

大豆におけるカルボニル化合物の挙動と風味との関係

RELATIONSHIP BETWEEN BEHAVIOR OF CARBONYL COMPOUNDS AND FLAVOR IN SOYBEANS

的場輝佳・高村仁知(奈良女子大学生生活環境学部)

喜多村啓介(農林水産省農業研究センター)

Teruyoshi MATOBA¹, Hitoshi TAKAMURA¹ and Keisuke KITAMURA²

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

²National Agriculture Research Center, Tsukuba 305

ABSTRACT

The contents of hexanal and total carbonyl compounds and the behavior of lipoxygenase in the formation of total carbonyl compounds in soybean extracts were elucidated. The proportion of hexanal to total carbonyl compounds in the soybean extract was about 1-2%. When the extract was incubated in the presence of exogenous linoleic acid, the contents of hexanal and total carbonyl compounds increased considerably. From the quantitative determination, it was estimated that the proportion of hexanal to total carbonyl compounds derived from linoleic acid by enzymatic action was about 20%. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **15**, 32-35, 1994.

大豆たん白質は、安価でしかも栄養性、機能特性に優れており、加工用食品たん白質素材として、世界的な需要の拡大が期待されている。しかし、大豆たん白質を飛躍的に食品素材として活用するために障害となっている一つの要因は、加工工程で発生する豆臭である。この豆臭の原因は、大豆の細胞組織が搾油などの工程で破碎された際に、不飽和脂肪酸を含有する脂質が、分子状酸素の存在下でリポキシゲナーゼ(EC 1.13.11.12)の作用を受け、ヒドロペルオキシドに過酸化され、これがさらに、酵素的あるいは非酵素的な分解によって生成する揮発性のカルボニル化合物であると考えられている。現在のところ、カルボニル化合物の内、リノール酸から生成するヘキサナールが、豆臭に寄与するkey化合物であると考えられている¹⁻³⁾。大豆(種子)には、作用様式の異なる3種のリポキシゲナーゼ(L-1, L-2, L-3)が存在する^{4,5)}。これらの各イソ酵素が、異なった作用様式で豆臭発生に関与する^{2,3,6-8)}。大豆にはヘキサナール以外のカルボニル化合物が存在す

ることが知られており⁹⁾、これらは種々の食品成分と反応し大豆食品の品質低下をまねく恐れがある¹⁰⁻¹⁵⁾。しかし、現在のところ総カルボニル化合物の生成に関与する酵素系の実態は明らかでない。本研究では、大豆における総カルボニル化合物量に対するヘキサナール量の存在割合を明らかにし、総カルボニル化合物の生成に寄与する酵素の挙動を究明することを試みた。

実験方法

大豆品種

通常大豆(スズユタカ)およびリポキシゲナーゼ欠損変異大豆(L-1, L-2, L-3 全欠)は、農林水産省農業研究センターで栽培されたものを用いた¹⁶⁾。

大豆抽出液の調製と酵素反応

大豆(1粒, 約0.2g)を4℃で一夜浸漬後、5mLの冷水中で破碎し、得られたホモジネートを酵素液として使用した。抽出液(0.8mL)をリノール酸基質溶液存在下および非存在下で25℃10分間インキュベートし、

種々の化学分析を行った²⁾。

化学分析

総カルボニル化合物量の測定は、Yukawa らの2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン発色法により¹⁷⁾、ヘキサナールの定量は、Matoba らの2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン-高速液体クロマトグラフ法により行った²⁾。また、たん白質含量の測定は、Lowry らの方法に従って行った¹⁸⁾。

結果と考察

通常大豆におけるヘキサナールと総カルボニル化合物の含量

ヘキサナールと総カルボニル化合物の含量を通常大豆（スズタカ）のホモジネート（抽出液）を用いて測定した（Table 1）。抽出液の pH は6.5で、たん白質含量は15 mg/mL であった。調製直後の新鮮な抽出液のヘキサナール含量は0.14 nmole/mg protein であった。25℃で10分間インキュベートすると、ヘキサナールのレベルは0.45 nmole/mg protein に増加した。一方、総カルボニル化合物含量は、インキュベート前では、20.3 nmole/mg protein であったが、インキュベート後には、32.7 nmole/mg protein に増加した。

総カルボニル化合物の生成に対するリノール酸添加の影響

ヘキサナールはリポキシゲナーゼ（主に、L-2）の作用によって、主に遊離のリノール酸から生成される²⁾。ヘキサナール以外のカルボニル化合物がどの程度リノール酸から生成されるのかを検討するために、大豆抽

出液に含まれるリノール酸の10倍量以上のリノール酸を添加して、抽出液をインキュベート（25℃，10分）した。その結果、ヘキサナールの生成量は、リノール酸の添加により10倍増加し、総カルボニル化合物の生成量も大きく増加した（Table 1）。この結果は、ヘキサナール以外のカルボニル化合物もリノール酸から生成されることを示すものである。

