

乳脂肪およびその分別物のリパーゼ分解

丹治幹男^{1,2}・大西正男¹・司城不二²

(受理：2000年11月30日)

Lipase hydrolysis of milk fat and its soft fractions
Mikio Tanji^{1,2}, Masao Ohnishi¹, and Fuji Tsukasaki²

摘 要

微生物起源の市販リパーゼを用いて、天然のバターフレーバーを強化する目的で乳脂肪を分解した。

1) 市販酵素であるパラターゼAとリパーゼFを比較すると、リパーゼFの方が分解率が高く、フレーバーも良好であった。また、酵素添加量を増やすことにより短時間で分解率を上げることができた。

2) リパーゼFでバターオイルを分解した場合、水相量の違い(10%と20%)、水道水の使用および水酸化物添加による加水分解率への影響はほとんどなかった。

3) リパーゼ分解により遊離した脂肪酸としては11種が検出され、そのうち主なものはパルミチン酸、ステアリン酸およびオレイン酸であった。24hと48hの分解時間で比較すると、遊離した脂肪酸量には違いがあったが、その組成はほとんど変わらなかった。また、ショートニング希釈およびマドレーヌでの実用試験においても、分解時間によるフレーバーの違いは単に強度的なものだけであった。

4) 乳脂肪から分別された低融点画分を同様にリパーゼで分解すると、分解率はバターオイルの場合と比べて多少低かったが、遊離した短・中鎖の脂肪酸組成には差がなかった。官能試験では、刺激臭が弱くなり風味的にマイルドで、またマドレーヌでの実用試験においてもフレーバー改善効果が認められた。しかし、これはバターフレーバー成分が分別の過程で低融点性画分に多く移行したことによると判断された。

キーワード：バター、乳脂肪、リパーゼ、加水分解、フレーバー

¹ 帯広畜産大学生物資源科学科応用生命科学講座 〒080-8555 北海道帯広市稲田町

² よつ葉乳業(株)事業本部研究開発グループ 〒060-0003 北海道札幌市中央区北3条西2丁目10-2

¹ Department of Bioresource Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

² Research and Development Department, Yotsuba Milk Products Co., Nishi 2-10-2, Kita 3, Chuo-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0003, Japan

緒 言

乳製品には、生乳から飲用乳、クリーム、バター、チーズなどの製品に至るまで、ほとんど同様の香気物質（フレーバー）が存在しており、それらフレーバー成分の割合ならびに含量の違いによって各種乳製品のフレーバー的特徴が現れている。乳製品の代表的な香気物質としては、C2～C18までの偶数炭素の脂肪酸類、それらのメチルとエチルエステル類、C1～C10のアルコール類、C3～C15のメチルケトン類、さらにC10前後の γ -と δ -ラクトン類、ジアセチルおよびジメチルサルファイドが知られている。これらの香気成分の多くは、乳を原料として酵素や微生物の作用により生成させることが可能であり、この方法は乳製品生産に利用されている¹⁾。

香気成分のうち、脂肪酸類は乳脂肪の構成成分として大量に存在するので、これをリパーゼの作用で遊離させることにより、乳製品フレーバーの素材として利用できる。蟹沢ら²⁾は、各種形態の乳脂肪を種々のリパーゼで処理し、遊離した脂肪酸の組成とフレーバーを調べて乳製品フレーバーの性質を検討している。その結果、遊離する脂肪酸のプロファイルには酵素の起源による差が見られ、それぞれ特徴あるフレーバープロファイルを与えることが明らかになっている。したがって、バターフレーバーを製造して商品に添加する場合、その目的に合わせて最適の酵素を選び、また分解率の最適条件などを検討する必要がある。

今回は、商品の実用化を念頭に置き、経済性にすぐれた微生物リパーゼを用いて、乳脂肪にバターフレーバーを付与するための酵素分解の条件を検討した。なお、リパーゼ処理乳脂肪の香気を形成する揮発性成分としては、脂肪が酵素により分解され遊離した脂肪酸の他に、原料乳脂肪由来の成分と脂質の酸化によって生じた成分が存在すると考えられるが、本研究では遊離脂肪酸について分析を行った。

