

—氢过氧化物可与大豆蛋白中的—SH反应生成—S—S—键、—SO₂H或—SO₃H,从而使大豆蛋白形成凝胶的能力下降^[3];另一方面,将少量含有脂肪氧合酶活力的大豆粉加入面粉中,生成的氢过氧化物在降解色素、漂白面粉的同时还氧化面筋蛋白质形成二硫键,起到漂白面粉和提高焙烤质量的作用^[2]。

鉴于脂肪氧合酶对食品质量的多重影响以及含脂肪氧合酶活力最高的大豆作为优良蛋白质资源在食品工业中日益广泛的应用,有必要寻找到快速、准确、灵敏的脂肪氧合酶测定方法,以便于食品加工过程中控制与脂肪氧合酶有关的质量指标。目前为止,已公开报道的测定方法包括量压法、分光光度法^[4]、氧电极法^[5]和Fe(CNS)₃显色法^[6],各种方法的测定原理和测定参数不同,具有各自不同的优缺点。氧电极法的工作原理是通过测定恒温密闭体系中氧电极电位的变化,定量脂肪氧合酶催化底物亚油酸发生氧合反应所消耗的氧气,并以初始耗氧速度作为酶活力单位^[2]。这种方法的优点是可连续记录反应进程,适用于纯酶和粗酶提取液的动力学研究,但由于对仪器温控和密闭性要求苛刻,限制了此法的广泛使用。Fe(CNS)₃显色法是利用酶反应初期产物能氧化Fe(CNS)₂生成有色化合物的特性,采用分光光度法定量测定酶活力,该法存在的主要问题是Fe(CNS)₃不稳定,而且呈现的色值和Fe(CNS)₃的量之间缺乏良好的线性关系^[1]。因此,作者将讨论除上述两种方法以外的其它脂肪氧合酶活力测定方法,简要介绍量压法、分光光度法及未公开发表的KI-淀粉法^[7]的基本原理,着重比较各种方法的相关性及其优缺点,探讨每种方法的适用范围。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆 东北产;亚油酸、KI、可溶性淀粉、冰醋酸及其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器

UV-1100紫外-可见分光光度计,北京瑞利分析仪器公司;微量呼吸减压仪,上海科技大学产品;722光栅分光光度计,上海第三分析仪器厂产品。

1.3 方法

1.3.1 酶液的制备 全脂大豆经粉碎后用石油醚多次浸提得到脱脂大豆粉。称取10g脱脂大豆粉加水搅拌使其充分溶解并定容至100mL,所得溶解液

在4℃,6000r/min条件下离心20min,得上清液为酶液。

1.3.2 酶液的热处理 将提取得到的酶液移入数支小试管中,用薄膜封口,然后将试管置于70℃的水浴中进行热处理,每间隔一定时间取出一管并迅速放入冰浴中冷却至0℃左右,即得到经2~20min热处理的各个酶液样品。

1.3.3 酶活力测定方法

1) 量压法(Warburg呼吸仪法,AACC方法)

取0.4mL酶液(已用蒸馏水稀释10倍后的酶液)放入反应瓶的侧臂内,再取1.0mL底物乳状液(5mL亚油酸+2mL吐温-20+15mL蒸馏水,搅拌而成)和2.0mL磷酸缓冲液(0.1mol/L,pH6.5)放入主室中。反应瓶在30℃的恒温水浴中振动平衡5min后关闭测压计活塞,调整密闭端液面至参比点,将侧臂内容物倒入主室并计时,反应3min后调测压计密闭端的液柱到原来的参比点,立即读出开口端的液柱高度,同时使用温压计校正。以1min内消耗氧1μL作为一个酶活力单位(U₁)。

2) 分光光度法^[4]

取0.3mL酶液(已用蒸馏水稀释50倍后的酶液)于试管中,加入2mL底物乳状液(2.24×10⁻³mol/L亚油酸分散于含0.5μL/mL吐温-20的0.1mol/L,pH9.0的硼酸缓冲液中)混匀后放入30℃水浴中并开始计时,反应3min后加入5mL无水乙醇终止反应,然后加入5mL蒸馏水混匀并测定反应液的吸光度。以1min内3mL反应体系在234nm的吸光度增加0.001作为一个酶活力单位(U₂)^[9]。

3) KI-淀粉法

取0.2mL酶液(已用蒸馏水稀释10倍后的酶液)于试管中,加入2mL底物乳状液(0.03mol/L亚油酸分散于含10μL/mL吐温-20的水中,调pH值至9.0)并开始计时,于30℃水浴中反应4min后加入0.1mL,1%的可溶性淀粉、0.4mL饱和KI溶液(新鲜配制)和5mL15%的醋酸溶液。室温下显色并测定显色8min时体系的吸光度,以1min内3mL反应体系在470nm的吸光度增加0.001作为一个酶活力单位(U₃)。

上述3种方法均遵循文献报道的基本步骤,并根据实际酶活力对具体条件加以修正,实验选用的酶液稀释倍数、酶和底物加量均经多次实验确证,在测定的反应时间内,底物过量条件下,测定参数随反应时间呈线性增加。

2 结果与讨论

量压法的测定原理与氧电极法相似. 脂肪氧合酶催化底物亚油酸与氧结合形成氢过氧化物, 使得一定体积的密闭体系内氧气的量减少, 在温度恒定的条件下, 体系的气体总压下降. 根据密闭体系的总气体体积和测定得到的气体压力变化值, 运用气体状态方程就可以计算出反应的耗氧量. 耗氧量与酶反应强度线性相关. 该法的主要优点是测定参数与反应体系浊度无关, 因而既适用于纯酶也适用于粗酶活力的测定, 但由于测定时需不断振动反应瓶以保持底物的乳化和温度的恒定, 酶活力会因振动而部分损失.

