



豆浆脂肪氧合酶测定方法的优化及酶动力学研究

夏 宁^{1,2}, 王晓琪², 严文冰², 章智华³, 郭 爽², 杨文君², 赵 雪², 石彦国¹

(1. 哈尔滨商业大学 食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 东北农业大学 大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 华南理工大学 食品科学与工程学院, 广东 广州 510641)

摘 要: 本文以前人所确定的大豆中 LOX 酶活力测定方法为基础, 对生豆浆中 LOX 活力测定方法进行稳定性方面的优化, 研究热处理过程、不同浓度豆浆对 LOX 活力的影响, 并确定 LOX 的最大反应速率、米氏速率常数和不同金属离子抑制剂及激活剂等酶反应动力学参数, 研究结果表明: 待测样品稀释 300 倍时, LOX 活力值的变化趋势较为明显, 且结果稳定; 对 10 个不同地域大豆进行制浆, 在 300 倍稀释倍数下测定不同加热温度的豆浆发现, LOX 活力在 40℃ 时最高, 当加热至 80℃ 时完全失活, 故选择对 LOX 测定方法进行样品稀释 300 倍, 加热至 40℃ 的优化处理。优化后的方法较其它已报到方法相比, 能够快速、准确地测出不同豆种所制豆浆中 LOX 活力值, 且试验结果重复性好, 稳定性高。通过对 LOX 酶促反应动力学研究, 确定了 LOX 酶促反应最大反应速率 $V_{\max} = 1.99 \Delta A \cdot \min^{-1}$, $R^2 = 0.9428$, 米氏速率常数 $K_m = 452.49 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 金属离子中, 钙离子、镁离子对 LOX 起抑制作用, 当锌离子在浓度为 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 LOX 起抑制作用, 而当锌离子浓度大于 $0.004 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 则对 LOX 起激活作用。

关键词: 豆浆; 大豆脂肪氧合酶(LOX); 酶促反应动力学; 抑制剂; 激活剂

Method Optimization for the Determination of Lipoygenase in Soybean Milk and the Evaluation of Its Kinetics

XIA Ning^{1,2}, WANG Xiao-qi², YAN Wen-bing², ZHANG Zhi-hua³, GUO Shuang², YANG Wen-jun², ZHAO Xue², SHI Yan-guo¹

(1. School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Key Laboratory of Soybean Biology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 3. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: Based on the method of determining the activity of LOX enzyme in soybean, we optimized the stability of the method of determining the activity of LOX in raw soybean milk, and studied the effect of heat treatment and different concentration of soybean milk on the activity of LOX in this paper. The maximum reaction rate of LOX, the Michlet rate constant and the kinetic parameters of enzyme reaction such as different metal ion inhibitors and activators were determined. The results showed that the change trend of LOX activity was obvious when the sample was diluted 300 times. The results were stable, and the results of soybean pulping in 10 different regions were determined at 300 times dilution times by different heating temperatures. The activity of LOX in soybean milk was highest at 40℃ and completely inactivated when heated to 80℃. Compared with other reported methods, the optimized method can measure the activity of LOX in soybean milk of different soybean varieties quickly and accurately, and the experimental results are reproducible and stable. By studying the kinetics of enzymatic reaction of LOX, the maximum reaction rate of LOX was determined: $V_{\max} = 1.99 \Delta A \cdot \min^{-1}$, $R^2 = 0.9428$, $K_m = 452.49 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. In metal ions, Ca^{2+} and Mg^{2+} had an inhibitory effect on LOX. At the concentration of $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the LOX was inhibited, and when the concentration of zinc ion was greater than $0.004 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the LOX was activated.

Keywords: soybean milk; LOX; Enzymatic reaction kinetics; Inhibitors; Activator

大豆中含有丰富的蛋白质, 且氨基酸组成与人体必需氨基酸的组成接近, 是优质的食物蛋白质来源。近年来, 大豆制品的保健功能越来越受到人们的关注, 豆浆作为豆制品的常见品种, 蛋白质含量高, 质量好,

且不含有胆固醇, 可以有效降低总胆固醇和低密度脂蛋白, 从而减少动脉硬化的发生, 预防心血管疾病。但大豆制品特有的豆腥味限制了大豆的应用市场, 部分消费者对大豆的豆腥味十分反感, 因此对于大豆风味

