サクシニル化鶏卵卵黄蛋白質の乳化特性

筒井 知己*・小原 哲二郎**

Effect of Succinylation on the Emulsifying Properties of Egg Yolk Protein Components

TOMOMI TSUTSUI* and TETSUJIRO OBARA**

It was reported that N-succinylation of egg yolk was effective for improving its emulsifying properties. To investigate this effect, egg yolk LDL (Low Density Lipoprotein) and HDL (High Density Lipoprotein) were succinylated at three different degrees. While succinylated LDL showed almost the same turbidity as intact LDL, the viscosity of 87.5% succinylated LDL was 1.3~1.4 times as high as that of intact LDL. Emulsifying activity of LDL decreased by succinylation, on the other hand, emulsifying capacity and emulsion stability of LDL increased with an increase of the degree of succinylation. Succinylated HDL showed almost the same turbidity as intact HDL in 2% NaCl soln. The viscosity of 92.1% succinylated HDL was 2.0~2.4 fold over that of HDL. Emulsifying capacity of succinylated HDL hardly increased, but emulsion stability of HDL increased with an increase of succinylation.

(Received Oct. 5, 1979)

食品蛋白質の化学修飾による改良についての研究が近年盛んになってきた。MEANS ら¹⁾によると、蛋白質の無水コハク酸による N-サクシニル化の場合、遊離のアミノ基が遊離のカルボキシル基にかわり、これとともに蛋白質の機能特性、たとえば水溶性、乳化性、起泡性等が改良されると報告されている。卵黄の場合、EVANS ら²⁾が N-サクシニル卵黄を用いてマヨネーズおよびドレッシングを製造し、乳化に有効であったと報告している。しかしながら、卵黄を分離した蛋白質成分、低密度リポ蛋白質 (LDL)、高密度リポ蛋白質 (HDL) をサクシニル化した報告はみられず、またサクシニル化の、これらの乳化特性への影響についても詳しい報告はない。

よって LDL, HDL のサクシニル化物について、溶解性、粘度と乳化特性の代表的な乳化活性、乳化容量、乳化安定性について測定したので報告する。

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³⁾と同様に、EVANS ら⁴⁾の方法に準じて LDL, HDL を調製した。

3. LDL と HDL のサクシニル化

サクシニル化の方法は HOAGLAND⁵⁾ に準じて行なった。LDL の場合、LDL 4g を pH 8, 75 mM リン酸緩液に溶解し 100 ml としたものを 3 個作製し、各々に無水コハク酸を 0.1 g, 0.2 g, 0.5 g 数回にわけて加えた。反応中は pH を 7~8 に保つため、3.5N 水酸化ナトリウム水溶液を少量ずつ滴下した。また試料は氷水で冷却し、0~1°C の温度に保った。次に水に対して透析を行なった。HDL は 2.5 g を pH 8, 75 mM リン酸緩液に

* 聖徳栄養短期大学 (〒124 東京都葛飾区西新小岩 1-4-6)

Seitoku Junior College of Nutrition, 4-6 Nishi-Shinkoiwa, 1-chome, Katsushika-ku, Tokyo, 124

** 東京農業大学 (〒156 東京都世田谷区桜ヶ丘 1-1-1)

Tokyo University of Agriculture, 1-1 Sakuragaoka, 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo, 156

溶解し 250 ml としたものをビーカー 3 個に作製し、各々に無水コハク酸を 0.1 g, 0.2 g, 0.5 g 加えて LDL と同様に処理した。サクシニル化された程度は, MOORE⁸⁾の方法に準じてニンヒドリン法で測定した。

4. 溶解性の測定

各試料を pH 3.5 から pH 7.8 の 0.1N クエン酸ナトリウム-塩酸緩衝液に、1%の割合で溶解させ、この溶液の濁度を 650 nm で測定した。なお HDL は塩化ナトリウムを 2.0% 添加したものもあわせて検討した。

