ケミルミネッセンス測定による 大豆リポキシゲナーゼの活性判定

薄木理一郎*・小川 円**・金田 尚志***

Estimation of Soybean Lipoxygenase Activity by Measurement of Chemiluminescence

Riichiro USUKI*, Madoka OGAWA** and Takashi KANEDA***

* *Shokei Women's Junior College, 1-9-15, Hachiman, Sendai-shi, 980*

** *Department of Food Chemistry, Tohoku University, 1-1,
Tsutsumidori-Amamiyamachi, Sendai-shi, 980*

*** *Koriyama Women's College, 3-25-2, Kaisei, Koriyama-shi, 963*

To estimate the activity of soybean lipoxygenase using a small amounts of sample in a short time, a novel optical electronic system as a single photon counting method was tried. One hundred milligrams of powdered soybean were mixed with 1 ml of 0.2 M borate buffer (pH 9.0) containing 1.6 mM of luminol and 22.5 mM of sodium linoleate in a stainless steel tray (d 50 mm, depth 15 mm), and placed in a photon counting oven maintained at 27 °C. The emission curve obtained was presumed to originate in the reaction of lipoxygenase with linoleic acid, because the addition of erucic acid, an inhibitor of lipoxygenase, abolished the emission, which was restored by the addition of lipoxygenase-I preparation. The order of emission intensity among 4 kinds of soybean breed agreed with the result of the determination of conjugated diene content. These results suggest the possibility of applying the photon counting method for the determination of soybean lipoxygenase activity.

(Received Aug. 11, 1986)

大豆、大麦、落花生などに含まれるリポキシゲナーゼがシス、シス1, 4-ペンタジエン構造をもつ不飽和脂肪酸を酸化してヒドロペルオキシドを生じ、これからさらに分解してオフフレーバーを生じ、品質を低下させることは古くから大きな問題となっている。そのためこの酵素の活性を無くしたり弱めたりする研究が多数報告されているが、近年、喜多村らによってリポキシゲナーゼを含まない大豆品種の開発が試みられている¹⁾²⁾。

これまでリポキシゲナーゼ活性測定法として種々の報告があるが³⁾、なかでも共役ジエン生成量を見る方法⁴⁾や β -カロチンの褪色を見る方法⁵⁾などがよく用いられ

ている。しかし、操作性や再現性に問題があると思われ、より簡単かつ微量で測定出来る方法の開発が望まれている。

近年 10^{-15} W というような非常に弱い光量を測定できるケミルミネッセンスアナライザーが開発され、高感度で操作も簡単なことから食品成分その他の極微量分析への応用が期待されている⁶⁾⁷⁾。脂質が酸化する際に化学発光(ケミルミネッセンス: CL)を生じることは著者らの実験によっても確かめられている⁸⁾ので、大豆のCLを測定することにより、大豆に含まれている脂質の酸化程度やリポキシゲナーゼの活性を判断することが期待で

* 尚綱女学院短期大学家政科 (〒 980 仙台市八幡 1-9-15)

** 東北大学農学部食糧化学科 (〒 980 仙台市堤通雨宮町 1-1)

*** 郡山女子大学家政学部 (〒 963 郡山市開成 3-25-2)

きる。BOVERIS ら⁹⁾ もリボキシゲナーゼが不飽和酸を酸化する際に CL を生じ、その発光種の一つが一重項酸素であることを認めており、1980 年には LILIUS と LAAKSO は標品リボキシゲナーゼ活性を CL 測定によって判断可能なことを示した¹⁰⁾。本研究ではこれを大豆に応用し、大豆のリボキシゲナーゼ活性を迅速かつ微量で測定できる方法を確立しようとした。

実 験 方 法

1. 試料および試薬

測定条件の検討にはアメリカ産丸大豆 IOM を用いたが、品種によるリボキシゲナーゼ活性の差異を検討するには 3 種の国産大豆（エンレイ、白鶴の子、茨城）を使用した。酵素標品はシグマ社製のリボキシゲナーゼタイプ I（大豆、 1.5×10^7 単位/125 mg；以下 L-1 と略す）を、ルミノールは東京化成（株）特級試薬を用い、リノール酸はサフラワー油からエステル交換で調製したものを尿素付加法で精製して純度 99% 以上のものを得たのち、SURREY K. の方法¹¹⁾ に準じ、ホウ酸緩衝液（0.2 M, pH 9.0）の中でナトリウム塩としたものを使用した。

