

马铃薯脂加氧酶催化 胡萝卜素的共同氧化作用

摘要

在亚油酸存在时，胡萝卜素可由马铃薯脂加氧酶催化共同氧化作用。共同氧化的速度与亚麻酸和 胡萝卜素的浓度有关。最大共同氧化作用的速度是当亚麻酸和胡萝卜素摩尔浓度比率为16:1。

1. 序言

脂加氧酶(亚油酸盐：氧还原酶EC 1.13.11.12)是目前最被广泛研究的酵素(Robinson, Wu, Domon, & Casey, 1995)。而且它存在于60多种的动植物身上。脂加氧酶主要是催化多不饱和脂肪酸(PUFA)包含顺式，顺式，1,4-戊二烯单元的双加氧作用，以形成共轭过氧化二烯酸。黄豆脂加氧酶是脂加氧酶中最被广泛研究的，Boyington, Gaffney and Amzel,(1993)已将它的分子结构发表出来。马铃薯脂加氧酶(至今仍未有完整的研究)是一个很不平常的酵素。它是植物酵素但是却和哺乳动物的脂加氧酶很相似，可以催化有20个碳原子的PUFA(花生四烯酸)的氧化作用，制造出15-过氧二十碳四烯酸。这个过氧化物在动物身上是很多有生物活性化合物的先质。在药理上是很重要的。所以，我们对马铃薯脂加氧酶非常感兴趣，因为它非常容易取得，可以做为哺乳类动物酵素的替代模式。Royo, Vancanney, Perez, Sanz, Stormann, Roshahl and Sanchez-Serrano(1996)将马铃薯脂加氧酶的三种同工酶分离出来，并将其命名为：LOX-1, -2和 -3。马铃薯LOX-1较偏好亚油酸为底物，而9-过氧化物是其主要产物。另一方面，亚麻酸被认为是马铃薯LOX-2和 -3的偏好底物，而13-过氧化物是其主要产物。

有一些脂加氧酶在PUFA的存在下，也可以催化类胡萝卜素的共同氧化。黄豆第一类脂加氧酶(LOX-1)被用作面粉漂白剂，也曾显示可以改善面包质量，有助于面团发酵过程(Frazier, Leigh-Dugmore, Daniels, Russell Eggitt, & Coppock, 1973; Cumbee, Hilderbrand, & Addo, 1997)。另一方面，因为类胡萝卜素是天然的染料和抗氧化物，当新鲜蔬菜如黄色的四季豆、水果或加工食品的颜色变白时，也代表其质量的恶化。也有相关的报导指出，黄豆、豌豆和小麦第二类的脂加氧酶(LOX-2和 -3)如果有亚油酸存在的话也有漂白效果(Weber, Laskawy, & Grosh, 1974)。但是大部分类胡萝卜素共同氧化作用的研究都集中在黄豆LOX-1。曾有声称在无氧状态和PUFA或相当的酰基过氧化物存在下，这个酵素呈现强烈的共同氧化活性(Klein, Grossman, King, Cohen, & Pinsky, 1984)。然而，在有氧状态下，它反而不能有效的催化漂白作用。因为黄豆不能在欧洲大陆广泛种植，所以必须选择其它替代的植物。我们最近的研究调查偏向于豌豆脂加氧酶的特性和使用，以及个别同工酶的选殖(Wu, Robinson, Casey, Hughes, West, & Hardy, 1995; Robinson et al., 1995; Casey, 1998; Hughes, Robinson, Hardy, West, Fairhurst, & Casey, 1998)。现在我们提出马铃薯脂加氧酶可能运用的漂白特性来作为另一种而且是较便宜的脂加氧酶的来源。因为明白了类胡萝卜素是可在食物中取得的抗氧化物和具有对抗自由基的保护效果(Donnelly & Robinson, 1995)，所以才对这个研究感兴趣。我们使用了全反式 胡萝卜素、维他

命A(视黄醇)、维他命A的醛式(视黄醛)和酸式(视黄酸)作为测试的底物。

2. 材料与方法

亚油酸、全反式 胡蘿卜素、视黄醇、视黄醛和视黄酸和勞式法材料盒(包括牛血清清蛋白，BSA)，勞式试剂和佛林和乔卡梯奥酚试剂皆购自于Sigma。硫酸胺、乙二胺四乙酸(EDTA)和其它的化学药品皆來自Fisher Scientific。红马鈴薯块茎则是从当地超市取得。

