卵黄の乳化特性

小川宣子(岐阜女子大学家政学部助教授)

卵黄を構成している蛋白質は，低密度リポ蛋白質 (LDL)，高密度リポ蛋白質 (HDL)，リベチン，ホスビチンからなり，低密度リポ蛋白質，高密度リポ蛋白質はいくつかの蛋白質からなっている。その中のホスビチンは，卵生の脊椎動物特有のもので，脳下垂体から分泌されるロ胞刺激ホルモンや黄前形成ホルモンにより，卵巣から分泌されるエストロジェンが肝臓に直接作用し，肝臓の標的細胞でDNAが活性化され，新しいRNAポリメラーゼ活性が増大することにより，卵黄成分の前駆物質であるリポビテレニンとビテロゲニンが合成される。ビテロゲニンは，リポビテリンとホスビチンの複合体からできており，血液の運搬により卵胞に入るとリポビテリンとホスビチンに分かれて蓄積される。ホスビチンは，リン酸基を多く含んでいる[1,2]ために，生理作用として，体内でミネラルなどを運ぶ担体として重要な蛋白質である。そこで，卵黄中に含まれるこのホスビチンを分離，精製し，同定を行った後，このホスビチンを用いて乳化性を調べた。

1)　ホスビチンの分離・同定

電気泳動法を用いて卵黄構成蛋白質を分画し，その蛋白質の性質を明らかにする前に，泳動像の同定を生物学ラベリングとオートラジオグラフィーで行った。又，卵黄から構成蛋白質を抽出し，抽出した蛋白質の化学的性質をイムノグラフィー，分子量測定，アミノ酸組成から調べ，電気泳動法による画分との確認を行った。

①　生物学的ラベリングとオートラジオグラフィーによる同定[3]

ホスビチンは，エストロジェンの刺激により肝臓で合成された後，血漿中に入り，卵黄中の顆粒部分に存在する。ホスビチンは卵黄中の80%のリンを含む[1]リン蛋白質であるので，その性質を利用してラベリングしたリンを投与することで血液中と卵黄に蓄積されたホスビチンを電気泳動により分離し，この分離蛋白質の同定を行った。

産卵中の雌ウズラ（体重約120 g）に，担体なしの^{32}Pを850 μCi 投与し，投与翌日に血液を採取後，屠殺して腹腔内より卵胞を取り出し，卵胞膜を除去した後，内部の卵黄を採取した。血液は，3,000rpm で遠心分離を行い，血漿を得，試料とした。卵黄は，0.9%と10%の食塩水で2倍希釈した[4]。10%高張食塩水によりホスビチンが存在している卵黄の顆粒部を溶解することができた。これらの試料を水平式ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により，泳動を行った。電気泳動法は，Gahne ら[5]（1977）の原法を改良した水平式ポリアクリルアミド薄層ゲル電気泳動法（阿部・小松，1978）[6]を用いた。電極槽用緩衝液には，0.13Mトリス—ホウ酸緩衝液 (pH 9.0)，ゲル用緩衝液には，0.1875Mトリス—硫酸緩衝液 (pH 9.0) を用いた。泳動用支持体としては，幅24cm，長さ20cm，厚さ1.2mm のゲル枠に10%（分離ゲル，長さ16 cm)，4%（試料添加ゲル，長さ3 cm) 及び8%（長さ1 cm) の濃度のポリアクリルアミドグラジエントゲルを作成した。通電は30mA の定電流で約2時間行い，通電開始15分後に濾紙片を除去した。泳動終了後，X線フィルムをゲルに上に重ね，4日間放置した後，現像を行い，リン蛋白質の存在を確認した。

0.9%の生理食塩水と顆粒部を溶解させるため

に10%の高張食塩水の各々で2倍希釈したウズラ卵黄の電気泳動像（**Fig.1**）より，10%の高張食塩水で希釈したウズラ卵黄の泳動像には No. 1-No. 11 の泳動帯が存在した。0.9%による卵黄希釈の泳動像の場合も，10%による卵黄希釈の泳動像の場合も，泳動像に大きな違いはみられなかった。しかし，10%希釈卵黄蛋白質の泳動像には No. 3 の泳動帯が存在し，0.9%希釈卵黄蛋白質には，この泳動帯は存在しなかった。このように0.9%食塩水や10%食塩水で希釈した場合にのみ見られる泳動帯が存在した。卵黄中の顆粒部分は0.9%の濃度の食塩水では溶解しないが，10%の食塩水では溶解する。このことから No. 3 の泳動帯は，卵黄中の顆粒に含まれる蛋白質と思われる。

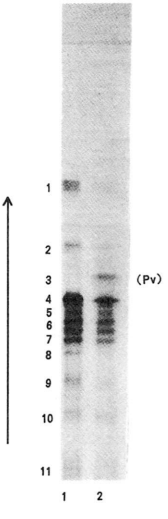


Fig.1 Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoretograms of whole quail egg yolk protein and purified yolk phosvitin stained with coomassie brilliant blue R.
1. quail yolk (quail yolk was diluted with an equal volume of 0.9% saline.)
2. quail yolk (quail yolk was diluted with an equal volume of 10% saline.)

