

鲜枣脂氧合酶酶学特性及热失活动力学研究

李君兰¹, 郑秀芳¹, 程敏², 焦扬¹, 冯九海¹, 李彩霞¹, 漆福建¹

(1. 河西学院农业与生物技术学院, 甘肃张掖 734000) (2. 宁夏石化公司, 宁夏银川 750000)

摘要:以亚油酸为底物, 采用紫外分光光度法测定鲜枣脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)的酶学特性及热失活动力学性质。考察了温度、pH、金属离子及络合物对 LOX 活性的影响, 并建立了 LOX 酶促反应动力学及热失活动力学参数。结果表明: 鲜枣 LOX 的最大吸收波长为 265 nm; 最适温度和 pH 分别为 40 °C、7.0; 在 pH 值为 5.0~6.0 的环境中, LOX 活性保持相对稳定; 酶促反应动力学符合米氏方程所描述的单底物酶促反应动力学, 其 K_m 和 V_{max} 分别为 0.14 mmol/L、0.26 U/min, 鲜枣 LOX 与底物亚油酸的亲和力较好; 且 LOX 的热失活遵循一级反应动力学规律, 反应活化能为 105.20 kJ/mol; 2 mmol/L Cu^{2+} 和 10 mmol/L Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 对 LOX 酶活力有激活作用($P < 0.05$), 而 2 mmol/L Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 10 mmol/L Mg^{2+} , EDTA 对 LOX 活性具有抑制作用($P < 0.05$)。该试验为鲜枣加工贮藏中 LOX 活性控制提供了有益的数据参考。

关键词: 鲜枣; 脂氧合酶; 特性; 热失活动力学

文章编号: 1673-9078(2015)10-174-181

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.030

Enzymatic Characteristics and Thermal Inactivation Kinetics of Lipoxygenase from Fresh Jujube

LI Jun-lan¹, ZHENG Xiu-fang¹, CHENG Ming², JIAO Yang¹, FENG Jiu-hai¹, LI Cai-xia¹, QI Fu-jian¹,

(1.College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye 734000, China)

(2.Petrochina Ningxia Petrochemical Company, Yingchuan 750000, China)

Abstract: Using linoleic acid as a substrate, the enzymatic characteristics and thermal inactivation kinetics of lipoxygenase (LOX) from fresh jujube were studied by ultraviolet (UV) spectrophotometry. The effects of temperature, pH, metal ions, and complexing agents on LOX activity were investigated, and the kinetic parameters for the LOX enzymatic reaction and thermal inactivation were determined. The results showed that the maximum absorption wavelength of fresh jujube LOX was 265 nm, while the optimum temperature and pH were 40 °C and pH 7.0, respectively. LOX activity was relatively stable at pH 5.0~6.0. Kinetics of the enzymatic reaction followed the Michaelis-Menten equation for single-substrate enzyme-catalyzed reaction, and the values of K_m and V_{max} were 0.14 mmol/L and 0.26 U/min, respectively. Fresh jujube LOX showed good affinity to the substrate linoleic acid. In addition, the thermal inactivation of LOX could be described by a first-order kinetic model, and activation energy (E_a) was 105.20 KJ/mol. The enzyme activity was enhanced by 2 mmol/L Cu^{2+} and 10 mmol/L Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Ca^{2+} , but was inhibited by 2 mmol/L Mg^{2+} , Zn^{2+} , and Mn^{2+} , as well as 10 mmol/L Mg^{2+} complexing agents ($P < 0.05$). The results provide useful reference data for the control of LOX activity during processing and storage of fresh jujube.

Key words: fresh jujube; lipoxygenase; characteristics; thermal inactivation kinetics

枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)是中国的传统果品之一, 鲜枣果实肉脆味美, 营养丰富, 含有多糖、芦丁(Vp)、维生素 C、五环三萜类、皂苷、环腺苷酸、环鸟苷酸、儿茶酚以及 Fe、P、Ca、Zn 等生物活性成分和矿物质元素^[1]。枣树具有抗旱、抗风沙、耐寒、耐盐碱、耐瘠薄, 适应性强等特点^[2], 西北地区主要分布在陕西、甘肃、新疆和宁夏, 其中新疆和田大枣、甘肃临泽小

收稿日期: 2015-01-18

基金项目: 甘肃省教育厅科研项目(1109B-10); 甘肃省农业生物技术研究与
应用开发项目(GNSW-2014-3)

作者简介: 李君兰, 博士, 教授, 主要从事农产品贮藏加工研究

枣品质最优。在自然条件下, 鲜枣采摘数天后就发生品质劣变, 生产上多以干制方式保存, 但维生素 C 和香气成分的含量损失严重^[3,4], 原有风味丧失。研究表明, 脂肪氧化是引起食品变质的主要原因之一, 它可以引起食品颜色、风味、质地的变化和营养价值的降低; 内源脂肪氧合酶(Lipoxygenase, LOX, EC1.13.11.12, 简称脂氧合酶)的活性变化与果实成熟衰老、风味物质变化密切相关^[5~7]。

