

# 植物オイルボディの物理的安定性を決定づける構造的・分子的要因の解明

香川大学 農学部  
石井 統也

## 1. 研究の目的と背景

食品には、水中に微細な油滴が分散した水中油滴型 (Oil-in-water, O/W) エマルションの状態であるものが多数存在する。近年、牛乳の代替として利用が拡大しつつある、豆乳やアーモンドミルクなどの植物ミルクも、O/W エマルションの一種である。多くの場合、植物ミルクは、原料である種子から抽出した段階で、天然の乳化状態をとる。植物ミルクの原料である植物の種子などには、中性脂質がリン脂質や膜タンパク質に覆われた、オイルボディと呼ばれる油滴状の粒子が蓄積している (Huang 1996)。

オイルボディは加熱などの処理に対して凝集や合一を生じにくく、物理的に安定であると言われている。オイルボディの表面を構成する主要な膜タンパク質であるオレオシンは、親水性の高いN末端およびC末端ドメイン、疎水性の高い中央ドメインからなる。オレオシンの中央ドメインは、極性脂質層を貫通し、くさびのように中性脂質の核に刺さっていると図示される場合が多い (Huang 1996; Nikiforidis 2019)。組み換えタンパク質とリン脂質、油を用いてオイルボディ様の粒子を再構成した研究では、中央ドメインの一部をある程度まで欠失させると、十分に油滴状の構造が再構成されないことが示されており (Peng *et al.* 2007)、中央ドメインが脂質との親和性を高める機能を担っていることが分かる。その一方で、オレオシンの中央ドメインがくさび様の構造をとることを否定するような報告もある (Idogawa *et al.* 2018)。

このように、オイルボディの物理的安定性の発現機構については、主にオレオシンの機能の観点から検討されているものの、まだ十分には明らかであるとは言えない。また、オイルボディに関する検討事例は、モデル植物や大豆、菜種等の油糧作物を対象としたものが多い。その一方で、アーモンドなどの、近年、植物ミルクとしての利用が広がりつつある素材については、食品加工上の物理的処理がオイルボディの物理的安定性どのような影響を及ぼすか、まだ十分に検討されていない。

本研究では、オイルボディが優れた物理的安定性を有する構造的・分子的要因を明らかにすることを目指し、複数の植物から単離したオイルボディの温度依存的な変化について検討した。

## 2. 研究の方法

### 2-1. 材料

オイルボディ調製の材料には、大豆種子 ('タマホマレ') およびアーモンド種子 (ノンパレル種) を用いた。試薬はいずれも分析グレードのものを使用した。試料および試薬、緩衝液の調製には、脱イオン水を使用した。

### 2-2. 大豆オイルボディの調製

大豆種子 50 g から生豆乳を調製し、スクロースを終濃度 20 wt% となるように加えた。1 M NaOH を加えて pH 11.0 に調整し、遠心分離 (22,140 × g, 4°C, 30 分間) により浮上するオイルボディ層を回収した。回収したオイルボディは 10 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 7.0) に分散させた。

### 2-3. アーモンドオイルボディの調製

アーモンド種子 50 g から生アーモンドミルクを調製した。Chen & Ono (2010) の方法を参考に、調製したアーモンドミルクを二つに分け、一方は pH 調整を行わずに、もう一方は 1 M NaOH を加え pH 11.0 に調整した後に、それぞれ遠心分離を行った (2,610 × g, 4°C, 30 分間)。浮上したオイルボディ層を回収し、10 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 7.0) に分散させた。

### 2-4. 粒子径測定

試料の粒子径はレーザー散乱・回折式粒度分布計 (SALD-3100, 島津製作所) により測定し、測定時の屈折率は 1.45 - 0.20i とした。分散媒には、脱イオン水または 1 wt% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を用いた。それぞれの分散媒での測定結果を比較することで、試料にフロック状の凝集物が含まれるかを評価した。

### 2-5. SDS-PAGE

10-20% グラジエントプレキャストゲル (E-T1020L, ATTO) を用い、試料のタンパク質組成を SDS-PAGE により解析した。還元処理は 1/20 容の 2-メルカプトエタノールにより行った。

### 3. 研究内容

実験1：大豆種子からオイルボディを調製する場合、抽出時の液性をアルカリ性にする事で、貯蔵タンパク質などがオイルボディに吸着するのを抑えることが可能となる (Chen & Ono 2010)。検討例の乏しいアーモンドオイルボディを、液性を変えた2通りの方法で調製し、アーモンドミルクおよびアーモンドオイルボディのタンパク質組成およびコロイド特性の解析を行った。また、試料の濃度を乾燥重量基準で5 wt%に調整し、25, 55, 75, 95°Cで30分間加熱し、凝集や合一の有無を評価した。