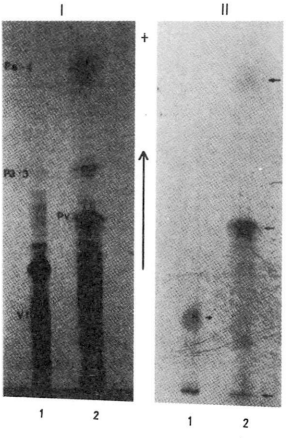


Fig.2 Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoretograms(Ⅰ) and its autoradiograms (Ⅱ) of Japanese quail.
1. plasma　2. egg yolk

^{32}P によるラジオオートグラフを **Fig.2** に示した。卵黄は，No. 3 (Pv) の泳動帯に強い反応が現れ，No. 1 (Pa-4) にやや弱い反応を示し，そして No. 4-NO.10 に極く弱い反応が見られた。よってこれらの泳動帯は，リン蛋白質であると考えられる。血漿は，No. 9 の泳動帯に強い反応があったことから，これは卵黄成分の前駆物質の一つであるリポビテリンとホスビチンの複合体であるビテロゲニンであると推定できた。

② ウズラ卵黄ホスビチンの精製

①でウズラ卵黄構成蛋白質の中でリン蛋白質泳動帯を確認した。そこで次に，卵黄よりホスビチンを抽出し，その化学的性質を調べ，抽出を行わないで確認したリン蛋白質との比較を行った。

ホスビチンの分離抽出法としては，Evans[7]，Bernardi ら[8] による遠心分離法，Tsutsui ら[9,10] による DEAE- セルロースカラムを用いた NaCl の linear gradient による溶出法などがあるが，Mecham ら[1] によるホスビチン抽出法を用いた

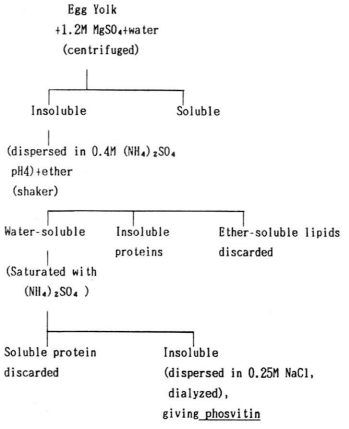


Fig. 3　Preparation of phosvitin fraction from egg yolk

(**Fig. 3**)。これは，抽出に時間を要するが，安価で多量の卵黄を処理することができ，比較的多くのホスビチンを抽出することができる方法である。方法は，卵黄に 1.2M $MgSO_4$を加え塩析した後，沈澱物を 0.4M $(NH_4)_2SO_4$で振とうし，6N H_2SO_4で pH 4.0 に調整し，次に 1 M酢酸緩衝液 (pH 4.0) とエチルエーテルで振とうした。分離したゼラチン層及び水溶液層を 0.4M $(NH_4)_2SO_4$，1 M酢酸緩衝液，エチルエーテルでさらに抽出して水溶液層を得，これを $(NH_4)_2SO_4$ 飽和溶液で透析を行い，沈澱物を採取した。これを 0.25M NaCl で溶解した後，0.01M酢酸ナトリウムで透析し，凍結乾燥により濃縮を行い，ホスビチンを抽出した。卵黄からのホスビチン抽出量は0.35%前後であった。

抽出試料（沈澱部）及びその他の画分（上澄液）については，バナドモリブデン酸法による比色法[11] を用いてリン含量の定量を行った。方法は，混酸で分解した試料に，硝酸液，0.25%メタバナジン酸アンモニウム液，5%モリブデン酸液を加え，445nm の波長で吸光度を測定した結果，抽出試料（沈澱部）のリン含量は26%，その他の画分（上澄液）は0.5%であった。

抽出した試料を DEAE Sepharose CL-6B(直径 2 cm, 長さ20cm) を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。緩衝液は，0.02Mトリス－塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用い NaCl 濃度を直線的に 0.6Mまで上げて溶出した。流速は，0.3ml/min で試験管 1 本につき 3 g ずつ採取し，流出液は，波長280nm で吸光度を測定した。なお，これらの操作はすべて10℃の温度内で行った。採取した各試験管ごとに電導度を測定し，ピークが出現した部分についてはセロチューブ12,000を用いて透析により塩を除去し，その後，凍結乾燥による濃縮を行い，精製試料を得た。

ウズラ卵黄より抽出した試料のクロマトグラムを **Fig. 4** に示した。これにより，溶出量240ml-345 mlの所に小さなピーク（第 I 画分）と，420ml-486mlの所に大きなピーク（第II画分）が現れ，第 I 画分の出はじめと出おわりの電導度は，1975 μ. mho-3230 μ. mho, NaCl濃度は，0.1M-0.2 M，第II画分の出はじめと出おわりの電導度は，3910 μ. mho-4900 μ. mho, NaCl 濃度は，0.29 M-0.39Mであった。又，主要ピークである第II画分の吸光度が最高値を示す時の電導度は，4210 μ. mho, NaCl 濃度は，0.32Mであった。この第II画分の試料につき，再度，DEAE イオン交換クロマトグラフィーで精製を行った結果 (**Fig. 5**)，溶出量18ml-383ml をII－1 画分，384ml-464ml をII－2 画分，465ml 以後をII－3 画分と分画すると，II－2 画分には 3 つのピークが存在し，これをウズラ卵黄精製ホスビチンとした。

③　抗血清の作製

高等動物の免疫機能は生体内に侵入した外来の成分を除去して個体としての統一性を維持するための機能を持っている。そこで，この機能を利用

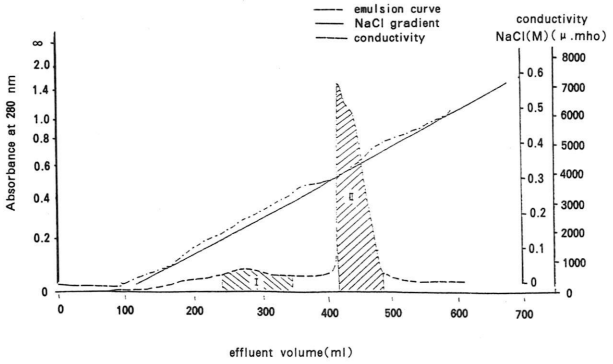


Fig. 4 Choromatographic Pattern of yolk phosvitin of Japanese quail on DEAE-Sepharose CL-6B.

