

# EDTA 对大豆脂氧酶的活性和催化体系的影响

沈洁<sup>1</sup>, 田丹<sup>2</sup>, 蔡燕<sup>2</sup>, 陈娇<sup>2</sup>, 赵勤<sup>2</sup>, 吴锦明<sup>2</sup>

(1. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 南通大学 化学化工学院, 江苏 南通 226019)

**摘要:** 本文研究了 EDTA 对脂氧酶(LOX)溶液稳定性及催化行为的影响。结果表明:EDTA 对脂氧酶的稳定性具有显著的促进作用,室温下能在较长时间(30 d)内保持较高的酶活(80% 以上),改变了其易失活的特点。EDTA 能大幅度提高脂氧酶催化亚油酸的催化效率,使其反应进程缩短为原来的 1/3,但当底物为大豆油时起抑制作用。光谱试验显示:EDTA 对 LOX 的影响只是局部构象的微调,并不涉及二级结构和三级结构的改变。EDTA 在保存液体脂氧酶和催化氧化亚油酸的反应中有较大的应用价值。

**关键词:** 脂氧酶;EDTA;稳定性;催化

**中图分类号:** Q503      **文献标识码:** A      **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2017. 02. 0305

## Effects of EDTA on the Soybean Lipoxigenase Catalytic System

SHEN Jie<sup>1</sup>, TIAN Dan<sup>2</sup>, CAI Yan<sup>2</sup>, CHEN Jiao<sup>2</sup>, ZHAO Qin<sup>2</sup>, WU Jin-ming<sup>2</sup>

(1. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong 226019, China)

**Abstract:** The effects of EDTA on the stability and catalytic behavior of lipoxigenase(LOX) were studied in this paper. The results showed that EDTA could improve the stability of LOX significantly, and it could retain high activity(80% or more) in a long time(30 days) at room temperature. EDTA can greatly improve the catalytic efficiency of LOX catalyzed on linoleic acid, so that the reaction process can be reduced to 1/3 of the original. But it would inhibit the catalytic activity when the substrate is soybean oil. Spectral experiments show that EDTA induces only a fine tuning of the local conformation of LOX, and does not involve the change of the secondary structure or tertiary structure. EDTA has great application value in preserving liquid LOX and catalytic oxidation of linoleic acid.

**Keywords:** Lipoxigenase; EDTA; Stability; Catalysis

脂肪氧合酶(LOX)广泛存在于动植物中,尤以大豆中的含量和活性最高。脂氧酶能专一催化氧化含顺,顺-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物<sup>[1]</sup>。大豆 LOX 的分子量约为 105 kDa,是一种单体酶。X 衍射技术显示 LOX-1 有 2 个结构域,其中氨基末端结构域有 146 个氨基酸残基,羧基末端结构域有 693 个氨基酸残基。氢过氧化物具有高度的反应性,是重要的医药化工中间体<sup>[2-3]</sup>。LOX 的天然优势底物是亚油酸,可得到满意的产率(达 80% 以上)。酯类底物如亚油酸甘油酯、磷酸酯等,较亚油酸而言不是理想的底物,产率极低(通常不超过 15%)。天然大豆油含有较高含量的不饱和脂肪酸亚油酸,且环氧大豆油是开发前景广阔的增塑剂和稳定剂,适宜作为酯类底物的模型。

LOX 由于其分布广泛、催化效率高,是一种值得深入研究并开发的酶类。目前限制 LOX 大规模

应用的瓶颈在于它稳定性较差,对于高温、有机溶剂或极端的 pH 极其敏感。国外在 LOX 固定化方面做了一些研究,但这些方法大多繁琐且不经济,未能大规模应用。若能找到一种简单有效的提高 LOX 稳定性的保存方法,并具有较好的催化效率,将具有现实的工业意义。

