

毛豆生長期間脂氧化酵素 含量變化及品種間差異的探討¹⁾

區少梅²⁾ 許祥純²⁾ 江國賓²⁾

摘要：以綠光、205及 AGS 292三種毛豆品種為試材，探討其脂氧化酵素在不同之生長期間的變化以及品種間差異的情形。並對脂氧化酵素進行初步的純化工作。

以 205 品種成熟期的毛豆為原料從中萃取脂氧化酵素並加以純化，結果顯示毛豆中至少含有二種脂氧化酵素之異構酵素，其最適作用之酸鹼度分別在 pH 7 及 9。

脂氧化酵素含量隨植株之生長而漸增。上升幅度以綠光為最高，205 次之而 AGS 292 最低。在成熟期綠光之脂氧化酵素含量最高，分別為 AGS 292 和 205 之 3.04 倍和 2.42 倍。

綜合以上結果，就減低脂氧化酵素之影響而言，AGS 292 和 205 兩毛豆品種於成熟期採收，應較綠光品種適合冷凍加工。

一、前 言

毛豆 (*Glycine max* Merr.) (Young Soybeans) 為蝶形花科 (Papilionaceae) 大豆屬的一年生草本植物，即從大豆品種中，選擇適合蔬菜用的，育成專供摘取豆莢，剝取豆仁之食用品種。毛豆營養豐富，含蛋白質達 40%，且其中離氨酸和色氨酸含量比例和肉類蛋白質同樣好，因此德國學者特美稱其為「植物肉」。目前毛豆不僅可製成冷凍蔬菜及罐頭外銷，夏季蔬菜缺乏時，更是一重要蔬菜來源，實為一極具發展潛力之園藝作物⁽¹⁾。

脂肪氧化對於未殺菁或殺菁不足之冷凍蔬菜，貯藏期間的品質劣變，是一非常嚴重的問題^(3,6,7,8,10)。對於食品至少有三種不良影響：1. 破壞食品必需的脂肪酸。2. 游離根破壞其它成分，如：蛋白質、維他命。3. 產生不良氣味⁽¹⁵⁾。造成脂肪氧化

之因子眾多，例如：光線、氧氣、水分含量、微生物及酵素的作用。其中脂氧化酵素 (lipoxygenase) 為最主要引起因子，但可能亦有其它酵素參與作用⁽⁶⁾。

脂氧化酵素廣泛存於植物組織中，但因植物種類及品種之不一樣會有不同的活性差異，豆類植物為一豐富來源，大豆尤為含量最豐的植物^(2,13,15)。脂氧化酵素主要作用於含有 cis-cis-1,4-pentadiene 之不飽和脂肪酸，在植物組織中主要受質為亞麻仁油酸 (linoleic acid 18:2) 和次亞麻仁油酸 (linoleic acid 18:3)，形成過氧化物，進一步分解成小分子的醛、酮、酸，引起不良氣味之產生，使組織產生劣變^(6,13,14,15)。

毛豆為臺灣一種具有高經濟價值的重要蔬菜，也是一種富含脂肪的東方食品，但有關毛豆的研究報告極少，資料缺乏。本實驗即以毛豆為材料，初步探討生長期間，種仁脂氧化酵素含量變化情形，以及

1) 本研究報告承行政院農業委員會補助經費 (75 農建 - 7.1 - 標 - 122(6))。

2) 國立中興大學食品科學系副教授及研究生。

各品種間是否有所差異，以期找出一適宜的毛豆品種和採收時間，減低加工後可能產生品質劣變的機會。

二、材料與方法

(一)毛豆品種

三個毛豆品種：

1. 綠光 (Ryokkoh)
2. 205 (Tzu zu no ku)
3. AGS 292

其中綠光、205為商業品種，AGS 292則為臺南縣善化鎮亞洲蔬菜研究發展中心 (AVRDC) 研究中尚未推廣之一優良品種。

(二)毛豆之種植及採樣

本實驗中所有毛豆材料均在亞蔬中心種植，為一產量試驗中之三個品系，於民國 75 年 (1986 年) 2 月 27 日播種，播種前所有種子均先以 50% 蓋普丹可濕性粉劑消毒。

