

— ノート —

脂質の消化に及ぼす乳化の影響

森内安子

Analysis of the Effects on Lipid by Emulsification

Yasuko MORIUCHI

要 旨

脂質の消化実験には乳化が必要であるが、この乳化を超音波装置からタッチミキサーに代えて実験を行った。その結果、酵素反応中にタッチミキサーを10分ごとに30秒間かけることで乳化状態を超音波の状態に近づけることができ、タッチミキサーでの脂肪の分解率は超音波に近い数値を示した。また、酵素反応時間は30分で分解率が10%以上の値であるため、必ずしも60分でなくても良い。さらに、酵素反応である以上当然ではあるが、緩衝液の必要性は明らかであった。

キーワード：乳化 emulsification

タッチミキサー touch mixer

脂肪酸 fatty acid

超音波 supersonic wave

緩衝液 buffer solution

分解 analyze

はじめに

脂質の生体内消化は胃からリパーゼが分泌されるが、量は少なく、最適 pH も 5 なので、pH 1～2 の胃液中では脂質はほとんど作用を受けない。腸ではアルカリ性の膵液、腸液の分泌によって胃液が中和され、これに胆汁酸塩が混ざって脂質はよく乳化される。乳化された脂質は、膵液のステアプシン、腸液のリパーゼの作用によってグリセリンと脂肪酸に分解される。このように、生体内の消化には酵素が重要な働きをしていることは周知のことであるが、脂質は他の栄養素と異なり酵素が作用するための条件として、乳化が必要である。

授業で脂質の消化実験をする場合、乳化の方法としては超音波装置を使用する方法が用いられているが、限られた時間内では授業前に乳化しておく必要がある。

著者は、かねてから超音波装置に代えて乳化がスムーズに行く方法を模索し、タッチミキ

サーを用いた方法を教材研究として検討した。

脂質の消化実験の測定方法¹⁾には、(i)加水分解の結果生成するグリセロール測定、(ii)遊離脂肪酸滴定、(iii)遊離脂肪酸キレート化合物による比色測定という方法があるが、学生実験では一般的方法として分解により生じた脂肪酸を中和する中和滴定法が用いられ、現在でも代表的な方法と考えられているためこの方法を用いた。

試料、試薬および装置

1. 試料・試薬

オリーブ油、2%胆汁酸塩液、0.5%リパーゼ酵素液、アセトン・エチルアルコール(1:1)混合液、1%フェノールフタレイン指示薬、N/20NaOH アルコール溶液、2%塩化カルシウム溶液、アンモニウム緩衝液(1NNH₄OH 165ml と 1NNH₄Cl 335ml を混合し、pH 9 に調整する。)

2. 装置および器具

TUBE ミキサー((株)アズワン)、超音波洗浄装置(島津製作所)、振とう恒温層(大洋科学工業)

実験の基本操作

1. 測定条件

脂肪酸のエステルであるオリーブ油に胆汁酸塩を用いて均質なエマルジョンとし、この乳化液と酵素 1 ml とを37℃、最適 pH のもとで指定時間反応させて、生成した脂肪酸を N/20NaOH アルコール溶液で滴定する。

2. オリーブ乳化液の調整

オリーブ油 1 ml (精秤) を試験管にとり、2%胆汁酸塩 4 ml を加えてタッチミキサーあるいは超音波装置に 5 分間かけてエマルジョンを作る。

3. 活性度の測定

オリーブ油乳化液それぞれにアンモニウム緩衝液 2 ml と 2%塩化カルシウム溶液 0.5 ml を加えて振とうし、37℃の恒温水槽内で10分間予熱する。本試験の試験管に酵素液 1 ml を加え振とうし、37℃の恒温水槽内で指定の時間反応させる。反応後、直ちにアセトン・エチルアルコール混合液 20 ml を加え反応を停止させてから、空試験の試験管に酵素 1 ml を加える。1%フェノールフタレイン液を指示薬として N/20NaOH アルコール溶液で滴定する。