LOX 的催化活性及其影响因素是研究者们较为关注的热点<sup>[4-5]</sup>。外源物的加入能影响 LOX 的构象,进而改变其酶活。蔡琨等<sup>[6]</sup>提出了外源铁以电子传递的方式对 LOX 活性中心的内源铁进行作用,缩短了 Fe(II)-LOX 转化为 Fe(III)-LOX 的滞后期。外源金属钡离子在合适的浓度下能提高脂氧酶对亚油酸酯的转化率<sup>[7]</sup>。适量添加某些无机盐、糖类、多元醇或有机电解质可提高酶的储存稳定性,尤以 EDTA 的效果最为显著<sup>[8]</sup>。

本文将 EDTA 加入到大豆脂氧酶溶液及其催化反应体系中,观察其对酶活和两种催化体系催化行

收稿日期:2016-11-22  
基金项目:江苏省青年自然科学基金(BK20150401, BK20150402);江苏省高校自然科学研究面上项目资助(15KJB530010, 15KJB150024)。  
第一作者简介:沈洁(1985-),女,讲师,主要从事生物化工研究。E-mail:shenjiet@jiangnan.edu.cn。  
通讯作者:蔡燕(1983-),女,博士,讲师,主要从事酶催化研究。E-mail:Yancai2010@ntu.edu.cn;  
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。

为的影响,并试图探讨 EDTA 与脂氧酶的相互作用关系。以期开发工业应用的液体脂氧酶制剂提供理论指导。目前尚未见关于 EDTA 与脂氧酶相互作用的研究报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大豆 LOX ( $70\ 600\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , Sigma); 亚油酸, 过氧化氢异丙苯 (Sigma 公司); 非转基因大豆油 (皂化价为  $191\ \text{mg}\cdot\text{KOHg}^{-1}$ , 酸价为  $0.16\ \text{mg}\cdot\text{KOHg}^{-1}$ ); 2,6-叔丁基-4-甲基酚 (BHT),  $\text{BaCl}_2$ , 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  $0.078\ \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ); 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); MOS-450 圆二色谱仪 (法国 Biologic)。

### 1.2 方法

1.2.1 脂氧酶热稳定性测试 热稳定性实验在  $50^\circ\text{C}$  ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) 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进行热处理, 一定梯度时间后取出置于冰浴中, 冷却 5 min 后用分光光度法测定酶活<sup>[9]</sup>。参照样为室温放置的 LOX 酶液。

1.2.2 脂氧酶催化亚油酸和豆油的反应 在适量乙醇和 pH9 硼砂缓冲液中加入一定量底物亚油酸, 并用  $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$  溶液将亚油酸皂化, 通入  $5\ \text{min}$  氧气 ( $20\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) 后, 加入脂氧酶使体系酶活为  $3.5\times 10^5\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。反应一定时间后用  $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫酸调节 pH3, 以乙醚萃取产物。

在适量乙醇和 pH6 磷酸盐缓冲液中加入一定量底物大豆油, 通入  $5\ \text{min}$  氧气 ( $20\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) 后, 加入脂氧酶使体系酶活为  $3.5\times 10^5\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。后处理同上。

用二甲酚橙法测定产物中氢过氧化物的含量<sup>[10-11]</sup>。氢过氧化物产率定义为实际测得的氢过氧化物的摩尔数与理论上应该生成的氢过氧化物摩尔数的比值。

1.2.3 荧光光谱测定 在  $25\ \text{mL}$  容量瓶中加入 EDTA 于  $20^\circ\text{C}$  恒温水浴中预热  $30\ \text{min}$  后, 加入  $50\ \mu\text{L}$  LOX 酶液, 放置  $30\ \text{min}$  后测定其在  $300\sim 450\ \text{nm}$  范围内的荧光光谱, 所有试验重复 3 次。激发波长为  $280\ \text{nm}$ , 激发及发射光栅狭缝宽为  $5\ \text{nm}$ , 激发狭缝宽度设定为  $3\ \text{nm}$ 。

1.2.4 CD 光谱 光源为氙灯, 液池光径为  $1\ \text{mm}$ , 在  $190\sim 240\ \text{nm}$  范围内扫描累加 3 次。LOX 溶液浓度为  $0.75\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 EDTA 对脂氧酶活性的影响

