鶏卵卵黄蛋白質成分の酸, アルカリ変性について

筒井 知己*・小原 哲二郎*

Studies on the Denaturation of Protein Components of
Egg Yolk by Acid or Alkali

TOMOMI TSUTSUI* and TETSUJIRO OBARA*

When pH of egg yolk solution was adjusted from 2 to 12 by 0.1 N HCl or 0.1 N NaOH, the maximum amounts of precipitate and highest turbidity was obtained at pH 5.5. Higher value of viscosity of the pH-adjusted egg yolk was obtained in the region below pH 4 and above 10. The maximum amount of precipitate and highest turbidity was obtained at pH 7 in LDL (Low Density Lipoprotein) solution and at pH 4.5 to pH 5 in Livetin solution. However, these phenomena were not related to changes of viscosity. HDL (High Density Lipoprotein) showed high turbidity below pH 4 or above pH 11 in 5% NaCl solution, and about 90% HDL was precipitated below pH 4. Disc electrophoresis of egg yolk showed that bands with Rf of 0.2 or less decreased below pH 5. These bands were main components of HDL. From above findings, the changes of viscosity of egg yolk was estimated to be mainly due to the properties of HDL.

(Received Feb. 17, 1979)

卵黄を主原料とするマヨネーズの製造中において、副原料の酢酸、食塩によって卵黄中のいかなる成分が影響を受けるかは興味深い問題である。野並ら¹⁾はマヨネーズの粘度はリボプロテイン以外の蛋白質の変性によるものであり、この変性は主として酢酸および食塩の添加により生じると述べている。また押田²⁾は卵黄の乳化力とマヨネーズの乳化安定度は食塩と酢酸の影響を受けるが、特に酢酸の影響を強く受け、pH 4 以下で乳化安定度が著しく低下すると報告している。さらに遠藤ら³⁾は卵黄蛋白質画分の粘度を調べ、ホスビチン、リボビチリン画分が最も粘度が高く、次に low density fraction (LDF)、リベチンの順であると述べている。このように各画分の乳化性や、塩による変性は検討されているが、酸、アルカリによる変性についての報告は皆無である。

我々は前報⁴⁾において卵黄の主要な構成成分であるリボプロテインの脂質組成、脂肪酸組成について報告したのであるが、本実験では全卵黄及び分画した LDL, HDL, リベチン画分の、酸、アルカリ処理による変化を、溶解度、粘度及びディスク電気泳動による泳動パタ

ーンなどについて調べた。

実験方法

1. 試料

鶏卵試料はオランダ産ゼックス種鶏の産卵直後の新鮮卵を用いた。

2. 各画分の調製

前報と同様に EVANS ら⁵⁾の方法に準じて卵黄を超遠心分離し LDL を調製した。リベチン画分は RAJU ら⁶⁾の方法と同様に DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる吸着成分を集め調製した。HDL は BURELY ら⁷⁾の方法に準じ、分離した粒子に 10 倍量の 0.16M 塩化ナトリウム溶液を加え 4°C で一昼夜攪拌後再度超遠心分離し沈殿を得た。この操作を再度繰り返し HDL を得た。これら各画分を透析脱塩した物を試料とした。

3. 溶解性の測定

(1) 濁度測定

各画分溶液を 0.1 N 塩酸または 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液を用いて固形物含量 4% で pH 2 から pH 12 に

* 東京農業大学農芸化学科 (〒156 東京都世田谷区桜丘 1 丁目)
Dept. of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture,
Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo

調製した。この溶液の濁度を島津分光光度計 UV 150 を用いて 650 nm 測定した。なお HDL はあらかじめ食塩に対する溶解性を調べた後、食塩溶液に溶解させた物を前述の操作と同様に処理し比較検討した。また卵黄の場合は濁度測定のみ 1% 固成物溶液を用いた。

