

大豆脂肪氧化酶生理作用研究进展^{*}

麻 浩 官春云

(湖南农业大学植物科技学院 长沙 410128)

ADVANCE IN RESEARCH OF THE PHYSIOLOGICAL ROLES OF LIPOXYGENASE

Ma Hao Guan Chunyun

(*Collage of Plant Science & Technology, HNAU, Changsha 410128*)

富含蛋白质和油脂的大豆为人类食用已有悠久历史, Andre 和 Hou(1932)首先发现大豆蛋白制品产生豆腥味是因聚不饱和脂肪酸的酶促反应的结果,其中关键的酶是脂肪氧化酶(Lipoxygenase)(EC1.13.11.12), Theorell 等(1947)首次从大豆中获得了大豆脂肪氧化酶(Lox1)的结晶。

大豆脂肪氧化酶是一种单一的多肽链蛋白质,其分子量为 94–97KDa,等电点范围从 pH5.7 到 pH6.4。大豆种子存在有三种不同性质脂肪氧化酶同功酶,分别被命名为 Lox1、Lox2 和 Lox3。由于层析法不断改进又将 Lox3 分离成为 Lox3a 和 Lox3b 两种,不过由于两者在许多性质上的相似,仍被认为是同一种同功酶。这几种同功酶在酶活性的最适 pH、热稳定性、与 Ca^{2+} 关系、等电点、底物专一性和许多生化性质上都不同^[1]。在植株生长发育过程中, Kato 等(1992)在大豆种子萌发初期用阴阳离子交换色谱法从子叶中分离提纯出 3 种新同功酶,他们将其命名为 Lox4、Lox5 和 Lox6;这三种同功酶最适 pH 为 6.5,在 pH9.0 时无活性,用亚油酸和亚麻酸作底物时,其最适酶促底物为亚麻酸;经部分氨基酸序列分析表明 Lox4 与 Lox1、Lox2 和 Lox3 存在有部分同源,但又明显不同于它们^[2]。Saravitz 等(1996)在受伤后不久的大豆叶片中分离出 Lox7、Lox8 两种脂肪氧化酶,并发现这两种同功酶在幼叶、花和未成熟的荚中都存在,并具有很高的酶活性^[3]。

大豆种子中的 Lox1、Lox2、Lox3 分别受 Lx1、Lx2 和 Lx3 基因控制,其缺失体分别受 lx1、lx2 和 lx3 三个隐性基因控制。Lx1 和 Lx2 是紧密连锁的, Lx3 是独立遗传的。目前国外已培育出缺失 Lox1、Lox2 和 Lox3 的一系列近等位基因系,并已经有缺失体品种推广^[1]。

脂肪氧化酶广泛地存在于动植物特别是高等植物内,目前还不完全清楚它的生理功能,已有研究表明它与植物的生长发育、衰老、伤害反应和抗有害生物有关^[4]。现将近年来

* 收稿日期 1997-12-16

Received on Dec. 16, 1997

有关大豆脂肪氧化酶生理作用研究进展综述如下。限于篇幅,有关大豆脂肪氧化酶与豆制品豆腥味之间的关系,笔者将另文详述

1 大豆脂肪氧化酶在生长发育中作用

已有的研究表明大豆脂肪氧化酶同功酶随植株发育而产生较大变化,在幼嫩快速生长的组织中通常都表现出很高的酶活性^[5 6],且在某些发育阶段中会产生新的大豆脂肪氧化酶同功酶^[2]。这促使相当一部分研究者认为大豆脂肪氧化酶在植物组织的生长和(或)发育中起某种作用。有些研究者认为大豆脂肪氧化酶在萌发种子中的高活性加速了细胞膜的瓦解,从而有利于贮藏的营养物质向正在发育的胚中转移。另一方面 Vernooy-Gernitsen等(1983)研究认为脂肪氧化酶在种子萌发的早期阶段可能参与调节或触发细胞内各种各样的过程,而不是主要参与不饱和脂肪酸的呼吸作用或活化作用;他们同时认为细胞中的脂肪氧化酶是在贮藏组织中的贮藏物开始活化作用和某些组织中叶绿体开始生物合成时才发挥功能^[7]。Grimes等(1992)认为在正在发育的芽尖中大豆脂肪氧化酶可能起到作为氨基酸暂时贮藏场所的重要作用^[8]。但大豆脂肪氧化酶在生长发育中的作用还远不清楚,尚须深入研究。

