

## 水-有機溶媒二相反応系における牛脂の酵素分解

榊原三樹男\* 岡田文男\* 福住武司\*

### Enzymatic Hydrolysis of Beef Tallow in a Biphasic Organic-Aqueous System

Mikio SAKAKIBARA, Fumio OKADA, and Takeshi FUKUZUMI

(Received Aug. 31, 1990)

Hydrolysis of beef tallow by soluble and immobilized lipase from *Pseudomonas sp.* in a biphasic organic-aqueous reaction system was investigated. The addition of an appropriate organic solvent to the reaction system stimulated the hydrolysis of beef tallow by lipase strongly. Among the organic solvents tested, isooctane was found to be the most suitable solvent for this purpose. The proportion of isooctane and phosphate buffer in the reaction mixture was best at the ratio of 1:4. Under this experimental condition, the reaction rate in a biphasic isooctane-aqueous buffer system was greatly enhanced compared to that in the organic-solvent-free system, and the percentage of hydrolysis reached about 40~65%.

#### 1. はじめに

油脂の加水分解による脂肪酸とグリセリンの連続的な工業生産法としては、高温・高圧下で行うColgate-Emery法が広く採用されている。しかしながら、この反応プロセスはエネルギー多消費型のプロセスであるため、常温・常圧で加水分解反応が進行する固定化酵素法が注目を浴び、すでにかんがりの研究が行われている<sup>1, 2)</sup>。ところで、工業的な原料油脂としては牛脂とパーム油がよく用いられるが、これらの油脂は油脂分解酵素リパーゼの反応至適温度において固体あるいは半固体状を呈している。このような固形油脂をそのまま反応系に投入し、固定化リパーゼと反応させても部分的に固体-固体間接触となるため、分解速度の向上は期待できない。したがって、分散を促進するための対策が必要と考えられている。

本研究では、適当な非極性有機溶媒を反応系に添加することで固形油脂を液状化し、効率の高い

---

\*生物化学工学科

分解を行わせる手法を確立したのでここに報告する。なお、本研究で用いた酵素の固定化担体としては、食品製造プロセスでの使用を考慮して生体親和性が高い天然高分子からなるキトサン多孔性ビーズを選択した。

## 2. 実験方法

1) 酵素および活性測定 *Pseudomonas sp.* 起源のリパーゼ粉末（天野製薬製：リパーゼ P）を使用した。リパーゼ活性単位の測定は、Yamaneら<sup>3)</sup>によるオリーブオイルエマルジョン法により行った。なお、本酵素の活性は36U/mg・powderであった。

2) 基質・試薬 牛脂およびオリーブ油は、いずれも油類薬品(株)から購入した。なお、これらの油脂のケン化価は、牛脂 195、オリーブ油 195であった。有機溶媒その他の薬品は特級品をそのまま使用した。

3) 固定化法 酵素を固定化するまえに、キトサンビーズ [キトパール：MDW-1010, BCW-2510, BCW-3010, BCW-3510（富士紡績社製）] を活性化した。すなわち、湿潤状態のキトパール1gあたりに1%グルタルアルデヒド溶液 4mlを加え、30℃の恒温槽中で 1時間振とうさせグルタルアルデヒド処理を行った。その後、1mlあたり 2mgの酵素濃度からなるリパーゼ溶液（0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.0）10ml中に活性化したキトパールを投入し、20℃の恒温槽中で 1時間30分振とうさせ、吸着・架橋反応を行った後固定化リパーゼを得た。なお、酵素タンパク量は Lowry法<sup>4)</sup>で定量した。

4) 牛脂の酵素分解法 反応容器は 4枚の邪魔板付きのセパラブルフラスコに標準型 6枚羽根を取り付けたものを使用した。反応液は0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.0）あるいは緩衝液と有機溶媒との混合液に、牛脂を全液量に対し20%（w/v）となるように加えて、総量が 200mlになるように調整した。添加した有機溶媒は、リパーゼ活性の安定化に効果の大きいイソオクタンを選択し、その割合は20%（v/v）とした<sup>5)</sup>。酵素濃度は、牛脂1gあたりに 25Uとし、それに相当するリパーゼ溶液 10ml（または、遊離酵素活性に相当する固定化リパーゼ量）を反応系に加えた。また、反応温度は 37℃とした。

上記の条件下で反応を行うとともに、経時的に反応液 3mlを採取し、これに 1:1ベンゼン-エタノール液12mlを加えて、反応を停止させた後、50℃の恒温槽中で 5分間振とうすることにより遊離脂肪酸を抽出した。この抽出液に対し0.1Nのアルコール性 KOH溶液によるアルカリ滴定を行い、得られた生成脂肪酸量から酸化価を求め、加水分解率を決定した。

