

脱脂大豆たん白質からの物理化学的脱臭操作の開発

井上國世*

京都大学大学院農学研究科

Deodorization of Soybean Proteins by Physicochemical Processing

Kuniyo INOUE

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502

ABSTRACT

Deodorization of soy protein isolate (SPI) was examined by treating the isolate by various absorbents such as polystyrene, polymetacrylate, zeolite, and charcoal. The SPI solution treated by the absorbents was smelled by 14 persons, and hexanal in the solution was determined. With increase in the hydrophobicity of the absorbents, the soybean odor and hexanal of the absorbent-treated solution decreased. Brominated polystyrene beads were the most effective absorbent when they were used after soaking in ethanol. The hexanal content was decreased to 1/5 of that of the untreated solution, and nobody could recognize the soybean odor of the solution. *Soy Protein Research, Japan* 1, 41-45, 1998.

Key words : absorbent, hexanal, soybean, deodorization, soy protein isolate

大豆たん白質は安価で高い栄養価を有しており、ゲル化性や乳化性などの機能性に優れているため、広く食品として使用されている。また、コレステロール低下効果などの生理作用が指摘されている。現在、大豆から油を搾取したあとに得られる脱脂大豆たん白質が大規模に生産されている。この脱脂大豆たん白質は食品として利用されることが期待されるが、大豆臭を有し、食品原料としての有用性が妨げられている。脱脂大豆たん白質の用途拡大のためには効率的な脱臭操作の開発が望まれる。

大豆臭の主成分は揮発性のカルボニル化合物であり、その中でも炭素数6のヘキサナールが最も主要な成分である。大豆臭は、大豆の加工過程で細胞が破壊され

る際に、大豆中に多く含まれているリノール酸がリポキシゲナーゼにより過酸化されてリノール酸 13- ヒドロペルオキシドになり、さらにヒドロペルオキシドリアーゼにより分解されて生成すると考えられている。また、非酵素的自動酸化による生成も指摘されている¹⁾。従来、アルデヒド脱水素酵素²⁾ やリパーゼ³⁾ などの酵素を用いる方法、微生物処理による方法⁴⁾、イオン交換樹脂を用いる方法⁵⁾、超臨界炭酸ガスを用いる方法⁶⁾ などが報告されているが、いずれも十分満足すべきものではない。一方、リポキシゲナーゼ (L-1, L-2, L-3) を欠失した変異品種⁷⁾ の開発がなされているが、ヘキサナールを完全に消失させることはできていない^{8,9)}。

本研究では簡便で安価な脱臭法を開発を目的として、各種吸着剤を用いる物理化学的脱臭法を検討した。

*〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町

方 法

実験材料および試薬

分離大豆たん白質 (soy protein isolate, SPI) であるフジプロ-R は不二製油株式会社より入手した。フジプロ-R を 20 mM トリス塩酸緩衝液, pH 9.0, に 50 mg/mL となるように溶解し, SPI 溶液とした。SPI 溶液に吸着剤を加え, 一定時間攪拌したのち, 2 mL を分取し, 遠心分離 (5,000 g, 5 分間) により吸着剤を除去し, 吸着剤処理化 SPI 溶液とした。とくに断らない限り, フラスコに SPI 溶液 30 mL をいれ, これに吸着剤 4 g を加え, 5 分間攪拌した。

吸着剤として東ソー製ゼオライト, HSZ-360 HUD, HSZ-690 HOD3A ; 三菱化学製合成樹脂吸着剤, SP207, SP825, HP20, HP 2 MG ; および活性炭 (塩酸処理化, ナカライテスク製) を用いた。

ゼオライト製吸着剤 HSZ-360 HUD の $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ 比は 15 (mole/mole) であり疎水性は小さいが, HSZ-690 HOD3A では $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ 比は 220 (mole/mole) であり疎水性が大きい。

