

エタノールと加熱の併用が大豆粉のリポキシゲナーゼ活性と 褐変度に及ぼす影響

松本 雄宇*¹、藤井 駿吾*²、角田 光淳*³

Effect of combined ethanol and heat treatment on lipoxygenase activity and browning in soybean flour.

Yu MATSUMOTO*¹、Shungo FUJII*²、Kojun TSUNODA*³

Abstract

We examined how a combination of ethanol and heat treatment affects lipoxygenase-1 and lipoxygenase-2 activities and browning index in soybean flour. Lipoxygenase-1 and lipoxygenase-2 activities in soybean flour did not decrease during heating at 120 °C for 10 min with not ethanol. However, lipoxygenase activities and the level of n-hexanal decreased with increasing ethanol concentration under the combinational effects of ethanol and heat treatment. The composition of the soluble protein fraction in soybean flour was analyzed using sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. A band corresponding to lipoxygenase was observed in the all samples, and the intensity of this band decreased with increasing ethanol concentrations under heating. The decrease in lipoxygenase activity might be caused by the insolubilization of lipoxygenase, owing to the denaturation of proteins under heating. Color index and browning index in soybean flour changed with heat treatment. However, browning index in soybean flour was no difference between difference ethanol concentrations under the heat treatment. In conclusion, the proposed method is capable of decreasing the lipoxygenase activities and inhibiting browning of soybean flour.

Key words : Soybean flour, Lipoxygenase activity, Browning

大豆粉, リポキシゲナーゼ活性, 褐変

I. 緒言

大豆には様々な栄養素や生理活性物質が含まれている。これらの成分は、肥満、骨粗しょう

症、がんなどの疾病リスクを低減する可能性が示されている [1-3]。したがって、日々の健康維持増進のために、食事における大豆のさらな

*¹人間健康学部 健康栄養学科

*²北海道文教大学 人間科学部 健康栄養学科

*³関東学院大学 材料・表面工学研究所

る消費が望まれる。伝統的に、大豆は豆腐や納豆などに加工して食されてきたが、最近では大豆粉を用いた新たな加工食品も広まりつつある。大豆粉は他の食材と混ぜるだけで様々な加工食品を作ることができるため、大豆粉の活用により大豆の消費拡大が期待できる。

しかし、大豆粉には抗栄養因子や特有の青臭みが存在するため、加工食品への利用が制限されている。抗栄養因子として知られるトリプシンインヒビターは、摂取により膵臓の肥大や過形成を引き起こすことが報告されており、その安全性が懸念されている。また、大豆特有の青臭みは、国内外を問わず大豆食への抵抗の一因となっている。この青臭みは、大豆子実中に含まれるリポキシゲナーゼ (LOX) の作用に基づいて発生する。LOX は、不飽和脂肪酸を酸化する酵素である [4]。大豆には3つの異なるアイソザイム (LOX-1、-2、-3) が存在しており、特に、LOX-2は青臭みの主成分である n-ヘキサナールの生成に深く関わっている [5]。さらに、LOX は酸化反応中にビタミンやカロテノイドなども一緒に酸化する性質があるため、大豆加工時の栄養損失にも関わっている [6]。

トリプシンインヒビターや LOX の活性を低減する有効な手段として、一般的に加熱処理が用いられる。Osman ら [7] は、121 °C、60分の加熱処理で、大豆に含まれるトリプシンインヒビターの活性が低減することを報告している。また Zhu ら [8] は、107 °C、30分のエクストルーダー処理によって、LOX の活性が低減することを報告している。しかし、加熱による大豆粉の褐変も、加工食品への利用を限定する原因となりうる。例えば、小麦粉や牛乳といった白色の食品に褐変した大豆粉を混ぜて加工すると、本来の色が失われ大豆粉の褐変を反映した色合いとなる。したがって、様々な加工食品への利用を考えると、褐変を抑えた大豆粉も価値があ

ると言える。

大豆粉の褐変を抑制しつつ LOX 活性を低減する方法として、我々は過去に報告したエタノールと加熱の併用処理法 [9] が有用であると考えた。この報告 [9] では、エタノールと加熱を併用して処理することで、大豆粉中の抗栄養因子の活性を低減できることを示した。しかしながら、本法が大豆粉の LOX 活性と褐変度に及ぼす影響は検討していない。LOX の耐熱性は抗栄養因子よりも低いいため、本法であれば大豆粉の LOX 活性も低減できると考えられる。さらに、大豆粉を密閉した状態で加熱するため、褐変反応の抑制も期待できる。