総カルボニル化合物の生成に対するリポキシゲナーゼの関与

総カルボニル化合物の生成に対するリポキシゲナーゼの影響について検討を行った（Table 2）。塩化スズ（SnCl₂）は、リポキシゲナーゼの阻害剤であることが知られている¹⁹⁾。SnCl₂ の存在下および非存在下で大豆抽出液をインキュベートし、ヘキサナール量および総カルボニル化合物量を測定したところ、SnCl₂ の存在下の場合、ヘキサナールの生成は完全に抑制されたが、総カルボニル化合物の生成は部分的に抑制された（約75%抑制）。また、リノール酸を添加して、SnCl₂ の存在下で同様の実験を行ったところ、ヘキサナールの生成は完全に抑制されたが、総カルボニル化合物の生成は完全には抑制されなかった（約70%抑制）。これらの結果は、総カルボニル化合物は部分的にリポキシゲナーゼ以外の作用によっても生成することを示唆している。

次に、リポキシゲナーゼ欠損（L-1, L-2, L-3 全欠）大豆の抽出液を用いて、同様の実験を行った（Table 2）。リノール酸を添加しなかった場合、ヘキサナールは全く生成しなかったが、総カルボニル化合物は僅か

Table 1. Level of hexanal and total carbonyl compounds in soybean extract in the absence and presence of linoleic acid

Incubation time ^a	Hexanal	Total carbonyl compounds
min	nmole/mg protein	
-18: 2 ^b		
0	0.14 (0.7) ^d	20.3
10	0.45 (1.3)	32.7
Increase ^c	0.31 (2.5)	12.4
+18: 2		
0	0.14 (0.7)	20.3
10	3.55 (9.1)	38.8
Increase	3.41 (18.4)	18.5

^aThe incubation was carried out at 25℃ in the presence and absence of linoleic acid (final 156 μM).

^b18: 2, linoleic acid.

^cThe level at 10 min - the level at 0 min.

^dPercentage relative to total carbonyl compounds.

Table 2. Effect of lipoxygenase on the formation of total carbonyl compounds in soybean extract

Soybean	Hexanal		Total carbonyl compounds	
	-18:2 ^a	+18:2	-18:2	+18:2
	nmoles/mg protein ^b			
Wild type				
-inhibitor ^c	0.31	3.41	12.4	18.5
+inhibitor	0	0.04	1.9	3.3
L-1, 2, 3 deficient	0	0.25	3.8	6.6

The incubation was carried out at 25°C for 10 min in the presence and absence of linoleic acid (final 156 μ M).

^a18:2, linoleic acid.

^bThe level at 10 min - the level at 0 min.

^cStannous chloride.

ではあるが生成した (3.8 nmoles/mg protein)。リノール酸を添加した場合は、ヘキサナールも総カルボニル化合物もリノール酸を添加しなかった場合に比べて、生成量はやや増加する傾向にあった。このことは、ヘキサナールの生成には、これまで知られていない新規のリボキシゲナーゼの関与やリボキシゲナーゼ経路以外の酵素系の関与を示唆するものである。

総カルボニル化合物に対するヘキサナールの存在割合

リノール酸を添加しなかった場合、総カルボニル化合物に対するヘキサナールの割合は、大豆抽出液のインキュベーション (25°C, 10分) 前後で、それぞれ0.7%および1.3%であった (Table 1)。インキュベーションの間に増加した総カルボニル化合物に対するヘキサナールの割合は、約2.5%であった (Table 1)。

リノール酸を添加した場合、総カルボニル化合物の生成に対するヘキサナールの生成割合は、約20%であった (Table 1)。これまでの研究によると、通常状態 (pH 6-7) では、リボキシゲナーゼ (主に、L-2) がリノール酸に作用して13-ヒドロペルオキシドと9-ヒドロペルオキシドが50:50の割合で生成し、13-ヒドロペルオキシドにリアーゼが作用してヘキサナールと12-オキソ-ドデカン酸が生成するが、9-ヒドロペルオキシドに作用するリアーゼは存在しない^{2,3)}。もし、このようなリボキシゲナーゼ経路がカルボニル化合物の生成の主経路であるなら、総カルボニル化合物に対するヘキサナールの存在割合は、50%であると予測される。しかしながら、本実験結果ではこの存在割合は20%であった (Table 1)。この存在割合の差は、カルボニル化合物は、先に述べたリボキシゲナーゼ経路以外の機構によっても生成することを示唆している。最近の報告によると、リボキシゲナーゼ経路は非常に複雑で、生成したヒドロペルオキシドはリアーゼ以外にもアレノ

オキシド合成酵素 (ケトールの生成) などの種々の酵素によって、他の物質に変換されることが明らかにされている^{20,21)}。また、ヘキサナールはアルコールデヒドロゲナーゼの作用で還元されることも知られている²²⁾。