粗粹取物是用Waring搅拌器均质配制的。将红马鈴薯(250 g)削皮加上2倍体积的100 mM磷酸缓冲液(pH 6.3，含2 mM焦亚硫酸钠、2 mM维他命C和1 mM EDTA)。先透过兩层的棉布将匀浆过濾，再利用10000x g的速度離心來净化匀浆。在4 °C，利用(15-45 %饱和)硫酸胺沉淀法來纯化脂加氧酶。沉淀物用pH 6.3, 40 mM的磷酸盐缓冲液重新悬浮。这就是后来提到的部份精練的酵素。然后利用勞式法來测量其蛋白浓度。

2.1 亚油酸的氧化作用

加氧磷酸钠缓冲液是将氧气加入液体中1分钟所制作的，然后再加入特维恩20 (Tween 20, 200 μ l)。接着是超音波处理。再用磷酸盐缓冲液稀释成0.5 ml 到50 ml。使用前，用18.6 μ l的亚油酸和1.733 ml的1 M加氧磷酸盐缓冲液混合，連續搅拌后，再用相同的磷酸盐缓冲液稀释100倍成为0.3 mM的亚油酸。保存在冰上的酵素出取物(5 μ l)加入1 M加氧磷酸盐缓冲液(2 ml)和0.3 mM的亚油酸(1 ml)。每隔15秒钟测量一次，紀錄5分钟。酵素的活性是测量在234 nm所增加的吸光率。活性单位的定义是增加的吸光率/0.001min。

2.2 類胡蘿卜素的共同氧化作用

不管是 胡蘿卜素、视黄醇、视黄醛或视黄酸(1 mg)皆存于用氮气密封的烧瓶裡。用含Tween 80(40 μ l)的氯仿(1 ml)來溶解，然后将溶剂蒸发干，再溶解于1 mM EDTA (10 ml)。测试的溶液含pH 6的加氧磷酸盐缓冲液(2 ml)、0.3 mM的亚油酸(1 ml)和1 mM 含類胡蘿卜素的EDTA(50 μ l)。测试在456, 328, 373和353 nm处减少的吸光率，依序來测试 胡蘿卜素、视黄醇、视黄醛和视黄酸减少的量。酵素活性最适合亚油酸和類胡蘿卜素的氧化作用是利用磷酸盐缓冲液从pH 5到6.5來决定的。

3. 结果和討論

部份精練马鈴薯脂加氧酶在pH 5.6的比活性是 1.76×10^4 单位/mg的蛋白质。亚油酸和 胡蘿卜素，在一定的底物浓度下，分别的氧化速度如图1所显示。部份精練的马鈴薯脂加氧酶酵素活性最适合的亚油酸的氧化作用是在pH 5.6到5.7，和Gilliard and Phillips, (1971)的报告相似。但和Sekiya, Aoshima, Kajiwara, and Hatanaka, (1977)的报告不同，因为他们使用了纯的马鈴薯酵素。这个差異可以有很多不同的解释。首先，可能是使用了不同品种的马鈴薯造成的，还有在纯化的过程中，不同的同工酶的分

離(Sekiya et al., 1997)。也许是在乳化的底物裡含不同成分和大小的胶体样微团的关系。在我们的马鈴薯酵素活性实验裡，最适合 胡蘿卜素的共同氧化作用是在pH 6.0。与亚油酸氧化作用的最佳pH还要高些。然而，Hsieh and McDonald (1984)提出小麦脂加氧酶对PUFA氧化作用和類胡蘿卜素的共同氧化作用的最佳pH还要更高(pH 10.2)。所以，这表示小麦脂加氧酶和黃豆第一類脂加氧酶相似，因为黃豆酵素是在pH 9.0观察到最大活性。