本研究では、エタノールと加熱の併用処理が、大豆粉の LOX 活性および褐変度に及ぼす影響を検討した。今回は、加熱温度を120°Cで一定とし、エタノール濃度の違いによる影響を評価した。また、本法を用いた加熱大豆粉の工業生産を視野に入れ、大豆粉を耐圧缶に少量入れた後処理するという既報の方法 [9] から、耐圧袋に多量の大豆粉を入れ密閉した後に処理するという方法に変更し検討した。

II. 方法

(1) 材料

大豆粉 (粒径中央値: 21.075 μm) は、ミナミ産業株式会社から提供されたものを用いた。

(2) 試料作製

大豆粉を耐圧袋に入れた後、99.5%エタノールを加えて密封した。エタノールは大豆粉の重量を基準にして2、5、7%の量を添加した。また、エタノール無処理のもの (0%) も作製した。これらの袋をアルミ容器に収容して密閉し、オートクレーブ (ES-315、トミー精工) を用いて120°Cで10分間加熱したものを試料とした。試料は、各エタノール濃度で3つずつ作製

した。

(3) LOX 活性測定

Suda ら [10] の方法を改変して LOX 活性を測定した。50 mg の試料を 0.5 mL の水に加えた後室温で 10 分間静置した。この混合物に 2 mL の検出液 1 (200 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0)、100 μ M メチレンブルー、10 mM リノール酸) を加え、35°C で 30 分間反応させた後、溶液の吸光度 (660 nm) を測定することで LOX-1 活性を評価した。LOX-2 活性の測定には、検出液 2 (0.1 mM ジチオスレイトール、200 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)、100 μ M メチレンブルー、10 mM リノール酸) を用いた。

(4) n-ヘキサナール分析

試料中の n-ヘキサナール量の測定は (一財) 食品分析開発センター SUNATEC に依頼した。分析は、各エタノール濃度の 3 つの試料のうち 1 つの試料のみ依頼した。分析はヘッドスペース-ガスクロマトグラフ-質量分析計にて行われた。なお、検出限界は 1 ppm 未満であった。

(5) ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分析

大豆粉末からの可溶性画分の抽出は、Mizutani らの方法 [11] を改変して行った。各試料 1.0 g に 40 mL の精製水を加え 1 時間抽出した。その際、20 分ごとに激しく攪拌した。抽出液を遠心分離 (7,000 rpm、5 分) し、得られた上清を可溶性画分とした。各試料の可溶性画分をタンパク質量が一定となるように調整した後、2-メルカプトエタノール (2-ME) を含むサンプルバッファーを加え電気泳動用試料とした。調製した試料を、ゲル濃度 10% のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 分析に供した。泳動後のゲルは Coomassie

Brilliant Blue 染色液 (EzStain AQUA、アトー) で染色した。大豆に含まれる LOX の分子量は 94-97 kDa であるため、94-97 kDa 付近のバンド強度を各試料間で比較した。

(6) 色差および褐変度の測定

L*、a*、b* 値は、カラーアナライザー色差計 (TES-135A plus、サトー) を用いて測定した。色の変化 (ΔE 値) は、 ΔE 値 = $[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ の式で算出した。L*、 Δa^* 、 Δb^* は、生の大豆粉の値を各試料の値から差し引くことで求めた。褐変度は、次式を用いて算出した。褐変度 = $[100(x - 0.31)] / 0.17$ 、 $x = (a^* + 1.75 L^*) / (5.645 L^* + a^* - 0.3012 b^*)$

(7) データ解析

データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表した。グループ間の差は、Tukey 検定により評価した。p < 0.05 の場合、有意差があると判断した。

III. 結果と考察

(1) エタノールと加熱の併用が LOX-1 および LOX-2 活性に及ぼす影響

大豆の LOX 活性は、加熱処理によって低減することが報告されている [12, 13]。また、我々はエタノールを処理せずとも、120°C、10 分間の加熱により大豆粉中の抗栄養因子活性が低減することを報告している [9]。LOX は抗栄養因子よりも易熱性の酵素であるため、エタノールを処理せずとも 120°C、10 分間の加熱によって LOX 活性は低減すると予想したが、予想に反して 0% 群の LOX-1 および LOX-2 活性に変化はなかった (図 1)。これは、先行研究に比べ、本研究で処理した大豆粉の量が多かったことが理由の 1 つとして考えられる。多量の大豆粉は、粉末内に空気を保持するため不良導体となりう

