総 説

バイオリアクタープロセスによる油脂の改質

西元 次雄・和泉 次夫・久保田隼人

不二製油（株）阪南工場研究所

（〒598 大阪府泉佐野市住吉町1）

The Modification of Fats and Oils by Bioreactor Process

Tsugio NISHIMOTO, Tsugio IZUMI, and Hayato KUBOTA

(1, Sumiyoshicho, Izumisano-shi, Osaka-fu, 〒598)

It is well known that lipase catalyzes not only the hydrolysis of fats and oils but also the interesterification and the ester-synthesis. Recently, a number of bioreactor system using the lipase has been investigated in the food processing field. In the field of fats and oils for food purpose, the interesterification process using lipase, especially 1,3 positional-specific lipase, has been developed as a newly established technology. It has become possible to manufacture the following products by using bioreactor process in industrial scale.

- 1) Cocoa butter equivalent, hard butters
- 2) BOB (1,3-Dibehenoyl-2-oleoylglycerol) fat-powder in a stable crystal form having special functions such as seeding effect and anti-blooming
- 3) Plastic fats for margarine and shortening processed from palm oils.

In this paper, some applications of bioreactor process under anhydrous condition are introduced.

はじめに

バイオテクノロジーは80年代のバイオブームで数多くの研究開発による有望製品の可能性を追求した第一世代から、実用化に向けて経済性を加味した工業化、すなわち成果の収穫の第二世代に入っている。食品産業においても食品加工の一手段としてバイオリアクターの開発、応用研究が広範に行われているが、その有用性、特異性にかかわらず実用化のためにクリアすべき問題点が多く、工業化に成功している例は意外と少ない。アミノ酸のD, Lラセミ体の光学分割、デンプンからのグルコースとフラクトースへ変換する反応による異性化糖の生産等がそれになる。油脂加工分野ではリパーゼを利用してカカオ脂様油脂、ハードバターの生産を中心としたバイオリアクタープロセスの工業化が可能となっている。生体触媒である酵素、リパーゼの特徴は、常温、常圧、中性付近という温和な条件下で極めて高い触媒機能を発揮すること、さらに特定の基質を捕らえて反応するという基質特異性にある。リパーゼは本来は生体内での脂質代謝に寄与する油脂の加水分解酵素であるが、反応系中の水分を減少すればその逆反応であるエステル合成

やエステル交換反応も触媒する¹⁾。そのため、リパーゼの応用範囲は極めて広く、オレオケミカルから食品加工分野まで工業化に向けて様々なバイオリアクタープロセスが追求されている²⁾。ここでは油脂の改質の観点から、リパーゼによるエステル交換反応の応用例を幾つか紹介する。

1 リパーゼによる油脂のエステル交換反応

油脂の物性はその主成分である、グリセリン1分子に3分子の脂肪酸がエステル結合したトリアシルグリセリンの構成による。すなわち、結合している脂肪酸の鎖長、不飽和度、組み合わせ、結合位置等により、大豆油やなたね油のように常温で液状を呈したり、パーム油や牛脂、カカオ脂のように常温で固まる性質が決定される。油脂をマーガリン、チョコレート、フライ油等の用途に適合するための加工法としては、従来から水素添加反応による不飽和脂肪酸の飽和化（硬化）や有機溶媒等を介してトリアシルグリセリン画分を分画する分別、エステル交換などが用いられて来た³⁾。しかし、硬化や分別では原料油脂の脂肪酸組成、トリアシルグリセリン組成で加工品質は限定され、ナトリウムメトキシドや水酸

化ナトリウムを用いる通常のエステル交換ではランダム反応であり脂肪酸の結合位置の選択はできない。

近年になって、リパーゼの反応機構や特異性に関する研究が進み、反応条件、基質、酵素の種類を適宜選択することにより、図-1のようにリパーゼを利用したエステル合成やエステル交換¹⁾が新しい油脂加工技術として注目されるようになって来た。中でも、位置特異性¹⁾を利用した酵素エステル交換反応が天然油脂の高付加価値化、高機能の付与を目指した改質技術として注目を集めている。