(2) 遠心分離による沈殿量の測定

押田⁹⁾の方法に従い、所定の pH に調製した 1% 卵黄溶液を 3 時間 25°C に放置後、3,000 rpm, 15 分間 25°C で遠心分離した。沈殿物を 4°C で一夜透析後、105°C 乾燥法により沈殿物の乾燥重量を求め、それぞれ最初の卵黄固形物に対する割合で示した。また LDL, リベチン画分も同様の方法で沈殿量を測定した。一方 HDL は食塩溶液に溶解させたものを同様に処理した。

4. 粘度の測定

3 の (1) の方法で調製した試料溶液を、東京計器製 EDL 型粘度計で No. 66 のローターを使用して、25°C で 100 rpm で測定した。

5. ディスク電気泳動

各試料溶液を pH 8.3, 0.005M トリス 0.038M グリシン緩衝液に、4°C で一夜透析後、Davis⁹⁾の方法に準じて running gel 7%, spacer gel 2.5% のアクリルアミド含量でゲルを作製し、試料を添加後、カラム 1 本あたり 5 mA の定電流で泳動させた。泳動後 1% アミドブラック 10 B-7% 酢酸溶液で蛋白質を染色した。脱色は 7% 酢酸溶液を用い、脱色したゲルを富士理研製 FD-A IV 型デントメーターにかけ 580 nm の吸収を測定した。

6. 等電点電気泳動

カラムはアムコ社製の 110 ml を、また carrier ampholyte は pH 2~10 を用いて常法⁹⁾により等電点電気泳動を行った。試料は蔗糖濃度勾配液に溶かし、泳家は 700 V, 40 時間行なった。溶出は 2 ml ずつフラクションコレクターで分取し、pH, 280 mm の吸収を測定した。

実験結果および考察

1. 卵黄溶液の異なる pH における濁度と遠心分離による沈殿量

Fig. 1 に供試卵黄溶液の種々の pH における溶解性の変化を示す。1% 卵黄溶液では透過度は pH 2 で 75.34%, pH 3 で 22.44% であり、これ以上 pH 4 から pH 9 までは光が透過せず、pH 10 で 66.83%, pH 11 で 72.78%, pH 12 で 70.31% となった。また 0.1% 卵黄溶液では pH 5.5 が最も透過度が低かった。卵黄の

Fig. 1. Solubility property of egg yolk

percent transmission
○—○ Egg yolk
□—□ 0.1% Egg yolk
percent of precipitate
△—△ 1% Egg yolk

遠心沈殿量では pH 5 から pH 7 の範囲が比較的沈殿物が多く、とりわけ pH 5.5 で最大沈殿量を示し、これは 0.1% 卵黄溶液の濁度の最大値と一致していた。このように卵黄溶液は中性付近では遠心分離による沈殿量が多く、0.1N 塩酸や 0.1N 水酸化ナトリウム溶液の添加量が多い所で高い透過度を示していた。この点について押田⁹⁾は卵黄の溶解性にはイオン強度が深く結びついており、pH 6, イオン強度 0.1 の時の卵黄溶液の濁度と遠心分離による沈殿量が最も多いという結果を得ており、これは卵黄中の HDL と LDL が完全に溶解していないためであると述べている。我々もこの点をさらに検討するために次の実験を行なった。

2. 各画分の異なる pH における濁度と遠心分離による沈殿量

LDL, HDL, リベチン画分の水に対する溶解性を調べたところ、LDL, リベチンは水に分散したが、HDL は水に不溶であった。そこで HDL 溶液に食塩を 1.0 から 10.0% まで加えその溶解性を調べたところ、Fig. 2 のような結果を得た。この場合 HDL は 5% 食塩濃度以上ではほぼ完全な溶解性を示したので、HDL を食塩水に不溶化させた後、酸またはアルカリを加えて pH を調整し 5% 食塩溶液としたものの透過度を比較した。Fig. 3 に各画分の異なる pH における濁度を、さらに Fig. 4 に遠心分離による沈殿量を示した。

(1) LDL

LDL は pH 2 で透過度が 70.0% あったが pH 2 を

Fig. 2. Solubility property of high density lipoprotein

Fig. 3. Turbidity of egg yolk fractions

- Low density lipoprotein
○—○ High density lipoprotein
△—△ Livetin fraction
▲—▲ Livetin fraction (0.1%)

