

# 大豆脂肪氧合酶的 分离纯化及其性质研究

陈书婷, 孔祥珍, 华欲飞\*, 张彩猛

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 食品学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:** 研究了从大豆种子中分离、纯化大豆脂肪氧合酶的方法, 研究表明经过缓冲液提取、差速离心、盐析沉淀和离子交换层析可以得到电泳纯级的大豆脂肪氧合酶。特性研究表明大豆脂肪氧合酶的最适 pH 为 9, 在较低温度下酶活能保持较高水平, 用双倒数法求得大豆中脂肪氧合酶  $K_m = 80.6 \mu\text{mol/L}$ ,  $V_{\text{max}} = 54.2 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。

**关键词:** 大豆脂肪氧合酶, 分离纯化, 酶活, 最适 pH,  $K_m$

## Study on purification and some properties of soybean lipoxygenase

CHEN Shu-ting, KONG Xiang-zhen, HUA Yu-fei\*, ZHANG Cai-meng

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

**Abstract:** The purification method and properties of lipoxygenase (LOX) from soybean were studied. Results showed that the electrophoresis purity LOX can be obtained by phosphate buffer extraction, differential centrifugation, ammonium sulfate deposition and ion-exchange chromatography. Characteristics of soybean lipoxygenase studies showed that the optimum pH was 9.0, and a high enzyme activity can maintain at low temperature, the  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  value of soybean lipoxygenase were  $80.6 \mu\text{mol/L}$  and  $54.2 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ , respectively.

**Key words:** soybean lipoxygenase; purification; enzyme activity; optimal pH;  $K_m$

中图分类号: TS201.2<sup>+</sup>5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)05-0176-03

脂肪氧合酶(lipoxygenase, EC1.13.11.12)属氧化还原酶, 通称脂氧酶(LOX)。LOX中含有非血红素铁, 专一催化具有顺, 顺-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸, 通过对其分子加氧, 形成过氧化氢衍生物, 是非常重要的风味前体物<sup>[1]</sup>。脂肪氧合酶广泛分布于各种植物中, 在豆类中具有较高的活力, 其中尤以大豆中活力最高<sup>[2]</sup>, 自从1947年Theorell等首次从大豆蛋白中获得脂肪氧合酶结晶后, 大多数脂肪氧合酶信息主要来自对大豆脂氧合酶同工酶的研究<sup>[3]</sup>。近年来, 用脂肪氧合酶作为生物催化剂来产生风味物质越来越被关注, 因此对脂肪氧合酶利用率也越来越高, 本实验研究大豆中脂肪氧合酶(LOX)的提取及纯化方法, 得到纯度较高的LOX, 并对其理化和酶学性质进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

收稿日期: 2010-04-21 \* 通讯联系人

作者简介: 陈书婷(1986-), 女, 在读硕士, 主要从事粮食油脂及植物蛋白方面的研究工作。

基金项目: 国家863计划基金(2008AA10Z305); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(JUSRPI0919)。

低温浸出豆粕 山东万得福实业集团有限公司, 谷神生物科技集团有限公司; 硫酸铵、吐温20、无水乙醇、硼酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠 均为化学纯。

S300型三足式离心机 中国张家港市恒大化工设备厂; UV2100型可见紫外分光光度计 尤尼科中国有限公司; 90型恒温磁力搅拌器 上海沪西分析仪器厂; 电子天平 Mettler-Toledo Group; DELTA320pH计 Mettler-Toledo Instruments(SH) Ltd.