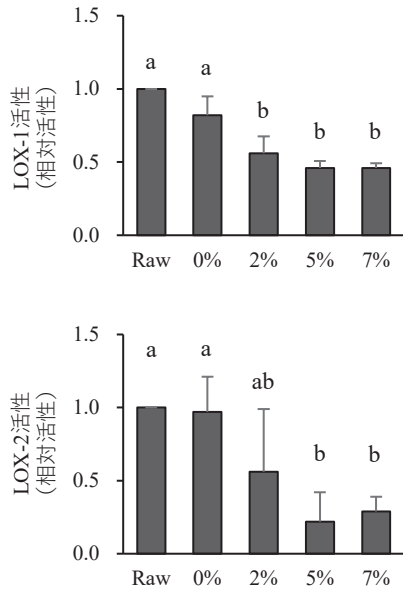


図1：エタノールと加熱の併用が大豆粉のLOX活性に及ぼす影響
 平均値±SD, n=3, p<0.05, 異符号間に有意差あり

る。したがって、粉末内部まで熱が伝わりづらくなり、LOX活性が低減するほど加熱できなかった可能性がある。

一方、エタノールを添加して加熱した試料(2%、5%および7%群)では、加熱時のエタノール濃度の増加に伴ってLOX-1およびLOX-2活性が低減していた(図1)。大豆粉の量が多くとともに、エタノールを添加するとLOX活性が低減した理由として、加熱によって気化したエタノール蒸気が大豆粉を内部から加熱したためと考えられる。先行研究[9]では、処理温度や処理時間を下げても、エタノールの添加濃度を高めれば大豆粉の抗栄養因子活性を低減できることが示されている。したがって、さらに低温かつ短時間でもLOX活性を低減できる可能性がある。

処理温度と処理時間を下げる利点の1つは、加熱による栄養素の破壊を抑えられることである。Kilshawら[14]の報告では、121℃、20

分のオートクレーブ処理により、脱脂粉乳に含まれるビタミンB₁量が60%減少していたが、100℃、30分のスチーム処理では25%しか減少していなかった。大豆が持つ一次機能(栄養機能)を維持するためにも、処理温度と処理時間は今後検討する必要がある。

また、本研究における加熱処理方法は、先に報告した手法[9]を改変して行っている。したがって、本法が大豆粉の抗栄養因子活性に及ぼす影響も検討課題となる。

(2) エタノールと加熱の併用がn-ヘキサナール量に及ぼす影響

エタノール無処理で加熱した大豆粉(0%群)のn-ヘキサナール量は、生大豆粉(Raw群)に比べてわずかに減少した(Raw群:17、0%群:12)。エタノール処理では、加熱時のエタノール濃度が高くなるにつれてn-ヘキサナール量が低下し、5%および7%のエタノール処理を行った大豆粉ではn-ヘキサナールが検出されなかった(2%群:6、5%群および7%群:Not Detected)。この結果から、本法が大豆粉の青臭み低減に効果的であることが示唆された。一方、本研究におけるn-ヘキサナールの検出限界は1ppm未満であるため、本法がn-ヘキサナールを嗅覚閾値である0.35ppm以下[15]まで低下させたかどうかは不明である。この点については、官能評価によって明らかになると思われる。

(3) エタノールと加熱の併用が大豆粉中の可溶性画分の組成に及ぼす影響

大豆粉から抽出した可溶性画分のタンパク質組成をSDS-PAGEにより分析した(図2)。すべての試料の可溶性画分でLOXのバンドが観察されたが、加熱時のエタノール濃度の増加に伴いバンドの強度は低下した。Mizutaniら[11]

