卵黄の酵素処理と卵黄脂質の分離について

西元勝也, 戸田義郎, 山本武彦*
(太陽フード株式会社, * 大阪市立大学理学部)

昭和 49 年 9 月 2 日 受 理

Enzymic Treatment of Egg Yolk and Separation of Egg Yolk Lipids

By Katsuya NISHIMOTO, Yoshio TODA and Takehiko YAMAMOTO*

Taiyo Food Co., Ltd., Yokkaichi; * Osaka City
University, Faculty of Science, Osaka

1. Incubation of egg yolk with a commercial fungal enzyme preparation sold as an acid proteinase at pH values around 4.0 resulted in increase in the yield of isopropanol extractable lipids.

2. Also, when centrifuged, the incubation mixture was separated into three layers. The top layer was neutral lipids with a small quantity of free fatty acids. The middle layer was consisted of phospholipids, neutral lipids and small quantities of their hydrolysis products, and the bottom layer, a mixture of amino acids and peptide derived from yolk protein by the proteinase action and contained almost no lipids.

3. The separation of lipid of egg yolk by the enzymic method was found to take place by the combining action of acid proteinase and a small quantity of lipase.

(Received September 2, 1974)

緒 言

鶏卵黄の脂質量は全卵のその約 99% にのぼり, 中性脂質 62%, リン脂質 33%, ステロール 5% からなり⁽¹⁾, それらの大部分は蛋白質と結合して, いわゆる lipoprotein⁽²⁻⁵⁾を形成し, これが乳化剤となって卵黄は濃厚な脂質・蛋白のエマルジョンとなっているといわれている。

卵黄中の脂質の分離には, 従来はもっぱら有機溶媒を用いる方法が適用されていた。しかし溶媒の種類や温度, 抽出の時間などの条件により, 分離されるそれぞれの脂質の量は異なり⁽⁶⁾, また分離したそれぞれの脂質には, 使用有機溶媒の微量が残存し利用上好ましくない。

著者らは, 卵黄脂質の分離には lipoprotein の蛋白部分を分解すれば, エマルジョン状態が破壊され, 脂質は自ら分離するのではないかと考え, 苦味生成が比較的少なく, しかも細菌汚染の防止に有利な酸性側で作用する *Rhizopus* 属糸状菌の proteinase 剤を用い, それを卵黄に作用させたところ, 酵素無処理卵黄に比べソプロ

パノール抽出性脂質の収量が増加し, また卵黄の脂質は予期したように, 単に遠心分離に付するだけで明らかに分離し, 有機溶媒分離法に比して, 定量的にも劣らないこと, またこの酵素的方法による脂質の分離は proteinase とともに微量の lipase が作用するときに最も効果的に行なわれることを明らかにした。本報では, これらの実験について報告する。

実 験 方 法

1. 供試酵素剤 *Rhizopus* 属糸状菌の生産する酸性 proteinase を主成分とする市販酵素剤 "Samprose" (阪急共栄物産 KK 製), 同じく *Rhizopus* より得られた lipase 活性を有しない酸性 proteinase 標品 (東洋紡績 KK 製), また同種菌から精製された lipase 標品 (KK 大阪細菌研究所製) を用いた。ただしこの標品中には, 常法では測定できないが, 1 夜のインキュベーションで反応生成物が検出される程度の phospholipase の存在が認められた。

2. 酵素活性の測定法 酸性 proteinase 活性の測

定は、鶴ら⁽⁷⁾の方法に従った。また lipase 活性は、Fiove および Nord 法⁽⁸⁾に準じて pH 4.0 で測定した。

3. 卵黄の酵素処理とイソプロパノール (IPA) による卵黄脂質の抽出分離 卵黄は市販新鮮卵から分離し、その 100 g に直接 (pH は 6.3) あるいは 20% クエン酸溶液約 8 ml を加えて pH を 4.0 に調製した後 “Samprose” 0.2 g (酵素剤 1 g 当りのカゼインを基質とした酸性 proteinase 活性は 1.7×10^5 単位, オリーブを基質とした lipase 活性は 4.0×10^2 単位) を添加し、50°C で 24 時間インキュベートし、ついでそれに 100 ml の IPA を加えて、50°C で 10 分間抽出し、抽出液を濾紙 (東洋 No.6) で吸引濾過した。残渣は、さらに 2 回同条件で IPA 抽出を行ない、それら IPA 抽出液を合し、減圧下に濃縮して抽出物量とした。