LOX 是一种氧化还原酶。广泛存在于植物、动物及微生物中, 分子量范围一般在 90~100 kDa, 是含有非血红素离子的双加氧酶, 专一催化分子中含顺, 顺

1-4 戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸加氧反应,生成具有共轭双键的氢过氧化衍生物^[8-10],并通过均裂或 β -裂变分解产生进而转化成具有一系列反应,从而破坏细胞膜的完整性以及改变膜的通透性,导致组织结构和细胞区域化丧失,细胞内部平衡功能失调^[11];蛋白水解酶和有机酸因膜功能丧失而释放出来,促使膜电位消除和呼吸作用进一步增强;叶绿素和蛋白质分解^[12-13],活性氧自由基含量的增加^[14]。引发果实原有质地^[15]、风味^[16-20]、颜色^[13]的改变而软化腐败。因此认为 LOX 是鲜枣成熟衰老的关键酶。因此本试验拟通过对鲜枣 LOX 酶学特性及热失活动力学的分析研究,预防或抑制鲜枣果品因 LOX 带来的感官和营养质量损失变化,将其不利影响尽可能降低,从而优化鲜枣加工和贮藏条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用临泽小枣,于2013年9月10日采自甘肃省张掖市临泽县蓼泉乡果园(东经 99°51',北纬 38°57',平均海拔在 1370 m),采收成熟度为脆熟期,枣果色泽鲜艳全红果。采收当日运回,剔除病果、伤果,挑选大小均匀的果实装袋,放入-40℃的冰箱中保存。

1.2 仪器与设备

Lambda 35 紫外分光光度计(美国珀金埃尔默公司);高速冷冻离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司);HH-8 型水浴锅(金坛市科析仪器有限公司);所用化学试剂均为国产 AR 级。

1.3 试验方法

1.3.1 LOX 酶液制备

取保存于冰箱的鲜枣约 10 个,剔除果核,放入研钵在冰浴中充分研磨后,称取匀浆约 40 g 左右,加入预冷的 pH 6.8 内含 20 mmol/L CaCl₂ 的 0.1 mol/L 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液溶解,定容至 250 mL,4℃放置 3~5 h 后用脱脂棉过滤,滤液中加入约 2 倍体积-20℃预冷的丙酮后抽滤,真空干燥制成丙酮粉。然后参考 Daniel A 等^[21]的方法进行纯化,具体过程如下:

鲜枣丙酮粉→0.1 mol/L 柠檬酸-Na₂HPO₄(pH 6.8,内含 6 mM EDTA)缓冲液溶解→4℃10000 r/min 离心 10 min 取上清液→20%(NH₄)₂SO₄ 盐析→4℃10000 r/min 离心 10 min 取沉淀→0.1 mol/L 柠檬酸-Na₂HPO₄缓冲液溶解→0%(NH₄)₂SO₄ 盐析→4℃10000 r/min 离心 10 min 取上清液→透析(14.7 kDa, MWCO)24 h→阴离子交换树脂吸附→收集未被吸附的溶液→

LOX 酶液。

1.3.2 LOX 活力测定

采用 3.0 mL 反应体系。其中 0.1 mol/L pH 6.8 的柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲溶液 2.0 mL,0.1 mmol/L 亚油酸(取 31 μ L 亚油酸加入 0.5 mL Tween-20,0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 0.5 mL,充分混合均匀至溶液清亮透明,用蒸馏水定容至 100 mL) 0.8 mL,LOX 酶液 0.2 mL。在 25℃下迅速混合均匀,于下述测定的最大吸收波长处测定吸光度 A 的变化。加酶液 15 s 开始计时,每 30 s 读数 1 次,共记录 3 min,平行测定 3 次,取平均值表示最终酶活力。以蒸馏水代替 LOX 提取液做空白。酶活力单位(U)定义为 1 min 内吸光度值增加 0.001 为一个酶活力单位。相对酶活计算根据(eq1)。

$$\text{相对酶活}(\%) = \frac{A_t}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_t-热处理时间为 t 时的样品酶活, U; A₀-热处理时间为 0 min 时的样品酶活, U; t-热处理时间, min。

1.3.3 鲜枣 LOX 最大吸收波长确定

按 1.3.2 的方法选择紫外波长范围 200~300 nm 间测定 LOX 与亚油酸反应底物的吸光度 A 的变化,确定鲜枣 LOX 的最大吸收波长。

1.3.4 LOX 最适 pH 及稳定性

用 0.1 mol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄、0.1 mol/L 柠檬酸-Na₂HPO₄ 的缓冲液调整反应体系的 pH 值。25℃下,取 2 mL pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0 的一系列缓冲溶液,加入 0.1 mmol/L 亚油酸 0.8 mL 和 LOX 酶液 0.2 mL,按 1.3.2 的方法在 LOX 最大吸收波长处测定并计算不同 pH 对 LOX 酶活力的影响。

取 2 mL pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0 的一系列缓冲液,加入 0.2 mL LOX 酶液,在 25℃下,分别放置 10、20、30、40、50 min 后,再加 0.1 mmol/L 亚油酸 0.8 mL。按 1.3.2 的方法在 LOX 最大吸收波长处测定并计算不同 pH 对 LOX 酶活力稳定性的影响。

