回転円筒型自動膜ろ過システムによる牛乳カゼインの連続酵素分解

金 哲*・宿野部幸孝**・三浦 靖*・種谷真一*

Continuous Enzymatic Hydrolysis of Milk Casein in an Automatic Vortex Flow Filtration System

Zhe JIN*, Yukitaka SHUKUNOBE**, Makoto MIURA* and Shin-ichi TANEYA*

* Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8, Ueda, Morioka, Iwate 020

** Show Brand Milk Products Co., Ltd., Technical Institute,
1-1-2, Minami-dai, Kawagoe, Saitama 350

In order to obtain casein peptides at higher productivity, a filtration membrane automatic bioreactor has been developed. Total solid concentration of reaction solution in a reaction vessel was controlled automatically by adding substrate and deionized water to it. As the results, it was possible to operate for 24 hours with a constant permeate flux. However, when operated during 80 hours under the concentration ratio of substrate to enzyme : 5.0%/1.0% at an operation pressure of 150 kPa, the lowering of 8.1% of permeate flux was finally found. In general, permeate flux decreased with an increase in substrate concentration and increased with an increase in operation pressure. Total membrane resistance, R (m^{-1}) was represented by the following equation, $R=4.47+0.15C$, where 4.47 was membrane resistance of itself and C was total solid concentration (%) of the reaction solution at 45°C. These results suggested that the decrease in enzyme activity and the accumulation of peptide which could not be further hydrolyzed and the increase in membrane resistance reduced the permeate flux after long operation period of up to 80 hours (Received Jan. 10, 1997 ; Accepted Jun. 3, 1997)

カゼイン・ペプチドは、食品物性の改良剤や呈味剤や増量剤として利用され、さらにその良好な吸収性を利用して、高齢者や乳幼児用の栄養食品、タンパク質飲料、スポーツ飲料など様々な食品に利用されている^{1)~5)}。カゼインの加水分解については、バッチ方式で酵素をタンパク質溶液に直接添加して分解物を得るだけでなく、酵素の有効利用という観点から酵素を不溶性担体に固定化した固定化酵素バイオリアクターおよび膜型バイオリアクターを用いる試みがなされてきている^{6)~8)}。カゼイン加水分解物の機能性は、主に分子量分布に関係しているため、一定の分子量分布を有する加水分解物を得る安定な製法が必要である。限外ろ過方式を用いた膜型バイオリアクターは、酵素反応と生成物の分離が同時に行える

うえ、一定の分子量分布の加水分解物が得られ、酵素の固定化で生ずる酵素活性の低下と立体障害を防ぐことができるため、多くの研究がなされている^{9) 10)}。しかし、膜の目詰まりや、未分解基質あるいは分解過程にある基質などのような高分子化合物の膜面への堆積のために長時間運転はできず、しかも定期的に膜面の汚れを取り除くための洗浄工程を設ける必要があり、生産効率および酵素の有効利用という面から必ずしも満足できるものではなかった。

前報¹¹⁾では、反応槽中の反応溶液の重量を一定にする方法により連続運転した結果を報告した。すなわち、透過流量を運転開始から1時間以内は15分ごと、その後は1時間ごとに測定し、各濃度の基質溶液を連続的に反

* 岩手大学農学部 (〒020 盛岡市上田 3-18-8)

** 雪印乳業株式会社技術研究所 (〒350 川越市南台 1-1-2)

反応槽へ送液しているポンプ流量を調節して重量を一定にした。この方法により運転時間が1時間から6時間内ではほぼ一定の重量を設定できた。しかし、この方法による6時間以上の運転では、反応槽中の反応溶液の固形分濃度が増加する傾向にあり、急激に透過流束が減少した。

そこで、この問題を解決するために、反応槽中の反応溶液の固形分濃度を屈折計で計測し、コンピュータにより基質溶液および水の補充流量を制御し、反応槽中の固形分濃度を一定に保つことを試みた。その結果、6時間以上の運転が可能になったので報告する。

実験方法

1. 試料

基質には水分含量が11.6% (w/w) の酸カゼイン (AL ACID, Milk Products 社製, ニュージーランド) を用いた。酵素はプロテアーゼ (プロテアーゼ M, Lot No. PRSO 7522 M, 天野製薬(株)製) を用いた。前報¹¹⁾ と同様の酵素活性測定法による酵素活性は $4313 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ であった。他は市販の特級試薬および脱塩水を用いた。

