

〔報 文〕

ジアシルグリセロールの乳化特性

— O/W 型エマルジョンの油水界面における吸着タンパク質量の測定 —

大橋きょう子・飯田美希・岡田智美

Emulsifying Properties of Diacylglycerol

— The Amount of Adsorbed Proteins on the Interface of Oil in Water Emulsions —

Kyoko OHASHI, Miki IIDA and Tomomi OKADA

In an earlier study, mayonnaise-like o/w emulsions prepared with diacylglycerol (DAG) showed higher viscosity than those prepared with triacylglycerol (TAG) under the same conditions. A similar tendency was observed even for preparations of oil droplets with approximately the same interface area, indicating that the amount of adsorbed proteins of DAG emulsions was higher than that of TAG emulsions.

Thus, this study attempted to clarify the amount of adsorbed proteins on the emulsion prepared with DAG. The viscosity and oil droplet size of DAG and TAG emulsions with varying oil-volume fractions were measured, and the amount of adsorbed proteins on the interface of DAG and TAG emulsions were measured.

DAG emulsions were found to contain less adsorbed proteins on the oil-water interface than TAG emulsions, suggesting that DAG and TAG differ with respect to their intermolecular interactions and structural changes following protein adsorption on the oil-water interface.

Key words: diacylglycerol (ジアシルグリセロール), oil droplet size (粒子径), oil-water interface (油水界面), egg yolk protein (卵黄タンパク質), adsorbed protein (吸着タンパク質)

緒 言

ジアシルグリセロール (以下 DAG) は、グリセリンに脂肪酸が 2 個結合した構造で、分子内に 1 個の水酸基 (OH 基) を有するため、体内で消化吸収された後、体脂肪として再合成されにくいことがすでに明らかとなっている¹⁾⁻³⁾。これまでに著者らは、DAG の構造上の違いにより調理特性もまたトリアシルグリセロール (以下 TAG) と若干異なることを報告している⁴⁾⁻⁸⁾。中でも、DAG で調製したマヨネーズ様 O/W 型エマルジョンの粘度が、同条件で調製した TAG のそれより大きく、油滴の総界面積を同じに調整しても同じ傾向にあることを認めた⁴⁾。このことから DAG エマルジョンの油水界面にお

ける吸着タンパク質の影響が示唆された。

タンパク質は脂質粒子表面に吸着するとタンパク質同士で相互作用することによって強固なフィルムを形成すること、また、乳化剤と粒子表面 (油水界面) 上で相互作用することが知られている^{9), 10)}。このようなタンパク質と脂質の油水界面における相互作用は、エマルジョンの乳化作用に関与すると考えられる。

そこで、DAG エマルジョンの乳化性に及ぼす吸着タンパク質の影響を明らかにすることを目的として、油相体積分率 (ϕ) の異なる DAG および TAG エマルジョンの粘度と粒子径を測定し、乳化安定性が高かった $\phi 0.6$ エマルジョンについて、DAG 油水界面における吸着タンパク質量を TAG のそれと比較し検討した。

実験方法

1. 試料および試薬

(1) 試料油

脂肪酸組成およびトコフェロール含量をほぼ同一に調整した DAG および TAG (花王株式会社提供) を用いた。試料油の成分組成を表 1 に示した。

(2) 卵黄

5°C で保存した採卵後 2 日以内の白色レグホン系鶏の卵を割卵, 分離後, ペーパー上で卵黄を転がして卵白およびカラザを完全に除去し, 直ちにエマルジョンの調製に供した。

(3) 酢酸水溶液

酢酸 (試薬特級; 和光純薬工業株式会社) を脱イオン水で 3.5% (v/v) 水溶液とした。

(4) クエン酸緩衝液

0.1 M のクエン酸水溶液および 0.1 M クエン酸ナトリウム水溶液 (いずれも試薬特級; 和光純薬工業株式会社) を混合し, pH 3.6 のクエン酸緩衝液とした。

表 1 試料油の一般組成

	試料油	
	DAG	TAG
脂肪酸組成 (%)		
C16:0	3.2	5.6
C18:0	1.2	2.0
C18:1	39.8	37.7
C18:2	47.1	45.3
C18:3	8.4	9.0
C20:1	0.3	0.4
計	100.0	100.0
トコフェロール含量 (ppm)		
α	276	300
β	0	52
γ	614	551
δ	207	131
計	1,096	1,032
POV	0.19	0.66
AV	0.1	0.02
比重 (20°C)	0.926	0.914
表面張力 (25°C) (mN/m)	34.5	35.0
界面張力 (25°C) (mN/m)	12.5	23.5
粘度 (20°C) (mPa·s)	78.6	63.8