2. 大豆の粉碎

約 10 g の大豆を柴田科学製アイカ万能粉碎器で 20 000 回転、1 分間粉碎し試料とした。

3. ケミルミネッセンスの測定

発光量の測定は東北電子産業（株）製ケミルミネッセンスアナライザー OX-7 型を使用し、リボキシゲナーゼの至適温度である 27°C にセットした試料部にステンレスセル（外径 50 mm、高さ 15 mm）を置き、30 秒間当たりの総カウント数を 30 分間にわたり記録した。大豆試料の CL 測定は、大豆粉碎物 0.1 g をステンレスセルにとり、0.0225 M リノール酸/0.2 M ホウ酸緩衝液 1 ml を加えた後アナライザーにセットし、外部からマイクロシンジで $1.6 \mu\text{M}$ のルミノールをホウ酸緩衝液として加えた。

4. 共役ジェン酸含量の測定

品種の異なる国産大豆の活性測定は従来から用いられ

ている共役ジェン酸生成量の測定⁴⁾ によった。

5. リボキシゲナーゼの不活性化

エルカ酸-エタノールによる ORY と ST. ANGELO の方法¹²⁾ を用いて標品リボキシゲナーゼの不活性化を行ったところ、100% の阻害が認められた。そこで上記 2 の大豆粉碎物の反応溶液に 80 mM エルカ酸-エタノール溶液 1 ml を加え、29°C に 5 分間保持したのち CL を測定した。

結果および考察

1. 測定条件の検討

まず大豆のみの CL を測定した。粉碎したもの、丸大豆そのもののほか、ナイフで輪切りにしたもの及びホウ酸緩衝液（0.2 M, pH 9.0）に 3 日間浸漬した大豆をホモジナイズ後吸引ろ過し、遠心分離（17 500 回転、20 分、0°C）の上澄液についても測定比較した。Table 1 に示すように、総体的に発光量は少なかった。ホモジナイズ試料はやや高い発光量を示したが迅速性に問題があった。

発光量および簡便性の点から粉碎するのが適当と考え、粉碎時間による CL 値の変動を測定したところ、5 分、10 分と粉碎時間が長くなるにつれて発光量は増加したが、1 分間粉碎でも十分な発光量が得られたところから粉碎時間は 1 分とした。なお、粉碎した試料を一週間以上放置するとわずかずつではあるが CL が増加したので、測定試料は粉碎後直ちに使用した。

大豆粉碎物 0.1 g そのままを 27°C で測定した CL パターンを Fig. 1 に示した。4 分後に極大ピークを示したが、その発光量は 150 と低く、リボキシゲナーゼ活性の定量性を検討するには無理と思われた。LAAKSO と LILIUS¹³⁾ は標品リボキシゲナーゼの活性測定にルミノールを用いているので、本実験でもルミノールを添加した際の発光増強について検討した。またリボキシゲナーゼはエステルよりも遊離酸とよく反応することが知られているので、リノール酸も基質として添加した。アナライザーで計測が可能な発光量にするためにルミノール量

Table 1 Changes of chemiluminescence generated from soybean seeds by several treatments

	Homogenate*	Powder	Slice	Whole
Emmision intensity**	250	150	21	37

* After soaking in a borate buffer solution (0.2 M, pH 9.0) for 3 days, soybean seeds were homogenized and centrifugated to obtain a supernatant.

** Maximum values in counts per 30 s at 27°C are shown.

Fig. 1 Time-course of chemiluminescence generated from powdered soybean

Fig. 2 Time-course of chemiluminescence generated from powdered soybean in the presence of luminol and linoleic acid

を LAAKSO と LILIUS のその 1/25 量に抑えるなど、種々反応条件を検討した結果、実験方法 3 に記した測定条件を定めた。その測定条件で求めた CL パターンを Fig. 2 に示したが、極大ピークの位置に変化はなく、発光強度は約 500 倍に増強された。なおリノール酸の代わりに大豆油を添加すると、発光量は 1/15 に減少した。

当初、大豆そのまの発光量から情報が得られることを期待したが、基質としてリノール酸、発光増強剤としてルミノールの添加が必要になったことがわかった。

2. リポキシゲナーゼ不活性化剤による発光の消失

Fig. 2 で得られた発光曲線がリポキシゲナーゼの反応によるものかどうかを明らかにするため、まずリポキシゲナーゼの不活性化によって CL がどうなるか検討した。これまで活性阻害剤として、塩化カルシウム¹³⁾、ミルクカゼイン¹³⁾、2, 3-dimercaptoethanol および dithiothreitol¹⁴⁾、2-mercaptoethanol と *o*-phenanthroline¹⁵⁾、システインと *o*-phenanthroline¹²⁾、エルカ酸¹²⁾、タンニン¹⁶⁾、クロロフィル¹⁷⁾、salicylhydroxamic acid¹⁸⁾ などの報告があるが、予備実験として、リ

Fig. 3 Change of chemiluminescence after inactivation of lipoxigenase and followed by reactivation by the addition of lipoxigenase-type I

For inactivation, 1 ml of 80 mM erucic acid-ethanol solution was added and incubated at 29°C for 5 min. Additional level of lipoxigenase-type I preparation was 120 U.