実験材料および方法

1. リパーゼの給源

NOVO社製の微生物リパーゼ（バラターゼA）と天野製薬（株）製の微生物リパーゼ（リパーゼF）を用いた。なお、リパーゼFは*Rhizopus* sp. から

調製したものである。

2. バターフレーバー調製のための基質

業務用の無塩バター（よつ葉乳業株式会社製、冬季製造品）を用いた。これを60℃で溶解してからバターセラムを除去し、その後、温水洗を4～5回繰り返してから、セパレーターで遠心分離してバターオイルを得た。また、無水乳脂肪自然分別によって得られた低融点性画分（Soft fraction, SF）も基質としてリパーゼ分解を行った。SFの調製法としては、まず原料無水乳脂肪を23℃まで冷却し、生じた結晶を吸引濾過して液状画分（SF1）を得た。次に、このSF1を12.5℃まで冷却して中融点性画分を結晶化させ、それを濾別して得られた液状画分（SF2）を基質として用いた。

3. リパーゼによる乳脂肪の処理

酵素10mgと水10mlを300ml容三角フラスコに添加・混合し、次いで40～45℃で溶かした基質（バターオイル）90gを添加した。これをラップで密封し、40℃にて攪拌しながら反応させた。

経時的にサンプリングしてフレーバーチェック（官能評価）を行うとともに、72℃で20分間、加熱失活させた後、50℃で遠心分離（1,000rpm、15min）を行った。得られた上澄の一部（0.1g）を採取し、酸価を測定してリパーゼ分解率を算出した。

4. 酸価の測定と分解率の算出

酸価の測定は、フェノールフタレインを用いて0.1N KOH溶液で滴定して算出した。リパーゼによるトリグリセリド分解率は次式により算出した。

$$\text{分解率 (\%)} = \text{酸価} / \text{ケン化価} \times 100$$

なお、ケン化価は、乳脂肪を100%分解した時の酸価とし、今回は平均的な値の226³⁾を採用した。

5. 遊離脂肪酸の分析

遊離脂肪酸の分析は、Jong & Badings の方法¹⁾を参考にして行った。すなわち、試料を50℃で溶解して遠心分離（1,500rpm、5min）し、その上澄5gに無水硫酸ナトリウム0.1gを添加してから攪拌し、再び50℃で遠心分離（1,500rpm、3min）した。得られた上澄0.01gを採取して、ジエチルエーテルヘプタン混液（1:1、v/v）5mlに溶解した。次に、これを内部標準物質とともにアミノプロピルカラム（Sep-Pak, Waters）に注入し、クロロホルム-2-プロパノール混液（2:1、v/v）20mlで中性脂質画

分を溶出させた後、2%ギ酸含有ジエチルエーテル7mlで溶出させて遊離脂肪酸画分を得た。この画分を1mlまで濃縮し、その1 μ lをガスクロマトグラフに注入して組成分析を行った。ガスクロマトグラフはFID検出器付ShimadzuGC-13A型を用い、Chrompack CP-WAX58CB (25m \times 0.32mm i.d., Df=0.2 μ m)のキャピラリーカラムを使用した。なお、内部標準物質としてC7、C13およびC17の飽和脂肪酸を用い、それに対する各脂肪酸の比率を算出して定量した。なお、内部標準物質に対する各脂肪酸の補正係数を予め既知試料を用いて算出した。

6. 官能評価

リパーゼで処理されたサンプルは、熟練したパネリスト5名により、そのままの状態のもの、無臭ショートニング(日清製油アリナーゼ10)に希釈(200~1,000倍)したもの、ならびに無塩バターに1%添加してマドレーヌを焼き上げたものについて、それぞれ官能評価された。

結果と考察

1. リパーゼの選定

2種の市販リパーゼ(パラターゼAとリパーゼF)を用いて乳脂肪を分解した結果をFig. 1に示す。48h後の分解率は、パラターゼAでは12%、リパーゼFでは33%で、リパーゼFの分解率の方が高かった。官能試験における分解物のフレーバー強度については、パラターゼAとリパーゼFとの間でほとんど変わらなかった。フレーバーの質については、パラターゼAを用いた場合はよりシャープなランシッド臭があり、一方、リパーゼFを用いた場合も基本

的にはランシッド臭であったが濃厚感と深みを感じられた。これは、パラターゼAによって遊離した脂肪酸にはフレーバー強度の強い短鎖タイプが多く、より刺激的に感じられることによると推測される。リパーゼF処理の場合は、分解率は高いがフレーバー強度の弱い中鎖脂肪酸が比較的多く遊離するので刺激臭は和らげられ、強度的にはパラターゼAの場合と変わらなくなるものと判断される。マドレーヌの実用試験では、焼成時に短鎖脂肪酸が散逸するために両リパーゼを用いた場合の差は大きく、リパーゼFの方が顕著にフレーバーが強くて好ましく感じられた。

