

大豆脂氧酶的热失活动力学与其二级结构的圆二色谱表现

蔡燕, 方云, 夏咏梅

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:应用大豆脂氧酶的变温圆二色谱图研究了大豆脂氧酶(LOX)的热失活与二级结构变化过程。结果表明:在50~65℃条件下,10 min内,LOX的酶活随热处理时间延长而下降,其热失活过程遵循一级动力学,活化能 E_a 值为217 kJ·mol⁻¹。在相同的热处理条件下,LOX中二级结构 α -螺旋和 β -折叠的相对含量均在20%左右浮动,不符合一级反应动力学,二级结构的变化并非LOX失活的主要原因。

关键词:大豆脂氧酶;失活动力学;圆二色谱;二级结构

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)01-0150-03

Thermal Inactivation of Soybean Lipxygenase and Its Secondary Structure Performance of Circular Dichroism Spectroscopy

CAI Yan, FANG Yun, XIA Yong-mei

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: The inactivation and secondary structure variation of soybean lipxygenase(LOX) during heating process was studied with circular dichroism(CD) spectroscopy. The quantitative secondary structures of LOX at various temperatures were obtained. At 50~65℃, LOX activity has a sharp drop with the time prolonging. Thermal inactivation of LOX could be described by a first order kinetic model, and activation energy E_a was further calculated to be 217 kJ·mol⁻¹. During the heating process, the contents of α -helix and β -sheet were both floating at 20%, indicated that the change of secondary structure of LOX was not the main reason for the loss of their activities.

Key words: Soybean lipxygenase; Inactivation kinetics; Circular dichroism; Secondary structures

脂肪氧合酶(lipoxygenase, EC1.13.11.12),通称LOX在自然界中广泛存在,在豆类中具有较高的活力,尤其在大豆中活力最高。LOX能专一催化氧化具有cis,cis-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸,形成具有共轭双键的氢过氧化衍生物^[1-2]。该产物是一种重要的药物合成和化学合成的中间体,有着较好的工业前景。对LOX的研究开发将提高生物技术等高新技术在大豆加工中的应用水平和大豆资源的高附加值利用。但LOX是一种非耐热性酶,存在易失活的缺陷,为工业利用带来一定的限制和困难。因此,研究LOX失活的原因和机理,了解其失活过程中构象的变化,对于调控LOX的活性,加深对其酶促反应过程中催化反应动力学和催化机制的理解具有重要的指导意义。

圆二色谱(Circular Dichroism, CD)是研究稀溶液中蛋白质结构的一种快速、简单、较准确的方法。特别是近十几年来,随着计算方法和拟合程序的极大发展,CD数据拟合的数据库愈加精确,使得远紫

外CD数据分析蛋白质二级结构的应用愈加广泛^[3-5]。该文采用盐析法从大豆中提取了精酶LOX,考察了LOX的失活动力学,并采用CD和计算机辅助解析手段研究了LOX热失活过程中其二级结构变化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

TU-1901型双光束紫外可见分光光度计(北京普析);MOS-450圆二色谱仪(法国Biologic);8917Z-01冷冻干燥仪(美国Labconco);透析袋(分子截留量为3500)。

亚油酸(Sigma, 98%,生化试剂),超纯水(电导率为0.078 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, 25℃),大豆样品为2009年东北吉林产,其余试剂均为国产AR级。

1.2 试验方法

1.2.1 LOX的制备 大豆洗净去皮,经石油醚浸提、粉碎后过40目筛。称取一定量脱脂大豆粉,加

收稿日期:2010-11-08

基金项目:江南大学创新团队基金资助项目(2008CXTD01)。

第一作者简介:蔡燕(1983-),女,博士,研究方向为酶催化。E-mail: caiyan821110@126.com。

通讯作者:夏咏梅(1965-),女,博士,教授,从事酶催化和精细化学品合成等方面的研究。E-mail: ymxia@126.com。

乙酸钠缓冲溶液(pH 4.4)室温搅拌 1 h (m 大豆: m 水 = 1:10), 在 $4\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下离心 20 min; 向滤液中加入硫酸铵使其质量百分数为 40%, 离心 20 min, 弃去沉淀; 再在上清液中加入硫酸铵至质量百分数为 60%, 离心 20 min 后取沉淀, 用超纯水溶解。在室温下透析 24 h 后冷冻干燥。

