

酵素化学的および物理化学的手法を用いる 大豆たん白質の脱臭技術の開発

井上國世*

京都大学大学院農学研究科

Deodorization of Soybean Proteins by Enzymatic and Physicochemical Processings

Kuniyo INOUE

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

ABSTRACT

In order to establish a convenient and effective process for deodorization of soy protein isolate (SPI), various solid absorbents such as polystyrene, polymetacrylate, zeolite and charcoal were examined. The efficiency of deodorization was evaluated by measuring hexanal and linoleic acid as well as by a sensory test. The content of hexanal in the SPI solution was decreased in all cases, while the content of linoleic acid was not in any cases. Although a brominated polystyrene absorbent (Sepabeads) and a zeolite absorbent (HSZ) removed hexanal more effectively than charcoal, a considerable amount of hexanal remained (more than one third). On the other hand, a model experiment showed that the absorption ability of these absorbents for hexanal was much higher than the content in the SPI solution. These results indicated a possibility that hexanal in the SPI solution was classified into two states : 1. free or bound on the surface of proteins (removable by absorbents) and 2. bound at the inside of proteins (unremovable). This idea was supported by the evidence that the excess hexanal added to the SPI solution was mostly removed by the absorbents. The chymotryptic digestion of the SPI solution did not promote the removal of hexanal by the absorbents, suggesting that hexanal in state 2 might exist in the similar state even in the digests. Despite the considerable remaining of hexanal after treatment by the absorbents, we succeeded in preparing the SPI solution deodorized well in the sensory test. It strongly suggested that hexanal in state 1 but not in state 2 was related to the soybean odor. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 20-27, 1999.

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

*〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町

大豆は、たん白質を豊富に含む農作物であり、植物油の供給源として重要な位置を占め大規模に生産され

ているため、脱脂大豆が比較的安価に入手できる。一方、大豆たん白質は、栄養的に良質であり、またゲル化能、乳化能など食品製造上の有利な性質も兼ね備えている。したがって、人口増加が憂慮される21世紀において、この脱脂大豆中のたん白質を食品としてさらに有効に活用することは大きな意義がある。そのための問題点の1つは大豆臭であり、その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、中でも炭素数6のヘキサナールが最も主要な成分であり、リノール酸の酵素的酸化分解反応や非酵素的自動酸化によって生じるとされている¹⁾。従来、酵素を用いる方法^{2,3)}、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。また、リポキシゲナーゼ欠損大豆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までには至っていない^{8,9)}。一方、大豆たん白質中に極性脂質と強い相互作用をする oil-body-associated proteins (OBAPs) が存在し¹⁰⁾、その構造も推定されている¹¹⁾。最近、脱脂大豆のたん白質から OBAPs を除去することが、極性脂質や臭い成分の除去に有効であることも報告されている¹²⁾。我々は各種吸着剤を用いる物理化学的脱臭法が簡便かつ効果的であることを報告した¹³⁾。本研究では各種吸着剤を用いる物理化学的方法に加え、プロテアーゼ処理を用いる酵素化学的方法を併用することを検討した。

方 法

実験材料及び試薬

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恵与された。フジプロ-R を 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に 50 mg/mL となるように溶解し、SPI 溶液とした。

吸着剤として東ソー製ゼオライト (HSZ-360HUD, HSZ-690HOD3A)、三菱化学製合成樹脂吸着剤 (セバピーズ SP207, セバピーズ SP825, ダイヤイオン HP207, ダイヤイオン HP2MG)、および活性炭 (塩酸処理化、ナカライテスク製) を用いた。4 種類の合成樹脂吸着剤は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て用いた。トリスアミノメタン (99.0%), 塩酸 (特級), hexanal (一級), 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) (特級), メタノール (特級), クロロホルム (特級) はナカライ・テスク製を、エタノール (特級), アセトニトリル

