大豆その他食品のリポキシダーゼに関する研究

Lipoxidase Activity of Soybean and Other Foods

(昭和45年6月30日受理)

吉 田 企 世 子*
(Kiyoko Yoshida)

The distribution of lipoxidase which oxidizes polyunsaturated fatty acid in various foods of plant origin, especially in soybean and its products was studied. Lipoxidase preparation from soybean showed higher resistance against heating in dry state than that treatment in wet state. When the coarsely ground soybean was heated in dry state at 80°C, for ten hours, yet 15% of activity was remained. When the soybean lipoxidase was added to the substrate containing antioxidant such as BHA or PG, little effect were observed in the first stage (i.e. for about thirty minutes) on both of them, however, their effects gradually began to appear thereafter. It was also shown that the lipoxidase activity was extremely low in various foods other than soybean.

特定の脂肪酸を酸化する酵素リポキシダーゼに関しては、いまだ不明の部分が多いが、熱に対してはかなり安定であることがすでに報告されている¹⁾。しかしどの程度の耐熱性があるかは不明である。また多くの食品中ではその活性度はきわめて低いが、しかし大豆では著しく高いので大豆加工品に何らかの影響をおよぼしているのではないかと考えられる。そこで、幾つかの観点からリポキシダーゼの性質を検討した。

実 験 と 結 果

1. リポキシダーゼ活性度の測定方法

H. Theorell らのSpectrophotometric Assay²⁾³⁾の一部を改良して用いた。すなわち、本酵素の作用によってリノール酸より生じた共軛 diene 系は 234 m μ に特有の最大吸収を示すのでこれを比較する方法である。測定には EPU-2 型日立分光々電光度計を用いた。

a. 基質の調製

トウモロコシ油、およびサフラワー油を試料として、尿素附加法⁴⁾により得たリノール酸 0.1g に中和等量の 0.1N-NaOH を加えて振盪し、さらに 0.1 M-borate buffer (pH 9.0) で1/70Mになるように希釈、振盪溶解した。完全に溶解してから(約1時間後)基質として用いた。この状態では自動酸化が進むので8時間以内に使用した。

b. 酵素液の調製

試料は粉末とし、エーテル脱脂した後、適量を0.1M-

acetate buffer (pH 4.5)で抽出し、さらに3,000 $\times$ g, 15分遠心分離して得た上清を pH6.7⁵⁾に調製して粗酵素液とした。野菜の場合には、絞り汁を遠心分離後 pH 6.7に調製して用いた。

c. 活性度の測定

容量 5.0 ml のツンベルグ管を使用した。主管の方へは基質 1.0 ml を採り、側管には 0.2 ml の酵素液を採った。栓をして 20°C の水槽中に15分間放置後、内容を混和し、2分間反応させた後、2.0ml の無水アルコールで反応を止めた。必要に応じて反応液の一部を60%アルコールで希釈した。

活性度の表示は、酵素抽出に用いた acetate buffer 中の試料 1g が吸光度1を示す時、これを1リポキシダーゼ活性度とした。

2. 大豆の品種別リポキシダーゼ活性度および貯蔵後の変化

農林省食糧研究所より提供された5品種(ハロソイ、カンリッチ、ホーカイ、オハイオ産、関東50号)について測定した。なお一部は、日中は戸外に、夜間は 37°C で1ヵ月保存した時の変化を同様に測定した。結果は、Table 1に示すように品種別では差なかったが、日本産のものが比較的小さい値を示した。これは品質が古かったことも原因しているようである。1ヵ月後の活性度はいずれも減少していた。この傾向は水分含量の多いものに著しかった。

3. 大豆加工品のリポキシダーゼ

豆乳…市販品 (pH 6.5~6.7, 固形分9%), 豆腐…市

* 女子栄養大学

Table 1. 大豆の品種別リポキシダーゼ活性度および
1 カ月貯蔵後の変化

品 種	リポキ シダー ゼ活性 度	水 分 %	1 カ月後の リポキシダ ーゼ活性度	減少率 %	備考
ハロソイ・ アメリカ産	2182	10.7	1653	24	収穫後1 カ年
品種不明・ オハイオ産	2153	10.4	1615	25	//
カンリッチ アメリカ産	2112	10.7	1603	24	//
ホーカイ・ アメリカ産	1938	10.2	1725	11	//
関東50号・ 日 本 産	1690	9.4	1549	8	古い品質