4. IPA 抽出物中の脂質の分析 IPA 抽出物は非脂質性の物質もかなり含むので、まずソックスレー連続抽出器を用いてエーテルで抽出し、これを粗脂肪とし、これについての酸価、ケン化価を常法⁽⁹⁾で求め、またヨート価を Wijs 氏法⁽¹⁰⁾で測定した。全リンは、過塩素酸で湿式灰化し、中村氏法⁽¹¹⁾により測定した。また抽出された全脂質の構成脂肪酸は、硫酸・ベンゼン・メタノール溶液を用いてメチルエステル化⁽¹²⁾し、それをガスクロマトグラフィーで検討した。

5. 卵黄の酵素処理による状態変化の検討 上述 3 の条件で卵黄に酵素を加えてインキュベートし、適時その一部を採取して遠心分離した場合の状態を検する一方、アミノ N をホルモール滴定法⁽¹³⁾により、また脂質の酵素作用による変化を薄層クロマトグラフィーにより検した。

実験結果

1. IPA 抽出性卵黄脂質量に及ぼす酵素処理の影響 “Samprose” 処理の IPA 抽出性卵黄脂質の収量に及

Diagram 1. Extraction of Yolk Lipids as a Reference Test.

The lipid isolated by this method is compared as a reference in Tables 1~3.

ぼす影響について試験した結果を Table I に示す。すなわち、対照(E)として Diagram 1 の方法で得た脂質の収量とほとんど同じ収量で、酵素処理卵黄から脂質が抽出された。ただし IPA 抽出区分には若干の異物質、特に低分子ペプチドの混入が見られた。

2. 酵素処理卵黄より得られた脂質の 2・3 化学的性質ならびに脂肪酸の組成

Table I に示した各脂質 (IPA 抽出物中のエーテル可溶区分) について酸価、ケン化価、ヨート価、リン含量、脂肪酸組成についてそれぞれ調べた。その結果を Table II および III に示す。すなわち非酵素的に分取した脂質と比較し、酵素処理卵黄からの脂質はケン化価、ヨート価については差は認められないが、酸価およびリン含量、

Table I. Yields of Lipids from Enzyme Treated Yolk

Egg yolk used, g	Condition for incubation	Yield, g of			
		IPA soluble fraction		IPA insoluble fraction	
		Total	Ether soluble	Total	Ether soluble
A 100	without Enz. pH 6.3, 50°C, 24 hr	29.2	29.0	19.7	3.8
B 100	without Enz. pH 4.0, 50°C, 24 hr	27.4	27.0	21.4	5.0
C 100	with Enz. pH 6.3, 50°C, 24 hr	31.7	30.7	17.0	1.8
D 100	with Enz. pH 4.0, 50°C, 24 hr	36.1	32.8	13.7	0.9
E 100	none	33.3	33.3	14.7	0

(see Diagram 1)

Fig. 1. Progressive Curves of Hydrolysis of Hen's Egg Yolk Protein and Lipid with Acid Proteinase and Lipase.

10 ml of 50% hen's egg yolk solution containing 0.8% citric acid, pH 4.0, was incubated with 1.5 ml of enzymes.

A : acid protease, 1.7×10^4 U ; B : acid protease, 1.7×10^4 U + lipase, 4U ; C : acid protease, 1.7×10^4 U + lipase, 4×10^2 U ; D : lipase, 4×10^2 U, units of activity).

Fig. 2. Progressive Thin Layer Chromatograms of True Lipid in the Digests of Hen's Egg Yolk by Acid Proteinase and Lipase of *Rhizopus*.

Adosorbent : Kieselgel-G, petroleum ether-ether-acetic acid 90 : 10 : 1, locator ; 50% H_2SO_4 .

Symbols of A to D are the same as in Tables I~III and Fig. 1.

SE : sterolester, TG : triglyceride, FFA : free fatty acid, S : free sterol, MG : monoglyceride.

また脂肪酸組成の一部に若干の差が認められた。pH 4.0 酵素処理からの脂質(D)は脂肪酸組成が対照とよく一致し、酵素処理は抽出の量的効果のみならず、質的效果も優れていることを示すものと考えられる。なお C, D の酸価の大きいのは、使用酵素剤中に lipase または phos-

Fig. 4. Periodical Change in Appearance of the Digests of Hen's Egg Yolk with Acid Proteinase and Lipase.