(5) ローリー法試薬キット

Modified Lowry Protein Assay Kit No. 23240

(PIERCE 社; 和光純薬工業株式会社)

- 酒石酸銅
- Folin 試薬
- 標準タンパク質溶液 (牛血清アルブミン)

2. エマルジョンの調製

油相体積分率 (ϕ) 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7 のエマルジョンを表 2 の条件に従い, それぞれ全量 10 ml を調製した。すなわち, 卵黄:3.5% (v/v) 酢酸水溶液=1:1 をホモジナイザーガラスカップに入れて予備攪拌した後, DAG または TAG を加えハイフレックスディスペルサー (HG 9-2 型; 株式会社エムエステー) を用いて, 20°C で 10,000 rpm, 5 min. 乳化攪拌を行い, 各試料エマルジョンを得た。得られたエマルジョンを 5°C で 60 分間静置後, 直ちに測定に供した。

表 2 エマルジョンの調製条件

油相体積分率 (ϕ)	0.5	0.55	0.6	0.65	0.7
油相 (ml)	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
水相 (ml)	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0

3. 測定項目

(1) 粘度測定

コーンプレート式回転粘度計 (TVE-33 H 型; 東機産業株式会社) を用いて, ϕ 0.5~0.7 の DAG および TAG エマルジョンを 20°C で測定した。測定に供したサンプル量, コーン・ローターおよびレンジを表 3 に示した。ローターの回転数を 1, 2, 5, 10, 20, 50 rpm の 6 段階, 各回転数における回転時間を 70, 40, 30, 30, 30, 30 sec. とし, 各回転数における測定値を自動記録し, 得られた値を流動解析ソフト (VA 2000; 東機産業株式会社) で解析し粘性係数 (Pa·s) を得た。

(2) 粒子径の測定

スライドガラスに試料エマルジョンを乗せてプレパラートを作成し, 高精細クイックマイクロスコープ (VH-5000; キーエンス株式会社) で観察, 対物ミ

表 3 測定条件

油相体積分率 (φ)	0.5	0.55	0.6	0.65	0.7
サンプル量 (ml)	1.1	1.1	0.5	0.5	0.4
コーン・ローター	1°34×R24	1°34×R24	3°×R14	3°×R14	3°×R12
レンジ	H	H	H	H	H

クロメーター (×1000) で撮影し画像を取り込んだ後、画像解析ソフト (WinRoof; 三谷商事株式会社) を用いて各エマルジョンの平均粒子径および標準偏差を得た。

