

絹セリシンを用いたビタミン E エマルション調製法の再現性について

栗岡 聡・山崎昌良

蚕糸科学研究所

(2006年9月1日受領)

Akira Kurioka and Masayoshi Yamazaki: Study on reproducibility in preparing a vitamin E emulsion using silk sericin.

For evaluation of the emulsifying ability of sericin extracted directly from fresh cocoons of *Bombyx mori*, a reproducible method has been formulated for preparing a vitamin E (α -tocopherol) emulsion through mechanical agitation using a high-speed homogenizer. The emulsifying ability varied depending on the timing of vitamin E addition, decreasing significantly when vitamin E was added prior to agitation in comparison with that when added along with agitation. It was shown that sericin effectively emulsified vitamin E when mixed in a sericin/vitamin E ratio of about 1 to 5 in weight. The concentration of phosphate buffer solution did not affect the emulsifying ability of sericin. Emulsions, however, were labile in solutions containing 3mM or higher sodium phosphate buffer (pH7.3), showing some insoluble sericin material after standing quiescent for 24h.

Silk Science Research Institute, Hyakunincho 3-25-1, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

Key words: silk sericin; emulsifying ability; reproducibility; vitamin E emulsion; addition time; ion strength

家蚕 (*Bombyx mori*) 繭層から熱水抽出したセリシンのエマルション能を評価するために、高速攪拌乳化装置を用いてビタミン E (α -トコフェロール) を再現性よくエマルション化できる条件を見出した。セリシンのエマルション能はビタミン E の添加時期によって変化し、ビタミン E を攪拌振盪処理前に添加すると攪拌振盪処理中に添加した場合に比べてセリシンのエマルション能が有意に低下した。セリシンとビタミン E の重量混合比が 1:5 のとき、セリシンはビタミン E を効率的にエマルション化することが明らかになった。また、リン酸緩衝液 (pH7.3) 濃度はエマルション化度に影響を及ぼさなかったが、3mM 以上のリン酸緩衝液試験区ではエマルション安定性が低く、24 時間静置後にセリシンが不溶化した。

キーワード：絹セリシン；エマルション能；再現性；ビタミン E エマルション；添加時期；イオン強度

緒言

脂質には栄養機能の他に多様な生理機能があることが遺伝子レベルでも解明されつつあり、特に、高度不飽和脂肪酸や脂溶性ビタミンには、例えば、アルツハイマー病の予防・改善効果 (Sano et al., 1997) など薬理的な作用のあることも認められている。しかし、機能性に富んだこれらの脂質は酸化されやすく保存安定性が低いことから、食品加工における機能性脂質の応用範囲は制限されている。そこで、脂質の酸化不安定性を改善するために、タンパク質などで包括された脂質を乾燥粉末化することによって、脂質の酸化を抑制する試みが行われている (服部・小池 2003)。

粉末化脂質の調製プロセスにおいては、脂質の乳化物 (エマルション) を噴霧乾燥のような急速脱水処理で粉末化する方法が多用されている。このとき、エマルション中の脂質とタンパク質間における相互作用は、乾燥後の粉末化脂質の特性に影響を及ぼす因子のひとつと考えられることから、良質な粉末化脂質を得るためにはエマルション能に優れたタンパク質を用いることが重要である。

エマルション能をもつタンパク質には動物由来のカゼイン、卵タンパク質及びゼラチンや、大豆タンパク質のような植物由来のものがあり、これらは工業的に利用されている食品タンパク質である。

一方、絹セリシンにもエマルション能があり、セリシン溶液と脂質からエマルションの調製が可能であることが古くから知られており (尾崎, 1941)、最近我々はセリシン溶液のエマルション能はゼラチンよりも優れていることを明らかにした (山崎・栗岡, 2005)。しかし、セリシンは、一般的には食品タンパク質に分類されないため、セリシンと既述の食品タンパク質との乳化特性の違いについて食品化学的な視点からの系統的な研究報告は少ない。

