

# 大豆加工工程における豆臭発生機構—ヒドロペル オキシドリアーゼの関与

GENERATION OF GRASSY BEAN FLAVORS DURING PROCESSING  
OF SOYBEANS —CONTRIBUTION OF HYDROPEROXIDE LYASE  
ACTIVITY TO *N*-HEXANAL FORMATION IN SOYBEAN

的場輝佳（奈良女子大学家政学部）

日高博志・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 MATOBA<sup>1</sup>, Hiroshi HIDAKA<sup>2</sup>, Keisuke KITAMURA<sup>3</sup>

Norihiko KAIZUMA<sup>3</sup>, and Makoto KITO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Science and Nutrition, Nara Women's University, Nara  
630

<sup>2</sup> Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

<sup>3</sup> Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka  
020

## ABSTRACT

A hydroperoxide (HPO) lyase which catalyzes the specific cleavage of 13-L-hydroperoxy-*cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid (13-L-*c,t*-HPO) to form *n*-hexanal was found in the homogenates of the soybeans such as *Glycine max* var. Suzuyutaka (normal type) and lipoxygenase (L) deficient mutant seeds (L-1 null, L-2 null, L-3 null). A carbonyl compound which was formed from 13-L-*c,t*-HPO and 13-DL-*c,t*-HPO by the enzyme was *n*-hexanal. The enzyme was specific to the L isomer of 13-*c,t*-HPO. 9-D-*t,c*-HPO was not available for the enzyme reaction.  $K_m$  and  $V_{max}$  values of the enzyme for 13-L-*c,t*-HPO were apparently similar among all the seeds. Apparent  $V_{max}$  value of the homogenate from L-2 null seed for linoleic acid was considerably lower ( $1/3 \sim 1/4$ ) than those in the other seeds. It is concluded that a rate-determining step of *n*-hexanal formation from linoleic acid in L-2 null seed is a step of 13-L-*c,t*-HPO formation by lipoxygenase. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 8, 9-11, 1987.

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、大豆たん白質を食品素材として利用拡大するための障害の1つに豆臭の問題がある。昨年度には、大豆に存在する3種類のリポキシゲナーゼアイソザイムのうちで、リポキシゲナーゼ-2が豆臭発生の初期段階で主体的役割を果していることをつきとめ、本酵素を欠損する品種

を用いることにより豆臭発生が防止できることを報告した<sup>1,2)</sup>。しかし、リポキシゲナーゼ反応生成物である不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシドからは種々のカルボニル化合物が生成することが予測されるにも拘らず、大豆ホモジネート中にはほとんど *n*-ヘキサナル以外のものは検出できない。したがって、何故 *n*-ヘキサナルが特異的に生成するのかという点が問題となっ

ている。

本研究は、以上の点を解明することにより豆臭成分の発生を生物的に除去する方法を考案することを目的とした。

## 実験方法

### リボキシゲナーゼ欠損大豆

リボキシゲナーゼアイソザイム (L-1, L-2, L-3) を欠損した変異大豆<sup>1,2)</sup>を単離し使用した。

### 大豆抽出液の調製

大豆(約0.5g, 3~4粒)を4℃で1夜浸漬後, 10 mlの冷水中で摩砕した。得られたホモジネートを酵素液として使用した。

### *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ジン誘導体として HPLC 法で定量した<sup>1,2)</sup>。

### ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定

ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定はリノール酸ヒドロペルオキシドを基質として用いた。反応は0.004% Tween 20 または Tween 80 及び種々の濃度の基質 (20~250  $\mu$ M) を含む0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で25℃, 5分間行った。そして, 生成する *n*-ヘキサナールを定量した。

## 結 果

### 各種変異大豆中のリノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性

基質として, 13-L-ヒドロペルオキシ-*cis*-9, *trans*-11-オクタデカジエン酸 (13-L-*c,t*-HPO), 13-DL-ヒドロペルオキシ-*cis*-9, *trans*-11-オクタデカジエン酸 (13-DL-*c,t*-HPO), 13-DL-ヒドロペルオキシ-*trans*-9, *trans*-11-オクタデカジエン酸 (13-DL-*t,t*-HPO) 及び 9-D-ヒドロペルオキシ-*trans*-10, *cis*-12-オクタデカジエン酸 (9-D-*t,c*-HPO) を用いた。Table 1 に示すように, 野生株, L-1 欠, L-2 欠, L-3 欠の大豆ホモジネートは 13-L-*c,t*-HPO 及び 13-DL-*c,t*-HPO のみに作用して *n*-ヘキサナールを生成した。他のカルボニル化合物の生成はほとんど検出できなかった (Fig. 1A)。9-D-*t,c*-HPO からは予想に反してカルボニル化合物はほとんど生成しなかった (Fig. 1B)。13-L-*c,t*-HPO 及び 13-DL-*c,t*-HPO からの *n*-ヘキサナールの生成量は2:1であった。また, 本反応の進行は酵素液を100℃, 5分間処理することにより停止した。以上の結果から, 13-ヒドロペルオキシドのみ作用して *n*-ヘキサナールを生成する酵素 (ヒドロペルオキシドリアーゼ) が大豆中に存在することが明らかとなった。本酵素は13-L-*c,t*-HPO のみに