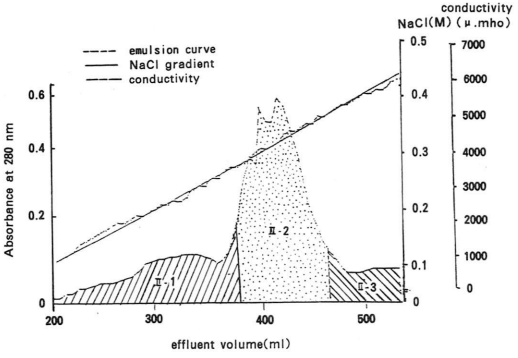


Fig. 5 Choromatographic pattern at second trial of yolk phosvitin of Japanese quail on DEAE-Sepharose CL-6B.

して抗血清を作製した。

Linda ら[12] により，カルモジュリンの抗体を作る際に，カルモジュリン投与では抗体を作製することをできなかったが，化学修飾させたカルモジュリンを投与することで，カルモジュリンの抗体を作製することができたという報告がある。そこでホスビチンの抗体作製についてはいままで報告がなく，産出しにくいといわれていたが，②で精製して得られたウズラ卵黄ホスビチンを過ギ酸酸化で化学修飾したホスビチンを抗原として投与することを試みた。抗血清の作製は精製試料を過ギ酸酸化による化学修飾をしたものを抗原として用いた。過ギ酸酸化を行うことで，蛋白質分子中のS-S結合が切れて$-SO_3H$となり，メチオニン残基の$-SCH_3$が$-SO_2CH_3$になり，化学修飾がおこるのではないかと推定される。精製試料0.02 g をギ酸0.5mlで溶解し，30分間氷水中で振とうし，過ギ酸試薬（30%過酸化水素0.5mlにギ酸9.5mlを加え，室温で30分間振とうした後，30分間氷水中で冷却して作製）を1.5ml加え150分間氷水中

で振とうさせ，試料を過ギ酸酸化させた。この抗原とフロイトアジュバントとエマルジョンを作製し，ウサギ（ニュージーランドホワイト種）への1回の投与量を300μg～400μgとし，103日間で11回投与を行った。抗原量の11回投与の合計は4000μgであった。フロイトアジュバントは1回の投与の時のみ完全フロイトアジュバントを用い，他の場合は，不完全フロイトアジュバントを用いた。抗原は，ウサギの背中に皮下注射を行い，投与した。頸動脈から血液を採取後，1,000rpmで20分遠心分離させ，血清を得，−80℃で保存した。

④ オクテルロニー法による抗体産生の確認

血清中に抗体作製が行われたかオクテルロニー法[13]により調べた。0.015Mリン酸緩衝液(pH 7.4)でアガロース濃度1.2％の寒天培地を用い，ウェルの大きさは直径3mmで，ウェルとウェルの間隔は2mmで行った。中央に抗血清を注入し，まわりに精製試料と，これを過ギ酸酸化による化学修飾を行ったホスビチン（化学修飾ホスビチン）とリン酸緩衝液を各々5μlずつ注入し，37℃の恒温器内で2時間放置し，沈降線を観察した。

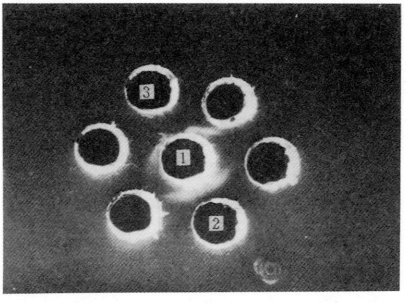


Fig. 6 Cross-reaction between quail yolk and rabbit antisera against quail yolk phosvitin.
1: antisera against quail yolk phosvitin
2: phosvitin prepared by Mecham & Olcott
3: chemical modified quail yolk phosvitin

沈降線が形成されていない時は，さらに抗血清を5μl注入した後，37℃一昼夜放置した結果を**Fig. 6**に示した。これによりウズラ卵黄精製試料と化学修飾ウズラ卵黄ホスビチンが抗血清との間に沈降線を形成し，抗血清中には抗原として使用した試料に対する抗体が生成されたことが確認できた。

⑤ ブロッティング法による泳動帯の同定

ホスビチン抗体が作製されていることを確認したこの抗血清を用いて，電気泳動法により分画された蛋白質の泳動帯のうちでホスビチンの泳動帯の確認を抗原抗体反応を利用したブロッティング法により行った。