(3) タンパク質の定量

DAG および TAG を用いて調製した φ0.6 エマルジョンについて、Denmat ら¹¹⁾の方法に準拠して粒子表面に吸着したタンパク質の測定を行った。

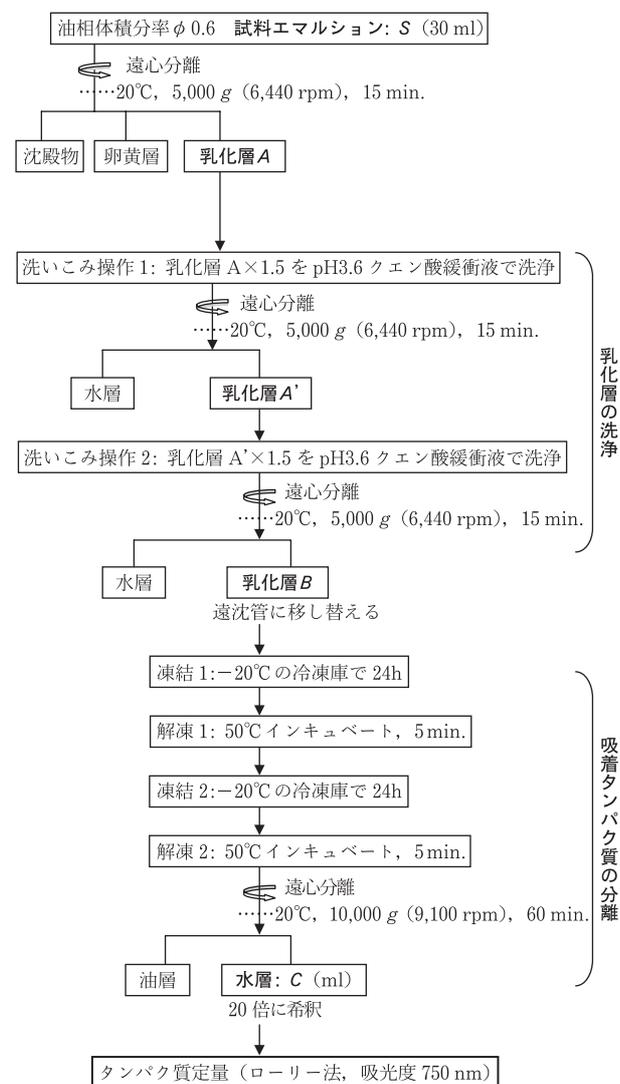


図 1 エマルジョンの吸着タンパク質の分離

測定に供した DAG および TAG エマルジョン S 各 30 ml を 20°C, 5,000 g (6,440 rpm), 15 min. 遠心分離した乳化層 A を、pH 3.6 クエン酸緩衝液で洗浄、遠心分離を 2 回繰り返して乳化層 B を採取した。採取した乳化層を -20°C で 24 時間凍結し、50°C で、5 min. 解凍する操作を 2 回繰り返した後、20°C, 10,000 g (9,100 rpm), 60 min. 遠心分離して乳化層を破壊し油層と水層に分離し、水層 C を得た¹²⁾。(図 1) 得られた水層中のタンパク質濃度をローリー法^{13), 14)}により定量した。すなわち、標準タンパク質溶液 (牛血清アルブミン) を用いて、タンパク質濃度を 5 段階 (20, 40, 60, 80, 100 μg/ml) に設定し、分光光度計で波長 750 nm における吸光度を測定した。測定値から検量線を作成し、水層中のタンパク質濃度 (μg/ml) を算出した。

いずれの測定も全て 4 回繰り返し行った。

結 果

1. エマルジョンの粘度 (粘性係数)

試料エマルジョンのずり速度上昇カーブについて解析した結果、測定値はいずれも両対数グラフ上で直線に近似でき、指数方程式 (Hershel-Bulkley の方程式) に従ったので、この式 I より粘性係数を求めた。

$$S - S_0 = KD^n \dots \text{式 I}$$

S: ずり応力 (Pa), S_0 : 降伏値 (Pa), K: 粘性係数 (Pa · s), D: ずり速度 (S^{-1}), n: 流動性指数

得られた油相体積分率の異なる各エマルジョンの粘性係数 (Pa · s) を図 2 に示した。油相体積分率 φ0.5~0.7 の DAG エマルジョンの粘性係数は $0.63 \text{ Pa} \cdot \text{s} \pm 0.13 \sim 46.74 \text{ Pa} \cdot \text{s} \pm 2.43$ であった。一方、TAG のそれは $0.51 \text{ Pa} \cdot \text{s} \pm 0.10 \sim 21.14 \text{ Pa} \cdot \text{s} \pm 3.07$ で、油相体積分率の増加に伴う粘度の上昇は DAG の方が大きかった。特に φ0.6 を超えた辺