対して非常に高い基質特異性を示した。そして, 反応は pH 6~7 (豆乳の pH) で進行した。

Table 1. Relative activity of *n*-hexanal formation from various hydroperoxides of linoleic acids<sup>a</sup>

| Substrate              | Relative activity, % |                       |
|------------------------|----------------------|-----------------------|
|                        | <i>n</i> -Hexanal    | <i>cis</i> -3-Nonenal |
| Suzuyutaka             |                      |                       |
| 13-L- <i>c,t</i> -HPO  | 100                  | trace                 |
| 13-DL- <i>c,t</i> -HPO | 57                   | trace                 |
| 13-DL- <i>t,t</i> -HPO | trace                | trace                 |
| 9-D- <i>t,c</i> -HPO   | trace                | trace                 |
| L-1 null               |                      |                       |
| 13-L- <i>c,t</i> -HPO  | 100                  | trace                 |
| 13-DL- <i>c,t</i> -HPO | 59                   | trace                 |
| 13-DL- <i>t,t</i> -HPO | trace                | trace                 |
| 9-D- <i>t,c</i> -HPO   | trace                | trace                 |
| L-2 null               |                      |                       |
| 13-L- <i>c,t</i> -HPO  | 100                  | trace                 |
| 13-DL- <i>c,t</i> -HPO | 57                   | trace                 |
| 13-DL- <i>t,t</i> -HPO | trace                | trace                 |
| 9-D- <i>t,c</i> -HPO   | trace                | trace                 |
| L-3 null               |                      |                       |
| 13-L- <i>c,t</i> -HPO  | 100                  | trace                 |
| 13-DL- <i>c,t</i> -HPO | 57                   | trace                 |
| 13-DL- <i>t,t</i> -HPO | trace                | trace                 |
| 9-D- <i>t,c</i> -HPO   | trace                | trace                 |

<sup>a</sup>13-L-*c,t*-HPO, 13-L-hydroperoxy-*cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid; 13-DL-*c,t*-HPO, 13-DL-hydroperoxy-*cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid; 13-DL-*t,t*-HPO, 13-DL-hydroperoxy-*trans*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid; 9-D-*t,c*-HPO, 9-D-hydroperoxy-*trans*-10, *cis*-12-octadecadienoic acid.

### リノール酸及び 13-L-*c,t*-HPO からの *n*-ヘキサナール生成に関するキネチックパラメーター

野生及び各変異大豆から得たホモジネート中での *n*-ヘキサナール生成に関して, リノール酸及び 13-L-*c,t*-HPO を基質とした時の *K<sub>m</sub>* 及び *V<sub>max</sub>* を測定した (Table 2)。すべての大豆に関して, 13-L-*c,t*-HPO に対する *K<sub>m</sub>* は, 40~60  $\mu$ M, *V<sub>max</sub>* は 14-20  $\mu$ mol/mg/min であった。リノール酸からの *n*-ヘキサナール生成に関して, *K<sub>m</sub>* は 30~50  $\mu$ M であった。*V<sub>max</sub>* については, 野生株, L-1 及び L-3 欠損大豆の場合は 10~20  $\mu$ mol/mg/min で, 13-L-*c,t*-HPO を基質とした場合の値と近似していた。しかし, L-2 欠損大豆の場合のみ