ブロッティング法は，ポリアクリルアミドゲルからニトロセルロースメンブランへ蛋白質をSEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD製TRANS-BLOT SD)により電気的に移行させるウェスタンブロッティングの手法を用いた。ニワトリ卵黄抽出ホスビチン（5μg/μlH_2O)，10％食塩水により2倍希釈したニワトリ卵黄，ウズラ卵黄抽出ホスビチン（2.5μg/μlH_2O)，10％食塩水により2倍希釈した試料について水平式ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を行った。その結果を**Fig. 7**に示した。これにより，ウズラ卵黄ホスビチンとウズラ卵黄抽出ホスビチンは同じ移動度の所に泳動帯が存在した。泳動終了後は，イムノウエスタンブロッティング法[14]によりニトロセルロースメンブランに蛋白質のブロッティングを行った。ブロッティン終了後は一次抗体，二次抗体の非特異的に結合するのを防ぐために3％牛血清アルブミンでブロッキングを行い（30mA，3時間)，一次抗体としては，作製した抗ホスビチン抗血清，二次抗体はPODコンジュゲイト抗ウサギIgG (Peroxidase Conjugated Antiserum to Rabbit IgG)を用い，イムノステイン染色キット（コニカイムノステインHRP)で，過酸化水素の

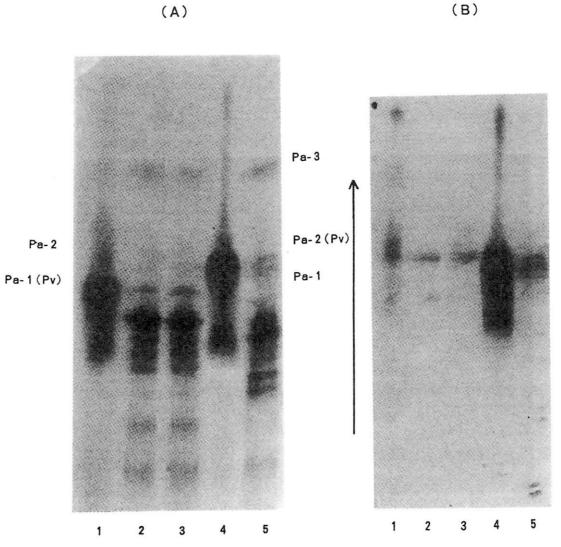


Fig.7 Quail yolk phosvitin and chicken yolk phosvitin electrophoresed in polyacrylamide gel(A) and Western blot(B).
1:chicken yolk prepared by Mecham & Olcott
2,3:chicken yolk (chicken yolk was diluted with an equal volume of 10% saline.)
4:quail yolk prepared by Mecham & Olcott
5: quail yolk (quail yolk was diluted with an equal volume of 10% saline.)

作用により酸化された芳香族アミノ化合物とナフトール誘導体のカップリング反応による染色を行った。その結果を **Fig.7** に示した。この抗血清は，ウズラ卵黄ホスビチンだけでなく，ニワトリ卵黄の Pa-2 に強く反応し，他の泳動帯にも反応したことから，作製した抗血清はモノクロナール抗体ではなく，ポリクロナール抗体であり，これは他の蛋白質とも抗原体反応を示すが，モノクロナール抗体に比べて抗原体反応が強く，ホスビチンの泳動帯の同定には有効な抗血清を作製することができたと考えられる。

⑥ 抗ホスビチン抗血清の抗体価測定

作製抗ホスビチン抗血清の抗体価測定を酵素免疫測定法 (ELISA 法 Enzyme-linked immunosorbent assays) により行った。固相はマイクロプレートウェルの内面とし，抗原はウズラ卵黄抽出ホスビチンで1ウェル (well) 当たり，100μl（1μg/ml(リン酸緩衝液)），一次抗体である抗血清（抗ホスビチン抗血清）は，希釈列を100倍，300倍，900倍，2,700倍，8,100倍，24,300倍，72,900倍，218,700倍，656,100倍，1,968,300倍，5,904,900倍とし，各々300μl 用いた。

POD コンジュゲイト抗体溶液（抗ウサギ IgG-POD コンジュゲイトヤギ抗体溶液 Peroxidase Conjugated Antiserum to Rabbit IgG)100μl/well(3,000倍希釈）を酵素標識二次抗体とし，基質を0-フェニレンジアミンとして，酵素を呈色させ，マイクロプレートリーダー MPR-A4(東洋曹達株式会社製）を用い，波長492nm で抗血清の各希釈系列の吸光度を測定した。反応の中止は

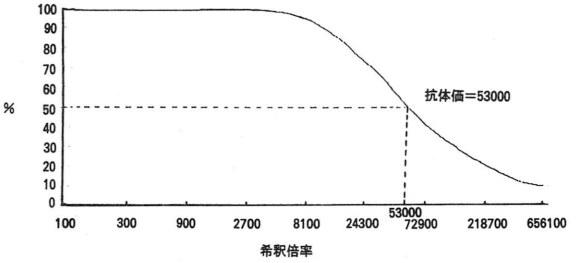


Fig.8 Antibody rabbit antisera against quail yolk phosvitin dilution antibody

1N H_2SO_4を用いた。最も高い吸光度の値を100%とし，各希釈系列の吸光度の割合を算出し，縦軸にその割合を，横軸に希釈倍数の対数をとり，グラフを作製した（**Fig.8**）。これより50%の吸光度を示す希釈倍数を抗体価とした所，抗体価は，53,000となり，高い抗体価を示した。このことから，抗ホスビチン抗血清の中には多くの抗体を含んでいると考えられ，抗原として用いたウズラ卵黄ホスビチンの精製度も高いものであったと推測できる。