為顧及毛豆採收利用之經濟效益，於種仁發育至直接可由豆莢外觸摸得知時，開始採樣，至毛豆成熟為止，共分三期採收，分別於 4 月 28 日、5 月 8 日和 5 月 19 日到亞蔬採樣，平均每期間隔 10~11 天，每次均以冰筒將毛豆帶回實驗室分析脂氧化酵素含量變化狀況。並將每一樣品逢機取十粒毛豆，以測微器 (micrometer) 測量種仁之長度、寬度及厚度，以得知各時期毛豆生長發育之情形。

(三)脂氧化酵素之抽取

由豆莢中剝取豆仁，稱重後將其冷凍至 -20°C ，然後和 -20°C 之丙酮溶液 (約 1:2 w/v) 一起放入高速攪碎機 (Warning blender) 中攪碎，抽氣過濾，去除丙酮溶

液，形成丙酮粉末 (Acetone powder)。將粉末溶解於含有 5% NaCl 之 0.2 M pH 7.0 磷酸鈉 (NaH_2PO_4) 緩衝溶液，攪拌一小時後，放入超高速冷凍離心機 (Himac centrifuge, Hitachi Co.)，以 $17,300 \times g$ 的速度離心 20 分鐘，沈澱棄置，上清液留下，即為粗酵素 (Crude enzyme)。以上所有步驟，均在 4°C 之溫度下進行。

(四)脂氧化酵素活性之測定

主要以 Surrey (1964) 提出之測定方法為依據。利用分光光度計 (Spectrophotometer 220 S, Hitachi Co.) 於 234 nm 測定吸光值變化情形。

受質的配製則是將 $157.2 \mu\text{l}$ 純亞麻仁油酸 (Sigma Chemical Co.)， $157.2 \mu\text{l}$ Tween-20 (日本林純藥工業株式會社) 和 10ml 蒸餾水均勻混合，以 1.0ml 0.1 N NaOH 使其澄清，加入蒸餾水定量至 50ml ，成為受質原液 (substrate stock)。分析前，再分別以 0.2 M 磷酸鈉緩衝溶液 pH 7.0 或 0.2 M Tris 緩衝溶液 pH 9.0 稀釋五倍後，充氧二分鐘並靜置室溫下十分鐘，即可使用。

(五)脂氧化酵素的純化

取粗酵素液，加入硫酸銨成 25% 飽和溶液，攪拌一小時，離心取上層液，再加入硫酸銨成 50% 飽和溶液，攪拌一小時，離心取下層沈澱物，以 0.005 M 磷酸鈉緩衝液 pH 7.4 透析 24 小時，取出透析液，離心，取上層液加入 DEAE-cellulose 離子交換樹脂管柱，以相同的緩衝液沖洗，於 280 nm 測其蛋白質沖洗液之吸光值，等吸光值升高再降回基線後，用 0~0.5 M 之 NaCl 0.005 M 磷酸鈉緩衝液沖洗。跑完 DEAE-cellulose 管柱，分別於 280 nm 測蛋白質吸光及於 pH 7 和 pH 9 之條件下測酵素活性，並分別收集在 pH 7 和 pH 9 具

有酵素活性的部份，加入硫酸銨 (50 ~ 90 %), 離心取沈澱物，溶入 0.005 M 磷酸鈉緩衝液 pH 7.2 (含 0.03 M NaCl), 加入 Sepharose 6 B-100 膠分離管柱，測 O.D. 280 及酵素活性，收集具有活性之酵素液，用去離子水透析 24 小時，取出進行冷凍乾燥即得酵素粉末。

三、結果與討論

(一) 各生長期毛豆大小之測定

將毛豆樣品分為三個生長期：

第一期：於豆莢外剛可觸摸到種子。

第二期：介於第一期和成熟期之間。

第三期：成熟期。

三個毛豆品種，不論在種仁的長度、寬度或厚度上，均隨生長而有漸增的趨勢。(表一)

