

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3798467号

(P3798467)

(45) 発行日 平成18年7月19日(2006.7.19)

(24) 登録日 平成18年4月28日(2006.4.28)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 1 C	3/04	(2006.01)	C 1 1 C 3/04
C 1 1 C	1/08	(2006.01)	C 1 1 C 1/08
C 1 2 P	7/64	(2006.01)	C 1 2 P 7/64

請求項の数 10 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平8-111769	(73) 特許権者	590002013
(22) 出願日	平成8年5月2日(1996.5.2)		ソシエテ デ プロデュイ ネットスル ソ
(65) 公開番号	特開平8-302384		シエテ アノニム
(43) 公開日	平成8年11月19日(1996.11.19)		スイス国シーエィチー 1 8 0 0 プベイ,
審査請求日	平成14年9月6日(2002.9.6)		ピー. オー. ボックス 3 5 3
(31) 優先権主張番号	95201151 8	(74) 代理人	100066692
(32) 優先日	平成7年5月4日(1995.5.4)		弁理士 浅村 皓
(33) 優先権主張国	オーストリア(AT)	(74) 代理人	100072040
			弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人	100089347
			弁理士 木川 幸治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高度不飽和脂肪酸の酵素分画方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

高度不飽和脂肪酸の本質的酵素分画方法であって、脂肪酸混合物の酵素触媒作用によるエステル化をメタノールを用いて行い、形成されたメチルエステルを未反応の脂肪酸からこの脂肪酸を水性媒体中の弱塩基を用いて鹼化することによって分離し、形成された石鹼を水により抽出し、その水性相を酸性化し、形成された脂肪酸をヘキサンを用いて抽出して、目的の高度不飽和脂肪酸を豊富化した画分を得る方法。

【請求項 2】

出発脂肪酸混合物は高度不飽和酸の豊富な油のトリグリセリドの全酵素加水分解由来のものを使用する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

使用油は n-3 および n-6 系脂肪酸、特にガンマリノレン酸が豊富で、特に黒スグリ種子油、ルリヂサ油および月見草油から選択した油である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

弱塩基はナトリウム、カリウムまたはアンモニウムの炭酸塩、リン酸塩、クエン酸塩またはその混合物であり、反応媒体を水性相および有機相に分離する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

鹼化は炭酸ナトリウム水溶液と反応させて行う、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

10

20

反応は20°～80℃の温度で攪拌しながら行う、請求項4記載の方法。

【請求項7】

反応は攪拌速度を高め、温度を徐々に約45°～約75℃に上げて行う、請求項4記載の方法。

【請求項8】

相の分離は塩化ナトリウム飽和溶液を添加して強化する、請求項4記載の方法。

【請求項9】

水溶性脂肪酸含有水性相は脂溶性エステル含有有機相から遠心分離により分離する、請求項4記載の方法。

【請求項10】

遊離脂肪酸は水性相を酸、特に濃塩酸により酸性化後、ヘキサンにより抽出し、次いでヘキサンを特に蒸発により除去して回収する、請求項4記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は本質的に酵素による高度不飽和脂肪酸の分画方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

n-6およびn-3系脂肪酸は、特にプロスタグランジンの生合成における前駆体として栄養価を有する。各種栄養品および化粧品適用に対しこれらの脂肪酸の豊富化画分を利用することは有利である。これらの脂肪酸は主としてトリグリセリドとして天然に見出される。遊離脂肪酸は高温および高圧下でトリグリセリドを加水分解して工業的に得られる。次いでこれらの脂肪酸を分画するために、いくつかの方法、例えば結晶化、蒸留、含有複合体の形成またはクロマトグラフ技術が開発された。これらの方法の適用では高度不飽和脂肪酸の場合分解を生じ、または工業的に適用するには費用がかかり過ぎることが分かった。

