リパーゼによるオリーブ油加水分解反応の動力学[†]

羽野 忠・松本道明・大竹孝明・堀 文昭

大分大学工学部 化学環境工学科^{††}

種々の溶媒を用いて、リパーゼおよびオリーブ油の界面張力を測定するとともに、リパーゼによるオリーブ油の加水分解反応を平面接触型攪拌槽を用いて行った。界面張力の測定結果からリパーゼおよびオリーブ油が界面に吸着することが明らかとなり、それらの吸着平衡定数をLangmuirとGibbsの吸着等温式にもとづいて算出した。検討した溶媒の中では、イソオクタンを用いた場合が最も高い加水分解速度を与え、これはこれまでの報告例と一致した。界面張力と速度実験に基づいて、液液界面に吸着した酵素とオリーブ油が反応するという新しい反応機構を提出した。加水分解速度に及ぼす溶媒の効果は、酵素もしくは基質の界面吸着特性の差ではなく、界面反応速度定数の差として説明できた。

緒 言

マーガリンの原料であるパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸などの高級脂肪酸は、現在、牛脂や豚脂を原料にして、Colgate Emery法によりオートクレイブ中で連続的に無触媒反応で製造されている¹⁰⁾。この反応は高温高圧下(250°C, 50 atm)で行われるため、反応条件のより穏やかなリパーゼによる酵素的加水分解の試みが数多くなされており、固定化酵素を含む各種の反応システムが数多く提案されている¹⁰⁾。しかし、リパーゼは高価である上、大規模に行われているColgate Emery法の熱効率も非常に良いことから、酵素法に置き換わる可能性は現在のところ大きくないと言われている⁷⁾。したがって現在では、多くの他の酵素反応プロセス同様このリパーゼ法も、酵素を用いなければ純度の高い製品の製造が困難な、すなわち熱劣化や熱重合を起こしやすい脂肪酸の製造に限られると考えられる。

ところで、多くの油脂が水に難溶性であるため、油脂加水分解反応は液状脂質もしくは固体や液状脂質を溶解した有機溶媒と酵素水溶液との2相系で反応が進む。しかし、このような2相系酵素反応の動力学に対しては、これまでは均相系のMichaelis-Menten型と同様の速度式がそのまま適用されている。本研究で取り上げたリパーゼによる油脂加水分解はこれまで多くの研究があるが、定量的に2相系酵素反応の動力学を詳細に検討した例は少ない^{6,8)}。水に難溶性の基質を有機溶媒に溶解して行う2相系の酵素反応は、酵素反応の可能性を広げるものと

して今後関心が高まるものと考えられる。

そこで本研究は、リパーゼによるオリーブ油の2相系加水分解反応を行い、酵素の界面吸着特性を定量的に把握することにより反応の動力学を明らかにすることを目的として行った。

1. 実 験

1.1 試薬

酵素水溶液は、*Candida cylindracea* 起源のリパーゼ(Sigma社、表示活性8.31 IU/mg-solid)を1/15 Mリン酸緩衝液(pH 7.7~7.8)に溶解して調製した。基質溶液は、市販のオリーブ油(和光純薬製、LOT No. SAN-501)を有機溶媒に溶解して調製した。用いた有機溶媒は、イソオクタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサンおよびイソヘプタンである。

1.2 界面張力

水相-有機相間の界面張力は、25°CでKarriら²⁾の方法にしたがって測定した。なお、酵素の界面吸着平衡定数を測定する際には、反応の影響を除外するためにオリーブ油を含んでいない有機相と酵素を含む緩衝液を用いた。同様に、オリーブ油の吸着平衡定数を測定する場合には、酵素を含まない緩衝液からなる水相とオリーブ油を含む有機相を用いた。

1.3 回分式油滴分散系の反応

500 ml セパラブルフラスコに4枚の邪魔板を取り付けたものと、直径50 mmの標準型6枚平羽根タービン翼とを使用した。オリーブ油は、種々の有機溶媒に溶解させ、25°Cにて300 rpmで混合攪拌しながら反応を行った。この場合、油相が分散相、水相が連続相を形成した。採取した反応液にエタノールを加えて反応を停止させた後、