(HPLC 用), 蒸留水 (HPLC 用), ヘキサン, 5% 塩化水素メタノール溶液 (GC 用), リノール酸は和光純薬を用いた。

電気泳動

SPI 溶液, 吸着剤処理化 SPI 溶液を SDS 化し, 電気泳動 (マルチゲル 4-20) を行った。SPI 溶液 10 μ L を 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) で 10 倍希釈し, 希釈溶液 30 μ L を SDS 電気泳動サンプル処理液 (0.0625 M トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8), 2% SDS, 15% グリセロール, 5% 2-メルカプトエタノール, 0.001% BPB) 30 μ L と混合し, 3 分間煮沸した後, 電気泳動を行った。

アルデヒド定量

アルデヒドは DNPH と反応させ, 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体に変換し, HPLC により定量した¹⁴⁾。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。次に, 吸着剤処理化 SPI 溶液 1 mL と DNPH 溶液 1 mL とを混合し, 45°C で 30 分間反応させた。反応終了後, 遠心分離 (5,000 $\times$ g, 10 分間) により不要物を除去した。上清 200 μ L をアセトニトリル 800 μ L と混合して 5 倍希釈した。この処理により, 溶解しているタンパク質を変性凝固させ, 遠心分離 (5,000 $\times$ g, 10 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 μ L をサンプルチューブへ注入し, 30 μ L をカラム内に注入した。HPLC は, YMC ODS-AMC18 (内径 4.6 mm $\times$ 300 mm) カラムを用い, 日立高速液体クロマトグラフィ装置 HPLC7000 で行った。溶出は, カラム温度 50°C, 流速 1.0 mL/min で, アセトニトリル濃度, 70 ~ 100% の直線グラジエントで行い, 検出は波長 360 nm で行った。

脂肪酸定量

脂肪酸は 5% 塩化水素メタノール溶液と反応させメチル化し, ガスクロマトグラフィー (GC) により定量した¹⁴⁾。吸着剤処理化 SPI 溶液 6 mL に, クロロホルム-メタノール (1:1) 溶液 12 mL を加えて脂肪酸をクロロホルム層に抽出し, 30 分間静置後, クロロホルム層 3 mL 分取, 留去した。0.3 mL のメタノールで洗い込み, それに 5% 塩化水素メタノール溶液 0.3 mL を加えて密栓した状態で 90 ~ 95°C で 2 時間反応させた。反応後, ヘキサンで抽出, 留去後, 定量 (200 μ L) に再溶解してボリュウムを整えたものを, GC 用試料とした。GC へは, 1 μ L を注入した。GC は, 0% Silar 10C-ChromosorbW MESH 80 ~ 100 (内径 3.2 mm $\times$ 2,100 mm) カラムを用い, 島津ガスクロマトグラフィ装置 GC-9APT で行った。溶出は, carrier: N₂, 60 mL/min で,

温度勾配 160℃ ～ 240℃ で行い、検出は水素炎イオン化検出器 (FID) で行った。

SPI 溶液の吸着剤処理

SPI 溶液に吸着剤 (2 g/40 mL) を加え、15 分間撹拌したのち、2 mL を分取し、遠心分離 (5,000 × *g*, 10 分間) により吸着剤を除去し、吸着剤処理化 SPI 溶液とした。

各種吸着剤のヘキサナール吸着能力の検討

ヘキサナールをエタノールで 10,000 倍に希釈し、40 mL の 20 mM Tris 塩酸緩衝液 (pH 8.0) に濃度を変化させて添加した。各種吸着剤を 2 g 加え、室温で 1 時間撹拌した。遠心分離 (5,000 × *g*, 10 分間) により吸着剤を除去し、上述の方法でヘキサナールを DNPH 化し、HPLC で定量した。

ヘキサナール添加 SPI 溶液の吸着剤処理

SPI 溶液 40 mL に濃度を変化させたヘキサナール標品 0.25 mL を添加し、これに吸着剤 2 g を混合、室温で 30 分間撹拌後、上述と同様にして HPLC 用分析試料とした。

SPI 溶液のプロテアーゼ消化

フジプロ-R を 20 mM リン酸緩衝液 pH 6.8 に、50 mg/mL となるように溶解し、0.05% アジ化ナトリウム存在下に、ウシ膵臓 α -キモトリプシン (0 ～ 48 nM) と、37℃ で 12 時間反応させた。反応液を上述の方法により吸着剤処理した後、クロロホルム・メタノール溶液 (体積比 1:1) で 3 回抽出し、ヘキサナールの定量に供した。