(二) 同一品種不同生長期脂氧化酵素含量變

化情形

三個品種的脂氧化酵素含量均隨生長而漸增，且未成熟毛豆之脂氧化酵素活性均顯著性低於成熟之毛豆，此結果和 Rackis et. al. (1972), Yao & Wei (1983) 作出的報告相似。

以每克樣品所含脂氧化酵素之總活性為依據，各個品種生長期間脂氧化酵素含量變化分別為：(圖一)

1. 205 由第一期的 27.09 O.D./min/g, 第二期的 248.15 O.D./min/g, 增加到第三期的 466.84 O.D./min/g。

2. 綠光由第一期的 56.09 O.D./min/g, 第二期的 117.65 O.D./min/g, 突增到第三期的 1128.43 O.D./min/g。

3. AGS 292 由第一期的 41.23 O.D./min/g, 第二期的 134 O.D./min/g, 上升到第三期的 371.07 O.D./min/g。

再相互比較三品種脂氧化酵素上升的

表 一、 各生長期毛豆大小測定結果

Table 1. The size of young soybean in various growth stage.

| Cultivar & Growth Stage | Length (cm) | Width (cm) | Thickness (cm) | |
|-------------------------|-------------|------------|----------------|-------|
| Ryokkoh | Stage 1 | 1.208 | 0.852 | 0.463 |
| | Stage 2 | 1.361 | 0.960 | 0.619 |
| | Stage 3 | 1.542 | 1.069 | 0.766 |
| AGS292 | Stage 1 | 1.137 | 0.791 | 0.463 |
| | Stage 2 | 1.285 | 0.884 | 0.684 |
| | Stage 3 | 1.548 | 1.070 | 0.905 |
| 205 | Stage 1 | 1.118 | 0.752 | 0.409 |
| | Stage 2 | 1.369 | 0.950 | 0.610 |
| | Stage 3 | 1.512 | 1.011 | 0.717 |

表 二、 各個生長期不同品種間酵素變化情形
 Table 2. The activity of lipoxygenase in each growth stage of various cultivars.

| Cultivars | Growth stage | | |
|-----------|--------------|---|---------|
| | Stage 1 | Stage 2 Activity (Δ Abs/ml/g) | Stage 3 |
| Ryokkoh | 56.09 | 117.65 | 1128.43 |
| AGS292 | 41.23 | 134.00 | 371.07 |
| 205 | 27.09 | 248.15 | 466.84 |

幅度，發現綠光增加最多，205次之，AGS 292 上升之幅度最小。

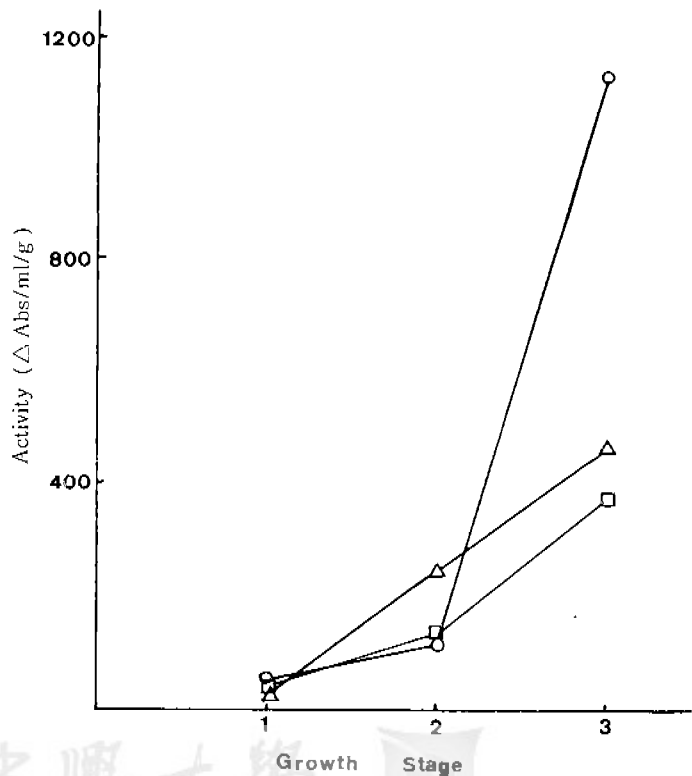
(三)不同品種同一生長期脂氧化酵素含量變化情形

三個品種脂氧化酵素含量，於各生長期互有消長。同樣以每克樣品所含脂氧化酵素之總活性為依據，可得知如下結果：(表二)