エマルションは熱力学的に不安定なため、エマルション化時のせん断力や温度、攪拌時の対

流など物理的条件の他に、容器や攪拌装置の材質、タンパク質や脂質の混合時期や順序などもエマルション化に影響を及ぼすものと考えられている。このように、エマルション化には多くの要因が関与しており、セリシンと食品由来の乳化性タンパク質とのエマルション能を比較するためには、先ず一定品質のエマルションを再現性よく調製することが前提となる。

そこで、本報告ではセリシンのエマルション能を評価するための予備的検討として、繭層から熱水抽出したセリシン溶液と脂溶性ビタミンであるビタミン E (α -トコフェロール) を用いて、ビタミン E (油滴) がセリシン溶液 (水中) に分散する構成をとる水中油滴 (O/W) 型エマルションの調製法について検討した。

材料と方法

セリシン溶液の抽出方法

家蚕「錦秋×鐘和」の生繭繭層 4g に蒸留水 100ml を加え、115°C、30 分間のオートクレーブ処理を行い、繭層からセリシンを抽出した。回収した抽出液と等量の 8M 尿素溶液を加え、0.4%セリシン溶液を調製した。

ビタミン E 溶液の調製

エマルション調製用のビタミン E 溶液には *d*- α -トコフェロール (ICN Biomedicals Inc.) を用いた。100mg の *d*- α -トコフェロールにエタノール 300 μ l を加えよく混合し、使用時まで -20°C で保存した。

ビタミン E エマルションの調製方法

0.4%セリシン溶液 2.5ml に 7.5ml の 2~32mM リン酸緩衝液 (pH7.3) を加え、最終濃度 0.1% のセリシン溶液を調製した。このセリシン溶液 10ml をポリプロピレン製試験管 (FALCON BLUEMAX) に入れ、ビタミン E 溶液 15~300 μ l を添加し、高速乳化装置 (ポリトロン Model K PTA10S) を用いて 30,000rpm、2 分間の攪拌振盪処理を行い O/W エマルションとした。エマ

ルシオン化処理による液温の上昇を抑制するために、試験管外側を水冷し処理温度を 30℃に保った。

ビタミン E の混合は、攪拌振盪処理の直前にビタミン E をセリシン溶液に添加する A 法と、攪拌振盪処理の開始直後に添加する B 法の 2 通りの添加時期で行った。

エマルジョン化度の測定

エマルジョン化度は、エマルジョン生成後直ちに試験管中層から採取したエマルジョン液を、Pearce and Kincera (1978) の方法に準じ 0.1%SDS 溶液で 10~160 倍希釈した後に、紫外可視分光光度計 (Ubest-35, 日本分光) で 500nm の吸光度を測定した。

結果と考察

エマルジョン液の希釈と吸光度測定

コロイド粒子の光散乱に起因する乳濁度は、エマルジョン化度を簡便に評価するひとつの指標となる。すなわち、500nm の吸収が強いほど添加したタンパク質のエマルジョン能が良好であり、より微小なエマルジョン粒子が生成されたものと判断される。

50mg のビタミン E を 10ml の 0.1%セリシン-1.5mM リン酸緩衝液 (pH7.3) 中で処理したエマルジョンについて、希釈率 0.1~0.00625 (10~160 倍希釈) と検体の吸光度の関係を図 1 に示す。40~160 倍希釈 (0.025~0.00625) では、エマルジョン濃度と吸光度との間に高い相関性 ($R^2=0.9969$) が認められた。一方、10~20 倍希釈 (0.1~0.05) では検量線の傾きが緩やかになりランベルトベールの法則に従わないことから、検体濃度が濃すぎる事が判った。

以上の結果から、50mg のビタミン E を 10ml のセリシン溶液に乳化分散した場合には、検体を 40~160 倍希釈することでセリシンのエマルジョン化度を適切に評価できることを明らかにした。