官能試験

SPI 溶液 40 mL に吸着剤 2 g を加え、15 分間撹拌後、吸着剤処理化 SPI を上述の方法で調製し、大豆臭を感じるか否かで 3 段階の点数 (+2, +1, 0) で、22 人がその臭いを評価した。

結 果

電気泳動

SPI 溶液の SDS 電気泳動の結果は示さないが、分子量 34,000 の OBAPs が確認できたが、17,000, 18,000, 24,000 の OBAPs は確認できなかった。また、吸着剤処理化 SPI の SDS 電気泳動の結果は、未処理のものと変化はみられなかった。

アルデヒド定量

アルデヒドの HPLC による検出結果を示す (Fig. 1)。HPLC では 11.0 分にヘキサナールに起因するピークが現れた。各種吸着剤処理化 SPI 溶液についての HPLC クロマトグラフにおけるヘキサナールピークの面積の

総和を示した。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。すべての吸着剤処理によって、SPI 中の残存ヘキサナール量は減少した。使用した 7 種の吸着剤の中で、ヘキサナールを大きく除去できたのはゼオライト HSZ-360HUD とセパビーズ SP207 であり、その効果は活性炭以上であった。その他の吸着剤処理化 SPI 中の残存ヘキサナール量に大きな違いは見られなかった。ゼオライト HSZ-360HUD、セパビーズ SP207、および活性炭で処理した SPI 溶液の残存ヘキサナール量は、コントロールに比べてそれぞれ、32%, 30%, 53% であった。

脂肪酸定量

HPLC の結果から吸着剤として適すると考えられる活性炭、樹脂 SP207、ゼオライト HSZ-360HUD について脂肪酸の吸着を GC を用いて分析した。主要な不飽和脂肪酸であるリノール酸に注目したところ、脂肪酸の吸着は活性炭 > セパビーズ SP207 > ゼオライト HSZ-360HUD の順になった (Fig. 2)。吸着が最も大きい活性炭では約 70% の吸着度であり、有効とはいえない結果となった。

各種吸着剤のヘキサナール吸着能力の検討

ヘキサナールの除去に、幾つかの吸着剤が有効である可能性が示唆されたため (Fig. 1)、モデル実験によりヘキサナールの吸着能力を調べた結果を Fig. 3 に示

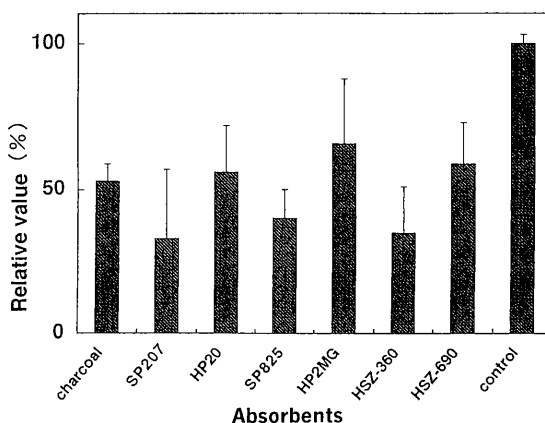


Fig. 1. Removal of hexanal from the SPI solution by absorbents. Two grams of each absorbent were added to 40 mL of the SPI solution (0.05 g/mL). After stirring for 15 min at room-temperature, 2 mL of the mixture was centrifuged by 5,000 × *g* for 10 min. Hexanal in the supernatant was determined.

す。これらの吸着剤は、SPI 溶液中に存在するヘキサナール量をはるかにこえる吸着能力を有することが明らかになった (Fig. 3)。

SPI 溶液に添加されたヘキサナールの吸着剤による除去効果

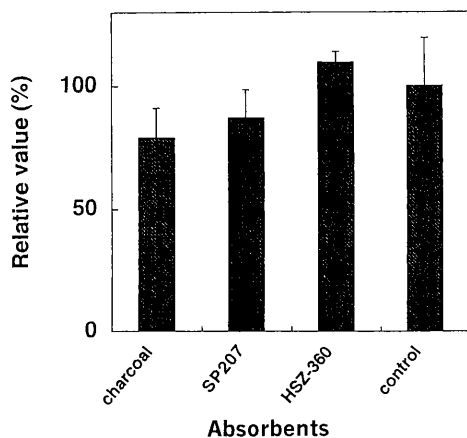


Fig. 2. Removal of linoleic acid from the SPI solution by absorbents. Two grams of each absorbent were added to 40 mL of the SPI solution (0.05 g/mL). After stirring for 15 min at room-temperature, 2 mL of the mixture was centrifuged by $5,000 \times g$ for 10 min. Linoleic acid in the supernatant was determined.