### 1.2 实验方法

1.2.1 脂肪氧合酶的酶活测定 底物的制备、酶活的测定参考文献[4]。

#### 1.2.2 脂肪氧合酶(LOX)的纯化

1.2.2.1 原料的选择 选取不同厂家的脱脂豆粕进行了酶活测定, 最终选定一种脱脂豆粕作为分离纯化的原料。

1.2.2.2 纯化方法 称取一定量的脱脂豆粕, 浸泡于0.1mol/L pH为4.5的醋酸缓冲液中, 在4℃冰箱静置过夜, 搅拌1h后得粗酶液, 用纱布过滤后, 离心取上清液, 回调pH6.8, 加固体硫酸铵分级沉淀(30%~60%), 收集沉淀, 用水溶解, 离心, 透析, 然后经DEAE-Sepharose Fast Flow离子交换柱, 在220nm波长下检测蛋白质含量, 并测定酶活力。

1.2.3 蛋白质含量的测定 采用 Bradford 的方法进行测定<sup>[5]</sup>。

1.2.4 分子量的测定 采用 Laemmli 法进行测定<sup>[6]</sup>。

1.2.5 等电点的测定 等电聚焦参考文献 [7] 进行。

1.2.6 动力学性质 配制不同浓度的底物溶液,测定相应的酶活力,用双倒数法作图求出  $K_m$  及  $V_{max}$  值。

1.2.7 大豆脂肪氧合酶的最适 pH 测定不同 pH 的缓冲液体系中酶的活力,确定其最适 pH。

1.2.8 最适温度 取脂肪氧合酶液,分别在 10、20、30、40、50、60、70℃ 的温度下水浴 20min,检测脂肪氧合酶的最适温度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 原料的选择

比较了谷神和万得福新旧脱脂豆粕的酶活,发现万得福新旧豆粕的酶活都比谷神的高,而万得福新豆粕的酶活又比旧豆粕的高 7%,因此选择万得福的脱脂豆粕作为原料。

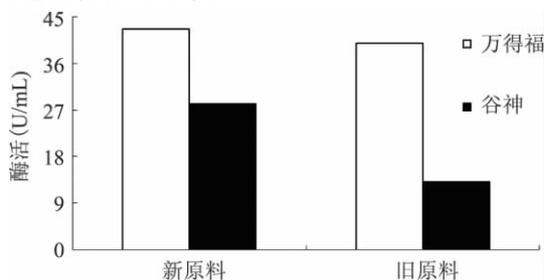


图1 不同原料中 LOX 的酶活

### 2.2 LOX 的分离纯化

脱脂豆粕经过硫酸铵沉淀,再经 DEAE-Sephrose FF 层析(图2),其分离纯化结果见表1。

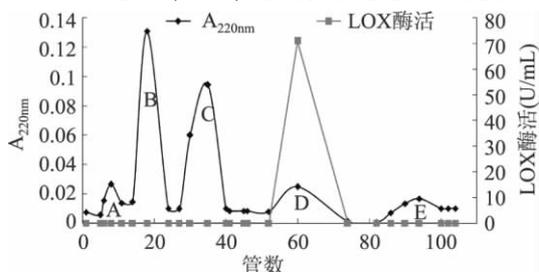


图2 LOX1 的 DEAE 层析谱图

从图2可以看出,洗脱液呈现5个蛋白峰,A、B、C、E 这四个蛋白峰均无活性,只有 D 峰具有脂肪氧合酶活力。

从表1可知,原料经硫酸铵分级分离,DEAE-Sephrose FF 柱层析后,比活力从 3.54U/mg 提高到 105.7U/mg,纯化倍数为 29.9,其回收率是 30.9%。

### 2.3 酶的分子量

由 SDS-PAGE 图可知,经 DEAE 柱层析后的

LOX 分子量为 94kDa。

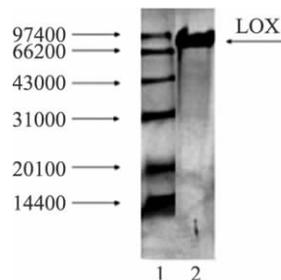


图3 脂肪氧合酶的 SDS-PAGE

注:1-Marker;2-经 DEAE 柱层析后的 LOX。

### 2.4 脂肪氧合酶的等电点

根据等电聚焦原理,可知 LOX 的等电点为 pH5.8,与文献相符。

### 2.5 动力学性质

以 0.2、0.1、0.067、0.05、0.04、0.033、0.028mol/L 不同浓度的亚油酸与酶液在 25℃ 最适 pH9.0 的条件下反应。以底物浓度的倒数为横坐标,反应速度的倒数为纵坐标,作脂肪氧合酶的 Lineweaver-burk 图,求得对于亚油酸而言 LOX 的  $K_m = 80.6\mu\text{mol/L}$ ,  $V_{max} = 54.2\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$  如图4所示。