越えると透過度が減少し、pH 7 では透過度 27.7% となった。さらに pH 7 を越えると透過度が増加し pH 12 では 75.5% となった。また遠心分離による沈殿量では、pH 6 から pH 7.5 の範囲に沈殿が認められ、pH 7 が沈殿量 20% と最も高く、これは濁度の最大値と一致した。我々がこの LDL を焦点電気泳動にかけた結果では pH 7.3 から pH 8.0 ぐらいに凝集した画分が認められ、LDL は pH 7 から pH 8 のいわゆる等電点に相当する付近で最も不溶化しているものと推測された。

(2) リベチン画分

リベチン画分は pH 2 では透過度 57.3% であったが、

Fig. 4. Percent of precipitate of egg yolk fractions

- High density lipoprotein
△—△ Livetin fraction
□—□ Low density lipoprotein

pH 2 以上では急激に透過度が減少し、pH 4 から pH 9 まではほとんど透過しなかった。pH 9 以上では透過度が増加し、pH 12 では透過度 72.5% になった。この曲線は卵黄の濁度曲線と類似していた。また 0.1% リベチン溶液では pH 4.5 が最も濁度が高かった。さらに遠心分離による沈殿量では pH 3 から pH 7 の範囲で沈殿が認められ pH 5 付近が沈殿量 40% と最も多かった。以上の結果から卵黄の濁度曲線が pH 4 から pH 9 まで著しく濁度が高いのは主としてリベチン画分による影響であることがわかった。

(3) HDL

HDL は LDL およびリベチン画分と多少異なった挙動を示し、pH 2 から pH 4 の間ではほとんど光を透過せず。pH 5 で透過度 4.9%、pH 6 で 17.7% を示し、これから pH 11 まで徐々に透過度が増加し、pH 11 では 24.7% を示した。さらに pH 11 以上では急激に透過度が減少し、pH 12 ではほとんど透過しなかった。さらに遠心分離による沈殿量では HDL は pH 4 より酸性で沈殿を生じ、その割合も pH 2 から pH 4 では 98.5% から 85.5% と非常に多かった。このように HDL は 5% 食塩濃度という高いイオン強度の下で、pH 4 以下という酸の添加量の多い所では塩析のような効果が生じ不溶化していくのではないかと推測された。

3. 卵黄溶液の異なる pH における粘度の変化

Fig. 5 に供試卵黄溶液の異なる pH における粘度の

Fig. 5. Viscosity of egg yolk solution

変化を示す。卵黄溶液は酸性側では pH 2 で粘度 6.07 センチポイズ (cp) であったのが、pH 2 以上で徐々に粘度が低下し、pH 4 では 2.45 cp になった。これ以上 pH 11 までは粘度はほとんど変わらず、pH 11 以上で再び粘度が上昇し、pH 12 では 5.89 cp を示した。従って卵黄成分は、かなり広い pH 範囲で物性が安定であるように推察された。

4. 各画分の異なる pH における粘度の変化

Fig. 6 に各画分溶液の異なる pH における粘度の変化を示す。

(1) LDL およびリベチン画分

LDL およびリベチン画分は pH 2 から pH 12 の各条件下でほとんど粘度の変化は認められなかった。従って

Fig. 6. Viscosity of egg yolk fractions

- High density lipoprotein
- △—△ Livetin fraction
- Low density lipoprotein

LDL およびリベチン画分は、濁度および遠心分離による沈殿量の変化が粘度の上昇とは必ずしも結びついていないことが確認された。

(2) HDL

HDL は pH 2 で 4.81 cp であったが、pH 2 以上で急激に粘度が低下し、pH 5 では 1.45 cp となった。pH 5 から pH 7 まではほとんど粘度の変化はなく、pH 7 以上で多少粘度が増加し、pH 12 では 2.01 cp を示した。このように HDL は他の二画分より強い粘度の変化を示し、これが卵黄の粘度上昇と結びついているものと推察された。