[†] 1990年7月30日受理；化学工学会第55年会(名古屋, 1990年4月)にて発表

^{††} 〒870-11 大分市旦野原700

Fig. 1 Effect of lipase concentration on interfacial tension

50°Cの恒温槽中で攪拌してエタノール中に生成脂肪酸を抽出した。この抽出液をアルコール性NaOH溶液により滴定した。得られた生成脂肪酸量より酸価(mg-NaOH/g-fat)を求め、(酸価/ケン化価)×100より加水分解率を計算した。また、この時の分散滴径は写真撮影することにより決定した。

1.4 平面接触攪拌槽を用いた反応

有機相体積 100 ml, 水相体積 200 ml および接触界面積 15.47 cm² の平面接触攪拌槽を用いた。25°Cの恒温に保たれた反応容器に水相および有機相を界面を乱さないように入れ、それぞれの相を直径 50 mm の標準型 6 枚平羽根タービン翼を用いて 40 rpm で攪拌した。一定時間毎に油相を 1 ml 採取し、1.3 で示した方法と同様の手順で生成脂肪酸量を決定した。

2. 結果

2.1 界面張力

Fig. 1 に酵素水溶液と種々の有機溶媒との界面張力, r , と酵素濃度との関係を示した。どの有機溶媒を用いても、界面張力は酵素濃度が増加するとともに減少しており、油水界面に酵素が吸着していることがわかる。また、Fig. 2 には、水相とオリーブ油を含む有機相間の界面張力とオリーブ油濃度の関係を示した。この場合も、オリーブ油濃度の増加に伴い界面張力は減少した。

酵素やオリーブ油の界面吸着平衡は Eq. (1) によって表される。

$$A_{\text{bulk}} \rightleftharpoons A_{\text{ad}} : K_A \quad (1)$$

ここで、 A は酵素もしくはオリーブ油を表し、 K_A は吸着平衡定数である。また、添字 bulk は、酵素の場合には水相、オリーブ油の場合には有機相を表し、ad は吸着状態を表す。

界面吸着量とバルク濃度との間に Langmuir の吸着等温式を、また界面吸着量と界面張力の間に Gibbs の等温

Fig. 2 Effect of olive oil concentration on interfacial tension

式をそれぞれ仮定すると、次式が得られる⁵⁾。

$$r = r_0 - (RT/S_A) \ln(1 + K_A C_A) \quad (2)$$

ここで r_0 は酵素およびオリーブ油を含まない水-有機溶媒間の界面張力であり、 S_A は吸着分子 1 モルが界面で占める面積である。Figs. 1 および 2 の実験結果に Eq. (2) をあてはめ、非線形回帰分析により求めた K_A および S_A を各溶媒について Table 1 に示した。また、図中にはこれらの定数を用いた計算線を実線で示した。表から、酵素およびオリーブ油ともに溶媒による界面被覆面積の差は小さいが、界面吸着平衡定数の差はオリーブ油の場合大きくなった。

2.2 油滴分散系

Fig. 3 に加水分解率に及ぼす有機溶媒の影響を示した。有機溶媒により加水分解速度に大きな差が見られる。この加水分解速度の差が Mukataka らの結果のように⁶⁾ 油水界面積の差によって生じたことも考えられるため、幾つかの溶媒系で回転数を変化させて分散滴径を測定した。しかし Fig. 4 に示したように、溶媒による分散滴径の差は小さく、加水分解速度の差が界面積の差によるものではないことを確認した。

Fig. 3 から、溶媒としてイソオクタンを用いた系が最も大きい反応速度を与えることがわかる。これは、同じリパーゼを用いたオリーブ油³⁾ および牛脂^{4,6)} の加水分解について報告された結果と一致する。

2.3 平面接触系

溶媒による反応速度の差を詳細に検討するために、接触界面積が既知の平面接触攪拌槽を用いて実験を行った。これは油滴分散系では、分散滴径は界面張力等によって変化する⁹⁾ ことが知られているため、反応機構の詳細な解析には適当でないと考えられたからである。

有機溶媒としては、油滴分散系で比較的高い加水分解速度を与えたイソオクタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサンおよびイソヘプタンを用いた。

Table 1 Adsorption equilibrium and rate constants

	Adsorption parameter				Kinetic parameter	
	Lipase		Olive oil		$10^7 kK_M$ [mol·m/(kg·s)]	$K_S^{(1)}$ [m ³ /kg]
	K_E [m ³ /kg]	$10^{-5} S_E$ [m ² /mol]	K_S [m ³ /kg]	$10^{-5} S_S$ [m ² /mol]		
isooctane	69.4	7.51	24.5	5.90	10.8	0.512
cyclohexane	131	9.54	6.04	5.27	1.54	0.174
methylcyclohexane	125	16.5	7.17	6.05	2.21	0.454
isoheptane	21.3	13.0	0.204	4.33	1.24	0.102

1) the values obtained from kinetic experiments

Fig. 3 Effect of solvent on the extent of hydrolysis of olive oil in a stirred cell

Fig. 4 Relation between drop diameter and agitation speed in various diluents

Fig. 5 に生成脂肪酸量の経時変化の一例を示した。はば原点を通る直線となるため、初期加水分解速度、 v_0 、を次式で定義した。

$$v_0 = \left(\frac{dC_{F,org}}{dt} \right)_{t=0} \left(\frac{V_{org}}{A} \right) \quad (3)$$

ここで、 $C_{F,org}$ は有機相中に生成した脂肪酸量である。

Fig. 6 に、 v_0 に及ぼす酵素濃度の影響を示した。イソオクタンを溶媒として用いた場合を除き、酵素濃度の増加に伴い v_0 はすぐに一定値を示した。

Fig. 7 に、 v_0 に及ぼすオリーブ油濃度の影響を示した。どの溶媒の場合もオリーブ油濃度の増大に伴い、加水分解速度は増加した。

Figs. 6 および 7 中の実線は、後述するモデルに基づく計算線である。

3. 考 察

これまで、リパーゼによる油脂の加水分解の動力学的に関して行われた研究は少ないが、その中で Mukataka ら⁶⁾ および Ucar ら⁸⁾ は界面での反応を考え、Michaelis-Menten 型類似の速度式を導出している。しかし彼らの

いずれの式から、Fig. 6 に示されたような、加水分解速度が酵素濃度に比例せずかつ一定値に収束するという傾向は説明できず、本実験結果には適用できない。

ところでリパーゼは界面に吸着することにより脂質分解に好ましい配向性を取り、活性が増大することが知られている¹⁾。そこで、均相系の Michaelis-Menten 型と同様なプロセスで界面に吸着した酵素と油相中の脂質との間で反応が進行すると仮定して、次のような界面反応モデルを考えた (Appendix 1)。

ここで、 E , S , G および F はそれぞれリパーゼ、オリーブ油、グリセリンあるいは一部加水分解された脂質および遊離脂肪酸を表す。 K_E , K_M はそれぞれ Eqs. (4), (5) の平衡定数である。また、反応初期では阻害は無視できると仮定した。

この界面反応モデルにおいて Eq. (6) が律速段階と考

Fig. 5 Time course of fatty acid produced in a stirred transfer cell

Fig. 6 Effect of lipase concentration on the initial reaction rate

えると、加水分解速度は次のように表せる。

$$v = k \theta_{ES} \quad (7)$$

ここで、 θ_j は化学種 j の界面被覆率を表す。界面酵素濃度と水相バルク酵素濃度との間の関係に前述のLangmuirの式を適用すると、Eqs. (4)および(5)から

$$\theta_{ES} = K_M \cdot K_E \cdot C_{S,org} \cdot C_{E,aq} \cdot \theta_v \quad (8)$$

ここで、 θ_v は空の吸着点の割合である。オリーブ油も

Fig. 7 Effect of olive oil concentration on the initial reaction rate

Fig. 8 Determination of overall reaction rate constant

界面吸着能を有していること、および反応中間体 ES の界面被覆率 θ_{ES} が反応初期では酵素およびオリーブ油の界面被覆率 θ_E 、 θ_S に比べてきわめて小さいと考えられることから、(Appendix 2)

$$\theta_E + \theta_S + \theta_v = 1 \quad (9)$$

Eqs. (7)~(9)より

$$v_0 = \frac{k \cdot K_M \cdot K_E \cdot C_{Sorg} \cdot C_{Eq}}{1 + K_E \cdot C_{Eq} + K_S \cdot C_{Sorg}} \quad (10)$$