## 3. 実験結果および考察

1) キトサンビーズへのリパーゼの固定化 Table 1 は各キトサンビーズにリパーゼを固定化した場合の活性、活性収率および各固定化担体の特徴を示したものである。この表から明らかのようにイオン結合と疎水結合の吸着モードを持つキトパールBCW-3010が最も優れた酵素用担体であることが本実験で確かめられた。

2) 担体粒子径の影響 粒子径の異なるキトサンビーズにリパーゼの固定化を行い、それらの活性を測定した。その結果を示したものが Table 2 である。本実験の場合、粒子径の小さい担体ほど活性および活性収率は高くでるが、これは基質の担体内への内部拡散の影響が現れているためであると推測される。

Table 1 Immobilization of lipase on various types of chitosan beads

Support (diameter 1mm)	Specific surface area ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Pore size (nm)	Adsorbed protein ( $\text{mg}/\text{g}^*$ )	Specific activity ( $\text{U}/\text{mg-prot.}$ )	Activity yield (%)	Activity ( $\text{U}/\text{g}^*$ )	Type of support
MDW-1010	15~100	100~300	0.45	67.3	9.7	30.3	Hydrophile
BCW-2510	110~130	50~250	0.16	92.5	10.9	14.8	Ionic bond mode
BCW-3010	120~150	50~250	0.27	170.4	26.2	46.0	Hydrophobic bond and ionic bond mode
BCW-3510	200~220	50~250	0.73	55.1	8.5	40.2	Hydrophobic bond mode

\* wet-weight

### 3) 固定化リパーゼのpHおよび温度依存性

pH 3.0~9.0 の範囲で遊離および固定化リパーゼの活性測定を行い、その結果を Figure 1 に示した。一般に酵素が固定化されることによって、基質に対する作用至適pHが若干移動することが報告されているが、本実験の場合、基質に対する至適pHの変化は、いずれの担体においても認められなかった。これらの傾向は小林らの報告<sup>6)</sup>と似ている。Figure 2 は遊離および固定化リパーゼの活性に対する温度依存性をpH 7.0の条件で調べたものである。固定化による耐熱性の向上は認められなかったが、至適温度が低温側にシフトするという傾向が見られた。とりわけ、キトパールBCW-3010に固定化したリパーゼの至適温度は遊離リパーゼのそれに比べて15°Cも低いという興味深い結果が得られた。この固定化リパーゼは低温域で作用するため、省エネルギー上有用な固定化酵素となり得るであろう。

4) 牛脂の酵素加水分解反応に及ぼす有機溶媒の影響 Figure 3 は有機溶媒無添加系で牛脂の酵素分解を検討したものである。この反応温度 (37°C) では、基質である牛脂は固体状を呈しており、反応系中の分散という点において非常に不利である。したがって、遊離および固定化リパーゼ、いずれの系においても牛脂の分解速度および分解率は変化せず、低い値のままであった。これ

Table 2 Effects of the size of chitosan beads on immobilization of lipase

Support	Diameter (mm)	Activity ( $\text{U}/\text{g}^*$ )	Activity yield (%)
MDW-1003	0.3	35.1	9.9
-1010	1.0	30.3	9.7
-1030	3.0	9.8	5.9
BCW-2503	0.3	23.5	10.6
-2510	1.0	14.8	10.9
-2530	3.0	10.2	7.9
BCW-3003	0.3	66.9	38.0
3010	1.0	46.0	26.2
3030	3.0	22.8	12.4
BCW-3503	0.3	47.4	9.5
-3510	1.0	40.2	8.5
-3530	3.0	23.5	5.9

\* wet-weight

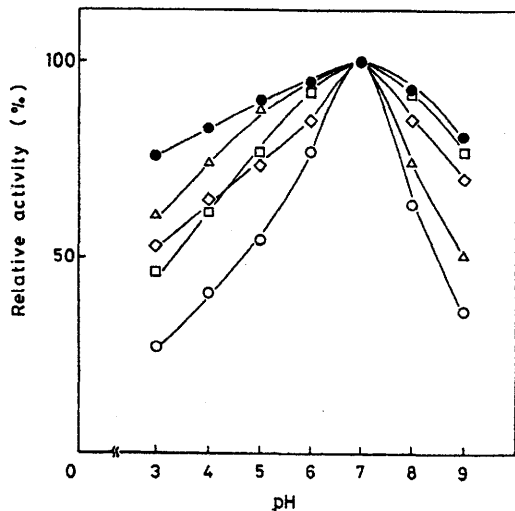


Fig. 1 Effects of pH on relative activities of soluble and immobilized lipase

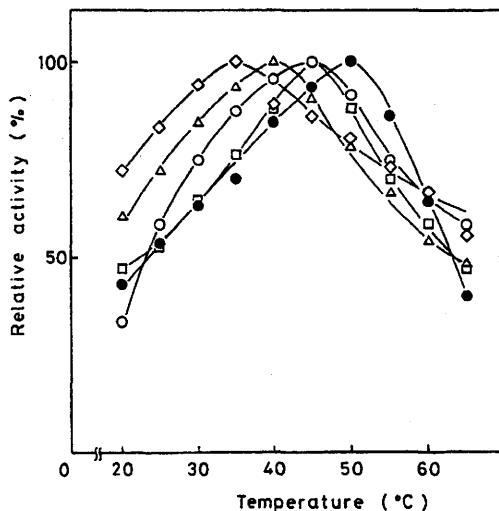


Fig. 2 Effects of temperature on relative activities of soluble and immobilized lipase

