

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

生化反應器形成香氣化合物系統之建立：
綠豆芽中過氧化物水解一之特性

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNFH-91-05

執行期間：91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

計畫主持人：郭建民

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：嘉南藥理科技大學食品衛生系

中 華 民 國 9 2 年 1 月 2 4 日

生化反應器形成香氣化合物系統之建立：

綠豆芽中過氧化物水解一之特性

計畫編號：CNFH-91-05

執行期限：91年1月1日至91年12月31日

主持人：郭建民 執行機構：嘉南藥理科技大學食品衛生系

一、中文摘要

本研究目的乃探討綠豆於發芽過程中過氧化物水解一 (hydroperoxide lyase, HPLS) 活性的變化及特性。綠豆於發芽至第 1-2 天且芽長為 2-2.5 cm 時過氧化物水解一活性會漸漸增加並達到最高。將粗抽出液經超過濾濃縮後，注入 hydroxyapatite 管柱分離，得到部分純化之酵素。該部分純化之 HPLS 活性最適 pH 值為 6，最適溫度為 37°C。將綠豆芽 HPLS 粗抽出液與 18:2-9OOH 及 18:3-9OOH 等過氧化物作用，可產生哈密瓜味、香瓜味、甜瓜味；若與 18:2-13OOH 及 18:3-13OOH 等作用則可產生濃郁的青草味、小黃瓜味。

關鍵詞：過氧化物水解一、綠豆芽、香氣

Abstract

Hydroperoxide lyase (HPLS) activity of mung bean during germinating process was studied. The mung bean seedlings were cultivated over a period of 4 days

and HPLS activity increased and reached a maximum about 15-folds at day 2-3. HPLS from mung bean seedlings was further concentrated by ultrafiltration and purified using hydroxyapatite column chromatography. The optimal pH of the partially purified HPLS was 6.0, and optimal temperature was 37 °C. The HPLS from mung bean seedlings showed higher reactivity toward 18:2-9HpODE (hydroperoxyoctadecadienoic acid) than 18:2-13HpODE. The partially purified HPLS of mung bean seedlings treated with 18:2-13HpODE or 18:3-13-HpOTE (hydroperoxyoctadecatrienoic acid) formed green-like aroma, while those treated with 18:2-9HpODE or 18:3-9-HpOTE produced sweet cucumber-like or melon-like aroma. These volatile compounds are being identified with GC-MS

Keywords: *hydroperoxide lyase, mung bean seedlings, flavor*

二、緣由與目的

近幾年來，由於生活水平之提升，消費者對天然香料之需求，也與日遽增，而添加天然香料之商品價格，也都較添加人工者高出許多。天然香料中又以具有 green、fruity、fresh fish-like 等香氣特徵之香料被使用的相當廣泛，除食品香料、水產香料之用途外，並可作為室內或汽車等空間之芳香劑使用，以及添加於飼料中促進陸地或水生動物攝食等用途上。每年對此類香料的消費金額大約有 10 到 20 億台幣之間 (Whitehead et al., 1995)，且有逐年增加之趨勢。假如單純由傳統之天然來源萃取，似乎已無法滿足每年龐大之需求。因此許多學者也提出利用生物科技之方法來解決，其中酵素法所獲得之香氣化合物可視為“天然香料”，以目前之技術來看，似乎是較可行且較便宜之方法。於酵素法中，利用脂氧合一 (lipoxygenase, LOX) 途徑相關酵素來產生此類“天然香料”是被認為較有效率、便宜且具有環保概念的方法 (Fabre and Goma, 1999)。因此最近許多利用 LOX 的專利 (Patent USN 4806379、USN9526413、NEP597069、EP0481147、NFR2696192) 也相繼被發展出來。

為利用 LOX 途徑之相關酵素來產生天然香料，對植物香氣之生合成過程必須充分瞭解。以植物為例，經由 LOX 等相關酵素生合成香氣之途徑中，主要有四個重要之酵素亦即脂解一 (lipase)、LOX、過氧化物水解一 (hydroperoxide lyase, HPLS) 及酒精去氫一 (alcohol dehydrogenase, ADH) 等。這些酵素代謝脂質使植物會散發出香氣成分來，其中又以 LOX 及 HPLS 最為重要，此兩者決定揮發性成分之

種類。若以催化亞麻油酸之位置分類，LOX 等相關酵素生合成香氣之途徑可區分成兩大類。第一類乃以黃豆 (Gardner 1991)、苜蓿 (Sekya et al., 1983)、茶葉 (Sekiya, et al., 1984) 為主，此類植物香氣生合成過程中，脂肪首先由 lipase 水解，而後經由 LOX 將 18:2 催化成 18:2-13OOH 及經 HPLS 水解產生 C6 aldehyde，再經 ADH 轉變為 C6 alcohol。第二類乃以蕃茄 (Galliard and Matthew, 1977)、香蕉葉 (Kuo et al., 2000a)、馬鈴薯 (Gailliard et al., 1974)、香瓜 (Phillips and Gailliard, 1978)、玉米 (Gardener, 1970) 為主，LOX 將 18:2 催化形成 18:2-9OOH，經 HPLS 水解產生 C9 aldehyde，再經 ADH 轉變為 C9 alcohol。

Josephson 等 (1986) 利用植物之 LOX 與 HPLS 粗抽出液加入魚漿中使其產生強烈之鮮魚味，黃豆脂氧合一已被應用於水果香料的修飾與製造 (Munoz et al., 1996)。烏魚鰓之 LOX 與 HPLS 粗抽出液亦被應用於修飾魚油 (蔡, 1994) 或烏魚子 (林, 1996) 氣味或形成水產香氣。Kuo and Pan (1991) 使用 LOX 與 HPLS 增加蝦香氣成分，其中具有烤蝦香氣之 5,8,11-tetradecatrien-2-one 含量大幅增加，故水產香氣成分可由 LOX 與 HPLS 之作用產生。

豆科植物或穀類種子中 LOX 之探討，已有相當多之研究報告。然而將這些種子發芽後，LOX 與 HPLS 之消長或其催化特性之探討，則目前鮮有這方面之研究，其中黃豆與黃豆芽是少數被研究較多者 (Olias, et al 1990)；而綠豆及綠豆芽方面，目前尚無報告加以說明。另外，綠豆之價格相當低廉，1

公斤綠豆約台幣 25 元左右，經發芽後約可獲得 5 公斤綠豆芽菜，平均 1 公斤綠豆芽菜僅約 5 元左右，故於經濟上之考量，極具可行性。再者，其發芽過程簡單、快速、容易控制，而且發芽過程之代謝作用旺盛，於酵素或前驅物或其他成分之代謝研究上，極具潛力。

故本研究將探討綠豆芽菜形成食品香氣之可行性，及探討綠豆芽於發芽過程中 HPLS 之消長並將分析綠豆芽 HPLS 之特性，以作為後續綠豆芽菜形成食品香氣之基礎研究。

