

大豆の豆臭生成に対する油脂の影響

Effect of Edible Oil on Beany Flavor Formation in Soybean Homogenate

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(農林水産省農業技術センター)

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

Soybean seeds contain three lipoxygenase isozymes (L-1, L-2, L-3). Effect of soybean oil in hexanal formation in soybean homogenate was investigated by using normal and their isozyme deficient seeds. The seeds used were normal type, null type (L-1, 2, 3 deficient), L-1 type (L-2, 3 deficient), L-2 type (L-1, 3 deficient) and L-3 type (L-1, 2 deficient). The defatted homogenate prepared from a lot of null type seeds produced a high level of hexanal in the presence of linoleic acid, but the raw homogenate from its single seed did not produce. As the result of single seed analysis, L-1 type seed contaminated about 20% in the null type seed group harvested at the same season. However, the homogenate of complete null type seed produced enzymatically a low level of hexanal. Hexanal formation in other seeds was not influenced significantly in the addition of soybean oil. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 46-50, 1995.

日本人は昔から豆腐、味噌、醤油などの形で大豆たん白質を食生活に取り入れてきた。大豆たん白質は、栄養性、経済性、加工特性に優れており、さらに、コレステロールの低下作用などの生理機能も明らかにされてきたため、健康志向の高まる中、新しい食品素材として注目を浴びている。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砕された際に、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うち、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) が存在し^{4,5)}、これらの各アイソザイム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⁹⁻¹⁰⁾、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¹¹⁻¹⁶⁾。しかし、大豆ホモジネート(豆乳)系における脂質過酸化反応の解析は、実際の食品加工に対して重要な情報を提供すると考えられるが、現在のところ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、大豆ホモジネート中におけるヘキサナール生成に及ぼす諸因子を明らかにするために、食用油脂を取り上げ、エマルション形成がヘキサナール生成に及ぼす影響について検討した。

実験方法

大豆品種

通常大豆(スズユタカ), リポキシゲナーゼ欠損変異大豆(L-1タイプ, L-2タイプ, L-3タイプ, および全欠タイプ)は, 農林水産省農業技術センターで栽培されたものを用いた¹⁷⁾。実験に使用した各種大豆のリポキシゲナーゼの存在状態をTable 1にまとめる。

大豆抽出液の調製と酵素反応

以下の方法で, 生豆乳, 脱脂豆乳, 再構成豆乳を調製した。生豆乳は, 大豆を4°Cで一晩浸漬後, 浸漬前の10倍量の水を加えガラスホモゲナイザーでホモゲナイズして得た。脱脂豆乳は, ヘキサノール脱脂大豆に20倍量の水を加え4°Cで1時間攪拌の後, 遠心分離して上清を得た。再構成豆乳は, 脱脂豆乳に精製大豆油を1.2%添加し, 再びホモゲナイズして乳化させて得た。なお, 添加した油脂の量は生豆乳の油脂量に相当する。

酵素反応の標準的な条件は, 以下の通りである。100 nmol リノール酸を含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)に各種大豆抽出液を加え, 25°Cで30分間反応させた。なお実験の目的に応じて, pH, 大豆抽出液の添加量および反応時間を変更した。

Table 1. Lipoxygenase isozyme in various soybean variety

Variety	Lipoxygenase isozyme		
	L-1	L-2	L-3
Suzuyutaka	+	+	+
Null type	—	—	—
L-1 type	+	—	—
L-2 type	—	+	—
L-3 type	—	—	+

+, presence; —, absence.

Table 2. Hexanal formation in raw and defatted soybean homogenates

Variety	Hexanal formation	
	Raw	Defatted
	(nmol/mg protein)	
Suzuyutaka	3.7	2.7
Null type	0.9	4.0
L-1 type	6.2	5.8
L-2 type	8.3	5.9
L-3 type	0.2	0.3

Homogenate was incubated at pH 7.0 and 25°C for 30 min in the presence of 100 μ M linoleic acid.