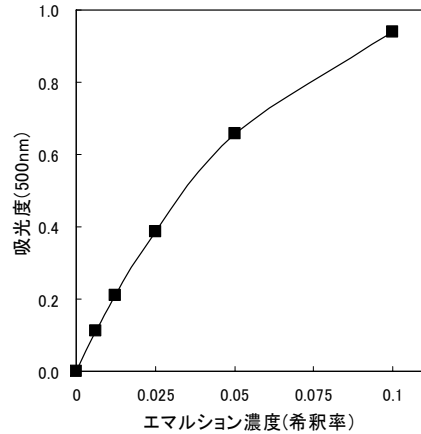


図 1. エマルジョン濃度と吸光度の関係

エマルジョン能とビタミン E の添加時期の関係

ビタミン E を添加する時期とセリシンのエマルジョン能との関係について調べるために、攪拌振盪処理直前にビタミン E を添加する試験区 (A 法; n=5) と攪拌振盪中にビタミン E を添加する試験区 (B 法; n=5) の 2 種類の実験を行った。図 2 は両試験区で生成したエマルジョンの吸光度を示し、a~e 及び f~j はそれぞれ A 法と B 法で生成したエマルジョンの吸光度に対応する。各エマルジョン液の吸光度は 0.1%SDS 溶液で 50 倍希釈した後に測定した。

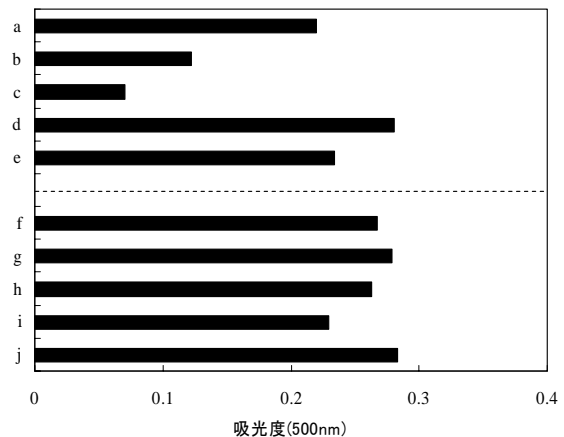


図 2. ビタミン E 添加時期のエマルジョン化度への影響

A 法試験区では、添加直後のビタミン E はセリシン溶液の表層中央部で大きな油膜を形成したが、試験管を穏やかに振盪するとこの油膜は速やかに小さな油滴に変化して分散し、表層周

辺部に移動した。

さらに、エマルション液の吸光度の格差が試料間において顕著であった。特に、吸光度の低い試料 b と c では試験管壁にビタミン E が多く付着しているのが確認された。この付着したビタミン E は粘着性が非常に強く、本実験で使用したポリトロン乳化装置による攪拌振盪処理だけでは、付着ビタミン E を乳化分散させることが困難であった。また、ガラス製の試験管を用いてもビタミン E の付着現象が同様に認められた。

一方、B 法試験区では、吸光度の変動幅が A 法試験区に比べて少なく、試験管壁へのビタミン E 付着量も少なかった。

ここで、A 法と B 法の 2 試験区間の等分散性を F 検定により検定した結果、2 試験区間の分散は一樣でなかったことから、ウェルチの検定を用いて 2 試験区について平均値の差の検定を行った。その結果、 $P < 0.05$ の場合に 2 試験区の平均値に有意差が認められた。

添加したビタミン E がポリプロピレンあるいはガラス製の試験管壁に一度付着してしまうと、エマルション能をもつセリシンが共存していてもエマルション化度が極端に低下する場合もあり、再現性のあるエマルション化が困難であった。一方、攪拌振盪中のセリシン溶液にビタミン E を注入した場合にはエマルション液を再現性良く得ることができた。そこで、これ以降の全てのエマルション化処理は攪拌振盪を開始してからビタミン E を添加する B 法を採用した。

