

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5177143号

(P5177143)

(45) 発行日 平成25年4月3日(2013.4.3)

(24) 登録日 平成25年1月18日(2013.1.18)

(51) Int.Cl.		F 1
C 1 2 N	11/14	(2006.01)
C 1 2 N	11/02	(2006.01)
C 1 2 N	9/20	(2006.01)

C 1 2 N	11/14
C 1 2 N	11/02
C 1 2 N	9/20

請求項の数 5 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2009-525392 (P2009-525392)
(86) (22) 出願日	平成20年7月28日 (2008.7.28)
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/063509
(87) 国際公開番号	W02009/017087
(87) 国際公開日	平成21年2月5日 (2009.2.5)
審査請求日	平成23年7月7日 (2011.7.7)
(31) 優先権主張番号	特願2007-199240 (P2007-199240)
(32) 優先日	平成19年7月31日 (2007.7.31)
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)

(73) 特許権者	000236768
	不二製油株式会社
	大阪府大阪市中央区西心斎橋2丁目1番5号
(72) 発明者	岩岡 栄治
	大阪府泉佐野市住吉町1番地 不二製油株式会社 阪南事業所内
(72) 発明者	有島 俊治
	茨城県つくばみらい市絹の台4丁目3番地
	不二製油株式会社 つくば研究開発センター内

審査官 三原 健治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固定化リパーゼおよびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

油脂，高分子乳化剤およびリパーゼ活性を有する酵素を含む水中油型乳化物が担体に固定化された、固定化リパーゼ。

【請求項2】

高分子乳化剤が多糖類である、請求項1記載の固定化リパーゼ。

【請求項3】

高分子乳化剤が水溶性大豆多糖類である、請求項1記載の固定化リパーゼ。

【請求項4】

油脂，高分子乳化剤およびリパーゼ活性を有する酵素を含む水中油型乳化物を、担体に吸着させ乾燥させることを特徴とする、固定化リパーゼの製造方法。

【請求項5】

油脂，高分子乳化剤およびリパーゼ活性を有する酵素を含む水中油型乳化物を、担体に吸着させ乾燥させることを特徴とする、固定化リパーゼのエステル交換活性の向上方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、各種エステル化反応、エステル交換反応等に好適に使用できる、高活性な固定化リパーゼ及びその製造方法に関する。

【背景技術】

10

20

【 0 0 0 2 】

リパーゼを触媒として使用した油脂のエステル交換反応による油脂の改質が広く行われている。これら油脂のエステル交換反応には、バッチ方式、カラムによる連続方式等があるが、従来からリパーゼを何らかの担体に固定化した、固定化リパーゼとして用いられることが多かった。リパーゼの固定化には、例えばアニオン交換樹脂（特許文献1）、フェノールホルムアルデヒド吸着樹脂（特許文献2）、疎水性多孔質担体（特許文献3）、陽イオン交換樹脂（特許文献4）、キレート樹脂（特許文献5）等が行われてきたが、これらに記載の方法は、リパーゼを担体に固定することでエステルの交換活性が低下する欠点に加え、担体が高価なためにコストが高くなる傾向があった。また、固定化時の活性を高める方法として、乳化活性のないポリヒドロキシ化合物の添加（特許文献6）、脂肪酸誘導体を添加（特許文献7）が提案されているが、まだ充分ではない。

10

【特許文献1】特開昭60 98984号公報

【特許文献2】特開昭61 202688号公報

【特許文献3】特開平2 138986号公報

【特許文献4】特開平3 61485号公報

【特許文献5】特開平1 262795号公報

【特許文献6】特開平7 265073号公報

【特許文献7】特開昭62-134090号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【 0 0 0 3 】

本発明の目的は、従来よりエステルの交換活性が向上した、固定化リパーゼを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 4 】

本発明者らは、上記の課題に対して鋭意研究を重ねた結果、油脂、高分子乳化剤およびリパーゼ活性を有する酵素を含む水中油型乳化物を担体に固定化して得られる固定化リパーゼは、リパーゼのエステル交換活性が格段に向上するという知見を見出し、本発明を完成させた。

