鶏卵の貯蔵中の変化に関する研究 (第 2 報)*

卵白蛋白質の分別分析及びその組成変化について

佐 藤 泰, 中 村 良 (名古屋大学農学部農芸化学科)

昭和 34 年 4 月 14 日 受 理

緒 言

著者らは前報⁽¹⁾で卵白構成蛋白質の貯蔵中の組成変化について電気泳動法による測定結果を報告した。しかし電気泳動法によって求められた各蛋白成分の全蛋白質に対する比率は、貯蔵中に各蛋白質の分解が行われないことを仮定して求めた値である。従って卵白蛋白質組成の変化を経時的に比較するには、化学的方法によって卵白を蛋白質区分と非蛋白質態窒素化合物区分とに分別し、その各々の変化を測定して、その結果を電気泳動分析の結果と併せて考察しなければならない。しかるに卵白蛋白質の化学的分別方法についての研究はこれまでに報告されていない。よって著者らは Fredericq 及び Deutsch の ovomucoid の調製法⁽²⁾を参照し、数種の蛋白沈澱剤につき検討した結果、卵白を蛋白質、peptone、低分子 peptide 及び amino acid の三区分に分別する方法を案出した。次いでこの方法を貯蔵卵に適用し、得られた結果と前報⁽¹⁾の実験結果とに基づき、貯蔵中における各蛋白質の変化について考察した。次にその結果を報告する。

実 験 の 部

実験 1 卵白の蛋白質区分と非蛋白質区分との分別定量法

(i) 分別定量法 下記の如く 4 段階に分けて行う。

(a) 卵白 25.00 g を 50 cc 定容フラスコ中に精秤し、1 N H_2SO_4 で pH 3.5 に調整し、全容を 50 cc とした後濾過し、この濾液を A とする。

(b) 濾液 A 25 cc に予め 1 N NaOH で pH 3.0 に調整した 10% トリクロル酢酸 25 cc を加え、遠心分離を行い、得られた上澄液を B とする。

(c) 上澄液 B 10 cc に無水アルコール 50 cc を加えて濾過し、濾液を C とする。

(d) 上澄液 B 10 cc に 5% 燐モリブデン酸 (2 N HCl 溶液) 10 cc を加えて濾過し、濾液を D とする。

全窒素及び A, B, C, D 各溶液の窒素を Semi-micro Kjeldahl 法で定量し、得られた値を卵白乾物 1 g 中の窒素 mg として表示したものを、夫々全-N, A-N, B-N, C-N, D-N とすると、ovomucin, ovomucoid, mucin 及び mucoid 以外の蛋白質, peptone, 低分子 peptide 及び amino acid 態の窒素は夫々次の様に算出される。

$\text{ovomucin-N} = \text{全-N} - \text{A-N}$, $\text{ovomucoid-N} = \text{B-N} - \text{C-N}$, mucin 及び mucoid 以外の蛋白質-N = $\text{A-N} - \text{B-N}$, $\text{peptone-N} = \text{C-N} - \text{D-N}$, 低分子 peptide 及び amino acid-N = D-N。

(ii) 分別定量法の検討

(a) 実験方法：新鮮卵卵白より次記の方法により調製した各蛋白質標品、すなわち ovomucin, ovomucoid, ovalbumin 及び市販ペプトンを新鮮卵の水様卵白及び実験 (i) の濾液 A に加えて以後の操作を行い、添加前後の濾液中の窒素を定量し、各標品の回収率を測定した。

各蛋白質標品の調製法及び窒素分析の結果は第 1 表に示す通りである。また市販ペプトンの沈澱剤に対する性質は第 2 表に示す通りである。

(b) 実験結果：各標品の回収率は第 3 表に示す通りである。

実験 2 貯蔵卵卵白の分析

(i) 卵白蛋白質組成の貯蔵中における経時的変化の測定

(a) 貯蔵条件及び供試料の調製法：前報と同一条件の下に $30 \pm 1^\circ$ にて貯蔵し、供試料も前報と同一調製法を用いて調製した。

* Studies on Changes in Stored Shell Eggs. Part II. Fractionation of the Egg White by Chemical Method and Changes of its Constituent during Storage.
By Yasushi SATO and Ryo NAKAMURA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Nagoya)

第 1 表 各種蛋白質標品の調製法及び分析結果

標品名	窒素含有率	調製法
ovomucin	12.41%	Lanni 等の方法 ⁽³⁾
ovomucoid	13.09	Fredericq 及び Deutsch の方法 ⁽²⁾
ovalbumin	15.77	Keckwick 及び Cannan の方法 ⁽⁴⁾

