



# 大豆脂肪氧合酶 LOX-1 热失活的高级结构变化分析

蔡燕, 韩鹏程, 齐美玉, 葛存旺

(南通大学 化学化工学院, 江苏 南通 226019)

**摘要:**为促进大豆脂肪氧合酶 LOX-1 的动力学及催化机理研究,并为 LOX-1 活性的合理调控提供科学依据,本研究利用 FT-IR 技术分析 LOX-1 在 20~80 °C 范围内的热失活和高级结构变化,采用 Omnic 6.0 和 Peakfit 4.12 软件处理 FT-IR 光谱,结合傅里叶自去卷积(FSD)、二阶导数分辨和曲线拟合技术分析酰胺 I 带,获得不同温度下 LOX-1 的二级结构含量,并进行热失活条件下 LOX-1 荧光光谱分析。研究结果显示:LOX 酶活在 50 °C 和 55 °C 下随时间逐步降低,65 °C 时 3 min 内活性完全丧失,LOX-1 酶对热具有敏感性。50~65 °C 时, $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠的含量均在 25% 左右浮动,变化幅度较热失活小,说明 LOX-1 二级结构的改变不是其活性丧失的主要原因。荧光光谱显示时间延长和温度升高后,LOX-1 的荧光发射峰未发生明显改变,说明 50~65 °C 时活性位没有进一步将色氨酸残基暴露于溶剂中,很可能活性位只发生了微小变化。

**关键词:**大豆;脂肪氧合酶;LOX-1;热失活动力学;FTIR;二级结构

## Analysis of Higher Structure Changes of Soybean Lipoxygenase-1 During Thermal Inactivation

CAI Yan, HAN Peng-cheng, QI Mei-yu, GE Cun-wang

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

**Abstract:** In order to provide a new perspective for the study of LOX-1 protein tissue, promote the study of its kinetics and catalytic mechanism, and provide a useful reference for the rational regulation of LOX-1 activity, the thermal inactivation and secondary structure change of LOX-1 in the temperature range of 20-80 °C were studied by FT-IR. The FT-IR spectra were processed by Omnic 6.0 and Peakfit 4.12 software, and the amide I band was analyzed by Fourier self deconvolution (FSD), second derivative resolution and curve fitting techniques. The secondary structure content of LOX-1 at different temperatures were obtained, and the fluorescence spectra under thermal inactivation conditions were analyzed. The results showed that LOX-1 activity decreased gradually with time at 50 °C and 55 °C, and completely lost within 3 min at 65 °C. LOX-1 was sensitive to heat. During 50-65 °C, the content of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet fluctuated about 25%, and the change range was not as large as that of thermal inactivation, which indicated that the change of LOX-1 secondary structure was not the main reason for the loss of LOX-1 activity. The fluorescence spectrum showed that the fluorescence emission peak of LOX-1 did not change significantly with the increase of time and temperature, indicating that the tryptophan residues were not further exposed to the solvent, so it is likely that the active site only changed slightly.

**Keywords:** Soybean; Lipoxygenase; LOX-1; Inactivation kinetics; FTIR; Secondary structure

LOX 能催化含 1 个或多个(Z,Z)-1,4-戊二烯双键的多不饱和脂肪酸的氢过氧化反应,生成氢过氧化共轭脂肪酸<sup>[1]</sup>。大豆脂肪氧合酶(lipoxygenase, LOX, 氧化还原酶, EC1.13.11.12)参与植株的生长、发育、衰老,其氢过氧化产物的主要代谢途径之一是生成挥发性醛、醇类,导致大豆制品产生豆腥味和品质恶化。另一个途径是催化单酚羟基化生成邻二酚,进而氧化生成邻醌,导致酶促褐变。LOX 是大豆异味发生、色泽变化和营养品质劣变的主要影响酶,缩短了大豆产品的货架期<sup>[2-5]</sup>。