【0003】

酵素方法は先行方法に対する別法を表わし、ほとんどエネルギーを使用せず、応力の少ない設備を使用して温和な条件下で反応を行うことができる。

【0004】

例えば、魚油および月見草油脂肪酸を分画する酵素方法は、Matthew J. HillsらのJAOCs, 67巻、9号、561～563頁から既知であり、これは菜種リパーゼおよびMucor mieheiにより触媒され、ブタノールによるエステル化はエステル化される酸の飽和度の関数であることに基づく。高飽和度を有する脂肪酸のエステル化後、エステルは薄層クロマトグラフィにより未反応脂肪酸から分離する。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は酵素によエステル化により高度不飽和脂肪酸の豊富な油から脂肪酸を分画する方法を供することで、これはクロマトグラフ分離を避け、工業的に適用できる。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明は高度不飽和脂肪酸を本質的に酵素により分画する方法に関し、この方法は酵素触媒作用により脂肪酸混合物のエステル化を行ない、形成エステルは未反応脂肪酸から分離し、所望の高度不飽和脂肪酸が豊富化した画分を得るもので、脂肪酸エステルは脂肪酸を調整鹼化し、形成石鹸を水で抽出し、水性相を酸性化し、形成酸を非極性溶媒で抽出することにより分離することを特徴とする。

【0007】

本発明方法を実施するために、好ましくは、高度不飽和脂肪酸の豊富な油のトリグリセリドの全酵素加水分解由来の出発脂肪酸混合物を使用する。この加水分解は好ましくは、Candida cylindraceaの非領域一特異性リパーゼにより好ましくは、室

10

20

30

40

50

温で、中性pHまたは中性に近いpHで、および大気圧で乳化媒体で行う。

【0008】

出発油として、任意の天然油は高度不飽和脂肪酸、特に3以上の不飽和度を有する動物または植物または合成起源のもの、例えばガンマリノレン酸（GLA）の豊富な黒スグリ種子油、ルリヂサ油、月見草油またはアラキドン酸の豊富な「TGA」油を挙げることができる。

【0009】

エステル化はメタノールおよび溶媒、例えばヘキサンまたは少量の水の存在で行う。反応は5～70時間、好ましくは10～40時間、好ましくは室温で継続する。使用酵素は固定化しても、またはしなくてもよい。再使用できるように固定化することが好ましい。領域—特異性でも、またはなくてもよい。

10

【0010】

反応後、遊離脂肪酸および脂肪酸メチルエステルの混合物を得る。エステル化画分は高不飽和度を有する脂肪酸、例えば黒スグリ種子油の場合特にGLAおよびステアリドン酸（SA）が少なくなる。これはこれらの酸がほとんどエステル化されず、従って遊離脂肪酸画分に豊富化されることを示す。

【0011】

本発明によれば、エステルから遊離脂肪酸の分離は温和な条件下で脂肪酸の鹼化により行う。これらの条件は水性媒体中で弱塩基、例えばナトリウム、カリウムまたはアンモニウムの炭酸塩、リン酸塩、クエン酸塩またはその混合物、好ましくは炭酸ナトリウムと、室温からの出発温度、例えば20℃～約80℃までの温度で攪拌、好ましくは次第に強く攪拌しながら、徐々に温度を45℃から約75℃まで上げて反応させることを特徴とする。次に水性相と有機相間に分離が認められ、この分離は例えば飽和食塩溶液の添加により強化できる。

20

【0012】

この方法により石鹼形で水溶性になる脂肪酸のみを反応させることができる。得た水性相は、例えば遠心分離によりデカンテーション後脂溶性エステルを含有する有機相から容易に分離できる。遊離脂肪酸は酸、例えば濃塩酸により水性相を酸性化して回収し、溶媒、例えばヘキサンにより抽出することができ、次に溶媒は例えば蒸発により除去できる。

【0013】

次例は本発明を説明する。例中、%および部は特記しない限り重量による。遊離脂肪酸の定量分析は塩化アセチルによるメチレーション後気相クロマトグラフィ（GPC）により行ない、従ってメチルエステル基準である。

30

【0014】

【実施例】

例1

1.1 脂肪酸出発混合物の製造

Candida cylindraceaの非特異性リパーゼにより黒スグリ種子油の酵素加水分解由来の脂肪酸混合物を出発材料として使用した。脂肪酸混合物は次の方法で得た。

40

20%の黒スグリ種子油を含有し、1.2%の大豆レシチン（Asol 100（商標）ルーカスマイヤー）を78.8%の0.025Mリン酸塩緩衝水溶液（pH6.88）に溶解し、マイクロ流動化装置（110T，マイクロフルイディスク社，ニュートン）を5回通して油滴の平均直径を約450nmにした油／水エマルジョンを製造した。