第 2 表 供試ペプトンの沈澱剤に対する性質

沈澱剤名	5%	83.3%	2.5%
	トリクロル酢酸	アルコール	燐モリブデン酸
沈澱部分 %	0	0	66.9

第 3 表 本分別定量法における各標品の回収率

被添加物名及び窒素量	添加物名及び窒素量	回収された添加物の窒素量	回収率 (%)
名称	窒素量 (mg)	名称	窒素量 (mg)
水様卵白	26.95	ovomucin	6.21
濾液 A	47.24	ovalbumin	8.67
濾液 A	79.50	ovomucoid	17.41
濾液 A	127.0	{peptone* ¹	28.42
		{amino acid* ²	14.40
			13.53

*1 本 peptone は市販ペプトンの内で 2.5% 燐モリブデン酸で沈澱する部分を示す。

*2 本 amino acid は市販ペプトンの内で 2.5% 燐モリブデン酸で沈澱しない部分を示す。

第 4 表 貯蔵中における水様卵白窒素化合物の経時的変化

貯蔵日数	0	10	20	30	40
各形態の N					
ovomucin-N	2.4	1.7	1.1	(1.7)*	(2.2)*
ovomucoid-N	9.7	7.9	6.9	7.4	7.8
mucin, mucoid 以外の蛋白質-N	87.2	89.6	91.3	90.1	89.1
peptone-N	<0.1	0.4	0	0	0.3
低分子 peptide 及び amino acid-N	0.7	0.4	0.7	0.8	0.6
全-N	100	100	100	100	100
	(140.3)	(136.3)	(134.3)	(135.8)	(137.9)

* 30 日及び 40 日の試料において ovomucin-N の値が若干大きくなっているのは、濃厚卵白と水様卵白の分離が完全に行えないためと考えられる。よってこの値は考慮しない。

(注) 全-N の括弧内の数字は卵白乾物 1g 当りの全-N mg 数を示す。

第 5 表 貯蔵中における濃厚卵白窒素化合物の経時的変化

貯蔵日数	0	10	20	30
各形態の N				
ovomucin-N	14.1	11.1	7.5	6.6
ovomucoid-N	9.5	7.9	7.5	7.9
mucin, mucoid 以外の蛋白質-N	75.7	80.4	84.3	84.7
peptone-N	<0.1	0.2	0.2	0
低分子 peptide 及び amino acid-N	0.6	0.4	0.5	0.8
全-N	100	100	100	100
	(145.2)	(139.5)	(137.2)	(139.6)

(注 1) 濃厚卵白においては貯蔵 40 日の試料がえられなかったため、分析は行なわなかった。

(注 2) 全-N の括弧内の数字は卵白乾物 1g 当りの全-N mg 数を示す。

法で充分であると考えられる。

2. 貯蔵卵卵白の分別分析の結果について

(1) 新鮮卵卵白における水様卵白と濃厚卵白との分析結果の比較 第 4 表、第 5 表及び第 6 表において、両卵白の分析結果を比較すると、ovomucin, ovomucoid 及び mucin, mucoid 以外の蛋白態窒素の百分率に夫夫差が認められる。従来報告においては ovomucin 以外の蛋白質の差については報告されていない。しかし、

(b) 分析方法：前記実験 1 の分別定量法による。

(c) 実験結果：貯蔵卵分析結果は、水様卵白については第 4 表、濃厚卵白については第 5 表に示す通りである。なお分析値は、すべて全 N に対する各形態の N % として表示した。但し、全 N の絶対値のみを併せて表示した。

(ii) 全-N, ovomucoid-N, mucin 及び mucoid 以外の蛋白質-N の変化の推計法による確認

(a) 供試料の調製：貯蔵卵において、濃厚卵白と水様卵白との分離が困難であるから、本実験では供試料の調製法を次の様に改めた。すなわち、新鮮卵を無菌的に割卵し、卵白を始めから濃厚卵白と水様卵白とに分け、その各々を滅菌試験管に入れ、綿栓して $30 \pm 1^\circ$ の通風器を有する恒温室に 0 日及び 20 日間貯蔵し、濃厚卵白の水様化したものは除き供試料とした。なお実験に供した試料はすべて 8 ケである。

(b) 各形態の蛋白質の分別定量法：実験 1 の分別定量法による。

(c) 実験結果：実験結果は第 6 表に示す通りである。なお分析値は各供試料の分析値の平均値を、全窒素のみ卵白乾物 1g に対する窒素 mg として表示し、ovomucoid-N 及び mucin, mucoid 以外の蛋白質-N は全-N に対する百分比として表示した。