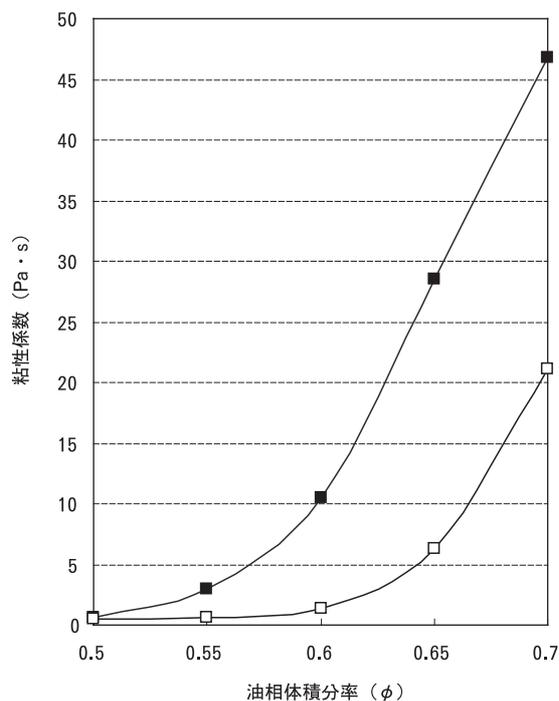


図2 油相体積分率の異なる DAG, TAG エマルジョンの粘性係数
 ■ DAG □ TAG

りから DAG エマルジョンの粘度は著しく大きくなることが認められた。

2. エマルジョンの粒子径

DAG および TAG で調製した ϕ 0.5~0.7 エマルジョンの平均粒子径および標準偏差を図3に示した。

この結果、 ϕ 0.5~0.65 までのエマルジョンにおいては、DAG の平均粒子径の方が TAG のそれに比べて小さかった。粘度が急激に大きくなった ϕ 0.6 における DAG エマルジョン (図2) の平均粒子径は $4.41 \mu\text{m} \pm 1.33$, TAG のそれは $6.47 \mu\text{m} \pm 1.74$ であった。TAG エマルジョンは油相体積分率が高くなるのに伴い平均粒子径は小さくなった。

一方、DAG エマルジョンは油相体積分率の違いによる粒子径の大きさに差は見られなかった。 ϕ 0.7 では DAG エマルジョンの平均粒子径は大きくなり、やや不安定なエマルジョンが形成されたことが認められた。

そこで、粘度が高く平均粒子径が小さかった ϕ 0.6 における DAG エマルジョンを試料として、

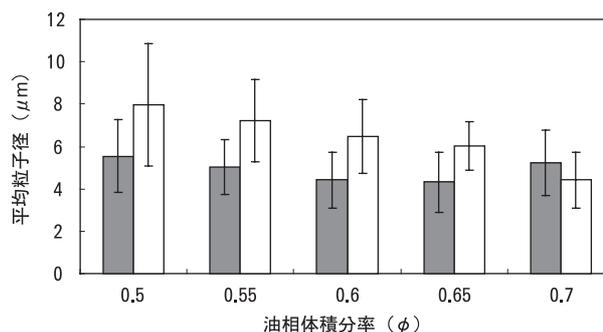


図3 油相体積分率の異なる DAG, TAG エマルジョンの平均粒子径
 ■ DAG □ TAG

油水界面における吸着タンパク質量を TAG のそれと比較した。

3. 油水界面の吸着タンパク質量

(1) 水層中のタンパク質濃度の定量

標準タンパク質溶液を用いて作成した検量線から求められた近似式 II に、吸光度 Y を代入し、20 倍に希釈した水層中のタンパク質濃度 X ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を算出した。結果、DAG エマルジョンのタンパク質濃度は 33.857 ($\mu\text{g}/\text{ml}$), TAG のそれは 58.857 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) であった。

$$Y = 0.0014X + 0.0166 \dots \text{式 II}$$

(2) 試料エマルジョンのタンパク質量

検量線より求めたタンパク質量 X ($\mu\text{g}/\text{ml}$) および測定に供した試料エマルジョンの全容量 S (ml) から得られた界面吸着タンパク分散液、すなわち水層の全容量 C (ml) を、以下の式 III に代入し、試料エマルジョン中のタンパク質量 P (mg) を求めた。試料エマルジョン 30 ml から得られた水層の全容量、および試料エマルジョン中のタンパク質量の結果を表4に示した。

$$\begin{aligned} &\text{試料エマルジョン中のタンパク質量 } P \text{ (g/ml)} \\ &= X \times 20 \times C \times 10^{-6} \dots \text{式 III} \end{aligned}$$

X : 水層 C を 20 倍希釈したタンパク質濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$),
 20 : 希釈倍率, C : 水層の全量 (ml), 10^{-6} : $\mu\text{g} \rightarrow \text{g}$ に換算

表4 試料エマルジョン中のタンパク質量

	DAG	TAG
S: 試料エマルジョン (ml)	30	30
C: 水層の全容量 (ml)	1.46	1.58
P: 試料エマルジョン中のタンパク質量 (mg)	989×10^{-3}	$1,860 \times 10^{-3}$

表5 油滴1個当りの平均粒子径・界面積・体積、油滴の個数および全界面積

	DAG	TAG
平均粒子径 (μm)	4.41	6.47
半径 (μm)	2.21	3.21
界面積 (μm^2)	19.5π	41.2π
体積 (μm^3)	14.4π	44.1π
油滴の全個数	3.98×10^{11}	1.30×10^{11}
油滴の全界面積 (m^2)	244×10^{-1}	168×10^{-1}