植物脂肪氧合酶可分为 LOX-1、LOX-2 和 LOX-3 共 3 种同工酶。1970 年,Christopher 等利用离子交换层析法将脂肪氧合酶分离成 I 型和 II 型两个组

分,两组分在许多性质上都不同,如酶活、最适 pH、热稳定性、Ca<sup>2+</sup>相关性、等电点、底物专一性等。大豆脂肪氧合酶有 4 种电泳类型,LOX-1 主要出现在层析法分离的 I 型中,也正是最早被 Theorell 分离结晶的那一种,LOX-2 和 LOX-3 出现在 II 型中<sup>[6]</sup>。LOX-1 因已被解析出晶体结构,活性高,提取相对简单,因此常被用于研究 LOX 的模板。LOX-1 广泛存在于动植物中,以大豆中活力最高。大豆 LOX-1 的分子量约为 105 kDa,是一种单体酶。X 衍射技术显示 LOX-1 有两个结构域, $\beta$  桶形结构域包含 NH<sub>2</sub> 末端残基 1~146 个,螺旋 C-结构域包含残基 147~839 个,并且包含活性中心催化铁。大豆 LOX-1 的活性位由 3 个 His 残基(His499, His504 和 His690)、

1个 Ile839 残基末端碳原子上的羧基和1个距离较一般配位键稍长的 Asn694 残基上的  $\delta$ -氧原子组成<sup>[7]</sup>。

热处理是目前食品工业广泛应用的酶灭活技术<sup>[8-9]</sup>。LOX-1 的热失活动力学已有报道<sup>[10-14]</sup>，为食品保存和加工提供了理论依据。通过研究加热情况下 LOX-1 酶活随时间的改变，依据失活过程可进一步计算失活常数、热失活活化能  $E_a$ ，建立热失活模型公式。但目前研究中缺乏热失活过程中 LOX-1 酶构象的变化情况，也未深入探讨导致失活的原因。傅氏转换红外线光谱分析仪 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) 采用调制光谱，具有高分辨率、高灵敏度、高信噪比、频率精度准确等优点。最常用于二级结构分析的是位于  $1\ 700 \sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$  范围的酰胺 I 带，其振动频率取决于 C=O 和 H—N 之间的氢键性质，通过氨基酸形成氢键的强弱和比例，结合二阶导数、去卷积技术，可以把原来未能分辨的峰进一步分解为各个子峰，并指出各子峰的峰位值，定量分析蛋白质分子中二级结构的组分<sup>[15]</sup>。FT-IR 光谱特征带的频率、强度和带宽对酶溶液环境中的微小构象变化非常敏感，适合为酶蛋白的结构和热稳定性提供有效信息。荧光技术 (Fluorescence technology) 是研究蛋白质在溶液中的三级结构变化的常用方法。LOX 中含有 13 个色氨酸残基，其发射荧光主要由这些敏感的色氨酸残基引发，能反映酶分子局部环境的变化，跟踪酶的折叠。这 13 个色氨酸残基分布紧凑，位于 LOX 的活性位的周围<sup>[16-17]</sup>。如果 LOX 活性位发生明显改变，那么势必会影响色氨酸残基在水溶液中的存在状态，进而在 LOX 荧光发射谱图上有所表现。

本研究首次使用 FT-IR 技术测定 LOX-1 在溶液中的二级结构含量，研究热失活过程中 LOX-1 的构象变化，利用 FT-IR 技术记录 LOX-1 在加热过程中的原始红外光谱，并将其应用于波段分解。结合反褶积和曲线拟合，揭示酰胺 I 带中隐藏的信息，确定其二级结构，并进一步分析构象变化与热处理时间和温度相关性。同时进行荧光光谱分析 (Fluorescence spectrum, FS)，分析其三级结构变化。本研究旨在为 LOX 蛋白组织研究提供一个新视角，促进其动力学及催化机理研究，并为 LOX 活性的合理调控提供科学参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大豆脂氧酶 LOX-1 ( $1\ 167, 10\ 002\ \text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ )，底物亚油酸 ( $\geq 98.0\%$ , Sigma)，石油醚、醋酸钠、硫酸铵等其它化学品为分析纯 (国药集团)。