⑦ 分子量

ウズラ卵黄ホスビチンの化学的性質の分子量測定をスラブSDSポリアクリルアミド電気泳動法で行った。

スラブ型SDSポリアクリルアミド電気泳動法による分子量測定方法は，標準試料は分子量既知の市販試料カルボキシペプチダーゼ(M. W. 34,600)，牛血清アルブミン(M. W. 68,000)，ミオグロビン(M. W. 16,900)の各々1mgに対して蒸留水，0.05%トリス-塩酸緩衝液(pH 6.8)，5%SDS，5%β-メルカプタノール，グリセリンの順でそれぞれ1mlずつ加え，100℃で2分間沸騰させ，一昼夜放置し，−20℃で凍結保存して，使用時ごとに解凍し，試料とした。又，ウズラ卵黄抽出ホスビチン，ウズラ卵黄精製ホスビチンは，試料2mgに対し，分解試薬を各々0.5mlとした。電気泳動法の条件は，分離ゲル濃度9.7%，濃縮ゲル濃度4.4%のゲルで，ゲル用緩衝液は，トリス-塩酸緩衝液(pH 6.8)，電極用緩衝液は0.02Mトリス-0.192Mグリシンで行い，16mAの定電流で2時間通電した。泳動終了後は，CBBR-250で染色を行った。その結果ウズラ卵黄抽出ホスビチンは3本の泳動帯に分離し，このうち主要な2本の泳動帯の分子量が相対移動度より，34,000，31,000であったが，ウズラ卵黄抽出ホスビチンをイオン交換クロマトグラフィーでさらに精製を行った時の第II画分の試料は，泳動帯が一本になり，他の泳動帯は除去され，残った泳動帯の分子量は32,000であった。

⑧ アミノ酸組成

ウズラ卵黄ホスビチンのアミノ酸組成を835形日立高速アミノ酸分析計を用いて明らかにした。

試料は6N HClを添加し，110℃で24時間加熱し，加水分解を行った。分析条件は，内径2.6mm，長さ150mmのカラムで日立カスタムイオン交換軸脂#2619を用い，温度は53℃で行った。ウズラ卵黄精製試料のアミノ酸組成の結果を**Table 1**に示した。これより，センリの含量は41.9%と高く，その次に多いのはリジン，アスパラギン酸，グルタミン酸，ヒスチジン，アルギニンの順であった。又，シスチンは含有していなかった。

Table 1 Amino acid composition of purified yolk phosvitin of Japanese quail.

アミノ酸 amino acid residue	濃度（%） concentrate		
	ウズラ Quail	ニワトリ Chicken	
アスパラギン酸 (Asp)	8.0	6.0[46]	6.2[49]
スレオニン (Thr)	3.5	2.3	7.2
セリン (Ser)	41.9	56.4	54.5
グルタミン酸 (Glu)	7.8	5.1	5.8
プロリン (Pro)	1.9	1.4	1.3
グリシン (Gly)	3.0	2.1	2.7
アラニン (Ala)	4.2	3.3	3.6
システイン (Cys)	1.3	0.0	0.0
バリン (Val)	1.6	1.2	1.3
メチオニン (Met)	0.1	0.4	0.5
イソロイシン (Ile)	1.0	0.9	0.9
ロンシン (Leu)	1.2	1.4	1.3
チロシン (Tyr)	0.1	0.2	0.5
フェニールアラニン (Phe)	1.1	0.4	0.9
リジン (Lys)	10.3	7.0	7.0
ヒスチジン (His)	6.5	5.6	4.9
アルギニン (Arg)	6.5	5.1	5.3
トリプトファン (Trp)	-	-	0.5
合計 Total	100	98.8	105

2) ホスビチンの乳化性

水谷ら[15]は卵黄 LDL で作製したエマルションの分散層について光学顕微鏡で分散粒子の大きさを測定し，報告しているが，顕微鏡下で限られた形の分散粒子を選択し，数えることは非常に困難であり，又，正確さに欠ける[16]。そこで，本研究では，パーソナルコンピュータによる画像処理を用い，ウズラ卵黄精製ホスビチンで作製したエマルションの複雑な分散粒子を観察した。

エマルションの安定性は界面の安定性と関連があり，Kerker[17]は，球状分散粒子の光散乱は，エマルションの濁度と界面と関係があることを示している。そこで，エマルションの安定性について，分光光度計によりエマルションの濁度から測定した。

又，さらに，エマルション作製時における卵の鮮度，蛋白質濃度とエマルションの安定性との関連についても合わせて研究を行った。

① 卵黄試料とその特性

岐阜県養鶏試験場で飼育しているホワイトレグホーン種より，産卵4時間以内の卵を採取し，これを新鮮卵とし，25℃で7日間保存した（以下これを，貯蔵卵という。）

これら新鮮卵と貯蔵卵の卵黄について比重，表面張力，水分を測定した。表面張力は，試料温度を25℃に保ち，泡圧法[18]により測定した。

② エマルションの調製及び乳化安定性の測定方法

卵黄，酢，落花生油（重量比率1：1）を混合し，食塩濃度は10%，蛋白質濃度が1，2，3，4，5%になるように調製し，これを，1,000rpmで60秒間ホモジナイズし，エマルションの試料とした。

又，ウズラ卵黄ホスビチン添加がエマルションの安定性に及ぼす影響について調べるためにエマルションに1)で抽出し，同定を行ったウズラ卵黄ホスビチンを0.5%添加したエマルションを作製した。

Pearce と Kinsella ら[16]による濁度法により，試料を0.1% Triton X-100 で500倍に希釈し，120分後に500nm 波長で吸光度を測定した。この方法は，エマルションの濁度が，分散油滴の界面積に比例するという Ivey ら[19]の考えをもとにしたものである。