二、材料與方法

1. 綠豆芽菜的培育

將綠豆加水浸泡 4-6 小時後，放入自動芽菜培育機中，於 30°C 下培育一段時間後取出備用。

2. 過氧化物水解—粗酵素液萃取

綠豆芽加入 5-10 倍體積之 50mM 鉀磷酸緩衝液(pH6.3)，並加入 0.1% Triton x-100 均質 5 分鐘，以細紗網過濾之，於 4°C 離心分離(15.000xg, 20min)，取上清液經透析後為粗酵素液。

3. 過氧化物水解—活性測定

取粗酵素液放於磷酸鉀緩衝液(0.1M, pH6.3, 含 0.01% tween-20) 中，加入 18:2-9OOH 或 18:2-13OOH 後，於 26°C 反應 5 分鐘，測量反應過程單位時間內 234nm 吸光度之變化，以每分鐘吸光度下降 0.1 時，為一活性單位。(unit)

4. HPLS 作用基質的製備:

18:2-9OOH 及 18:3-9OOH 由馬鈴薯 LOX 於 pH 6.0 下製備而成，18:2-13OOH 及 18:3-13OOH 由

市售黃豆 LOX 於 pH 9.0 下製備而成。反應後經乙酸乙酯抽出過氧化物，再經製備式正相 HPLC 純化過氧化物。其分離條件如下：

管柱為 Bondclone silica column (30 cm x 7.8 mm, 10 μ, Phenomenex, Torrance, Ca, USA)

移動相為 hexane : isopropanol : acetic acid(98:1.9:0.1, V/V/V) 流速為 2 mL/min，於 234 nm 下偵測