### 1.2 设备与仪器

TU-1901 双光束紫外 - 可见分光光度计 (Pgeneral, 中国); 傅里叶变换红外光谱仪 (Nicolet Nexus, 美国), ATR 配件 (Thermo, 美国) 等。

### 1.3 方法

1.3.1 热稳定性分析 酶活定义为在  $25\ ^\circ\text{C}$ , pH9 条件下, 以亚油酸为底物使 3 mL 反应体系每分钟在 234 nm 处增加 0.001 个吸光度所需的酶量<sup>[11]</sup>。

考察不同温度下 LOX-1 活性的热稳定性。分别将 1 mL  $9.17 \times 10^6\ \text{kat} \cdot \text{mL}^{-1}$  大豆 LOX-1 溶液置于 20, 30, 40, 50, 60, 70 和  $80\ ^\circ\text{C}$  水浴中加热 10 min, 立即取出置于冰浴中冷却, 并测定其残余酶活。以冷藏保存的 LOX-1 溶液作为对照, 2 次复重。

考察  $50 \sim 65\ ^\circ\text{C}$  条件下, LOX-1 活性随时间的变化。分别在 50, 55, 60 和  $65\ ^\circ\text{C}$  下对 1 mL  $9.17 \times 10^6\ \text{kat} \cdot \text{mL}^{-1}$  大豆 LOX-1 进行热处理, 分别在 0, 2, 4, 6, 8 和 10 min 后取出等分试样, 立即在冰浴中冷却 3 min, 测定其残余活性。以冷藏保存的 LOX-1 溶液作为对照, 2 次重复。

1.3.2 红外光谱分析 待变温水平衰减全反射附件 (ATR) 升温至指定温度 ( $20 \sim 80\ ^\circ\text{C}$ ), 准确移取 1 mL 2% LOX-1 水溶液, 均匀地在变温 ATR 附件的 ZnSe 晶体上铺满。用干燥空气连续吹扫样品室, 以消除蒸汽的吸收。以纯水为背景, 在  $4\ \text{cm}^{-1}$  分辨率下扫描 32 次收集 LOX-1 溶液的红外图谱。在相同条件下测量背景光谱, 并从样品光谱中减去背景光谱。

1.3.3 二级结构分析 采用 OMNIC 6.0 软件处理原谱, 再利用 Peakfit 4.12 软件对  $1\ 700 \sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$  区域的酰胺 I 带进一步分析, 得到 LOX-1 二级结构的信息。在曲线拟合之前, 减去  $1\ 700$  和  $1\ 600\ \text{cm}^{-1}$  处通过纵坐标的基线。基线通过最小二乘曲线拟合修改, 允许水平基线作为附加参数进行调整, 以获得最佳拟合, 并使用 Savitsk-Golay 进行平滑处理, 再进行二阶求导和傅里叶自去卷积 (FSD), 用 Gaussian 和 Lorentzian 功能进行峰形拟合, 多次拟合使残差 ( $R^2$ ) 大于 0.99。每个洛伦兹带根据其最大频率被分配到一个二级结构:  $\alpha$ -螺旋 ( $1\ 647 \sim 1\ 660\ \text{cm}^{-1}$ )、 $\beta$ -折叠 ( $1\ 615 \sim 1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ )、转弯 ( $1\ 660 \sim 1\ 680\ \text{cm}^{-1}$ )、随机 ( $1\ 646 \sim 1\ 641\ \text{cm}^{-1}$ ) 和  $\beta$ -反平行 ( $1\ 681 \sim 1\ 692\ \text{cm}^{-1}$ )。然后将分配给某一构象的所有组分带的面积相加并除以总面积, 所得数值被视为 LOX-1 二级结构的比例。

