

リポキシゲナーゼ欠損大豆を用いる豆臭成分の除去

REDUCTION OF GRASSY BEANY FLAVOR IN LIPOXYGENASE DEFICIENT MUTANTS OF SOYBEANS

的場輝佳（奈良女子大学家政学部）

日高博志・成田宏史・鬼頭 誠（京都大学食糧科学研究所）

喜多村啓介・海妻矩彦（岩手大学農学部）

Teruyoshi MATOBA¹, Hiroshi HIDAKA², Hiroshi NARITA², Keisuke KITAMURA³, Norihiko KAZUMA³ and Makoto KITO²

¹ Department of Food Science and Nutrition, Nara Women's University, Nara 630

² Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

³ Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020

ABSTRACT

The process of development of *n*-hexanal from soybean homogenate was investigated by using *Glycine max* var. Suzuyutaka(wild type) and the following lipoxygenase(L) deficient mutant seeds(L null); L-1 null, L-2 null, L-3 null, and L-1, -3 null. *n*-Hexanal was determined during the incubation of the homogenates of these seeds at 25°C. The level of *n*-hexanal was the lowest in the L-2 null homogenate and the highest in the L-1, -3 null homogenate. After the addition of linoleic acid to the homogenates, the level of *n*-hexanal increased remarkably in the homogenates from the seeds except for L-2 null. *n*-Hexanal was scarcely generated in the L-2 null homogenate. These results suggest that L-2 isozyme is responsible for *n*-hexanal formation by using free linoleic acid as the substrate. When the soybean extract prepared from these seeds was incubated at 70°C, *n*-hexanal formation was the lowest in the L-2 null soybean extract. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 7, 9-13, 1986.

大豆たん白質は生産性、経済性のみならず栄養性においても優れた植物たん白質である。しかし、食品素材としては豆臭のために広範囲な消費が抑制されている。豆臭は多数の化合物から成る複合系であるが、主要成分として揮発性のカルボニル化合物が知られている。これらはリノール酸などの *cis*, *cis*-1,4-ペンタジエン構造をもつ高度不飽和脂肪酸が、リポキシゲナーゼ反応によって酸化されて生成するヒドロペルオキシドに由来している。大豆には3種類のリポキシゲナーゼアイソザイム(L-1, L-2, L-3)が存在しており、それぞれ異なる反応速論的挙動を示している。したがって、それらは多様な作用様式でヒドロペルオキシド生成に関

与していると考えられる。

本研究は、豆臭成分の除去を目的として、主要カルボニル化合物である *n*-ヘキサナル生成に最も重要な役割を果たすアイソザイムを同定するとともに、本アイソザイムを欠損した変異大豆を使用することにより豆臭成分の除去を行うことを目的とした。リポキシゲナーゼ欠損変異大豆はすでに得られている¹⁻⁴⁾ので、これらを使用することによって研究を遂行した。

実験方法

リポキシゲナーゼ欠損大豆

リポキシゲナーゼアイソザイム(L-1, L-2, L-3及び

L-1,3)を欠損した変異大豆を単離して使用した。

大豆抽出液の調製

大豆(約0.5 g, 3~4粒)を4℃で一夜浸漬した後, 10 mlの冷水中で磨砕した。得られたホモジネートはそのまま25℃の実験に供した。しかし, 70℃の実験には3,000 rpm, 10分間の遠心分離によって得られた上清を用いた。

n-ヘキサナールの定量

n-ヘキサナールは2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体に転換した後, HPLC法で定量した。基本的には Selim⁵⁾ 及び Reindle and Stan⁶⁾の方法を改良して行った。

リポキシゲナーゼ活性の測定

リポキシゲナーゼ L-1, L-2, L-3 はリノール酸を基質として pH 7.0及び9.0で Grossman and Zakut⁷⁾の方法によって測定した。L-2 及び L-3 活性はリノール酸メチルを基質として pH 7.0で Hildebrand and Hymowitz¹⁾の方法で測定した。