5. 粘度の測定

各試料で 1% または 2% の溶液をつくり、さらにそれぞれに塩化ナトリウムを 0.1% または 0.2% 加えたものもあわせて作製し、東京計器製 EDL 型粘度計で No. 66 のローターを使用し、25°C, 100 rpm ずり速度 35.0 sec⁻¹ で測定し、みかけの粘度で表現した。なお LDL, HDL 各溶液の pH は 7.0 であり、無水コハク酸を 0.5 g 加えて処理した LDL の 1% 溶液の pH は 6.6 で、無水コハク酸を 0.5 g 加えて処理した HDL の 1% 溶液の pH は 7.0 であった。各画分のサクシニル化率の差による pH の相違はほとんどみられなかった。

6. 乳化特性の測定

(1) 乳化活性 (Emulsifying activity)

柴崎ら⁷⁾の方法に従い、目盛付試験管に 0.05~1.0% の各溶液 5 ml をとり、市販トウモロコシ油 5 ml を加え、15 分間振盪後、3,000 rpm で 15 分間遠心分離し、中間にできる乳化層の体積を測定した。なお濃度が 0.05% の時、無水コハク酸を 0.5 g 加えて処理した LDL 溶液の pH は 6.8 であり、無水コハク酸を 0.5 g 加えて処理した HDL 溶液の pH は 7.3 であったが、特に pH の調節は行なわなかった。

(2) 乳化容量 (Emulsifying capacity)

SWIFT^{8),9)}の方法に準じて測定した。0.5, 1.0, 1.5% の 3 種の各溶液 2 ml をガラス製カップに入れ、これにメチルレッドを加え、ホモジナイザー HD 型 (日本精機(株)) で約 10,000 rpm で回転させながらトウモロコシ油を 0.6 ml/min で滴下させ、転相するまでに要した油の体積を測定し、蛋白質の g あたり乳化された油の体積 ml で表わした。

(3) 乳化安定性 (Emulsion stability)

青木ら¹⁰⁾の方法に従い、固型物含量 0.5~1.5% の各溶液 6.5 ml にトウモロコシ油 3.5 ml を加え、上記ホモジナイザーで 14,000 rpm, 1 分間攪拌し、試験管に移して 30 分間放置した。試験管の底の部分から 2.5 ml 取り出し、それを乾燥することにより水分定量を行なった。

彼らの計算式に従い乳化安定性を算出した。

実験結果および考察

1. サクシニル化量の測定

LDL のサクシニル化量は無水コハク酸 0.1, 0.2, 0.5 g 添加物でそれぞれ 58.3, 70.4, 87.5% であった。これに対して HDL のサクシニル化量は、無水コハク酸 0.1, 0.2, 0.5 g 添加物でそれぞれ 48.0, 74.9, 92.1% であった。

2. サクシニル化リポ蛋白質の溶解性

LDL の場合を Fig. 1 に、HDL の場合を Fig. 2 に示す。58.3% サクシニル LDL (58.3% suc-LDL とよぶ) は pH 7 から pH 8 で LDL に比べて多少透過度が増加した。さらに 70.4%, 87.5% サクシニル化されると、pH 5 から pH 8 でより透過度が増加していた。以上のように suc-LDL は LDL よりいくぶん溶解性が高まるように推測された。一方 pH 3.5 から pH 4.5 で、サクシニル化物はすみやかに白濁したのは、LDL の濃度が減少したものと思われた。

HDL は水および低イオン強度の緩衝液には溶解性が

Fig. 1. Solubility properties of LDL and succinylated LDL

- LDL
- 58.3% succinylated LDL
- △—△ 70.4% succinylated LDL
- 87.5% succinylated LDL

Fig. 2. Solubility properties of HDL and succinylated HDL

- HDL
 ▲—▲ HDL dissolved 2% NaCl soln.
 ■—■ 48.0% succinylated HDL
 △—△ 74.9% succinylated HDL
 □—□ 92.1% succinylated HDL

低く、前報¹¹⁾のように5%塩化ナトリウム溶液を用いてほぼ完全に溶解させることができた。HDLを2%塩化ナ

トリウムを加えた各pHの緩衝液に溶解させると、pH6以上で約90%の透過度を示し、かなり高い溶解性を示しているように思われた。これに比し suc-HDLはpH5以上でいずれも塩化ナトリウム添加の場合より高い透過度を示した。以上のようにHDLはサクシニル化されると著しく溶解性が増加するに思われた。