1.3.5 LOX 最适温度

取 2 mL 0.1 mol/L pH 6.8 的柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液,加入 0.1 mmol/L 的亚油酸 0.8 mL,LOX 酶液 0.2 mL,分别在 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70℃的水浴中保温 5 min,取出迅速放入冰浴中冷却,按 1.3.2 的方法在 LOX 最大吸收波长处测定并计算不同温度下 LOX 酶活力变化。

1.3.6 金属离子及螯合剂

取 0.1 mol/L pH 6.8 的 Tris-HCl 缓冲液 2 mL,分别内含 CaCl₂、MnSO₄、CuSO₄、Na₂-EDTA、MgSO₄、ZnCl₂ 且溶液中各物质浓度分别为 2 和 10 mmol/L。加

入 0.1 mmol/L 的亚油酸 0.8 mL, LOX 酶液 0.2 mL, 在 25 °C 的水浴中, 保温 5 min 后, 取出迅速冷却, 按 1.3.2 的方法在 LOX 最大吸收波长处测定并计算 LOX 残余相对酶活力的变化。以同浓度不含上述任何物质的 Tris-HCl 缓冲液做空白对照(CK), 其余方法相同。

1.3.7 LOX 动力学参数测定

25 °C 下, 取 0.1 mol/L 2 mL pH 6.8 的柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲溶液, 加入 0.2 mL LOX 酶液, 然后分别加入浓度在 0~0.1mmol/L 的亚油酸 0.8 mL, 迅速摇匀, 按 1.3.2 的方法在 LOX 最大吸收波长处测定并计算 LOX 酶活力的变化。运用 Haldane (eq2) 和 Lineweaver-Burk(eq3) 方程, 通过一元线性回归分析估计测定鲜枣 LOX 的动力学参数 K_m 和 V_{max} 。

$$v = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S} \quad (2)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{S} \quad (3)$$

式中: v -反应速率, U/min; V_{max} -最大反应速率, U/min; S -底物浓度, mmol/L; K_m -米氏常数, mmol/L。

1.3.8 LOX 的热失活动力学模型构建

取 2 mL 0.1 mol/L pH 6.8 的柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液, 加入 0.1mmol/L 的亚油酸 0.8 mL 和 0.2 mL LOX 酶液, 分别在 40、45、50、55、60 °C 的水浴中保温 0~5 min, 取出迅速放入冰浴中冷却。按 1.3.2 的方法在 LOX 最大吸收波长处测定并计算不同温度下加热不同时间 LOX 残余相对酶活力的变化。以处理时间为横坐标, 相对酶活力的对数值为纵坐标作图, 得到温度对 LOX 活性的影响曲线, 以此曲线为基础, 研究 LOX 热失活动力学。

已有研究资料表明, LOX 的热失活可以用一级反应动力学来描述^[22-24], 即在特定的食品体系中, 失活速率常数 K 与热处理时间 t 满足以下方程(eg4):

$$\text{相对酶活} (\%) = e^{-kt} \times 100 \quad (4)$$

方程(1)与(4)相等, 并对其积分得到下列方程(eg5)

$$\ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = -K \times t \quad (5)$$

式中: K -热失活速率常数, min⁻¹。

温度取决于速率常数, 热失活的速率常数取决于一级反应速度, 其反应速率遵循阿伦尼乌斯方程。同时, 本试验采用阿伦尼乌斯方程来描述温度与反应速率的关系, 其表达式(eg6)如下:

$$K = Ae^{-\frac{Ea}{RT}} \quad (6)$$

对方程(6)进行积分可得线性等式(eg7)为:

$$\ln(K) = \ln(A) - \frac{Ea}{RT} \quad (7)$$

式中: A -阿伦尼乌斯常数, min⁻¹; Ea -反应的活化能, KJ/mol; R -气体常数, 8.314 J/mol K; T -绝对温度, K。

1.3.9 热失活速率常数 K 、半衰期 $T_{1/2}$ 、 D 值和活化能 Ea 的计算

热失活速率常数根据方程 5 计算。描述酶耐热性的重要参数有: 半衰期 $T_{1/2}$ 、 D 值和活化能 Ea 。其中半衰期 $T_{1/2}$ 和十倍减少时间 D 值是用来描述酶稳定性的重要参数。半衰期越大, 酶的热稳定效果越好。 D 值是指在一定的热力致死温度条件下, 目标酶损失 90% 活力所需要的加热时间(s)^[22], D 值越大表示该酶的耐热性越强。计算根据(eq8)和(eq9)。活化能 Ea 是指反应物(初态)转化成中间产物(过渡态)所需要的能量。即: 在一定温度下, 1mol 反应物分子进入过渡态所需要的自由能, 反应系统中, 活化分子越多, 反应速度越快。

$$T_{1/2} = \ln(2) / k \quad (8)$$

$$D = \ln(10) / k \quad (9)$$

1.4 数据处理

本文所有试验均为 3 次平行测定, 试验结果以平均值±标准偏差表示, 显著水平为 $P < 0.05$ 。运用 Origin 8.5(OriginLab Inc. 美国)作图并对测定结果进行回归分析。