— Inactivated soybean
+ Lipoxigenase type I
..... Inactivated soybean

ノール酸と酵素標品 L-1 に対する上記発光阻害剤による CL の低下を検討した。その結果 33~100% の間で発光量の減少が観察されたが、このうちエルカ酸による不活性化が阻害率、再現性共に優れていることを認めたので、実験方法 5 に記した反応条件での発光量を測定した。その結果を Fig. 3 中の破線で示したが、発光量は著しく減少した。

次にエルカ酸-エタノールで処理した大豆粉砕物に標品 L-1 120 U を加えて CL を測定したところ、Fig. 3 中の実線で示したように、再び 4 分に極大ピークを有する発光曲線が得られた。これらの事実から、大豆粉砕物で観察された発光曲線はリポキシゲナーゼの作用によるものと推察した。

3. 品種の異なる大豆の発光量測定

大豆品種によりリポキシゲナーゼ活性が異なることが予想される。そこでアメリカ産大豆以外に 3 種の国産大豆を用いて実験方法 3 により CL を測定し、発光量に差があるか及びリポキシゲナーゼ活性測定法としてよく用いられている共役ジェン法の測定値との相関の有無を検討した (Fig. 4)。

CL 測定の結果、発光量はアメリカ産大豆が最も高く、エンレイ、白鶴の子、茨城の順となった。一方、共役ジェン法による活性の強さの順序も CL 値と同様になり、両法間にはある程度の相関性のあることがわかった。

Fig. 4 Differences in chemiluminescence among four types of soybean seeds at pH 9.0

Conjugated diene content*

○ American	1.971
□ ENREI	1.905
× HAKUTURU-NO-KO	1.862
△ IBARAKI	1.850

*Absorbance at 234 nm

大豆の脂質含量が CL 値に影響していることが考えられたが、アメリカ産大豆の粗脂肪含量が明らかに高いほかは、エンレイ (15.9%), 白鶴の子 (14.8%), 茨城 (15.1%) 間に大きな差は認められず、またリノール酸含量も順に 63, 50, 66 および 70% の値を示し、CL 値との関係はないように思われた。

リポキシゲナーゼと不飽和脂肪酸との生成物には、共役ヒドロペルオキシドの他に、非共役ヒドロペルオキシド¹⁹⁾、環状ヒドロペルオキシド²⁰⁾、などが生じることが知られており、共役ジエン法がリポキシゲナーゼ活性を正確に反映しているかについては疑念が持たれる。一方、CL 値を測定する本法は、過酸化物生成時に生ずるフリーラジカルがリノール酸化を起こす¹⁰⁾ことを利用しているので、大豆品種によるリポキシゲナーゼ活性の差異を鋭敏に捉え得ると思われる。

Fig. 4 から明らかなように、大豆品種によって発光量曲線はやや異なる。極大ピークでの最大発光量、測定開始から 15 分まで、あるいは 30 分までの総カウント数などの中、どれを CL 値として採用するかによって評価は変わってくるが、実験の結果は 30 分までの総カウント数が最も繰り返し精度が高く、信頼性があると言えた。因みにアメリカ大豆の 30 分までの総カウント数は $191\,800 \pm 1\,350$ (標準偏差) であった。

4. pH 7.0 における発光について

大豆中には L-1 の他にもリポキシゲナーゼ-2 (L-2) や-3 (L-3) も含まれているので、これら L-2, L-3 の

至適 pH である 7.0 で発光曲線がどうなるかを検討した。測定条件は、緩衝液として 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を使用した以外は pH 9.0 の場合と同様である。その結果を Fig. 5 に示したが、極大ピークが pH 9.0 の場合の 4 分から 2.5 分と短時間にシフトし、その発光強度は pH 9.0 の場合の約 2 倍を示した。

喜多村は L-1 の活性は中性付近で低いと述べている¹⁾ので、この発光は L-2 および L-3 の作用によるものと推定された。

次に品種の異なる 4 種の大豆の発光量を pH 7.0 でも測定して比較した (Fig. 6)。その結果、発光量の強さの順序は pH 9.0 の場合と同じで、アメリカ産、エンレイ、白鶴の子、茨城の順を示し、発光強度は Fig. 5 で観察されたのと同様に pH 9.0 のその約 2 倍を示した。

Fig. 5 Influence of pH on emission intensity

— pH 7.0
..... pH 9.0

Fig. 6 Differences in chemiluminescence among four types of soybean seeds at pH 7.0

○ American
□ ENREI
× HAKUTURU-NO-KO
△ IBARAKI

この pH 7.0 での CL に L-1 の関与は少ないと考えられるが、この pH 7.0 での CL 曲線が L-2 あるいは L-3 によるものであるという明確な確認は行っていない。