收稿日期: 2018-06-15

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0101302-5); 黑龙江省科学基金(C2018026); 辽宁省肉类加工与质量安全控制工程技术研究中心开放课题(2018001)。

第一作者简介: 夏宁(1981-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事大豆蛋白与农产品加工研究。E-mail: xianing1981@126.com。

通讯作者: 石彦国(1960-), 男, 博士, 教授, 博导, 主要从事大豆加工研究。E-mail: yangguosh@163.com。

的研究一直都是国内外相关领域研究的热点。

1932年 Andre 和 Hou 发现大豆中的脂肪氧合酶(LOX)的催化作用是造成大豆产生豆腥味的主要原因^[1],1947年 Theorell 等首次以大豆为原材料提取到了 LOX 的结晶^[2]。脂肪氧合酶催化多不饱和脂肪酸和脂肪酸酯的氧化还原反应,会生成氢过氧化物。生成的氢过氧化物会再降解成多种低分子醇、醛、酮、酸和胺等挥发性成分,由于这些小分子化合物大都具有不同程度的异味,并且在这个催化反应中产生的自由基会攻击食品中的一些成分,如维生素、酚类物质和蛋白质等,从而对大豆的风味产生一定的影响^[3]。

目前去除豆腥味的主要手段有加热处理、微波照射、改变介质的 pH、有机溶剂萃取和水解酶处理等^[4],而其主要是为了钝化或抑制 LOX,以改善产品风味。酶活力的测定是风味研究中的重要环节,LOX 活力测定大多采用石胜尧等^[5-6]的酶活力测定方法,将该测定方法应用于本研究经生浆法加工所得豆浆的酶活力测定中,发现酶提取液透明度低,检测结果重现性差。在 LOX 的抑制与激活方面,郑兵福等^[7]研究结果表明使用金属络合剂等,对脂肪氧合酶的抑制效果较好,可以大大降低脂肪氧合酶的活性。

因此,本文以东农 42 为原料制备成的豆浆作为研究对象,对 LOX 活力的测定方法进行优化,通过测定 10 个不同区域大豆品种制浆后加热至不同温度时的 LOX 活力,验证优化后测定方法的稳定性。研究 LOX 的最大反应速率、米氏速率常数和不同金属离子对 LOX 活力的影响等,最终确定并完善 LOX 的酶促反应动力学。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料与主要试剂 大豆品种为东农 42、东农 47、东农 56(东北农业大学大豆研究所);黑农 48、黑农 64(黑龙江农科院大豆研究所);郑豆 0163、郑豆 94059(河南省农科院棉油所);齐黄 36(山东省农业科学院作物研究所);邯豆 5(河北省邯郸市农业科学院);冀豆 23(河北省农科院粮油作物所);润豆 1(黑龙江省宾县庆丰农业科学研究所)。

甲醇(美国 DIKMA 公司),亚油酸(Sigma 公司),Tris(Thermo Scientific),无水甲醇、吐温-20、 Na_2HPO_4 、NaOH 等(天津)。

1.1.2 仪器设备 CH-8606 电子分析天平(瑞士 Mettler Instrumente AG 公司),752 紫外可见分光光度计(上海悦丰仪器仪表有限公司),数显恒温油浴锅 HH-4S(大龙兴创实验仪器有限公司),Eppendorf Centrifuge 5417R 离心机(德国艾本德股份公司)。

1.2 试验设计

1.2.1 检测 LOX 活力最佳稀释浓度的确定 通过单因素试验确定检测 LOX 活力的最佳稀释倍数。将离心后豆浆的上清液分别稀释 100 倍、200 倍、300 倍、400 倍和 500 倍,检测并计算酶活力值。每个稀释倍数进行 3 次重复试验。

1.2.2 不同加热温度对 LOX 酶活性的影响 预冷离心机 20 min,设定离心机的参数为 $9\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4°C , 30 min。将于各温度(20,30,40,50,60,70,80 $^\circ\text{C}$)移取的豆浆样品制成的样品及时离心,取离心后上清液 10 μL 、亚油酸底物 100 μL 、缓冲溶液 800 μL 于干燥洁净的烧杯中,加入稀释 300 倍所需要的蒸馏水量,在 234 nm 下观察分光光度值的变化,每隔 60 s 记录 1 个数据,计算酶活力值。每个温度点进行 3 次重复试验。