以上の結果から、ビタミン E の添加時期を攪拌振盪開始後にすることで、エマルション化時に起こる脂溶性物質と試験管壁との疎水的な相互作用を抑制し、再現性の高いエマルションが得られる調製方法を見出した。この調製方法を応用すれば、ビタミン E 以外の粘調な脂質、例えば、高度不飽和脂肪酸のような試料においても再現性の良いエマルション調製が可能と考えられる。

エマルション化に適するビタミン E の添加量

5~100mg のビタミン E を 10ml の 0.1%セリシン-1.5mM リン酸緩衝液 (pH7.3) 中でエマルション化し、ビタミン E 添加量とエマルション液の吸光度の関係を調べた。その結果、図 3 に示すように、ビタミン E 添加量の増加につれエマルション液の吸光度が上昇し、エマルション化度が増加した。

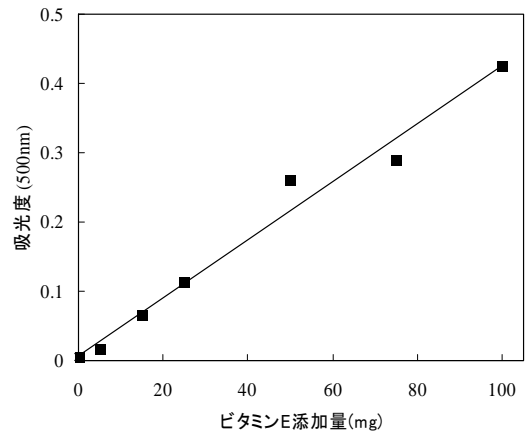


図 3. ビタミン E の添加量とエマルション液の吸光度

これらの試料について 24 時間後のエマルション液の安定性を調べた結果、添加量 50mg までの試験区ではエマルション液の状態に変化は認められなかった。一方、添加量 75mg 以上の試験区では乳白色のクリーム状物質が液表面に析出した。このクリーム層の厚みはビタミン E の添加量に比例して増加する傾向がみられたことから、クリーム層の成分は飽和して乳化分散されなかったビタミン E であると推察された。

本実験で用いたセリシン溶液 10ml 中には、約 10mg のセリシンが含まれていることから、セリシン 10mg に対してビタミン E 添加量が 50mg であれば、ビタミン E は過不足なくエマルション化されることが確認された。すなわち、セリシンとビタミン E の重量混合比が約 1:5 のときに効率的なエマルション化が可能であることが明らかになった。

エマルジョン能に及ぼす緩衝液濃度の影響

セリシンのエマルジョン能に及ぼすイオン強度の影響を調べるために 0~24mM のリン酸緩衝液 (pH7.3) 中で 50mg のビタミン E をエマルジョン化した。図 4 は各試験区のエマルジョン液の吸光度を測定した結果を示す。その結果、リン酸緩衝液濃度が異なっても生成エマルジョン

の吸光度は 0.23~0.25 の範囲内であり、エマルジョン化度に顕著な差は認められなかった。また、リン酸緩衝液を含まないセリシン溶液の場合でも、エマルジョン化度はほぼ同程度であった。