和亚油酸氧化作用的速度比起來， 胡蘿卜素的共同氧化作用較慢 就如图1所显示。但是在456nm的吸光率却是随时间降低，可能与某些被氧化产物的吸光率也是在这个波长的关系。这样的产物可能和一些尚未发表的尝试性需确认的产物相似(Wu et al., 1998)。这些产物它的共轭双键數并没有改变。所以，真正胡蘿卜素的氧化作用速度应该比在456nm所测到的共同氧化速度还要快。反应物(胡蘿卜素和亚油酸) 和酵素的浓度会影响到共同氧化作用的速度。对于類胡蘿卜素的漂白作用， 胡蘿卜素和亚油酸有其最适宜的底物浓度(图2)。对 胡蘿卜素而言，它的浓度是6.0 μM (当亚油酸浓度是0.1 mM时)。对亚油酸而言，它的浓度是0.05 mM(当 胡蘿卜素是3 μM 时)。而且，亚油酸和 胡蘿卜素的浓度比也会影响到共同氧化的速度。图3显示当[亚油酸]/[β 胡蘿卜素]是等于16，共同氧化速度比其它的浓度比的速度还要快。另一方面，当酵素的浓度是5.9到40.8单位/ml时，和共同氧化的速度成线性关系。

胡蘿卜素的共同氧化作用是同时氧化兩种底物(PUFA和類胡蘿卜素)，这个观念是被广泛接受的。在实验条件下，最高速度出现在当[亚油酸]/[β 胡蘿卜素]莫耳浓度比等于16时(图3)。这可能是在乳化胶体样微团中最适合的亚油酸和 胡蘿卜素的莫耳浓度比有关。或者只是需要较高浓度的亚油酸基來偶聯類胡蘿卜素分子的氧化作用。Hughes et al. (1998) 提出在某些同工酶裡，过氧化基较容易释放。因为化学歧化反应的关系，提高了羰基衍化物的形成。这也表示过氧化基的释放可以漂白和降解可溶性 胡蘿卜素。当底物是视黃醇、视黃醛和视黃酸时，没有明显的共同氧化作用产生。这表示这些较具极性的類胡蘿卜素并不能接近这个酵素。