2. 試料の調製

90~95°C に加熱した脱塩水に酸カゼインを各3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0% (w/w) の濃度になるように、それぞれスターラー (FL 105 N, 東京硝子器械(株)製) で2時間攪拌しながら溶解させて基質溶液を調製した。この際、溶液のpHを酸性にするために酸カゼイン1gあたり濃塩酸0.04 ml を添加して加熱した。最終的には、溶液を冷却後に1 N HCl でpH 3.2に調整した。酵素溶液は、1.0% 濃度になるようにプロテアーゼを脱塩水に溶解させて調製した。酵素濃度Eに対する基質濃度Sとの割合はS/E=3.0%/1.0%, 4.0%/1.0%, 5.0%/1.0%, 6.0%/1.0%, 7.0%/1.0% (以下、S/Eの%を省略する) の5通りを用いた。

3. 膜分離装置と制御装置

使用した装置の概略図をFig. 1に示した。Aは回転円筒型膜ろ過システム (Vortex Flow Filtration System: 以下、VFFシステムと呼ぶ) であり、Benchmark GX-200 (Membrex 社製, 米国) を用いた。円筒型膜 (Ultra Filic Membrane MX-10, Membrex 社製) は親水性ポリアクリロニトリル製であり、分画分子量10000で、高さ0.159 m, 半径 $2.25 \times 10^{-2} \text{ m}$, 膜面積 $2.25 \times 10^{-2} \text{ m}^2$ である。シリンダーの半径は $2.5 \times 10^{-2} \text{ m}$ で、円筒型膜との間隙は $0.25 \times 10^{-2} \text{ m}$ である。この間隙を流れる反応溶液には膜の回転 (200~4000 rpm) によりTAYLOR渦流が発生し、膜面での反応溶液中の固形分による細孔内

Fig. 1 Experimental apparatus

部の閉塞やゲル層の生成を抑制している。円筒型膜の回転数は前報¹¹⁾ で報告したように、1200 rpm 以上では透過流束にあまり変化がなかったため、本報では1500 rpm に設定した。Bは容積式ポンプ (302 S, WATSON MARLOW 社製, 英国), Cはペリスタポンプ (SJ-1211, アトー(株)製), DとEはローラーポンプ (RP-1000型, 東京理化学器械(株)製) である。45°C に設定した恒温水槽内に設置した反応槽に基質溶液と酵素溶液をS/E=3.0/1.0, 4.0/1.0, 5.0/1.0, 6.0/1.0, 7.0/1.0で総体積 $2 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ になるように入れて酵素反応を開始し、直ちにその溶液はポンプB (流量 $27 \text{ kg} \cdot \text{h}^{-1}$) によりステンレス製シリンダーと回転膜間隙に送られる。膜を透過した溶液は透過液として系外へ取り出される。残った反応溶液は再び反応槽へ戻される。このとき、P点でチューブを絞って反応溶液にろ過圧力 (35, 100, 150, 200 kPa) を加える。反応溶液は、反応が進むにつれてアルカリ性にシフトするので、pHコントローラー (FD-02, 東京硝子器械(株)製) を用いて1 N HCl でpH 3.2に制御した。DとEのポンプ流量をP制御法により制御した。また反応槽中の反応溶液の容量と固形分濃度を一定に保持するため、全固形分濃度の測定には、プロセス屈折計 (PRM-60型, (株)アタゴ製) を使い、反応液の全固形分濃度とプロセス屈折計の電圧出力値との検量線を求めて制御に用いた。反応槽中の反応溶液の容量の測定には、レベル計 (GYMT型高精度非接触変位センサー, サンテクト(株)製) を使い、反応槽中の反応溶液の容量と電圧出力値の検量線を求めて制御に用いた。A/D変換モジュール (AD 12-16T (98) H, コンテック(株)製) およびD/A変換モジュール (DA 12-8 (98), コンテック(株)製) はI/O拡張ユニット (NOTE-PAC (98) V-4 A, コンテック(株)製) を介してパーソナルコンピュー

タ (PC-386 NOTE AR, エプソン販売(株)製) と接続した。計測/制御/解析は、パッケージソフトウェア (LABTECH NOTEBOOK (98), コンテック(株)製) を用い、Fig. 2 に示したフローチャートで実施した。なお、実験後の膜の洗浄は最初に脱塩水で行い、その後 25℃ で 0.5% (w/w) アルカリ洗剤 (Ultrasil 54 s, ヘンケル白水(株)製) 水溶液で 30 分程度行って脱塩水での透過流束初期値に戻した。