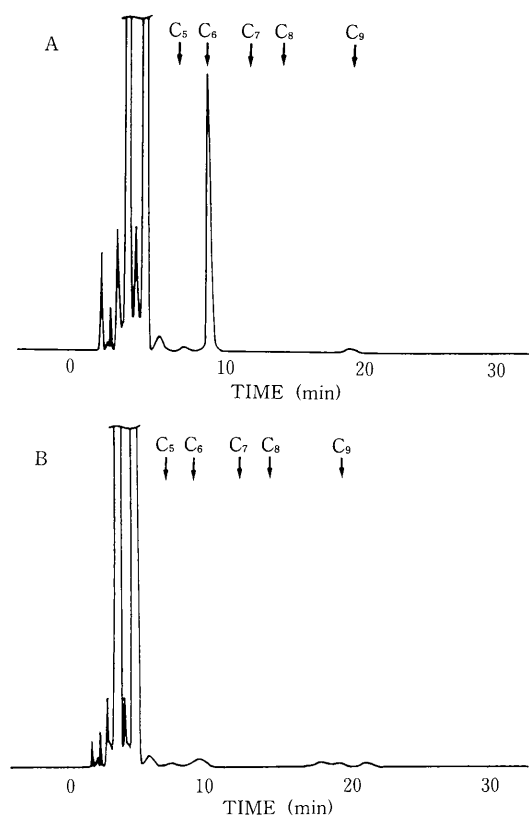


Fig. 1. Separation of carbonyl compounds as their (2, 4-dinitrophenyl) hydrazine derivatives after reaction with 9- and 13-hydroperoxides by high performance liquid chromatography. 13-L-*c,t*-HPO (A) or 9-D-*t,c*-HPO (B) was allowed to react with the homogenate of Suzuyutaka at 25°C and for 20 min. The products were used for the analysis of carbonyl compounds described under Methods: C<sub>5</sub>, *n*-pentanal; C<sub>6</sub>, *n*-hexanal; C<sub>7</sub>, *n*-heptanal; C<sub>8</sub>, *n*-octanal; C<sub>9</sub>, *n*-nonanal.

Table 2. Kinetic parameters of *n*-hexanal formation from linoleic acid and 13-L-*c,t*-HPO<sup>a</sup>

|            | K <sub>m</sub> (μM) |     | V <sub>max</sub> (μmol/mg/min) |     |
|------------|---------------------|-----|--------------------------------|-----|
|            | LA                  | HPO | LA                             | HPO |
| Suzuyutaka | 38                  | 44  | 11                             | 14  |
| L-1 null   | 40                  | 55  | 14                             | 19  |
| L-2 null   | 59                  | 59  | 4.5                            | 16  |
| L-3 null   | 31                  | 39  | 17                             | 22  |

<sup>a</sup>LA, linoleic acid; HPO, 13-L-*c,t*-HPO.

4.5 μmol/mg/min と非常に低い値が得られた。

## 考 察

前報<sup>1,2)</sup>では、大豆ホモジネート中で通常の条件 (pH 6~7) において、*n*-ヘキサナール生成には L-2 酵素が主体的役割を果たしていることを示した。本研究では、不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシドが非酵素的に開裂して *n*-ヘキサナールが生成されるという一般的なスペキュレーションを否定し、酵素反応によって特異的に生成されることを明らかにした。豆乳中でリノール酸から 9- 及び 13-ヒドロペルオキシドが生成することが知られている<sup>3)</sup>。しかし、*n*-ヘキサナールのみが大豆中に多量に存在することを我々は示したが、これは 13-ヒドロペルオキシドのみを特異的に切断する酵素の存在を示すことにより説明できることを明らかにした。また、L-2 欠損大豆ホモジネート中には、13-ヒドロペルオキシドリアーゼ活性は他の変異大豆の場合とほぼ同じレベルにあった。しかし *n*-ヘキサナール生成量は他の変異大豆の場合に比し非常に低いレベルであった。このことは 13-ヒドロペルオキシド生成量が *n*-ヘキサナール生成の律速段階となっていることを示している<sup>4)</sup>。したがって、L-2 酵素と 13-ヒドロペルオキシドリアーゼを同時に欠損する大豆を育種によって入手することが可能となれば、大豆製品中での *n*-ヘキサナール生成を極端に低下させることができるものと結論できる。

## 文 献

- 1) 的場輝佳, 日高博志, 成田宏史, 喜多村啓介, 海妻矩彦, 鬼頭 誠 (1986): リボキシゲナーゼ欠損大豆を用いる豆臭成分の除去. 大豆たん白質栄養研究会誌, 7, 9-13.
- 2) Matoba, T., Hidaka, H., Narita, H., Kitamura, K., Kaizuma, N. and Kito, M. (1985): Lipoxygenase-2 isozyme is responsible for generation of *n*-hexanal in soybean homogenate. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 852-855.
- 3) Galliard, T. and Chan, H. W. S. (1980): The Biochemistry of Plants, A Comprehensive Treatise, ed. by Stumpf, P. K., Academic Press, New York, Vol. 4, pp. 131-161.
- 4) Matoba, T., Hidaka, H., Kitamura, K., Kaizuma, N. and Kito, M. (1985): Contribution of hydroperoxide lyase activity to *n*-hexanal formation in soybean. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 856-858.