1.2.3 优化的 LOX 酶活力测定方法的稳定性检验 采用 10 个不同区域种植的大豆品种,生浆法制备豆浆,并分别加热至不同温度点取样,测定不同温度时,豆浆样品中的 LOX 活力,验证经优化得到的 LOX 酶活力,确定方法的结果稳定性。

1.2.4 LOX 酶米氏常数及酶促反应最大反应速率的测定 分别配制浓度为 1.00,1.25,1.75,2.00,2.25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚油酸溶液,在低温避光环境下保存。分别取不同浓度的亚油酸底物 100 μL ,常温下的上清液 30 μL ,磷酸氢二钠盐溶液 2 mL 于干燥洁净的烧杯中,充分混匀,在 234 nm 下观察分光光度值的变化,每 10 s 记录一个数据。每个浓度进行 3 次重复试验。

1.2.5 豆浆中 LOX 酶促反应动力学的完善 准确称取 15 g 东农 42,料液比 1:3。分别加入蒸馏水;0.02,0.04,0.06 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化钙溶液;0.002,0.006,0.020 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化镁溶液;0.002,0.004,0.006 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸锌溶液,浸泡 12 h,记为样品 1~10,随后以料水比 1:7 加入蒸馏水用料理机进行打浆。在室温条件下移取 2 mL 浆液于 2 mL 离心管中,置于 4°C , $9\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下的离心机中离心 30 min。取离心后上清液 30 μL ,亚油酸底物 100 μL ,缓冲溶液 800 μL ,蒸馏水 1 600 μL ,在 234 nm 下观察分光光度值的变化,每隔 5 s 记录一个数据。每个样品进行 3 次重复试验。

1.3 方法

1.3.1 溶液的配制

(1)分离缓冲液的配制

准确称取 Tris 7.68 g,硼酸 0.38 g 和 EDTA 1.85 g,用蒸馏水定容至 100 mL,得到 Tris-硼酸缓冲液。

(2)反应缓冲液的配制

准确称取 1.11 g 氯化钠和 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.38 g,用蒸馏水定容至 100 mL,得到硼酸钠缓冲溶液。

(3)底物的配制

取 113 μL 的亚油酸盛于 10 mL 的容量瓶中,用

无水甲醇定容。待亚油酸充分溶解后,取 3.48 mL 于锥形瓶中,加入 44 μL 吐温-20。然后加入 50 mL 0.05 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 溶液,最后用 1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液调至 pH9。由于甲醇的含量小且易挥发不会对试验效果产生过大影响。此时亚油酸浓度为 2.52 mmol·L⁻¹。

1.3.2 豆浆样品的制备 准确称取 15 g 东农 42, 用自来水洗去大豆中的沙粒、小石子等杂物,重复漂洗 3 次,再用蒸馏水清洗两次,料水比 1:3 浸泡 12 h, 随后以料水比 1:7 加入蒸馏水用料理机进行打浆,磨浆后再用 80 目滤网过滤取浆^[8]。

在室温条件下先移取 2 mL 浆液于 2 mL 离心管中,置于冰盒中冷藏待用,再移取 2 mL 浆液于进样瓶中待用;然后加热剩余的豆浆样品,分别在 30, 40,50,60,70,80℃ 移取 2 mL 浆液于 2 mL 离心管中,置于相同的冰盒中冷藏待用,另移取 2 mL 浆液于进样瓶中待用。每个温度梯度取 3 个样品。

1.3.3 含激活剂和抑制剂粗酶的提取 准确称取 15 g 东农 42,10 份,标记为样品 1~10,料液比 1:3, 分别加入蒸馏水和相应浓度的金属离子溶液,浸泡 12 h,随后以料水比 1:7 加入蒸馏水用料理机进行打浆。在室温条件下移取 2 mL 浆液于 2 mL 离心管中,置于 4℃, 9 000 r·min⁻¹ 条件下的离心机中离心 30 min。

1.3.4 测定项目与方法

(1) LOX 活力的测定

取离心后上清液 10 μL、亚油酸底物 100 μL、缓冲溶液 800 μL 于干燥洁净的烧杯中,加入稀释倍数所需要的蒸馏水量,在 234 nm 下观察分光光度值的变化,每隔 60 s 记录 1 个数据。酶活力计算公式如下:

$$LOX = \frac{[(A_4 - A_3) - (A_2 - A_1)] \times V_1}{(W \times V_2 / V_3) \times T} \times 1\,000 \quad (1)$$