1. 第一期：綠光脂氧化酵素含量最高，約為 56.09 O.D./min/g，AGS 292 居中 41.23 O.D./min/g，205 最少 27.09 O.D./min/g。

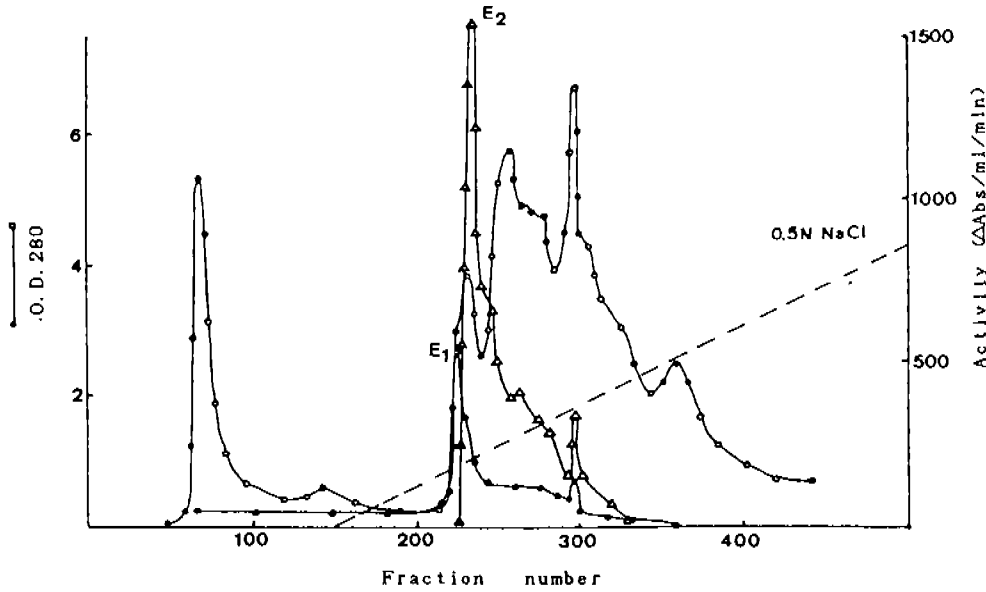
2. 第二期：205 脂氧化酵素含量最高；248.15 O.D./min/g，AGS 292 和綠光相差不多，分別為 134.00 O.D./min/g 和 117.65 O.D./min/g。

3. 第三期：綠光脂氧化酵素含量激增至 1128.43 O.D./min/g，為三品種之冠，各為 205 及 AGS 292 之 2.42 及



圖一、各品種生長期間脂氧化酵素含量變化情形
 Fig. 1. The activity of lipoxygenase in each cultivar of various growth stage.

○—○ Ryokkoh Δ—Δ 205 □—□ AGS292



圖二、以 DEAE-cellulose 管柱純化毛豆之脂氧化酵素
 Fig. 2 DEAE-cellulose chromatography of lipoxygenase from young soybeans.