1.3.4 荧光光谱分析 用  $0.2\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH9.0 硼酸盐缓冲液将 LOX-1 酶稀释至  $0.2\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 制备 LOX-1 样品。在 295 nm 激发的分光光度计上记录荧光光谱, 激发和发射带宽为 4 nm。50, 55, 60 和  $65\ ^\circ\text{C}$  下, 在  $300 \sim 380\ \text{nm}$  范围内收集发射光谱, 以 3 次独立扫描的平均值作为结果。

## 1.4 数据分析

采用 Excel 2013 对数据进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆脂肪氧合酶 LOX-1 的热稳定性分析

2.1.1 温度对 LOX-1 活性的影响 在 20~80 °C 条件下,研究了 LOX-1 在不同温度下加热 10 min 后的稳定性,其热处理后的残留活力。如图 1 所示,在低于 40 °C 时,LOX-1 活性保持良好,残留酶活性在 90% 以上。在 40~60 °C 时,LOX-1 的残留活性逐步下降。在 50 °C 下处理 10 min 后,LOX-1 的残留活性为 58.2%,60 °C 下酶活仅为 5%。当温度达到 70 °C 以上,加热 10 min 后已经检测不到 LOX-1 的活性。可见温度的升高对 LOX 的灭活效果影响显著。

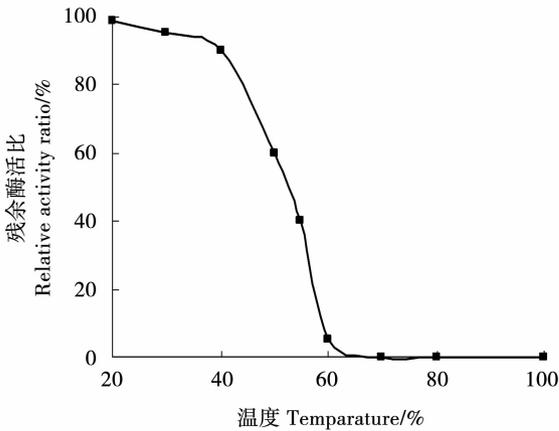


图 1 LOX-1 不同温度下热稳定性分析

Fig. 1 Thermal stability analysis of LOX-1 at different temperatures

2.1.2 时间对 LOX-1 活性的影响 热诱导的酶活性变化不仅与温度有关,还与热处理时间有关。选取 50~65 °C 作为考察酶活变化的温度范围,观察大

豆 LOX-1 酶活随时间的变化情况。如图 2 所示,在 50 和 55 °C 下,LOX-1 酶活变化表现为一个逐步降低的过程。温度为 65 °C 时,LOX-1 在 3 min 内完全失活。该失活现象证实了 LOX-1 酶的热敏感性。

将大豆 LOX-1 溶液在 80 °C 下加热 30 min 后,有大量变性 LOX-1 酶析出。将变性的酶蛋白置于冰上 30 min 后,LOX-1 酶的活性并未恢复,表明 LOX 的热失活是不可逆的。

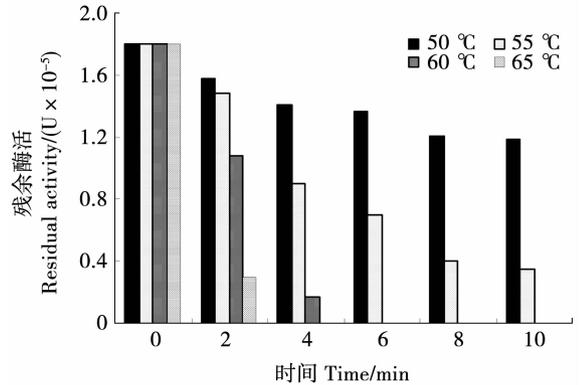


图 2 不同温度下大豆 LOX-1 热失活时间分析

Fig. 2 The analysis of LOX-1 thermal inactivation verse time at different temperatures