又，エマルション溶液をスライドグラスに1滴滴下し，光学顕微鏡（ニコン AFX）で分散粒子を観察し，写真影響をしたものについてパーソナルコンピュータによる画像解析を行った。

③ パーソナルコンピュータによる画像解析

画像解析の過程を **Fig. 9** に示した。イメージキャナー (200dpi, EPSON GT-4000) で光学顕微鏡の写真を取り込み，ヒストグラムによりデータを整理し，これよりしきい値を設定し，データの2

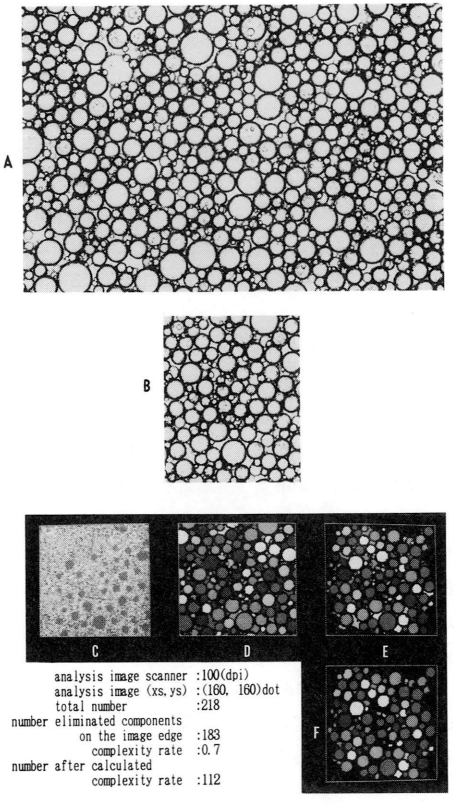


Fig. 9 Algorithm of the image processing in the emulsion
A : A microphotograph by the light microscopy
B : Digitizing by an image scanner
C : Binarizing by the thresholding level
D : Labeling the image
E : Eliminating components on the image edge
F : Screening by complexity

値化を行った。画像の端にかかったデータは，取り除き，データとして認識した分散粒子の面積を画素数から測定した。又，各々の分散粒子の周囲長（L）と面積（S）から次の式より粒子の円形度（複雑度）を求めた。

円形度（複雑度R）＝L＊L/2πS

すなわち，円形度（複雑度）が1に近い程，円形に近く，0に近い程，円形とは離れた型の粒子であることを示す。画像解析を行う際には画像を見ながらこの円形度（複雑度）を入力し，さらにデータとして得たい粒子を対話的に得た。Aがエマルションの光学顕微鏡写真で，Bは画像解析を行った範囲であり，Cはイメージスキャナで取り込んだ画像で，Dで各粒子のナンバリングが行わ

れ，Eで画像の端にかかっているデータが取り除かれ，Fは入力された円形度（複雑度）により得られた画像を示す。

④ 結果及び考察

新鮮卵黄の表面張力は70.73dyn/cmで，貯蔵卵黄では69.19dyn/cmであり，表面張力への鮮度の影響はなかった。又，比重及び水分は，新鮮卵黄で1.033，47.95%であり，貯蔵卵黄では1.041，49.79%であり，卵鮮度が悪くなると卵黄膜の脆弱化が起こる卵白から卵黄に水分が移行することで卵黄水分が多くなり，比重が大きくなったと考えられる。

卵の鮮度，蛋白質濃度がエマルションの乳化安定性（濁度法）に及ぼす影響について **Fig. 10** に示した。蛋白質濃度が1%のエマルションの吸光度は新鮮卵黄，貯蔵卵黄いずれも最も小さく安定したエマルションであったが，蛋白質濃度5%では最も大きくなり，蛋白質濃度はエマルションの乳化安定性（濁度法）に影響を及ぼしていた。蛋白質濃度1%の場合のエマルションの吸光度は，新鮮卵黄によるエマルションの吸光度は0.155であり，貯蔵卵黄の場合が0.126となり，鮮度の悪い方が乳化安定性が小であった。しかし，蛋白質濃度が2，3，4，5%では，卵の鮮度によるエマルションの乳化安定性（濁度法）に違いなかった。又，ウズラ卵黄ホスビチンをエマルションに添加した時の結果を **Table 2** に示した。これより，蛋白質濃度が2～4%のエマルションの場合は，ホスビチンを添加すると吸光度の値が大きくなり乳化安定性は良くなったが，蛋白質濃度が5%のエマルションの場合は，ホスビチンを添加すると吸光度の値が非常に小さくなり乳化安定性が悪くなった。

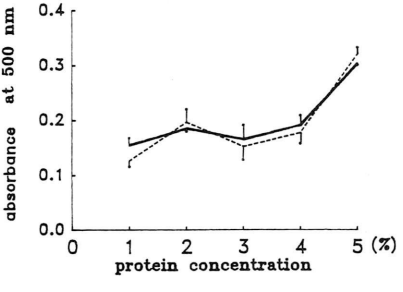


Fig. 10 Effects of storage of egg and protein concentration on the emulsion.
Emulsion prepared from the fresh egg yolk(——), and the stored egg yolk (……).