其中:V₁表示反应总体积;V₂表示加入反应体系中上清液的体积;V₃表示离心后上清液总体积;W 表示样本质量,0.042 g;T 表示反应时间,1 min 单位为 U·g⁻¹。

(2) 米氏常数及酶促反应最大反应速率的测定

将配制好的 2.25 mmol·L⁻¹ 的亚油酸溶液分别稀释为 1.00,1.25,1.75,2.00,2.25 mmol·L⁻¹。取稀释后的亚油酸底物 100 μL,30 μL 常温下的上清液,2 mL 磷酸氢二钠盐溶液于干燥洁净的烧杯中,充分混匀,在 234 nm 下观察分光光度值的变化,每 10 s 记录一个数据。

2 结果与分析

2.1 测定 LOX 最佳稀释倍数的确定

从表 1 中可以看出,将离心后的酶液稀释 100 倍时,随着温度的不断升高,酶活力值呈先上升后下降的趋势,在 20~70℃,LOX 的活力值不断上升,70℃ 时酶活力值达到最高,当温度达到 80℃ 时,检测出的 LOX 活力值为-10 714.29 U·g⁻¹。将离心后的酶液稀释 200 倍时,随着温度的不断升高,酶活力值的变化趋势与稀释 100 倍时接近,但是酶活力值最高温度点为 60℃。当稀释倍数达到 400 倍时,酶活力数值随着温度的上升呈现逐渐下降的趋势,在 30~40℃ 范围内,LOX 活力略有升高,但 40℃ 时酶活力值仅为 657 142.86 U·g⁻¹,远低于该稀释倍下 20℃ 时 LOX 的活力值(900 000 U·g⁻¹),酶活力数值整体偏低;稀释倍数为 500 倍时,酶活力值变化情况与 400 倍接近。当稀释倍数在 300 倍时,LOX 活力变化趋势较为明显,且检测出来的溶液吸光值也在正常范围内,吸光值的变化速度也较为平缓,因此,本研究中所测酶活均采用 300 倍的稀释倍数,以此稀释倍数探究不同加热温度对 LOX 活力的影响。

表 1 不同稀释倍数的豆浆中 LOX 活力

Table 1 LOX activity in soybean milk with different dilution times (U·g⁻¹)

温度 Temperature/℃	稀释 100 倍 100 times dilution	稀释 200 倍 200 times dilution	稀释 300 倍 300 times dilution	稀释 400 倍 400 times dilution	稀释 500 倍 500 times dilution
20	44642.86	375000.00	998910.71	900000.00	464285.71
30	35714.29	92857.14	1046196.40	628571.43	508928.57
40	101785.71	425000.00	1341732.10	657142.86	633928.57
50	157142.86	457142.86	1004821.40	407142.86	642857.14
60	164285.71	467857.14	845232.14	142857.14	642857.14
70	225000.00	171428.57	70928.57	78571.43	116071.43
80	-10714.29	17857.14	0	-42857.14	142857.14

2.2 不同加热温度对 LOX 活力的影响

由图 1 可知,将豆浆中的 LOX 稀释 300 倍后,检测出来的 LOX 活力值随着温度的升高呈现出先上升后逐渐下降的趋势。当加热温度为 40℃ 时,豆浆中的 LOX 活力达到最高值1 341 732.1 U·g⁻¹,说明东农 42 大豆中 LOX 的最适温度为 40℃。且当加热至 50℃ 时,得到的 LOX 活力值与 20℃ 较为接近,由此可以说明东农 42 大豆中 LOX 最适作用温

度为 20~50℃,当加热温度超过 50℃ 以后,LOX 的活力逐渐降低,尤其在加热温度从 60℃ 上升到 70℃ 过程中,LOX 的活力降低幅度最大。当加热温度为 80℃ 时,酶活力值为 0,即在该温度下豆浆中的 LOX 彻底失活。因此本试验在测定 LOX 酶活性时采用将酶液稀释 300 倍并加热至 40℃ 的优化处理。这一结果表明了不同加热温度对东农 42 大豆中 LOX 活力的影响。