リパーゼの位置特異性は二つに大別される。表-1⁵⁾のようにアシルグリセリンの1位、3位だけに作用する1,3特異性酵素とすべての位置に作用する非特異性酵素で、その位置特異性は加水分解反応及びその逆反応の合成でも変わらないことが確認されている⁶⁾。特に、1,3特異性リパーゼでは原料トリアシルグリセリンの2位の脂肪酸を固定したまま、1,3位の脂肪酸を目的の脂肪酸に変換することができ、従来の金属エステル交換反応では

得られない改質油脂を得ることが可能である。図-2に1,3位特異性リパーゼによるエステル交換反応を示す。

2位の脂肪酸が不変で、1,3位脂肪酸だけがその存在するモル比に従いランダムに配位される。図-3³⁾に示すように2位が固定されることにより生成トリアシルグリセリン分子種が大幅に限定される結果、所望の分子種を高収率で得ることができる。

リパーゼの基質特異性には位置特異性の他に脂肪酸特異性^{7),8)}、アシルグリセリン特異性⁹⁾等があるが、その応用については後述する。

2 酵素エステル交換と水分の関係

リパーゼは油脂の加水分解とその逆の合成反応を触媒するが、反応を規定するのは反応系の水分である¹⁰⁾。表-2に水分濃度とリパーゼの応用を示す¹¹⁾が、エステル交換反応に関しては必ずしも水分で規定できない。

コールマンらは、水のない系、乾燥系ではエステル交換反応は起こらず、酵素活性を発現させるため一定レベ

1. 加水分解

2. エステル合成

3. トランスエステル交換

3. 1 アシドリシス

3. 2 アルコリス (グリセロリス)

3. 3 エステル交換

R · H : 脂肪酸

図-1 リパーゼの触媒する反応

表-1 各種微生物起源リパーゼの位置特異性

1,3 位特異酵素	非特異性酵素
○ <i>Rhizopus delmar</i>	○ <i>Candida cylindracea</i>
○ <i>Rhizopus arrhizus</i>	○ <i>Chromobacterium viscosum</i>
<i>Rhizopus chinensis</i>	<i>Corynebacterium acnes</i>
<i>Rhizopus javanicus</i>	○ <i>Geotrichum candidum</i>
○ <i>Rhizopus niveus</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
○ <i>Mucor miehei</i>	○ <i>Pseudomonas fluorescens</i>
○ <i>Aspergillus niger</i>	○ <i>Penicillium cyclopium</i>
<i>Humicola lanuginosa</i> No. 3	<i>Penicillium roqueforti</i>
<i>Leptospirae pomana</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

○印：工業生産されているもの
 岩井三枝子，油脂，42 (10)，72 (1989)

1. トリアシルグリセリン間の反応

2. トリアシルグリセリンと脂肪酸の反応

図-2 1, 3 特異性リパーゼによるエステル交換

ルの水分が必要と述べている^{12), 13)}。しかし，沢村らはエステル交換活性が発現するよう酵素製剤を調製すると実質的に無水系と言える金属エステル交換反応レベルの乾燥系でもエステル交換反応が起こることを確認している^{14), 15)}。この乾燥系での反応では加水分解によるジアシルグリセリン，モノアシルグリセリンの生成がほとんどなく極めて有利な反応である。しかし，図-4のようにエステル交換活性は水分によって左右されるため，部分アシルグリセリンの生成を特に抑える必要がない場合は，活性が高まるように水分を添加する反応系が選ばれることもある。