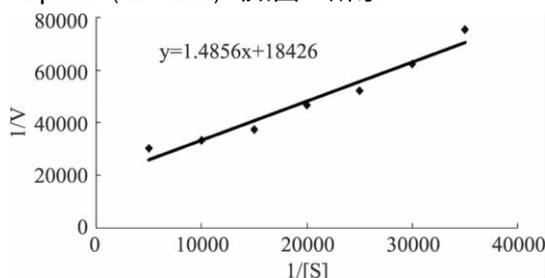


图4 大豆脂肪氧合酶的米氏常数测定

### 2.6 大豆脂肪氧合酶的最适 pH

将纯化后的酶分别稀释于不同 pH 的缓冲液中 (pH3~10),测定其酶活,考察 pH 对酶活的影响,结果如图5。

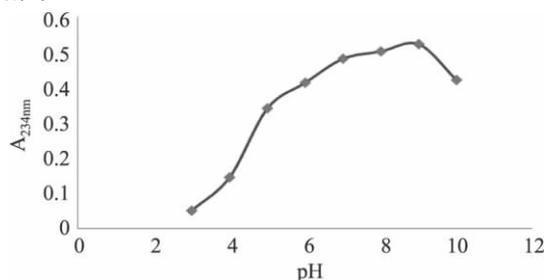


图5 大豆脂肪氧合酶的最适 pH

由图5可见,在 pH7~9 区域内,酶活性较高,故该区域为 LOX 的最适 pH 作用范围,且 pH9 时的 LOX 活性最高。

### 2.7 大豆脂肪氧合酶的最适温度

表1 LOX1 的分离纯化

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (U)	比酶活 (U/mg)	回收率 (%)	纯化倍数 (fold)
粗酶	1098.7	3889.4	3.54	100	1
硫酸铵分级沉淀	275.3	2139.2	7.77	55	2.198
DEAE-Sephrose FF	11.45	1210.3	105.7	30.9	29.9

(下转第 182 页)

明 pepA 基因已稳定整合到泡盛曲霉基因组并且是以单拷贝形式整合进去的。此外,western 杂交和蛋白酶活测定也进一步表明该基因得到了正确的表达。由于泡盛曲霉野生型菌株自身具有较高的酸性蛋白酶活力,转化子酶活与之相比并没有大幅度的提高。这提示我们在对工业酿造丝状真菌分子改造时,一些高水平表达的分泌酶系,仅通过增加拷贝数对整体的酶活贡献有限,但由于酿造产品的风味形成是多酶系的协同作用,本研究方法可应用于分泌量少、活性较小的辅助酶系分子改造。

### 参考文献

- [1] Koseki T, Furuse S, Iwano K, et al. Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(10): 2032-2034.
- [2] 龚宵, 江均平, 贺稚非. 泡盛曲霉 AS 2437 菌株的酶系分析[J]. *食品工业科技* 2009(1): 144-145.
- [3] Takahashi K, Inoue H, Sakai K, et al. The primary structure of *Aspergillus niger* acid proteinase A [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(29): 19480-19483.
- [4] Groot M J, Bundock P, Hooykaas P J J, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(9): 839-842.
- [5] Michielse C B, Hooykaas P J, van den Hondel C A. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional

genomics in fungi [J]. *Curr Genet* 2005, 48: 1-17.