2 结果与分析

2.1 鲜枣 LOX 最大吸收波长的确定

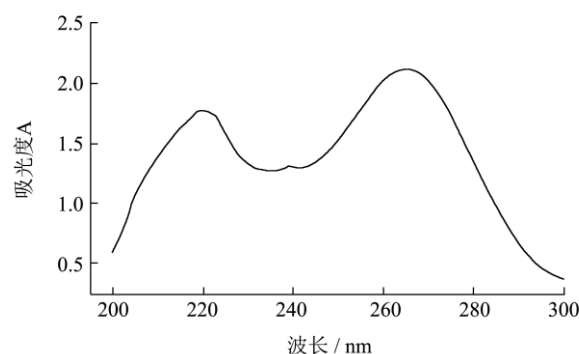


图 1 鲜枣 LOX 反应产物紫外吸收图谱

Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of LOX reaction product from fresh jujube

LOX 与亚油酸反应产物的吸光度变化如图 1 所示。在紫外波长 200~300 nm 之间 LOX 的吸光度 A 出

现了两个高峰,即在 228 和 265 nm 处吸光度 A 值分别达到 1.9768 和 2.1153;而在波长为 242 nm 时,吸光度 A 为 1.2964;随反应产物浓度的增加吸光度值越高。故本研究中选择 265 nm 为工作波长。该反应产物在 200~300 nm 之间出现两个吸收高峰可能与反应物亚油酸、LOX 酶提取液相关。

2.2 温度对 LOX 活性的影响

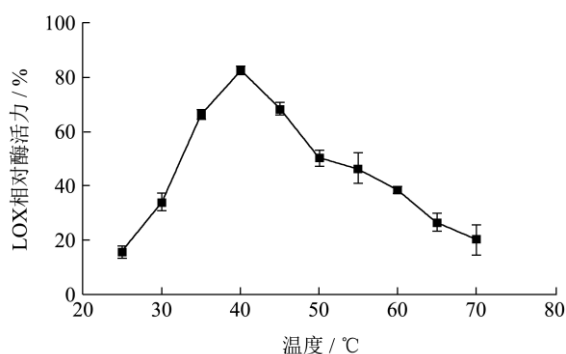


图 2 温度对鲜枣 LOX 相对酶活性的影响

Fig.2 Effect of temperature on LOX relative activity of fresh jujube

由图 2 可知,温度对 LOX 的活性影响显著。在 25~70 °C 温度范围内,LOX 相对酶活力出现了一个高峰,即在 40 °C 时 LOX 相对酶活力达到 82.33%,说明鲜枣 LOX 的最适温度为 40 °C。当温度达到 70 °C 后,LOX 几乎完全失活。这主要是因为不适宜的温度破坏了酶活性部位三维结构的完整性和稳定性,从而使 LOX 失活;温度对酶活性的影响是双重的,温度升高能加快催化反应的速度,也是保持酶活力的关键,另一方面又能促使酶蛋白变性,它是两种对抗效应的综合反应。每种酶在一定条件下都有其最适温度,但是最适温度也不是酶的特征常数。不同来源、不同环境下的 LOX 最适温度存在差异,研究表明临泽小红枣 LOX 的最适温度为 40 °C 这一结果与香蕉叶^[25]、菊苣^[26]、鳄梨^[21]的 LOX 最适温度 40 °C 的结果是一致的;而与文献资料报道的平菇^[27]的 LOX 最适温度为 25 °C。青豌豆^[28]、甜玉米^[22]为 30 °C 不一致。

2.3 pH 对 LOX 活性及稳定性的影响

不同 pH 对鲜枣 LOX 相对酶活性的影响如图 3(a) 所示。在 pH 为 3.0~9.0 范围内,当 pH 为 7.0, LOX 相对酶活力达到 78.11%。说明鲜枣 LOX 的最适 pH 是 7.0。酶的最适 pH 值同最适温度一样,也不是酶的特征性常数,它受许多因素的影响。pH 值的变化影响了酶分子活性部位上有关基团或底物分子的解离,引起酶的电荷分布和活性部位的分子构象发生改变,使

酶空间结构破坏,导致酶活性丧失。植物的种类、品种,或同一品种不同部位的 LOX 其适宜的 pH 值也存在差异。但大多研究结果表明,LOX 最适 pH 在偏酸性或中性范围,如豌豆种子^[29]为 pH 5.5、香蕉叶^[25]6.2、鳄梨^[21]6.5、茄子^[8]7.0、青豌豆^[28]6.0、大豆^[9]的三种同工酶 LOX-I、LOX-II、LOX-III 最适 pH 分别为 9.0、6.8、7.0。

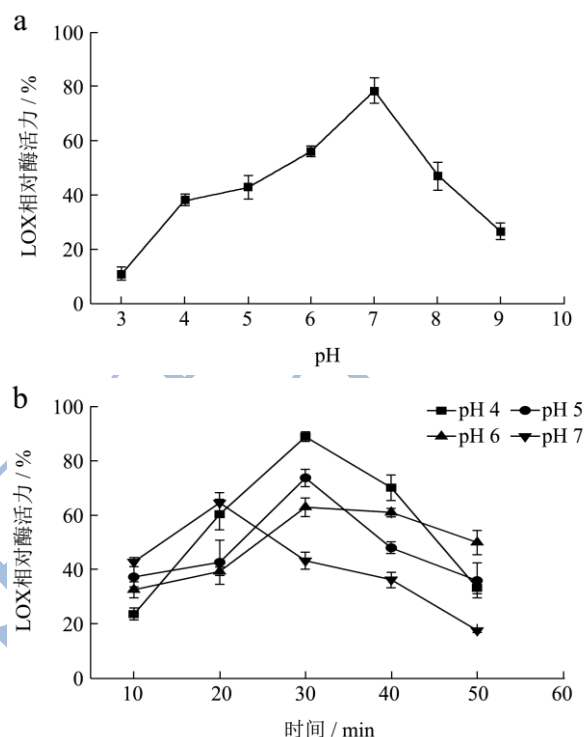


图 3 (a) pH 对鲜枣 LOX 活性的影响; (b) pH 对鲜枣 LOX 稳定性的影响

Fig.3 (a) Effect of pH on LOX activity of fresh jujube; (b) effect of pH on the stability of LOX from fresh jujube