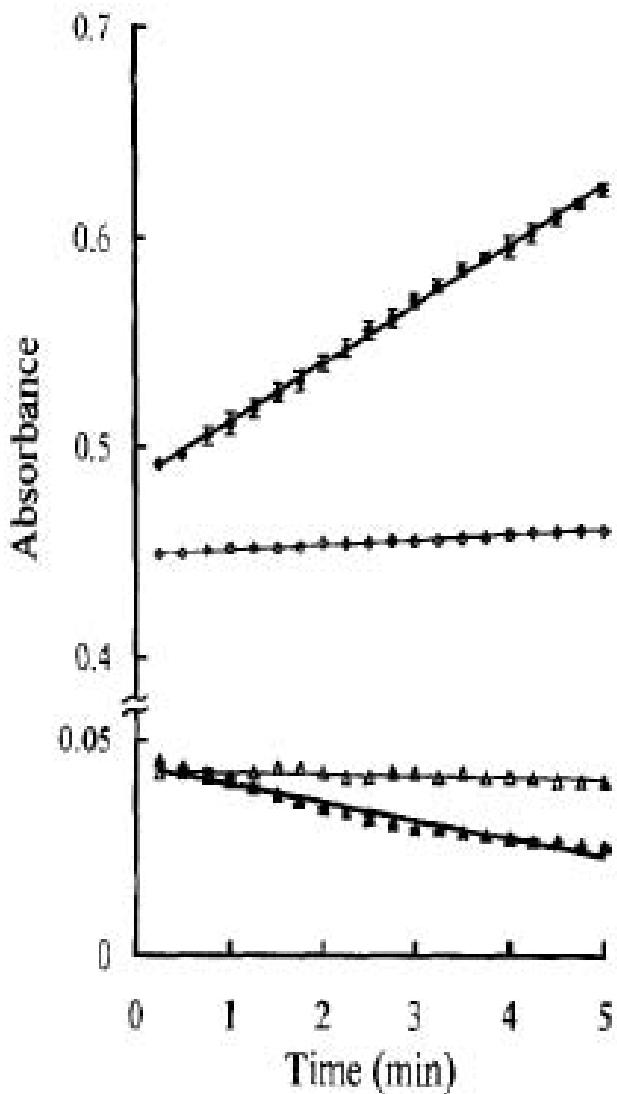


图1：马铃薯脂加氧酶(来自部份精炼样本，也就是硫酸胺纯化的部分)的双加氧作用(-◆-和-◇-)和共同加氧作用(-▲-) 和(-△-)。-◆-和 (-▲-) : 加入马铃薯酵素(误差条是得自3次测量结果在95%信心水平裡)；-◇-和-△- : 没有加入酵素。(双加氧作用的测量条件是 : 0.1 mM 亚油酸溶解于pH 5.6 的 1 M 磷酸盐缓冲液含 5 μ l 部份精炼马铃薯脂加氧酶。测量在 234 nm 的吸光率。共同加氧作用的测量条件是 : 0.1 mM 亚油酸和 3 μ M 的胡蘿卜素溶解于pH 5.6 的 1 M 磷酸盐缓冲液含 5 μ l 部份精炼马铃薯脂加氧酶。测量在 456 nm 的吸光率。)

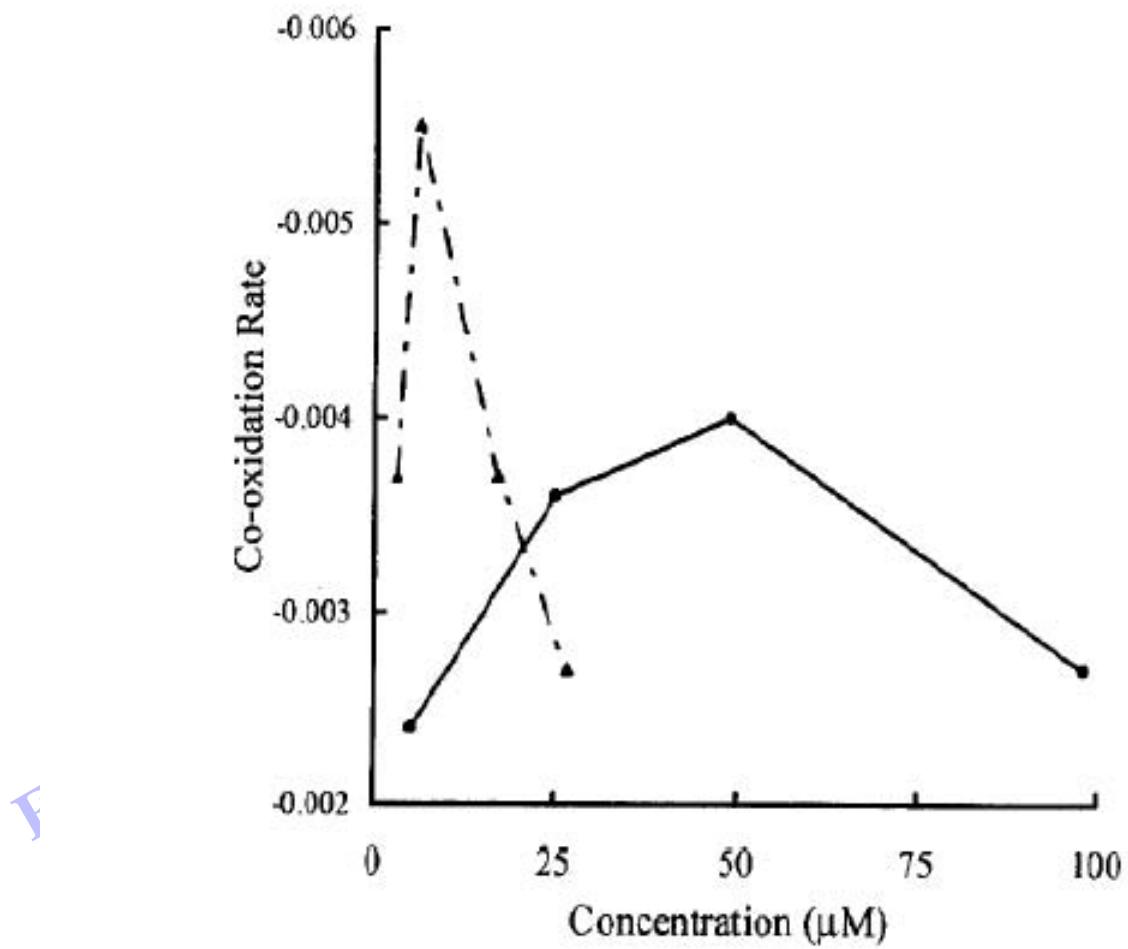


图2：亚油酸浓度(当 胡蘿卜素的浓度固定在 $3 \mu\text{M}$)与共同氧化作用的速度的关系 (•)。和 胡蘿卜素浓度(▲) (当亚油酸的浓度固定在 $98 \mu\text{M}$)与共同氧化作用的速度的关系。