リポキシゲナーゼ活性

Axelrodらの方法に準じて, 共役ジェンの生成量(234 nmの吸光度変化)を指標に分光学的方法によって測定した⁵⁾。

化学分析

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, ヒドロペルオキシドの生成量は, イソルミノールを用いた化学発光法で測定した¹⁸⁾。たん白質含量の測定は, Lowryらの方法に従って行った¹⁹⁾。

結果と考察

生豆乳および脱脂豆乳のヘキサナール生成

種々の大豆品種の生豆乳及び脱脂豆乳にリノール酸を基質として加え, 25°C, 30分間反応させた後のヘキサナールの生成量をTable 2に示す。生豆乳では, L-2タイプの大豆でヘキサナールの生成量が最も多く, L-1タイプ, スズユタカでもかなりの量のヘキサナールが生成したのに対して, 全欠タイプ, L-3タイプで低い値を示した。この傾向はHajikaらの報告と一致した¹⁷⁾。

一方, 脱脂豆乳では, L-1タイプとL-2タイプでヘキサナールの生成量が高かったが, 全欠タイプでは, 生豆乳の場合に比べてヘキサナールの生成量が著しく高かった。全欠タイプには, L-1, L-2, L-3のいずれのアイソザイムも含まれていないはずなので, このヘキサナール生成は極めて意外な現象であった。もし, この現象が事実なら, 全欠大豆には, 新しいタイプのアイソザイムが存在すること, リポキシゲナーゼ以外の酵素系が関与すること, あるいは, 脱脂処理によりリポキシゲナーゼ活性が発現することなどの可能性が考えられた。

また, スズユタカ, L-1タイプ, L-2タイプでは, 生豆乳の方が若干ヘキサナール生成量が高かった。これは, 油脂の影響のほか, 脱脂処理における酵素の失活による影響も考えられる。

脱脂豆乳および再構成豆乳のヘキサナール生成

先でも述べたように, 生豆乳と脱脂豆乳とでヘキサナールのパターンが異なる理由の一つに, 反応系における油脂の影響によることが考えられる。そこで, スズユタカおよび種々の変異大豆の脱脂大豆を用いて, ヘキサナール生成に対する油脂の影響についてさらに検討を加えた。脱脂豆乳及び再構成豆乳にリノール酸を基質として加え, 25°C, 30分間反応させた後のヘキサナールの生成量を調べた (Table 3)。ここで, 脱脂

豆乳での反応系は油脂が無添加の系で、再構成豆乳での反応系は油脂が添加された系である。全体として、油脂を添加することによって、ヘキサナールの生成量は低くなる傾向にあったが、その影響は大きくなかった。全欠タイプ以外的大豆では、油脂添加の有無で大きな変化が見られなかったことから、これらの大豆においては、油脂はリポキシゲナーゼの基質としては作用せず、また、リポキシゲナーゼを活性化、もしくは阻害するものではないことが明らかとなった。

しかし、全欠タイプの場合、生豆乳の反応系でみられた低レベルのヘキサナール生成は、脱脂豆乳に油脂を添加した再構成豆乳の反応系では観察されなかった。そこで、再度実験を試みたところ、生豆乳を用いた場合、全欠タイプでのヘキサナール生成量は、スズユ

カの10分の1程度であったが、脱脂処理を行うと、全欠タイプでもスズユカを超える量のヘキサナールが生成した。この傾向はおおむね再現性があったが、生豆乳と脱脂豆乳とでヘキサナール生成量が大きく異なることは、新たな酵素系の存在を提起するものの、アーティファクトの結果であるとの疑問もあった。そこで、これまでの実験記録を詳細に点検したところ、脱脂大豆の調製には、生豆乳の場合に比べて大量の大豆を処理していた。このことから、収穫された全欠タイプ大豆試料中に強いリポキシゲナーゼ活性をもつ大豆が混入している可能性もあると考え、大豆一粒ずつから脱脂大豆を調製し再検討を行った。

大豆一粒分析によるヘキサナール生成とリポキシゲナーゼ活性

スズユカおよび全欠型大豆一粒ずつからヘキサン脱脂大豆を調製し、それぞれの脱脂豆乳系におけるヘキサナール生成量およびリポキシゲナーゼ活性を測定した (Table 4)。その結果、全欠型はヘキサナール生成量の異なる3種類、A、B、Cタイプに分類することができた。全欠型の大部分を占めるAタイプは、極めてヘキサナールの生成量が少なかった。全欠型の一部であるBタイプは、スズユカの70%の生成量を、全欠型のごく一部であるCタイプは、スズユカの2倍以上のヘキサナールを生成した。

次に、スズユカおよび全欠型A、B、Cタイプにおけるリポキシゲナーゼ活性をpH 5、7、9で測定した (Table 4)。スズユカでは、pH 5、7、9で高いリポキシゲナーゼ活性を示した。全欠型AおよびBタイプでは、スズユカに比べて低かったが、pH 5で有意な活性がみられ、pH 7、9では活性がなかった。一方、Cタイプでは、pH 9でスズユカ以上の高い活性がみられた。このことから、本実験に供した全欠型大豆には、pH 9で高いリポキシゲナーゼ活性を有するL-1タイプの品種が混在しており、これが全欠大豆のヘキサン脱脂豆乳でヘキサナールが多量に生成した原因であると考えられた。なお、Aタイプに対するB、Cタイプの混入割合はおおよそ1/5であった。現在のところ、真の全欠型大豆 (Aタイプ) に、他の品種が栽培時あるいは収穫後にどのようにして混入したかは不明である。