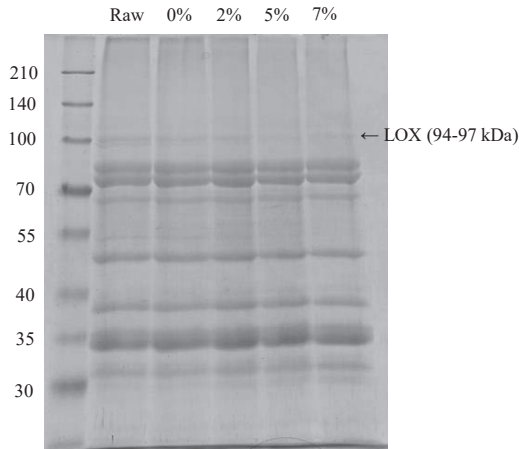


図2：エタノールと加熱の併用が大豆粉のタンパク質組成に及ぼす影響

は、大豆子実中の LOX は加熱処理によって不溶化することを示唆している。したがって、本法による LOX 活性の低下(図1)は、加熱によって LOX が変性し、不溶化したことに起因するものと考えられる。

(4) エタノールと加熱の併用が大豆粉の色差および褐変度に及ぼす影響

L* 値およびΔE 値は、Raw 群よりも 0% 群で高かった。さらに、加熱時のエタノール濃度の増加に伴い、L* 値とΔE 値は上昇していた(表1)。一方、a* 値と b* 値は、Raw 群よりも 0% 群で高かったが、加熱時のエタノール濃

度の違いによる差はなかった(表1)。色差値から算出した褐変度は、Raw 群よりも 0% 群で高かった。しかし、加熱時のエタノール濃度の違いによる差は認められなかった(図3)。以上の結果から、エタノール濃度の違いは加熱による褐変に大きくは影響しないものと考えられる。

さらに、各試料を肉眼で観察したところ、加熱処理した試料間で顕著な色調変化は認められなかった(図3)。したがって、本法は加熱による褐変を最小限に抑えることができると考えられる。加熱による大豆粉の褐変には、糖とアミノ酸の非酵素的な反応であるアミノカルボニル反応が関わっている。本法は大豆粉を袋に入

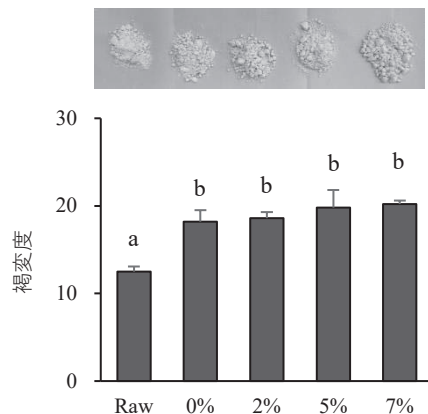


図3：エタノールと加熱の併用が大豆粉の褐変度に及ぼす影響

平均値 ± SD, n = 3, p < 0.05, 異符号間に有意差あり

表1 エタノールと加熱の併用が大豆粉の色差に及ぼす影響

	エタノール濃度				
	Raw	0%	2%	5%	7%
L*	97.5 ± 1.5 ^a	95.0 ± 1.2 ^{ab}	95.1 ± 0.8 ^{ab}	94.6 ± 1.0 ^b	93.2 ± 0.5 ^b
a*	1.8 ± 0.4 ^a	3.3 ± 0.4 ^b	3.2 ± 0.2 ^b	3.0 ± 0.6 ^b	3.0 ± 0.1 ^b
b*	10.6 ± 0.2 ^a	14.1 ± 0.6 ^b	14.5 ± 0.4 ^b	15.4 ± 1.1 ^b	15.5 ± 0.2 ^b
ΔE	- ^a	4.7 ± 0.6 ^b	4.9 ± 0.4 ^b	5.8 ± 0.8 ^{bc}	6.8 ± 0.9 ^c

平均値 ± SD, n = 3, p < 0.05, 異符号間に有意差あり

れ、空気を抜き密閉した状態で加熱しているため、この反応の促進因子の一つである酸素が少なく、反応の進行が抑えられたものと考えられる。

本法は加熱による大豆粉の褐変を抑制できるという利点があるが、その一方でいくつかの欠点も考えられる。アミノカルボニル反応によって生成される褐変色素メラノイジンは、油脂に対して抗酸化作用を示すことが報告されている[16]。また、加熱した大豆からは様々な香気成分が同定されるが、これらもアミノカルボニル反応によって生成される。したがって、本法で処理した大豆粉は、1)十分に焙煎した大豆粉よりも酸化しやすく保存性に劣る、2)加熱大豆特有の香ばしさが少なく嗜好性に劣る。という可能性がある。