SPI 溶液に含まれるヘキサナールに比べて大過剰の、しかし吸着能力を越えない範囲のヘキサナール標品を添加したサンプルを吸着剤処理したところ、ヘキサナールの大部分が吸着除去されたが一部は除去でき

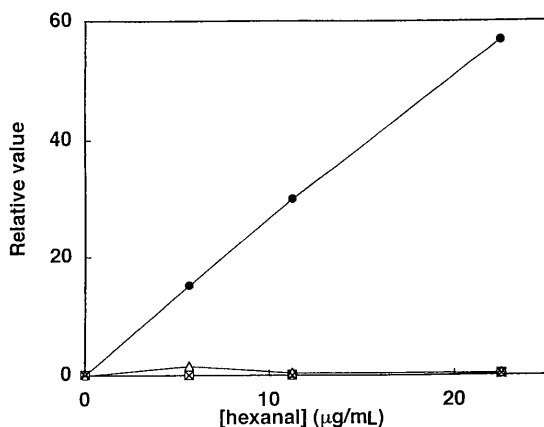


Fig. 3. Addition of hexanal to a Tris-HCl buffer and removal of hexanal by absorbents. Two grams of each absorbent were added to 40 mL of a 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing various concentrations of hexanal indicated. After stirring for 1 h, 2 mL of the mixture was centrifuged by $5,000 \times g$ for 10 min. Hexanal in the supernatant was determined.

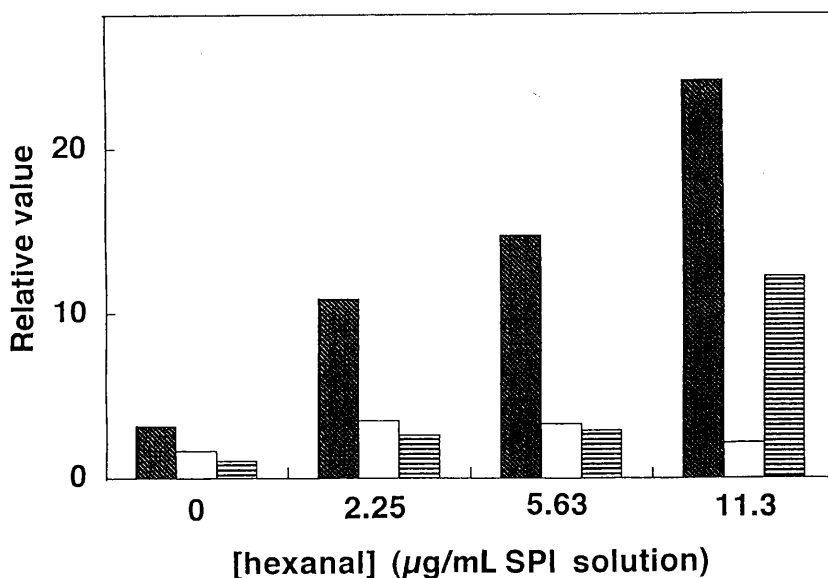


Fig. 4. Addition of hexanal to the SPI solution and removal of hexanal by absorbents. Two grams of each absorbent were added to 40 mL of the SPI solution (0.05 g/mL) containing different concentrations of hexanal. After stirring for 30 min, 2 mL of the mixture was centrifuged by $5,000 \times g$ for 10 min. Hexanal in the supernatant was determined.

なかった (Fig. 4). この残存量は (Fig. 3), 添加量にかかわらずほぼ一定であった.