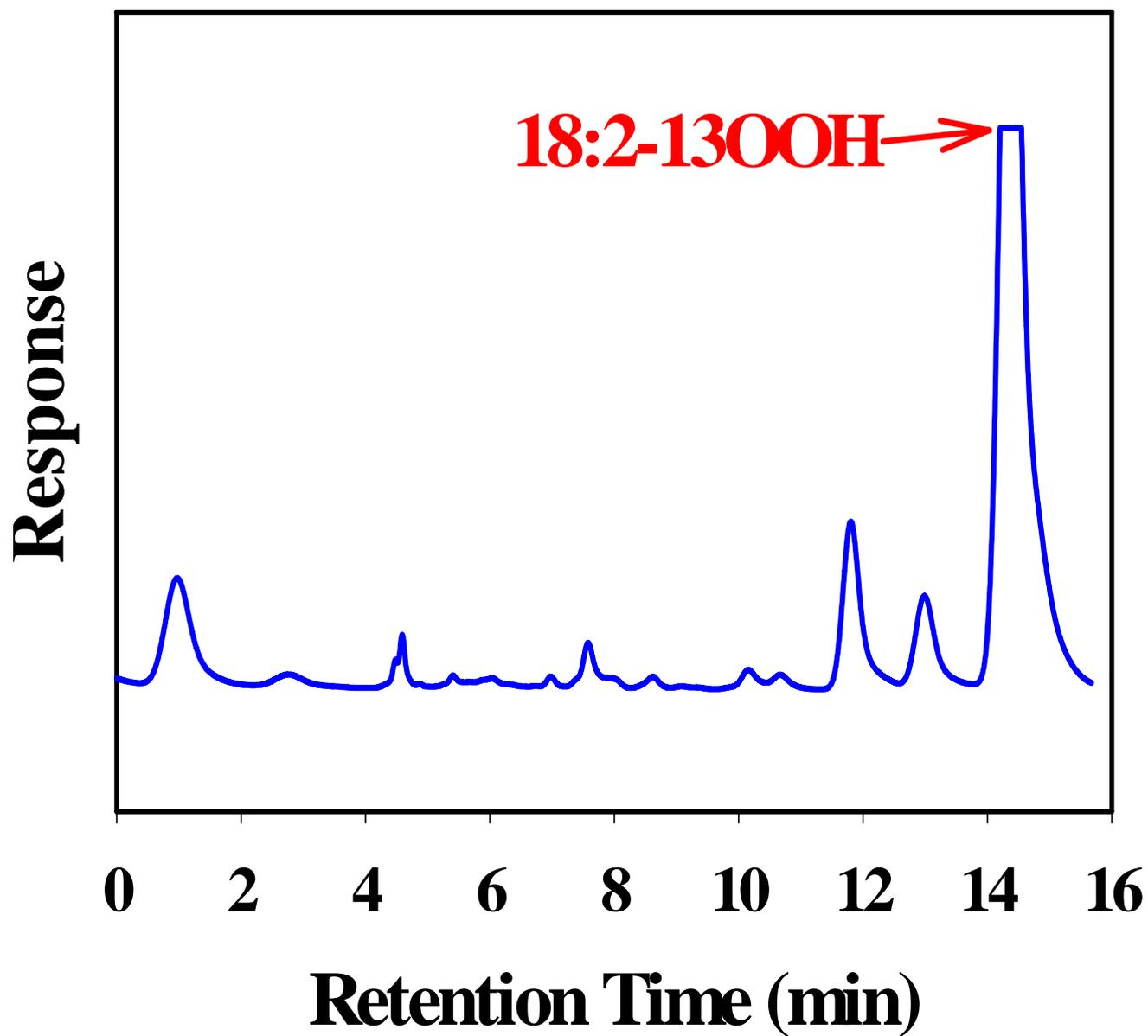
四、謝辭

感謝本校校長王昭雄博士於研究經費及實驗環境之支持以及海洋大學水產食品科學研究所孫寶年教授之提攜與幫忙，使得實驗得以順利進行。

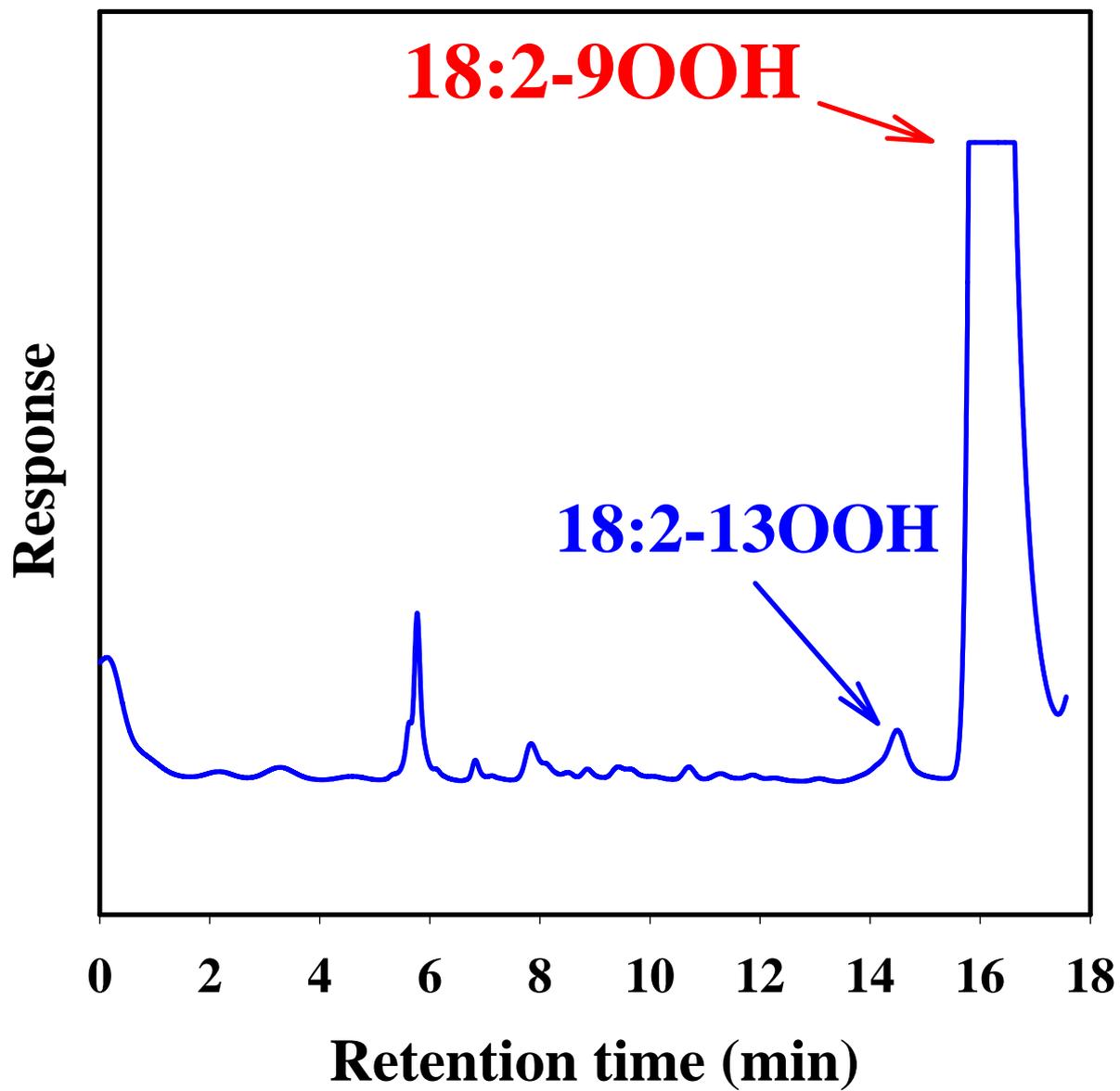
五、結果

表一. 綠豆芽 HPLS 抽出液與不同過氧化物反應後之香氣描述

