

外源钡离子对脂肪氧合酶好氧催化体系的影响

蔡燕,周红波,鞠剑锋,吴锦明

(南通大学 化学化工学院,江苏 南通 226019)

摘要:对外源金属钡离子对大豆脂肪氧合酶的紫外光谱和荧光光谱的影响进行了测定,并考察了钡离子对脂氧酶好氧催化大豆油体系反应产率的影响。结果表明:在 Ba^{2+} 离子加入量为 $0.75\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,脂氧酶特征吸收 A_{360} 从初始的 0.1 升高至 0.4。但 Ba^{2+} 离子对脂氧酶发射光谱影响甚微,在 $360\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 峰值处与原始谱图比仅下降了约 1.2%。在 Ba^{2+} 离子加入浓度为 $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,脂氧酶好氧催化豆油体系的产率从 8% 提高至 18%,影响显著。

关键词:脂肪氧合酶;钡;构象;氢过氧化物

中图分类号: **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.06.1053

The Effects of Exogenous Ba^{2+} on the Lipoygenase Catalytic System

CAI Yan, ZHOU Hong-bo, JU Jian-feng, WU Jin-ming

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong 226019, China)

Abstract: Lipoygenase (LOX) can catalyze the oxidation of polyunsaturated fatty acids and their esters containing the *cis*, *cis*-1,4-pentadiene moiety to the corresponding hydroperoxides. The effect of exogenous Ba^{2+} on the conformation and catalytic performance of LOX on soybean oil was observed. The addition of exogenous Cu^{2+} in LOX solvent strengthened the absorbance A_{360} in UV spectrum from 0.1 to 0.4. Exogenous Ba^{2+} could quench the fluorescence excitation spectra of LOX slightly (by 1.2%). When the addition concentration of Ba^{2+} was $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, the total yield of soybean oil hydroperoxide catalyzed by LOX increased from 8% to 18%.

Keywords: Lipoygenase; Ba^{2+} ; Conformation; Hydroperoxide

大豆脂肪氧合酶(1ipoygenase, EC1.13.11.12, LOX), 又称脂氧酶, 脂氧酶分布广泛, 以大豆中活力最高, 因其廉价易得而具有较好的工业利用价值。LOX 能好氧催化具备 *cis*, *cis*-1,4-戊二烯结构的多不饱和脂肪酸及其酯, 形成具有共轭双键的氢过氧化衍生物。

LOX 属金属酶, 金属酶的活性往往受体系外源金属离子的影响, 它们在酶催化反应中发挥着举足轻重的作用。外源金属可以通过影响底物与活性部位的结合、调节氧化还原过程或静电稳定屏蔽负电荷等途径作用于酶的催化反应。通常每分子大豆 LOX 中含有一分子内源性的二价 $\text{Fe}(\text{II})$, 该铁对 LOX 的酶活和催化机制起着至关重要的作用。蔡琨等^[1]报道了外源铁离子对 LOX 的活性及其酶促反应具有明显的促进作用, 可以缩短该酶促反应的滞后期, 并伴有对活性中心铁的电子传递过程, 由此对 LOX 的反应机制作了补充工作。蔡燕等^[2]报道了外源铜离子与 LOX 活性中心铁的交换作用, 并用新型指示剂测定了置换率, 定性并定量证明了 LOX 中心铁与外源铜离子之间存在着置换作用。对于金属酶来说, 不同金属离子对其影响不同。研究各种金属离子对 LOX 的影响, 也有利于进一步揭示其催化机理。其他金属离子对 LOX 的活性及催

化性能的影响尚未见讨论。

二价金属离子通过多种方式对金属酶的催化起着重要作用。作者利用紫外吸收光谱发现二价钡离子也能与铁离子和铜离子对 LOX 的作用类似, 有较强的增强作用。因此本文对外源金属钡离子对大豆脂肪氧合酶的紫外和荧光光谱的影响进行了测定并考察了其好氧催化豆油体系反应产率的影响, 旨在为大豆脂肪氧合酶的进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆 LOX ($70\text{ }600\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, Sigma); 大豆(黑农 37, 2011 年产于吉林省); 非转基因大豆油(皂化价为 $191\text{ mg}\cdot\text{KOHg}^{-1}$, 酸价为 $0.16\text{ mg}\cdot\text{KOHg}^{-1}$); 过氧化氢异丙苯(质量分数 80%, Sigma 公司); 2,6-叔丁基-4-甲基酚(BHT), BaCl_2 , 浓硫酸(98%), 二甲酚橙(AR, 国药集团化学试剂有限公司); 超纯水(电导率为 $0.078\text{ }\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, 25°C); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析); RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司)。