SPI 溶液の樹脂による脱臭におけるプロテアーゼ消化の効果

SPI 溶液の α -キモトリプシン消化物の SDS-PAGE を (Fig. 5) に示す. 各サンプルを有機溶媒抽出に供し, 残存ヘキサナル量を未消化物の場合と比較すると, 同程度であった (Fig. 6).

官能試験

(22 人の点数の総和) / (22 人が +2 と評価したときの点数の総和) の割合を算出し, これを官能試験のグラフとした (Fig. 7). ゼオライト HSZ-360HUD とセパ

ーズ SP207 はかなり効果的に大豆臭を除去した. 特に, ゼオライト HSZ-360HUD の結果は, 活性炭に匹敵するものであった.

考 察

ヘキサナルの SPI 溶液中での存在状態

Fig. 3 の結果は, 用いられた吸着剤が, SPI 溶液中に存在するヘキサナル量をはるかに凌ぐ吸着量を有することを示している. これと一致して, Fig. 4 の結果は, 添加された大過剰のヘキサナル標品は大部分が吸着除去されることを示している. しかし, Fig. 4 において, 残存ヘキサナルが添加量にかかわらずほぼ一定であることから, SPI 溶液中でのヘキサナルの存在状態は, (1) 吸着剤によって除去されやすいたん白質表面上, あるいは遊離の状態, および (2) たん白質の内部に強く結合し吸着剤によって除去されにくい状態に分けられると考えられ, Fig. 4 の残存ヘキサナルは, 状態 (2) の環境に存在すると考えられた. この様な可能性は, 以前藤巻らによって, 酵母菌体からの低分子化合物のエーテル抽出におけるペプシン処理の効果をもとに, 提案されている¹⁵⁾. さらに, SPI 溶液のキモトリプシン消化物を吸着剤処理した結果, 残存ヘ

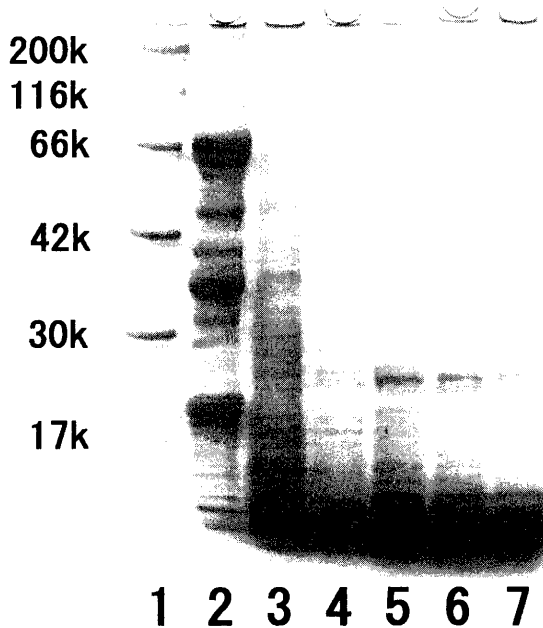


Fig. 5. SDS-PAGE of α -chymotryptic digests of SPI. SPI (50 mg/mL in 20 mM phosphate buffer) was digested by α -chymotrypsin at pH 6.8, 37°C for 12 h in the presence of 0.05% sodium azide. The SDS treatment was shown in MATERIALS AND METHODS. Lane 1 is molecular weight markers (from top to bottom : Mr 200,000, myosin ; Mr 116,248, β -galactosidase ; Mr 66,267, bovine serum albumin ; Mr 42,400, aldolase ; Mr 30,000, carbonic anhydrase ; Mr 17,201, myoglobin). Lanes 2~7 are the SPI digests obtained with various concentrations of α -chymotrypsin indicated : Lane 2, 0 nM ; Lane 3, 2.4 nM ; Lane 4, 4.8 nM ; Lane 5, 9.6 nM ; Lane 6, 24 nM ; and Lane 7, 48 nM.