4. 反応槽のプロテアーゼの残存活性測定

0.1 N 乳酸および 0.1 N NaOH で pH 3.0 に調整した溶液中にミルクカゼイン (acc. to Hammarsten, メルク社製) を 1.5% (w/w) で溶解し、その溶液を試験管に 1 ml 採り、 $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ の恒温水槽中で加温した。10~15 分間保持した後、反応槽から採取したサンプル溶液 1 ml を加え、直ちに混合した。この反応液を $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で 60 分間保持した後、0.4 M トリクロル酢酸溶液 2 ml を加えてよく混合し、さらに $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で 25 分間保持した。この溶液をろ紙 (No. 131, 直径 70 mm, 東洋濾紙(株)製) でろ過した。さらに、このろ液 1 ml を試験管に採り、0.4

M 炭酸ナトリウム溶液 5 ml および脱塩水で 5 倍希釈したフォーリン試薬 1 ml を加えてよく混合し、 $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で保持した。正確に 20 分間経過後、この反応液の波長 660 nm での吸光度 (A_t) を脱塩水を対照として測定した。別に 1.5% (w/w) ミルクカゼイン溶液 1 ml に 0.4 M トリクロル酢酸溶液 2 ml を加え、よく混合した後、反応槽から採ったサンプル溶液 1 ml を加えたものにつき、以下同様に操作して吸光度 (A_b) を測定した。

プロテアーゼの活性は、60 分間反応後のろ液 1 ml 中にチロシン 100 μg に相当するアミノ酸を生成する酵素の量をプロテアーゼの活性 1 単位とし、次式により算出した。

$$\text{プロテアーゼ活性 (U} \cdot \text{g}^{-1}) = (A_t - A_b) \cdot F \cdot n \cdot (1/100) \quad (1)$$

F, チロシン検量線により求めた吸光度差が 1.0 のときのチロシン量 (μg) であり、この場合 $F=100$ とした。

1/100, 単位換算係数

n, 酵素溶液の希釈倍数

5. 反応液の粘性率の測定

45°C における各 S/E での反応液の粘性率を循環恒温水槽 (NTT-1 400, 東京理科機械(株)) を接続した回転粘度計 (VISCONIC ED, (株)東京計器製) を用いて測定した。なお、粘度校正には粘度計校正標準液 (JIS Z 8809, 昭和シェル石油(株)製) を用いた。

実験結果および考察

1. 反応槽中の反応液の設定体積と固形分濃度

24 時間運転における設定体積 $2 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ としたときの各 S/E の反応溶液の全固形分濃度を Fig. 3 (a) に示した。また、80 時間運転における設定体積 $2 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ としたときの S/E=5.0/1.0 での反応溶液の全固形分濃度を Fig. 3 (b) に示した。これらの図に示したように、本実験では P 制御により反応槽の体積および固形分濃度をほぼ一定に保つことができ、反応液体積の設定値に対する変動は $\pm 1.75\%$ 、反応槽固形分濃度の設定値に対する変動は $\pm 6.25\%$ であった。

2. 重量透過流束特性

操作圧力 100, 150, 200 kPa における S/E を 3.0/1.0, 4.0/1.0, 6.0/1.0, 7.0/1.0 にして運転した際の運転時間と重量透過流束 J との関係を図 4 に示した。いずれの操作圧力においても、重量透過流束は運転 1 時間以内では、基質の加水分解物の生成が不充分なために徐々に増加するが、その後は運転 24 時間まではほぼ一定の値を維持した。前報¹⁾で示したように、透過液中の分解物は分

Fig. 2 Flow chart of control program

B_m , Setting value of total solid concentration in the reaction vessel; B_r , Measured value of solid concentration in the reaction vessel; L_m , Setting value of solution level in the reaction vessel; L_r , Measured value of solution level in the reaction vessel.

Fig. 3 Time courses in total solid concentration (%) and volume of solution in the reaction vessel ($2 \times 10^{-3} \text{ m}^3$)

◇, S/E=7.0%/1.0%; □, S/E=6.0%/1.0%; ■, S/E=5.0%/1.0%; △, S/E=4.0%/1.0%; ×, S/E=3.0%/1.0%; ○, Volume of solution in reaction vessel.