以上の結果より、以後の実験においてはリパーゼFを用いて乳脂肪を分解する条件について検討を進めた。

2. リパーゼFによる乳脂肪分解

1) 水相量と酵素添加量の影響について

リパーゼFによる乳脂肪分解の経時的变化をFig. 2に示す。比較対照区の条件(control)と水相量を2倍にした条件を比較すると、水相量が増えた方がやや分解率が高かったが実用レベルでは影響のない範囲であった。また、酵素量を5倍にした条件では、比較対照区と比べて反応の起ち上がりが速く、2hでの分解率が20%を越えた。このように、酵素を過剰に添加することによって短時間で分解率が上がることが示されたが、時間が経過するにつれて両者の分解率の差は縮小した。

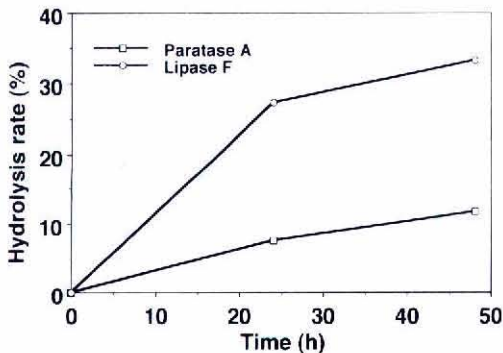


Fig. 1. Hydrolysis rate of butter oil by commercial lipases.

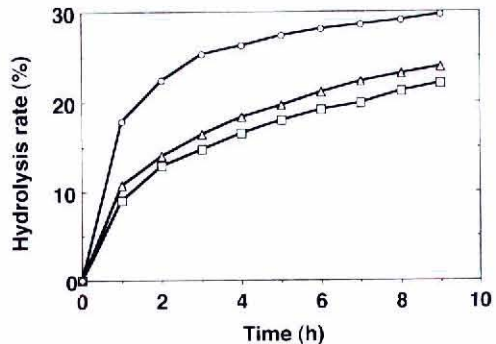


Fig. 2. Hydrolysis rate of butter oil by Lipase F under different conditions.

□ Control
 △ 1/2 dilution of the reaction mixture with H₂O
 ○ 5 fold of enzyme

フレーバーに関しては、いずれの条件でも反応開始3h後まではバター臭が残っていたが、それ以上に分解時間を長くすると、経時的にランシッド臭が強くなった。また、controlの9h後（分解率22%）と酵素5倍量の2h後（分解率22%）のフレーバーを比較すると、フレーバーの質も強さも違っており、後者の方が基質のバター様臭が残っており良好であった。岩井は、より少量の酵素を用いて反応時間を延長させると、同じ分解率に達した短時間の分解と比べて異臭（ランシッド臭）を伴うことを報告している³⁾。この主な原因は、長時間の攪拌による有効フレーバー成分の揮散であると考えられている。一方、マドレーヌでの実用試験においては、前者（9h後）と後者（2h後）を比較した結果、両者のフレーバーの違いは多少感じられたが、特に後者のフレーバーが良好という結果ではなかった。

2) pHとミネラルの影響について

pHの影響を調べるために、水道水（pH 8.03）に酵素を懸濁（酵素10mg/水道水10ml）させるとpHは6.76となり、また蒸留水（pH 5.00）を用いた酵素溶液の場合は、pH 5.62であった。このように酵素溶液の段階では水道水と蒸留水とのpHの差（3.03）が1.14にまで縮まっているのは、リパーゼ自体の緩衝作用によるものと考えられる。両条件でのリパーゼ分解では、分解率、フレーバーともに本質的な違いがなく（データ非掲載）、水道水を用いてもpHの違いやそれに含まれる微量ミネラルの影響は出ないことが判明した。

これまでに、バターオイルのリパーゼ分解ではpHの重要性が指摘されており、Garciaらはフレーバーに関係する短・中鎖脂肪酸は低pH（5~6）領域で遊離速度が速いと報告している⁶⁾。また、蟹沢らは高分解率になると遊離脂肪酸中のC4の占める割合が高くなるとしているが⁷⁾、このことはpHの影響と推測される。また、水道水中に含まれる微量のミネラルが分解反応に影響を及ぼし⁸⁾、特にその中に含まれるFe²⁺が酵素反応を阻害するとの報告がある⁹⁾。しかし、本研究ではそれらの影響は確認されなかった。また、微量のFe²⁺の阻害作用は長時間の反応では消失し、最終的にはFe²⁺が存在しない条件と同一の結果が得られることが知られている。