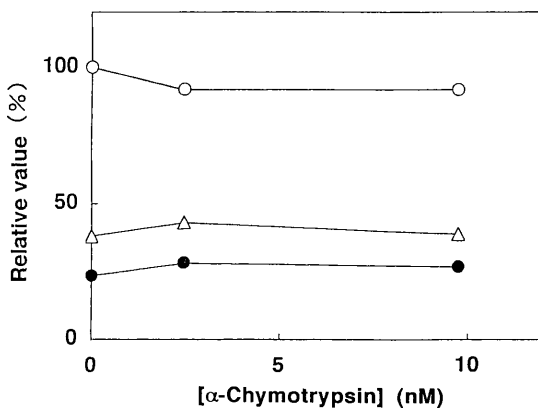


Fig. 6. Removal of hexanal from the α -chymotryptic digests of SPI by absorbents. The digestion of SPI by chymotrypsin was conducted under the same conditions as in Fig. 5. The method measuring hexanal was the same as in Fig. 1 except hexanal was extracted three times with an equal volume of the chloroform methanol mixture (in a volume ratio of 1 : 1) after mixing the digest and each absorbent.

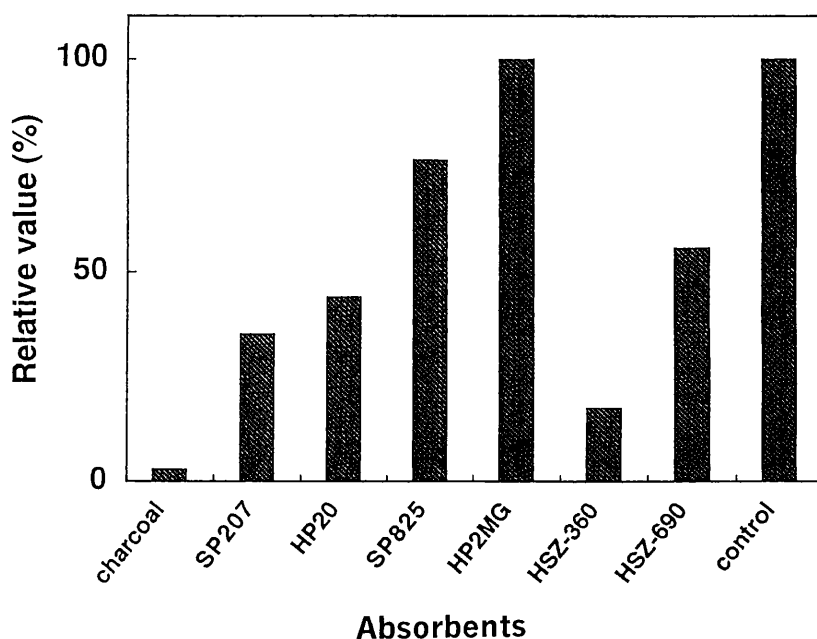


Fig. 7. Effect of absorbents on the deodorization of the SPI solution in a sensory test. The SPI solution (50 mg/mL) treated by an absorbent was smelled by 22 people. Residual soybean odor in each sample was evaluated with the three kinds of points, 0, +1, +2 where the most deodorized one was marked as 0. The vertical axis shows the percentage in the sum of the points by 22 people against the control (without absorbents).

キサナール量が未消化物同程度であったことから (Fig. 6), この吸着剤で除去できないヘキサナールは、消化処理においても状態(2)の環境に存在することが示唆された。これは、たん白質の立体構造が壊れたために、たん白質分子とヘキサナールに新たな相互作用が生まれたためであるかもしれない。

官能試験と残存ヘキサナール量の相関

Fig. 1およびFig. 3において、ヘキサナールの除去効果が高いと考えられた活性炭、ゼオライト HSZ-360HUD およびセバピーズ SP207 は、官能試験でも非常に効果があることが明らかになった (Fig. 7)。しかし、官能試験において大豆臭がほとんど完全に除去された活性炭の場合でも、残存ヘキサナールがコントロールの53%も残存することから、除去されず残存したヘキサナールは臭いに影響を及ぼさないような状態で存在する可能性が示唆された。そこで、我々は、上