子量 300~600 のペプチドである。重量透過流束は基質濃度 S が大きくなるにつれて低下し、この傾向は、操作圧力を変えても同じであった。ただし、操作圧力を増加させると重量透過流束は大きくなった。たとえば、 $S/E = 3.0/1.0$ で操作圧力 100 kPa のときの重量透過流速は約 $30 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ であるが、200 kPa ではその約 2 倍の重量透過流束が得られた。

3. 膜抵抗

体積透過流束 J_v ($\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) は、一般に操作圧力 P (Pa) に対して次式で与えられる⁽¹²⁾⁽¹³⁾。

$$J_v = \frac{1}{\eta R} P \quad (2)$$

ここで、 η は反応溶液の粘性率 ($\text{Pa} \cdot \text{s}$)、 R は次式で示したように膜自身の抵抗 R_1 と透過されない固形分による膜細孔内部の閉塞や膜面のゲル層の生成などに起因する抵抗 R_2 との和として考えられる。

$$R = R_1 + R_2 \quad (3)$$

R_1 を求めるために脱塩水を処理した時の操作圧力と体積透過流束 J_v との関係を検討した。その直線の勾配は、

Fig. 4 Time courses of permeate flux at various concentration ratios of substrate to enzyme

◇, S/E=7.0%/1.0%; □, S/E=6.0%/1.0%; △, S/E=4.0%/1.0%; ×, S/E=3.0%/1.0%.

脱塩水の透過に関する ηR の逆数を与え、純水の粘性率 $0.60 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ (45°C) を用い R_1 を求めると 4.47 m^{-1} が得られた。Fig. 5 に各 S/E における溶液について、操作圧力と体積透過流束との関係を示した。各 S/E における直線の勾配を求め、その溶液における粘性率を測定して全抵抗を計算すると、 $S/E = 3.0/1.0$ で 5.11 m^{-1} 、 $S/E = 4.0/1.0$ で 5.20 m^{-1} 、 $S/E = 6.0/1.0$ で 5.46 m^{-1} 、 $S/E = 7.0/1.0$ で 5.62 m^{-1} であった。 R_2 は全抵抗から R_1 を引いて求め、この R_2 は全固形分濃度 (基質+酵素) に対して直線関係 (比例定数は 0.15 m^{-1}) が得られた。したがって、実験式として全膜抵抗に関して次式が与えられた。

$$R = 4.47 + 0.15 C \quad (4)$$

ここで、 C は反応槽中の反応溶液の全固形分濃度 (%、 w/w) である。ただし、反応溶液温度は 45°C である。全抵抗は基質濃度の増加につれて比例的に増加した。膜抵抗には溶液中の透過されない固形分による膜細孔内部の閉塞や膜面上のゲル層の生成による抵抗よりも膜自身の抵抗の方が大きく効いていると考えられる。ポリエーテ

ルスルホン製平膜 (PTOGCOLCM 2, 10 000 NMWL, 膜面積 $6.0 \times 10^{-3} \text{ m}^2$, ミリポア社製) を用いた別の実験では, $S/E=3.0/1.0$ のときの全膜抵抗 R は 16.13 m^{-1} であり, 回転膜抵抗の 5.20 m^{-1} と比較して大きく, 全膜抵抗の減少は回転膜ろ過の効果によるものと考えられる.

4. 長時間運転における諸特性

24 時間運転では, 反応槽中の反応溶液の固形分濃度を

Fig. 5 Relationships between volume permeate flux and transmembrane pressure

◇, $S/E=3.0/1.0$ $y=0.0979x$; □, $S/E=4.0/1.0$ $y=0.0849x$; △, $S/E=5.0/1.0$ $y=0.0736x$; ×, $S/E=6.0/1.0$ $y=0.0628x$; *, $S/E=7.0/1.0$ $y=0.0530x$.

一定に制御することによって, 酵素の補充なしに, ほぼ一定の反応条件を保つことができ, 安定した重量透過流束を得た. 次に, $S/E=5.0/1.0$, 操作圧力 150 kPa のもとで 80 時間の運転を試みた. Fig. 7 (a) に運転時間による重量透過流束の変化を示した. 重量透過流束は, 約 24 時間の運転範囲ではほとんど低下しないが, その後徐々に低下し, 80 時間後では最高値である $37 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ から 8.1% だけ減少した $34 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ になった. 前報¹¹⁾ で報告したように, 反応槽中の酵素分解の効率を

Fig. 6 Relationship between membrane resistance and the solid concentration of solution in the reaction vessel
 $y=0.15x$.