液态酶不适于长期保存, 其失活原因由于酶蛋白分子的复杂性尚不明确。如图 1 所示, 大豆脂氧酶在液态环境下尤其不稳定, 在 7 d 后酶活即丧失 80% 左右, 所以是一种适于即时提取利用的酶。但是在加入质量分数为 1% 的 EDTA 之后, 脂氧酶的酶活在 14 d 内基本保持稳定, 过 30 d 后尚能维持在初始水平的 80%。由此可知 EDTA 对脂氧酶的稳定性的促进作用。

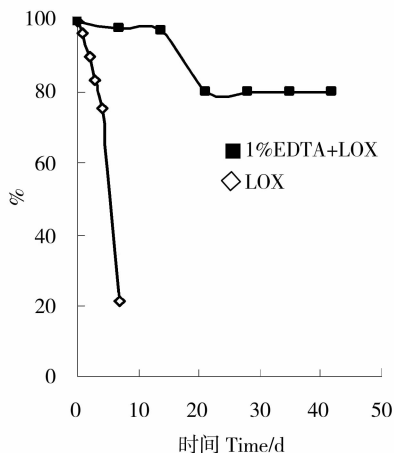


图 1 EDTA 对 LOX 储存稳定性的影响 ( $20^\circ\text{C}$ )

Fig. 1 Effects of EDTA on the stability of LOX activity

另一方面, 脂氧酶属于热不稳定性酶, 在受热条件下可能瞬时失活。对比加入 EDTA 后的脂氧酶的热失活稳定性差异 (图 2)。EDTA 能够小幅提高脂氧酶对热变性的抵抗能力, 使其失活速率有所下降, 酶活残余量略有增加。

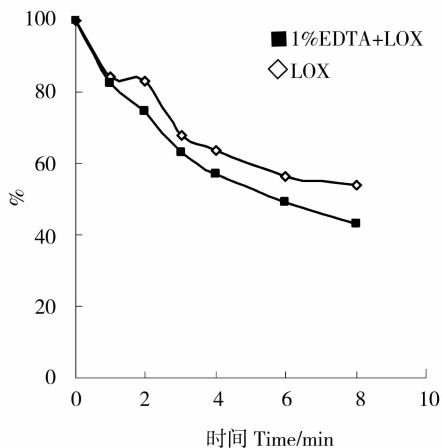


图 2 EDTA 对 LOX 失活稳定性的影响 ( $50^\circ\text{C}$ )

Fig. 2 Effects of EDTA on the thermal inactivation of LOX activity

2.2 EDTA 对脂氧酶催化亚油酸反应的影响

如图 3 所示,向反应体系中添加 EDTA 可以明显加快反应速度。在 30 min 时,反应已经进行得较为完全,达到平衡产率 92%。而未添加 EDTA 的脂氧酶催化体系中,需约 90 min 方能达到反应平衡。由此可知 EDTA 的加入可使脂氧酶催化亚油酸反应的进程缩短为原来的 1/3。亚油酸经皂化后变为水溶性,LOX 与其同处于水相中,推测 EDTA 的加入使脂氧酶的构象变得易于与亚油酸结合。

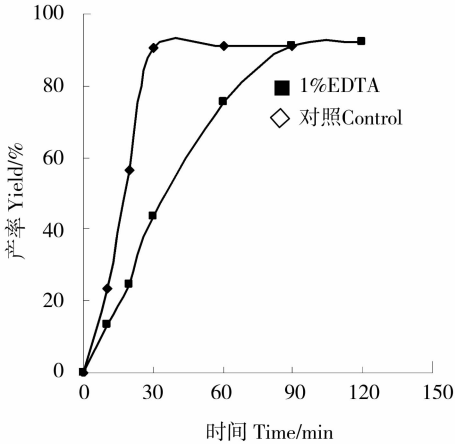


图 3 EDTA 对脂氧酶催化亚油酸反应的影响  
Fig. 3 Effects of EDTA on the LOX catalyzed reaction on linoleic acid