述の状態(2)の環境のヘキサナールは大豆臭に関与せず、状態(1)の環境のヘキサナールが大豆臭に関与すると推測した。また、ヘキサナールは大豆臭の成分ではあるが、それ以外の、より閾値の低い大豆臭成分の存在も示唆される。活性炭、各種合成樹脂による直接脱臭は、これら低い閾値を有し極微量で大豆臭を発すると考えられる成分、例えば 2-*n*-ペンチルフラン¹⁶⁾の除去に有効である可能性が考えられた。活性炭処理では、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。ゼオライト HSZ-360HUD やセバピーズ SP207 は、活性炭に代わりうる有力な吸着剤といえる。

謝辞 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) の協力を得た。厚く御礼申し上げます。

要 約

分離大豆たん白質 (SPI) の簡便で効率的な脱臭操作の開発を目的に、各種吸着剤による直接的な脱臭効果を検討した。脱臭の効果を、臭い物質であるとされるヘキサナールと、その原料であると考えられるリノール酸を指標に評価したところ、ヘキサナールはすべての場合で減少したが、リノール酸は有意には減少しなかった。特にヘキサナールを効率良く除去できたのはゼオライト HSZ-360HUD とセパビーズ SP207 であり、その効果は活性炭以上であった。これらの吸着剤について、ヘキサナールの吸着能力を調べたところ、SPI 溶液中に存在するヘキサナール量をはるかにこえる量を吸着できることが明らかになった。それにもかかわらず、吸着剤処理化 SPI 溶液にかなりのヘキサナールが残存することから、SPI 溶液中でのヘキサナールの存在状態を、状態 (1) : 吸着剤によって除去されやすいたん白質表面上あるいは遊離の状態、状態 (2) : たん白質の内部に強く結合し吸着剤によって除去されにくい状態と推定した。SPI 溶液に、新たに過剰のヘキサナールを添加し、これら吸着剤で処理したところ、その大部分が除去できた。これは、添加されたヘキサナールの大部分が (1) の状態で除去可能であるのに対し、残存ヘキサナールは状態 (2) の環境下で除去できないことを示唆していると考えられた。状態 (2) に存在するヘキサナールを除去するために、キモトリプシンで SPI 溶液を処理し、吸着剤処理したが、残存ヘキサナール量に変化はなかった。これは、残存ヘキサナールが消化物中においてもやはり状態 (2) の環境下に存在することを示唆した。さらに、官能試験でほとんど無臭化された SPI 溶液において、かなりのヘキサナールが残存していることから、次の 2 つの可能性が示唆された。(A) 状態 (2) のヘキサナールは大豆臭に関与せず、状態 (1) のもののみが関与する。(B) ヘキサナールは大豆臭の成分ではあるが、それ以外の、より閾値の低い大豆臭成分が存在し、吸着剤処理は、これらを効率的に除去する。

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 Biotechnol 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) Hajika M, Igita K and Kitamura K (1991) : A line lacking all the seed lipoxigenase 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 lipoxigenase-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) : リボ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) Herman EM (1987) : Immunogold-localization and synthesis of an oil-body membrane protein in developing soybean seeds. *Planta*, **172**, 336-345.

- 11) Tzen JT and Huang AH (1992) : Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J Cell Biol*, **117**, 327-335.
- 12) Samoto M, Miyazaki C, Kanamori J, Akasaka T and Kawamura Y (1998) : Improvement of the off-flavor of soy protein isolate by removing oil-body associated proteins and polar lipids. *Biosci Biotechnol Biochem*, **62**, 935-940.
- 13) 井上國世 (1998) : 脱脂大豆たん白質からの物理化学的脱臭操作の開発. 大豆たん白質研究, **1**, 41-45.
- 14) Matsuura H, Matsuura N, Minagawa N and Hirota T (1997) : Determination of aliphatic aldehydes in milk, milk products, edible fat and oil by HPLC. *Bunseki Kagaku*, **46**, 31-36.
- 15) Fujimaki M, Utaka K, Yamashita M and Arai S (1973) : Production of higher-quality plastein from a crude single-cell protein. *Agric Biol Chem*, **37**, 2303-2312.
- 16) Chang SS, Smouse TH, Krishnamurthy RG, Mookherjee BD and Reddy RB (1966) : Isolation and identification of 2-pentyl-furan as contributing to the reversion flavour of soybean oil. *Chem Indust*, **46**, 1926-1927.