【 0 0 0 5 】

30

即ち、本発明は、

(1) 油脂、高分子乳化剤およびリパーゼ活性を有する酵素を含む水中油型乳化物が担体に固定化された、固定化リパーゼ。

(2) 高分子乳化剤が多糖類である、(1)記載の固定化リパーゼ。

(3) 高分子乳化剤が水溶性大豆多糖類である、(1)記載の固定化リパーゼ。

(4) 油脂、高分子乳化剤およびリパーゼ活性を有する酵素を含む水中油型乳化物を、担体に吸着させ乾燥させることを特徴とする、固定化リパーゼの製造方法。

(5) 油脂、高分子乳化剤およびリパーゼ活性を有する酵素を含む水中油型乳化物を、担体に吸着させ乾燥させることを特徴とする、固定化リパーゼのエステル交換活性の向上方法。

40

に関するものである。

【発明の効果】

【 0 0 0 6 】

本発明によれば、固定化リパーゼのエステル交換活性を向上させることができるため、単位酵素重量あたりのエステルの交換反応量を高めることができ、またエステルの交換油の生産性を向上させることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 0 7 】

以下、本発明を具体的に説明する。本発明で用いる高分子乳化剤とは、乳化能を有する高分子であり、天然高分子乳化剤が好ましく、動植物由来蛋白質や乳化性多糖類等が挙げ

50

られる。具体的には、動物性蛋白としては、各種動物由来の脱脂粉乳，全脂粉乳等の蛋白質素材、これら蛋白質素材を分画精製したカゼイン，乳アルブミン，ゼラチン等の蛋白質、並びにこれらの加水分解物等が挙げられる。植物性蛋白としては、大豆，エンドウ，小豆，ソラマメ等の各種豆類に由来する、分離蛋白質等の蛋白質素材や、これらを分画したグリシニン， β -コングリシニン，ファゼオリン等の蛋白質、並びにこれらの加水分解物等が挙げられる。乳化性多糖類としては、水溶性大豆多糖類，アラビアガム，各種加工澱粉等、乳化活性を持つ各種の多糖類が挙げられる。中でも乳化性多糖類を、特に水溶性大豆多糖類を乳化剤として使用すると、エステル交換活性が強く維持され好ましい。本発明は、上述した高分子乳化剤を必須成分とするが、これに低分子乳化剤を併用することも可能である。

10

【0008】

水中油型乳化物の調製に用いる油脂類としては、大豆油，ヤシ油，パーム油，パーム核油，なたね油，ひまわり油，ピーナッツ油，オリーブ油，コメ油，シア脂，サル脂，綿実油，カカオ脂，オリーブ油，ゴマ油，コムギ胚芽油，イリッペ脂，ベニバナ油，トウモロコシ油，乳脂，羊脂，山羊脂，馬脂，卵黄油，イワシ油，鯨油等の動植物油脂、またはこれらの分別品や水素添加品等を含めたトリグリセリド類、あるいは、脂肪酸の低級アルコールエステルやグリセリンモノ脂肪酸エステル、グリセリンジ脂肪酸エステル等、更にはこれらの組合せも、水中油型乳化物の油脂類として用いることができる。

【0009】

水中油型乳化物の調製において、高分子乳化剤の油脂に対する使用量は、安定な乳化が行なわれるのであれば特に限定しない。敢えて望ましい範囲を設定するのであれば、高分子乳化剤は油脂に対して0.1~50重量%混合することが好ましく、1~40重量%混合することがさらに好ましく、5~30重量%混合することが最も好ましい。高分子乳化剤と油脂の比がこの範囲内にあると、安定した水中油型乳化物となり、固定化後の高いエステル交換活性を与える。

20

【0010】

高分子乳化剤と油脂を含む混合液は、適当な乳化処理を施して水中油型乳化物とする。乳化にはホモキサー，ホモゲナイザー，ナノマイザー等を用いて適切な圧力を設定して行うことができるし、膜乳化や超音波を用いて乳化することもできる。使用する水中油型乳化物は、その平均粒子径を10 μ m以下にすることが好ましく、3 μ m以下にすることが更に好ましい。また、平均粒子径0.5 μ m未満への調製は工業生産上の効率が悪く、これ以上の粒子径での使用が一般的である。