不同 pH 对鲜枣 LOX 稳定性的影响结果如图 3(b) 所示。pH 分别为 4.0、5.0、6.0 时,10~30 min LOX 酶活力随时间的增加而增加,30 min 时 LOX 相对酶活力最高,分别为 88.93%、73.76%、62.97%;在 30~50 min, LOX 相对酶活力随时间的增加而降低,分别降低了 55.64%、37.76%、12.95%;而 LOX 在 pH7.0 时随时间的延长,其活力逐渐降低,50 min 后相对酶活力下降了 47.05%,说明 pH7.0 和 pH4.0 对 LOX 酶活力最不稳定,鲜枣 LOX 在 pH6.0 的反应体系中稳定最好, pH5.0 的反应体系稳定性介于中间。结果表明:鲜枣 LOX 对 pH 稳定性在 5.0~6.0 之间,偏酸性的环境中酶活力较稳定,与刘春泉^[24]等在甜玉米中的研究结果相一致。

2.4 金属离子对 LOX 活性的影响

选取部分常见的 2 价金属离子,测定不同浓度的

金属离子对鲜枣 LOX 活力的影响, 结果见表 1。与对照相比, 2 mmol/L CuSO₄和 10 mmol/L 的 CuSO₄、MnSO₄、CaCl₂对 LOX 都具有激活作用, 其残余相对酶活力分别达到 122.73%、167.89%、108.89% 和 113.83%, 且 Cu²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺对 LOX 残余相对酶活力的影响与金属离子浓度成正比关系, 且二者差异显著($P<0.05$); 2 mmol/L MgSO₄、ZnCl₂、MnSO₄和 10 mmol/L 的 Na₂-EDTA、MgSO₄对 LOX 都有抑制作用, 其中 2 mmol/L Mn²⁺对 LOX 的抑制作用最强, 残余相对酶活达 71.91% ($P<0.05$), Mg²⁺对 LOX 残余相对酶活力的影响与金属离子浓度成反比关系, 且二者差异显著($P<0.05$); 2 mmol/L 的金属螯合剂 Na₂-EDTA、CaCl₂与 10 mmol/L ZnCl₂对 LOX 的抑制作用与对照相比无显著差异($P>0.05$)。

表 1 金属离子和 EDTA 对 LOX 的活性的影响

Table 1 Effect of metal ion and ethylenediaminetetraacetic acid

on LOX activity

金属离子	残余相对酶活/%	
	2 mmol/L	10 mmol/L
CK	100 ^{cde}	100 ^{cde}
Na ₂ -EDTA	102.12±0.25 ^{cde}	97.44±1.61 ^{de}
CuSO ₄	122.73±0.09 ^b	167.89±6.87 ^a
MgSO ₄	97.14±0.77 ^{de}	91.40±1.66 ^e
CaCl ₂	100.44±0.37 ^{cde}	113.83±7.46 ^{bc}
ZnCl ₂	96.84±1.43 ^{de}	106.60±3.25 ^{cde}
MnSO ₄	71.91±5.52 ^f	108.89±5.17 ^{bcd}

2.5 LOX 酶促反应动力学

由图 4a 可知, 当亚油酸底物浓度小于 0.05 mmol/L 时, 随着底物浓度增加, LOX 的反应速率也相应的增加, 且反应速率与底物浓度近似成线性变化关系, 表现为一级反应; 当底物浓度大于 0.05 mmol/L 时, LOX 活性增加缓慢, 反应速率变化很小, 不再呈线性变化。表明 LOX 逐渐被底物饱和, 直至达到最大饱和度, 这种双曲线型的变化表明 LOX 催化的亚油酸反应符合米氏动力学方程。

根据实验数据采用双倒数作图法得到反应速率倒数与底物浓度倒数的关系曲线如图 4b 所示, 其回归方程: $y = 0.5385x + 3.7961$, 相关系数 $R^2 = 0.9723$, 进一步验证了鲜枣 LOX 的酶促反应动力学符合米氏方程, 根据直线斜率和截距求得该反应的米氏常数 $K_m = 0.14$ mmol/L, $V_{max} = 0.26$ min/U。 K_m 值是酶的重要动力学指标, 反映了酶和底物的亲和程度, K_m 值越高, 酶与底物的亲和能力越低, 但是不同来源 LOX 的 K_m 存在差异, 如甜玉米^[22](4 mM)、番茄^[30](4.1 mM)、鳄