合成樹脂製吸着剤 SP207, SP825, HP20, HP 2 MG の性質は以下のとおりである。

HP20 : ポリスチレン製ビーズであり比較的大きい細孔を持ち, 大きい分子の吸着に適する。疎水性はここで使用した 4 種類のうちでは中等度である。

SP825 : HP20 のポリスチレン製ビーズに均一な細孔を導入したもので, 比較的小さい細孔を持ち小さい分子の吸着に適する。疎水性は中等度である。

SP207 : HP20 のポリスチレン製ビーズの芳香環に臭素を付加したものであり疎水性はここで使用した 4 種類のうちでは最も大きい。

HP2MG : ポリメタクリレート系の化合物よりなり, 芳香族性の基をもたない。親水性が高いため, 極性の高い化合物の吸着にすぐれている。疎水性は最も小さい。

これら 4 種類の合成樹脂吸着剤については, 試料液に吸着剤を直接加えた場合と吸着剤を一度エタノールに浸漬し, ついで, 水に浸漬したのち, これを試料液に加えた場合の 2 通りの方法により検討した。

アルデヒドの定量

アルデヒドは 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン (dinitrophenylhydrazine, DNPH) と反応させ, 2, 4-ジニトロフェニルヒdrazone (dinitrophenylhydrazone) 誘導体に変換し, HPLC により定量した。

DNPH 50 mg をエタノール混合液 (エタノール : 塩酸

: 水 = 90:2:8 (V:V:V)) に溶解させたものを DNPH 溶液とした。

吸着剤処理化 SPI 溶液 1 mL と DNPH 溶液 1 mL とを混合し, 45℃ で 30 分間反応させた。反応終了後, 遠心分離 (5,000 g, 5 分間) により不要物を除去した。上清 200 μL をアセトニトリル 800 μL と混合して 5 倍に希釈した。この処理により, 溶解しているたん白質を変性凝固させ, 遠心分離 (5,000 g, 5 分間) により不要物を除去した。ここで得られた遠心上清を HPLC 用試料とした。HPLC へは, 40 μL をサンプルチューブへ注入し, 30 μL をカラム内に注入した。

HPLC は日立製高速液体クロマトグラフィー装置, HPLC 7000 を用いて実施した。カラムは YMC 社製 ODS-AM C18 (内径 4.6 mm $\times$ 300 mm) を用いた。カラム温度は 50℃, 流速は 10 mL/分であった。検出は 360 nm の吸光度によった。70% アセトニトリル水溶液で平衡化したカラムにサンプル注入後, 15 分間にわたり, アセトニトリル濃度を 70% から 100% までの直線的な濃度勾配をかけ, 15 分から 25 分にかけて 100% アセトニトリルで溶出し, ついで, 25 分から 27 分の 2 分間にわたり, アセトニトリル濃度を 70% にまで低下させた。

官能試験

SPI 溶液 30 mL に吸着剤 4 g を加え, 5 分間攪拌後, 吸着剤処理化 SPI 溶液を調製し, 14 人がその臭いをかぎ, 大豆臭を感じるか否かを 3 段階 (++, +, -) で評価した。

結果と考察

アルデヒドの定量における処理条件の設定

フラスコに SPI 溶液 30 mL を加え, これに 0.1, 0.13, 0.2, 0.5, 1.0 g/mL となるように吸着剤を加えた。5 分間, 30 分間, 60 分間, および 120 分間攪拌して, “吸着剤処理化 SPI 溶液” をえた。HPLC では 11.4 分のヘキサナールに起因するピーク 1 (後述) の面積の大きさはいずれの吸着剤の場合も 0.13 g/mL で 5 分間の処理で十分であることが示されるので, 以下の実験では, いずれの吸着剤の場合も 0.13 g/mL で 5 分間攪拌して得られる吸着剤処理化 SPI 溶液を試料とした。

アルデヒドの定量

上記の検討結果に従い, フラスコに SPI 溶液 30 mL を加え, これに吸着剤 4 g を加え, 5 分間攪拌して, 吸着剤処理化 SPI 溶液をえた。

HPLC では 11.4 分にヘキサナールに起因するピーク 1 が現れた。また, 15 ~ 18 分には他のアルデヒド類に

起因すると考えられるピーク 6 本（ピーク 2～7）が現れた。ヘキサナールに加えて、これら 6 種類の未同定物質が大豆臭に関与すると仮定して、HPLC で定量した。Table 1 に、各種吸着剤処理化 SPI 溶液についての官能試験による+の個数、HPLC クロマトグラフにおけるピーク 1 の面積、ピーク 2～7 の面積の総和、ピーク 1～7 の面積の総和を示した。