2 大豆脂肪氧化酶与种子劣变的关系

大豆种子中存在有 Lox1 Lox2 Lox3 三种脂肪氧化酶同功酶,一粒干重约为 160mg 的大豆种子,Lox1 和 Lox2 的含量大约为 0.23mg 和 0.45mg;而其催化反应的底物亚油酸和亚麻酸的含量分别为 15mg 和 2mg,存在于甘油三酸脂中,只有微量的游离脂肪酸存在^[7]。

许多研究证实由于脂肪氧化酶能够催化细胞膜中的不饱和脂肪酸和贮藏的脂质氧化形成脂肪酸氢过氧化物和自由基;细胞膜中的多聚不饱和脂肪酸的氧化会引起细胞膜的通透性增加,从而导致细胞中 Ca^{2+} 的水平增加,磷脂酶的活化和游离脂肪酸的释放^[7];不饱和脂肪酸氧化形成的自由基、氢过氧化物和碳酰化合物又会对蛋白质、膜结构、细胞组织以及 DNA 造成破坏^[9];细胞膜的破坏又会引起种子活力的丧失。这使得部分研究者认为大豆种子脂肪氧化酶与大豆种子的衰老或劣变有关^[10]。

但也有的研究者认为大豆种子脂质的过氧化与种子的衰老过程无关^[11]。Trawatha 等(1995)利用 Century 及其脂肪氧化酶缺失近等位基因系(缺 Lox1Lox3 缺 Lox2Lox3 和缺 Lox3 三种类型)研究大豆种子脂肪氧化酶与种子劣变的关系,结果表明 Century 及其脂肪氧化酶缺失近等基因系在贮藏期间以同样的速率、同样的规律丧失种子的发芽率和活力;而且在相同贮藏条件下缺失体材料的种子也没有表现出更长或更短的寿命现象,因此他们认为大豆种子中的脂肪氧化酶与大豆种子的劣变可能无关,或者说大豆种子中缺失 1 或 2 个脂肪氧化酶同功酶对种子的劣变没有影响^[12]。

大豆种子的劣变发生的时期及原因可能是多方面的^[13]。劣变的最重要的因素,可能会因贮藏的方式不同而变化。

3 大豆脂肪氧化酶在伤害反应和抗有害生物中的作用

大豆叶片中,总有脂肪氧化酶存在但与反应底物是分开的,直到受到伤害或产生组织损伤,脂肪氧化酶方能与底物产生接触,认为脂肪氧化酶在伤害反应和抗有害生物中起作用是由于研究发现植物组织受到伤害后,脂肪氧化酶蛋白质及其活性会急剧增加,并会形

成新的脂肪氧化酶同功酶^[3 9]。

大豆脂肪氧化酶的直接抗性反应就是催化亚麻酸和亚油酸氧化生成脂质过氧羟自由基和一些次级氧化产物,这些物质对有害生物是有毒性的,许多研究表明脂肪氧化酶催化产物如己醛等对植物病原物有着不利的影响,如 Mohri 等 (1990)证实氢过氧化物和己醛对害虫有驱除作用^[14]。同样许多研究者也指出受到伤害后的初期阶段,抗性品种比易感品种脂肪氧化酶的活性要大得多。

Shukle 等 (1983)利用大豆中提取的脂肪氧化酶、胰蛋白酶抑制剂和植物凝血素等饲喂烟草天蛾 (*Manduca Sexta*) 幼虫,发现大豆脂肪氧化酶可阻止其幼虫生长,因此他们认为脂肪氧化酶在植物体内能直接起到抵御有害生物危害的功能^[15]。脂肪氧化酶间接参与抗有害生物的一个可能机制就是抗性植物组织中过氧化自由基的大量生成使得该组织成为不利于有害生物生长的食物;另一个可能机制可能涉及到有害生物引起伤害后在抗性和感性遗传型的组织中形成的过氧化自由基,抗性遗传型因具有较强的解去自由基和过氧化物毒性的能力故遭受较少的组织损伤。参与保护细胞免受细胞毒素(过氧化物和自由基)危害的酶有过氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POX)。SOD 催化过氧化物(过氧化自由基与氧反应的产物)不平衡分离生成过氧化氢和分子氧, CAT 和 POX 催化使 O_2 代谢过程中有毒的中间产物减少^[9]。