与量压法不同, 分光光度法测定的是酶催化反应的初期产物. 脂肪氧合酶催化底物亚油酸反应生成的初期产物具有共轭二烯的结构, 而共轭双键在 234 nm 处有特征吸收, 通过测定反应体系在 234 nm 处的吸光度可以定量生成的共轭二烯量, 并推算出酶活力. 该法的显著优点是可连续测定, 但受分光光度法测定体系不能有浊度的限制, 不适用于浊度较高的粗酶液酶活力的测定, 比如未脱脂的大豆提取液.

KI-淀粉法与 $\text{Fe}(\text{CNS})_3$ 显色法类似, 测定的基本原理是基于脂肪氧合酶催化亚油酸反应形成的氢过氧化物在酸性条件下可氧化 I^- 形成 I_2 , 而 I_2 与淀粉结合可呈现出介于兰、紫和褐色之间的颜色, 在 470 nm 处有特征吸收. 吸光度的大小直接反映生成的 I_2 量, 因而可以间接定量脂肪氧合酶活力的大小. 与上述分光光度法一样, KI-淀粉法的测定同样受到酶液浊度的制约, 而且由于显色是在酸性条件下进行的, 酶液中存在的蛋白质和脂肪在酸性条件下会絮凝. 若采用离心的方法虽能除去絮凝但同时会使部分有色物质的沉淀, 从而影响测定结果的可靠性. 因此, 该法不适合于粗酶提取液酶活力的测定.

以上简要地分析了 3 种方法的优缺点, 采用上述 3 种方法测得的酶提取液及经热处理后的酶液的酶活力数据见表 1~3.

从表中数据可以看出, 对于相同的酶液, 欲使测定参数处于较为理想的范围, 分光光度法的酶液稀释倍数最高, 在本实验中为 50 倍, 比采用量压法和 KI-淀粉法时的稀释倍数高 4 倍, 也就是说, 分光光度法的灵敏度最高. 但从工业化的角度来看, 由于 KI-淀粉法的测定是在可见光范围进行的, 当有

脂肪氧合酶活力存在时, 测定体系就会呈现肉眼可辨的特征颜色, 因而该法特别适用于灭酶时鉴定是否存在脂肪氧合酶的残余酶活力, 即脂肪氧合酶的定性分析.

表 1 采用量压法测定脂肪氧合酶活力

Tab. 1 Lipoxygenase activity determined by manometric method

酶液在 70 °C 热处理时间/min	校正压差* (水柱)/mm	总耗氧量/ μL	酶活力/ (U_1/mL)	残余活力/%
0	59.0	74.9	624	100
2	48.8	62.0	516	82.7
4	34.6	43.9	365	58.6
6	24.4	31.0	258	41.4
8	17.3	22.0	183	29.3
10	12.2	15.5	129	20.7
12	8.1	10.3	85.8	13.8
15	6.1	7.7	64.2	10.3
20	4.0	5.1	42.5	6.7

* 校正压差 = 测量压差 - 空白压差 - 温压计压差

表 2 采用分光光度法测定脂肪氧合酶活力

Tab. 2 Lipoxygenase activity determined by spectrophotometric method

酶液在 70 °C 热处理时间/min	A_{234}	酶活力/ (U_2/mL)	残余活力/%
0	1.55	3.47×10^5	100
2	1.25	2.80×10^5	80.6
4	0.851	1.91×10^5	54.9
6	0.660	1.47×10^5	42.6
8	0.465	1.04×10^5	30.0
10	0.360	8.06×10^4	23.2
12	0.225	5.04×10^4	14.5
15	0.184	4.12×10^4	11.9
20	0.118	2.64×10^4	7.6

表 3 采用 KI-淀粉法测定脂肪氧合酶活力

Tab. 3 Lipoxygenase activity determined by KI-starch method

酶液在 70 °C 热处理时间/min	A_{470}	酶活力/ (U_3/mL)	残余活力/%
0	0.796	34051	100
2	0.664	28404	83.4
4	0.358	15322	45.0
6	0.336	14373	42.2
8	0.282	12063	35.4
10	0.164	7015	20.6
12	0.124	5304	15.6
15	0.103	4427	13.0
20	0.042	1797	5.2

