

# 大豆の青臭さの原因であるn-ヘキサナールを分解できる アルデヒドデヒドロゲナーゼのスクリーニング

鈴木秀之\*<sup>1</sup>・富山大輔<sup>2</sup>

<sup>1</sup>京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 <sup>2</sup>京都大学農学部

## Screening of Aldehyde Dehydrogenase Which Degrades n-Hexanal, the Causative Substance of Soy Bean Smell

Hideyuki SUZUKI<sup>1</sup> and Daisuke TOMIYAMA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585

<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502

### ABSTRACT

n-Hexanal, the causative substance of soy bean smell, is a big problem when we use soy products in food industry. n-Hexanal is produced through the oxidation of linoleic acid whose content is very high in soy beans. Aldehyde dehydrogenases, which may have high activity for n-hexanal, were screened *in silico* and we chose *Bradyrhizobium japonicum* from soy nodules. The gene was cloned and over-expressed in *Escherichia coli*. It was shown that the cell-free extracts of the over-expressed strain had very high activity against n-hexanal. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 67-70, 2008.

Key words : n-hexanal, aldehyde dehydrogenase, root nodule bacteria

大豆を材料に豆乳や大豆たん白質を調製する場合、最も問題となるのはその青臭さである。青臭さの主成分は大豆に多量に含まれているリノール酸の酸化により生成するn-ヘキサナールである。食品の加工には大豆から大豆油を注出した残渣である脱脂大豆が用いられることが多いが強い青臭みを持っている。特に豆乳は青臭みが残り易く、人によって好き嫌いが分かれる。調製豆乳は調味料や香料を加えることで飲みやすくしているが、青臭みのもとをなくしたわけではない。大豆に含まれるリノール酸は大豆のリポキシゲナーゼに

よってリノール酸13-ヒドロペルオキシドとなり、さらにヒドロペルオキシドリナーゼによってn-ヘキサナールへと変換される<sup>1)</sup> (Fig. 1)。そのため、煮沸によってリポキシゲナーゼを失活させる方法や品種改良によりリポキシゲナーゼを欠損した大豆の育種、栽培が行われている。一方、発生したリポキシゲナーゼの除去法として吸着剤による吸着や微生物によるヘキサナールの代謝分解が検討されている。バクテリアが生産するアルデヒドデヒドロゲナーゼの中には基質特異性が広く、比較的長鎖のアリファティックアルデヒドに作用して、カルボン酸を生成するものが報告されている。本研究では、n-ヘキサナールデヒドロゲナーゼを生産

\*〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町

するバクテリアを検索し、同酵素の遺伝子のクローニングを行った。

## 方 法

### ヘキサナール、ヘキサン酸の濃度測定

大豆の青臭みの主成分のヘキサナールおよび代謝産物であるヘキサン酸の検出には逆相HPLC (LC-10, 島津製作所)を用いた。カラムはナカライテスク社製5C<sub>18</sub>-MS II, 移動層は50%メタノール溶液, 流速0.5 mL/min, 検出波長220 nm, カラムオープン温度30°Cで行った。

### 発現誘導培養

300 mL容三角フラスコに60 mLの100 μg/mLアンピシリンを含むLB培地を用意し, これにOD<sub>600</sub>=0.05となるように前培養液を植菌, 37°Cで振盪培養してOD<sub>600</sub>=0.4から0.8になったときにIPTGを終濃度0.5 mMになるよう添加した。サンプリングは1時間ごとに行い, そのときのOD<sub>600</sub>を測定するとともに, 培養液500 μL分の菌体をSDS-PAGE用サンプルとした。

### 無細胞抽出液の作成

培養液を4°C, 8,000 rpmで10分間遠心して菌体を得た。これを培養液の1/10量(6 mL)の滅菌水で洗菌した。沈殿を6 mLのソニック用バッファー(10 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, 20 mg/L PMSF)に懸濁させた後, 氷冷しながら5分間超音波破碎を行った。4°C, 8,000 rpmで10分間遠心した上清を無細胞抽出液とした。