2.3 EDTA 对脂氧酶催化大豆油反应的影响

大豆油与脂氧酶分别处于油相和水相,两者的接触效率很大程度上影响着反应效果<sup>[12]</sup>。EDTA

与 LOX 结合之后,LOX 的构象变得利于与亚油酸分子的结合,却不适合与豆油底物分子相结合,而且 EDTA 的加入似乎并不能提高两者的传质接触。如图 4 所示,在体系中加入质量分数为 1% 的 EDTA 后,产率从原来的 11% 降至 8%,平衡时间未见明显变化。

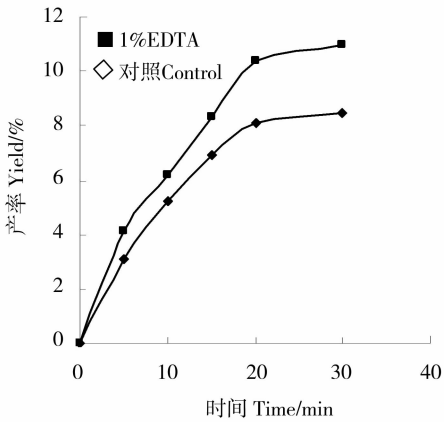


图 4 EDTA 对脂氧酶催化大豆油反应的影响  
Fig. 4 Effects of EDTA on the LOX catalyzed reaction on soybean oil

2.4 EDTA 对脂氧酶荧光光谱的影响

EDTA 与脂氧酶相互作用后其荧光发射光谱的变化如图 5 所示。最大发射峰依然在 335 nm 处未发生偏移,但是峰值有细微的变化,说明 EDTA 并未改变脂氧酶的三级结构。随着 EDTA 浓度的增加,脂氧酶的荧光图谱峰值时而升高,时而下降,带有随机性。

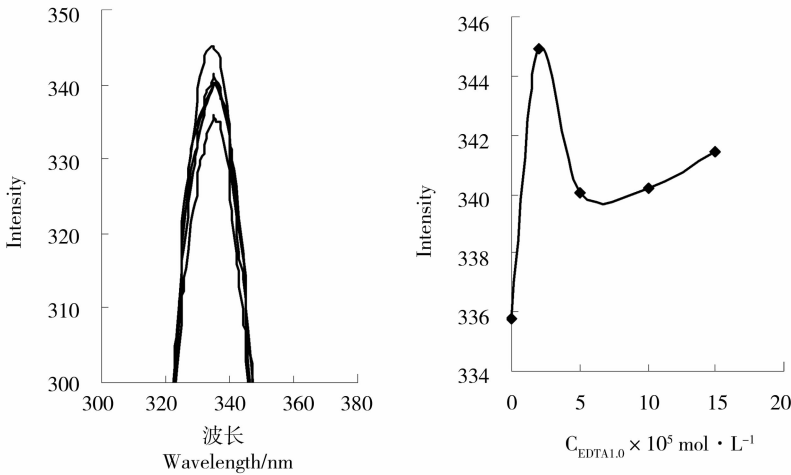


图 5 EDTA 对 LOX 荧光发射光谱的影响  
Fig. 5 Effects of EDTA on the fluorescence excitation spectra of LOX

2.5 EDTA 对脂氧酶 CD 光谱的影响

如图 6 所示,LOX 的 CD 光谱在加入质量分数

为 1% 的 EDTA 之后,扫描曲线有较小的变化。各二级结构的比例利用软件 DICHROWEB 进行在线

计算,其主要二级结构  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠的含量均在 25% 左右浮动,加入 EDTA 后的变化也保持在误差范围内,说明 EDTA 与 LOX 的相互作用并未导致其二级结构发生改变。