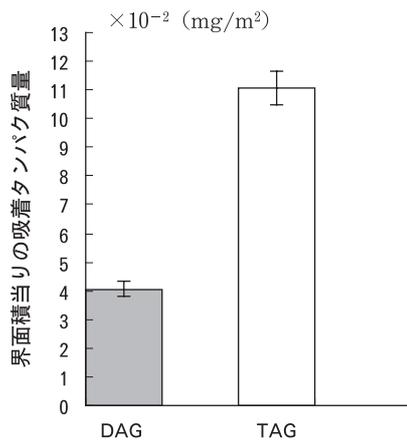


図4 単位界面積当りの吸着タンパク質量

DAG: $4.06 \pm 0.25 \times 10^{-2}$
TAG: $11.07 \pm 0.61 \times 10^{-2}$

(3) 油滴界面積当りの吸着タンパク質量

DAG および TAG エマルジョンの平均粒子径 (図3) から半径を算出し、油滴1個当りの界面積 ($4\pi r^2$) および体積 ($4/3 \cdot \pi r^3$) を求めた (表5)。次に測定に供した試料エマルジョン 30 ml 中の油量 (18 ml) を油滴1個当りの体積で除して油滴の全個数を求め、油滴の個数に油滴1個当りの界面積を乗じて油滴の全界面積を算出した。結果を表5に併記した。エマルジョンのタンパク質量 P (表4) を、

求めた油滴の全界面積で除して、単位界面積当りの吸着タンパク質量 (mg/m^2) を算出し、結果を図4に示した。

考 察

DAG で調製したエマルジョンの粘度は高かったにもかかわらず、油滴界面における吸着タンパク質量は TAG のそれに比べて少なかった。この結果は、油水界面に吸着した卵黄タンパク質の吸着後の構造変化および分子間の相互作用が、両試料油で異なっていることを示唆している。

三田¹⁵⁾は、マヨネーズ様 O/W 型エマルジョンでは、タンパク質が界面に吸着すると油分子が吸着タンパク質分子の疎水部に入り込み、凝集力を弱めるため、構造の変化を起こしやすいと報告している。卵黄タンパク質はリン脂質を介して脂質とタンパク質が結合したりポタンパク質を主体とした構造をとっており、Kawai¹⁶⁾によればリポタンパク質が DAG と接触するとリポタンパク質のリン脂質が DAG 油に溶解してリポタンパク質の構造が壊れる一方、TAG 油と接触した場合にはリン脂質の油層への溶解は生じないことが報告されている。また、乳化性に関与する低密度リポタンパク質は外側の大部分がリン脂質で覆われ¹⁷⁾、この低密度リポタンパク質は TAG に対して乳化剤として有効に機能するが、DAG に対しては有効に機能しないことが先行研究で明らかとなっている⁷⁾。Mirian M. SAKUNO ら¹⁸⁾は、 β -LG を乳化剤とした場合、 $\phi 0.2$ 、水相中の β -LG 1% で調製した DAG エマルジョンのタンパク質量は TAG に比べて少ないことを示し、油滴表面に吸着したタンパク質の構造変化を示唆している。このことから、DAG では油水界面に吸着したりポタンパク質の状態が TAG 界面と大きく異なっているものと考えられる。

一般に、タンパク質は非極性の油と接触するとタンパク質の高次元構造が変化して疎水部分が露出すると言われている^{19), 20)}。TAG では、この露出した疎水部分同士が相互作用し、安定な吸着タンパク層を形成するのではないかと考えられる。一方、DAG は TAG に比べて極性が高いため、タンパク

質の変性度合が低くタンパク質同士の相互作用も少なくなっているものと推察される。本研究の結果からは、卵黄を用いた O/W 型エマルジョンの粘度および粒子径との関係に、油滴吸着タンパク質量の影響は認められないとの結論のみに留まったが、今後は極性脂質と卵黄タンパク質の相互作用、DAG 油界面における挙動について更なる検討が必要である。

要 約

DAG エマルジョンの乳化性に及ぼす油水界面の吸着タンパク質量の影響を明らかにするために、油相体積分率の異なる ϕ 0.5~0.7 の DAG および TAG エマルジョンの粘度と粒子径を測定した。その結果、乳化安定性の高かった ϕ 0.6 エマルジョンの油滴吸着タンパク質量について DAG と TAG で比較し、以下の結論を得た。

- 1) 油相体積分率の増加に伴う粘度の上昇は DAG の方が大きかった。特に ϕ 0.6 を超えた辺りから DAG エマルジョンの粘度は著しく大きくなることが認められた。
- 2) TAG エマルジョンは油相体積分率が高くなるのに伴い平均粒子径は小さくなった。一方、DAG エマルジョンは油相体積分率の違いによる粒子径の大きさに差は見られなかった。
- 3) DAG エマルジョンの油水界面における吸着タンパク質量は、TAG エマルジョンのそれより少なかった。