梨^[21](0.80 mM), 本实验条件下测得鲜枣的 K_m 值为 0.14 mM, 与香蕉叶^[25](0.15 mM)、豌豆^[29](0.44 mM) 相接近, 结果说明鲜枣 LOX 与底物亚油酸的亲和力较好。

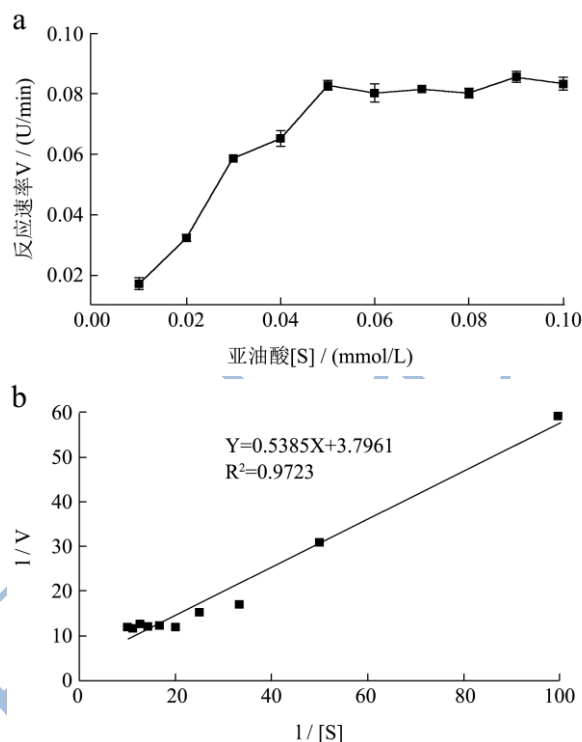


图 4 (a) 不同浓度底物对鲜枣 LOX 活力的影响; (b) 鲜枣 LOX 催化亚油酸的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig.4 (a) Effect of substrates with different concentrations on the activity of LOX in fresh jujube; (b) Double-reciprocal plot of the reaction of linoleic acid catalyzed by LOX from fresh jujube

2.6 LOX 的热失活动力学

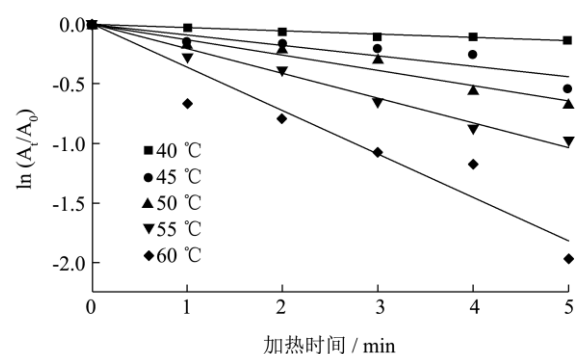


图 5 一级动力学模型下热处理对鲜枣 LOX 活性的影响

Fig.5 Effect of heat treatment under the first-order kinetic model on the activity of LOX from fresh jujube

LOX 只有在低温下才能较长时间地保持其活性, 为进一步研究 LOX 的热稳定性, 将鲜枣 LOX 酶液在 40~60℃ 范围保温不同时间后冰浴冷却。在室温条件

下测定其活性。利用 Origin 中的线性回归程序,以 LOX 相对酶活力的自然对数 $\ln(A_t/A_0)$ 与处理时间 t 进行线性回归。如图 5 所示,酶活力受温度和时间的影响显著,随处理温度的升高和热处理时间的延长,酶蛋白快速变性失活,同时,时间与相对酶活力的自然对数曲线在各温度下均呈线性关系(相关系数 $R^2 > 0.939$),表明鲜枣 LOX 的热失活遵循一级反应动力学规律。

根据直线的斜率以及方程 5 得到各温度下的热失

活速率常数见表 2,失活速率常数 K 和所受的热处理程度呈正相关。这表明温度越高,鲜枣 LOX 失活速率越快。随温度的升高, $T_{1/2}$ 和 D 值越小。加热温度 60°C 时, $T_{1/2}$ 、 D 值均为加热温度 40°C 时的 7.44%,表明当温度高于 40°C 时,随温度的升高,热处理对 LOX 活性的抑制作用变化显著。在 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 范围内,鲜枣 LOX 的 $T_{1/2}$ 、 D 值比甜玉米^[24]测定结果数值小,表明甜玉米中 LOX 比鲜枣 LOX 更加耐热。但这可能与操作条件及品种不同有关,造成测定结果出现差异。

表 2 鲜枣 LOX 失活的一级动力学模型参数

Table 2 Parameters of first-order kinetic model for inactivation of LOX from fresh jujube

温度/ $^\circ\text{C}$	K/min^{-1}	$T_{1/2}/\text{min}$	D/min	R^2
40	0.0271 ± 0.0015	25.5756 ± 1.4207	84.9446 ± 4.7186	0.9827
45	0.0882 ± 0.0099	7.8583 ± 0.8952	26.0998 ± 2.9731	0.9291
50	0.1285 ± 0.0076	5.3938 ± 0.3203	17.9144 ± 1.0639	0.9792
55	0.2069 ± 0.0067	3.3499 ± 0.1086	11.1261 ± 0.3607	0.9938
60	0.3640 ± 0.0267	1.9041 ± 0.1405	6.3242 ± 0.4669	0.9685