After heating at 80°C for 20 min, the incubation mixtures were centrifuged at 3000 rpm for 20 min.

Fig. 3. Progressive Thin Layer Chromatograms of Phospholipid in the Digests of Hen's Egg Yolk by Acid Proteinase and Lipase of *Rhizopus*.

Adosorbent : Kieselgel-G, chloroform-methanol-water 65 : 25 : 4, locator : iodine → dragendorff reagent → ninhydrin.

PE : cephalin, PC : lecithin, Lyso PE : lyso cephalin, Lyso PC : lyso lecithin.

Symbols are the same as in Fig. 2.

pholipase が存在したためと考えられる。

3. 脂質の分離と proteinase および lipase の作用との関係

pH 4.0 に調整した卵黄液に酸性 proteinase および

Fig.5. Separation of Lipids Egg Yolk by Incubation with a Certain amount of Proteinase & Lipase Followed by Subjecting the Incubation Mixture to Centrifugation.

U : top layer, M : middle layer, B : bottom layer.

Table II. Some Properties of Lipids Isolated by the Enzymatic Method

Sample	Acid value	Saponification value	Iodine value	Phosphorus content, %
A	8.7	208	75.6	1.32
B	8.2	212	75.7	1.28
C	10.7	214	76.2	1.24
D	22.7	217	74.6	1.17
E	5.9	210	76.0	1.19

Symbols are the same as in Table I.

Table III. Composition of Fatty Acids in Lipids Isolated by the Enzymatic Method

Sample	Fatty acid, %						
	C-12	C-14	C-16	C-16:1	C-18	C-18:1	C-18:2
A	0	0.1	28.2	3.7	8.7	49.3	10.1
B	0	0.1	27.0	3.9	9.9	49.3	9.8
C	0	0.1	29.8	3.9	10.1	45.6	10.4
D	0	0.1	31.1	3.4	7.8	47.2	10.4
E	0	0.1	31.5	3.4	7.7	48.1	9.3

Symbols are the same as in Table I.

lipase の精製標品を, それぞれ単独にあるいは同時に添加してインキュベートし, 種々時間後の反応液 1 ml 当りの酸およびホルモール滴定の合計値 (1/100N NaOH の消費量で示す) を検討した. Fig.1 に示す lipase (4×10^2 単位) のみを加えた(D)は, 滴定酸度のみの増加

でホルモール値の増加はほとんど認められなかった. 一方 proteinase のみ(A), またはそれに微量の lipase を加えたもの(B)では, ホルモール値の増加のみで滴定酸度の増加はほとんどなかった. proteinase, lipase 両者を加えたもの(C)は理論的には A, D の合計値として現れるはずで, 図から明らかなように実験的にも理論値とほぼ一致した.

一方, 酵素とともにインキュベートした卵黄を経時的に分取し, そのアセトン可溶および不溶脂質について, それぞれ薄層クロマトグラフィーを行なった. その結果は Fig.2 および 3 で, lipase のみ(D)またはそれと proteinase とを加えたもの(C)からは, lipase 標品中に汚染的に存在していた phospholipase 活性のため遊離脂肪酸, モノグリセライド, リゾレシチン, リゾケファリンの生成が認められた.

他方, 酵素反応の 2, 16, 20 および 24 時間後にそれぞれの反応液を分取し, まず 80°C で 20 分間加熱して酵素を失活させ, ついで 3000 rpm で 20 分間遠心分離を行ない, その状態を観察した. その結果は Fig.4 で, 使用酵素の種類によって反応液を遠心分離した場合の状態は異なり, proteinase のみ添加したもの(A), またはそれにごく少量の lipase を加えたもの(B)は, 20 時間以上の酵素反応により不透明なエマルジョン状態を呈しながらも 2 層に分離した. 一方 lipase のみを添加したもの(D)では, 全体が粘性のあるペースト状となり, 上記条件での遠心分離では, なんらの変化もみられなかった. これらに対し proteinase と lipase とを添加したもの(C)では, 反応 2 時間後にすでに反応液は遠心分離により分離が認められ, 反応 16 時間では明瞭に上, 中, 下の 3 層に分離した. すなわち Fig.5 に示すように上層は橙黄色透明な油状層であり, 中間層は黄色不透明でゲル状を呈し, 下層は濃黄カッ色透明な水溶液として分離した. なお C のインキュベーション時間, それに伴う遠心分離時の状態, 酸およびホルモール滴定値の合計値を Fig.6 に示す. インキュベーション 16 時間後における酸・ホルモール滴定の合計値は, 反応液 1 ml 当り 1/100N NaOH で約 30 ml となり, このようになった反応液は 80°C, 20 分間の加熱で, もはや蛋白などの凝固は示さなかった.