30

【0011】

本発明で用いられるリパーゼとしては、細菌，酵母，糸状菌，放線菌等に由来する、広い起源のものが使用でき、限定されるものではないが、具体的には、リゾプス属 (*Rhizopus* sp.) アスペルギルス属 (*Aspergillus* sp.)、キャンディダ属 (*Candida* sp.)、ムコール属 (*Mucor* sp.)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes* sp.)、アスロバクター属 (*Arthrobacter* sp.)、スタフィロコッカス属 (*Staphylococcus* sp.) ペニシリウム属 (*Penicillium* sp.)、ジオトリカム属 (*Geotrichum* sp.) 等が挙げられる。また、豚臓リパーゼや米糠リパーゼ等動植物由来のものも使用することができる。これらリパーゼの粗酵素または精製酵素をリパーゼ活性を有する酵素として、先に調製した水中油型乳化物と混合する。あるいは、高分子乳化剤，油脂および該リパーゼを含む混合液を乳化処理し、水中油型乳化物を得ることもできる。尚、耐熱性の高いリパーゼを用いると、高融点の油脂からなる水中油型乳化物を使用できるために、油脂の酸化や加水分解に伴う風味劣化に対して耐性の高い固定化酵素を得ることができる。

40

【0012】

酵素と乳化物の混合比率は、酵素のリパーゼ活性に対する乳化物中の油脂成分の比として、種々の割合とすることができる。具体的には「JIS K0601 工業用リパーゼの活性度測定方法」に従って測定したリパーゼ活性 (Unit) に対する、乳化物中の油脂分量 (mg) の比が、0.06倍以上が好ましく、0.4倍以上が更に好ましい。また、10倍以下が好ましく

50

、3倍以下が更に好ましい。0.06倍未満であるとその効果が十分には発揮されない場合がある。また、10倍より多くなると調製される固定化リパーゼ単位重量あたりの活性が低下し、反応系に添加する固定化リパーゼの量が増加するため、反応系の肥大化や担体由来の水分量が増加し、副反応を招きやすくなる。酵素と乳化物の混合は、水中油型乳化物に液体の酵素を加えて均一化しても良いし、水中油型乳化物に固体若しくは粉末の酵素を加え溶解分散させても良い。あるいは、高分子乳化剤と油脂と酵素を含む混合液を乳化処理し、水中油型乳化物とすることも可能である。

【0013】

本発明に利用する担体としては、珪藻土、アルミナ、セライト、セルロース及びその他のセルロース誘導体、多孔性ガラス、ガラス繊維、ケイ酸ゲル、フロリジル、イオン交換樹脂、二酸化チタン、カオリナイト、パーライト等が例示されるが、リパーゼ分子を捉えておく機能があれば、その成分は特には捕らわれない。

10

【0014】

固定化リパーゼの調製は、上記に記載した各種リパーゼを含む水中油型乳化物を上記に記載した担体に接触させた後、乾燥させることで、リパーゼを担体に吸着させて行う。接触には、リパーゼを含む水中油型乳化物に担体を浸しても良いし、担体に対して同乳化物を噴霧しても良い。水中油型乳化物を担体に接触させる際、担体の吸収できる水分量であることが好ましい。吸収できる水分以上の接触を行うと、担体から水中油型乳化物が流れ出してしまうため所定の酵素量を担持させることができない。

【0015】

リパーゼを吸着させた担体は、種々の方法で乾燥することができる。具体的には、減圧による乾燥手段や、相対的に低湿度の空気、窒素、その他の不活性ガスと接触させる所謂通気乾燥等の方法が挙げられる。

20

中でも、リパーゼを吸収させた担体を、好ましくはその温度に於ける水の蒸気圧より低い圧力環境に保持する、減圧乾燥が好ましい。

【0016】

この様に調製された固定化リパーゼは、高いエステル交換活性を有しているために、油脂の改質等に好適に用いることができる。その形態は、パッチ方式やカラムを用いた連続方式等、種々の方法に用いることができる。