Eq. (10) を変形すると、

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{k \cdot K_M \cdot C_{Sorg}} + \left(\frac{1 + K_S \cdot C_{Sorg}}{k \cdot K_M \cdot K_E \cdot C_{Sorg}} \right) \cdot \frac{1}{C_{Eq}} \quad (11)$$

したがって、オリーブ油濃度一定の条件下で、 $1/v_0$ と $1/C_{Eq}$ のプロットは直線になることが予想され、切片より総括の反応速度定数 kK_M を求めることができる。この関係を Fig. 8 に示した。直線関係が得られ、これより求められた総括の速度定数 kK_M を Table 1 に併せて示した。一方、Fig. 8 の直線の傾きは、Table 1 に示した界面張力の測定から求められた定数値 K_S , K_E を用いて Eq. (11) より算出できる。しかし、Fig. 8 から得られた値と計算値は大きく異なった。この原因は、界面張力測定結果に基づいて決められた K_S の値が真の吸着平衡定数を表していないためであると推測される。すなわち、 K_S を Eq. (2) にしたがって算出する場合、界面張力が吸着種濃度増加に伴って減少していく領域の測定点が重要である。Fig. 2 のオリーブ油の界面張力のデータをみると、オリーブ油の体積分率が 1% 以上で界面張力が大きく低下している。この領域では、油相はオリーブ油と有機溶媒の混合溶液といってよい。したがって界面張力の低下は、オリーブ油の界面吸着の寄与以上に、油相組成そのものが変化していたために主に生じたものと考えられる。ちなみに緩衝液-オリーブ油間の界面張力は 19.2mN/m であり、反応条件下ではほぼ一定であることが示された。そこで、Fig. 8 の各直線の傾きより見かけの K_S を求め、Table 1 に示した。Eq. (2) に基づく K_S と反応実験から求められた K_S は、2~50 倍異なった。修正されたオリーブ油の K_S 値およびその他の定数を用いた計算線を Figs. 6 および 7 に示した。計算線と実測値はほぼ一致していると考えられる。したがって、Fig. 6 で加水分解速度と酵素濃度が比例しなかったのは、リパーゼが Langmuir 型の界面吸着を示すためであると考えられる。

Table 1 に示すように吸着パラメータに差があったものの、反応条件下では C_E , C_S が大きいいため、Eq. (10) からわかるように吸着項に基づく速度の差は大きくない。したがって、4 種の溶媒を用いた平面接触系の反応速度は、総括反応速度定数 kK_M に支配された。一方分散系の反応においては、比界面積は大きいものの用いた酵素量およびオリーブ油量は飽和界面吸着量に比べて充分大過剰に存在している (Appendix 3)。したがって、このようなことから Figs. 3 および 5 にみられる溶媒による加水分解速度の差は、総括反応速度定数 kK_M の差に由来していると推察される。本研究で観察された溶媒による kK_M

の差の酵素化学的な解釈は、今後の課題である。

結 言

種々の溶媒を用いて、リパーゼおよびオリーブ油の界面吸着挙動を測定するとともに、リパーゼによるオリーブ油の加水分解反応を回分式油滴分散系搅拌槽および平面接触型搅拌槽を用いて行い、次のような結論を得た。

- 1) 界面張力の測定結果からリパーゼおよびオリーブ油が界面に吸着することが明らかとなり、その吸着平衡定数を Langmuir と Gibbs の吸着等温式に基づいて算出した。溶媒による界面吸着平衡定数の差は存在したが実験条件下ではその差が小さくなることがわかった。
- 2) 溶媒としてイソオクタンを用いた場合が最も高い加水分解速度を与え、これまでの報告例と一致した。
- 3) 界面へ吸着した酵素に油相中のオリーブ油が反応するという新しい反応機構を提出した。このモデルによって実験結果を解析し、総括の加水分解反応定数を得た。

