

リポキシゲナーゼ欠損大豆における豆臭生成機構の解析

的場輝佳^{*1}・高村仁知¹・喜多村啓介²

¹奈良女子大学生生活環境学部 ²農林水産省農業研究センター

Mechanism of Beany Flavor Formation in Lipoxygenase-Deficient Soybean

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

Hexanal is the key compound for beany flavor in soybean products. This volatile aldehyde is formed from linoleic acid via hydroperoxide by the actions of lipoxygenase and hydroperoxide lyase. Soybean seeds contain three lipoxygenase isozymes (L-1, L-2 and L-3). A mutant which lacks all three isozymes was recently developed. However, this mutant still produces hexanal. In this study, the mechanism of the hexanal formation in the mutant soybean seeds was investigated. First, soybean seeds were separated to soluble and membrane fractions by ultracentrifugation. Then, linoleic acid or its 13-hydroperoxide was incubated with these fractions, and the formation of 13-hydroperoxide and hexanal was determined. Both soluble and membrane fractions of normal soybean seed converted linoleic acid to its 13-hydroperoxide and hexanal, and converted 13-hydroperoxide to hexanal. In mutant soybean seed, only soluble fraction produced linoleic acid 13-hydroperoxide and hexanal. Membrane fraction of mutant soybean seed did not form 13-hydroperoxide and hexanal, while the activity converting 13-hydroperoxide to hexanal was high. These results suggest that a new lipoxygenase isozyme exists in the soluble fraction of the mutant soybean seed lacking L-1, L-2 and L-3. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **17**, 29-32, 1996.

Key words: soybean, lipoxygenase, linoleic acid, hexanal, beany flavor

大豆は古来から豆腐、納豆、味噌などの形で日本人の食生活に取り入れられてきた。近年では、欧米においても、豆腐をはじめとする日本の伝統的大豆加工食

品が注目を集めている。大豆たん白質は、栄養的に良質である上、安価であり、また、ゲル化能、乳化能などに優れている。また、コレステロール低下作用などの好ましい生理作用が明らかになっており、健康志向の高まるなか、注目すべき食品である。しかし、加工

*〒630 奈良市北魚屋西町

過程で発生する豆臭がさらなる活用の障害となっている。

豆臭の主成分は、揮発性のカルボニル化合物であり^{1,2)}、その中でも炭素数6のヘキサナールが最も大きく寄与している³⁻⁵⁾。この豆臭は、加工過程において、大豆の細胞組織が破壊される際に、大豆中に多く存在するリノール酸が、脂質過酸化酵素リポキシゲナーゼの作用により過酸化されてリノール酸13-ヒドロペルオキシド(13-HPOD)となり、これがさらにヒドロペルオキシドリナーゼにより分解されて生成するとされている。大豆種子中には、作用様式の異なる3種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^{6,7)}、著者らは、L-2が豆臭生成に最も寄与し⁴⁾、L-3は抑制的に作用することを見出している⁸⁾。また、これらのアイソザイムの全てを欠損した変異品種が開発されており⁹⁾、その実用化が期待される。しかし、全欠損変異品種においても、ヘキサナールの酵素的生成がみられる。本研究では、このリポキシゲナーゼ全欠損大豆における豆臭生成機構の解析を行った。

実験方法

大豆

農林水産省農業研究センターにおいて栽培した通常大豆(スズタカ)およびリポキシゲナーゼ全欠損大豆⁹⁾を用いた。

大豆種子可溶性画分および膜画分の調製

外皮を除去した乾燥大豆種子25 gを液体窒素にて凍結後、コーヒーマルで粉碎した。これに、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.7) 250 mLを加え、水中にて10分間浸漬後、ポリトロンを用いて30秒間ホモゲナイズし、ガーゼでろ過した。これを遠心分離(9,300×g, 15分, 4°C)した後、得られた上清を粗酵素抽出液とした。さらに、超遠心分離(200,000×g, 60分, 4°C)により得られた上清を可溶性画分、超遠心分離後の沈澱を緩衝液に再懸濁後、さらに超遠心分離して得られた沈澱を再懸濁し、膜画分とした。なお、たん白質はLowry法で定量した¹⁰⁾。