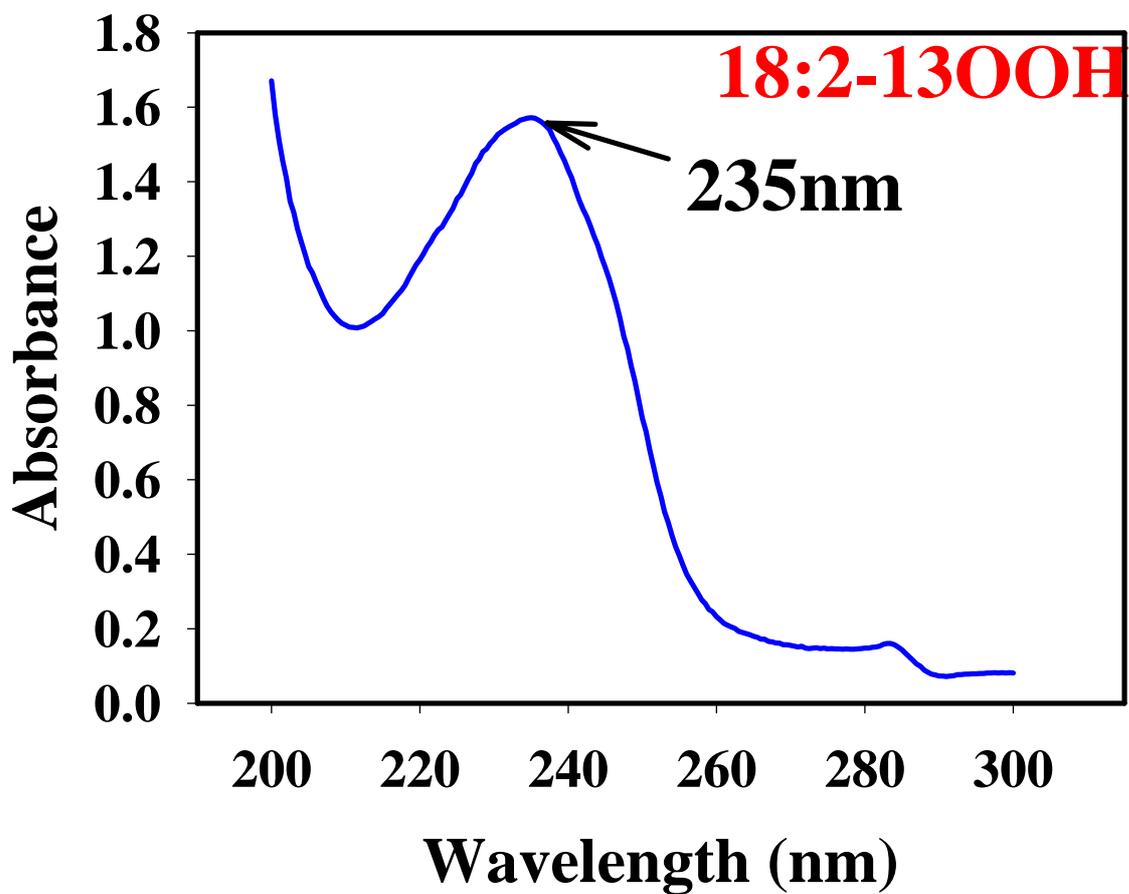
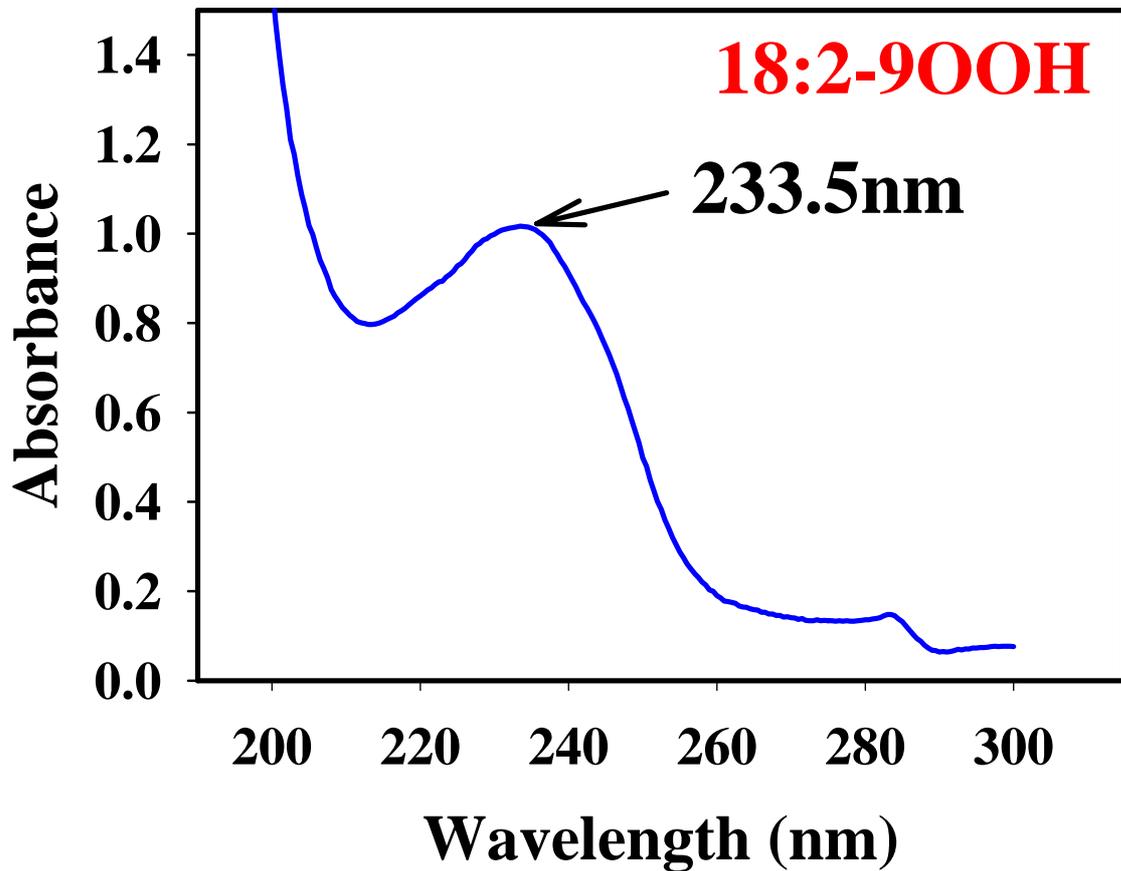
基質	香氣描述
18:2-9OOH (產生 9 個碳的醇類與醛類)	哈密瓜味、青草味、香瓜味、甜瓜味
18:2-13OOH (產生 6、12 碳的衍生物)	濃青草味
18:3-9OOH	小黃瓜味、香瓜味、哈密瓜味
18:3-13OOH	濃郁的青草味、小黃瓜味