5. ディスク電気泳動

LDL, リベチン画分と HDL は種々の pH における粘度、濁度および遠心分離による沈殿量に差違が認められたので、さらにディスク電気泳動を行ない比較検討した。

(1) 卵黄

Fig. 7 に卵黄のディスク電気泳動図を示す。CHANG ら¹⁰⁾は 10% 食塩溶液で希釈した卵黄を用いて、ディスク電気泳動で最多数 19 本の蛋白質バンドを分離している。我々は卵黄の場合、試料ゲルに残留する LDL 成分以外に、13 本の蛋白質バンドを確認でき、このうち 4 本が主要蛋白質成分であった。このような卵黄は pH 5 以下の処理で R_f 0.2 の位置にバンドを示す蛋白質と原点付近の蛋白質が不明瞭となり、この他に R_f 0.11, 0.14 にあるバンドも減少していった。一方アルカリ性側では pH 12 処理で、やはり R_f 0.2 以下にバンドを示す蛋白質の減少が認められた。以上のように R_f 0.2 以下の位置にバンドを示す蛋白質が酸またはアルカリにより変性凝集をおこし、この結果が卵黄の粘度上昇に関係が深いものと推察された。

(2) HDL

Fig. 8 に HDL のディスク電気泳動図を示す。Burley ら⁷⁾によると HDL の主成分は α -リボビテリン、 β -リボビテリンであり、Cook¹¹⁾によるとモノマーは 20 万の分子量で、ディスク電気泳動で running gel の中にゆっくり入っていきはずだとしている。さらに CHANG ら¹⁰⁾は HDL のディスク電気泳動で主に 5 本の蛋白質バンドを分離している。我々の HDL 試料の主成分は試料ゲルに残留する成分以外に R_f 0.04 から 0.1 の位置にバンドを示す蛋白質が認められた。これら HDL は pH 4 以下の処理で R_f 0.04 から 0.1 の蛋白質バンドが減少した。一方アルカリ性側でも pH 11 以上の処理で R_f 0.1 付近にあるバンドの減少が認められた。このよ

Fig. 7. Densitometric tracings of egg yolk

Fig. 8. Densitometric tracings of high density lipoprotein

うに HDL では酸またはアルカリ処理により $R_f 0.1$ 以下のバンドが変性、凝集をおこし、これが卵黄の粘度上昇に関係が深いものと推測された。

(3) リベチン画分

Fig. 9 にリベチン画分のディスク電気泳動図を示す。Chang ら¹⁰⁾はリベチン画分をディスク電気泳動にかけ、16本の蛋白質バンドを分離しており、 $R_f 0.18$ の付近に γ -リベチンがあり、 α -リベチン、 β -リベチンは広範囲に多数のバンドを示すと報告している。我々のリベチン試料は広範囲に多数の蛋白質バンドを示し、pH5以下の処理で $R_f 0.3$ 以下の蛋白質バンドが多少低下し、さ

らに pH3 以下では $R_f 0.2$ から 0.3 付近のバンドが著しく減少していった。しかしこれらの変化は粘度の変化とは結びついていなかった。MARTIN ら¹²⁾によると α -リベチンは 4.2×10^4 の分子量であり、 β -リベチンは 8.0×10^4 の分子量と報告されており、この分子量の小ささが、粘度変化の少なさに関連があるのではないかと推測された。

(4) LDL

Fig. 10 に LDL のディスク電気泳動図を示す。LDL は未変性の時にはディスク電気泳動では泳動しなかった。これは LDL 粒子の大きさと考えられる。菅野ら¹³⁾によると LDL は L_1 と L_2 の二成分からなり、これらは 9×10^6 と 4.8×10^6 の分子量であるとの報告があり、また MARTIN ら¹⁴⁾はこれらが多分散性であり、 10.3×10^6 と 3.3×10^6 の平均分子量であると報告している。いずれにしても、ディスク電気泳動でアクリルアミド含量7%の running gel 中にはその粒子の大きさのために入っていけないことになる。従って LDL は pH3 から pH11 の処理条件下では試所ゲルに蛋白質が残留していた。ところが pH2 および pH12 の処理では $R_f 0.27, 0.35, 0.42, 0.55$ の位置にあらたなバンドが出現し、pH12 の処理では $R_f 0.66$ にもバンドが認められた。これは LDL の一部が酸またはアルカリにより破壊さ