酵素反応

試験管に0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0) 0.8 mLと大豆可溶性画分または膜画分(1 mg たん白質/mL) 0.1 mLを入れた後、基質として10 mM リノール酸または10 mM 13-HPODを0.1 mLに加え、25°Cで反応を開始した。ヘキサナールを定量する場合はオキシム化試薬(12.5 mM O-ベンジルヒドロキシルアミ

ン+50 mM PIPES(pH 6.5)/50%メタノール)を加えて反応を停止した。また、HPOD量を測定する場合は1 M クエン酸を加えてpH 4.0とした後、クロロホルムを加えて反応を停止した。

ヘキサナールおよび13-HPODの定量

ヘキサナールを定量する場合は、反応停止後、室温にて30分間放置後、クロロホルムを加えてO-ベンジルオキシム誘導体を抽出した。窒素気流下で濃縮後、イソオクタンに再溶解し、ガスクロマトグラフィーで定量した。13-HPODを定量する場合は、反応停止後、クロロホルム層を抽出し、窒素気流下で濃縮した後、エタノールに再溶解した。これを、ルミノールを用いた化学発光検出HPLCに供してヒドロペルオキシドを特異的に検出し、定量を行った。

結果と考察

リノール酸からの13-HPODの生成

通常大豆およびリポキシゲナーゼ全欠損大豆の膜画分・可溶性画分に基質としてリノール酸を加えたときの13-HPOD生成量の経時変化をFig. 1に示す。通常大豆の膜画分において、反応15分でたん白質1 mgあたり31.4 nmolと最も多くの13-HPODが生成した。既知のリポキシゲナーゼアイソザイム(L-1, L-2, L-3)は、可溶性画分に存在するが、膜画分における13-HPOD生成が最も多かったことから、この画分に強いリポキシゲナーゼ活性が存在すると考えられる。これに対し、リポキシゲナーゼ全欠損大豆では、可溶

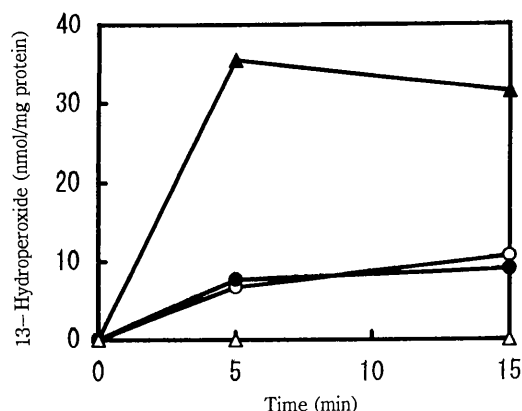


Fig. 1. Conversion of linoleic acid to its 13-hydroperoxide in soluble and membrane fractions prepared from normal and mutant soybean seeds. ●: soluble, normal ▲: membrane, normal ○: soluble, mutant △: membrane, mutant

Table 1. Hexanal formation from linoleic acid 13-hydroperoxide in soluble and membrane fractions prepared from normal and mutant soybean seeds

Soybean	Fraction	Hexanal formation (nmol/mg protein)
Normal	Soluble	4.3
	Membrane	12.9
Mutant	Soluble	13.7
	Membrane	96.8

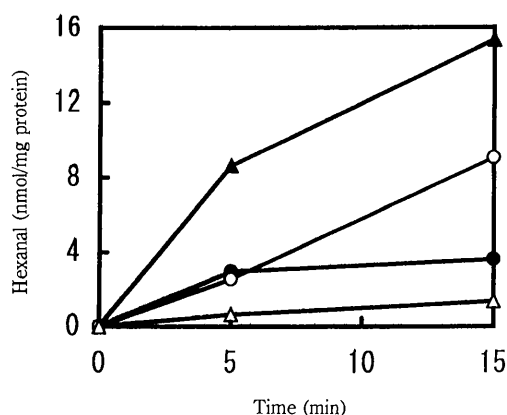


Fig. 2. Hexanal formation from linoleic acid in soluble and membrane fractions prepared from normal and mutant soybean seeds.