卵の鮮度，蛋白質濃度がエマルションの分散粒子に及ぼす影響について光学顕微鏡から観察した結果を **Fig. 11** に示した。分散粒子の大きさは1～10μmであった。これを，画像解析し，エマルション分散粒子の面積を測定した結果を**Table 3** に示した。卵の鮮度がエマルション分散粒子の面積に及ぼす影響はなく，蛋白質濃度がエマルション分散粒子の面積に及ぼす影響は，蛋白質濃度1，2，3，4，5%のエマルション分散粒子の面積は，各々85.6～87.6，86.2～98.4，308.4～322.8，229.8～372.4，304.5～352.8 pixelsであり，蛋白質濃度が濃くなるとエマルション分散粒子は大きくなった。

ホスビチンのエマルションへの添加の影響については，蛋白質濃度3%の場合，ホスビチンをエ

Table 2 Turbidity of emulsion

protein concentration (%)	system I	system II
1	0.155*[b] ±0.012	0.131[c] ±0.007
2	0.185[b] ±0.006	0.237[a] ±0.014
3	0.165[b] ±0.026	0.183[b] ±0.014
4	0.191[b] ±0.017	0.211[ab] ±0.025
5	0.303[a] ±0.003	0.086[d] ±0.003

* Means ± standard deviation of six eggs.
Numbers with same letters on the same system are not significantly different at 5% level.
I is emulsion prepared from the fresh egg yolk.
II is emulsion prepared from the fresh egg yolk with 0.5% phosvitin by total weight.

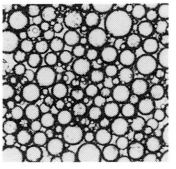
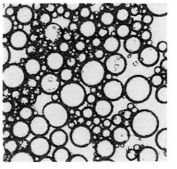
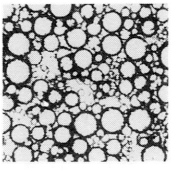
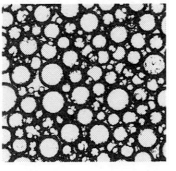
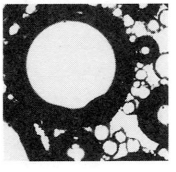
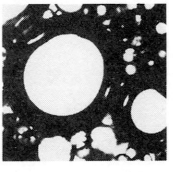
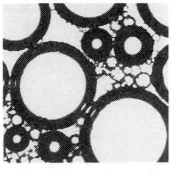
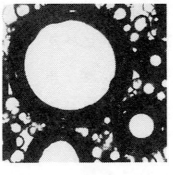
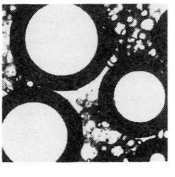
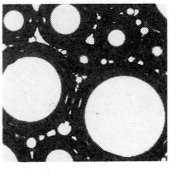
system / protein concentration	the emulsion prepared from the fresh egg	the emulsion prepared from the stored egg
1 %		
2 %		
3 %		
4 %		
5 %		

Fig. 11 Light Micrographs of the emulsion prepared egg yolk

Table 3 The areas of globules in emulsion with the image processing

protein concentration (%)	system		
	I	II	III
1	85.60*b ± 5.41	100.08b ± 18.78	87.60c ± 8.40
2	86.24b ± 11.16	70.29b ± 6.62	98.43c ± 5.98
3	322.75a ± 91.15	71.12b ± 13.98	308.38a ± 23.09
4	372.43a ± 141.17	306.64a ± 96.97	229.76b ± 52.78
5	304.45a ± 121.27	306.46a ± 99.08	352.79a ± 64.35

* Means ± standard deviation of six eggs.
Numbers with same letters on the same system are not significantly different at 5 % level.
I is emulsion prepared from the fresh egg yolk without phosvitin.
II is emulsion prepared from the fresh egg yolk with 0.5% phosvitin by total weight.
III is emulsion prepared from the stored egg yolk without phosvitin.

マルションに添加することにより，分散粒子の大きさは322.75pixelsが71.12pixelsと小さくなり，蛋白質濃度2，4％の場合も分散粒子がやや小さくなる傾向にあったが，他の蛋白質濃度の場合はホスビチンを添加してもエマルションの分散粒子は小さくならなかった。

これより，エマルションの安定性を調べるために，分散粒子の大きさと濁度法による吸光度測定値から検討を行い，これらの結果は一致しなかったが，これは，分散粒子の大きさ測定の観察は，エマルション作製直後の値であり，吸光度測定は，エマルション作製120分後の値であるためと考えられ，分散粒子の分散状態を推定するためには，この両者の値を測定する必要があると考えられる。ウズラ精製ホスビチン添加がエマルションの分散粒子の大きさに与える影響については，蛋白質濃度5％のエマルションの場合は，ホスビチンの添加をしても分散粒子の大きさは無添加のものと比べて変わらないが，この粒子は安定なものではなく吸光度の値は非常に小さくなることが明らかになった。

ホスビチンは従来から乳化性を下げるといわれてきていたが，本研究により，蛋白質濃度が1～4％の範囲では，ホスビチンのエマルションへの添加は，無添加のものと比べてエマルションの分散粒子を細かくし，分散粒子の安定性をもよくすることがわかった。

これは，エマルションの分散粒子の数や面積の測定方法にパーソナルコンピュータによる画像処理を用いることで，エマルションの分散粒子の状態をより正確にとらえることができたからと考えられる。

本研究を遂行するにあたりまして，研究助成を賜りました浦上食品・食文化振興財団に心より感謝いたします。今後とも，貴財団の益々のご発展を祈念致します。

文　献

1) D. K. Mecham and H. S. Olcott: J, Am. Chem. Sci., **71**, 3670 (1949)
2) G. Schimidt, M. J. Bessman, M. D. Hickey and S. J. Thannhauser: J. Biol. Chem., **223**, 1027 (1956)
3) H. Tanabe, N. Ogawa, M. Kurobe and K. Hayashi: Proceeding of 5th AAAP, Vol. 3, p 163 (1990)
4) 水川恵美子・小川宣子・田名部尚子：岐阜女子大学紀要，**17**，113 (1988)
5) B. Gahne, K. Juneja and J. Grolmus: Anim. Blood Grps. biochem. Genet., **81**, 27 (1977)
6) 阿部恒夫・小松正憲：水平式 Polyacrylamide Gradient Gel電気泳動法，免疫実験操作法Ⅶ，1978，pp 2013-2020
7) R. J. Evans, S. L. Bandemer, K. Heinlein and J. A. Davidson: Biochemistry, **7**, 3095 (1968)
8) G. Bernardi and W. H. Cook: Biochem. Biophys.