発光量が多いことから、リポキシゲナーゼの活性測定条件として一見 pH 7.0 の方が適当なように見えるが、pH 7.0 での測定値はバラツキが大きく再現性に問題があると考えられた。

以上、0.1 g の大豆粉砕物にリノール酸、ルミノールを含む緩衝液を加えた際に生じる CL を測定することにより大豆中に多く存在する L-1 の活性を相対的に捉えることができることを明らかにしたが、本方法を定量法として確立するためにはいくつか克服しなければならない課題が残されている。すなわち、得られた CL にはリポキシゲナーゼの作用によるものの他に、わずかなではあるが、脂質酸化生成物による CL も含まれていると考えられる。この量は、リポキシゲナーゼを不活性化した際の CL を測定することによって求められ、その値を不活性化前の値から差し引けば真のリポキシゲナーゼによる発光量が求められるが、その為には確実な不活性化条件の確立が必要である。また pH 9.0 では L-2 および L-3 は活性を示さないと言われているので、pH 9.0 での CL は L-1 だけによるものと考えられるが、L-1 と他の L-2、L-3 の量的バランスによって、pH 9.0 での CL に変動はないのかという疑問がある。今後、酵素標品を使った詳しい検討を通して、簡便かつ鋭敏な本測定法を定量性の確実なものとし、さらに L-1、L-2、L-3 の個別定量法を確立したいと考えている。

要 約

単一光子計数法を用いた高感度なケミルミネッセンスアナライザーを用いて大豆リポキシゲナーゼ活性を少量かつ短時間で測定せんとした。

(1) 大豆粉末 0.1 g をステンレスシャーレに入れ、1.6 mM のルミノールと 22.5 mM のリノール酸ナトリウムを含む 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 1 ml を加えて発光量を測定した。

(2) 得られた発光曲線は、リポキシゲナーゼの活性阻害剤であるエルカ酸を添加すると消失し、酵素製剤を加えると回復することから、大豆中のリポキシゲナーゼ-1 とリノール酸の反応によるものと推定された。

(3) 4 品種の大豆の発光強度を測定したところ、その強さはリポキシゲナーゼ活性測定法の一つである共役ジ

エン酸含量の定量結果とある程度相関した。

以上の結果から、大豆リポキシゲナーゼ活性の判定に光子計数法の適用が可能であることがわかった。

本研究の概要は日本食品工業学会第 33 回大会 (昭和 61 年 4 月 20 日、東京) で発表した。

文 献

- 1) 喜多村啓介：日食工誌，31，751 (1984)。
- 2) 喜多村啓介：日農化誌，59，1071 (1985)。
- 3) GROSSMAN, S. and ZAKUT, R.: *Methods of Biochem. Anal.*, 25, 303 (1979)。
- 4) AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M. and LAAKSO, S.: *Methods in Enzymol.*, 71, 441 (1981)。
- 5) GROSSMAN, S. and ZAKUT, R.: *Methods of Biochem. Anal.*, 25, 318 (1979)。
- 6) 薄木理一郎：化学と生物，19，400 (1981)。
- 7) 薄木理一郎・宮沢陽夫：防菌防黴，11，475 (1983)。
- 8) USUKI, R., KANEDA, T., YAMAGISHI, A., TAKYU, C. and INABA, H.: *J. Food Sci.*, 44, 1573 (1979)。
- 9) BOVERIS, A., CADENAS, E. and CHANCE, B.: *Photobiochem. Photophys.*, 1, 175 (1980)。
- 10) LILIUS, E.-M. and LAAKSO, S.: *Anal. Biochem.*, 119, 135 (1982)。
- 11) SURREY, K.: *Plant Physiol.*, 39, 65 (1964)。
- 12) ORY, R.L., and ST. ANGELO, A.J.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 30 A (1975)。
- 13) LAAKSO, S., and LILIUS, E.M.: *J. Agric. Food Chem.*, 30, 913 (1982)。
- 14) ANGELO, A.J., and ORY, R.L. "Symposium : Seed Proteins", Inglett, G.E., ed., AVI Pub. Co., Westport, CT, 1972, p. 284。
- 15) ROZA, M. and FRANCKE, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 327, 24 (1973)。
- 16) PISTORIUS, E.K. and AXELROD, B.: *J. Biol. Chem.*, 249, 3183 (1974)。
- 17) COHEN, B. -S., GROSSMAN, S., PINSKY, A. and KLEIN, B.P.: *J. Agric. Food Chem.*, 32, 516 (1984)。
- 18) PARRISH, D.J. and LEOPOLD, A.C.: *Plant Physiol.* 62, 470 (1978)。
- 19) HASLBECK, F., GROSCH, W., and FURL, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 750, 185 (1983)。
- 20) ROZA, M. and FRANCKE, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 528, 119 (1978)。

(昭和 61 年 8 月 11 日受理)