Fig. 6. Hydrolysis of Hen's Egg Yolk Protein and Lipid by "Samprose" and Separation of Lipid from the Digests.

10 ml of 50% hen's egg yolk containing 0.8% citric acid, pH 4.0, was incubated with 0.1 g "Samprose," the total acid protease and lipase activity were 1.7×10^4 U, and 4×10^3 U, respectively.

T: top layer, M: middle layer, B: bottom layer.

5. 市販酵素処理卵黄の遠心分離による分画と各画分の化学成分などについて

"Samprose" を用いて, Diagram 2 に示した方法により卵黄を処理したのち遠心分離し, 500 g の卵黄から上層 71g, 中間層 194g, 下層 730g を得た. なお, この反応液の酸度-ホルモール滴定の合計値は 1/100N NaOH で, 約 40 ml であった. 上層, 中間層より脂質をクロロホルムで抽出し, 薄層クロマトグラフィーで検討した結果, Fig. 7 に示すように上層部(T)は中性脂質とその分解物, およびこんせきのリン脂質からなり, 中間層(M)は中性脂質とその分解物およびリン脂質とその分解物からなることが認められた. また上, 中, 下層中の脂質含量, 脂質の酸価, 窒素, リン, アミノ酸量など

Diagram 2. Enzymatic Processing of Hen's Egg Yolk to Separate Lipids.

Fig. 7. Thin Layer Chromatograms of Lipid in the Fractions T & M in Fig. 5 and Table IV.

Adsorbent: Kieselgel-G, (I) petroleum ether-acetic acid 90:10:1 (II) chloroform-methanol-water 65:25:4, locator: (I) 50% H_2SO_4 , (II) iodine→dragendorff reagent→ninhydrin.

SE: sterolester, TG: triglyceride, FFA: free fatty acid, S: free sterol, MG: monoglyceride, PE: cephalin, PC: lecithin, Lyso PE: lyso cephalin, Lyso PC: lyso lecithin S: authentic specimen as a marker, T: top layer, M: middle layer.

Table IV. Analysis of Several Components of Hen's Egg Yolk Fractionated by Processing with "Samprose" Followed by Subjecting the Processed Mixture to Centrifugation

Fraction	Lipid constituents	AV	Solubility in organic solvents	Moist. %	Total N %	Amino N %	Free amino N, %	Total P %	Crude fats %
T	TG, FFA, SE, S, MG	46	acetone soluble	0	0.10	0	±0	trace	100
M	TG, FFA, SE, S, PC, PE, lyso PC, lyso PE	—	methanol-chloroform insoluble matter 5%	47	1.37	0	±0	0.96	47
Extract of M with IPA		76	acetone soluble 60% acetone insoluble 40%	0	0.98	0	±0	1.40	100
S	—	—	—	93	1.68	1.16	0.53	0.23	0.3

の分析結果は Table IV で, 上層部はすべてアセトン可溶性でその酸価は 46 であり, オレイン酸相当量で約 23% が遊離脂肪酸と算出された。窒素はわずかに 0.1% で, これは微量の低分子ペプチドやアミノ酸の混在によるものと考えられ, またリン含量については前に述べた薄層クロマトグラフィーの結果と同じで, ほとんどリン脂質の存在は認められなかった。

中間層 (M) は水分 47%, メタノール・クロロホルム不溶物が 5% 量で, これは卵黄蛋白やその分解物の混入によるものと考えられ, またリン含量は 0.96% で, その全量をレシチン由来と仮定すると, レシチン (ただし dipalmityl-, distearyl-, dioleoyl-lecithin の等量混合物とする) 量は約 24% で中間層全脂質の 52% に相当した。なお中間層の IPA 可溶区分を分析した結果, アセトン不溶脂質として 40%, またリン含量は 1.40% でレシチン換算で約 36% となった。上層および中間層の脂質総収量は卵黄 500g から 162g, すなわち卵黄に対し 32.4% の収量で分離された。卵黄の脂質含量は約 33% といわれていることから, 本法による脂質の回収はほとんど完全であることがわかる。ただし脂質分解酵素を使うため, 脂質の一部は分解された。