3 エステル交換バイオリアクター

酵素エステル交換のバイオリアクターを工業化する際の重要な因子は酵素の固定化，反応器の形式，反応系の水分のコントロールである¹⁶⁾。

リパーゼの固定化については総説がある²⁾が，担体の選択では機械的強度，微生物による汚染耐性，熱安定性，耐薬品性，再生の容易さ，固定化容量，コスト等が重要な要素である。固定化法については化学的方法と物理的方法があり¹⁷⁾，前者では共有結合形成による担体への結合や橋かけ構造の形成，後者では不溶性ゲルやマイ

クロカプセルへの包括法，担体への吸着法，イオン交換法等が提案されている。図-5にけいそう土を用いた吸着法による固定化の例を示す¹⁴⁾。有機溶媒中や油脂中で酵素が活性を発現するには一定量の水分が必要なこと，酵素活性を最大にする最適水分量が存在することが指摘されている¹⁸⁾。しかし，酵素の起源が異なると活性の発現率が異なること¹⁹⁾や活性が出るよう調製した酵素製剤では乾燥系でも活性を示すことから，水分量だけでは活性を規定できない。沢村らはエステル交換の程度，リパーゼのエステル交換活性，その活性の低下度等の解析を次のように行っている²⁰⁾。

エステル交換反応は，反応に関与 (1,3 特異性エステル交換では1,3 位の脂肪酸) する脂肪酸間の平衡反応であるから，その活性はエステル交換反応速度定数で表せる。エステル交換反応率 (X) は，反応系のトリアシルグリセリン又は特定の脂肪酸に着目し，反応前の含量 (S_0)，完全に反応し平衡に達した時の含量 (S_∞) と反応時間 (t) 時点の含量 (S_t) の関数式 (I) により求められる。

$$X = S_t - S_0 / S_\infty - S_0 \quad (I)$$

エステル交換活性 (K_t) はエステル交換反応率 (X) と反応時間 (t) 及びこの反応に用いた基質の量 (S) とり

1. ランダムエステル交換

2. 1, 3位特異性エステル交換

図-3 ランダムエステル交換と1, 3位特異性エステル交換による生成物の違い

表-2 水分濃度とリパーゼの応用

水分濃度	反応相	リパーゼの応用
% 100	不均相	◎油脂の除去
10		◎多段分散膜バイオリアクター (船田ら)
1		—油脂の加水分解—
ppm 1000		◎微水系バイオリアクター (山根ら)
ppm 100	均相	—モノアシルグリセリン生産—
ppm 10		◎エステル交換パイオプロセス —カカオ脂代用脂生産— (Coleman & Macrae)
ppm 1		(松尾ら)
		(田中ら)
	超微水系	◎超微水系バイオリアクター
		—低アシルグリセリンパーム油の生産—

J. Kurashige, N. Matsuzaki, K. Makabe, *J. Dispersion Science and Technology*, 10 (4 & 5), 531-559 (1989)

パーゼの量 (E) より式 (Ⅱ) で求めることができる。

$$K_t = \frac{1}{t} \left(1 \ln \frac{1}{1-X} \right) \times \frac{S}{E} \quad \text{(Ⅱ)}$$

エステル交換活性 (K_t) は、経時的に低下して行くと

め (K_t) をプロットし、初期活性 (K_0) や活性半減期、経時的な (K_t) の変化を積分した総力化 (ΣK) をそれぞれ数値化してリパーゼの選択、活性化、エステル交換反応の制御を行っている。乾燥系で酵素活性を発現さ

図-4 エステル交換活性とジアシルグリセリン生成

市販 1, 3 位特異性リパーゼ (300 g)

冷水溶解 (1200 gの水)

けいそう土 750 g 添加

ゆるやかにかくはん

減圧乾燥

固定化酵素製剤

図-6 充填塔型リアクター（乾燥系）フロー

図-5 けいそう土へのリパーゼ固定化例

せ、それを最大に高めるにはリパーゼ水溶液をけいそう土と混合した後、充分緩慢に乾燥する必要がある。表-3 にリゾース属リパーゼ固定化の際の乾燥条件と活性の関係を示した。