HPLC 分析において面積値が 2,000 以下は測定信頼限界以下である。Table 1 と 2 に示した面積値は、DNPH 処理したのちアセトニトリルで 5 倍に希釈した結果を示している。従って、DNPH 処理した反応液の数値は表に示した HPLC チャート上の面積値の 5 倍、また、吸着剤処理化 SPI 溶液の数値は 10 倍である。

アルデヒドの DNPH 化誘導体の吸光度はアルデヒドの種類によらず、ほぼ一定であるが、ヘキサナールについて求めた検量線から、面積値 10,000 は 130 nM のヘキサナール 30 μ L に相当する、すなわち 3.9×10^{-12} moles (3.9 pmoles) のヘキサナールに相当する。

Table 1 に吸着剤の種類と官能試験の+点数、ヘキサナール（ピーク 1）の面積値、他のアルデヒド類に基

づくと考えられるピーク 2～7 の面積値、およびピーク 1～7 の面積値を示した。吸着剤は+点数の順に並べた。官能試験の結果を見ると、極性の高いゼオライト HSZ-360 HUD やポリメタクリレート樹脂 HP2MG では対照に比べわずかに大豆臭が除去されているものの大きい効果がないことがわかる。一方、疎水性の強いゼオライトである HSZ-690 HOD3A やポリスチレン樹脂 HP20 や SP825 はかなり効果的に大豆臭を除去するが、活性炭はこれらよりも優れた脱臭効果をもつことがわかる。活性炭処理化 SPI 溶液では被験者 14 人全員が大豆臭を認めなかった。HSZ-690 HOD3A 処理化 SPI 溶液では 1 人が、HP20 処理化 SPI 溶液では 2 人が大豆臭を認めた。一方、対照では全員が大豆臭を認めたのに対し、HSZ-360 HUD および HP2MG 処理化 SPI 溶液では 10 人が大豆臭を認め、4 人が認めなかった。この 4 人のうち 3 人は HSZ-360 HUD 処理化 SPI 溶液でも HP2MG 処理化 SPI 溶液でも大豆臭を認めなかった。一部の人には明確に認識できる臭いが他の一部の人には認識できず、臭いの閾値には個人差があることがわかる。

Table 1. Comparison of soy protein-odor and aldehydes of soy protein after the treatment by various absorbents

Absorbent ^a	Score of sensory test ^b	HPLC peak areas (relative values ^c)		
		peak 1	peak 2-7	peak 1-7
Control	19	4,960	10,450	15,410
HSZ-360 HUD	14	3,770	8,740	12,510
HP2MG	12	3,260	5,180	8,440
SP207	4	3,200	3,240	6,440
SP825	3	2,360	1,540	3,900
HP20	2	3,150	1,400	4,550
HSZ-690 HOD3A	1	2,990	1,620	4,610
Active carbon	0	1,800	1,290	3,090

^a The sensory tests were done with 14 volunteers, who smelled the solution of the soy protein isolate treated by the various absorbents. The volunteer gave three points scores (zero, 1 and 2) to the respective solutions according to the strength of the odor.

^b Characteristics of the absorbents: Zeolite beads HSZ-360 HUD and HSZ-690 HOD3A were manufactured by Tosoh, and hydrophobicity of the former is lower than the latter; SP20, polystyrene porous beads of Mitsubishi Chemical; SP825, polystyrene beads with smaller pores than SP20; SP207, HP20 with higher hydrophobicity by introducing bromides to styrene rings; and HP2MG, polymetacrylate beads of Mitsubishi Chemical with lower hydrophobicity.

^c One unit of the figure (relative value) corresponds to 12 ng/mL of hexanal.