● : soluble, normal ▲ : membrane, normal
○ : soluble, mutant △ : membrane, mutant

性画分において13-HPODの生成が見られ、これは通常大豆の可溶性画分と同レベルであった。しかし、膜画分では13-HPODの生成は見られなかった。このことから、リポキシゲナーゼ全欠損大豆においては、新

規のリポキシゲナーゼアイソザイムが可溶性画分に存在する可能性が考えられる。

13-HPOD からのヘキサナル生成

各画分に13-HPODを基質として加え、ヘキサナルの生成量を測定した結果をTable 1に示す。この値はヒドロペルオキシドリアーゼ活性を示すことになる。ヒドロペルオキシドリアーゼは膜結合酵素であることが知られているが、通常大豆では、可溶性画分にも、膜画分の3分の1の活性が見られた。また、リポキシゲナーゼ全欠損大豆においては、ヒドロペルオキシドリアーゼ活性は著しく高く、膜画分で通常大豆の約7.5倍もの活性が存在し、可溶性画分においても、通常大豆の膜画分並みの活性が見られた。

リノール酸からのヘキサナル生成

各画分にリノール酸を基質として加え、ヘキサナルの生成量を測定した結果をFig. 2に示す。通常大豆の膜画分においては、ヘキサナル生成量は最も高く、反応15分間でたん白質1 mgあたり15.3 nmolのヘキサナルが生成した。Fig. 1に示すように、膜画分においてもリポキシゲナーゼ活性が高かったことから、ここで生成したヘキサナルは、膜画分に存在するリポキシゲナーゼによってリノール酸が過酸化された後、ヒドロペルオキシドリアーゼによって開裂して生じたものと考えられる。また、可溶性画分においては、膜画分の約5分の1しかヘキサナルが生成しなかった。一方、リポキシゲナーゼ全欠損大豆では、膜画分におけるヘキサナル生成は小さかったが、可溶性画分において、たん白質1 mgあたり8.1 nmolのヘキサナル生成がみられた。

以上の結果から、全欠損大豆の可溶性画分には、既知のリポキシゲナーゼアイソザイム以外の、新しいアイソザイムが存在する可能性が考えられる。あるいはリポキシゲナーゼを経由しない別の脂質酸化系によりヘキサナルが生成していることも考えられる。これらの酵素系について、現在、さらに検討を進めている。

要 約

豆臭の主成分であるヘキサナルはリノール酸からリポキシゲナーゼとヒドロペルオキシドリアーゼの作用により生成する。近年、大豆種子中に存在する3種類のリポキシゲナーゼアイソザイム(L-1, L-2, L-3)すべてを欠損した変異品種が開発されているが、この変異品種においてもヘキサナルが生成する。本研究においては、このリポキシゲナーゼ欠損変異大豆におけるヘキサナル生成機構の解明を行った。まず、大豆種子を破碎し、超遠心分離により、可溶性画分と膜画分に分画したのち、リノール酸とインキュベートし、リノール酸13-ヒドロペルオキシド(13-HPOD)およびヘキサナル生成を測定した。その結果、通常大豆において

は、可溶性画分および膜画分ともリノール酸を13-HPOD およびヘキサナールに変換した。変異大豆においては、可溶性画分のみがリノール酸を13-HPOD およびヘキサナールに変換したが、膜画分はリノール酸から13-HPOD およびヘキサナールを生成できなかった。これらの結果は、L-1, L-2, L-3を欠損する変異大豆の可溶性画分に新しいリポキシゲナーゼアイソザイムが存在することを示唆している。

文 献

- 1) Grosch W and Laskawy G (1975): Differences in the amount and range of volatile carbonyl compounds formed by lipoxygenase isozymes from soybeans. *J Agric Food Chem*, **23**, 791-794.
- 2) 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.
- 3) Rackis JJ, Sessa DJ and Honig DH (1979): Flavor problems of vegetable food proteins. *J Am Oil Chem Soc*, **56**, 262-271.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Galliard T and Chan HW-S (1980): Lipoxygenase. In : *The Biochemistry of Plants*, vol. 4 Stumpf PK ed., Academic Press, New York, pp. 131-161.
- 7) Axelrod B, Cheesbrough TM and Laakso S (1990): Lipoxygenase from soybeans. *Methods Enzymol*, **71**, 441-451.
- 8) Takamura H, Kitamura K and Kito M (1991): Inhibition by lipoxygenase-3 of n-hexanal generation in soybeans. *FEBS Lett*, **292**, 42-44.
- 9) 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.
- 10) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.