反応器の形式については¹⁶⁾、その目的が加水分解かエステル交換かにより、反応系は水系又はエマルジョン系あるいは非水系かに分けられる。リアクターシステムにはバッチ式、半連続式、連続式があり、工業化という意味では当然連続式が有利になる²¹⁾。バイオリアクターについては総説^{21), 16), 22)}があるが、加水分解でかくはん槽型、充填層型、膜型リアクターが、エステル交換で充填層型、超臨界ガスバイオリアクター等が発表されている。図-6 に非水系連続式充填塔型エステル交換リアクターフローを示した。

反応系の水分コントロールは特にエステル交換反応に重要である。プレカラムを用いて基質を水和させた後、固定化酵素カラムを通液する方式²³⁾、乾燥系でエステル交換活性が出るように調製した酵素製剤充填カラムに乾燥基質を通液する方式²⁴⁾、窒素気流中で反応系の水分を蒸発させながら反応制御する方式²⁵⁾等がある。

4 エステル交換バイオリアクターによる油脂の改質

1) カカオ脂様油脂、ハードバターの生産

チョコレートは砂糖、ココア分、粉乳、油脂等が主成分であるが、チョコレート特有の常温でパキッと割れる硬性質、口中で速やかに冷感を伴って溶解する性質等は主に油脂の物理的性質による。チョコレート用油脂の代表がカカオ脂であり、その独特の物理的特性はそのトリアシルグリセリンの主成分が POS, SOS, POP (P: パルミチン酸, O: オレイン酸, S: ステアリン酸) の 1,3 飽和-2-オレオイルグリセリン、いわゆる対称型トリアシルグリセリンであることに由来する。ハードバターは、カカオ脂が高価な天然品でしかも気候変動等で供給、品質が安定化しないことに着目して開発されたものである。ハードバターは各種の対称トリアシルグリセリンより任意に構成することができるので、ソフト型からカカオ脂同等の標準型、耐熱型の製造が可能である。また、耐熱保型性、耐ブルーム性等のカカオ脂の持つ欠点を補う機能もある(表-4)。従来、このようなハード

表-3 酵素製剤乾燥条件とエステル交換活性

酵 素 剤	脂質分解活性	初期エステル交換活性 (KO)
市販酵素そのまま	4500	0
減圧 (6 Torr), 4 h 乾燥品	1240 (97.3 %)	3.2
減圧 (8 Torr), 20 h 乾燥品	1210 (94.1 %)	12.7
減圧 (15 Torr), 4 d 乾燥品	1150 (89.4 %)	28.5

市販酵素：リゾーブス層 1,3 位特異性リパーゼ

脂質分解活性の () 内は付加した担体の部分を除外して換算した残存率

表-4 カカオ脂とハードバターの比較

品 名	対称トリアシルグリセリン組成 (%)			耐熱性	口溶け
	POP	POS	SOS		
カカオ脂 (IVORY)	15	37	26	○	○
ハードバター 耐熱型	23	12	40	◎	△
標準型	34	13	32	○	○
ソフト型	36	12	25	△	◎

表-5 ハードバターの代表的原料油脂

原料油脂	主 な 産 地	収穫量 (t/年)	組 成		
			POP	POS	SOS
シア脂	西アフリカ	5,000~50,000	tr	7	31
イリッペ脂	マレーシア, インドネシア	0~15,000	8	36	40
サル脂	インド	2,000~23,000	1	10	54
コクム脂	インド	200~600	tr	4	76
パーム油	マレーシア, インドネシア	8,000,000	26	3	tr

バターは表-5²⁷⁾のような熱帯地方で産する天然油脂から有機溶媒を用いて分別し、SOS, POP 成分を分離、濃縮して製造されて来た。しかし、これらの原料油脂も収穫量に大きな変動があり、価格、品質面で不安定であり、供給安定な原料を用いて高品質なハードバターを目指したエステル交換バイオリアクターの開発が進められた^{13), 28)}。