Table 2. Effect of ethanol treatment of the absorbents on the absorbent-dependent deodorization of soy protein isolate

Absorbent ^a	Peak 1 area (relative values ^b)			Order of the efficiency of absorbent ^c	
	Ethanol treatment			Before	After
Control	4,960	4,960	0	(1)	1
HSZ-360 HUD	3,770	2,930	840	(2)	2
HP2MG	3,260	2,460	800	(3)	3
HSZ-690 HOD3A	2,990	2,250	740	(6)	4
HP20	3,150	2,200	950	(5)	5
Active carbon	1,800	1,610	190	(8)	6
SP825	2,360	1,190	1,170	(7)	7
SP207	3,200	1,080	2,120	(4)	8

^a Characteristics of the absorbents are shown in Table 1.

^b One unit of the figure (relative value) corresponds to 12 ng/mL of hexanal.

^c Order of the efficiency of the absorbents in deodorization before and after the ethanol treatment of the absorbents.

アルデヒドの定量に対する吸着剤のエタノール処理の効果

ヘキサナール（ピーク 1）の面積値を見ると，上位 4 つの成績（対照＞HSZ-360 HUD＞HP2MG＞SP207）と第 8 位（活性炭）は官能試験の順位に対応しているが，第 5～7 位の成績は対応していない．官能試験では+点数が 3 から 1 であり，ピーク 1 の面積値（相対値）が 3,150 から 2,360 である．2,500 以下は概ね測定の情報限界以下であり，ピーク 1 面積値で第 5 位以下（3,150 以下）は明確に区別できないと考えられる．ピーク 2～7 およびピーク 1～7 の面積値についてもピーク 1 の場合と同様の傾向がみられる．以上の結果から，官能試験はピーク 1 の面積値で定量化できることが示唆された．また，大豆臭の強さは概ね，対照＞HSZ-360 HUD＞HP2MG＞SP207＞（SP825≒HP20≒HSZ-690 HOD3A）≧活性炭の順番になることが考えられる．吸着剤の疎水性はゼオライトについては HSZ-690 HOD3A が HSZ-360 HUD よりも大きいこと，また，ポリスチレン樹脂である SP825 や HP20 がポリメタクリレート樹脂である HP2MG より大きいことを考えると，脱臭には疎水性の大きい吸着剤が効果がある傾向が窺える．しかし，SP207 は HP20 に臭素原子を導入し疎水性を高めた樹脂であるにも拘わらず HP20 に比べて脱臭効果が優れているとは言えず，むしろ劣っていると考えられる．これは SP207 の疎水性が強すぎるため試料液が樹脂内部に入っていないことを反映している可能性があり，樹脂を予めエタノールに浸漬したのち，試料液に加えた．この結果を Table 2 に示す．

エタノール処理により，極性の高い樹脂である HSZ-

360 HUD および HP2MG を含めてすべての吸着剤において，ピーク 1 面積値の減少が認められた．減少の程度は疎水性が最も大きい SP207 で最も大きく，ついでポリスチレン樹脂である SP825 や HP20 で大きかった．この結果は，疎水性が大きい樹脂では本来，試料液は樹脂表面とうまく接触できないが，エタノール処理により試料液が樹脂表面に接触しやすくなることを意味している．エタノール処理により，極性の高い樹脂である HP2MG や HSZ-360 HUD でもピーク 1 面積のかなりの減少が見られたが，疎水性の高いゼオライトである HSZ-690 HOD3A ではそれほど大きい減少は認められなかった．また，活性炭での効果も比較的小さく，エタノール処理の効果はほとんどないと考えて良い．SP207 が最も効果的な吸着剤であることが示された．活性炭，SP825，および SP207 で処理した試料液は官能試験において大豆臭を認めなかった．以上の結果は，SPI 溶液を処理する樹脂の疎水性が大きいほど，脱臭効果が大きいことを示している．

活性炭による処理では，分離大豆たん白質溶液中へ炭素微粒子が混入することが避けられないという欠点がある．エタノール処理したポリスチレン系樹脂からなる吸着剤が活性炭に比べて優れた脱臭効果を示したことは，合成樹脂製の吸着剤とくに臭素化ポリスチレン樹脂製吸着剤を活性炭に換えて，有効に使用できることを意味している．これらの吸着剤は数 mm 程度の粒子径を有しており，処理したあとで分離大豆たん白質溶液と吸着剤とを容易に分離できるという長所がある．これらの吸着剤は安価であり，かつ繰り返し使用が可能である点で高い実用性を有していると考えられ