考 察

1. 分析方法について 本分析に用いた標品のうち、protease, peptone 或はこれらより更に高分子の蛋白分解物の標品が得られなかったため、市販ペプトンを用いて実験を行った。しかし電気泳動法による分析結果の検討という本研究の目的には本

第 6 表 各形態の窒素化合物の変化量に対する信頼性の判定

貯蔵日数 及び差の判定	全-N		ovomucoid-N		mucin, mucoid 以外の蛋白質-N	
	水様卵白	濃厚卵白	水様卵白	濃厚卵白	水様卵白	濃厚卵白
0 日	137.8* ¹	136.1* ¹	10.2* ²	12.7* ²	86.5	74.1
20 //	136.3* ¹	132.9* ¹	7.4	7.8	93.0	85.5
日数による差の判定	なし	なし	$t=4.21$	$t=7.24$	$t=2.92$	
			危険率 1% 以下 で差あり	危険率 1% 以下 で差あり	危険率 1.5% 以下 で差あり	差あり

(註) 全-N の値は卵白乾物 1g に対する N mg を以て表示し, ovomucoid-N, mucin, mucoid 以外の蛋白質-N の値は全-N に対する百分比を以て表示した。

*¹ この結果において 0 日及び 20 日の両卵白の間にも, 夫々有意の差が認められない。

*² この結果において 0 日の水様卵白と濃厚卵白との値について推計処理を行うと $t=3.55$, 危険率 1% 以下で有意の差が認められる。

従来の分析方法がほとんど電気泳動分析のみであり, これまでに卵白の電気泳動図には ovomucin の山が得られていないことを考えると, 後に述べる如く, 本分析結果は従来の電気泳動による分析結果⁽⁶⁾と著るしく異なるものではないと思われる。

(2) 貯蔵卵卵白における各蛋白質成分の経時的変化について 第 4 表, 第 5 表及び第 6 表において両卵白の貯蔵中における各蛋白質成分の経時的変化は, ほぼ等しいことが認められる。すなわち, 第 6 表の結果から両卵白共に全窒素の変化はないと認められるから, 各貯蔵卵の全窒素を 100 として計算した各形態窒素の百分比を以て変化を考察することができる。よって第 4 表及び第 5 表によれば, peptone 及び低分子 peptide ならびに amino acid 態窒素の変化は認められず, ovomucin 及び ovomucoid 態窒素の経時的減少及び mucin, mucoid 以外の蛋白質態窒素の経時的増加が貯蔵 20 日間迄に著しいことが認められる。なお濃厚卵白においては, 水様卵白より ovomucin の減少並びに mucin, mucoid 以外の蛋白質の増加が著るしいことが認められる。

3. 電気泳動分析の結果と本分析結果との比較

(1) 新鮮卵卵白における水様卵白と濃厚卵白との分析結果の比較 電気泳動分析の結果では, 両卵白における蛋白質組成の差は認められなかったが, 本分析結果においては各構成蛋白質の間に差が認められる。すなわち第 4 表及び第 5 表の結果から濃厚卵白は水様卵白に比し, ovomucin が多く, mucin, mucoid 以外の蛋白質が少いことが認められる。また ovomucoid については第 4 表及び第 5 表においてはほとんど差が認められないが, 別個に行った推計分析の結果では第 6 表に認められる如く危険率 1% 以下で濃厚卵白に多く含まれることが認められる。この両分析結果の相異は前記の如く, 電気泳動図においては ovomucin の山が得られないため生ずるものと考えられる。すなわち ovomucin はその性質や成分において globulin に近いと考えられるので^(8,5), 電気泳動図において恐らく globulin と同じ山に含まれるのではないかと考えられる。この様に考えれば, 両卵白において ovomucin, ovomucoid 及び globulin の間に夫々差があっても, これらの蛋白質は電気泳動図において凡て一つの山として存在するので, 全体としては電気泳動図において差がないという結果になるものと考えられる。

(2) 貯蔵卵卵白における経時的変化について 本分析の結果において, 両卵白の構成蛋白質の貯蔵中における分解は認められない。よって前報⁽¹⁾で全卵白に対する百分比として求められた電気泳動分析の結果は, ovomucin を除く各区分のほぼ正確な組成を示すと考えてよい。また本分析の結果では両卵白の貯蔵中の変化の状態はほとんど同じであるが, 電気泳動分析の結果は両卵白においてかなり異なっている。よって各々の卵白の場合に分けて両分析結果を比較しつつ考察する。