3. サクシニル化リポ蛋白質の粘度

LDLの結果をTable 1に、HDLの結果をTable 2に示す。LDL、HDLともサクシニル化率が上がるにつれて粘度も増加した。87.5% suc-LDLはLDLの1.3~1.4倍の粘度を示した。また塩化ナトリウムを添加した場合、多少粘度が低下していた。これに比べて92.1% suc-HDLはHDLの2~2.4倍の粘度を示した。このようにHDLがサクシニル化された時、粘度がかなり大きな変化を示す理由として、HDLはLDLに比べ蛋白質含量が多く、反応に関与するアミノ基が多いため、多量のサクシニル基が結合し、粒子の大きさが増大したことが考えられる。またこれ以外になんらかの構造変化や凝集等による影響も考えられる。

4. 乳化活性

結果をFig. 3に示す。LDLはHDLの10倍程の乳化活性を示した。suc-LDLの乳化活性はLDLに比べて減少し、87.5%サクシニル化物でも、1%溶液の時LDLの約60%の値であった。一方suc-HDLの乳化活性はHDLに比べて、サクシニル化率が上がるほど増加し、92.1% [suc-HDL]は1%溶液の時、HDLの3倍近い値を示した。しかしこの値はsuc-LDLの乳化活性の

Table 1. Effect of NaCl on the apparent viscosity of succinylated LDL

viscosity in centipoise at 25°C

Protein concentration, %	1.0			2.0		
Salt concentration, %	0	0.1	0.2	0	0.1	0.2
LDL	1.05	1.03	1.03	1.10	1.08	1.09
58.3% succinylated LDL	1.11	1.06	1.05	1.27	1.15	1.13
70.4% succinylated LDL	1.19	1.14	1.12	1.35	1.18	1.16
87.5% succinylated LDL	1.36	1.15	1.12	1.58	1.33	1.19

Table 2. Effect of NaCl on the apparent viscosity of succinylated HDL

viscosity in centipoise at 25°C

Protein concentration, %	1.0			2.0		
Salt concentration, %	0	0.1	0.2	0	0.1	0.2
HDL	0.99	1.02	1.03	1.08	1.14	1.10
48.0% succinylated HDL	1.20	1.24	1.24	1.25	1.69	1.62
74.9% succinylated HDL	1.37	1.71	1.78	1.67	1.94	2.06
92.1% succinylated HDL	1.86	1.66	1.39	2.60	2.20	1.98

Fig. 3. Effect of succinylation on the emulsifying activity of LDL and HDL

- : native
- : 48.0% succinylated LDL
58.3% succinylated HDL
- ▲-▲-▲: 70.4% succinylated LDL
74.9% succinylated HDL
- △-△-△: 87.5% succinylated LDL
92.1% succinylated HDL

最も低い値に相当していた。このように LDL はサクシニル化されると乳化活性が減少し, HDL はサクシニル化されると乳化活性が増加するが, その値は LDL に比べてかなり低いことがわかった。

5. 乳化容量

結果を Fig. 4 に示す。LDL の場合 58.3, 70.4, 87.5 % とサクシニル化率が上がるにつれて, 乳化容量は増加した。87.5% suc-LDL は 0.5% 溶液の時 LDL の 1.4 倍の乳化容量を示した。HDL の場合, LDL の約 80% の乳化容量であったが, やはりサクシニル化されると多少乳化容量が増加し, 92.1% suc-HDL で, 0.5% 溶液の時, HDL の 1.1 倍の乳化容量を示した。以上の結果から, 乳化容量はサクシニル化されると一般に増加するが, LDL は HDL に比べてその増加率が多少大きいことがわかった。

6. 乳化安定性

結果を Fig. 5 に示す。LDL はサクシニル化率が上がるにつれて乳化安定性が著しく増加し, 87.5% suc-LDL は 1.5% 溶液の時, LDL の 5 倍近い乳化安定性を示した。一方 HDL もサクシニル化率が上がるほど乳化安定性が増加し, 92.1% suc-HDL は, 1.5% 溶液の時, HDL の 10 倍近い値を示した。suc-HDL の著しい乳化安定性の増加は, 溶解性の