る。樹脂基材と低分子化合物との疎水性相互作用についての詳細な研究はほとんど報告がない。われわれは親水化処理を施したビニルポリマーを基材とするゲルである Toyopearl と低分子化合物との相互作用を報告した¹⁰⁾。今後、このような基礎的検討が不必要な臭い、色、味の除去に有効に応用されることが期待される。

本研究を遂行するにあたり、滝田禎亮博士、宇野恭史氏、村上博氏、椎原美沙氏（京都大学）の実験における協力を得た。また、高柳弘昭氏（三菱化学株式会社横浜総合研究所機能化学研究所）と徳永節生氏（東ソー株式会社化成第二製造部）からは貴重なご助言を賜った。厚く御礼申し上げる。

要 約

分離大豆たん白質（SPI）の簡便で安価な脱臭法の開発を目的にポリスチレン系樹脂、ポリメタクリレート系樹脂、ゼオライト、活性炭など各種吸着剤の効果を検討した。SPI 溶液にこれらの吸着剤を加えて攪拌したのち、人の嗅覚に基づく臭いの官能試験とアルデヒド類、とくにヘキサナールの定量により、吸着剤処理による脱臭効果を比較した。官能試験とヘキサナールの定量値の間にはほぼ良好な相関が認められた。SPI 溶液に吸着剤を加えて脱臭効果を調べたところ、活性炭が最も優れた効果を示した。一方、他の吸着剤については樹脂が疎水的であればあるほど脱臭効果が優れている傾向が示された。とくに強い疎水性をもつ臭素化ポリスチレン樹脂を予めエタノールに浸漬したのちに用いると活性炭よりも良好な脱臭効果を示し、未処理 SPI 溶液に比べてヘキサナール含量は 1/5 に減少し、大豆臭を指摘した被験者はいなかった。以上のことから、SPI 溶液に疎水性樹脂からなる吸着剤を添加し攪拌することにより簡便かつ効果的に脱臭できることを示した。吸着剤樹脂は SPI 溶液から容易に分離でき、再生して繰り返し使用可能であり、本方法は従来試みられてきた方法に比べて安価で実用性が高い。

文 献

- 1) 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.
- 2) Takahashi N, Kitabatake N, Sasaki R and Chiba H (1980): Enzymatic improvement of food flavor. V. Oxidation of aldehydes in soybean extracts by an NAD⁺-regenerating system made up of aldehyde dehydrogenase and diaphorase. *Agric Biol Chem*, **44**, 1669-1670.
- 3) Trumbetas JF, Franzen RW and Loh JP (1993): Removal of odor and offensive taste from protein foods using lipases. European Patent Application EP 572139 A2.
- 4) Kobayashi H, Kohya S, Kawashima K, Kim W-S, Tanaka H, Motoki M, Kasamo K, Kusakabe I and Murakami K (1992): Deodorization of soybean protein with microorganisms. *Biosci Biotech Biochem*, **56**, 530-531.
- 5) Nakamura M, Nishitani T, Mihashi T and Tomizawa A (1994): Method for deodorizing soybean proteins with ion exchangers. Japan Kokai Tokkyo Koho JP 94276955 A2.
- 6) Maheshwari P, Ooi ET and Nikolov ZL (1995): Off-flavor removal from soy-protein isolate by using liquid and supercritical carbon dioxide. *J Am Oil Chem Soc*, **72**, 1107-1115.
- 7) Hijika M, Kitamura K and Igita K (1991): A line lacking all the seed lipoyxygenase isozymes in soybean induced by gamma ray irradiation. *Jpn J Breed*, **41**, 507-509.
- 8) Takamura H, Kitamura K and Kito M (1991): Inhibition by lipoyxygenase-3 of *n*-hexanal generation in soybeans. *FEBS Lett*, **292**, 42-44.
- 9) 的場輝佳, 高村仁知, 喜多村啓介(1996): 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。大豆たん白質研究会会誌, **17**, 29-32.
- 10) Inouye K (1991): Chromatographic behaviors of proteins and amino acids on a gel filtration matrix, TSK-GEL Toyopearl. *Agric Biol Chem*, **55**, 2129-2139.