次に、アルカリ条件下（pH 8.01とpH 7.99、それぞれNaOHとCa(OH)₂で調整）での影響を調べたところ、分解率に関しては比較対照（pH 5.00）とはほとんど差がなかった（データ非掲載）。Na⁺やCa²⁺の影響に関しては、*Rhizopus delemar*のリパーゼの場合、どちらの陽イオンもわずかに活性を増加（それぞれ1.3倍と1.2倍）させると報告されている⁷⁾。Ca²⁺については、遊離脂肪酸と結合してカルシウム石鹸を生じ、それが反応液の乳化状態に変化をもたらすことによると推論されているが、本研究ではCa²⁺による阻害効果は観察されなかった。

また、フレーバーに関しては、Ca²⁺添加条件では24h後で少し比較対照区とは官能的に異なっていたが、両者の分解率には差がないことから、それは遊離脂肪酸の組成の違いを反映していると推測される。また、カルシウム石鹸が生じたことがフレーバーの変化を引き起こしたことも考えられる。しかし、48h後ではフレーバー強度の強弱（Ca²⁺添加の方が強い）は観察されたが、質的な違いは認められなかった。

3) 遊離脂肪酸プロファイルに及ぼす反応時間の影響について

リパーゼFを用いて反応時間の違い（24hと48h、分解率と総遊離脂肪酸量は、前者で27%と1,366 $\mu\text{mol/g}$ 、後者で33%と1,546 $\mu\text{mol/g}$ ）が遊離脂肪酸プロファイルおよびフレーバーの質に及ぼす影響を調査した。Fig. 3に分解した乳脂肪中の遊離脂肪酸プロファイルを示す。リパーゼFを用いた分解により遊離した脂肪酸としては11種が検出され、そのう

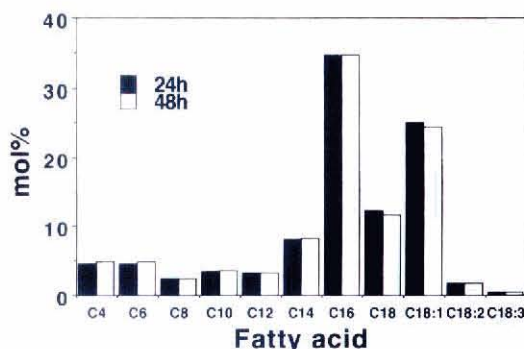


Fig. 3. Free fatty acid profiles released after 24h and 48h from butter oil by Lipase F.

ち主な脂肪酸は24hおよび48hのどちらの分解時間においてもパルミチン酸 (C16、35%)、オレイン酸 (C18:1、25%) およびステアリン酸 (C18、10%) であった。このように、24hと48hを比較すると、単に分解率 (Fig. 1) に基づく遊離脂肪酸の量的な違いが生じたのみで、その組成には差は認められなかった。また、ショートニング希釈およびマドレーヌでの実用試験においても、フレーバー強度による差が分解24hと48hとの間で認められた。

3. 低融点性画分のリパーゼ分解

乳脂肪から調製した低融点性画分をリパーゼFで処理した時の分解率および遊離した脂肪酸量を Table 1 に示す。48hでの分解率は、SF1を基質とした場合は27.7%で、SF2の場合は26.8%となり、通常のバターオイルよりも低下した。また、生成した遊離脂肪酸量 (SF1で1,311 $\mu\text{mol/g}$ 、SF2で1,258 $\mu\text{mol/g}$) もバターオイルを基質とした場合 (1,546 $\mu\text{mol/g}$) と比べて少なかった。これらのことは、リパーゼFの基質に対する脂肪酸鎖長と結合位置に対する特異性に起因すると考えられる。なお、低融点性画分の場合、分解反応は24h以内でほとんど進み、反応時間24hと48hではフレーバーにも変化が生じなかった (データ非掲載)。

SFを用いるとフレーバーの質は刺激臭が弱くて風味的にマイルドとなり、弱いエステル様臭を生じた。また、マドレーヌでの実用試験においても、バターオイルの場合よりも風味的に良好であった。一般に、乳脂肪の自然分別によって得られたSFは、元のバターオイルと比べてバター風味が強くなっている。この原因は、恐らくバターフレーバーを構成する化合物が分別の過程でSFへ濃縮されたことによると考えられる⁶⁾。

低融点性画分のリパーゼ分解 (反応48h) で生成した遊離脂肪酸のプロファイルを Fig. 4 に示す。バターオイルを1段階分別から2段階分別へと分別を進めると、得られる低融点性画分における短・中鎖脂肪酸 (C4~C12) および不飽和脂肪酸 (C18:1~C18:3) の割合が高くなるが、リパーゼFによる分解で遊離した短・中鎖脂肪酸の割合にはバターオイルとの間でほとんど差が生じなかった。バターオイルプロフィールとの違いはC16とC18:1に見られ、SFではバターオイルと比べて前者の割合が減少し、後