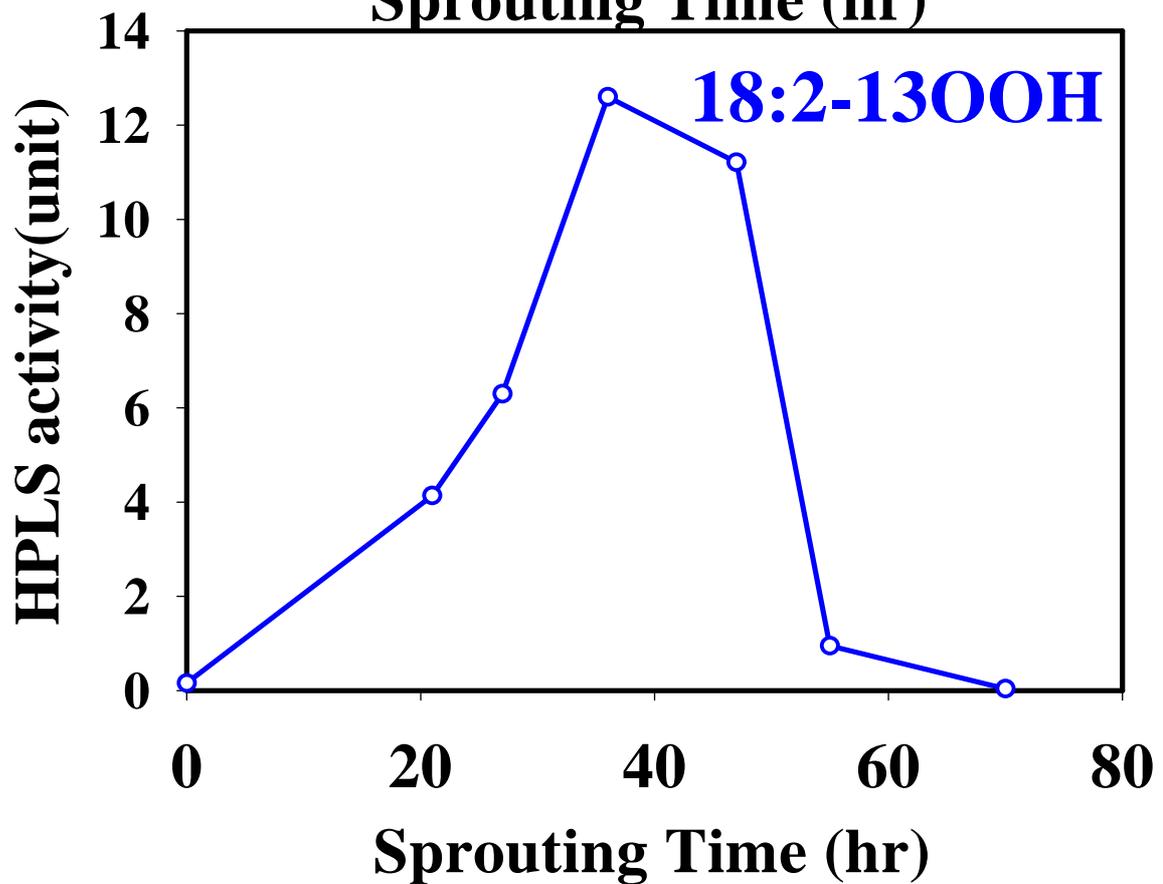
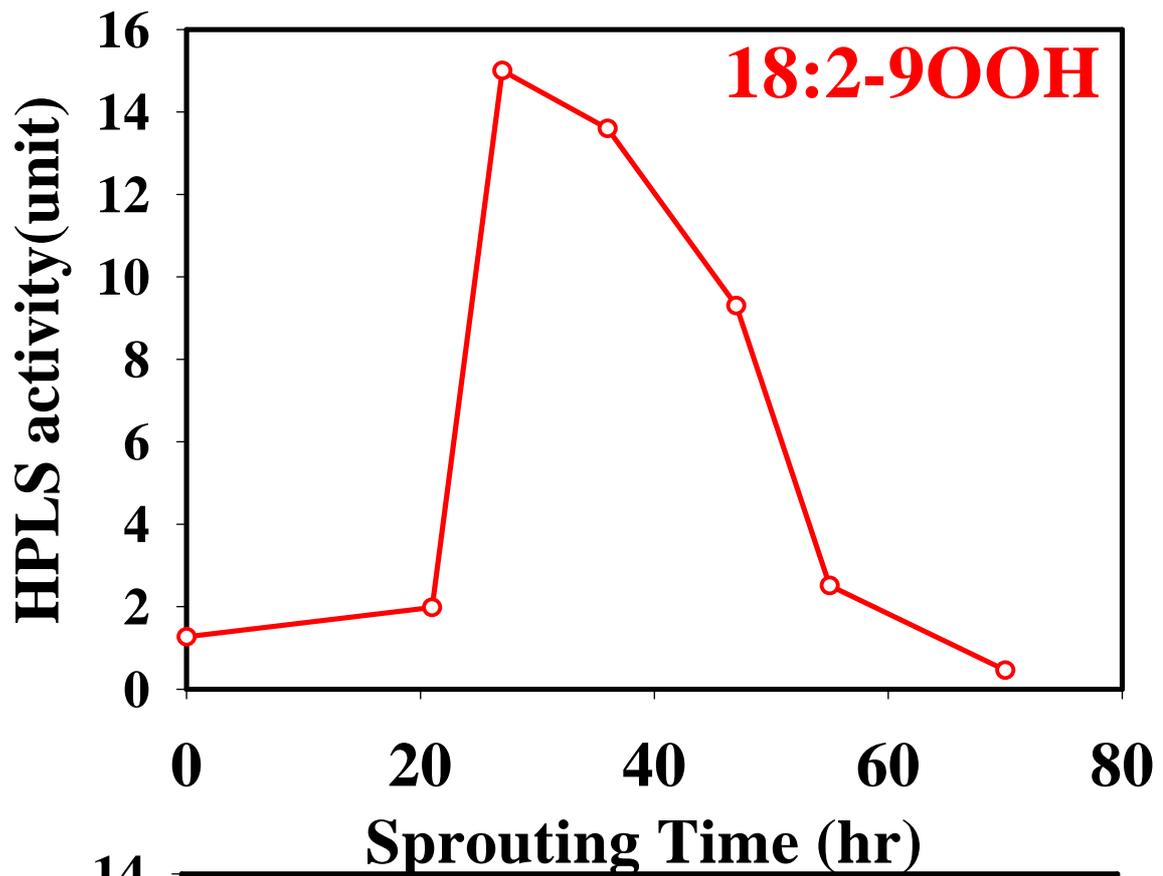
圖一 18:2-13OOH 之正相 HPLC 層析圖