Candida cylindraceaタイプBのリパーゼ（バイオカタリスツ社，カーディフ，英国）をリン酸塩緩衝液に溶解し、次に4000gで20分遠心分離して不溶性残留物を除去した。上澄を試験に使用した。10mlの上記エマルジョン（2gの黒スグリ種子油含有）は25mlの栓付エルレンマイヤーフラスコに入れ、37℃の温度にサーモスタット制御された浴で250rpmで電磁攪拌しながら、そこに0.2gのリパーゼに相当する酵素溶液を添加した。

50

4時間反応後、媒体は4000gで遠心分離してエマルジョンを破壊し、油相はエーテルで抽出して回収した。抽出物は水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥し、次いで溶媒を蒸発除去した。得た脂肪酸は光から保護し、窒素下で-25℃で貯蔵した。

水性相のリパーゼ溶液および形成グリセロールは限外濾過（モジュール YM10、カットオフ限界10,000、アミコン、デンバー、米国）により回収し、再使用できるリパーゼ濃溶液を得た。

反応中遊離した脂肪酸%に相当する加水分解度はMetrohm titroprocessor 692により酸-塩基滴定により測定して99.9%に相当した。エタノールおよびエチルエーテルの25mlの等量混合物に溶解した分析試料は、0.1N濃度のKOHアルコール溶液により滴定した。

10

脂肪酸混合物はメチルエステル形でGPCにより測定して次の組成を有した。

脂肪酸	%
C 16:0	7.1
C 18:0	1.7
C 18:1	13.3
C 18:2	45.6
C 18:3 ガンマ	15.5
C 18:3 アルファ	12.2
C 18:4	2.9
C 20:1	0.8
C 20:2	0.2
その他	0.8

20

1.2 エステル化

脂肪酸は11mlのヘキサンおよび1mlのメタノール混液中の900mgの脂肪酸混合物および1200mgの固定化リパーゼ（Mucor mieheiからのLipzyme TM20、ノボノルディスク社、デンマーク）を使用してメタノールによりエステル化した。この酵素は位置2と比較してトリグリセリドのグリセロール骨格の位置1および3で強い特異性を有する。反応は電磁バーを供したガラスフラスコで、機械攪拌機上に置いて20時間室温で行った。反応後、酵素は濾別し、すすぎ、10容量%の水で再水和後再使用できる。遊離脂肪酸および脂肪酸メチルエステルの混合物を得た。

30

1.3 脂肪酸およびメチルエステルの分離

20gの脂肪酸および脂肪酸メチルエステルの上記混合物を40℃に加熱し、次に水に溶解した1.1gの炭酸ナトリウムを攪拌しながら添加した。次いで攪拌速度を上げ、温度を75℃に高めた。この温度に達すると、加熱を中止し、20mlの飽和塩溶液を添加した。それにより有機相および水性相の形成が認められた。次に全体を3000rpmで10分遠心分離し、2相を分離し、次いで石鹼を含有する水性相は塩酸溶液により固化した。次に形成脂肪酸はヘキサンにより抽出し、次いでヘキサンは蒸発除去した。こうしてGLAおよびSAが豊富化した、次の組成（メチルエステルのGPC）を有する1.5gの脂肪酸を回収した。

脂肪酸	%
C 16:0	1.3
C 18:1	2
C 18:2	6.5
C 18:3 ガンマ	73.4
C 18:3 アルファ	2.4
C 18:4	13.6
その他	0.8

40

【0015】

例2

エステル化工程（例1の1.2に相当）において、9mlのメタノールおよび1mlの水から

50

成る溶媒混合物を使用したことを除いて、手順は例 1 に従った。

こうして 64.6% の GLA および 11.8% の SA の豊富化相（石鹼から得た非エステル化部分から成る）を得た。

【0016】

例 3～7

エステル化工程（例 1 の 1.2 に相当）において、酵素反応時間は表示のように変え、豊富化相の GLA% および SA% の結果は表示のように得たこと以外、手順は例 1 と同じであった（GPC によりメチルエステルを測定）。

【表 1】

例	3	4	5	6	7
反応時間、 時間	5	10	30	40	70
% GLA	70	73.5	77.6	75.6	74.8
% SA	12	13	12.6	13.3	12.8