1.2.2 分光光度法测定 LOX 酶活 LOX 的酶活基于其催化氧化底物亚油酸形成氢过氧化亚油酸的反应测得^[6]。底物溶液按如下方法配制: 将 0.25 mL Tween 20 和 0.27 mL 亚油酸先后在磁力搅拌下分散于 10 mL pH 9.0 的 $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸硼砂缓冲液中, 滴加 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液使体系澄清并用 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸调回 pH 9.0, 然后用上述缓冲液定容至 500 mL。移取 0.2 mL LOX 酶液于 25°C 1.5 mL 的底物溶液中, 混匀后于 25°C 恒温水浴中保温 3 min, 用 5 mL 无水乙醇终止反应, 加入 5 mL 超纯水, 混匀后用分光光度计在 234 nm 处测定反应液的吸光度。空白为加入 0.2 mL 酶液后, 依次加入 5 mL 无水乙醇和 1.5 mL 底物溶液, 于 25°C 恒温 3 min, 再加入 5 mL 超纯水。一个酶活单位定义为使 3 mL 反应体系每分钟 (min) 在 234 nm 处增加 0.001 个吸光度的酶量 (mL)。

1.2.3 LOX 的热稳定性测定 热稳定性试验在 $50 \sim 65^\circ\text{C}$ 的恒温水浴中进行。移取一定量 LOX 酶液置于指定温度的水浴中, 一定时间后取出置于冰浴中, 冷却 3 min 后测定酶活。取 3 个平行样进行测定。参照样为室温放置的 LOX 酶液。

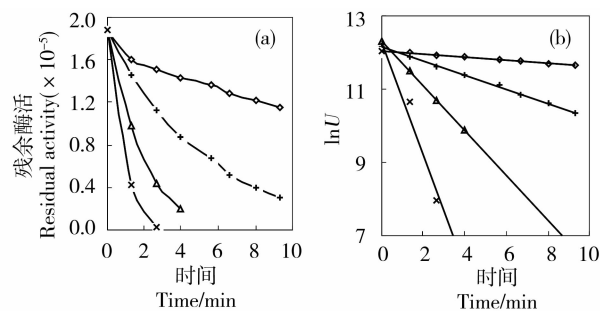
1.2.4 CD 光谱测定 LOX 的二级结构 所用 LOX 水溶液的浓度为 $0.07\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。光源为氙灯, 液池光径为 1 mm, $190 \sim 240\text{ nm}$ 扫描累加 4 次, 用 MOS-450 自带软件对图谱进行平滑处理。各二级结构的比例利用软件 DICHROWEB 在线计算^[7]。

2 结果与分析

2.1 LOX 的热失活动力学

LOX 只有在低温下才能较长时间地保持其活性。将 LOX 置于 $50 \sim 65^\circ\text{C}$ 下加热 10 min, 考察其活性随时间的变化情况, 如图 1(a)。在不同加热温度条件下, LOX 剩余酶活 (A) 随加热时间的延长呈下降趋势, 加热温度越高其下降速度越快, 65°C 时 3 min 内 LOX 的酶活已基本完全丧失。

图 1(b) 表明 LOX 的热失活动力学为拟一级反应。LOX 的热失活常数 k 、半衰期 $t_{1/2}$ 可由对数残余酶活 ($\ln A$) 的自然对数对时间 (t) 的直线方程得到, 归总列于表 1。热失活常数 k 随温度升高而增大, 相应 LOX 活性的下降速率也越快。由图 2 所得直线方程并根据阿伦尼乌斯方程, 可知 LOX 的热失活反应的活化能 E_a 为 $217\text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。大量研究结



50 °C (◇); 55 °C (+); 60 °C (△); 65 °C (×)

图 1 LOX 溶液的热失活

Fig. 1 Thermal inactivation of LOX in pH 9 borax-borate buffer

果表明大部分蛋白质的热失活动力学为一级反应^[8-12], 豌豆^[8]、绿豆^[9]、番茄^[10]汁液中 LOX 的热失活也遵循一级动力学, 活化能分别为 168、540、174 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 与该文研究的大豆 LOX 的 E_a 值 ($217\text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) 在相同数量级。