1,3 特異性リパーゼによるエステル交換で POS, SOS を製造するには主に次の3方式がある。

S: ステアリン酸, O: オレイン酸, P: パルミチン酸

それぞれの方式によるハードバターの製造フローを、

図-7 に示す。パーム中融点部を用いる (1) 法ではカカオ脂の主成分である POS, SOS, POP を含むカカオ脂近似の組成 (表-6) になるが、脂肪酸の分留によるパルミチン酸の排出が必要であった。(3) 法でも同様にカカオ脂近似となるが、分別によりハードバターに望ましくない3飽和トリアシルグリセリンを充分除去する必要がある。(2) 法では目的成分は SOS になるが、反応後の脂肪酸は硬化して原料として再使用でき、さらに SOO, OOO 主成分の分別低融点画分もオレック油脂に混合して利用できるため無駄がなかった。この (3) 法で得られた SOS 画分とパーム中融点部から得られた代表的なハードバターの SFI (固体脂指数, 図-8) はカカオ脂と極めて近似しており、耐熱保型性、口溶け、スナップ性等のチョコレート性状においてもほぼ同等で優れたハードバターであった。近年、原料のオレック油脂の品質改良が進みオレイン酸含量 80 % 以上のハイオレックサフラワー、ひまわり、なたね油等が開発されており、高品質で安定供給可能な酵素エステル交換法によるハードバターが今後主流になると思われる。

2) 安定結晶粉末油脂 BOB の生産

図-7 ハードバター製造フロー

表-6 カカオ脂とエステル交換ハードバターの組成

	ジアシルグリセリン含量 (%)	対称トリアシルグリセリン含量 (%)		
		POP	POS	SOS
パーム中融点部	3.5	67.8	14.2	1.9
エステル交換ハードバター	3.3	14.5	38.3	26.1
カカオ脂	2.3	14.6	38.2	25.7

図-8 カカオ脂とハードバターの SFI

対称トリアシルグリセリンには重要な特性として結晶多形 (Polymorphism) 現象がある²⁸⁾。すなわち、同一の化学組成でありながら固め方、熱履歴により複数の結晶構造を示す。カカオ脂では6種類の多形が分類されているが安定な結晶形はV型、VI型で正常なチョコレートはV型で固化している。チョコレート生産に際し、テンパリングという熱処理、すなわち溶解状態のチョコレート生地を一度 25~26℃ に冷却後、30℃ 位まで再加熱する操作を行うが、これは冷却によりⅢ、Ⅳ型の不安定結晶を生成させ再加熱により不安定結晶を融解し同時に安定なV型へ転移させるためである²⁹⁾。この操作後、チョコレートを冷却、成形すると艶が良好で組織も密な製品となる。

このテンパリングに代えて、シーディング法が蜂屋らによって詳細に検討され、粉末油脂結晶の効果と機能が明らかにされた^{30), 31)}。すなわち、SOS, BOB (S: ステアリン酸, O: オレイン酸, B: ベヘン酸) のような対称型トリアシルグリセリンの安定結晶粉末を少量チョコレート生地に添加混合することにより、テンパリングが

達成されテンパリング工程が大幅に簡略化できる。このシーディング機能は 3 飽和トリアシルグリセリン (SSS) や BOB の不安定結晶, SSO, BBO のような非対称型トリアシルグリセリンでは観察されなかったことから, 安定結晶でしかも対称型トリアシルグリセリンであることが必須である。従い, この BOB の生産にも 1,3 特異性リパーゼによるバイオリクターを利用することができる。

図-9 にその製造フローを示す。分別低融点部はオレック油脂にリサイクルされる。凍結粉碎工程は, 粉末油脂結晶径が $25\mu\text{m}$ 以下でないといとチョコレートの滑らかさを損ねると, 次に述べる耐ブルーム性改善効果を充分発揮させるために必要であった。