大豆的伤害反应已证明与 Lox7、Lox8 有关^[3],但大豆脂肪氧化酶参与伤害反应的机理尚不清楚。有研究指出脂肪氧化酶参与从亚麻酸合成茉莉酮酸的反应过程,茉莉酮酸被认为是植物对伤害和病原危害抵御反应的介体。最近已有研究证明大豆幼苗受伤后在下胚轴组织中茉莉酮酸的含量会增加^[16]。

4 大豆脂肪氧化酶与植物体化学发光的关系

脂肪氧化酶在酶促不饱和脂肪酸氧化过程中,伴生游离基和过氧化氢物,是植物产生活性氧的途径之一。方允中等认为脂质过氧化过程中产生单线态氧,超弱发光主要来自于生物体内单线态氧转变为基态氧的反应^[17]。华中师大张志良等也研究证实大豆的发光与不饱和脂肪酸的过氧化作用有关,脂肪氧化酶参与该过程^[1]。徐文英等 (1995)曾研究测定了大豆种子脂肪氧化酶同功酶缺失体材料苗期子叶和真叶的超弱发光变化以及缺失体类型与叶片超弱发光强度的关系,试图使用苗期叶片等活性材料直接进行同功酶缺失体鉴定成为可能^[18]。

5 大豆脂肪氧化酶缺失体对农艺性状的影响

大豆种子中脂肪氧化酶的缺失是否会对大豆农艺性状产生影响将关系到选育的脂肪氧化酶缺失体材料的实际推广应用。至今,大多数研究者的研究结果证实,大豆种子中脂肪氧化酶 (Lox1、Lox2 和 Lox3) 的缺失对大豆农艺性状没有明显影响,在整个生活世代中也没有观察到生理方面的问题。

Pfeiffer 等 (1992)比较了 10 个 $Lx1Lx1-lx1lx1$ 近等位基因系的农艺性状的表现,并测定了 Century 缺失脂肪氧化酶近等位基因系对种子和荚感染黑点枯萎病 (*Phomopsis Longicolla* Hobbs) 的影响,结果表明用缺失等位基因 $lx1$ 代替 $LX1$ 在四个地点种植对产量无不良影响,对倒伏性、株高、百粒重、蛋白质与脂肪含量没有影响,成熟期上只有一天的差异。缺失 Lox2 和 Lox2Lox3 的近等位基因系在两年试验中各有一年较重地感染黑点枯

萎病,但对产量影响不大^[19]。

Kitamura等(1987)用 *Suxuyutaka* 及其近等位基因系 *lx1 lx2 lx3 lx1.3 lx2.3* 作大豆种子中脂肪氧化酶的缺失对农艺性状影响的研究,结果也表明各近等位基因系在萌发期、早期生长、开花和种子发育等阶段没有显著性的生理和形态方面的差异,在害虫危害种子的程度上也没有差异,尽管研究中单株荚数、单株种子数和单株产量在两个重复间差异较大,但两个地点各近等位基因系间这些性状的方差分析没有达到 5% 的显著水平^[20]。

Hajika等(1992)研究指出大豆种子缺失 *Lox1* 和 *Lox2* 同功酶在种子发育过程中不是致死的,并利用辐射育种的方法获得缺失 *Lox1 Lox2* 和 *Lox3* 三种同功酶的大豆株系^[21-22]。曾有研究者观察到与正常大豆种子相比大豆螟虫有喜食脂肪氧化酶缺失体材料种子,特别是 *Lox2* 缺失体材料种子的趋势,但在种子成熟期间,取食趋势上没有显著差异^[14]。