### 酵素活性の測定

アルデヒドデヒドロゲナーゼの酵素活性測定は, 補酵素NADHの340 nmの吸光度の経時的变化を測定することにより行った。酵素標品と50 mM Tricine緩衝液

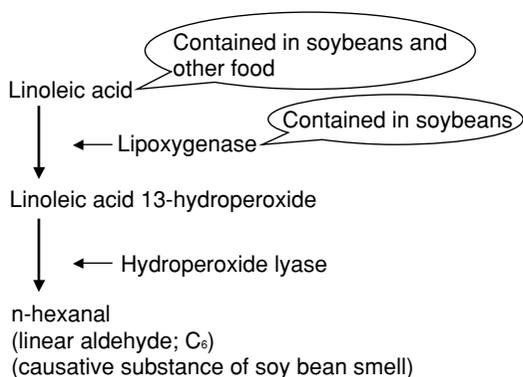


Fig. 1. Mechanism of the synthesis of hexanal from linoleic acid.

pH 8.5, 1 mM ヘキサナール, 5 mM NAD<sup>+</sup>を含む反応液を混合し, 37°Cで反応を行った。1分間に1 μmolのヘキサナールを変化させる酵素量を1酵素単位とした。

## 結果と考察

### *in silico*でのヘキサナール分解菌のスクリーニング

石油分解菌であるHD-1菌がヘキサナールに対してアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を持つことが報告され, その遺伝子 (*hd-ald*) がクローニングされていた<sup>2)</sup>。そこで, この遺伝子と相同性の高い遺伝子を*in silico*で検索したところ, 根粒菌のいくつかが持っていることが明らかとなった。最も相同性の高い(81.4%)遺伝子を持つ菌は大豆根粒菌の*Bradyrhizobium japonicum*で, その遺伝子は*bll4784*であった。大豆の生産するヘキサナールを基質とするデヒドロゲナーゼを大豆根粒菌が持っていることは, 両者の生理にどのような影響を持っているか興味が持たれる。

### 菌体でのヘキサナール代謝確認

ヘキサナール(5 mM)を含む培地で*B. japonicum*を培養した。30°C, 100 rpmで振盪培養し, HPLCで経時的なヘキサナールの減少を確認した(Fig. 2)。*B. japonicum*を培養すると経時的にヘキサナール濃度が減少した。しかし, 菌を培養した場合に比べれば緩や

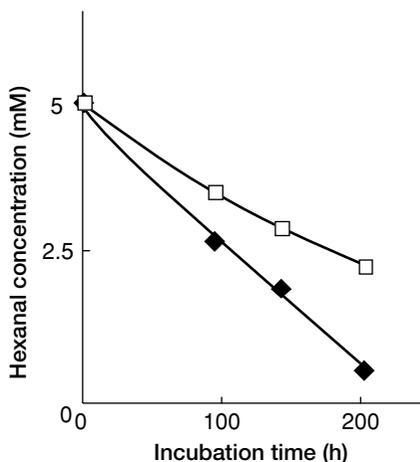


Fig. 2. Metabolism of hexanal by *Bradyrhizobium japonicum* cells. *B. japonicum* was grown in the medium containing 5 mM hexanal at 30°C with reciprocal shaking at 100 rpm. The concentration of hexanal in the medium was measured by HPLC. Black diamonds, with *B. japonicum*; white squares, without *B. japonicum*.

AACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCatgaacaaggtggaattcctcagcgtcacc

Fig. 3. DNA sequence around the initiation codon of pDT1. The initiation codon derived from the vector was surrounded by the square. The DNA sequences correspond to 6 X His-coding region and *Bam*HI recognition site were indicated with underbar and overbar, respectively. DNA sequence derived from *bll4784* gene was shown by the lower-case letters.