表 1 LOX 热失活的一级动力学参数

Table 1 Thermal inactivation kinetic rate constants of LOX obtained by fitting to first order kinetic model

温度 $T/^\circ\text{C}$	方程 equation	R^2	$k \times 10^{-3}$ $/\text{s}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{s}$
50	$\ln A = -0.0413t + 12.041$	0.9986	0.69	990
55	$\ln A = -0.1925t + 12.15$	0.9987	0.32	216
60	$\ln A = -0.6075t + 12.297$	1.0000	10.1	68.6
65	$\ln A = -1.5332t + 12.266$	0.9686	25.6	25.9

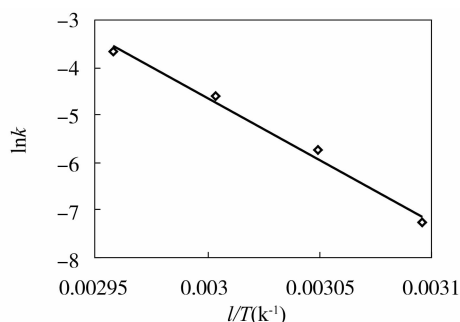


图 2 LOX 热失活动力学的阿伦尼乌斯方程拟合

Fig. 2 Arrhenius plot of the inactivation rates of heat resistant fraction of LOX for thermal inactivation

2.2 CD 光谱分析 LOX 热失活过程的二级结构变化

图 3 为 LOX 在远紫外区的圆二色谱图。通常 $200 \sim 220\text{ nm}$ 处的双负峰是蛋白中含有 α -螺旋结构的反映。前者为 $\pi-\pi^*$ 电子跃迁所贡献, 后者为 $n-\pi^*$ 电子跃迁所贡献。210 nm 处的负峰是 β -折叠构象的特征峰。此图反映 LOX 同时含有 α -螺旋和 β -折叠结构^[13]。

由图 4 可见, 总体上, 在 $50 \sim 65^\circ\text{C}$ 下, LOX 的二级结构变化并不像失活过程一样遵循一级反应动力学, 与其失活的剧烈程度相比, 各二级结构含量变化并不明显。LOX 的失活速率受温度影响很

大,尤其在 65℃ 时 3 min 内酶活完全丧失,但此时其二级结构的含量相对很平稳。在 55 ~ 65℃ 下 α -螺旋和 β -折叠的含量均在 20% 左右浮动。

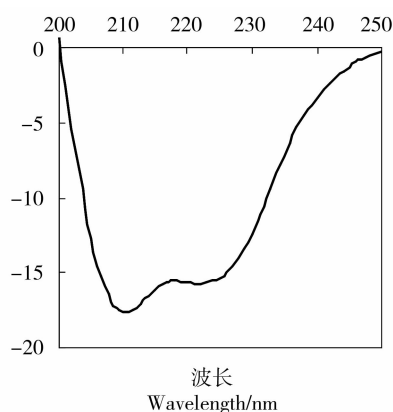
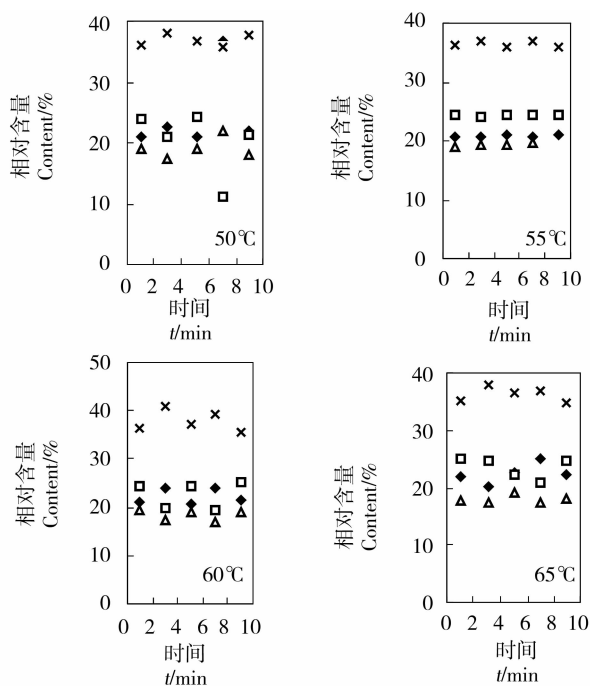