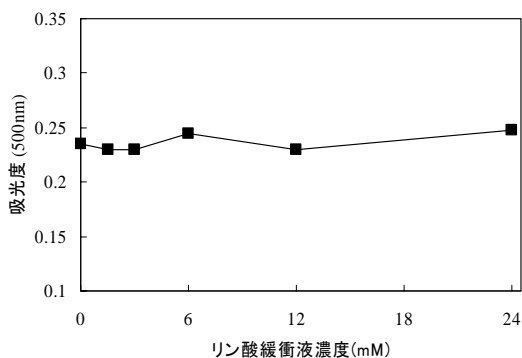


図 4. エマルジョン能に及ぼすイオン強度の影響

各試料のエマルジョン安定性を調べるために、上記で調製したエマルジョン液を室温で 24 時間放置した後、エマルジョン液の状態変化を観察した。その結果、3mM 以上のリン酸緩衝液試験区では、羽毛状の凝固物が沈殿あるいは表層に浮遊しているのが確認された (図 5, C~F)。これらの試験区の沈殿物量には差が認められず、濃度依存性はなかった。一方、1.5mM 以下のリン酸緩衝液試験区ではこのような凝固物は観察されず (図 5, A~B)、これらのエマルジョン液の吸光度はエマルジョン生成直後とほぼ同値であった。

以上の結果から、セリシンを用いてエマルジョンを調製する場合には、1.5mM 以下の希薄な緩衝液または蒸留水中でエマルジョン化した方が、セリシンが不溶化することもなく安定したエマルジョンが得られることが明らかになった。

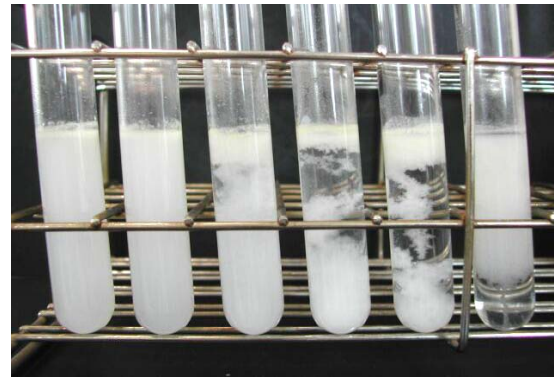


図 5. エマルジョン安定性の比較 (24h 放置後)

緩衝液濃度 (mM) A: 0, B: 1.5, C: 3, D: 6, E: 12, F: 24

タンパク質を含まない蒸留水でビタミン E をエマルジョン化すると、一時的にエマルジョンの形成が認められるが、やがて乳化破壊が起こり水相と油相の 2 相分離が観察された。一方、セリシンが沈殿した不安定なエマルジョン液では、沈殿を除去した上清は透明で、2 相分離は確認されなかったことから、セリシンはビタミン E を吸着したまま不溶化した可能性が高い。

このように、セリシンは脂質吸着能が高いことが示唆されたが、脂質とセリシンの相互作用についての知見は殆ど得られていない。一方、カゼインやラクトグロブリンについては油水界面におけるタンパク質と脂質の吸着構造について研究が進んでいる (松村, 2003)。今後、セリシンについても界面化学的な視点から脂質への吸着構造の解明が待たれる。

本報告ではセリシンを用いたビタミン E エマルジョン調製方法の最適化を検討した。その結果、再現性よくエマルジョンを調製するために、ビタミン E は攪拌拌振盪中に添加する、エマルジョンの安定化のためイオン強度は低く設定する、ビタミン E 添加量はセリシン重量の約 5 倍とする、の 3 点について明らかにした。現在、本実験で確立したエマルジョン調製法に基づいて、セリシンのエマルジョン能について詳細な研究を進めている。

文献

- 服部利明・小池寛之 (2003) 食品の高機能粉末・カプセル化技術, 269, サイエンスフォーラム.
- 松村康生 (2003) 食品の高機能粉末・カプセル化技術, 121, サイエンスフォーラム.
- 尾崎準一 (1941) 蚕糸化学と副産物利用, 528, 農芸化学全書第8冊, 朝倉書店.
- Pearce, K. M., and Kinsella, J. E. (1978) Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique, *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 716-723.
- Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R. G., Klauber, M.R., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., Cotman, C.W., Pfeiffer, E., Schneider, L. S., and Thal, L. J. (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease, *N. Engl. J. Med.*, **336**, 1216-1222.
- 山崎昌良・栗岡 聡 (2005) セリシンのエマルジョン化能について, 第53回日本シルク学会研究発表要旨集録, 120-121.