【実施例】

30

【0017】

以下に実施例を記載するが、この発明の技術思想がこれらの例示によって限定されるものではない。

【0018】

(実施例1)

水60gに水溶性大豆多糖類8gを分散溶解させ、これに精製パーム油32gを加え、ホモミキサ―(特殊機化工業社製)で予備乳化し、卓上高圧ホモゲナイザー(Ranni社製)にて150kg/cm²にて2回通液し乳化させ、水中油型乳化物Aを調製した。得られた乳化物の平均粒子径は1.8μmであった。天野製薬製市販リパーゼ粉末(ペニシリウム起源、加水分解活性1,000unit/g)7gを冷水10gに分散させ、さらにこの分散物に水中油型乳化物Aを35g混合したものを、珪藻土50gに散布し水和物を得た。この珪藻土を凍結乾燥し、水分3重量%の固定化リパーゼ1を得た。

40

【0019】

パーム中融点画分とパーム低融点画分を6:4に配合した基質(基質水分<0.1%)100gに、10gの固定化リパーゼ1を加え、60にて作用させエステル交換活性を求めた。反応生成物の評価については、ガスクロマトグラフィー(GC)にてトリパルミチン含量組成を測定し、下記に示す式で反応率を求めた。

反応率 = (反応生成物のトリパルミチン含量 原料油脂のトリパルミチン含量) / (反応平衡組成物のトリパルミチン含量 原料油脂のトリパルミチン含量)

50

次いで、下式より初期反応速度定数 k を求めた。

$$\text{初期反応速度定数 } k = \ln [1 / (1 - \text{反応24時間後の反応率})]$$

この反応速度定数 k と、原料油脂に対するリパーゼ（固定化リパーゼに含まれるリパーゼ活性を有する酵素製剤量）添加量から、下記に示す式で算出した値をエステル交換活性値とし、表 1 に記載した。

$$\text{エステル交換活性値} = k \times (\text{原料油脂量} / \text{リパーゼ活性を有する酵素製剤量}) \quad 10$$

【 0 0 2 0 】

（実施例 2）

天野製薬製市販リパーゼ粉末（同上）7g及びグルコース7gを冷水10gに分散させ、さらにこの分散物に水中油型乳化物Aを17.5g混合し、さらに珪藻土50gを分散させ水和物を得た。その後は実施例1と同様に固定化リパーゼの調製と評価を行った。

【 0 0 2 1 】

（実施例 3）

グルコースを13.3g、水中油型乳化物Aの添加量を1.75gとした以外は、実施例2と同様に固定化リパーゼの調製と評価を行った。

【 0 0 2 2 】

20

（実施例 4）

グルコースを13.7g、水中油型乳化物Aの添加量を0.88gとした以外は、実施例2と同様に固定化リパーゼの調製と評価を行った。

【 0 0 2 3 】

（実施例 5）

実施例1における乳化物の調製を、卓上高圧ホモゲナイザーによる処理圧力を50kg/cm²とし、水中油型乳化物Bを調製した。得られた乳化物の平均粒子径は4.8μmであった。この水中油型乳化物Bを用いた以外は、実施例1と同様に固定化リパーゼの調製と評価を行った。

【 0 0 2 4 】

30

（実施例 6）

実施例1における乳化物の調製を、水溶性大豆多糖類の代わりにアラビアガムを用いて行い、水中油型乳化物Cを調製した。得られた乳化物の平均粒子径は2μmであった。この水中油型乳化物Cを用いた以外は、実施例1と同様に固定化リパーゼの調製と評価を行った。

【 0 0 2 5 】

（実施例 7）

実施例1における乳化物の調製を、水溶性大豆多糖類の代わりに市販カゼインナトリウム（DMV社製EMLV）を用いて行い、水中油型乳化物Dを調製した。得られた乳化物の平均粒子径は2.2μmであった。この水中油型乳化物Dを用いた以外は、実施例1と同様に固定化リパーゼの調製と評価を行った。

40

【 0 0 2 6 】

（実施例 8）

実施例1における乳化物の調製を、水溶性大豆多糖類の代わりに分離大豆蛋白質（フジプロR：不二製油（株）製）を用いて行い、水中油型乳化物Eを調製した。得られた乳化物の平均粒子径は3.5μmであった。この水中油型乳化物Eを用いた以外は、実施例1と同様に固定化リパーゼの調製と評価を行った。