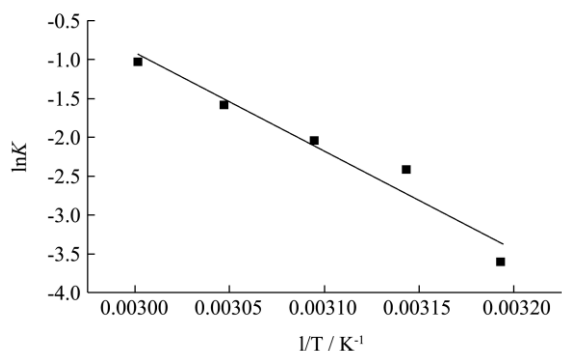


图 6 LOX 热失活动力学的阿伦尼乌斯方程拟合

Fig.6 Fit of LOX thermal inactivation kinetics to the Arrhenius equation

为了进一步研究鲜枣 LOX 的热稳定性,根据方程 7,本实验分析了反应速率常数 K 与处理温度 T 之间的关系,其结果见图 6。在 $40\sim 60^\circ\text{C}$ 下,5 min 内, $\ln K$ 与 $-1/T$ 线性关系良好,表明鲜枣 LOX 热失活遵循 Arrhenius 方程, $E_a = 05.20 \pm 12.77 \text{ kJ/mol}$ ($R^2 = 0.9436$)。此结果与甜玉米^[22]在 $50\sim 70^\circ\text{C}$ 下测得的活化能 116.39 kJ/mol 基本一致。而与番茄^[31]汁液(174 kJ/mol)、豌豆^[32](168 kJ/mol)、绿豆^[33](540 kJ/mol)和大豆^[34](217 kJ/mol)相差较大。Indrawati^[33]在研究绿豆 LOX 热失活动力学时测得的 E_a ,大约是本文所测值的 5 倍。其原因可能为酶失活虽然遵循一定的动力学模型规律,但实际上是一个多机制的复杂变化过程,每一个反应机制都有其依赖的温度,当温度 $\geq 70^\circ\text{C}$ 时,失活过程需要更高活化能,反应速率更加依赖温度的升高,也即温度效应大于时间效应。温度高于 100°C 时,随着蛋白质二、三级机构被破坏,酶失活主要遵循以下反应

方程: $N \rightleftharpoons U \rightarrow I$, 其中: N , U , I 分别为酶蛋白的自然结构,可逆展开以及不可逆展开状态。在高温瞬时处理下,多数酶蛋白呈打开状态,此时时间效应大于温度效应,反应速率主要由 $U \rightarrow I$ 步骤决定,因此反应需要较小的活化能。除了由于操作条件及品种不同,造成测定结果出现差异外,笔者认为测定温度范围差异太大,酶蛋白发生复杂变化,影响了活化能的模型计算,结果并不具有一般可比性。

3 结论

3.1 以临泽小枣为研究对象,确定其 LOX 酶学特性。在 265 nm 处有最大吸收波长; Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 对 LOX 酶活性有激活作用($P < 0.05$)。酶促反应动力学符合米氏方程所描述的单底物酶促反应动力学。在 pH 值为 $5.0\sim 6.0$ 的环境中, LOX 活性保持相对稳定;最适温度和 pH 分别为 40°C 、 7.0 ,疑似脂氧合酶 LOX-II,但仍需进一步检测、鉴定。

3.2 采用 D 、 $T_{1/2}$ 、Arrhenius 模型,测定了鲜枣 LOX 在 $40\sim 60^\circ\text{C}$, 5 min 内热处理过程中的失活速率常数 K ,各温度下的 D 值和 $T_{1/2}$ 值及活化能 E_a 。数据线性拟合较好,遵循一级动力学规律,该动力学模型为鲜枣贮藏加工热处理控制过程中关键工艺参数的设置提供参考。

参考文献

[1] Li J W, Fan L P, Ding S D, et al. Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube [J]. Food Chemistry, 2007, 103(2): 454-460