Fig. 7 Time courses of permeate flux, substrate conversion, productivity and relative activity during 80 hours operation

◇, Reaction solution; □, Enzyme buffer solution.

表す基質変換率 X , すなわち反応槽中での反応溶液の固形分濃度に対する透過液の固形分濃度の割合を用い, その経時変化を Fig. 7 (b) に示した. 基質変換率は重量透過流束の場合と全く同様に, 約 24 時間内の運転ではほとんど変化せず, その後徐々に低下した. 基質変換率の初期値 0.6 が, 運転 80 時間後には 0.4 に低下した. さらに, 前報⁽¹⁾と同様に, 生産性すなわち酵素重量に対する膜透過分解物の重量の割合を用い, その経時変化を示すと Fig. 7 (c) のようになり, 基質変換率と同じ傾向を示した. Fig. 7 (d) は反応溶液および酵素溶液を 45°C においてバッチ式で攪拌した際の酵素活性の経時変化を示したものである. いずれの溶液においても相対酵素活性は運転時間の経過に伴って低下した. 以上のことから, 80 時間の長期運転における重量透過流束の減少には, 酵素活性の低下, 反応溶液におけるそれ以上分解できない固形分の蓄積, および膜抵抗の増加が考えられる. 今後, 酵素の補充方法を検討するとともに, 反応液中の固形分の組成を分析して蓄積成分の除去方法も検討する予定である.

要 約

プロテアーゼによる酸カゼインの加水分解物を効率よく得るために, 回転円筒型膜ろ過システムを用いた自動連続バイオリアクターを開発し, 次の結果を得た.

(1) 反応槽における反応溶液にコンピュータ制御により基質溶液と脱塩水を添加して全固形分濃度を所定値に維持することで, 24 時間程度まで安定な重量透過流束を得た.

(2) 80 時間の運転では重量透過流束が 8.1% 減少し, 基質変換率と生産性と酵素活性はともに, 運転時間の経過につれて減少した.

(3) 重量透過流束は基質濃度の増加にともない低下し, 操作圧力の増大にともない増加した.

(4) 全膜抵抗 R は $R = 4.47 + 0.15 C$ で表された. ただし, 4.47 は膜自身の抵抗値 (m^{-1}), C は 45°C の反応溶液の全固形分濃度 (%) である.

以上のことから, 80 時間の長期運転における重量透過流束の減少には, 酵素活性の低下, 反応溶液におけるそれ以上分解できない固形分の蓄積, および膜の抵抗の増加が考えられる.

文 献

- 1) VEGARUD, G. E. and LANGSRUN, T.: *J. Dairy Research*, **56**, 375 (1989).
- 2) CHOBERT, J.M., SITOHY, M.Z. and WHITAKER, J.R.: *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 220 (1988).
- 3) ADLER-NISSEN, J.: *J. Chem. Technol. Bio-Technol.*, **32**, 138 (1981).
- 4) MIETSCH, F.: *Die Nahrung*, **33**, 9 (1989).
- 5) ADLER-NISSEN, J.: *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1090 (1976).
- 6) WAGNER, J.: Food Process Engineering, ed. LINKO, P. et al. (Applied Sci., London), p. 536 (1980).
- 7) HIDDINK, J. and DE BOER, R.: Food Process Engineering, ed. LINKO, P. et al. (Applied Sci., London), p. 561 (1980).
- 8) MANNHEIM, A. and CHERYAN, M.: *J. Food Sci.*, **55**, 381 (1990).
- 9) CHERYAN, M. and DEESLIE, W.D.: Ultrafiltration Membranes and Applications, ed COOPER, A.R. (Plenum Press, New York), p. 591 (1980).
- 10) DEESLIE, W.D. and CHERYAN, M.: *J. Food Sci.*, **46**, 1035 (1981).
- 11) 金 哲・宿野部幸孝・種谷真一: 食科工, **44**, 10 (1997).
- 12) 古川俊夫: 食品の開発, **29** (10), 8 (1994).
- 13) 種谷真一: 食品膜技術懇談会, 第 8 回秋季研究例会講演要旨, p. 34 (1996).

(平成 9 年 1 月 10 日受付, 平成 9 年 6 月 3 日受理)