鉴于脂肪氧化酶的重要作用,大豆种子中实际上已培育出各种脂肪氧化酶缺失体类型,既然已有的研究证实大豆种子中脂肪氧化酶的缺失对农艺性状和生理性状没有明显影响,这就会引出三个方面问题:其一,*Lox1 Lox2* 和 *Lox3* 是否仅在种子中存在;其二,或者仅在种子中表现为缺失,即基因阶段性表达的问题;其三,如在植株中也表现为缺失,缺失的脂肪氧化酶(*Lox1 Lox2* 和 *Lox3*)其功能是否为其它类型(或新的)脂肪氧化酶同功酶的功能所补偿。但目前尚未见到这三方面的报道

因此广泛深入开展大豆脂肪氧化酶在生长发育、种子劣变、伤害反应和抗有害生物等方面功能的研究,将有助于人类对植物生长发育进行调控,种子的安全贮藏和进行新品种的选育。特别是脂肪氧化酶具有的植物保护方面的作用,已引起人们的广泛关注,脂肪氧化酶催化反应的产物氢过氧化物衍生物、己醛等已被证明对许多昆虫是有毒物质,有可能成为开发新型植保素的重要来源。

参 考 文 献

- [1] 丁安林等, 1995, 大豆脂肪氧化酶研究进展, 大豆科学, 14(1): 67- 73
- [2] Kato, T. et al., 1992, Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of a major new lipoxygenase gene. *Plant Physiol*, 110 287- 299
- [3] Saravitz, DM. et al., 1996, The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. *Plant Physiol*, 110 287- 299
- [4] Hildebrand, DF. et al., 1989, Lipoxygenase. *Physiol Plant*, 76 249- 253
- [5] Hildebrand, D. et al., 1983, Lipoxygenase activities in developing and germinating soybean seeds with and without lipoxygenase- 1. *Bot Gaz*, 114 (2): 212- 216
- [6] Hildebrand, DF. et al., 1991, Changes in lipoxygenase isozyme levels during soybean embryo development. *Plant Science*, 75 1- 8
- [7] Verony- Gerritsen, M. et al., 1983, Localization of lipoxygenase 1 and 2 in germination soybean seed by an indirect immunofluorescence technique. *Plant Physiol*, 73 262- 267
- [8] Grimes, HD. et al., 1993, Expression and accumulation patterns of nitrogen- responsive lipoxygenase in soybeans. *Plant Physiol*, 103 457- 466
- [9] Hildebrand, DF. et al., 1989, Peroxidative responses of leaves in two soybean genotypes injured by

- Twospotted Spider Mites. J. Economic Entomology, 79 1459– 1465
- [10] Parrish, DK. et al., 1997, On the mechanism of aging in soybean seeds. Plant Physiol, 61 365– 368
- [11] Priestley, DA. et al., 1979, Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. Plant Physiol, 63 726– 729
- [12] Trawatha, SE. et al., 1995, Soybean lipoxygenase mutants and seed longevity. Crop Sci, 35 862– 868
- [13] 唐善德等, 1994, 春大豆种子劣变的研究, 大豆科学, 13(3): 230– 236
- [14] Mohri, S. et al., 1990, Physiological effects of soybean seed lipoxygenase on insects. Agric Biol Chem, 54 2265– 2270
- [15] Shukle, RH. et al., 1983, Lipoxygenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybeans effects on larval growth of *Manduca Sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), Environ Entomol, 12 787– 791
- [16] Grimes, HD. et al., 1992, Expression, activity and cellular accumulation of methyl jasmonate- responsive lipoxygenase in soybeans. Plant Physiol, 103 457– 466
- [17] 方允中等, 1993, 自由基生命科学进展, 原子能出版社
- [18] 徐文英等, 1995, 大豆脂肪氧化酶同工酶缺失体的苗期叶片超弱发光研究, 大豆科学, 14(3): 269– 273
- [19] Pfeiffer, TW. et al., 1992, Agronomic performance of soybean lipoxygenase isolines. Crop Sci, 32 357 – 362
- [20] Kitamura, K. et al., 1987, Performance of near- isogenic lines lacking seed lipoxygenase. Soybean Genetics Newsletter, 14 109– 112
- [21] Hajika, M. et al., 1991, A line lacking all the seed lipoxygenase isozymes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] induced by gamma ray irradiation. Japan J. Breed, 41 507– 509
- [22] Hajika, M. et al., 1992, Genetic relationships among the genes for lipoxygenase- 1, - 2 and - 3 isozymes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seed. Japan J. Breed, 42 787– 792