他方下層は, わずか 0.3% の脂質しか含まない卵黄蛋白の分解物として回収された。

考 察

鶏卵卵黄脂質の有機溶媒, たとえばイソプロパノールによる抽出は, あらかじめ卵黄に適量の酸性 proteinase および lipase を加えてインキュベートすることにより, 脂質抽出の効果が促進されることが認められた。すなわち, クロロホルム・メタノール混合液を用いて抽出した場合の脂質 (Diagram 1) を対照として収率を比較すると, 酵素処理をしない場合 pH 6.3 (A) では 87.0%, pH 4.0 (B) では 81.0%, 一方酵素処理の場合 pH 6.3 (C) では 92.5%, pH 4.0 (D) では 98.5% の収率であった。これは proteinase によって卵黄蛋白が分解されて, 脂質の存在状態がより抽出されやすいように変化したためと考えられる。また抽出された種々の脂質について, それらの化学的性質, リン含量, 脂肪酸組成などを比較したところ, ケン化価, ヨーソ価については差が認められなかったが, リン含量, 脂肪酸の組成, 酸価の点で差がみられた。すなわち脂質のリン含量は, pH 4.0 での酵素処理では対照と同じであったが, pH 6.3 酵素処理

では少なくなった。一方脂質の酸価は, 酵素処理により増加した。これは, 遠心分離のみによって脂質を分離させるには lipase の添加が必要であるため, 当然のことである。ともかくも卵黄に酸性 proteinase と lipase とを併用作用させると, 卵黄は遠心分離のみで上, 中, 下の 3 層に分離し, 上層には中性脂質と若干の分解物, 中層には中性脂質, リン脂質と若干のそれらの分解物, および少量の蛋白分解物, また下層はほとんど脂質を含まない卵黄蛋白の分解物とに分別できることがわかった。これは単に学問的のみならず, 実用的にもきわめて注目すべきことと考えられる。

要 約

1. 鶏卵黄を *Rhizopus* 属糸状菌より得られた酸性 proteinase, lipase を含む酵素剤 ("Samprose") とともにインキュベートすることにより, イソプロパノールにより抽出される脂質の収量は増加した。

2. 酵素処理した卵黄は, 酸度, ホルモール滴定値は増加するが, その増加のある時点以後では卵黄は遠心分離のみにより上, 中, 下の 3 層に分離することがわかった。

3. 分離した上層は中性脂質と若干のその分解物, 中層は主としてリン脂質と若干のそれらの分解物, 下層は脂質をほとんど含まない卵黄蛋白の分解物であることがわかった。

酸性 proteinase 標品を恵与された東洋紡績株式会社, lipase 標品を恵与された株式会社大阪細菌研究所に感謝します。

- (1) A.L. Romanoff and A.J. Romanoff: "The Avian Egg," Wiley & Son's Inc., New York, 1949, p. 336.
- (2) R.J. Evans, S.L. Bandemer, K. Heinlein, and J.A. Davidson: *Biochemistry*, **7**, 3095 (1968).
- (3) W.H. Cook and W. G. Martin: *Can J. Biochem. Physiol.*, **40**, 1273 (1962).
- (4) F.A. Vandenheuvel: *ibid.*, **40**, 1299 (1962).
- (5) 藤野安彦: 栄養と食糧, **24**, 317 (1971).
- (6) 野並慶宣: 鶏卵の化学と利用法, 地球出版 (東京), 1960, p. 66.
- (7) D. Tsuru, T. Yamamoto and J. Fukumoto: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 651 (1966).
- (8) 日本化学会編: 実験化学講座, 第 24 巻, 丸善, 1958, p. 239.

- (9) 東大農化教室：実験農芸化学，下巻，朝倉書店，1960，p. 459.
 - (10) 日本化学会編：実験化学講座，第 23 巻，丸善，1957，p. 476.
 - (11) 日本化学会編：実験化学講座，第 23 巻，丸善，1957，p. 532.
 - (12) 油脂および油脂製品試験法部会：油化学，19(5)，337 (1970).
 - (13) 日本化学会編：実験化学講座，第 24 巻，丸善，1958，p. 225.
-