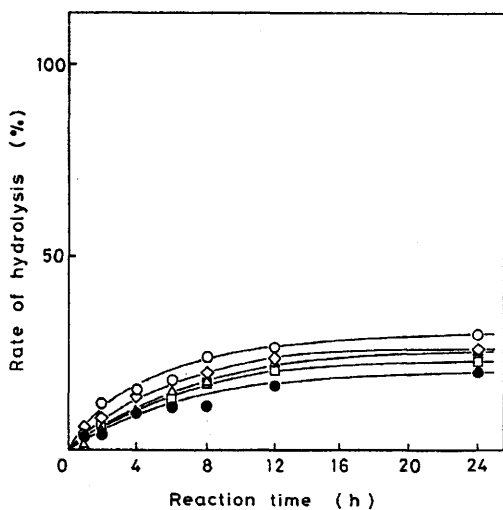


Fig. 3 Hydrolysis of beef tallow by soluble and immobilized lipase in an aqueous phosphate buffer system

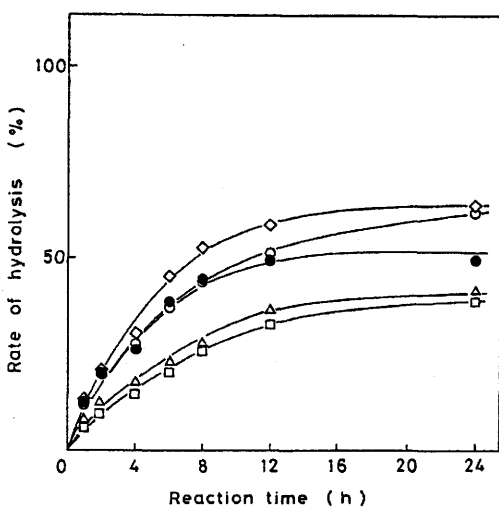


Fig. 4 Hydrolysis of beef tallow by soluble and immobilized lipase in a biphasic isooctane-aqueous phosphate buffer system

○ : MDW-1010  
 □ : BCW-2510  
 ◇ : BCW-3010  
 △ : BCW-3510

} Immobilized lipase

● : Soluble lipase

に対して、非極性有機溶媒であるイソオクタンを添加した系(有機溶媒:緩衝液=1:4)で牛脂の酵素分解を行い、有機溶媒の効果を検討した。その結果を示したものが Figure 4 である。この図が

ら明らかのように、有機溶媒添加系での分解経過は無添加系での反応に比べ、分解速度および分解率とも高い値が得られた。中でもイオン結合と疎水結合の吸着モードを持つキトパールBCW-3010に固定化したリパーゼの場合の結果が最も良かった。これは固定化により酵素が安定化されたため遊離の場合より良い結果が得られたものと推定される。いずれにしても、イソオクタン添加により20~30%であった分解率(24h後)が40~65%に向上したことは、酵素-基質間の接触頻度が有機溶媒によって高められたことを裏付けている。

#### 4. まとめ

遊離および固定化リパーゼ(固定化担体:キトサン多孔性ビーズ)による牛脂の加水分解反応に非極性有機溶媒(イソオクタン)を添加したところ、有機溶媒無添加系に比べて2倍程分解率が向上した。また、この反応系は反応生成物である脂肪酸とグリセリンがそれぞれ有機溶媒相と水相とに分配されるため、生産物の分離、回収という点においても有利な方法である。

#### 謝 辞

キトサン多孔性ビーズ(商品名 キトパール)およびリパーゼ(商品名 リパーゼ P)を供与していただいた富士紡績および天野製薬株式会社に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) S. Negishi, S. Sato, S. Mukataka and J. Takahashi, *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 350(1989)
- 2) F. F. Wang, Y. J. Wang, J. F. Shaw and R. C. Chang, *Biotech. Bioeng.*, **35**, 132(1990)
- 3) T. Yamane, T. Funada and S. Ishida, *J. Ferment. Technol.*, **60**, 517(1982)
- 4) H. O. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
- 5) S. Mukataka, T. Kobayashi and J. Takahashi, *Hakkokogaku*, **65**, 434(1987)
- 6) T. Kobayashi, I. Kato, K. Ohmiya and S. Shimizu, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 413(1980)