虽然分光光度法与量压法的测定参数不同, 但两个测定参数之间存在着一定的数学关系. 根据

234 nm的吸光度和亚油酸氢过氧化物(共轭二烯)的摩尔消光系数^[7],可以推算出被氧化的亚油酸的量,并相应地计算出反应的耗氧量.由分光光度法的酶活力定义,每 mL 酶液催化反应 1min,在 3 mL 体系内 A_{234} 为 $U_2 \times 0.001$,相当于 1 L 的体系内 $A_{234} = U_2 \times 0.001 \times 3/1000 = U_2 \times 3 \times 10^{-6}$,即生成的氢过氧化物为 $U_2 \times 3 \times 10^{-6} (2.74 \times 10^4)$ mol = $U_2 \times$

1.09×10^{-10} mol,换算成耗氧量即为 $U_2 \times 2.44 \times 10^{-3}$ μ L. 计算结果见表 4. 表中数据显示,采用分光光度法测定的结果高于量压法,据分析,可能是由于采用量压法时平衡阶段和酶反应时的振动会造成酶活力的部分损失,也可能存在测量的系统误差.不过总的来说,计算的结果证实了两种测定方法的可靠性.

表 4 分光光度法测定结果与量压法测定结果的比较

Tab.4 Comparison of the results obtained by manometric and spectrophotometric methods

酶液在 70 °C 热处理时间/min	量压法		分光光度法	
	酶活力/ (U_1 /mL)	耗氧量/ (μ L/(min·mL))	酶活力/ (U_2 /mL)	耗氧量* / (μ L/(min·mL))
0	624	624	3.47×10^5	847
2	516	516	2.80×10^5	683
4	365	365	1.91×10^5	466
6	258	258	1.47×10^5	359
8	183	183	1.04×10^5	253
10	129	129	8.06×10^4	197
12	85.8	85.8	5.04×10^4	123
15	64.2	64.2	4.12×10^4	101
20	42.5	42.5	2.64×10^4	64

注:亚油酸氢过氧化物的摩尔消光系数为 2.74×10^4 mol/(L·cm)

比较几种方法测定得到的残余活力,可以考察 KI-淀粉与其它两种方法的相关性.根据表 1~3 中的数据,将残余活力对热处理时间作图(图 2)图中曲线再次证明量压法与分光光度法的良好相关性.相对而言,KI-淀粉法的曲线波动较大,这有可能是加入醋酸终止酶反应和显色时,在酸性条件下体系浊度较大所带来的误差,不过,从与其它两种方法的相关性来看,KI-淀粉法仍不失为一种有效的脂肪氧合酶测定方法.

3 结论

以上关于 3 种方法的定性和定量分析结果表明,量压法适用范围广,可测定比色法不能应用的高浊度酶液,但测定结果偏低;分光光度法灵敏度高,适于连续监测酶反应进程;KI-淀粉法受浊度的影响较大,一般适合工业化应用.3 种方法都存在一定的相关性,其中量压法和分光光度法相关性较

好.

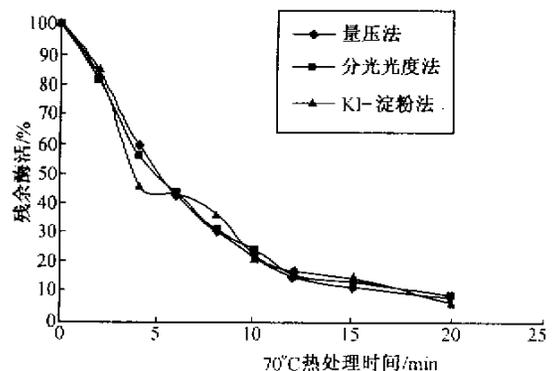


图 2 3 种测定方法得到的酶热失活曲线

Fig.2 Thermal inactive curve of lipoxygenase obtained from three different assays

(下转第 91 页)

参考文献：

- [1] MICHAEL N A. Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality[J]. **Crit Rev Food Sci Nutr** , 1977(9) : 1 ~ 40.
- [2] 王 璋. 食品酶学[M]. 北京 : 中国轻工业出版社 , 1994.
- [3] AKIO Obata , MASARU Matsuura , KEISUKE Kitamura. Degradation of sulfhydryl groups in soymilk by lipoxygenase during soybean grinding[J]. **Biosci Biotech Biochem** , 1996 60(8) : 1229 ~ 1232.
- [4] AL-OBAIDY H M , SIDDIQI A M. Properties of broad bean lipoxygenase[J]. **J Food Sci** , 1981 46 : 622 ~ 629.
- [5] GALLIARD T , PHILLIPS D R. Lipoxygenase from potato tubers[J]. **J Biochem** , 1971 , 124 : 431 ~ 438.
- [6] GROSSMAN S , BEN A , BUDOWSKI P. Enzymic oxidation of carotene and linoleate by alfalfa : extraction and separation of active fractions[J]. **phytochemistry** , 1969 8 : 2287 ~ 2293.
- [7] HISATERU Mitsuda , KYODEN Yasumoto , AIJIRO Yamamoto. Study on soybean lipoxygenase[J]. **Agr Biol Chem** , 1967 31 : 115 ~ 120.