1.2 方法

1.2.1 紫外和荧光光谱测定 在 25 mL 容量瓶中

收稿日期:2015-08-14
基金项目:江苏省青年自然科学基金(BK20150401);江苏省高校自然科学研究面上项目(15KJB530010)。
第一作者简介:蔡燕(1983-),女,博士,讲师,主要研究方向为酶催化研究。E-mail:Yancai2010@ntu.edu.cn。
通讯作者:吴锦明(1958-),男,博士,教授,主要从事有机合成研究。E-mail:wjm@ntu.edu.cn。

加入不同浓度的钡离子为效应物,于20℃恒温水浴中预热30 min后,加入适量LOX酶液,放置30 min后测定其紫外和荧光光谱。

荧光光谱测量时,激发光栅和发射光栅狭缝宽均设为5 nm,激发狭缝宽度为3 nm,激发波长为280 nm。石英比色皿1 cm×1 cm×4 cm。测定300~450 nm范围内的荧光发射光谱。

1.2.2 外源Ba²⁺离子对脂肪氧合酶催化大豆油反应的影响 以适量乙醇和pH6的磷酸缓冲液稀释1.5 g大豆油,加入不同浓度的金属离子为效应物,

于15℃恒温水浴中预热5 min后,通入15 mL·min⁻¹氧气5 min,再加入8 mL酶液。反应一定时间后用1 mol·L⁻¹硫酸调节pH至3,用乙醚萃取产物。

1.2.3 氢过氧化亚油酸及其酯的含量测定 用二甲酚橙法测定产物中氢过氧化物的含量^[3]。样品吸光度测量值与过氧化氢异丙苯标准曲线对照求得氢过氧化物的摩尔量,并计算出氢过氧化物的得率。所有单因素分析的实验点相对误差在2%以内。过氧化氢异丙苯标准曲线如图1所示。

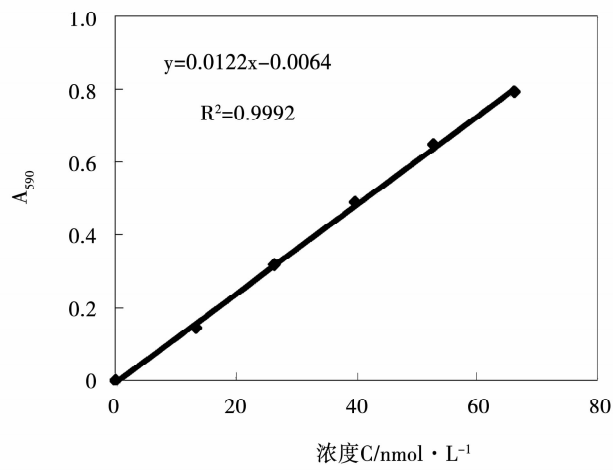


图1 氢过氧化异丙苯的标准曲线
Fig. 1 Calibration of cumene hydroperoxide

2 结果与讨论

2.1 外源Ba²⁺离子对脂肪氧合酶紫外吸收的影响 自然状态下的脂氧酶的紫外光谱与普通蛋白质类似。一般认为脂氧酶溶液中Fe³⁺-LOX的量与紫外吸收光谱上330~400 nm之间的吸光度线性相关,且360 nm处的吸光度是铁与LOX的结合引起的^[4-5]。

如图2所示,表示一定浓度范围内金属Ba²⁺离子加入后引起LOX紫外图谱在360 nm处的变化情况。当用外源Ba²⁺离子滴定脂氧酶溶液时,LOX的紫外吸收随着金属Ba²⁺离子加入浓度的上升而增强。在Ba²⁺离子浓度加入量为0.75 mmol·L⁻¹时,A₃₆₀从初始的0.1升高至0.4。说明Ba²⁺离子与LOX发生了相互作用。

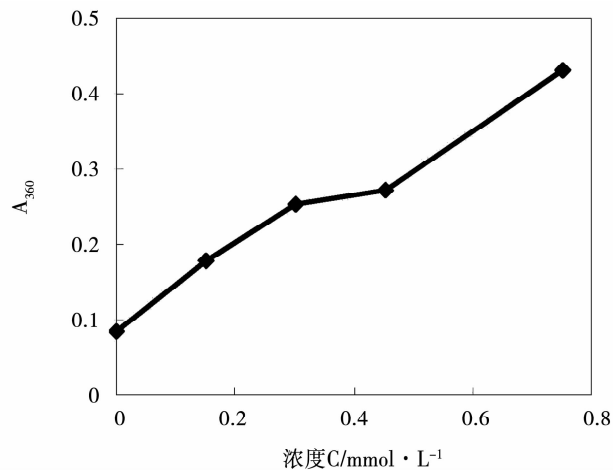


图2 外源金属离子Ba²⁺对脂肪氧合酶紫外吸收A₃₆₀的影响
Fig. 2 Effect of exogenous Ba²⁺ on the absorbance of lipoxigenase at A₃₆₀