3.04 倍，205 次之；466.84 O.D./min/g，AGS 292 最少，僅 371.07 O.D./min/g。

由於本實驗的目的除了欲選擇一適合加工的毛豆品種外，亦需找出一適當的採收時期，以獲得最佳之經濟效益。因此根據本研究結果顯示，選擇脂氧化酵素含量少的毛豆品種，於成熟期採收，是最佳之組合。AGS 292 為脂氧化酵素含量最少的品種，205 則稍高，但相差不大，所以 AGS 292 和 205 二個毛豆品種，於成熟期採收，不但能適於加工，減少劣變機會之外，尚能獲得最佳之經濟利益。

往後的實驗，當可朝向選取更成熟的豆仁，做較後的生長期分析，探討毛豆長成黃豆之生長期間脂氧化酵素含量變化情形，以對毛豆生長期間脂氧化酵素含量變化情形，有一全盤且深入之了解。

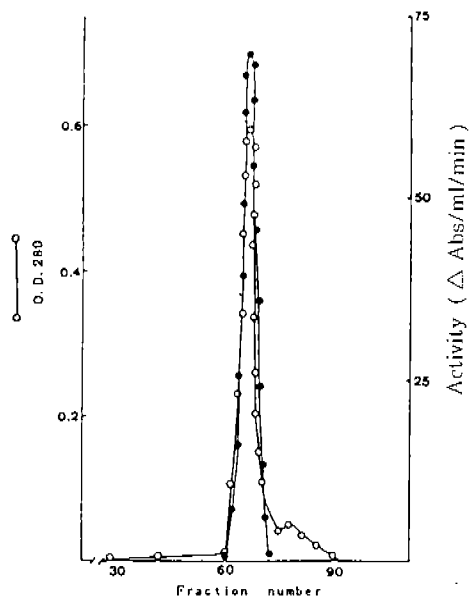
四脂氧化酵素之純化

選取適合加工的 205 品種之成熟毛豆，做進一步的酵素純化工作。據 Hildesbrand

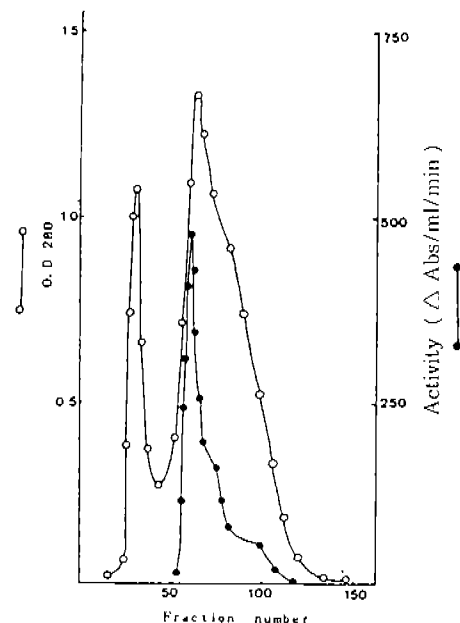
(1981)、Kitamura (1984) 及 Vernooy-Gerritsen (1984) 等報告顯示大豆中至少含有三種脂氧化酵素之異構酵素，分別稱為 L-1，L-2 和 L-3。其特性依最適作用 pH 值可分為兩類，即 pH 9.0 的 L-1 及 pH 6.0-7.0 的 L-2 和 L-3^(4,5,12)。本試驗以 pH 7.0 和 pH 9.0 兩種受質溶液，測定 DEAE-cellulose 離子交換樹脂之蛋白質沖洗液酵素活性，由圖二可發現於 225 及 234 號試管各出現了酵素活性高峯 E₁ 與 E₂。

分別取 E₁，E₂ 附近之酵素液用硫酸銨沈澱至 50~90%，再經由 S 6B-100 膠分離管柱作進一步純化而得到部分純化之酵素液。(圖三、四)

經由純化結果，顯示毛豆中脂氧化酵素也有異構化酵素存在，而毛豆生長期間，脂氧化酵素異構酵素之含量變化情形如何，本試驗目前正在探討之中。



圖三、以 Sepharose 6B-100 純化 DEAE-cellulose E_1 之脂氧化酵素
Fig. 3 Sepharose 6B-100 chromatography of lipoxigenase from E_1 peak of DEAE-cellulose column.



圖四、以 Sepharose 6B-100 純化 DEAE-cellulose E_2 之脂氧化酵素
Fig. 4 Sepharose 6B-100 chromatography of lipoxigenase from E_2 peak of DEAE-cellulose column.