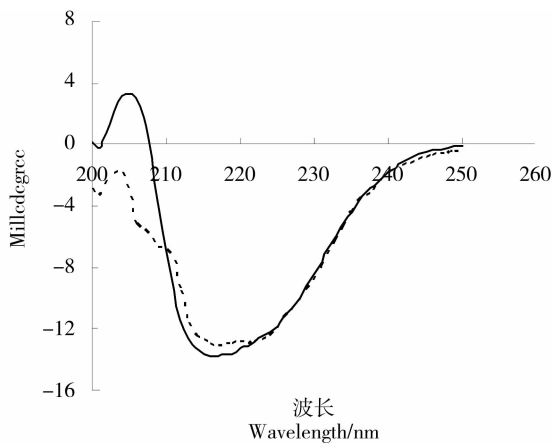


图6 EDTA 对 LOX 的 CD 光谱的影响

Fig. 6 Effects of EDTA on the CD spectra of LOX

### 3 结论与讨论

EDTA 对脂氧酶的稳定性有较为显著的促进作用。室温下,在加入质量分数为 1% 的 EDTA 之后,脂氧酶的酶活在 14 d 内基本保持稳定,30 d 后尚能维持在初始水平的 80%。EDTA 也能够小幅提高脂氧酶对热变性的抵抗能力,使其失活速率有所下降。EDTA 的加入可使脂氧酶催化亚油酸反应的进程缩短为原来的 1/3,但致使催化大豆油的产率从 11% 下降为 8%。说明 EDTA 与 LOX 的结合后其构象变得利于与亚油酸分子结合,却不适合与豆油底物分子相结合。荧光光谱和 CD 光谱的结果显示,EDTA 的加入并未改变 LOX 的二级结构和三级结构,只是局部构象发生了微调。利用适量添加 EDTA 的方法能获得具有理想稳定性的液体脂氧酶制剂,且对底物亚油酸的催化效率有促进作用,在实际应用中有望大为降低能耗。后续可通过进一步研究外源添加剂组合配方的方法,调整 LOX 的局部构象,以期得到适合其它底物如亚油酸酯类等的液体脂氧酶制剂。

### 参考文献

- [1] Stephen J B, Sharon H A S. Perspective on enzyme catalysis[J]. Science, 2003, 301: 1196-1202.
- [2] Wheeler D H, Milun A, Linn F. Dimer Acid Structures: Cyclic structures of clay catalyzed dimers of normal linoleic 9-cis, 12-cis-octadecadienoic acid[J]. Jaocs, 1970, 47: 242-244.
- [3] 蔡燕, 石玉刚, 周红波, 等. 氢过氧化亚油酸钠在洗涤用品中的应用研究[J]. 日用化学工, 2012(43): 188-191. (Cai Y, Shi Y, Zhou H B, et al. Application of sodium linoleate hydroperoxide in laundry product[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2012(43): 188-191.)
- [4] 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: 423-429.
- [5] Indrawati, Amvan L, Ludikhuyze L R, et al. Pressure-temperature inactivation of lipoxygenase in green peas (*Pisum sativum*): A kinetic study [J]. Journal of Food Science, 2001, 66: 686-693.
- [6] 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.
- [7] 蔡燕, 周红波, 鞠剑锋, 吴锦明. 外源钡离子对脂肪氧合酶好氧催化体系的影响[J]. 大豆科学, 2015, 34(6): 1053-1056. (Cai Y, Zhou H B, Ju J F. The effects of exogenous  $Ba^{2+}$  on the lipoxygenase catalytic system [J]. Soybean Science, 2015, 34(6): 1053-1056.)
- [8] 蔡琨, 方云, 夏咏梅, 等. 大豆脂肪氧合酶的提取及影响酶活因素的研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(2): 10-15. (Cai K, Fang Y, Xia Y M, et al. Extraction of soybean lipoxygenase and factors affecting its enzyme activity[J]. Chemical & Industry of Forest Products, 2004, 24(2): 10-15.)
- [9] Surrey K. Spectrophotometric method for determination of lipoxygenase activity[J]. Plant Physiology, 1964, 65-70.
- [10] Gay C, Collins J, Gebicki J M. Hydroperoxide assay with the ferric xylenol orange complex[J]. Analytical Biochemistry, 1999, 273: 149-155.
- [11] Jiang Z Y, Woolland A C S, Wolf S P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of  $Fe^{2+}$  in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method[J]. Lipids, 1991, 26: 853-856.
- [12] Cai Y, Xu H, Liu Y J, et al. Soymeal catalyzed economic facile bioproduction of soybean oil hydroperoxide[J]. Biocatal Biotransform, 2011, 29(1): 31-36.