しかし、Table 4でも明らかなように、全欠型Aタイプの豆乳においてもヘキサナールが確かに生成した。緒論で述べたように、リノール酸からヘキサナールが生成する過程には、リポキシゲナーゼとリアーゼの2段階の酵素が関与する。リアーゼ活性を測定したところ、全欠型大豆における活性は、スズユカより高かつ

Table 3. Hexanal formation in defatted and re-constructed soybean homogenate

Variety	Hexanal formation	
	Defatted	Re-constructed
	(nmol/mg protein)	
Suzuyutaka	2.7	2.5
Null type	4.0	2.5
L-1 type	5.7	5.8
L-2 type	5.9	5.6
L-3 type	0.4	0.3

Homogenate was incubated at pH 7.0 and 25°C for 30 min in the presence of 100 μ M linoleic acid. Re-constructed homogenate was prepared by homogenizing "defatted homogenate" in addition of soybean oil.

Table 4. Hexanal formation and lipoxygenase activity of Suzuyutaka and null type soybeans

Variety	Hexanal formation ^{a)}	Lipoxygenase activity ^{b)}		
		pH 5	pH 7	pH 9
	(nmol/mg protein)	(Δ 234nm/min/mg protein)		
Suzuyutaka	2.7	7.4	6.0	9.0
Null type A	0.2	0.9	t	0
B	1.0	1.0	t	0
C	6.5	1.0	0.5	16.0

^{a)} Defatted homogenate was incubated at pH 7.0 and 25°C for 30 min in the presence of 100 μ M linoleic acid.

^{b)} The activity was measured according to the method of Axelrod et al.⁵⁾ using defatted homogenate.

た。従って、全欠型大豆の豆乳中においても、リノール酸の自動酸化で生成するヒドロペルオキシドが存在していれば、リアーゼの作用でヘキサナールが生成することになる。そこで、全欠型（Aタイプ）脱脂豆乳にリノール酸を添加して生成するヒドロペルオキシド量を化学発光法で測定したところ、ヒドロペルオキシドは自動酸化によって生成する以上に、酵素反応によっても生成することが明らかになった。しかしながら、本実験で用いた化学発光法では、リアーゼの基質となるリノール酸ヒドロペルオキシドの外に化学発光を誘導する化合物をも検出している可能性もあるので、この問題に関しては、全欠型大豆におけるヘキサナール生成機構の解析と共に、さらに検討する必要がある。

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) : Lipoygenase-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 H W-S (1980) : Lipoygenase. In "The Biochemistry of Plants", Vol. 4, Stumpf PK ed., Academic Press, New York, pp.131-161.
- 5) Axelrod B, Cheesbrough TM and Laakso S (1981) : Lipoygenase from soybeans. *Methods Enzymol*, **71**, 441-451.
- 6) Hildebrand DF, Hamilton-Kemp TR, Loughrin JH, Ali K and Andersen RA (1990) : Lipoygenase 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 lipoygenase-3 of n-hexanal generation in soybeans. *FEBS Lett*, **292**, 42-44.
- 9) Grosch W and Laskawy G (1975) : Differences in the amount and range of volatile carbonyl compounds formed by lipoygenase isoenzymes from soybeans. *J Agric Food Chem*, **23**, 791-794.
- 10) Yukawa N, Takamura H, Kitamura K and Matoba T (1995) : Proportion of hexanal to total carbonyl compound in soybean extracts. *Biosci Biotech Biochem*, **59**, 723-724.
- 11) 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.
- 12) Gardner HW (1979) : Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids - A review. *J Agric Food Chem*, **27**, 220-229.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Pokorny J, Janitz W, Vden I, Velsek J, Valentov H and Davdek J (1987) : Reaction of oxidized lipids with protein. Part 14. Aldolization reactions of lower alkanals in presence of nonlipidic substances. *Nahrung*, **31**, 63.
- 16) 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.
- 17) Hajika M, Kitamura K and Igita K (1991) : A line lacking all the seed lipoygenase isozymes in soybean induced by gamma-ray irradiation. *Jpn J Breed*, **41**, 507-509.
- 18) Yamamoto Y, Rrei B and Ames BN (1990) : Assay of lipid hydroperoxides using high-performance liquid chromatography with

isoluminal chemiluminescence detection.
Methods Enzymol, **186**, 371-380.

19) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and

Randall RJ (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.