実験2：大豆オイルボディを調製し、コロイド特性の評価を行った。また、タンパク質加水分解酵素であるパパインを用いてオレオシンを加水分解し、その後、加熱処理 (95°C, 30分間) および遠心分離による加速不安定化試験 (20,630×g, 40°C, 90分間) を行い、どの程度、凝集や合一といった不安定化が生じるかを評価した。

### 4. 研究の実施経過

実験1：アーモンド種子から調製したアーモンドミルク、および異なる液性で分離したオイルボディのタンパク質組成を解析した (Fig. 1)。非還元条件の約60 kDaにみられる主要なタンパク質は、アーモンド種子の貯蔵タンパク質である Amandin であると考えられる (Devnani *et al.* 2020)。Amandin はペプチド間SS結合を有しており、還元条件において約37 kDaと約20 kDaにみられる主要なバンドが、Amandinの酸性鎖および塩基性鎖と思われる。オイルボディのタンパク質組成に着目すると、特に還元条件において、液性をpH11に調整した試料では、比較的、40 kDa以上のタンパク質が少ないことが明らかとなった。一方で、依然としてAmandinを含む複数のバンドが検出されていた。以上の結果から、本手法では、オレオシン以外のタンパク質をほぼ含まない、intactに近い状態のオイルボディは得られないことが明らかとなった。

調製したアーモンドミルクおよびオイルボディの分散状態を評価するため、粒子径分布測定を行った (Fig. 2)。アーモンドミルクはやや大きな粒子を含む傾向があったものの、オイルボディとほぼ同様に、1~10 μmの範囲に分布することが示された。

加熱に対する分散安定性を評価した結果 (Fig. 3)、アーモンドミルクは、55°Cよりも高い温度で処理することにより、顕著に凝集物を形成することが明らかとなった。その一方で、いずれのアーモンドオイルボディも、95°Cで加熱した場合にも、油滴の凝集や合一は見られなかった。

実験2：調製した大豆オイルボディの分散液にパパインを添加し、最長5時間、タンパク質の加水分解を行った。SDS-PAGEの結果 (Fig. 4)、1時間未満の比較的短時間

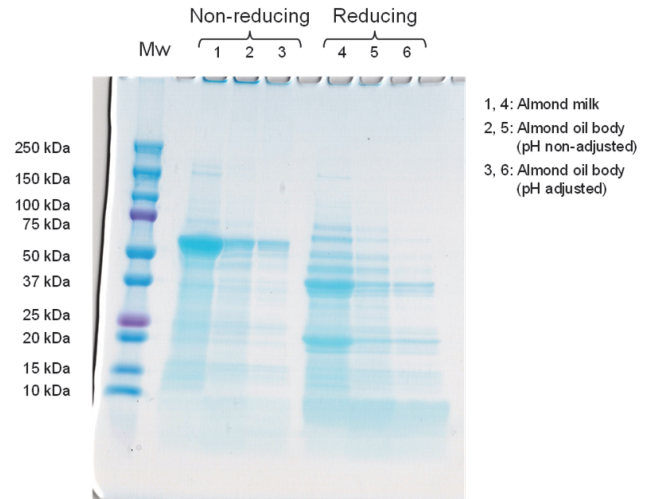


Fig. 1 SDS-PAGE profiles of almond milk and almond oil bodies.

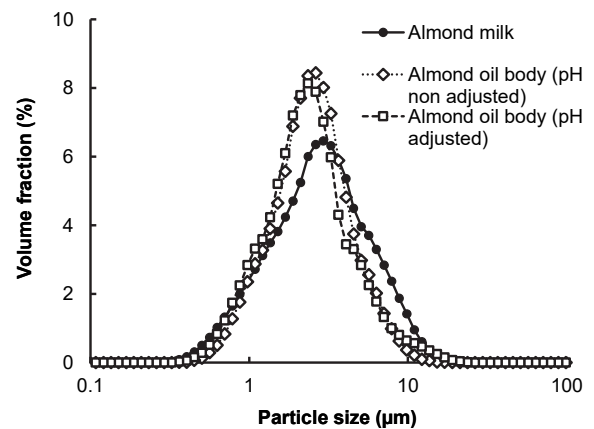


Fig. 2 Particle size distributions of almond milk and almond oil bodies.

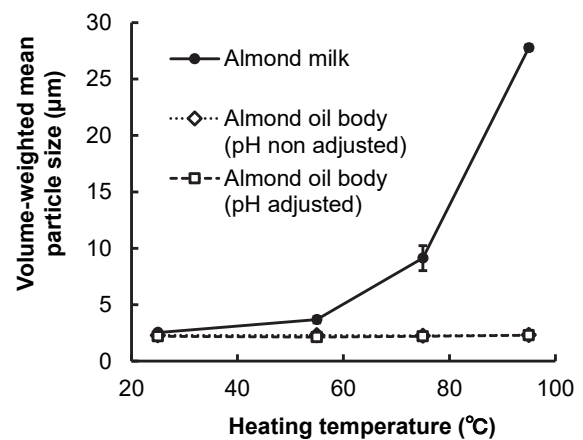


Fig. 3 Mean particle size of almond milk and almond oil bodies heated at various temperature.