2.2 外源 Ba²⁺ 离子对脂肪氧合酶紫外吸收影响的时间变化

由图 3 可知,随着外源金属 Ba²⁺ 离子的加入,还可观察到脂氧酶 A₃₆₀处吸光度随时间不断增大的过程。这个变化在加入金属 Ba²⁺ 离子后的初始 5 s

内尤其明显,随着时间的延长增强速度放缓。在加入 1 min 后 A₃₆₀到达峰值,时间继续延长吸光度不再发生明显改变。这反映了 Ba²⁺ 离子与脂氧酶溶液相互作用的动态过程。

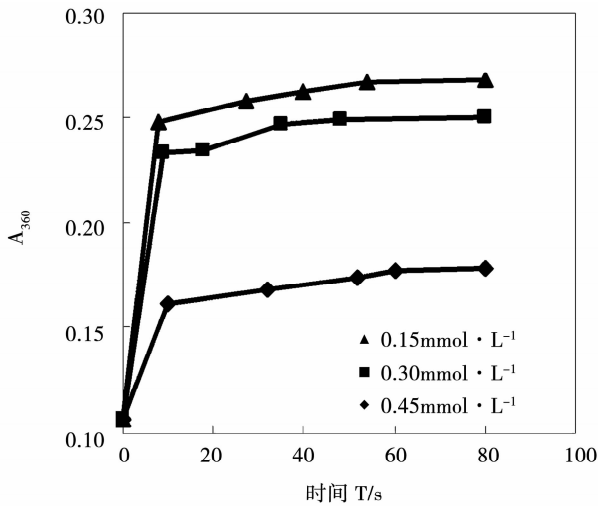


图 3 外源 Ba²⁺ 离子对脂肪氧合酶 A₃₆₀ 的时间变化影响

Fig.3 Time dependence of A₃₆₀ in the presence of exogenous Ba²⁺

2.3 外源 Ba²⁺ 离子对脂肪氧合酶荧光光谱的影响

脂氧酶属内源性荧光物质,它包含有布满整条肽链的 37 个酪氨酸(Tyr)和 13 个色氨酸(Trp)。脂肪氧合酶的荧光发射图谱如图 4a 所示,该荧光图谱与文献结果相似,发射峰值位于波长 330nm 处^[6-7]。将不同浓度的外源 Ba²⁺ 离子溶液与脂氧酶作用 1 h 后测定相应的荧光光谱图。发现 Ba²⁺ 离子对脂氧酶不产生荧光猝灭作用,也没有使其峰值发生偏

移,即外源 Ba²⁺ 离子对 LOX 的发射峰影响甚微,如图 4b 所示。与自然态的脂氧酶相比,与外源 Ba²⁺ 离子相互作用过后的脂氧酶在 330 nm 处的荧光发射峰值约下降了 1.2%,从谱图上看与自然态脂氧酶几乎重合。说明外源 Ba²⁺ 离子的加入并没有改变脂氧酶中酪氨酸和色氨酸在溶液中的裸露程度。