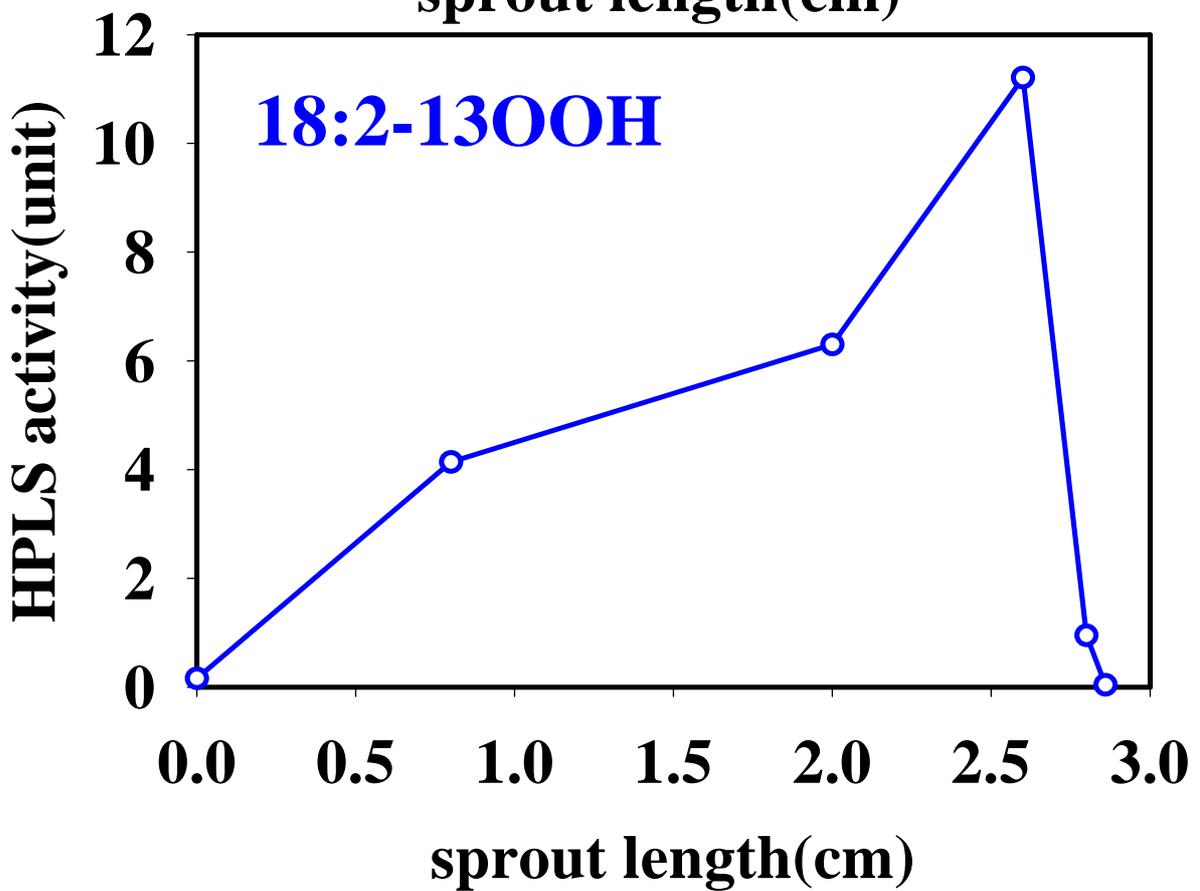
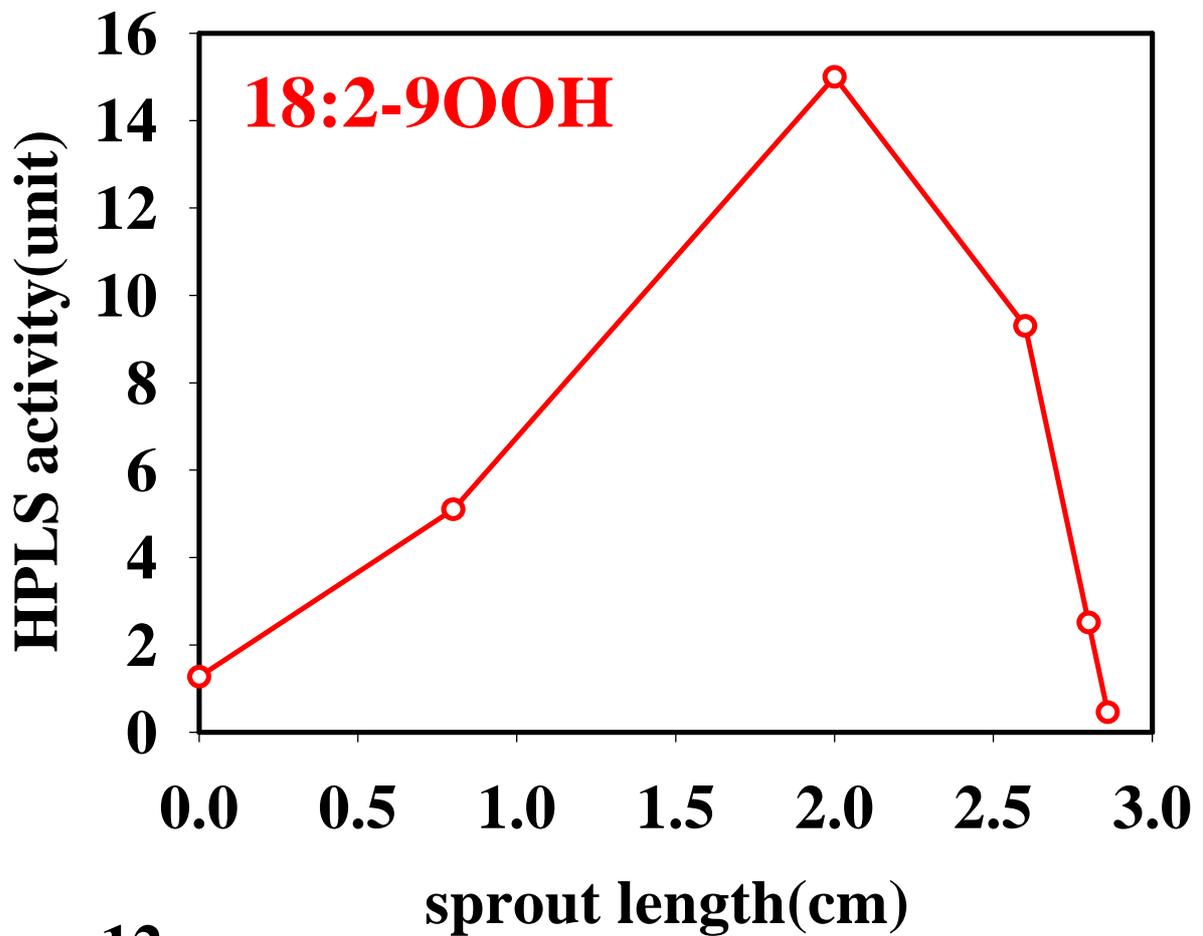
圖二.18:2-900H 之正相 HPLC 層析圖