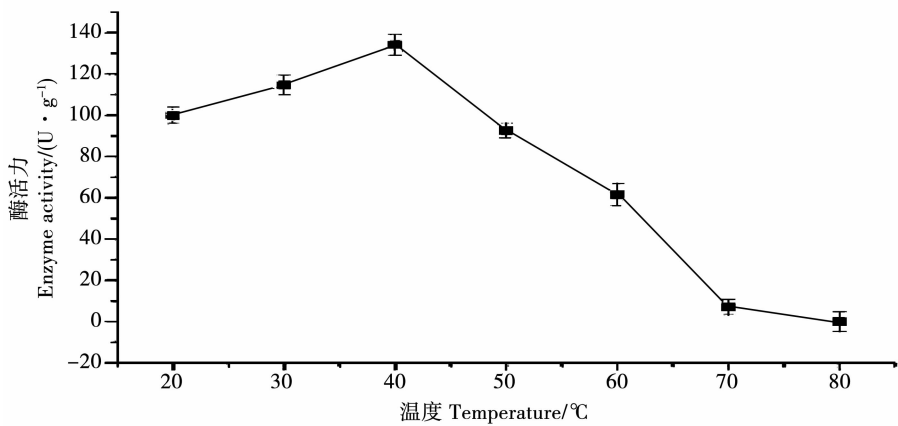


图 1 不同加热温度下豆浆中 LOX 的活力

Fig. 1 LOX activity in soybean milk with different heat temperatures

2.3 优化的 LOX 检测方法稳定性检验

本研究进一步选取十个高油和高蛋白大豆品种,采用优化方法测定在不同温度下的豆浆 LOX 活力值,由试验结果(表 2)可知,采用优化后的方法测

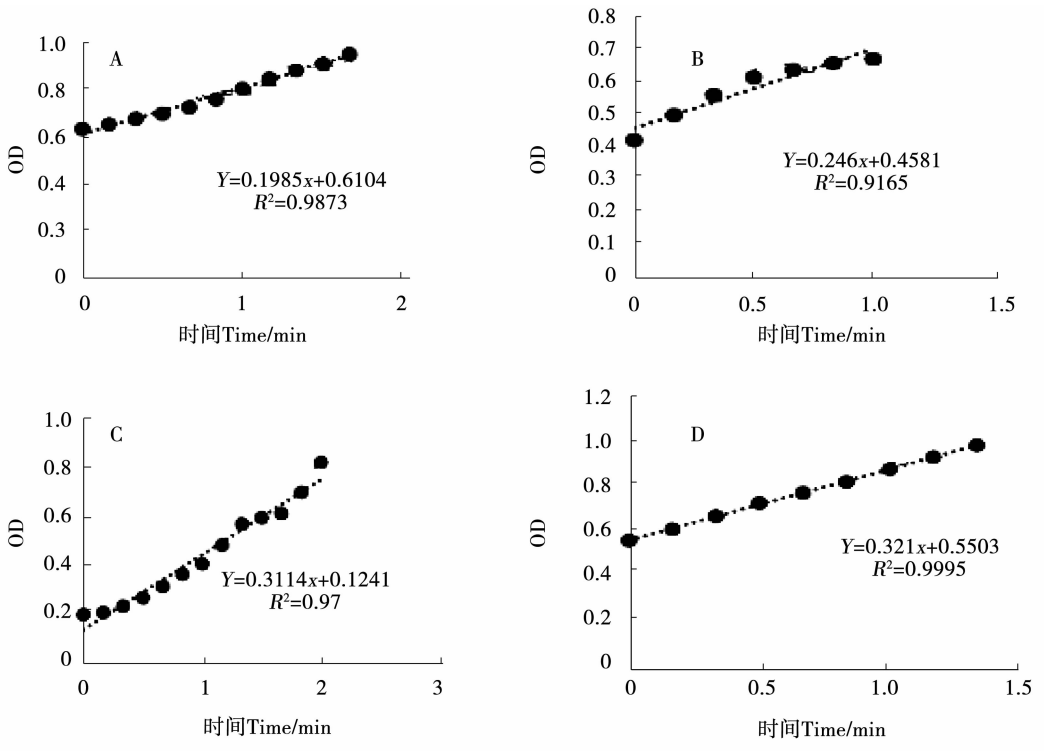
定豆浆中的 LOX 活力值都在可控范围内,同时试验结果的重现度较高。因此,优化后的酶活力测定方法具有一定的可行性,但针对不同的 大豆品种,稀释倍数应做适当的调整。

表 2 热处理对 10 种大豆豆浆中 LOX 酶活力的影响
Table 2 Effect of heat treatment on LOX enzyme activity in soybean milk (U·g⁻¹)