Table 1. Hydrolysis rate and free fatty acid amounts liberated after 48h from butter oil and its soft fractions by Lipase F

Substrate	Hydrolysis rate (%)	Free fatty acid ($\mu\text{mol/g}$)
Butter oil	33.3	1,546
SF1	27.7	1,311
SF2	26.8	1,258

SF1: Soft fraction obtained by first step fractionation of butter oil

SF2: Soft fraction obtained by second step fractionation of SF1

者の割合が増加した。このことは、マドレーヌでの実用試験におけるSFのリパーゼ分解物によるフレーバー改善効果が、短・中鎖の遊離脂肪酸によるものではなく、分別によって濃縮された他のフレーバー成分に原因していることを示唆している。また、蟹沢らは、*Candida cylindracea* リパーゼを用いて分解率が高い条件 (低pH) では、C4~C12、C16 およびC18の遊離速度が速く、一方、分解率が低い条件 (高pH) ではC18:1とリノール酸 (C18:2) の遊離速度が速いことを報告している⁷⁾。本実験でもSFの分解率が低いので (30%以下)、不飽和脂肪酸の方が反応初期で分解されやすく、そのことも遊離した脂肪酸プロフィールに差 (C18:1の増加) を生じた一因と類推される。

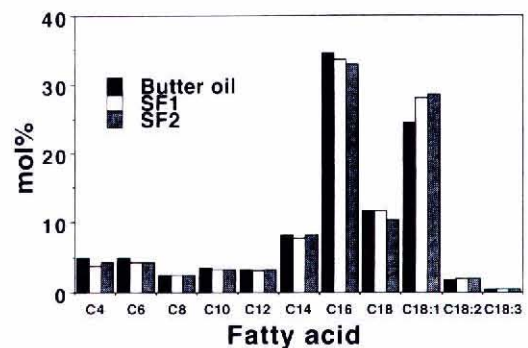


Fig. 4. Free fatty acid profiles released after 48h from soft fractions (SF1 and SF2) of butter oil by Lipase F.

文 献

- 1) 蟹沢恒好：乳技協資料, **40**, 202 (1990)
- 2) 蟹沢恒好, 山口雄三, 服部達彦：日食工誌, **29**, 693 (1982).
- 3) 佐々木林治郎, 津郷友吉：乳の化学, 地球出版, p.30 (1962).
- 4) C. D. Jong and H. T. Badings: *J. High Resolution Chromatography*, **13**, 94 (1990).
- 5) 岩井美枝子：科学と工業, **52**, 98 (1978).
- 6) H. S. Garcia, C. H. Amundson, and C. G. Hill Jr.: *J. Food Sci.*, **56**, 1233 (1991).
- 7) 岩井美枝子：リパーゼ, 幸書房, p.152-173 (1991).
- 8) N. J. Walker, P. A. E. Cant, and A. R. Keen: *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.*, **12**, 94 (1977).

Summary

In order to enhance natural butter flavor, butter oil hydrolysis was carried out using commercial lipases derived from microorganisms.

- 1) Comparisons of Paratase A and Lipase F, showed Lipase F had a higher hydrolysis rate and better flavor. Furthermore, increasing the amount of enzyme gave a higher hydrolysis rate in a shorter time.
- 2) Different amounts of water in the reaction mixture (10 & 20%), the use of tap water, and the addition of hydrates had no influence on the hydrolysis rate of butter oil with Lipase F.
- 3) Eleven fatty acids were hydrolyzed from butter oil by Lipase F, the major ones being palmitic, stearic and oleic acids. In comparing the 24h and 48h reaction times we found there were slight differences in the amount of free fatty acid, but not in its profiles. The sensory evaluation of lipase-hydrolyzed butter oil in the shortening-dilution system and confectionery making test showed that there was a notable difference in intensities of the flavors between 24h and 48h hydrolysis.
- 4) Although the hydrolysis rates of soft fractions from butter oil with Lipase F were lower compared to those of butter oil, there were no notable differences

in the composition of free fatty acids with short and medium carbon chains. The rancid flavor of lipase-hydrolyzed soft fractions was light and mild, and the flavor-improving effect was also observed in the confectionery making experiment. However, we believe that the effect could be due to the increasing amounts of flavor compounds moved from the butter oil to the soft fractions during the fractionation process.

Key words : butter, milk fat, lipase, hydrolysis, flavor