### 2.2 二级结构变化分析

通过曲线拟合的方法,定量分析蛋白质分子中二级结构的各个组分。如图 3 所示,分峰处理获得 6 个复杂的组分峰,1 652.4  $\text{cm}^{-1}$  处的子峰表明有  $\alpha$ -螺旋存在,低波段 1 616.9 和 1 630.1  $\text{cm}^{-1}$  的子峰代表  $\beta$ -折叠,1 641.9  $\text{cm}^{-1}$  处的子峰归属于无规卷曲,高波段 1 667 和 1 680  $\text{cm}^{-1}$  的子峰是反平行  $\beta$ -折叠的特征峰(图 3)。面积归一化计算求得室温下大豆 LOX-1 二级结构中  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠的含量分别为 28.6% 和 20.4%。

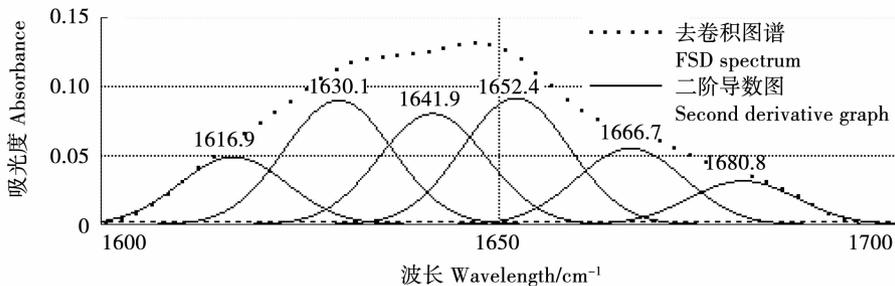


图 3 LOX-1 在酰胺 I 带的去卷积和二阶导数图

Fig. 3 Fourier self deconvoluted and second derivative of soybean LOX-1 in the amide I band region

检测宽轮廓下各组成成分含量的变化可揭示热处理对大豆 LOX-1 蛋白二级结构成分的影响。与大豆 LOX-1 热失活的时间对应,考察 10 min 内,各热处理温度下 LOX-1 二级结构的变化情况。如图 4 所示,在 50~65 °C 的温度范围内,LOX-1 失活

与二级结构变化无关,因为溶液态 LOX-1 的失活是趋势下降的,而其二级结构相对稳定。当酶冷却到室温时,二级结构没有恢复到天然状态,表明热诱导的 LOX-1 酶结构变化是不可逆的。