參 考 文 獻

1. 梁 鵬主編。1980。台灣農家要覽(上冊) 豐年社 台北 p. 1023 ~ 1025。
2. Al-Obaidy, H. M. and A. M. Siddiqi. 1981. Inhibition of broad bean lipoxigenase. *J. Food Sci.* 46:597-600.
3. Haydar, M. L. S. and D. Hadziyev. 1975. Oxidation of pea lipids by pea seed lipoxigenase. *J. Food Sci.* 40:808-814.
4. Hildesbrand, D. F. and T. Hymowitz. 1981. Two genotypes lacking lipoxigenase-1. *J. A. O. C. S.* 58:583-588.
5. Kitamura, K. 1984. Biochemical characterization of lipoxigenase lacking mutants, L-1-less, L-2-less and L-3-less soybeans. *Agric. Biol. Chem.* 48(9): 2239-2346.
6. Leoni, O., R. Iori. and S. Palmieri. 1985. Purification and properties of lipoxigenase in germinating sunflower seeds. *J.*

- Food Sci. 50:88-92.
7. Pauls, K. P. and J. E. Thompson. 1984. Evidence for the accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons. *Plant Physiol.* 63:726-729.
 8. Priestley, D. A. and A. C. Leopold. 1979. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. *Plant Physiol.* 63:726-729.
 9. Rackis, J. J., D. H. Honig., D. J. Sessa. and H. A. Moser. 1972. Lipoxygenase and peroxidase activities of soybeans as related to the flavor profile during maturation. *Cereal Chem.* 49(5):586-597.
 10. Stewart, R. R. and J. D. Bewley. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* 65:245-248.
 11. Surrey, K. 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiol.* 39:65-70.
 12. Vernooij-Gerritsen M., JLM Leunissen., GA Veldink and JFG Vliegthart. 1984. Intracellular localization of lipoxygenase-1 and-2 in germinating soybean seeds by indirect labeling with protein a-colloidal gold complexes. *Plant Physiol.* 76:1070.
 13. Vick, B. A. and D. C. Zimmerman. 1981. Lipoxygenase, hydroperoxide isomerase, and hydroperoxide cyclase in young cotton seedlings. *Plant. Physiol.* 67:92-97.
 14. Vliegthart, J. F. G., Gerrit A. V. and Jan Boldingh. 1979. Recent progress in the study on the mechanism of action of soybean lipoxygenase. *J. Agric. Food Chem.* 27(3):623-626.
 15. Whitaker, J. R. 1972. Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker Inc. N.Y. p. 607-617.
 16. Yao, J. J., L. S. Wei. and M. P. Steinberg. 1983. Effect of maturity on chemical composition and storage stability of soybeans. *J.A.O.C.S.* 60(7):1245-1249.

Investigation of Activity Changes and Variations of Lipoxygenase Among Soybean Cultivars During Growth

Andi O. Chen Shyang-chwen Sheu Kwo-bing Jiung¹⁾

Summary

Ryokkoh, 205 and AGS 292 were three cultivars of soybeans chosen for this study. Young soybeans were sampled at three different growing stages. The changes of lipoxygenase activity and the variations among these three cultivars of young soybeans were investigated. Lipoxygenase was purified from the young soybeans of 205 cultivar at mature stage. The results indicated that there are at least two types of lipoxygenase isozymes exist in young soybeans, and the optimum pH for these two lipoxygenases were pH 7 and 9, respectively. The lipoxygenase activity in young soybeans was increasing with the growth of plants. Among these three cultivars, the increasing rate of lipoxygenase activity in Ryokkoh was the highest while that in AGS 292 was the lowest. Furthermore, the lipoxygenase activity of Ryokkoh at mature stage was the highest and about 3.04 and 2.42 times those of AGS 292 and 205, respectively.

In brief, to reduce the possibility of lipoxygenase effect on the quality of processed young soybeans, the two young soybean cultivars "AGS 292" and "205" picked in mature stage should be more suitable for processing than Ryokkoh.

1) Associate professor, graduate students, Dept. of Food Science, College of Agriculture, National Chung Hsing University.