で、17, 18 kDa にみられるオレオシンと思われるタンパク質は、ほとんど加水分解されることが明らかとなった。

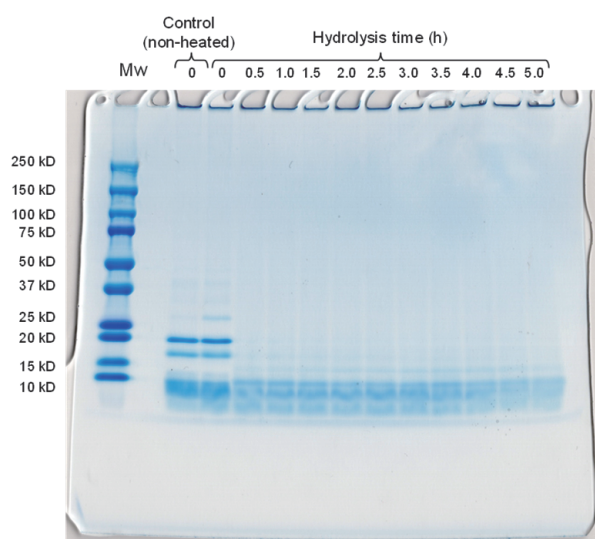


Fig. 4 Protein composition of enzymatically-hydrolyzed soybean oil bodies.

タンパク質の加水分解処理を行った大豆オイルボディを、95℃、30 分間の加熱処理、あるいは、遠心分離による強制不安定化試験 (20,630 ×g, 40℃, 90 分間) に供したものの、油滴の凝集および合一は生じなかった (データ示さず)。

## 5. 研究から得た結論・考察

実験 1 より、アーモンドオイルボディは、種子貯蔵タンパク質などが夾雑した、精製度の低い状態にあっても、加熱処理に対して安定であることが明らかとなった。また、実験 2 では、膜タンパク質であるオレオシンの大部分が加水分解された状態にあっても、オイルボディが加熱処理および機械的なストレスに対して安定的に存在する可能性が示唆された。通常、タンパク質などの両親媒性高分子が形成する界面膜と比較すると、低分子界面活性分子が形成する界面膜は、力学的には弱い場合が多い。オイルボディの極性脂質層の場合は、リン脂質の他にも、ステロール類などが存在する可能性があり、複数の種類の分子が集合することで、強固な界面層を形成している可能性が考えられる。

## 6. 残された問題、今後の課題

先行研究にはオレオシンの構造と機能に焦点を合わせた

検討が多く、オレオシンの構造と機能については、部分的にはあるが明らかにされつつある (Peng *et al.* 2007; Idogawa *et al.* 2018)。その一方で、オイルボディ表面の極性脂質層については、詳細な組成分析は、一部のモデル植物を用いた植物生理学分野での検討を除き、ほとんど行われておらず、コロイド化学・界面化学的な検討は乏しいように思われる。リン脂質や糖脂質、植物ステロールなどの分析を行うとともに、それらの複合層がどのような界面化学的特性を示すかを明らかにすることで、オイルボディの物理的安定性についての理解をより深化させ、食品乳化系の安定化にも有用な知見を見出したい。

## 7. 謝辞

本研究を遂行するにあたって、公益財団法人 東洋食品研究所から助成を賜りました。この場をお借りして関係各位に心より御礼申し上げます。

## 8. 参考文献

- Chen, Y. & Ono, T., 2010, Simple Extraction Method of Non-allergenic Intact Soybean Oil Bodies That Are Thermally Stable in an Aqueous Medium. *J. Agric. Food Chem.*, **58**(12), p. 7402-7407. DOI: 10.1021/jf1006159.
- Devnani, B. *et al.*, 2020, Heat induced denaturation, aggregation and gelation of almond proteins in skim and full fat almond milk. *Food Chemistry*, **325**, p. 126901. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126901.
- Huang, A. H. C., 1996, Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.*, **110**(4), p. 1055-1061. DOI: 10.1104/pp.110.4.1055.
- Idogawa, S. *et al.*, 2018, Effect of Oleosins on the Stability of Oil Bodies in Soymilk. *Food Sci. Technol. Res.*, **24**(4), p. 677-685. DOI: 10.3136/fstr.24.677.
- Nikiforidis, C. V., 2019, Structure and functions of oleosomes (oil bodies). *Adv. Colloid Interface Sci.*, **274**, p. 02039. DOI: 10.1016/j.cis.2019.102039.
- Peng, C.-C. *et al.*, 2007, Minimizing the Central Hydrophobic Domain in Oleosin for the Constitution of Artificial Oil Bodies. *J. Agric. Food Chem.*, **55**(14), p. 5604-5610. DOI: 10.1021/jf070977o.