Appendix

- 1) 界面張力の測定結果から、界面に吸着したオリーブ油と酵素との反応も考えられるが、この場合基質の易動度がかなり制限されるために可能性は低いと考えられる。また、この吸着種どうしの反応モデルに基づく速度式では、実験結果を説明することができなかった。
- 2) Eq. (9) において θ_S を無視すると、Eq. (10) から v_0 と C_{Sorg} との関係は原点を通る直線となり、Fig. 7 の実験結果と異なる。
- 3) たとえばイソオクタン-水系で酵素あるいはオリーブ油が完全に油水界面を被覆するためには、酵素で 5.2×10^{-6} kg、オリーブ油で 2.4×10^{-9} kg が必要である。一方実験に用いた酵素量は 8.5×10^{-5} kg、オリーブ油量は 9.6×10^{-3} kg である。ただし、酵素の分子量は 5 万、オリーブ油はトリオレインであると仮定して計算した。

[謝 辞] 実験にご協力いただいた萩原伸吾 (現川崎化成 (株))、桐原豊美 (現富士通南九州システムエンジニアリング (株))、安藤俊之 (現古河電工 (株)) および甲斐徳子の各氏に感謝致します。

Nomenclature

A	= contact area of stirred transfer cell	[m ²]
C_A	= concentration of species A ($A = E$: lipase,	
	$A = S$: Olive oil)	[kg/m ³]
C_F	= concentration of free fatty acid	[mol/m ³]
K_A	= adsorption equilibrium constant of	
	species A ($A = E$: lipase, $A = S$: Olive	
	oil)	[m ³ /kg]
K_M	= Michalis constant	[m ³ /kg]
k	= rate constant of Eq. (6)	[mol/(m ² ·s)]

R	= gas constant	[N·m/(mol·K)]
S_A	= interfacial area occupied by species	
A		[m ² /mol]
T	= temperature	[K]
t	= time	[s]
V	= volume	[m ³]
ν	= reaction rate of hydrolysis	[mol/(m ² ·s)]
γ	= interfacial tension	[N/m]
θ	= fraction of interfacial area occupied by species A	[-]
ϕ	= hold-up of organic solution	[-]
<Subscripts>		
ad	= adsorption state	
bulk	= bulk solution	
org	= organic solution	
0	= initial state	

Literature cited

- 1) Brockerhoff, H.: *Bioorg. Chem.*, **3**, 176 (1974)
- 2) Karri, S.B.R. and V.K. Mathur: *AIChE J.*, **34**, 155 (1988)
- 3) Kim, K.H., D.Y. Kwon and J.S. Rhee: *Lipids*, **19**, 975 (1984)
- 4) Kobayashi, T., S. Mukataka, H. Kataoka and J. Takahashi: *Hakkokogaku*, **63**, 439 (1985)
- 5) Matsumoto, M., K. Kondo and F. Nakashio: *J. Chem. Eng. Japan*, **23**, 359 (1990)
- 6) Mukataka, S., T. Kobayashi and J. Takahashi: *J. Ferment. Technol.*, **63**, 461 (1985)
- 7) Schmid, R.D.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 563 (1987)
- 8) Ucar, T., H.I. Ekiz and M.A. Caglar: *Biotech. Bioeng.*, **33**, 1213 (1989)
- 9) Yamaguchi, I., S. Yabuta and S. Nagata: *Kagaku Kogaku*, **27**, 576 (1963)
- 10) Yamane, T.: *Bioscience and Industry*, **47**, 17 (1989)

Kinetic Study of Olive Oil Hydrolysis with Lipase

Tadashi Hano, Michiaki Matsumoto, Takaaki Ohtake
and Fumiaki Hori

Dept. of Environ. Chem. Eng., Oita Univ., Oita 870-11

Key Words : Biochemical Engineering, Enzyme Kinetics, Two-Phase Reaction, Lipase, Olive Oil, Hydrolysis

Hydrolysis of olive oil in various organic diluents was carried out by using lipase in a stirred transfer cell. Based on measurement of the interfacial tension between aqueous and organic solutions, it was found that they are adsorbed at the oil-water interface.

Among diluents investigated, isooctane gave the highest reaction rate as reported previously. From adsorption and kinetic experiments, a new model of interfacial reaction between adsorbed lipase and olive oil was proposed. The effect of diluent on the reaction rate was explained not by the difference in adsorption characteristics of lipase or olive oil but by the difference in interfacial reaction rate constants.