脂質分析

脂質類は常法に従って分析した。

結 果

25℃における *n*-ヘキサナール生成

正常及び L-1, L-2, L-3 欠損大豆抽出液を25℃でインキュベートし, 生ずる *n*-ヘキサナール量を測定した (Fig. 1)。抽出液の pH は6.5~7.0であった。*n*-ヘキサナールのレベルは L-2 欠損大豆で最低であった (Fig. 1C)。そして L-1, -3 欠損大豆で最高であった (Fig. 1E)。L-2 を含有する変異大豆抽出液における *n*-ヘキサナール生成 (Figs. 1B 及び D) は正常大豆 (Fig. 1A) の場合に近い値が得られた。L-2 を含有する大豆抽出液における *n*-ヘキサナール生成 (Figs. 1A, B, D 及び E) は, インキュベーション開始後最初の10分間に上昇し, 以後プラトーに達した。これらの結果は, 3種類のアイソザイムのうち L-2 が, 抽出液中で *n*-ヘキサナール生成に強く関与していることを示唆している。

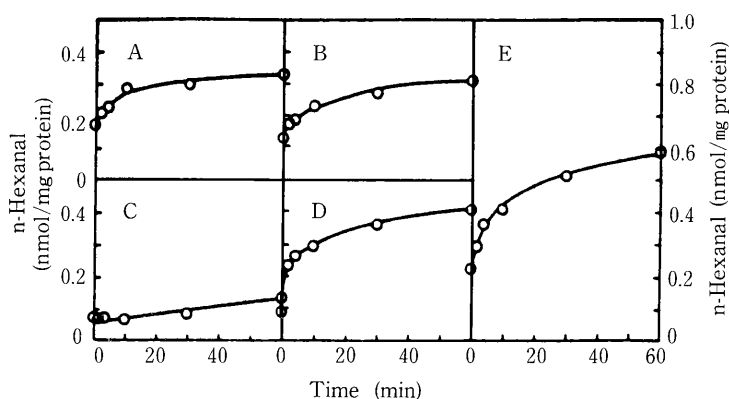


Fig. 1. Changes in *n*-hexanal formation during incubation at 25°C : (A) Suzuyutaka, (B) L-1 null, (C) L-2 null, (D) L-3 null, (E) L-1, -3 null.

外因性リノール酸の *n*-ヘキサナール生成への影響

前記のように, L-2 欠損大豆抽出液中において, 10分間のインキュベーションで *n*-ヘキサナール生成がプラトーに達したことは, 基質であるリノール酸の不足による可能性が考えられる。そこで抽出液にさらにリノール酸を添加することによりこの点を検討した。反応はそれぞれの抽出液を25℃, 10分間インキュベートした後にリノール酸を添加し, さらにインキュベーションを行った。L-2 欠損大豆の抽出液では *n*-ヘキサナールは増加しなかったが, L-2 を含む系ではすべて増加した (Table 1)。添加したリノール酸の *n*-ヘキサナールへの転換率は12% (正常豆), 23% (L-1 欠損大豆), 39% (L-3 欠損大豆), 46% (L-1, -3 欠損大豆)であった。この結果は, L-2 酵素がリノール酸からの *n*-ヘキサナール生成に必須であり, 基質は遊離のリノール酸であることを示している。

ールへの転換率は12% (正常豆), 23% (L-1 欠損大豆), 39% (L-3 欠損大豆), 46% (L-1, -3 欠損大豆)であった。この結果は, L-2 酵素がリノール酸からの *n*-ヘキサナール生成に必須であり, 基質は遊離のリノール酸であることを示している。

脂質

Table 2 に全脂質組成を示した。脂質のほとんどがトリアシルグリセロールで, 遊離脂肪酸は非常に少なかった。また, 脂肪酸組成に関して, 変異大豆間の差はあまりみられなかった (Table 3)。

Table 1. Effect of exogenous linoleic acid on *n*-hexanal formation^a

Time after linoleic acid addition	<i>n</i> -Hexanal, nmol/mg protein				
	Suzuyutaka	L-1 null	L-2 null	L-3 null	L-1,-3 null
5	1.3	1.4	0.12	3.0	5.5
20	1.2 (0.30)	1.9 (0.27)	0.17 (0.10)	3.4 (0.35)	4.8 (0.52)

^aSoybean homogenate(0.8 mL) was incubated at 25°C for 10 min, and then linoleic acid solution(20μL)was added Linoleic acid(0.2%) solution containing 0.2% Tween 20 and 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0, was used. The concentration of linoleic acid in the mixture was 128 μM. The mixture was further incubated at 25°C for 20 min. The values in parentheses indicate those without addition of linoleic acid.