シーディング効果は粉末油脂結晶の融解によって左右され, 完全融解するとシーディング機能は消失する。BOB 結晶の融点は約 53°C であり油脂への溶解度以上の量の BOB 粉末をチョコレートに添加すればテンパリングの完了と同時にチョコレートの融解自動復帰能 (図-10) という機能が得られ, $35\sim 38^\circ\text{C}$ という高温域でのブルーム耐性が得られた。すなわち, 通常テンパリングでは, カカオ脂が 35°C 以上で融解し, それが自然冷却されるとテンパリングなしに成形した形となり, 速やかにブルーム発現する。これに対し, BOB 粉末シーディングチョコレートではカカオ脂が融解しても BOB 安定結晶は残存するため, 自然冷却の際シードテンパリングされ正常状態に復帰する。

BOB 結晶粉末は以上のシーディング機能を保持する画期的な油脂素材と言える。

3) 可塑性に優れた油脂の生産

マーガリン, ショートニングのような可塑性, 展延性が要求される製品の油脂は, 通常高融点脂, 中融点脂, 液体油の組み合わせで構成されている。近年, 増産が進み供給が安定し, 価格のメリットもあるパーム油をその中融点脂として使用する各種試みがされて来た。パーム油中には POP 成分に由来する結晶粗大化現象があり, 使用量はかなり制約されてきた。この結晶性改質のため, パーム油とラウリン系油脂を金属エステル交換する方法がある³²⁾。この方法ではパーム油の対称型構造をラ

図-10 BOB 安定結晶粉末のシーディング機能

ンダムな構造に変えるため, パーム油特有の経時的に硬化する性質は改善される。しかし, この方法では 3 飽和トリアシルグリセリンの増大による融点上昇から製品の口溶けが悪化し, また反応中に酸価の上昇, 着色現象があり, 製品歩止まりのロス, 煩雑な精製工程が必要等の欠点があった。

パーム系油脂とラウリン系油脂の 1,3 特異性リパーゼによるエステル交換法では, 上記の問題がなく, 温度上昇による液油のシミ出しがなく, 口溶け良好で経時的な組織の変化のない優れた可塑性油脂が得られることを見いだした。表-7 に金属エステル交換と 1,3 特異性酵素エステル交換による可塑性油脂の相違点を示す。

このようなバイオリクターでの改質が定着すれば, さらにパーム油の可塑性油脂への利用度は拡大するものと思われる。

4) リパーゼのアシルグリセリン特異性を利用した油脂改質

パーム油等には主成分のトリアシルグリセリンの他に, 結晶性, 熱安定性に悪影響を与えるジアシルグリセリンが多量に存在する。これらの欠点を改良するため, 部分アシルグリセリン特異性のあるペニシリウム属等のリパーゼを用いて, 超微水系でジアシルグリセリンをトリアシルグリセリンに変換するバイオリクターが開発されている^{11), 33)}。連続運転での評価, 経済性が工業化に向けてかぎとなるとと思われる。

図-9 BOB 安定結晶粉末製造フロー

表-7 金属エステル交換と酵素エステル交換による可塑性油脂の相違点

		金属エステル交換	酵素エステル交換
反 応	触 媒 反応方式 反応後処理 歩止まり	ナトリウムメチラート等 バッチ式 リン酸洗浄及び水洗 約 97 %	1,3 特異性リパーゼ 連続カラム方式 不 要 ほぼ 100 %
	製品品質 脱色性 口溶け しみ出し耐性 結晶性	悪 い やや悪い やや悪い 経時的しまり現象あり	良 好 良 好 良 好 経時変化ほとんどなし

5) 脂肪酸特異性を利用した油脂の改質

EPA (イコサペンタエン酸), DHA (ドコサヘキサエン酸)の脳血栓、動脈硬化等の循環器疾患予防のような生理機能に着目して魚油から EPA, DHA を濃縮したトリアシルグリセリン製造が試みられている³⁴⁾。EPA, DHA がオレイン酸、ステアリン酸に比べ極めて加水分解されにくい特異性を利用して、ランダム特異性酵素による分解で EPA, DHA 含有アシルグリセリンを濃縮し、次にエステル交換により改質魚油を得る方法である。