以上より、油水界面に吸着したタンパク質の吸着後の構造変化および分子間の相互作用が DAG と TAG では異なることが示唆された。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、貴重なご助言を賜りました花王株式会社 中島義信氏、試料油をご提供くださいました花王株式会社に厚く御礼申し上げます。また、論文をまとめるに当たり御教示いただきました本学大学院生活機構研究科特任教授 島田淳子先生に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 渡邊浩幸, 長尾知紀, 後藤直宏, 福島陽子, 鬼沢浩司, 田口浩之, 大町登志子, 安川拓次, 内藤幸雄, 島崎弘幸, 板倉弘重: ジアシルグリセリンの長期摂取によるヒトの体脂肪代謝に及ぼす効果, 日本油化学会誌, **47**, 369-376 (1998)
- 2) 板倉弘重: ジアシルグリセロール油の食事療法への応用, 栄養-評価と治療, **19**, 504-511 (2002)
- 3) 渡邊浩幸: ジアシルグリセロールの栄養特性, 栄養日本, **47**, 15-19 (2004)
- 4) 大橋きょう子, 島田淳子: 濃厚な水中油滴型エマルジョンの系におけるジアシルグリセロールの乳化特性, 調科誌, **35**, 132-138 (2002)
- 5) Shimada A. and Ohashi K.: Interfacial and emulsifying properties of diacylglycerol, *J. Food Sci. Technol. Res.*, **9**, 142-147 (2003)
- 6) 大橋きょう子, 島田淳子: ジアシルグリセロールで調製したマヨネーズ様エマルジョンに及ぼす調味料の影響, 家政誌, **59**, 297-303 (2004)
- 7) 大橋きょう子, 島田淳子: ジアシルグリセロールの乳化性に及ぼす卵黄成分および食塩の影響, 学苑生活科学紀要, No. 782, 13-24 (2005)
- 8) 河上智子, 大橋きょう子, 島田淳子: ジアシルグリセロールを油相とする卵黄の乳化性, 日食工誌, **53**, 354-360 (2006)
- 9) 松村康生: 油脂の結晶化がエマルジョンの物性・安定性に及ぼす影響, オレオサイエンス, **5**, 13-19 (2005)
- 10) E. Dickinson: Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **20**, 197-210 (2001)
- 11) M. Le Denmat, M. Anton and V. Beaumal: Characterization of emulsion properties and of interface composition in O/W emulsions prepared with hen egg yolk, plasma and granules, *Food Hydrocolloids*, **14**, 539-549 (2000)
- 12) 伊藤美希, 鈴木敦子: ジアシルグリセロールで調製したエマルジョンの油滴界面吸着タンパク質量について, 平成 18 年度生活科学科卒業論文, 48-54 (2007)

- 13) 小澤美奈子:「基礎化学実験法 3」 タンパク質 I 検出・構造解析法, 15-16, 日本生化学, (2001)
- 14) 飯島健志ほか:「食品化学実験」第 2 版 3.3 ローリー法によるタンパク質の定量, 116-119, 地人書館 (2005)
- 15) 三田朝義: エマルション-タンパク質の界面活性と乳化作用, 油化学, **35**, 132-138 (1986)
- 16) Kawai S.: Characterization of diacylglycerol oil mayonnaise emulsified using phospholipase A₂-treated egg yolk, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **81**, 993-998 (2004)
- 17) 中村良:「卵の科学」 2.2 卵黄タンパク質, 19-24, 朝倉書店 (1998)
- 18) Mirian M. Sakuno, S. Matsumoto, S. Kawai, K. Taihei and Y. Matsumura: Adsorption and structural change of β -Lactoglobulin at the diacylglycerol-water interface, *Langmuir*, **24**, 11483-11488 (2008)
- 19) 的場輝佳: タンパク質-脂質, 化学と生物, **22**, 391-397 (1984)
- 20) 峯 芳徳, 千葉一裕, 多田全宏: タンパク質の動的構造とエマルションの特性, *New Food Industry*, **37**, 50-63 (1995)

(おおはし きょうこ 管理栄養学科)

(いいだ みき 平成 19 年度生活科学科卒業生)

(おかだ ともみ 平成 19 年度生活科学科卒業生)