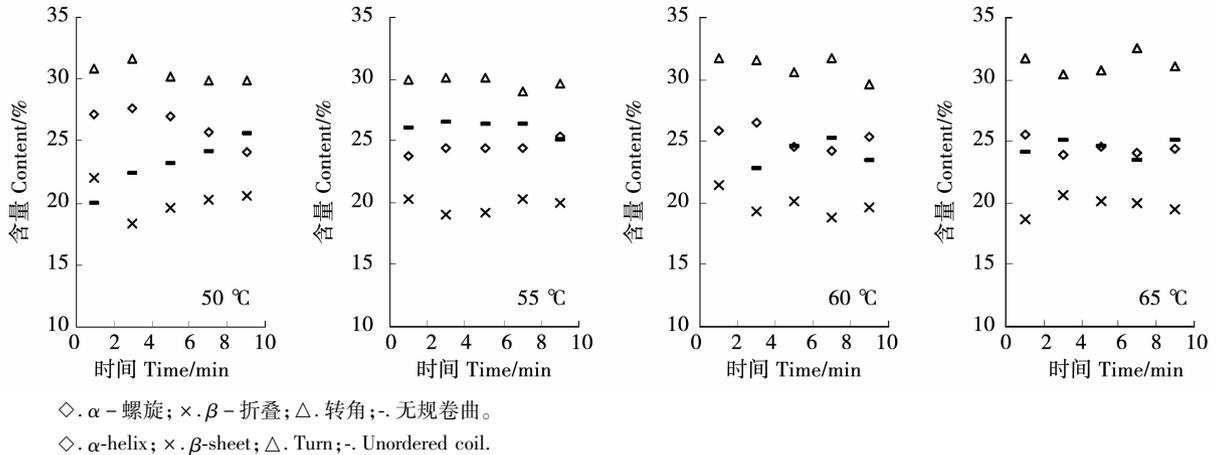


图4 大豆 LOX-1 在 50 ~60 °C 下各二级结构含量随时间的变化

Fig. 4 The secondary structure percentage changes of soybean LOX-1 under 50 – 60 °C

### 2.3 荧光光谱分析

由以上分析可知, LOX-1 的失活并非由二级结构的变化引起, 因此继续探索 LOX-1 失活与三级结构的变化关系。如图 5 所示, LOX-1 的荧光发射峰在 335 nm 处。在 50 ~ 65 °C 的温度下, 时间的延长和温度的升高都未使 LOX-1 的荧光发射峰发生明

显变化, 所有热处理酶的发射光谱与自然展开态几乎相同, 荧光强度略有增加。说明此温度范围内, 活性位的氨基酸残基并未发生大幅度的变动, 没有进一步将色氨酸残基暴露于溶剂中, 很可能活性位只是发生了微小的变化。

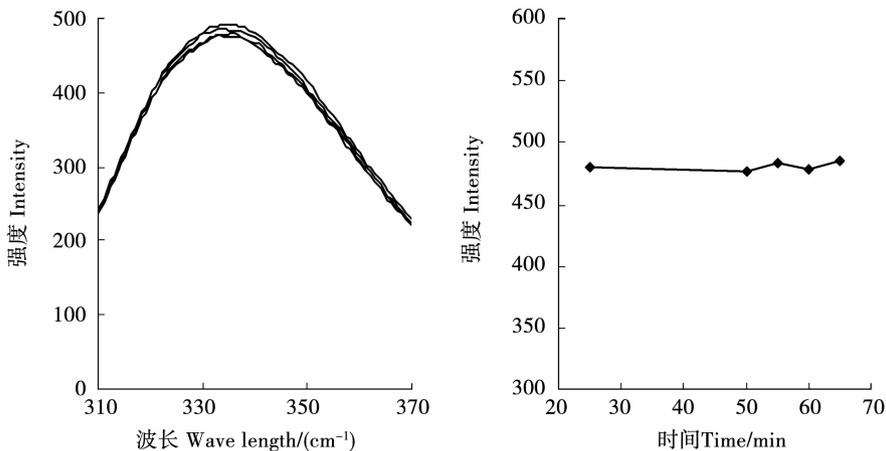


图5 大豆 LOX-1 在 50 ~60 °C 下荧光光谱分析

Fig. 5 The fluorescence spectrum analysis of soybean LOX-1 at 50 – 60 °C

### 3 讨论

关于 LOX 的热失活研究已有较多报道, 一般直接以植物的汁液为研究对象, 以更好地模拟食品热处理过程中酶活变化的真实情况, 更准确地为食品保存和加工提供理论依据。本研究以纯化的 LOX-1 溶液为研究对象, 结合热失活过程同步考察其高级结构变化, 寻找其失活与构象变化之间的关联, 为 LOX-1 活性的合理调控提供科学参考。

本研究在 20 ~ 80 °C 的温度范围内研究了大豆 LOX-1 的失活和构象变化情况。LOX-1 酶活在 50 和 55 °C 下表现为一个逐步降低的过程, 65 °C 时 3 min 内活性完全失去, 证实了 LOX-1 酶的热敏感性。

X-射线晶体衍射计算得晶体态 LOX-1 分子含  $\alpha$ -螺旋 38% 和  $\beta$ -折叠 14% [18]。CD 技术 [19-20] 测得