(i) 濃厚卵白における変化: 電気泳動分析の結果では濃厚卵白における貯蔵中の経時的変化は認められなかったが, 本分析結果においては ovomucin 及び ovomucoid が貯蔵中に変性してその量を減じ, この両者以外の蛋白質は増加することが認められる。この両分析結果の相異は新鮮卵卵白における両卵白の分析結果の比較において述べた如く, 電気泳動図において ovomucin, ovomucoid 及び globulin の山の分離ができなかったためによるものと考えられる。よって両分析結果を総合すると, 濃厚卵白においては貯蔵中に ovalbumin 及び conalbumin は変化しないが, ovomucin 及び ovomucoid は変性し, その性質を変えると考えられる。

(ii) 水様卵白における変化: 水様卵白の電気泳動分析の結果においては, 濃厚卵白の場合と異なり, conalbumin の減少と globulin+ovomucoid の増加が認められた。また本分析の結果は ovomucin 及び ovomucoid が減少し, この両者以外の蛋白質が増加することが認められる。しかし前報⁽¹⁾において述べた如く, 電気泳動分

析及び本分析に供した水様卵白は、採卵直後に存在していた水様卵白以外に貯蔵中に濃厚卵白が水様化したものが加わったものである。従って採卵直後に存在した水様卵白は、貯蔵中に濃厚卵白の場合と同じ変化を示し、その電気泳動図も変化しないと考えられるが、貯蔵中に水様化した濃厚卵白は採卵直後に存在していた両卵白の何れとも異なった蛋白組成を示し、このものが加わることによって貯蔵卵水様卵白は全体としても電気泳動図に変化が生じたものと考えられる。よって両分析の結果を総合すると採卵直後に存在していた水様卵白は、貯蔵中に濃厚卵白と同じ変化を示すが、濃厚卵白が水様化するときには conalbumin が変性して globulin に近い成分になり、また ovomucin が次第に性質を変化して減少すると考えられる。

(3) 濃厚卵白の水様化に伴う成分蛋白質の変化について 前記の如く、濃厚卵白が水様化すると conalbumin が変性し、ovomucin が減少することが認められる。この鶏卵の貯蔵中における両卵白の変化については、これ迄にその報告をみない。しかし conalbumin についてはこれを pH 3.0 以下の酸性溶液で処理してから、電気泳動を行うと数ヶの成分に分れることは報告されている^(7,8)。従って鶏卵の貯蔵中における卵白 pH の変化及び無機塩類濃度の変化などによって濃厚卵白が水様化し、その際に conalbumin が変性して上に述べた変化を示す可能性もないわけではない。この点についてはなお今後検討するつもりである。また ovomucin の減少については ovomucin そのものの性質も明かでなく、分析方法も充分でないから真に ovomucin が減少するのか、比較的不溶性の ovomucin が可溶化するのかについてはなお今後の研究を要するところである。

要 約

鶏卵卵白を蛋白質区分と非蛋白質区分とに分別する目的を以て、種々な蛋白沈澱剤について検討した結果、卵白を ovomucin, ovomucoid, この両者以外の蛋白質, peptone 並びに低分子 peptide 及び amino acid 区分に分別する方法を考案した。次いでこの方法を貯蔵卵に適用し、濃厚卵白及び水様卵白の経時的変化を究明した。その結果両卵白ともに構成蛋白質の分解は認められず、ovomucin 及び ovomucoid の減少、並びにこの両者以外の蛋白質区分の増加が認められた。よって以上の実験結果を基にして、さきに報告した貯蔵卵卵白の電気泳動分析の結果について考察した。

終りに臨み、本研究を行うにあたり御指導を頂いた東大教授佐々木林治郎先生に厚く御礼申し上げます。なお研究費は文部省科学研究費に仰いだことを記して謝意を表します。

(本報告は昭和 33 年 5 月 5 日、日本農芸化学会大会で講演した。)

(1) 佐藤 泰, 中村 良 : 日畜会報, 29, 297 (1958).	(5) E. G. Young : <i>J. Biol. Chem.</i> , 120, 1 (1937).
(2) E. Fredericq, H. F. Deutsch : <i>J. Biol. Chem.</i> , 181, 499 (1949).	(6) R. H. Forsythe, J. F. Foster : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 20, 161 (1949).
(3) F. Lanni et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 179, 1275 (1949).	(7) J. R. Cann, R. A. Phelps : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 52, 48 (1954).
(4) R. A. Kekwick, R. K. Cannan : <i>Biochem. J.</i> , 30, 227, 235 (1936).	(8) 金森正雄, 前田一郎 : 本誌, 32, 337 (1958)