おわりに

リパーゼの持つエステル交換、エステル合成機能及び特異な基質特異性が明らかになったことにより、一部では既に工業化され、バイオプロセスは油脂の改質技術として広く定着してきた。今後の課題は、目標とする最終製品の付加価値、市場性、機能を充分認識したうえで、バイオリクターの設備費、生産コスト等の経済性の壁をどう乗り越えるかである。付加価値の高い分野では、トリアシルグリセリンの2位に必須脂肪酸、1,3位に中鎖トリアシルグリセリン由来の中鎖脂肪酸を配した易吸収性の栄養生理機能油脂³⁵⁾、前述の改質魚油等がその好例となる。また、生産コストからは酵素活性、寿命、耐熱性のアップが課題となるが、酵素の本態の研究、遺伝子工学的酵素の改質等により、高活性酵素、低コスト酵素の実現が期待される。

[平成4年(1992年)4月6日受理]

文 献

- 山根恒夫, 農化, 62, 783 (1988)
- F. Xavier Malcata, Hector R. Reyes, Hugo S. Garciaschales G. Hill, Jr., Clyde H. Amundson, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67, 890 (1990)
- 柳原昌一, “食用加工油脂の知識”, 幸書房 (1984)
- S. Yamada, “Methods in Enzymology”, (1987)
- 岩井三枝子, 油脂, 42 (10), 72 (1989)
- C.J. Fielding, *J. Biol. Chem.*, 256, 876 (1981)
- A.R. Macrae, *Microbial Enzymes and Biotechnology*, (1983)
- R. Jensen, *Lipids*, 9, 149 (1974)
- T. Mase, S. Yamaguchi, in Abstracts of ISF-JOCS World Congress, Tokyo, September (1988), p. 279
- J. Kurashige, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64, 1252 (1987)
- J. Kurashige, N. Matsuzaki, K. Makabe, *J. Dispersion Science and Technology*, 10 (4 & 5), 531 (1989)
- マイクル・ハーダー・コールマン公開特許 昭 52-104506
- Coleman, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 291 (1983)
- 松尾高明ら, 特許公告 昭 56-127087
- 沢松紀夫ら, 特許公告 昭 62-134090
- 山根恒夫, バイサイエンスとインダストリー, 47 (1), 17 (1989)
- J.E. Bailey, D.F. Ollis, “Biochemical Engineering Fundamentals”, McGraw-Hill Book. Co., New York (1986) p. 180
- A. Zaks, A.W. Kildanov, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82, 3192 (1985)
- 樋口勝彦, 山科孝雄, 石川一彦, 平田博文, 油化学, 36, 355 (1987)
- 沢村紀夫, 月間フードケミカル, 7月号, 49 (1989)
- 橋本征雄, 油脂, 14 (10), 62 (1988)
- 平野二郎, 船田 正, 油化学, 36, 729 (1987)
- NOVO INDUSTRI A/S パンフレット
- 沢村紀夫ら, 特許公告 昭 63-22798
- 丸銭詔司ら, 公開特許 昭60-19495
- 松尾高明ら, 特許公告 昭 57-27159
- Wong Soon, “A Development Approach to Cocoa Butter & Cocoa Butter Replacers”, (1987)
- R.K. Wille, E.S. Lutton, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 43, 491 (1966)
- 蜂屋 巖, 古谷野哲夫, 佐野清隆, 油化学, 37, 613 (1989)
- 古谷野哲夫ら, 公開特許 昭 63-240745
- 蜂屋 巖, 油脂, 42 (7), 54 (1989)
- テオフィル ビエスケラ, 特許公告 昭 58-53894
- 化学技術誌 MOL, 28 (12), 89 (1990)
- 田中幸久, 油脂, 42 (12), (1989)
- 平松義文ら, 公開特許 平 1186822