品系 Variety	20℃	30℃	40℃	50℃	60℃	70℃	80℃
东农 47 Dongnong 47	1085680	1165120	1251180	946660	594400	39720	- 46340
东农 56 Dongnong 56	1477679	1714107	1761393	1243399	847360	182411	- 94571
黑农 48 Heinong 48	1329571	1545714	1761241	1255268	778643	36482	0
黑农 64 Heinong 64	1255964	1456446	1607375	1324964	722071	65500	- 41375
郑豆 0163 Zhengdou 0163	1126571	1294786	1387571	1056571	382411	5589	- 24321
郑豆 94059 Zhengdou 94059	1214540	1387080	1457800	1060600	281160	2320	- 2781
齐黄 36 Qihuang 36	1507960	1686700	1811780	1340360	280460	2960	- 46340
邯豆 5 Handou 5	1420143	1685643	1798429	1280179	349214	1857	- 65018
冀豆 23 Jidou 23	1366571	1487054	1522071	1067911	318179	5589	- 2205
润豆 1 Rundou 1	1274705	1459480	1548010	1092085	351640	2150	- 13620

2.3.1 动力学参数 由图 2 可知,在温度、pH、上清液浓度一定的情况下,上述 4 种底物的酶促反应

的反应速率为 0.198 5,0.246 0,0.311 4,0.321 0 $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ 。



A、B、C、D 亚油酸底物浓度分别为 1.00,1.25,1.75 和 2.00 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。
A、B、C、D indicate the linoleic acid concentration of 1.00,1.25,1.75 and 2.00 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

图 2 不同亚油酸底物浓度时吸光值随时间的变化图

Fig. 2 The changes of absorbance value with time at different linoleic acid concentration

利用双倒数的方法,以酶促反应速率的倒数对相应的底物浓度的倒数作图,如图 3,得到回归方程: $1/v = 227.33 (1/s) + 0.503$, $R^2 = 0.9428$ 。X 和 Y 轴上的截距分别代表米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (V_{\max}) 的倒数^[11]。根据米氏方程式:

$$\frac{1}{v} = \frac{k_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

可求出脂肪氧化酶酶促反应的米氏速率常数为 $452.49 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,最大反应速率为 $1.99 \Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ 。

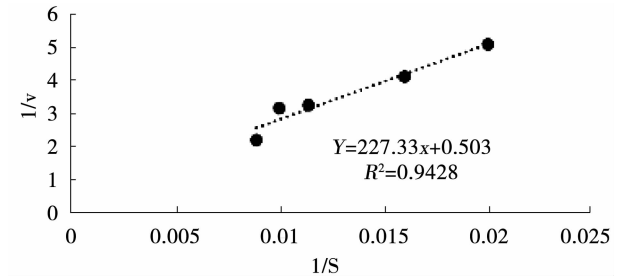


图 3 豆浆中 LOX 酶促反应赖氏方程图

Fig. 3 Reich equation diagram of LOX enzymatic reaction in soybean milk

2.3.2 豆浆中 LOX 酶促反应动力学的完善 根据 2.3.1 中的公式计算不同金属离子加入下 LOX 的活力值,由表 3 可知,在豆浆中添加氯化钙,降低了酶反应速率;当氯化钙的浓度为 $0.02, 0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对 LOX 的酶活力的抑制效果较为明显,其中浓度为 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,LOX 的酶活力值达到最低值 $203.956 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,而在浓度升高到 $0.06 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,酶活力值与对照样品的酶活力值较为接近,抑制效果明显降低。由此说明,在 $0.02 \sim 0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,氯化钙抑制剂对东农 42 籽粒中的 LOX 活力的抑制效果较好。

由表 4 可知,在豆浆中添加氯化镁,同样降低了酶反应速率,且抑制效果优于氯化钙。随着氯化镁浓度由 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 升高到 $0.020 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,LOX 的酶活力值逐渐降低,在 $0.020 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最低值 $257.853 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,且低于添加同浓度的氯化钙时的酶活力值。

由表 5 可知,不同浓度的锌离子对 LOX 作用效果不同,当锌离子的浓度为 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对 LOX