图 3 LOX 溶液的 CD 光谱

Fig.3 The CD spectra of LOX



α -螺旋(◆); β -折叠(□); 转角(△); 无规卷曲(×)
 α -helix(◆); β -sheet(□); turn(△); unordered coil(×)

图 4 CD 光谱测定 LOX 二级结构的变化

Fig.4 Changes in the secondary structure content of LOX during heat inactivation at 50 ~ 65 °C obtained by CD spectra

3 讨论

在 50 ~ 65℃ 下,10 min 内,LOX 的热失活遵循拟一级反应动力学, E_a 值为 217 kJ · mol⁻¹。但 LOX 的二级结构并不遵循一级反应,而是保持相对稳定, α -螺旋和 β -折叠的含量均在 20% 左右浮动,表明二级结构的变化不是导致 LOX 失活的直接原因。Tou^[14-16] 认为活性部位只占其 LOX 整体分子的微小部分,与其它结构部位相比,具有较大的柔性,

对环境溶液的反应更灵敏。推测在 50 ~ 65℃ 时, LOX 分子整体刚性结构保持相对完整,而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 活性的丧失,这需要进行进一步的研究证实。

参考文献

- [1] Gardner H W. Lipoxygenase as a versatile biocatalyst[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1996, 73: 1347-1357.
- [2] Minor W, Steczko J, Bolin J T, et al. Crystallographic determination of the active site iron and its ligands in soybean lipoxygenase-1[J]. Biochemistry, 1993, 32: 6320-6323.
- [3] Pelton J T, McLean L R. Review of spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 277: 167-176.
- [4] Kelly S M, Jess T J, Price N C. Review of how to study proteins by circular dichroism[J]. Biochimica et Biophysica Acta; Proteins Proteomics, 2005, 1751: 119-139.
- [5] Greenfield N J. Analysis of circular dichroism data[J]. Methods Enzymology, 2004, 383: 282-291.
- [6] Surrey K. Spectrophotometric method for determination of lipoxygenase activity[J]. Plant Physiology, 1964, 39: 65-70.
- [7] Whitmore L, Wallace B A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular data[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 32: 668-673.
- [8] Indrawati, Van Loey A, Ludikhuyze L, et al. Pressure-temperature inactivation of lipoxygenase in green peas (*Pisum sativum*): a kinetic study[J]. Journal of Food Science, 2001, 66: 686-693.
- [9] Indrawati I, Ludikhuyze L, van Loey A, et al. Lipoxygenase inactivation in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) due to high pressure treatment at subzero and elevated temperatures[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 1850-1855.
- [10] Rodrigo D, Jolie R, Van Loey A, et al. Thermal and high pressure stability of tomato lipoxygenase and hydroperoxide lyase[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 79: 423-427.
- [11] Bustoa M D, Owusu Apentenb R K, Robinsonb D S, et al. Kinetics of thermal inactivation of pea seed lipoxygenase and the effect of additives on their thermostability[J]. Food Chemistry, 1999, 65: 323-329.
- [12] Anthon G E, Barret D M. Thermal inactivation of lipoxygenase and hydroperoxytrieneic acid lyase in tomatoes[J]. Food Chemistry, 2003, 81: 275-279.
- [13] Ludwig P, Tordi M, Colosimo A. Circular dichroism on the lipoxygenase from reticulocytes[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1986, 830: 136-139.
- [14] Tsou C L. Kinetics of substrate reaction during irreversible modification of enzyme activity[J]. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 1988, 61: 381-436.
- [15] Tsou C L. Conformational flexibility of enzyme active sites[J]. Science, 1993, 262: 380-381.
- [16] Tsou C L. Location of the active sites of some enzymes in limited and flexible molecular regions[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1986, 11: 427-429.