Table 2. Lipid composition of soybean cultivars lacking lipoxygenase isozymes

	Lipid class(wt %) ^a			
	TG	PL	DG	FA
Suzuyutaka	94.4	4.5	0.9	0.2
L-1 null	96.0	3.1	0.6	0.3
L-2 null	94.5	4.6	0.8	0.1
L-3 null	96.4	2.7	0.6	0.3
L-1,-3 null	93.3	6.0	0.6	0.1

^aTG, triacylglycerol; PL, phospholipid; DG, diacylglycerol; FA, free fatty acid.

Table 3. Fatty acid composition of lipid classes from soybean cultivars lacking lipoxygenase isozymes

	Percent				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
Triacylglycerol fraction					
Suzuyutaka	12.6	3.4	22.5	51.9	10.2
L-1 null	10.8	3.9	20.0	55.8	9.5
L-2 null	11.5	4.6	29.3	46.3	8.3
L-3 null	10.7	3.4	20.0	55.7	10.7
L-1,-3 null	13.4	3.2	17.5	54.0	11.8
Phospholipid fraction					
Suzuyutaka	17.3	2.7	5.2	65.0	9.8
L-1 null	17.1	3.2	7.5	61.4	10.8
L-2 null	18.0	3.9	6.3	61.2	10.8
L-3 null	18.4	3.3	7.2	62.6	8.5
L-1,-3 null	17.0	2.9	5.2	64.0	10.9
Diacylglycerol fraction					
Suzuyutaka	13.6	3.8	25.6	48.2	8.2
L-1 null	13.4	4.8	34.2	40.2	7.3
L-2 null	13.2	4.1	29.7	46.7	6.3
L-3 null	12.1	3.0	20.0	56.7	8.2
L-1,-3 null	13.9	3.0	12.4	58.6	12.1
Free fatty acid fraction					
Suzuyutaka	19.0	7.2	29.5	34.1	10.2
L-1 null	19.8	7.7	33.0	31.4	8.1
L-2 null	18.7	6.8	41.7	27.1	5.7
L-3 null	17.8	5.6	22.8	43.2	10.6
L-1,-3 null	24.7	5.2	12.3	45.8	12.0

70℃におけるリポキシゲナーゼ活性と *n*-ヘキサナール生成

変異大豆抽出液を70℃でインキュベートし、リポキシゲナーゼ活性の変化と *n*-ヘキサナール生成の関係を調べた。L-1 活性は熱に安定なことが知られているが、70℃、5分間で約50%が失活し、10分間でほぼ完全に失活した。これは既に報告した知見²⁾と一致している。しかし、L-2, L-3 は熱不安定性であり、最初の5分間で活性はなくなった (Fig. 2)。このような条件における *n*-ヘキサナール生成は、正常及び L-3 欠損大

豆抽出液では L-1, L-2 欠損大豆抽出液よりも高いレベルにあった (Fig. 3)。L-2 欠損大豆抽出液では最低レベルであった。このことは、大豆加熱加工過程においても L-2 が L-1 よりも *n*-ヘキサナール生成に強く関与していることを示している。70℃、10分間のインキュベーションですべてのリポキシゲナーゼアイソザイムが失活したにも拘らず、抽出液中で *n*-ヘキサナールがさらに生成したことは、ヒドロペルオキシドからの *n*-ヘキサナール生成には、さらにもう1段階の反応が関係していることを示唆している。