かではあるものの、菌を培養しなくても振盪しているだけでヘキサナール濃度が減少していくことが明らかとなった。これは自然酸化によるものと考えられる。両者の差はそれほど劇的ではなく、これは *B. japonicum* のヘキサナール代謝速度がそれほどは大きくないためと考えられる。

一方、酵素反応によって生成するヘキサ酸が化学量論的には蓄積しなかった。これは、菌がヘキサ酸を  $\beta$ 酸化により代謝するためと考えられる。ヘキサナールと同様ヘキサ酸にも強い臭いがあるため、菌体によりさらに代謝されることは都合がよい。

#### *bll4784* のクローニングと大量発現株の作成

*B. japonicum* の野生株ではヘキサナールデヒドロゲナーゼの活性は顕著ではなかった。そこで、*bll4784* の大量発現株を作成して確認することにした。プライマーは、それぞれ *Bam*H I と *Sal* I の制限酵素サイトを持つ 2 つのプライマー（プライマー F: cccGGATCCatgaacaaggtggaattcctcagcgtcacc; プライマー R: cccGTCGACtcagaagaagccgagcttcttcgggctgta）を設計し、PCR で増幅させた *bll4784* 遺伝子をベクター pQE80L のマルチクローニングサイトの *Bam*H I サイトと *Sal* I サイトの間に挿入し、pDT1 を作成した。設計したプライマーと pDT1 の開始コドン付近の DNA 配列を Fig. 3 に示した。pDT1 の *Bam*H I から *Sal* I の間の DNA についてはシーケンシングを行い、データベースと同じであることを確認した。pDT1 を用いて DH5 $\alpha$  株 (DT1 株) を形質転換した。

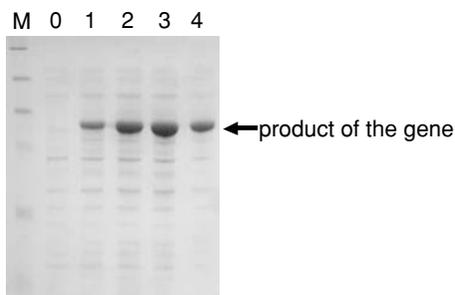


Fig. 4. Induction of *bll4784* gene from strain DT1. The sample was taken every one hour after the addition of IPTG. The numbers indicate the hours after the addition of IPTG. M indicates the molecular weight marker; 175, 83, 62, 47.5, and 32.5 K.

#### *bll4784* 発現誘導培養と活性の確認

DT1 株で *bll4784* を発現誘導し、1 時間ごとのサンプルを SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけた (Fig. 4) ところ、目的とするたん白質が強く発現していることが明らかとなった。DT1 株とコントロール株 (DH5 $\alpha$  株を pQE80L で形質転換したもの) の無細胞抽出液の酵素活性を比較したところそれぞれ 80.2, 2.5 mU/mg であった。

このことから、*bll4784* 遺伝子の産物がヘキサナールデヒドロゲナーゼであることが明らかとなった。

## 要 約

大豆を材料に豆乳や大豆たん白質を調製する場合、最も問題となるのはその青臭さである。青臭さの主成分は大豆に多量に含まれているリノール酸の酸化により生成する n-ヘキサナールである。本研究では、石油分解菌の持つアルデヒドデヒドロゲナーゼがヘキサナールを基質とすることがすでに報告されていたことから、そのアミノ酸配列を基に Blast 検索をかけた。その結果、いくつかの根粒菌の持つアルデヒドデヒドロゲナーゼが高い相同性を示した。中でも高い相同性を示すアルデヒドデヒドロゲナーゼを持つことが分かった大豆根粒菌である *Bradyrhizobium japonicum* を n-ヘキサナール (アルデヒド) デヒドロゲナーゼ生産菌候補として選抜した。次いで、遺伝子クローニングを行い、大腸菌内で発現させ、その無細胞抽出液を酵素標品として n-ヘキサナールデヒドロゲナーゼ活性を持つことを確認した。

## 文 献

- 1) 鬼頭 誠, 高村仁知 (1992): 大豆たん白質製品中のヘキサナル生成とその抑制に関与する因子. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **13**, 12-14.
- 2) Okibe N, Amada K, Hirano S-I, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M and Kanaya S (1999): Gene cloning and characterization of aldehyde dehydrogenase from a petroleum-degrading bacterium, strain HD-1. *J Biosci Bioeng*, **88**, 7-11.