性。

(a) 各TMEと2種のTMEを混合した混合TMEの添加効果。

(b) 混合TMEの添加効果の実験値(左)と予測値(右)(各TME添加時に得られた相対活性を相加平均したもの)。

参考文献

<日本語文献>

- 小河重三郎 2020年 (a) 「単鎖型糖脂質の凍結および乾燥下における挙動解析」『低温生物工学会誌』第66巻 第1号：1-10
- 小河重三郎、宮崎裕司、中島真奈、坪村太郎 2020年 (b) 「トレハロース脂肪酸モノエステルの凍結融解過程での乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性に対する保持効果」『低温生物工学会誌』採択済
- 戸谷洋一郎、原節子 2015年「油脂の科学 (食物と健康の科学シリーズ), 初版」朝倉書店株式会社 38-39

<外国語文献>

- Aripin, N.F.K., Hashim, R., Heidelberg, T., Kweon, D.K., Park, H.J. 2013. "Effect of vesicle's membrane packing behaviour on skin penetration of model lipophilic drug." *J Microencapsul*, Vol.30 No.3:265-273
- Chen, J., Kimura, Y., Adachi, S. 2007. "Surface activities of monoacyl trehaloses in aqueous solution." *LWT-Food Sci Technol*, Vol.40 No.3:412-417.
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M. 1998. "The role of vitrification in anhydrobiosis." *Annu Rev Physiol* Vol.60 No.1:73-103
- Decout, A., Silva-Gomes, S., Drocourt, D., Barbe, S., André, I., Cueto, F.J., Lioux, T., Sancho, D., Pérouzel, E., Vercellone, A., Prandi, J., Gilleron, M., Tiraby, G., Nigou, J. 2017. "Rational design of adjuvants targeting the C-type lectin Mincle." *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol.114 No.10:2675-268
- Hillgren, A., Lindgren, J., Aldén, M. 2002. "Protection mechanism of Tween 80 during freeze-thawing of a model protein, LDH." *Int J Pharm*, Vol.237 No.1-2:57-69
- Imamura, K., Murai, K., Korehisa, T., Shimizu, N., Yamahira, R., Matsuura, T., Tada, H., Imanaka, H., Ishida, N., Nakanishi, K. 2014. "Characteristics of sugar surfactants in stabilizing proteins during freeze-thawing and freeze-drying." *J Pharm Sci*, Vol.103 No.6:1628-1637
- Izutsu, K., Yoshioka, S., Terao, T. 1994. "Stabilizing effect of amphiphilic excipients on the freeze-thawing and freeze-drying of lactate dehydrogenase." *Biotechnol Bioeng*, Vol.43 No.11:1102-1107
- Kallerup, R.S., Franzyk, H., Schiøth, M.L., Justesen, S., Martin-Bertelsen, B., Rose, F., Madsen, C.M., Christensen, D., Korsholm, K.S., Yagmur, A., Foged, C. 2017. "Adjuvants based on synthetic mycobacterial cord factor analogues: biophysical properties of neat glycolipids and nanoself-assemblies with DDA." *Mol Pharm*, Vol.14 No.7:2294-2306
- Kilburn, D., Townrow, S., Meunier, V., Richardson, R., Alam, A., Ubbink, J. 2006. "Organization and mobility of water in amorphous and crystalline trehalose." *Nat Mat*, Vol. 5 No.8:632-635
- Matsumoto, Y., Cao, E., Ueoka, R. 2013. "Novel liposomes composed of dimyristoylphosphatidylcholine and trehalose surfactants inhibit the growth of tumor cells along with apoptosis." *Biol Pharm Bull*, Vol.36 No.8:1258-1262
- Matsumoto, Y., Kuwabara, K., Ichihara, H., Kuwano, M. 2016. "Therapeutic effects of trehalose liposomes against lymphoblastic leukemia leading to apoptosis in vitro and in vivo." *Bioorg Med*

Chem Lett, Vol.26 No.2:301-305

- Ogawa, S., Kawai, R., Koga, M., Asakura, K., Takahashi, I., Osanai, S. 2015. "Degree of maintenance of lactate dehydrogenase (LDH) activity during freeze/thaw process highly depends on hydrophobic chain length of synthetic mono-tailed glycolipid stabilizer." *Cryobiol Cryotechnol* Vol.61 No.2:89-94
- Ogawa, S., Kawai, R., Koga, M., Asakura, K., Takahashi, I., Osanai, S. 2016. "Oligosaccharide-based surfactant/citric acid buffer system stabilizes lactate dehydrogenase during freeze-drying and storage without the addition of natural sugar." *J Oleo Sci*, Vol.65 No.6; 525-532
- Ogawa, S., Takahashi, I. 2017. "Glass Transition of Ultrathin Sugar Films Probed by X-Ray Reflectivity." *Carbohydrate*, IntechOpen, Chapter 6, 115-130
- Ogawa, S., Honda, K., Tsubomura, T., Totani, K., Takahashi, I., Hara, S. 2018 "Physicochemical characterization of 6-O-acyl trehalose fatty acid monoesters in desiccated system." *Chem Phys Lipids*, Vol.216:80-90
- Ogawa, S., Ono, Y., Takahashi, I. 2020 "Glass transition behavior of perpendicularly aligned thermotropic liquid crystalline phases consisting of long-chain trehalose lipids." *J Mol Liq*, Vol.298:111954
- Oku, K., Watanabe, H., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y., Komori, M., Inoue, Y., Sakurai, M. 2003. "NMR and Quantum Chemical Study on the OH••• π and CH•••O Interactions between Trehalose and Unsaturated Fatty Acids: Implication for the Mechanism of Antioxidant Function of Trehalose." *J Am Chem Soc*, Vol.125 No.42:12739-12748
- Raku, T., Kitagawa, M., Shimakawa, H., Tokiwa, Y. 2003. "Enzymatic synthesis of hydrophilic undecylenic acid sugar esters and their biodegradability." *Biotechnol Lett*, Vol.25:161-166
- Singh, S., de Pablo, J.J. 2011. "A molecular view of vapor deposited glasses." *J Chem Phys*, Vol.134 No.19:194903
- Yusoff, M., Aripin, N.F.K., Aznan, N.I., Salleh, R.M. 2018. "Self-assemblies behaviour of palm oil-based galactoside." *Malaysian J Anal Sci*, Vol.22 No.2:339-345