10

20

【0017】

例 8～15

黒スグリ種子油脂肪酸混合物のエステル化を各種起源および区域一特異性の酵素により室温で 20 時間反応させて例 1（1.2 の項）のように行った。得た結果はエステル化画分の脂肪酸組成を測定して評価した（GPC によりメチルエステルで）。

【表 2】

30

例	8	9	10	11	12	13	14	15
酵 素	Rhizo- pus javanicus 生物触媒	Penicill- ium cyclop- ium	Penicill- ium roque- forti	Geotri- chum candi- dum	非特異的リパ ーゼ混合物	Candida cylindrica タイプ	Rhizo- pus javanic- us タイプ F-AP 15	Asper- gillus niger タイプ AP 6
C 13:0	—	—	—	0.5	—	—	—	—
C 16:0	7.6	5.8	8.8	11.2	8.4	7.9	8.1	7.6
C 16:1	—	0.1	—	—	—	—	—	—
C 18:0	1.2	1.1	1.8	1.8	1.5	1.4	1.3	1.4
C 18:1	15.8	15.7	16.3	12.8	16.9	15.9	15.4	17.4
C 18:2	57	59	54.9	48.7	56.8	56.2	56.1	57.7
C 18:3 ガンマ	2.1	1.6	2.2	1.2	1.8	2	5.1	2
C 18:3 アルファ	14.5	15.3	13.5	7.2	12.3	14.4	12.9	13
C 18:4	—	—	—	1.8	1	0.3	—	—
C 20:1	0.6	0.6	0.8	0.6	—	0.8	0.6	0.8
C 20:2	—	0.2	—	—	—	0.2	—	—
その他	1.3	0.6	1.8	14.2	1.4	0.8	0.5	0.1

(注) —: 定量し得ず

上記結果は、すべての場合エステル化画分はG L AおよびS Aが減少したことを示す。これはこれら2つの酸がほとんどエステル化されず、従って遊離脂肪酸画分にこれらの酸が豊富化することを示す。

【0018】

例16

原料として、*Mortierella fungus*から抽出し、アラキドン酸が非常に豊富な、サントリー会社、東京、日本からの合成T G A油の全加水分解物を使用した。ト

10

20

30

40

50

リグリセリドの加水分解後、遊離脂肪酸混合物はL i p o z y m e T M 2 0により室温で20時間例1（1. 2の項）のようにエステル化した。次に遊離脂肪酸メチルエステルは薄層クロマトグラフィにより分離し、遊離脂肪酸混合物の組成を分析した。脂肪酸出発混合物およびエステル化後得た遊離脂肪酸混合物の組成は下記する（GPCによりメチルエステルを測定）。

脂肪酸組成	TGA油組成	エステル化画分	
%	%	組成 %	
C 14:0	0.7	—	
C 16:0	17.2	5.6	10
C 16:1	0.2	—	
C 17:0	0.3	0.2	
C 18:0	9.2	5.5	
C 18:1	22.3	7.7	
C 18:2	8.3	2.4	
C 18:3 ガンマ	1.7	6.5	
C 18:3 アルファ	1	—	20
C 20:0	0.9	0.9	
C 20:1	1	0.7	
C 20:2	0.7	0.5	
C 20:3	3.9	13.1	
C 20:4	20.2	40.2	
C 22:0	3.5	4.2	
C 22:6	8.2	11.2	30
その他	0.7	1.5	

(注) — : 定量し得ず

上記結果は黒スグリ種子油の場合と同様に、遊離脂肪酸画分に一層豊富化した、特にトリ不飽和脂肪酸であったことを示す。TGA中の%が低いに拘らず、GLAはアルファリノレン酸（ALA）に比し選択的に豊富化されたことも注目される。

フロントページの続き

- (72)発明者 ローレンス サンドズ
スイス国スルピオン, アン ルッティ (番地なし)
(72)発明者 ハンス ユエルゲン ヴィレ
スイス国ビルニューブ, シーエィチ. デ ラ コリス 10

審査官 渡辺 陽子

- (56)参考文献 特開平03-020398 (JP, A)
特開平06-287599 (JP, A)
特開平06-210340 (JP, A)
特開昭62-296885 (JP, A)
J. American Oil Chemists' Society, 1994年, Vol. 71, No. 6, 563-567
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C11B, C11C
A12P7