Fig. 4. Effect of succinylation on the emulsifying capacity of LDL and HDL

- : native
- : 48.0% succinylated LDL
58.3% succinylated HDL
- ▲-▲-▲: 70.4% succinylated LDL
74.9% succinylated HDL
- △-△-△: 87.5% succinylated LDL
92.1% succinylated HDL

増加と関連があるのではないかと推測された。

押田¹²⁾は卵黄より LDL, HDL を遠心分離し, これらでマヨネーズをつくり, 乳化特性を比較検討している。その結果によると LDL の方が HDL より乳化力が大で

Fig. 5. Effect of succinylation on the emulsifying stability of LDL and HDL

- : native
- : 48.0% succinylated LDL
58.3% succinylated HDL
- ▲-▲-▲: 70.4% succinylated LDL
74.9% succinylated HDL
- △-△-△: 87.5% succinylated LDL
92.1% succinylated HDL

あり、乳化安定性は低いと報告している。本実験の場合もやはり LDL の方が HDL に比べて高い乳化活性と乳化容量を示した。また LDL の乳化安定性の低さはサクシニル化によりかなり改善されるように推測された。HDL はサクシニル化によりすべての乳化特性が増加したことから、サクシニル化は HDL の利用性を広げるように推測された。

要 約

鶏卵卵黄を超速心分離して得た低密度リポ蛋白質 (LDL), 高密度リポ蛋白質 (HDL) をサクシニル化し、その溶解性、粘度、乳化活性、乳化容量、乳化安定性を検討した結果を要約すると次のごとくである。

(1) サクシニル LDL の透過度は LDL に比べて中性付近で多少増加した。しかし pH 3.5~4.5 ではサクシニル LDL は白濁した。サクシニル HDL は HDL に比べて透過度が著しく増加した。

(2) サクシニル LDL とサクシニル HDL の粘度は、サクシニル化率が上がるにつれて増加し、87.5%サクシニル LDL は LDL の 1.3~1.4 倍の粘度を示し、92.1%サクシニル HDL は HDL の 2.0~2.4 倍の粘度を示した。

(3) サクシニル LDL の乳化活性は LDL に比べて減少した。一方サクシニル HDL の乳化活性はサクシニル化率が上がるにつれて増加したが、その値は LDL に比べてかなり低いことがわかった。

(4) サクシニル LDL とサクシニル HDL の乳化容量は、サクシニル化率が上がるほど増加し、0.5% 溶液の時、87.5% サクシニル LDL は LDL の約 1.4 倍の乳化

容量を示し、92.1% サクシニル HDL は HDL の 1.1 倍の乳化容量を示した。

(5) サクシニル LDL とサクシニル HDL の乳化安定性は、サクシニル化率が上がるにつれて増加した。特にサクシニル HDL の増加率が著しかった。

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) MEANS, G. E. and FEENEY, R. E.: "Chemical Modification of Proteins" Holden Day, San Francisco, 1971.
- 2) EVANS, M. T. A. and IRONS, L.: German Patent, 1 951 247 (1970).
- 3) 筒井知己・小原哲二郎: 日食工誌, **26**, 81 (1979).
- 4) EVANS, R. J., BANDEMER, S. L., DAVIDSON, J. A., HEINLEIN, K. and VAGHEFI, S. S.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **164**, 566 (1968).
- 5) HOAGLAND, P.: *J. Dairy Sci.*, **49**, 782 (1966).
- 6) MOORE, S. and STEIN, W.: *J. Biol. Chem.*, **211**, 907 (1954).
- 7) 柴崎一雄・大久保一良・佐藤降夫: 日食工誌, **19**, 580 (1973).
- 8) SWIFT, C., LOCKETT, C. and FRYAR, J.: *Food Technol.* **15**, 468 (1961).
- 9) SWIFT, C. and SULZBACHER, W.: *Food Technol.* **17**, 224 (1963).
- 10) 青木 宏・長野宏子: 日食工誌, **22**, 320 (1975).
- 11) 筒井知己・小原哲二郎: 日食工誌, **26**, 365 (1979).
- 12) 押田一夫: 日食工誌, **23**, 250 (1976).

(昭和 54 年 10 月 5 日受理)