販豆乳に70°Cで $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03Mを加えて豆腐を作った後、ガーゼ上に30分放置して上清液と凝固物にわけて試料とした。湯葉…市販豆乳を70°Cに保温し、表面に出来た皮膜をすくい採って湯葉とした。市販品についても測定した。凍豆腐…3銘柄の市販品を用いた。きなこ…4銘柄の市販品を用いた。結果は Table 2 のように、凍豆腐には微量ながら活性が認められた。豆乳には認められることもあったがごく微量であった。

Table 2. 大豆加工品のリポキシダーゼ

大豆加工品	リポキシダーゼ 活 性 度
豆 乳	0~0.2
豆腐	0
上 清 液	0
湯 葉	0
凍 豆 腐	3~5
き な こ	0~9.6

4. 凍豆腐リポキシダーゼ活性度の検討

凍豆腐のリポキシダーゼの存在を確認するために2銘柄の凍豆腐を用いて次の実験を行なった。エーテル脱脂した粉末凍豆腐10gに0.1M-acetate buffer 50mlを加えて抽出し、遠心分離後の上清を粗酵素液とした。基質としてリノール酸 1.75gに N-NaOH 6.2mlを加えてエマルジョンとし、0.1M-borate buffer 7.8mlとtween 20 1.0 mlを加えて均一な透明試料とした。これに酵素液 10mlを作用させ、30分、3時間、24時間および5日後の基質の酸化の程度を POVおよび TBA test により測定した。POVは Lea らの改良法⁶⁾を、TBAは E. W. Turnerらの方法⁷⁾を一部改良して用いた。結果は Fig. 1 に示した。凍豆腐からの抽出液を加えると急速に酸化は進み、その程度は基質だけの時より大きかった。しかし24時間後は緩慢になった。

5. 加熱による大豆リポキシダーゼの変化

a. 乾熱加熱

市販丸大豆を用いて次のように調製した。

- 80°C加熱 軟質試験管に荒挽した脱脂大豆を採り密封後加熱した。加熱にはすべて電気均熱乾燥器を用いた。
- 90°C加熱 iと同様に処理した。
- 125°C加熱 0.5mm以下粒子の粉末としたものを脱脂後、大型シャーレーに採り（蓋は除く）加熱した。
- 130°C加熱 iiiと同様に処理した。

結果は Fig. 2 に示すように125°C加熱でも2時間後まではわずかながら活性が認められリポキシダーゼは乾熱に対してかなり安定であることがわかる。

b. 湿熱加熱

Fig. 1. 基質（リノール酸）に凍豆腐の抽出酵素を作用させた時の酸化の程度

a と同じ試料について次のように調製した。

i. 80°C 加熱 軟質試験管に荒挽した脱脂大豆と十分浸る量の水を加え、密封後 25°C に16時間放置して吸水させた後、加熱した。

ii. 74°C加熱 i と同様に処理した。

iii. 70°C加熱 荒挽と丸大豆について i と同様に処理した。結果は Fig. 3 に示した。なお80°C および74°C 加熱では1時間後にすでに活性は認められなかった。乾熱加熱と比較すると湿熱ではかなり不安定であることが認め Fig. 2. 乾熱加熱によるリポキシダーゼ活性度の変化

Fig. 3. 湿熱加熱によるリポキシダーゼ活性度の変化

Fig. 4. 基質 (リノール酸) に大豆リポキシダーゼを作用させた時の酸化の程度と抗酸化剤の効果(1)

められた。

6. 大豆リポキシダーゼに対する抗酸化剤の効果

リノール酸に少量のエーテルに溶した抗酸化剤を加えて混合した後、エーテルは除去し、中和後0.1M-borate buffer で希釈、さらに tween 20を添加して均一としたものに酵素液を作用させた。抗酸化剤としては BHA(リノール酸に対して $1.3 \times 10^{-3}M$) および PG ($5.6 \times 10^{-5}M$) を用いた。試料調製後、30分、24時間および5日間 20°C に放置した時のリノール酸の酸化の程度を POV および TBA testにより測定した。さらに脱脂大豆を 130°C、2時間加熱して酵素作用を消失させた後抽出した不活性酵素液を作用した場合について同様に測定して比較した。