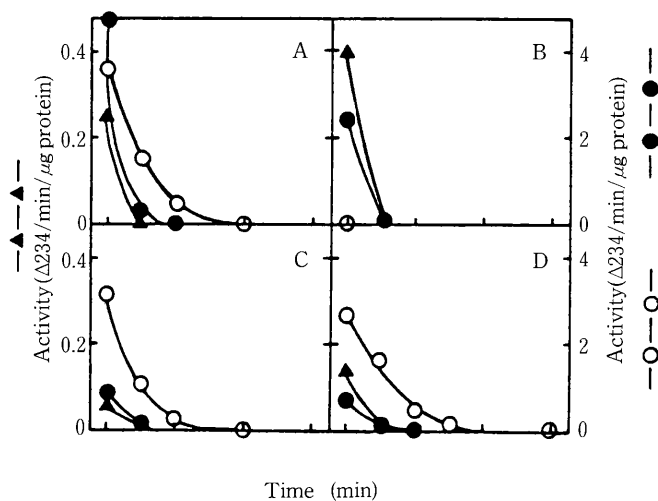


Fig. 2. Changes in lipooxygenase activities during incubation at 70℃ : (A) Suzuyutaka, (B) L-1 null, (C) L-2 null, (D) L-3 null. (○-○) L-1 activity at pH 9.0, linoleic acid as the substrate ; (●-●) L-2, -3 activity at pH 7.0, linoleic acid as the substrate ; (△-△) L-2, -3 activity at pH 7.0, methyl linoleate as the substrate.

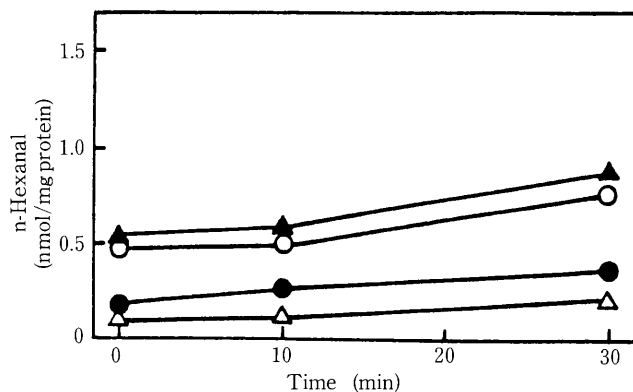


Fig. 3. Changes in *n*-hexanal formation during incubation at 70℃ : (▲-▲) Suzuyutaka, (●-●) L-1 null, (△-△) L-2 null, (○-○) L-3 null.

考 察

大豆抽出液中では25℃における *n*-ヘキサナール生成に L-2 が強く関与していることが明らかとなった。L-1 は熱安定性のゆえに *n*-ヘキサナール生成に最も関与する酵素であると考えられてきたが、70℃の実験では大豆抽出液中の *n*-ヘキサナールレベルは L-2 欠損大豆よりも L-1 欠損大豆の方が高かった。このことは、大豆の加熱加工過程でも L-2 が *n*-ヘキサナール生成に大きく関与していることを示している。大豆抽出液の pH が6.5~7.0であったことから、このような *n*-ヘキサナール生成の L-2 活性依存性は、アイソザイム反応の至適 pH に支配されているように思われる。結論として、豆臭成分の1つである *n*-ヘキサナールの生物的除去には、L-2 欠損大豆を用いることが望ましいことが明らかとなった。

文 献

- 1) Hildebrand, D. F. and Hymowitz, T.(1981): Two soybean genotypes lacking lipoxygenase-1. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 583-586.
- 2) Hildebrand, D. F. and Kito, M.(1984): Role of lipoxygenase in soybean seed protein quality. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 815-819.
- 3) Kitamura, K., Davies, C. S., Kazuma, N. and Nielsen, N. C.(1983): Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. *Crop Sci.*, **23**, 924-927.
- 4) Kitamura, K.(1984): Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1-less, L-2-less and L-3-less soybeans. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2339-2346.
- 5) Selim, S.(1977): Separation and quantitative determination of traces of carbonyl compounds as their 2,4-dinitrophenylhydrazones by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **136**, 271-277.
- 6) Reindle, B. and Stan, H. J.(1982): Determination of volatile aldehydes in meat as 2,4-dinitrophenylhydrazones using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 849-854.
- 7) Grossman, S. and Zakut, R.(1979): Determination of the activity of lipoxygenase(lipoxidase). *Methods Biochem. Anal.*, **25**, 303-329.