実験基本操作方法を図 1 に示した。

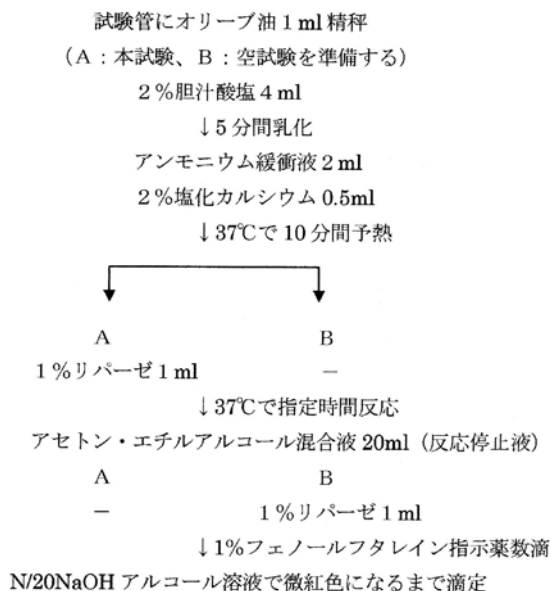


図1 脂肪の分解操作方法

4. 計算

$\text{NaOH (mg)} = 185.5 \text{ (オリーブ油のケンカ価)} \times 40 \div 56 \times \text{オリーブ油の重量}$

$\text{加水分解率} = 2 \times (A - B) \times f \text{ (N/20NaOHアルコール溶液の } f) \div \text{NaOH(mg)} \times 100$

A：本試験の滴定値

B：空試験の滴定値

なお、計算式はケン化価が KOH で求められた数値であるため、使用する NaOH に換算して分解率を計算した。

実験方法と結果および考察

1. 乳化方法と分解率

基本操作に基づきタッチミキサーあるいは超音波装置で5分間乳化した後、37°C恒温層で15分、30分、および60分間反応させて1%フェノールフタレイン液を指示薬として N/20NaOH アルコール溶液で滴定し分解率を求めた。実験はそれぞれ5回行った。その結果を表1と図2に示した。

表1、図2の結果からまず言えることは、初めに乳化が5分間のみであるため、時間の経過に伴い分離が進み超音波、タッチミキサーともに15分、30分および60分間反応の分解率は比例しなかった。しかし、乳化器具の違いをみると超音波のほうが分解率は高値を示し、30分反応では超音波はタッチミキサーの分解率の差が最も高く約2倍はあるが、15分ではほとんど差が認められない。さらに60分反応では超音波とタッチミキサーの分解値は超音波の1.3倍に比べ

表1 乳化器具の違いによる脂肪分解率 (%)

反応時間	15分	30分	60分
超音波装置	3.04±0.12	10.95±1.52	14.70±1.73
タッチミキサー	3.49±0.31	4.67±0.52	10.84±0.08

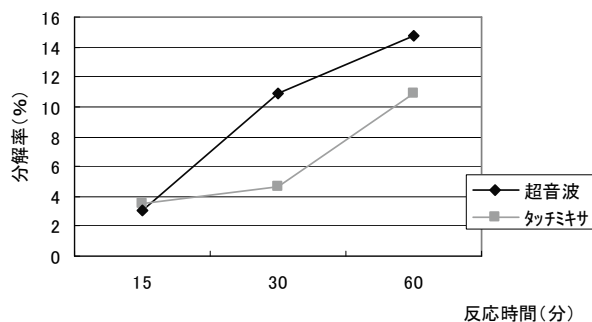


図2 乳化装置による脂質の分解率

タッチミキサーは2.3倍の上昇で高くなった。先にも述べたように超音波は事前の乳化の準備が難しいため、これらを考慮し、超音波に代用としてタッチミキサーを使用することを考えた。すなわち、分解率を超音波の数値に近い値を出すためには、タッチミキサーの乳化回数を増やして分離を抑えると分解率が高くなると考えられる。また、学生実験の限られた時間内では乳化から分解までを行うには60分よりは30分反応で結果を出す方法が望ましい。そこで、基本操作に基づき乳化器具はタッチミキサーを用いて、反応30分間に5分毎と10分毎に30秒間乳化する、乳化回数を変えて分解率を求めた。いずれも実験はそれぞれ5回行った。その結果を表2に示した。