起抑制作用;当浓度升高到 0.004, 0.006 mol·L⁻¹时, LOX 的酶活力值升高较明显, 锌离子起激活作用。

由此可见, 不同的金属离子及其浓度, 对豆浆中脂肪氧合酶酶活的影响不同。钙离子、镁离子对大豆脂肪氧合酶起抑制作用, 锌离子在浓度为 0.002 mol·L⁻¹时, 对大豆 LOX 起抑制作用;当锌离子浓度大于 0.004 mol·L⁻¹时, 则起激活作用。

表 3 钙离子对大豆脂肪氧化酶酶活的影响

Table 3 Effects of calcium ion on the activity of lipoxygenase in soybean		
浓度 Concentration /(mol·L ⁻¹)	酶活 Enzyme activity /(U·g ⁻¹)	影响效果 Influence effect
0.02	299137	抑制
0.04	203956	抑制
0.06	63453	抑制
0	647302	

表 4 镁离子对大豆脂肪氧化酶酶活的影响

Table 4 Effects of magnesium ions on the activity of lipoxygenase in soybean		
浓度 Concentration /(mol·L ⁻¹)	酶活 Enzyme activity /(U·g ⁻¹)	影响效果 Influence effect
0.002	351319	抑制
0.006	330935	抑制
0.020	257853	抑制
0	647302	

表 5 锌离子对大豆脂肪氧化酶酶活的影响

Table 5 Effects of zinc ions on the activity of lipoxygenase in soybean		
浓度 Concentration /(mol·L ⁻¹)	酶活 Enzyme activity /(U·g ⁻¹)	影响效果 Influence effect
0.002	361813	抑制
0.004	750809	激活
0.006	709856	激活
0	647302	

3 讨论

研究发现 LOX 的最适反应温度为 20~40℃, 当温度大于 80℃时会出现失活的现象^[9], 本研究表明当稀释 100 和 200 倍时酶活力最高的温度为 60℃, 所得最高温度并不在 LOX 最适反应温度内, 由此可以说明稀释倍数为 100 和 200 倍时试验误差较大, 这可能主要是因为稀释的倍数过低, 稀释后的溶液

中 LOX 的浓度过高, 导致溶液的吸光值较大, 且变化速度快, 记录中会存在较大的误差, 造成较大的试验误差。当稀释倍数为 400 和 500 倍时, 酶活力数值整体偏低。这可能是因为稀释倍数过高, 稀释后的溶液中 LOX 的浓度过低, 使得检测溶液的吸光值很小, 随着温度的升高, 会很快出现在检测的 1 min 内吸光值几乎没有变化或者吸光值减小的现象, 从而导致计算得出的酶活力数值偏小, 由此造成酶过早地出现“失活”的假象。

当稀释倍数为 300 倍时, 在 20~50℃ 范围内, 随着温度的不断上升, 参与反应的活化分子数逐渐增多, 从而使得反应速率加快, 由此促进了 LOX 的活力。但是 LOX 的本质是具有生物催化活力的蛋白质, 随着温度的不断增加, 蛋白质会在一定程度上发生变性, 酶活力开始降低。当加热温度超过 50℃ 以后, LOX 的活力降低幅度最大, 这主要是因为 65℃ 的加热条件下, LOX 分子直径显著增大, 开始发生聚合现象, 从而形成多聚体, 酶分子形态变大, 溶解度随之降低, 在溶液中的密度降低, 酶活力值降低^[10]。

4 结论

试验结果表明稀释倍数为 300 倍时, 检测出来的吸光值均在正常范围内, LOX 活力值随着温度的变化呈现出较好的变化趋势。同时, 在该稀释倍数下检测其脂肪氧合酶的活力, 当加热温度为 40℃ 时, 豆浆中的 LOX 活力最高, 加热温度上升到 80℃ 后, LOX 活力彻底丧失。

大豆脂肪氧化酶酶促反应米氏速率常数 $K_m = 452.49 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 最大反应速 $V_{\max} = 1.99\Delta A\cdot\text{min}^{-1}$, $R^2 = 0.9428$ 。Ca²⁺、Mg²⁺ 在浓度分别为 0.02~0.04 mol·L⁻¹, 0.002~0.020 mol·L⁻¹ 时, 对 LOX 均有抑制作用; Zn²⁺ 在浓度为 0.002 mol·L⁻¹ 时, 对 LOX 也有抑制作用, 在浓度为 0.004, 0.006 mol·L⁻¹ 时, 对 LOX 有激活作用, 且效果较为明显。

温度对 LOX 活力起到调节作用, 能够有效地控制酶活力, 进而对豆浆的不良风味有所改善; 同时, 酶反应动力学的确定对豆浆中 LOX 活力值的测定及变化有着重要的意义。本研究结果对探明 LOX 酶的抑制机理和抑制方法提供了一定的理论基础, 对大豆产品豆腥味的抑制有一定的借鉴意义, 为实际生产应用过程中合理调控 LOX 的催化反应, 降低生产成本, 生产高质量产品提供指导依据。

参考文献

[1] Gardner H W. Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants[J]. Biochemica et Biophysica Acta, 1991,1084(3): 221-239.