IV. 結論

本研究の結果から、本法は大豆粉に含まれるLOX活性を低下でき、かつ加熱による褐変への影響は小さいことが明らかとなった。

V. 要約

本研究では、エタノールと加熱の併用処理が、大豆粉のLOX活性および褐変度に及ぼす影響を検討した。

1) 加熱時のエタノール濃度の増加に伴い、LOX-1およびLOX-2活性は低下した。一方、エタノールを添加せずに加熱すると、LOX活性は低下できなかった。

2) 加熱時のエタノール濃度の増加に伴いn-ヘキサナル量も低下した。また、5%と7%のエタノール処理ではn-ヘキサナル量が検出されなかった。

3) 大豆粉から抽出した可溶性画分のタンパク質組成をSDS-PAGEにより分析したところ、加熱時のエタノール濃度の増加に伴いLOXの

バンド強度は低下した。したがって、本法によるLOX活性の低下は、LOXが変性し不溶性化したことに起因するものと考えられる。

4) 大豆粉の色差値(L*, a*, b*)およびΔE値は、加熱時のエタノール濃度の増加に伴い有意に変化した。褐変度は、加熱時のエタノール濃度の違いによる差は認められなかった。また、各試料の色調を肉眼で比較したところ、顕著な違いは認められなかった。したがって、本法は加熱による褐変を最小限に抑えることができると考えられる。

本研究の結果から、本法は大豆粉に含まれるLOX活性を低下でき、かつ加熱による褐変への影響は小さいことが明らかとなった。

VI. 利益相反

相当する事項はない。

VII. 参考文献

1. Velasquez MT, and Bhatena SJ. (2007) Role of dietary soy protein in obesity. *Int. J. Med. Sci.* **26**, 72-82.
2. Taku K *et al.* (2011) Soy isoflavones for osteoporosis : an evidence-based approach. *Maturitas.* **70**, 333-338.
3. Sahin I *et al.* (2019) Soy Isoflavones in Integrative Oncology : Increased Efficacy and Decreased Toxicity of Cancer Therapy. *Integr. Cancer. Ther.* **18**, 1534735419835310.
4. Rackis JJ *et al.* (1979) Flavor problems of vegetable food proteins. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **56**, 262-271.
5. Matoba T *et al.* (1985) Lipoxygenase- 2 isozyme is responsible for generation of n-hexanal in soybean homogenate. *J. Agric. Food Chem.* **33**, 852-855

6. 西場洋一 他 (1999) リポキシゲナーゼ欠失大豆による大豆水系混和時の栄養的損失の改善. 九州農業研究. **61**, 31.
7. Osman MA *et al.* (2002). Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors : Effect of acidic and basic pH. *Food Chem.* **78**, 419-423.
8. Zhu S *et al.* (1996) Effect of different extrusion temperatures and moisture content on lipoxygenase inactivation and protein solubility in soybeans. *J Agric Food Chem.* **44**, 3315-3318.
9. 松本雄宇 他 (2019) エタノールおよび加熱による大豆ウレアーゼ活性の新規低減法. 日本食品科学工学会誌. **66**, 427-431.
10. Suda I *et al.* (1995) Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozyme in soybean seeds. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 742-747.
11. Mizutani Y *et al.* (2019) Effects of heat treatment under low moisture conditions on the protein and oil in soybean seeds. *Food Chem.* **1**, 577-584.
12. Baker E.C and Mustakas G.C (1973) Heat inactivation of trypsin inhibitor, lipoxygenase and urease in soybeans : Effect of acid and base additives. *J Am Oil Chem Soc.* **50**, 137-141.
13. Zhu S *et al.* (1996) Effect of different extrusion temperatures and moisture content on lipoxygenase inactivation and protein solubility in soybeans. *J. Agric. Food. Chem.* **44**, 3315-3318.
14. Kilshaw P.J *et al.* (1982) Effects of heat treatment of cow's milk and whey on the nutritional quality and antigenic properties. *Arch Dis Child.* **57**, 842-847.
15. Rackis J.J *et al.* (1979) Flavor problems of vegetable food proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **56**, 262-271.
16. 成瀬宇平 他 (1995). 食品中の褐変物質の脂質に対する抗酸化性. 栄養学雑誌. **53**, 71-81.