Acta, **44**, 86 (1960)
9) T. Tsutsui and T. Obara: Agric. Biol. Chem., **48**, 1153 (1984)
10) T. Tsutsui and T. Obara: Agric. Biol. Chem., **46**, 2587 (1982)
11) 農林省農林水産技術会事務局監修，作物分析法委員会編：栄養診断のための栽培植物分析測定法，養賢堂，1983，p 5, 70
12) J. E. Linda and D. M. Watter: J. Biol. Chem., **256**, 4205 (1981)
13) 狩野恭一：医学免疫学，東京大学出版，1979，p 5
14) A. W. Neal Burnette: Anal. Biochem. **112**, 195 (1983)
15) R. Mizutani and R. Nakamura: J. Food Sci., **50**, 1621 (1985)
16) K. N. Pearce and J. E. Kinsella: J. Agric. Food Chem., **26**, 716 (1978)
17) M. Kerker: The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation, 1969, Academic Press
18) 鮫島実三郎：物理科学実験法，裳華房，1988，p 345
19) F. I. Ivey, N. B. Webb and V. A. Jones: Food Technol., **24**, 1279 (1970)

Emulsifying Property of Egg Yolk Protein

Noriko Ogawa (Gifu Women's University)

i) Phosvitin isolated from egg yolk

Thin layer horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoretograms of egg yolk.

Yolk phosvitin was isolated from fresh egg by the method of Mecham and Olcott. Purification of the phosvitin fraction was performed by ion exchanged chromatography on a DEAE-Sepharosed CL-6B column. Both with the phosvitin band in egg yolk sample and with phosvitin preparation bands on polyacrylamide gel, welldefined purple phosphoprotein bands resulted.

Amino acid composition of purified phosvitin is obtained that serine content of the sample was 41.9% as residue percent permolecule.

Performic oxidized phosvitin, emulsified in either complete Freund's adjuvant or incomplete Freund's adjuvant, was used as antigen to immunize a rabbit. The antisera were assayed for specificity against performic acid-oxidized purified phosvitin by Ouchterlony double immunodiffusion analysis and by enzymelinked immunosorbent assay. Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis was employed to determine electrophoretic patterns of egg yolk and were identified by three different methods. (1) Checking autoradiograms of the gel of yolk sample obtained from ^{32}P-injected laying quail. (2)Western blotting to determine of phosvitin band. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel was done on to nitrocellurose. Blot was incubated in a solution containing anti-quail phosvitin antisera. The antibody binding to Phosvitin bands was detected IgG antibody. The antigen bound to immobilized antibody was then detected by using staining kit. (3)Staining of phosphoprotein bands on the gel with rhodamines B-pohosphomolybdate complex.

The purified quail yolk phosvitin bands showed exactly the same mobility as the ^{32}P-labeled major phosphoprotein bands, phosvitin.

The immunized rabbit with performic acid-oxidized phosvitin was bled one week following injection, and sera were tested for the presence of antibody directed against phosvitin. The serum obtained on day 110 clear precipitation lines were observed against native phostitin and performic acid-oxidized phosvitin by double diffusion test. Antibody titer of the antiphosvitin antisera against purified phosvitin was around 53,000 by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Thus antiphosvitin antibody were elicited by the injection of performic acid oxidized phosvitin in their study. Previous efforts to elicit an

antibopy directed against Phosvitin in rabbits were unsucessful, since Phosvitin appeared to be poor antigen in rabbits.

ii) Emulsifying properties of egg yolk

This experiment was carried out to elucidate the effect of storage of shell eggs and protein concentration on emulsifying properties of egg yolk.

The egg yolk stored at 25℃ for 7 days was suspended in vinegar-peanut oil, and 10% NaCl. Amount of protein concentrate of emulsion were 1, 2, 3, 4 and 5%.

The applications of the emulsion requires the form of size distribution and measurements of turbidity, and the image processing with personal computer to be evaluate as a method for observing emulsifying properties of egg yolk.

Fresh and stored egg yolk gave the lowest turbidity in 1% protein concentrate emulsion, and highest turbidity in 5% protein concentrate emulsion. The effect of the protein concentration was apparent in turbidity of emulsion.

The absobance of 1% protein concentrate emulsion prepared from the fresh egg yolk was 0.155, and that of the emulsion prepared from the stored egg yolk was 0.126. The storage didn't caused decrease in turbidity of 2, 3, 4 and 5% protein concentrate emulsion.

The turbidity at 5% protein concentrate was much larger, but the size of globulars was large. The addition of phosvitin in 5% protein concentration emulsion was less effect of the turbidity of the emulsion, but the foam formation was high in that of phosvitin in 3% protein concentration emulsion.

The size of globules with the light microscopy corresponds to that of globules with the personal computer image processing.

The image processing with personal computer improved to evaluate globular size.