タッチミキサーの乳化回数は10分毎に比して5分毎に乳化するほうが約15%分解率は高くなってはいるが、乳化10分毎の分解率が超音波の数値に近い値であるので、操作の煩雑さを考えると10分毎に乳化をする方法で充分であると考えられる。

表2 乳化回数の変化と脂肪分解率 (%)

タッチミキサー	5分毎	10分毎
30分間反応	13.74±1.35	11.56±2.09

2. 添加試薬と分解率

乳化液に緩衝溶液としてアンモニウム緩衝液 2 ml と活性化剤として 2 % 塩化カルシウム溶液 0.5 ml を添加するが、学生実験では時として試薬を入れずに反応終了後に気づくというケースもあり、限られた時間内で再度実験するには時間に余裕がない。そこで、それぞれの試薬の添加による分解率への影響を調べた。

基本操作に基づきタッチミキサーを用いて乳化を行い、30分間反応 (10分毎に乳化をする)

表3 試薬の添加による分解率 (%)

	添加試薬の有無		
	○	○	—
アンモニウム緩衝液	○	○	—
塩化カルシウム	○	—	○
分解率	11.36±1.55	10.18±0.46	6.43±1.78

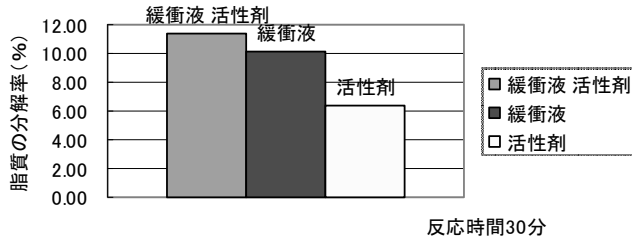


図3 試薬添加による分解率

させ分解率を求め、実験は各5回行った。

乳化の後、アンモニウム緩衝液、2%塩化カルシウム溶液の添加の有無は分解率にかなりの差を生じた。その結果を表3と図3に示した。

アンモニウム緩衝液の無添加による分解率は添加に比べ約43.4%が減少した。周知のことではあるが、酵素作用には緩衝液が必要なのは明らかである。一方活性剤である塩化カルシウムの添加が及ぼす分解率への影響はアンモニウム緩衝液ほど顕著ではないが、約10%が減少した。

まとめ

本研究は、脂質の消化実験には乳化が必要であるが、その乳化作業を超音波装置に代えて、学生自身が授業時間内に乳化も体験できるタッチミキサー方法の検討と、それをを用いた実験操作法の確立を目的にして行ったものである。

まず超音波装置に代わるタッチミキサーによる乳化は、確かに超音波装置の方が乳化状態は優れていた。しかし、事前に超音波をかけて各班の乳化液を準備するのは大変であり、さらに学生が乳化過程を確認できないなどのデメリットを考えるとタッチミキサーを用いた乳化を考える必要があった。そこで、超音波の乳化状態に近づけるために乳化回数を増やし、酵素反応時間中に10分ごとにタッチミキサーを30秒間かけた結果、脂肪の分解率は超音波とほぼ同値になった。もちろん、学生実験に使用するのであるから、タッチミキサーを各班に準備する必要がある。超音波装置に比べるとタッチミキサーは安価であるので経費的な側面から見ても妥当である。また、酵素反応時間は30分でも分解率が10%以上の数値を示したため、必ずしも60分反応しなくても良いと考える。

なお、学生実験では試薬を添加せずに反応終了後に気づくという班もあるので、緩衝液と活

性剤の両試薬の添加の有無について分解率への影響を調べた。その結果、予想していたとおり、緩衝液は酵素反応には必要なものであるので無添加の場合は約50%の減少になっていたが、活性剤である塩化カルシウムの無添加では約10%の減少にとどまっていた。いずれも試薬の入れ忘れは実験としては良くないことではあるが、限られた時間内で実験のやり直しができない場合もあるため、減少率を知らせることにより、それぞれの試薬の役割と大切さを学生に周知させることができると考える。

現在当実験室では、念のため酵素反応時間を60分にしてこの方法を学生実験に採用しているが、学生が報告する分解率はほぼ満足できる値である。

参考文献

- 1) 林淳三編・浅野勉・倉沢新一ほか：生化学実験，建帛社，1993