- [2] Gao Q H, Wu P T, Liu J R, et al. Physico-chemical properties and antioxidant capacity of different jujube (*Ziziphus jujube* Mill.) cultivars grown in loess plateau of china [J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 130(1): 67-72
- [3] 穆启云,陈锦屏. 红枣挥发性物质在烘干过程中的变化研究 [J]. *农业工程学报*, 2001, 17(4): 99-101
MU Qi-yun, CHEN Jin-ping. Variation of volatile compounds of Chinese dates during toast [J]. *Transactions of the CSAE*, 2001, 17(4): 99-101
- [4] 张宝善,陈镜屏,李慧芸. 热风干制对红枣非酶褐变的影响 [J]. *食品科学*, 2006, 27(10): 139-142
ZHANG Bao-shan, CHEN Jin-ping, LI Hui-yun. Effect of hot air drying on nonenzymatic browning of Chinese jujube [J]. *Food Science*, 2006, 27(10): 139-142
- [5] Droillard M J, Rouet - Mayer M A, Bureau J M, et al. Membrane - associated and soluble lipoxygenase isoforms in tomato pericarp [J]. *Plant Physiol*, 1993, 103(4): 1211-1219
- [6] Villatoro C, Altisent R, Echeverria G, et al. Changes in biosynthesis of aroma volatile compounds during on-tree maturation of Pink lady apples [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, 47(3): 286-295
- [7] Caroline C, Randolph B. Lipoxygenase-associated apple volatiles and their relationship with aroma perception during ripening [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2013, 82(2): 28-38
- [8] Lopez-Nicolas J M, Perez-Gilabert M, Gracia-Carmona F. Eggplant lipoxygenase (*Solanum melogena*): product characterization and effect of physicochemical properties of linoleic acid on the enzymatic activity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(1): 433-438
- [9] Taner B, Ashhan D. Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(4): 491-496
- [10] Grechkin A. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase path way [J]. *Prog. Lipid Res.*, 1998, 37(5): 317-352
- [11] Paliyath G, Droillard M J. The mechanism of membrane deterioration and disassembly during senescence [J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 1992, 30(6): 789-812
- [12] Gomboeva S B, Shumaev K B, Gessler N N, et al. The mechanism of oxidation of beta-carotene and polyunsaturated fatty acids [J]. *Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology*, 2001, 377(1): 98-101
- [13] Meng W, Jing S, Weihua F, et al. Identification of a ripening-related lipoxygenase in tomato fruit as blanching indicator enzyme [J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(9): 932-936
- [14] Scandalios J G. Oxygen stress and superoxide dismutase [J]. *Plant Physiol.*, 1993, 101(1): 7-12
- [15] Ganiyu O. Effect of blanching on the antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables [J]. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2005, 38(5): 513-517
- [16] Jan P, Nelly Y, Michael H, Gordon. *Antioxidants in Food: practical applications* [M]. CRC Press, Woodhead Publishing Ltd., 2001
- [17] Wang Jing, Zhu Yongyi. A study on enzymatic properties of Rice lipase [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2000, 15(5):10-13
- [18] Fatemeh W, Ramu M R, Winton P, et al. Lipase and lipoxygenase Activity, Functionality, And Nutrient Losses in Rice Bran During storage [P]. Louisiana Agricultural Experiment Station. Lsu Agricultural center. 2000 Bulletin Number 870
- [19] Magda A M, Tarek M M, Saleh A M, et al. Distribution of lipases in the Gramineae, Partial purification and characterization of esterase from Avena [J]. *Bioresource Technology*, 2000, 73: 227-234
- [20] Taner B, Ashhan D, Seda E. Dondurulmus Domateslerin Depolanması Sırasında Olusan Renk Kayıplarının Belirlenmesive Onleme Yontemleri [J]. *Turkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu*; 2006: 599-602
- [21] Daniel A J V, Carmen H B, Luis C Z, et al. Partial purification and enzymatic characterization of avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass) lipoxygenase [J]. *Food Research International*, 2010, 43(4): 1079-1085
- [22] 刘春泉,刘夫国,牛丽影,等. 甜玉米脂氧合酶酶学特性及热失活动力学 [J]. *核农学报*, 2013, 27(12): 1865-1872
LIU Chun-quan, LIU Fu-guo, NIU Li-ying, et al. Characterization and thermal inactivation kinetics of lipoxygenase from sweet corn [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2013, 27(12): 1865-1872
- [23] Morales-Blancas E E, Chandia V E, Cisneros-Zevallos L. Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from broccoli, green, asparagus and carrots [J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67(1): 146-154
- [24] Monica A, Slivia S. Kinetics of thermal inactivation of tomato lipoxygenase [J]. *Food Chemistry*, 2006, 95: 131-137
- [25] Kuo J M, Hwang A, Yeh D B, et al. Lipoxygenase from banana leaf: purification and characterization of an enzyme that catalyzes linoleic acid oxygenation at the 9-position [J].

- Journal of Agricultural and food chemistry, 2006, 54(8): 3151-3156
- [26] Daglia M, Aceti C, Giorgetti S, et al. Purification and characterization of soluble cichorium intybus var. Siwestre lipoxygenase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(16): 6448-6454.
- [27] Kuribavashi T, Kaise H, Uno C, et al. Purification and characterization of lipoxygenase from pleurotus ostreatus [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50 (5): 1247-1253
- [28] Gokmen V, Baheci S, Acar J. Characterization of crude lipoxygenase extract from green pea using a modified spectrophotometric method [J]. European Food Research and Technology, 2002, 215(1) : 42- 45
- [29] Urszula S, Anna J, Barbara B, et al. Characterisation of lipoxygenase from pea seeds (pisum sativum var. Telephone.L) [J]. Food chemistry, 2009, 116(4): 906-910
- [30] Suurmeijer C N S P, Pérez-Gilabert M, Van der Hijden H T W M, et al. Purification, product characterization and kinetic properties of soluble tomato lipoxygenase [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1998, 36(9) : 657 -663
- [31] 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(2): 423-427
- [32] 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(5): 1850-1855
- [33] Indrawati I, 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(5): 686-693
- [34] 蔡燕,方云,夏咏梅.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[J].大豆科学,2011 38(11):144-147
CAI Yan, FANG Yun, XIA Yong-mei. Thermal inactivation of soybean lipoxygenase and its secondary structure performance of circular dichroism spectroscopy [J]. Soybean Science, 2011, 38(11): 144-147