溶液态 LOX-1 含  $\alpha$ -螺旋 28% ~ 34%、 $\beta$ -折叠 22% ~ 28%。说明结晶过程使得 LOX-1 的结构与处于溶液态时的结构发生了变化。CD 技术受光散射影响较大, 而且对  $\beta$ -折叠信号弱, 容易对结果造成偏差。本试验采用灵敏的 FT-IR 技术分析了热失活过程中大豆 LOX-1 的二级结构变化。室温下大豆 LOX-1 二级结构中  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠的含量分别为 28.6% 和 20.4%, 与 CD 技术测定结果有较好的一致性。当加热至 50 °C 以上时,  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠的含量均在 25% 左右浮动。大豆 LOX-1 受热后  $\alpha$ -螺旋含量下降了约 3%,  $\beta$ -折叠的含量上升了约 5%。上述现象说明 LOX 能迅速适应环境溶液而调节至结构上的平衡并保持稳定的状态存在。肽链折叠的动力学指出, 卷曲可以在 1 ~ 100 ms 中完成, 而有的试验还表明螺旋的形成只需要几微秒, 为大豆 LOX-1 二级

结构的迅速变化提供了理论解释。同时研究结果也说明在一定温度下, LOX-1 的失活并不是由 LOX 的二级结构变化引起的, 因为 LOX-1 的失活是直线下降的, 而其二级结构保持相对稳定。温度的升高也未使 LOX-1 的荧光发射峰发生明显变化。

Ludwig 等<sup>[19]</sup>采用 CD 技术研究了由产物引起的脂氧酶失活过程中其二级结构的变化, 从兔子细胞中提取脂氧酶进行研究, 结果表明 LOX 在有氧条件下与氢过氧化亚油酸的自杀式反应引起的失活过程并不伴随着脂氧酶分子总体结构的改变, 而是位于铁原子附近的一个活性很强的蛋氨酸被氧化了。Wei 等<sup>[21]</sup>研究了螯合剂 DTNB 引起的大豆 LOX-1 的失活, 推测是由于活性位 4 个半胱氨酸中的 2 或 3 个与 DTNB 发生结合。活性位 1 个或几个氨基酸残基发生变化就会导致脂氧酶的失活, 可见活性的改变并不一定伴随酶分子整体构象的变化。结合 FT-IR 和 FS 结果, 推测大豆 LOX 的热失活过程也只是由于活性位的氨基酸残基发生了微小的构象变化, 但这个变化足以导致 LOX 结合底物能力的逐步降低和丧失。

大豆 LOX-1 的活性部位只占其整体分子的微小部分, 较底物分子稍大, 在该区域构象由弱力连接在一起, 具有较大的柔性, 比分子更容易受到热的扰动, 表现为对温度更敏感, 更脆弱。推测加热时, LOX-1 分子整体刚性结构保持完整, 而较柔性的活性部位的局部结构已发生明显变化, 如活性位基团的相互靠近或立体取向受到破坏等, 导致 LOX-1 活性的丧失。

## 4 结 论

FT-IR 技术分析结果表明, 大豆 LOX-1 酶对热具有敏感性,  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠含量的变化幅度较热失活小, 说明大豆 LOX-1 二级结构的改变不是其活性丧失的主要原因。FS 结果说明, 50 ~ 65 °C 温度范围内, 活性位的氨基酸残基未发生大幅度变动, 没有进一步将色氨酸残基暴露于溶剂中, 很可能活性位只发生了微小变化, 但这个变化足以导致 LOX 结合底物能力的逐步降低和丧失。

## 参考文献

[1] Tayeb A H, Sadeghifar H, Martin A, et al. Lipoygenase-mediated peroxidation of model plant extractives [J]. *Industrial Crops and Products Industry*, 2017, 104: 253-262.