結果は Fig. 4~5 に示すように、大豆リポキシダーゼ

Fig. 5. 基質 (リノール酸) に大豆リポキシダーゼを作用させた時の酸化の程度と抗酸化剤の効果(2)

ーゼを作用させると30分以内に基質の著しい酸化が認められ、その後は非常に緩慢に進み、基質だけの場合よりはるかに小さい値を示した。

7. リポキシダーゼの分布

数種の食品についてリポキシダーゼ活性度を測定した結果は Table 3 に示すように、落花生などの豆類、馬鈴薯がわずかに目立つ程度で全体に小さい値が示された。

Table 3. 豆類および野菜類のリポキシダーゼ

食品の種類	リポキシダーゼ活性度	備 考
落 花 生	9.5	千葉産、収穫直後
"	9.2	埼玉産 "
"	8.2	産地不明
"	3.2	埼玉産、小粒収穫直後
う ず ら 豆	5.3	北海道産
乾グリーンピース	3.0	"
白 隠 元	2.3	"
小 豆	1.4	"
馬 鈴 薯	2.8	市販品、品種不明
ピーマン	1.9	"
大根(外皮部)	1.3	"
わ さ び	1.2	"
二十日大根	1.2	"
大 根(内部)	0.5	"
甘 諸	0.1	"
キ ャ ベ ツ	0	"
生 姜	0	"
ご ぼ う	0	"

考 察 と 要 約

- (1) 大豆のリポキシダーゼ活性度は品種別には大差ないが、古くなるほど低くなる傾向が認められた。これは大豆の水分含量とも関係があるらしい。
- (2) 大豆を湿熱加熱すると74°Cでは1時間で、70°Cで2~2.5時間で活性が消失していた。
- (3) 乾熱加熱では粉末の時130°C 1時間でも認められ、2時間で消失していた。荒挽大豆を80°Cで加熱した時は10時間後もなお15%の残存率が示された。
- (4) 大豆加工品の中では凍豆腐に微量存在するようである。
- (5) 大豆リポキシダーゼに対して抗酸化剤 BHA または PG は再者とも初期の酸化作用(約30分間)に対してはわずかな抑制効果が認められ、時間の経過と共に徐々にその効果が示された。
- (6) リポキシダーゼの分布状態は大豆に著しく多く、平均 2,035/g/2分間の活性度を示したが他の食品では少なかった。

本研究にあたりご指導いただいた日本女子大学桜井芳人教授に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) Andre, E., Hou, K. W.: *Compt. Rend.*, **194**, 645 (1932)
- 2) Theorell, H., Bergström, S., Akesson, A.: *Rharm. Acta. Helv.*, **21**, 318 (1946)
- 3) 浅田敏雄: 生化学, **24**, 129 (1952)
- 4) Johnson, A. R.: *J. Am. Oil. Chemists Soc.*, **38**, 453 (1961)
- 5) 福場博保: 日農化, **26**, 199 (1952)
- 6) 東大農学部編: 実験農芸化学
- 7) Turner, E. W., Paynter, W. D., Montic, E. J., Bessert, M. W., Struck, G. M., Olson, F. C.: *Food Technol.*, **8**, 326(1954)

強化小麦中の遊離リジンとメチオニンの定量法

小麦に添加したリジンとメチオニンが単独あるは共存しているいずれの場合にも可能で簡易な比色定量法を考案した。

細かにひいた強化小麦を0.1N塩酸で15分間振とうし、ろ過する。ろ液の一部にニトロフェリシアナイドナトリウムの溶液を加え510mμで吸光度を測定し、メチオニンを定量する。残りのろ液はニンヒドリン試薬を加えて全ニンヒドリン陽性物質の吸光度を570mμで測定する。リジン含量は全ニンヒドリン陽性物質とメチオニンの吸光度から算出する。カラムクロマトグラフィー法で行なっ

た結果との比較では、リジンはほぼ同じ値であったが、メチオニンはカラム法によるものの値がいく分低かった。回収率はリジンとメチオニンをそれぞれ0.12~5.18%まで同時に添加した試料で、リジンは117~100%、メチオニンは90~97%であった。これはそれぞれ単独に添加した場合の回収率とはほぼ同じであった。

Determination of Free Lysine and Methionine in Amino Acid-Fortified Wheat.

by Ferrel, R. E., et al.: *Cereal Chem.*, **46**, 614~620 (1969)

(飼 持)