【 0 0 2 7 】

（比較例 1）

実施例1における乳化物の調製を、水溶性大豆多糖類の代わりに市販シヨ糖脂肪酸エステ

50

ル（DK-SS：第一工業製薬製）を用いて行い、水中油型乳化物Fを調製した。得られた乳化物の粒子径は2.4 μ mであった。この水中油型乳化物Fを用いた以外は、実施例1と同様に固定化リパーゼの調製と評価を行った。

【0028】

（比較例2～4）

比較例1に於て、シヨ糖脂肪酸エステル（DK-SS）の代わりに、シヨ糖脂肪酸エステル（DK-F-160：第一工業製薬製／比較例2）、ポリグリセリン脂肪酸エステル（サンソフトQ14S：太陽化学製／比較例3）、ポリグリセリン脂肪酸エステル（サンソフトQ12S：太陽化学製／比較例4）を、それぞれ用い評価した。

【0029】

（比較例5）

実施例1において、水中油型乳化物A 35gの代わりに、グルコース14g及び水21gを用いて使用した以外は実施例1と同様に固定化リパーゼの調製と評価を行なった。

【0030】

（表1）反応24時間後の反応率及びエステル交換活性

	組成					酵素活性		
	油脂 (g)	乳化剤 (g)	グルコース (g)	油脂 (g)	酵素 (Unit)	油脂 (mg) / 酵素Units	反応率 (%)	エス交換活性
実施例1	11.2	2.8	—	7.0	7,000	1.6	80	161
実施例2	5.6	1.4	7.0	↑	↑	0.80	75	139
実施例3	0.56	0.14	13.3	↑	↑	0.08	45	60.0
実施例4	0.28	0.07	13.7	↑	↑	0.04	28	33.0

【0031】

（表2）反応24時間後の反応率及びエステル交換活性

	乳化剤	組成					乳化物状態		酵素活性		
		油脂 (g)	乳化剤 (g)	グルコース (g)	油脂 (g)	酵素 (Unit)	油脂 (mg) / 酵素Units	ホモ圧 (kgf)	乳化粒子径 (μ m)	反応率 (%)	エス交換活性
実施例1	水溶性大豆多糖類	11.2	2.8	—	7.0	7,000	1.6	150	1.8	80	161
実施例5	↑	↑	↑	—	↑	↑	↑	50	4.8	70	120
実施例6	アラビアガム	↑	↑	—	↑	↑	↑	150	2.0	72	127
実施例7	カゼインNa	↑	↑	—	↑	↑	↑	↑	2.2	58	86.8
実施例8	大豆蛋白質	↑	↑	—	↑	↑	↑	↑	3.5	63	99.4
比較例1	シヨ糖エステル	↑	↑	—	↑	↑	↑	↑	2.4	45	59.8
比較例2	シヨ糖エステル	↑	↑	—	↑	↑	↑	↑	1.6	41	52.8
比較例3	ポリグリセリンエステル	↑	↑	—	↑	↑	↑	↑	2.2	42	54.5
比較例4	ポリグリセリンエステル	↑	↑	—	↑	↑	↑	↑	3.7	39	49.4
比較例5	—	—	—	14	↑	↑	—	—	—	15	19.8

【0032】

上記表1に示す結果より、乳化物の固形分（mg）をリパーゼ活性（Unit）に対して0.05倍以上添加するとエステル交換活性が上昇し、0.1倍以上の添加では、無添加品（比較例2）に比べて格段にエステル交換活性を高めることができる事が判った。用いる乳化剤は乳化性を持つ多糖類が特に良好だった。また、添加する水中油型乳化物の平均粒子径は4 μ mよりも大きくなると効果が低下する（実施例5）傾向が認められた。

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2004/035773(WO,A1)
特開平03-130079(JP,A)
J.Mol.Catal.B:Enzymatic,2005,Vol.35,No.4-6,p.93-99

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 11/00-11/18
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
G-Search
BIOSIS/WPI(DIALOG)