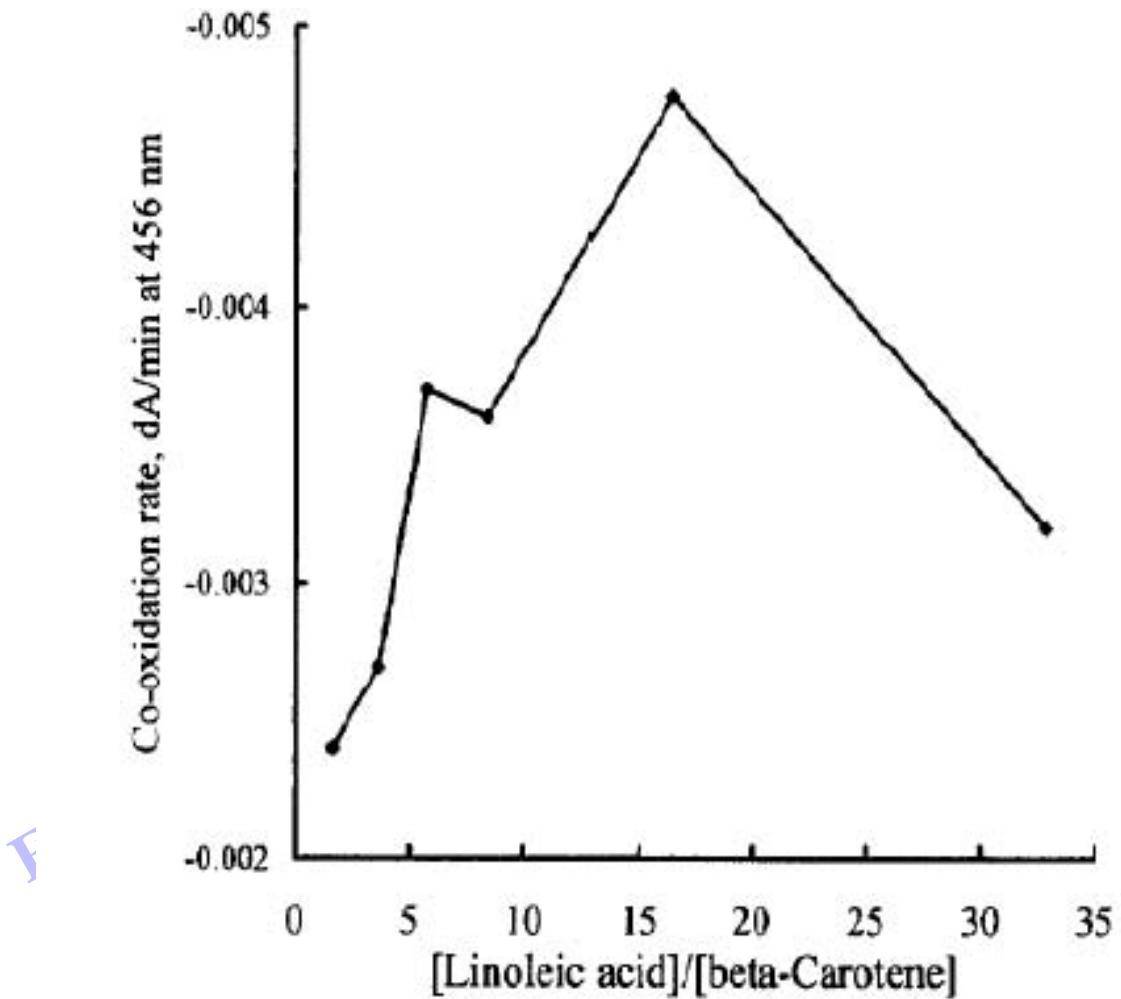


图3：[亚油酸]/[β 胡蘿卜素]的浓度比率(墨耳比率)与共同氧化作用的速度的关系。