[2] Feussner I, Wasternack C. The lipoxygenase pathway[J]. Annud Review of Plant Biology, 2002, 53:275-297.

[3] 何婷, 赵谋明, 崔春. 脂肪氧合酶的酶学特性及其活性抑制机理的研究进展[J]. 食品工业科技, 2008(2):291-293, 298. (He T, Zhao M M, Cui C. Advances in studies on enzymatic properties and inhibition mechanism of lipoxygenase [J]. Food Industry Science & Technology, 2008(2):291-293, 298.)

[4] 杨淑媛. 新编大豆食品[M]. 北京:中国商业出版社, 1989: 45- 60. (Yang S Y. New soybean food[M]. Beijing:China Commercial Press, 1989:45-60.)

[5] 李笑梅, 马永强, 段善海. 几种大豆脂肪氧化酶抑制物的作用研究[J]. 中国粮油学报, 2001(5):47-49. (Li X M, Ma Y Q, Duan S H. Studies on the effects of several soybean fatty oxidase inhibitors[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2001(5):47-49.)

[6] 石胜尧, 张延坤, 郭大发, 等. 大豆脂肪氧化酶活性的测定[J]. 营养学报, 1996, 18(3):354-357. (Shi S Y, Zhang Y K, Guo D F, et al. Determination of the activity of soybean fat oxidase [J]. Nutrition Journal, 1996, 18(3):354-357.)

[7] 郑兵福, 廖卢艳, 蒋立文. 不同处理对四棱豆脂肪氧化酶活性的抑制作用[J]. 食品科学, 2011, 32(1):82-85. (Zheng B F, Liao L Y, Jiang L W. Inhibitory effects of different treatments on the activity of lipoxygenase in tetragonia bean [J]. Food Science, 2011, 32(1):82-85.)

[8] 岗田真由美, 陈葆新. 加热处理对豆浆风味的影响[J]. 中国调味品, 1980(6):41-43. (Okada Y, Chen B X. Effects of heating treatment on the flavor of soybean milk [J]. Chinese Condiments, 1980(6):41-43.)

[9] And S Y, Chang K C. Selected odor compounds in soymilk as affected by chemical composition and lipoxygenases in five soybean materials[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(2):426.

[10] Jin G, Zhang J, Yu X. Crude lipoxygenase from pig muscle:Partial characterization and interactions of temperature, NaCl and pH on its activity[J]. Meat Science, 2011, 87(3):257-263.

《植物遗传资源学报》2019 年征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊,中国科技核心期刊、全国中文核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)核心期刊,被国内多家数据库收录,被 CA 化学文摘(美)(2014)收录,荣获 2015 年度中国自然资源学会高影响力十佳期刊。据《中国科技期刊引证报告》(核心版)统计:2017 年影响因子 1.180。据 CNKI《中国学术期刊影响因子年报》统计:2017 年复合影响因子 1.663,综合影响因子为 1.294,分别比 2016 年提高 11.24% 和 3.03%。

报道内容为有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。如种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新,信息学、管理学等;起源、演化、分类等系统学;基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊,A4 开本,216 页,彩色铜版纸印刷。定价 68 元,全年 408 元。各地邮局发行。邮发代号:82 - 643。国内连续出版物号 CN11 - 4996/S,国际连续出版物号 ISSN1672 - 1810。本刊编辑部常年办理订阅手续,如需邮挂每期另加 3 元。

地址:北京市中关村南大街 12 号《植物遗传资源学报》编辑部
邮编:100081 电话:010 - 82105794 010 - 82109494
网址:www. zwyczy. cn
E - mail:zwyczyxb2003@ 163. com zwyczyxb2003@ caas. cn
zwyczyxb2003@ sina. com
微信 ID:植物遗传资源学报 作者 QQ 群:372958204