圖三 HPLS 作用基質之波長掃描光譜



圖四綠豆發芽過程中 HPLS 活性之變化



圖五綠豆發芽過程中 HPLS 活性與芽長之關係

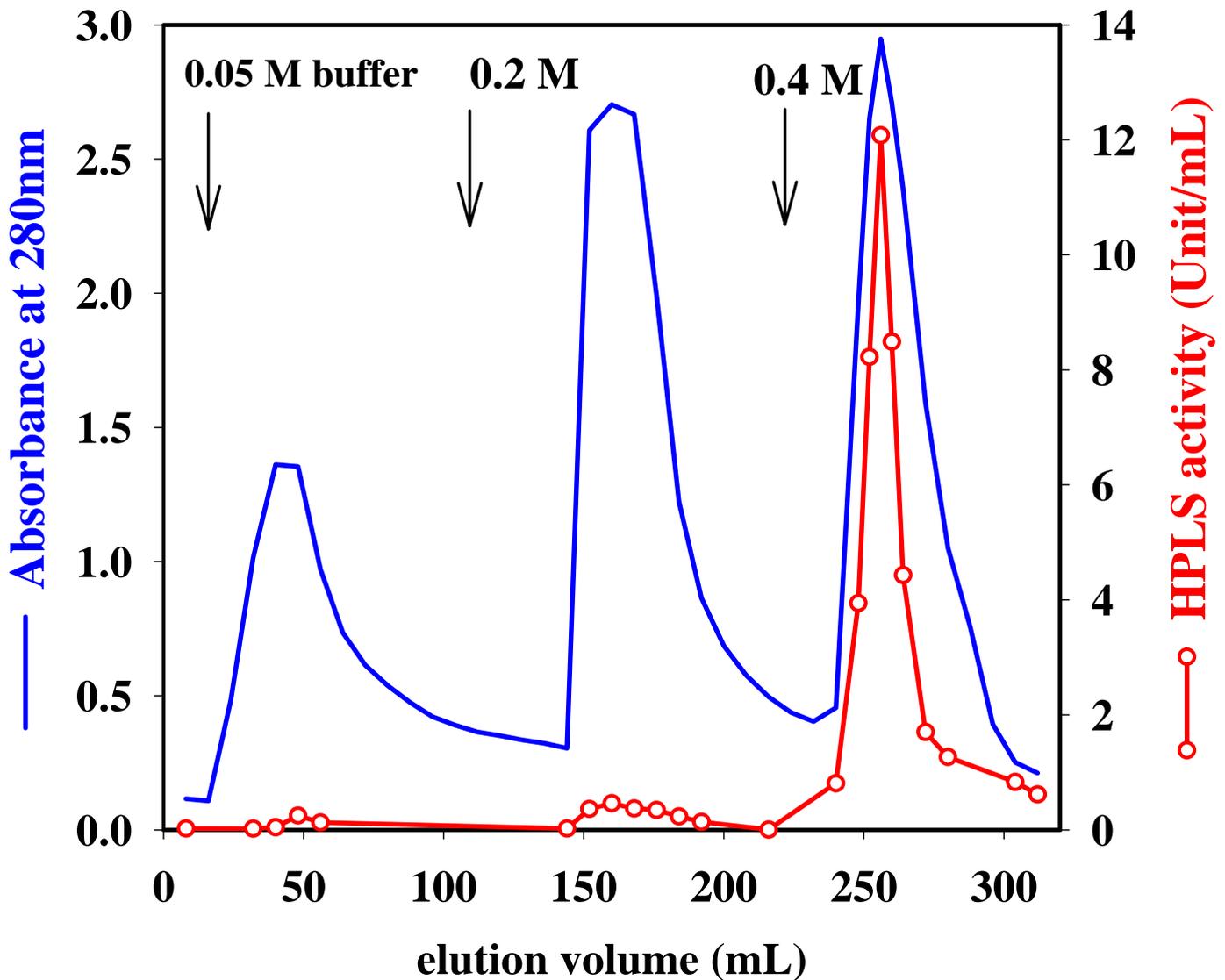
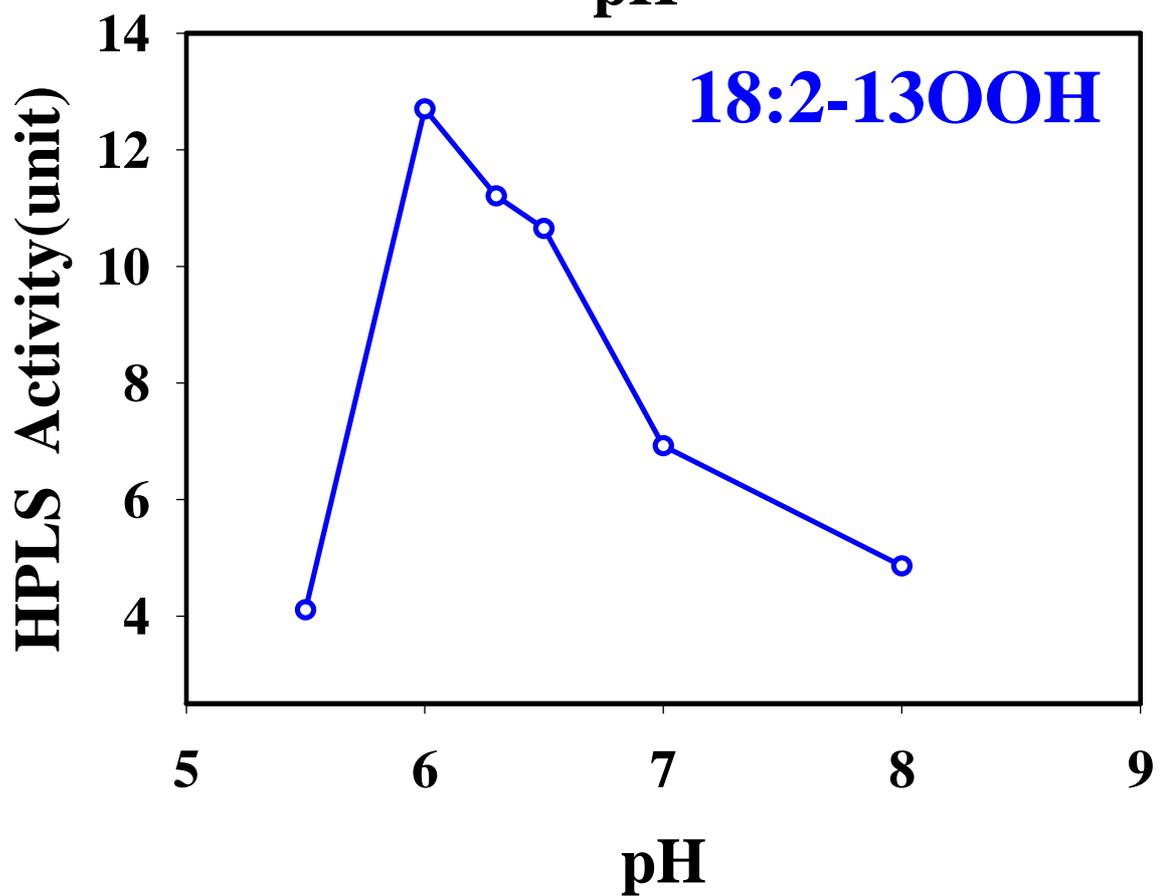
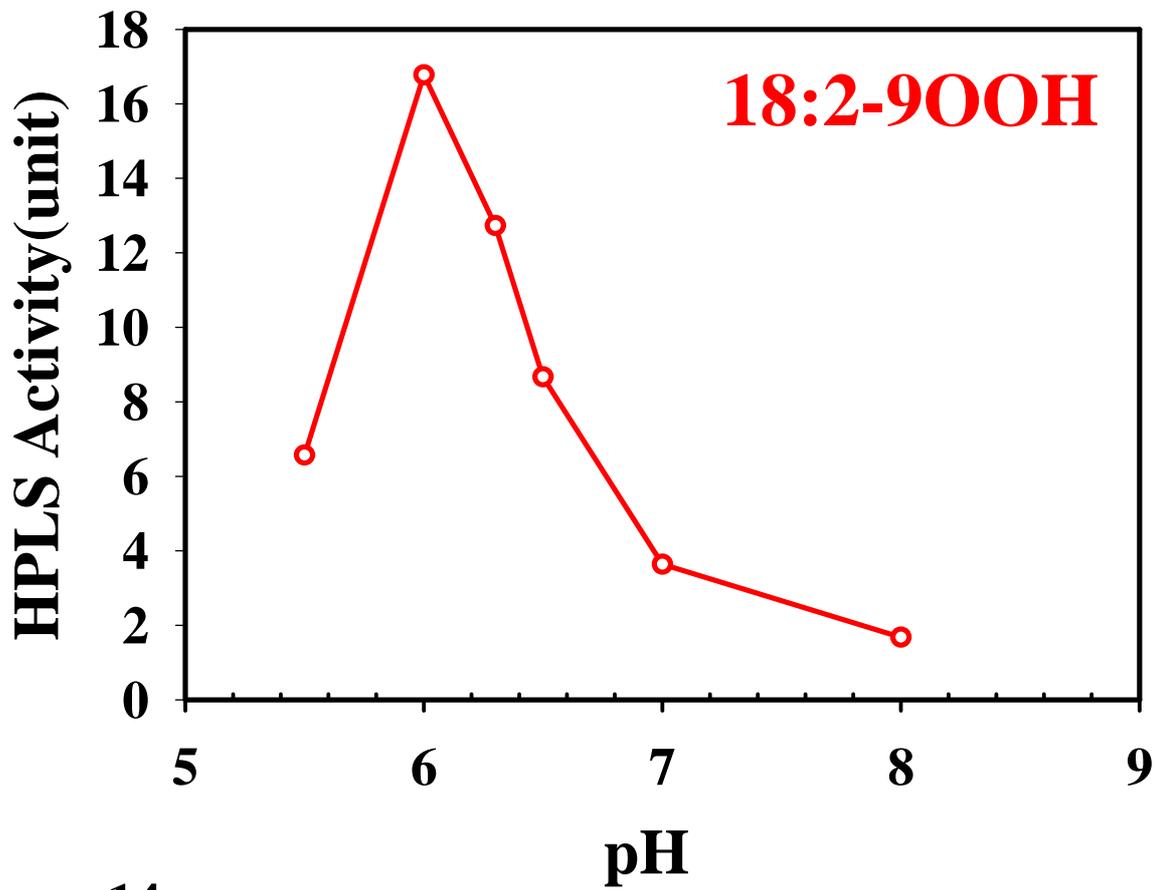
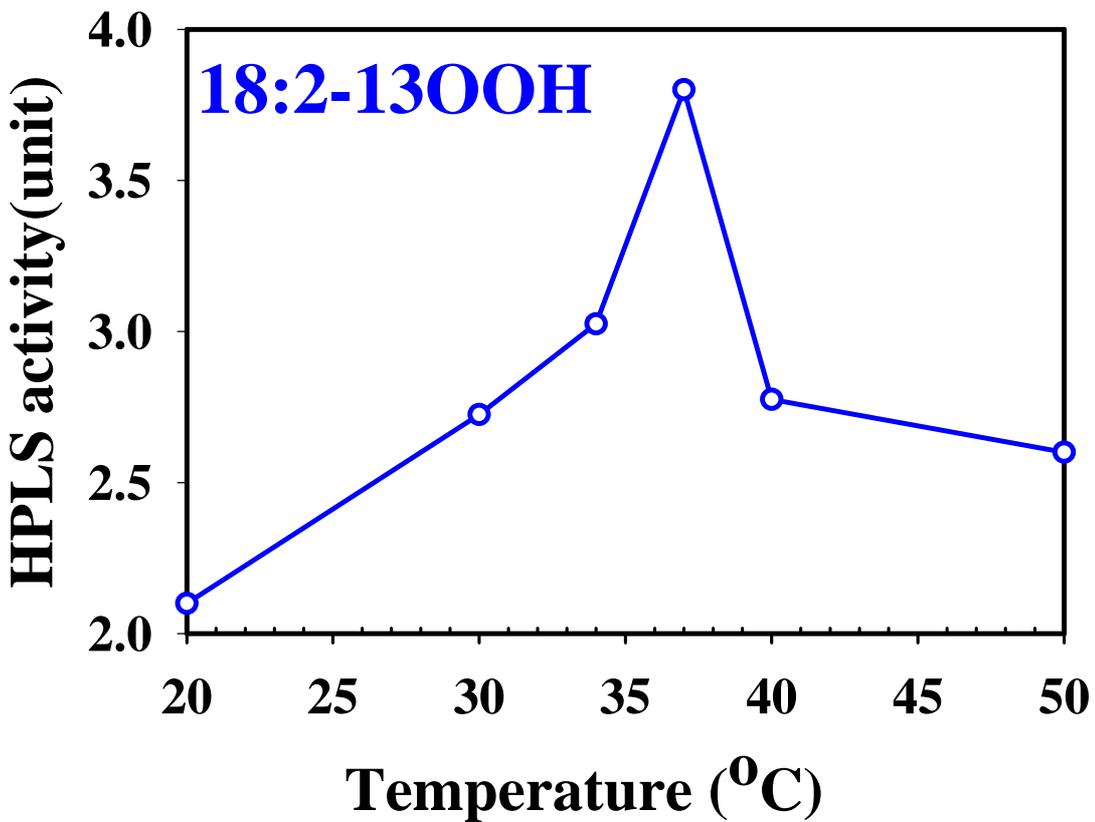
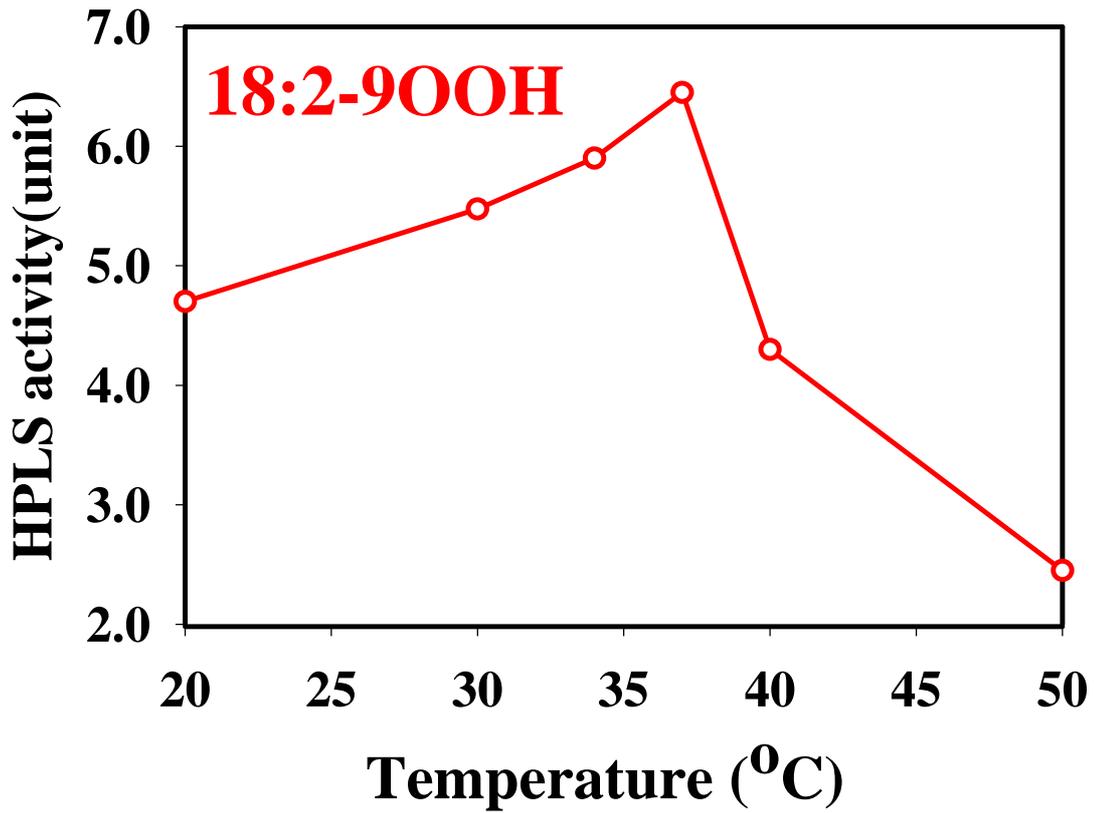


Figure 6. Elution profile of mung bean seedling HPLS on hydroxyapatite column (2.6x15 cm). Column was equilibrated with 50 mM potassium buffer (pH 6.3) and eluted with 0.2 or 0.4 M phosphate buffer at a flow rate of 1 mL/min. Fractions of 4 mL were collected and assayed for protein as absorbance at 280 nm and for HPLS activity.



圖七.綠豆芽 HPLS 的最適 pH 值



圖八綠豆芽 HPLS 的最適溫度