- [6] Michielse C B, Salim K, Ragas P. Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer [J]. *Mol Gen Genomics* 2004, 271: 499-510.
- [7] Michielse C B, Hooykaas P J J, Hondel C A M, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori* [J]. *Nat Protocol* 2008, 3(10): 1671-1678.
- [8] Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [9] 潘力, 李立凤, 邹承娟, 等. 几株酱油米曲霉的分离和 RAPD 分析 [J]. *食品工业科技* 2007(1): 105-106.
- [10] Ye L, Pan L A. A comparison of the unfolded protein response in solid-state with submerged cultures of *Aspergillus oryzae* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008, 72(11): 2998-3001.
- [11] Nevalainen K M, Te'o V S, Bergquist P L. Heterologous protein expression in filamentous fungi [J]. *Trends Biotechnol*, 2005(23): 468-474.
- [12] 刘谨, 王汉忠. 丝状真菌外源基因表达系统研究的现状及展望 [J]. *微生物学通报* 2000, 27(6): 453-454.
- [13] Gou X H, Zhang Y Z. Characterization and transformation of anti-FOA strain of *Aspergillus awamori* [J]. *Acta Microbiologica Sinica* 2000, 40(2): 161-165.

(上接第 177 页)

将纯化后的酶分别稀释于不同温度的缓冲液中,测定其酶活,考察温度对酶活的影响,结果如图 6 所示。

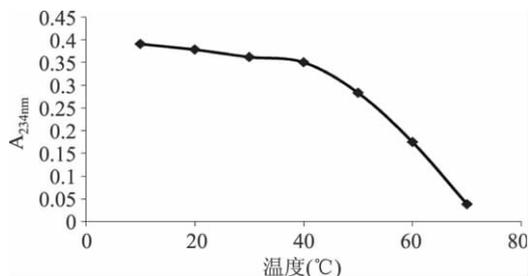


图 6 大豆脂肪氧合酶的最适温度

由 6 图可见,酶活在低温下能保持较高水平,高于 40°C 后急剧下降。因此,游离酶の利用和处理都应尽量在低温下操作,以便保持较高的酶活。

### 3 结论

近年来,用脂肪氧合酶作为生物催化剂来产生风味物质越来越被关注,因此对脂肪氧合酶の利用率也越来越高。脂肪氧合酶可以用常规酶浸提和纯化方法加以分离和纯化,包括硫酸铵沉淀或丙酮沉淀,用水或缓冲液浸提脱脂豆粕即可得到粗 LOX 酶液,进一步分离提纯的方法有盐析法、有机溶剂沉淀法、聚合物沉淀法、双相分离法等<sup>[8]</sup>。透析、离子交换柱层析、凝胶过滤以及各种电泳技术分离和鉴定。本文中大豆脂肪氧合酶分离纯化的程序是硫酸铵沉淀及过 DEAE-Sephrose FF 柱。结果表明:对脂肪氧

合酶过一次 DEAE-Sephrose FF 层析柱,其纯化倍数是 29.9,回收率达 30.9%。大豆中脂肪氧合酶的最适 pH 为 9.0,在低温下酶能保持较高水平的活力,大豆中的脂肪氧合酶  $K_m = 80.6 \mu\text{mol/L}$ ,  $V_{\text{max}} = 54.2 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。

### 参考文献

- [1] Selim Kermasha, Ndeye Dioum, Barbara Bisakowski. Biocatalysis of lipoxygenase in selected organic solvent media [J]. *Journal of Molecular Catalysis* 2001(11): 909-919.
- [2] 王璋. 食品酶学 [M]. 中国轻工业出版社, 1991: 279.
- [3] 田其英, 华欲飞. 大豆脂肪氧合酶研究进展 [J]. *粮食与油脂* 2006(8): 6-9.
- [4] Axelrod. Lipoxygenase from soybeans [J]. *Meth Enzymol*, 1981, 71: 441-451.
- [5] BRADFORD MA. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [6] Laemmli. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [7] Yuji Tasaki, Takashi Hara and, Toshio Joh. Effect of phosphate deficiency on growth and protein profile in three strains of *Pholiota nameko* [J]. *Mycoscience* 2001, 42: 489-498.
- [8] 蔡琨, 方云, 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): 52-26.