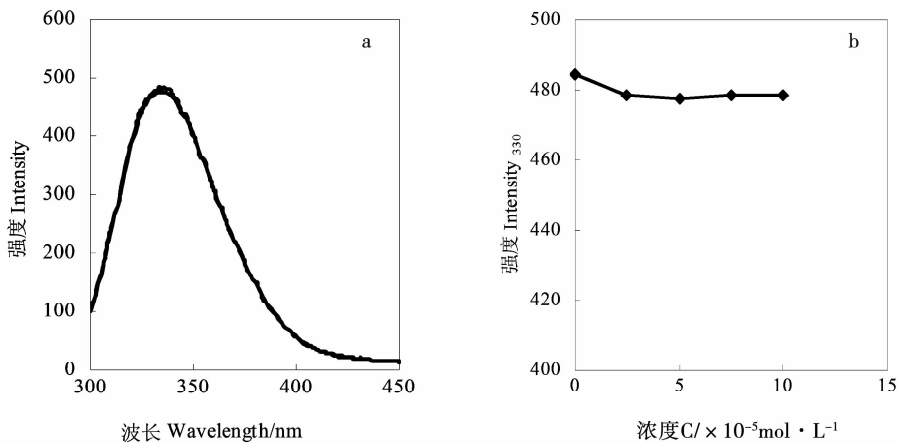


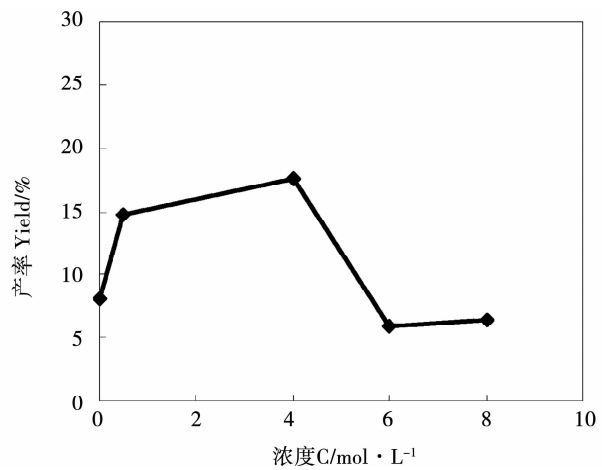
图 4 外源金属 Ba²⁺ 离子对脂氧酶荧光发射图谱的影响

Fig.4 Effects of exogenous Ba²⁺ on the fluorescence excitation spectra of lipoxygenase

2.4 外源 Ba²⁺ 离子对脂肪氧合酶催化豆油反应的影响

考察外源金属 Ba²⁺ 离子对脂氧酶催化豆油体系的影响。结构表明随 Ba²⁺ 浓度的增大,其对氢过氧化大豆油产率的影响呈非单调关系,表现为先增

大后降低。在 Ba²⁺ 离子加入浓度为 4 mmol · L⁻¹ 时,体系产率从 8% 提高至 18%,影响显著。但随着 Ba²⁺ 离子浓度的进一步提高,氢过氧化大豆油产率转为下降的趋势。



体系参数:1.5 g 豆油, 8 mL 酶液, 0.5 mL 酒精, pH 6 磷酸盐溶液, 1% ED-
TA, 100 min,15℃。

System parameter:1.5 g oil, 8 mL enzyme liquid, 0.5 mL ethyl alcohol, pH6
phosphate solution, and 1% EDTA, for 100 min at 15℃.

图5 外源金属 Ba²⁺ 离子对氢过氧化大豆油产率的影响
Fig.5 Effects of Ba²⁺ concentration on the LOX
catalyzed reaction on soybean oil

3 结 论

外源金属 Ba²⁺ 离子能使脂肪氧合酶在 360 nm 特征吸收处的吸光度大幅上升,在加入量为 0.75 mmol·L⁻¹时,A₃₆₀从初始的 0.1 升高至 0.4。利用紫外吸收光谱还能观察到 Ba²⁺ 离子与 LOX 的动态作用过程。但 Ba²⁺ 离子对 LOX 的荧光发射谱图影响甚微,与原始态 LOX 谱图几乎重合,在 330 nm 发射峰值处约仅下降了 1.2%。说明 Ba²⁺ 离子的加入并没有改变脂氧酶中酪氨酸和色氨酸在溶液中的裸露程度。在 Ba²⁺ 离子加入浓度为 4 mmol·L⁻¹时,LOX 好氧催化豆油体系的产率从 8% 提高至 18%,影响显著。但这种影响呈非单调关系,因此钡离子的加入量与对体系氢过氧化物产率的影响息息相关。本文证实了钡离子与脂氧酶之间确实存在着相互作用,且适量钡离子的加入能大幅提高脂氧酶的反应产率。但两者之间具体的作用方式有待进一步研究。

参考文献

[1] Cai K, Fang Y, Xia Y M, et al. Effect of exogenous iron on aerobic catalytic mechanism of soybean lipoxygenase[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004,32:21-26.

[2] Cai Y, Xu H, Xia YM, et al. The proof of the displacement of endogenous Fe(II) of lipoxygenase by exogenous Cu²⁺ [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2010, 162(4): 1147-1152.

[3] Gay C, Collins J, Gebicki JM. Hydroperoxide assay with the ferric xylene orange complex [J]. Analytical Biochemistry, 1999, 273: 149-155.

[4] Schilstra M J, Veldink G A, Vliegthart J F G. The dioxygenation rate in lipoxygenase catalysis is determined by the amount of iron(III) lipoxygenase in solution[J]. Biochemistry, 1994, 33: 3974-3979.

[5] Goldsmith C R, Jonas R T, Stack T D P. C-H bond activation by a ferric methoxide complex: Modeling the rate-determining step in the mechanism of lipoxygenase [J]. Journal of the American Chemical Society, 2002, 124(1): 83-96.

[6] Navaratnam S, Feiters MC, Al-Hakim M, et al. Iron environment in soybean lipoxygenase-1 [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1988, 956: 70-76

[7] Finazzi A A, Avigliano L, Egmond M R, et al. Fluorescence perturbation in soybean lipoxygenase-1[J]. FEBS Letters, 1975, 52(1): 73-79.