れ、その構成蛋白質が泳動したのではないかと推測された。

要 約

鶏卵卵黄を超速心分離して得た LDL、リベチン画分、HDL の酸、アルカリによる変性を濁度、遠心分離による沈殿量、粘度、ディスク電気泳動から検索した結果を要約すると次のごとくである。

(1) 1%卵黄溶液の pH2 から pH12 までの処理で、濁度は pH4 から pH9 が最も高く、0.1% 卵黄溶液では pH5.5 濁度が最も高かった。また遠心分離による沈

Fig. 9. Densitometric tracings of livetin fraction

Fig. 10. Densitometric tracings of low density lipoprotein

殿量もやはり pH5.5 が最も多かった。

(2) LDL, リベチン画分, HDL の溶解性は, LDL は pH7, リベチン画分は pH4.5 から pH5 が最も濁度が高く, 遠心分離による沈殿量が多かった。HDL は pH4 より下, pH11 より上で濁度が増加し, 遠心分離による沈殿量では, pH2 から pH4 で98.5% から 85.5% の沈殿を得た。

(3) 卵黄の異なる pH における粘度の変化は, pH4 より下, pH10 より上でそれぞれ酸変性, アルカリ変性による粘度の上昇が認められた。

(4) LDL, リベチン画分, HDL の粘度変化は LDL, リベチンは pH の差による粘度変化は認められず, HDL は pH5 より下, pH11.5 より上で粘度の上昇が認められた。

(5) ディスク電気泳動で, 卵黄中で酸またはアルカリにより変化を受けるのは R_f 0.2 以下の蛋白質バンドであった。HDL では pH4 以下で R_f 0.04 から 0.1 の蛋白質バンドが消失し, リベチン画分は pH5 以下で R_f 0.3 以下の蛋白質バンドが消失した。一方 LDL は pH2 と pH12 の処理であらたに4本から5本の蛋白質バンドが出現した。

終りに臨み, 本研究に御援助いただいた財団法人旗影会に感謝の意を表わすとともに, 御指導および試料鶏卵を提供いただいたキュービー株式会社基礎研究所長押田

一夫博士に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 野並慶宜・竹内順子: 農化, **35**, 464 (1961).
- 2) 押田一夫: 食品工誌, **22**, 501 (1975).
- 3) 遠藤健一・笹子謙治・山内邦男: 食品工誌, **21**, 431 (1974).
- 4) 筒井知己・小原哲二郎: 食品工誌, **26**, 81 (1979).
- 5) EVANS, R.J., BANDEMER, S.L., DAVIDSON, J.A., HEINLEIN, K. and VAGHEFI, S.S.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **164**, 566 (1968).
- 6) RAJU, K.S. and MAHADEVAN, S.: *Anal. Biochem.*, **61**, 538 (1974).
- 7) BURLEY, R.W. and COOK, W.H.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 1295 (1961).
- 8) DAVIS, B.J.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, Art, 2, 321 (1964).
- 9) 松尾雄志・堀尾武一: 蛋白質・核酸・酵素, **12**, 737 (1967).
- 10) CHANG, P., POWRIE, W.D. and FENNEMA, O.: *J. Food Sci.*, **35**, 775 (1970).
- 11) COOK, W.H.: *Nature*, **190**, 1173 (1961).
- 12) MARTIN, W.G., VAMDEGAER, J.E. and COOK W. H.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **35**, 241 (1957).
- 13) SUGANO, H. and WATANBE, I.: *J. Biochem.*, **50**, 413 (1961).
- 14) MARTIN, W.G., AUGSTYNIAK, J. and COOK, W. H.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **84**, 714 (1964).

(昭和54年2月17日受理)