[2] Zhu Z J, Chen H M, Chen J J. One-step bioconversion of fatty acids into C8-C9 volatile aroma compounds by a multifunctional lipoygenase cloned from *Pyropia haitanensis* [J]. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 2018, 66(5): 1233-1241.

[3] Chong W K, Mah S Y, Easa A M, et al. Thermal inactivation of lipoygenase in soyabean using superheated steam to produce low beany flavour soya milk [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(90): 4371-4379.

[4] Yilmaza S T, Cakli S, Yilmaza E B S, et al. Effect of fillet temperature on lipoygenase activity in sardine mince with and without milk protein concentrate [J]. *Food Science and Technology*, 2018, 90: 38-44.

[5] Navicha W B, Hua Y F. Optimization of soybean roasting parameters in developing nutritious and lipoygenase free soymilk [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2017, 11(4): 1899-1908.

[6] Mishra V K, MISHA S. Origin of regio- and stereospecific catalysis by 8-lipoygenase [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2019, 123(50): 10605-10621.

[7] Offenbacher A R, Sharma A, Doan P E, et al. Soybean lipoygenase-substrate complex: Correlation between the properties of tunneling-ready states and eNDOR-detected structures of ground states [J]. *Biochemistry*, 2020, 59(7): 901-910.

[8] Cautela D, Castaldo D, Laratta B. Thermal inactivation of pectin methylesterase in pineapple juice [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2018, 12(4): 2795-2800.

[9] Thalpal C, Jain N, Rashind N, et al. Kinetics and thermodynamics of the thermal inactivation and chaperone assisted folding of zebrafish dihydrofolate reductase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018, 637: 21-30.

[10] Michael S, Philipp E, Stephanie B M, et al. Lipoygenase inactivation kinetics and quality-related enzyme activities of narrow-leaved lupin seeds and flakes [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 68: 36-43.

[11] Xu B, Wang L K, Miao W J, et al. Thermal versus microwave inactivation kinetics of lipase and lipoygenase from wheat germ [J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2016, 39(3): 247-255.

[12] Perez C J, Califano A, Victoria S M, et al. Kinetic parameters for the thermal inactivation of peroxidase and lipoygenase in precooked frozen *Brassica Species* [J]. *Journal of Food Science*, 2017, 82(6): 1378-1386.

[13] Stephany M, Kapusi K, Bader M S, et al. Odour-active volatiles in lupin kernel fibre preparations (*Lupinus angustifolius* L.): Effects of thermal lipoygenase inactivation [J]. *European Journal of Food Research and Technology*, 2016, 242(7): 995-1004.

[14] Xu Z, Liu S, Lu X Y, et al. Thermal inactivation of a recombinant lipoygenase from *Pseudomonas aeruginosa* BBE in the absence and presence of additives [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94(9): 1753-1757.

[15] Hande B, Alev B, Mete S, et al. Effect of thermal treatment on secondary structure and conformational change of mushroom polyphenol oxidase (PPO) as food quality related enzyme: A FTIR study [J]. *Food Chemistry*, 2015, 187: 263-269.

[16] Pinto M D, Macias P. Fluorescence quenching study on the interaction between quercetin and lipoygenase [J]. *Journal of Fluorescence*, 2011, 21: 1311-1318.

[17] Pinto M D, Duque A L. Fluorescence spectroscopic study on the interaction of resveratrol with lipoygenase [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2010, 980: 143-148.

[18] Boyington J C, Gaffney B J, Amzel L M. The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoygenase [J]. *Science*, 1993, 260: 1482-1486.

[19] Ludwig P, Tordi M G, Colosimo A. Circular dichroism observations on the lipoygenase from reticulocytes [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1985, 830: 136-139.

[20] Wei L, Zhang R B, Wang L M, et al. Conformation changes of polyphenol oxidase and lipoygenase induced by PEF treatment [J]. *Journal of Applied Electrochemistry*, 2010, 40(2): 295-301.