更に、大豆抽出液にリノール酸を添加しない場合でも、かなりの量のカルボニル化合物が生成することが観察された (ヘキサナールの生成量の約40倍: Table 1)。このことは、ヘキサナール以外のカルボニル化合物は遊離の脂肪酸からのみならず、トリアシルグリセロールのような結合型の脂質からも、酵素の作用により生成する可能性のあることを示唆している。事実、トリアシルグリセロールがリボキシゲナーゼの基質になると推定している報告もある^{7,23)}。

本研究で、大豆抽出液においては、ヘキサナール以外にかなりの量のカルボニル化合物がリボキシゲナーゼの作用によって不飽和脂肪酸から生成することを明らかにした。現在のところ、これらのカルボニル化合物がどのような経路でどの程度生成されるのかについて、個々の酵素反応に対する化学量論的な解明はされていない。今後検討すべき問題である。

文 献

- 1) Rackis JJ, Sessa DJ and Honig DH (1979): Flavor problems of vegetable food proteins. *J Am Oil Chem Soc*, **56**, 262-271.
- 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) 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.
- 4) Galliard T and Chan HW-S (1980): Lipoxxygenase. *In: The Biochemistry of Plants*, vol. 4, Stumpf P K ed., Academic Press, New York. pp. 131-161.
 - 5) Axelrod B, Cheesbrough TM and Laakso S (1981): Lipoxygenase from soybeans. *Methods Enzymol*, **71**, 441-451.
 - 6) Hildebrand DF, Hamilton-Kemp TR, Loughrin JH, Ali K and Andersen RA (1990): Lipoxygenase 3 reduces hexanal production from soybean seed homogenates. *J Agric Food Chem*, **38**, 1934-1936.
 - 7) Zhuang H, Hildebrand DF, Andersen RA and Hamilton-Kemp TR (1991): Effects of polyunsaturated free fatty acids and esterified linoleoyl derivatives on oxygen consumption and C6 aldehyde formation with soybean seed homogenates. *J Agric Food Chem*, **39**, 1357-1364.
 - 8) Takamura H, Kitamura K and Kito M (1991): Inhibition by lipoxygenase-3 of n-hexanal generation in soybeans. *FEBS Letters*, **292**, 42-44.
 - 9) Grosch W and Laskawy G (1975): Differences in the amount and range of volatile carbonyl compounds formed by lipoxygenase isoenzymes from soybeans. *J Agric Food Chem*, **23**, 791-794.
 - 10) Kanazawa K, Danno G and Nataka M (1975): Lysozyme damage caused by secondary degradation products during the autoxidation process of linoleic acid. *J Nutr Sci Vitaminol*, **21**, 373-382.
 - 11) Gardner HW (1979): Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids—A review. *J Agric Food Chem*, **27**, 220-229.
 - 12) Funes J, Yong S and Karel M (1980): Changes in lysozyme due to reactions with volatile products of peroxidizing methyl linoleate. *J Agric Food Chem*, **28**, 794-798.
 - 13) Tashiro Y, Okitani A, Utsunomiya N, Kaneko S and Kato H (1985): Changes in lysozyme due to interaction with vaporised hexanal. *Agric Biol Chem*, **49**, 1739-1747.
 - 14) Pokorny J, Janitz W, Vden I, Velsek J, Valentov H and Davdek J (1987): Reaction of oxidation lipids with protein. Part 14. Aldolization reactions of lower alkanals in presence of nonlipidic substances. *Nahrung*, **31**, 63-70.
 - 15) Kikugawa K and Beppu M (1988): Involvement of lipid oxidation products in the formation of fluorescent and cross-linked proteins. *Chem Phys Lipids*, **44**, 277-296.
 - 16) Hajika M, Kitamura K and Igita K (1991): A line lacking all the seed lipoxygenase isozymes in soybean induced by gamma-ray irradiation. *Jpn J Breed*, **41**, 507-509.
 - 17) Yukawa N, Takamura H and Matoba T (1993): Determination of total carbonyl compounds in aqueous media. *J Am Oil Chem Soc*, **70**, 881-884.
 - 18) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
 - 19) German JB and Kinsella JE (1985): Lipid oxidation in fish tissue. Enzymatic initiation via lipoxygenase. *J Agric Food Chem*, **33**, 680-683.
 - 20) Vick BA and Zimmerman DC (1987): Oxidative systems for modification of fatty acids: The lipoxygenase pathway. *In: The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise*, Stumpf P K ed., Academic Press, New York. pp. 53-90.
 - 21) Gardner HW (1991): Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim Biophys Acta*, **1084**, 221-239.
 - 22) Matoba T, Sakurai A, Taninoki N, Saitoh T, Kariya F, Kuwahata M, Yukawa N, Fujino S and Hasegawa K (1989): n-Hexanol formation from n-hexanal by enzyme action in soybean extracts. *J Food Sci*, **54**, 1607-1610.
 - 23) Koch RB, Stern B and Ferrari CG (1958): Linoleic acid and trilinolein as substrates for soybean lipoxidase(s). *Arch Biochem Biophys*, **78**, 165-179.