

芝麻脂肪氧化酶活性测定

曹世娜,孙 强\*,黄纪念,高锦鸿  
(河南省农业科学院 农副产品加工研究所,河南 郑州 450002)

**摘要:** 为了明确芝麻脂肪氧化酶活性测定的适宜条件,采用紫外分光光度法测定芝麻脂肪氧化酶的活性并对测定的适宜条件进行探讨。结果表明,芝麻脂肪氧化酶活性测定的最佳反应条件为:取 2.95 mL 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 值 6.2)、20 μL 10 mmol/L 的底物亚油酸钠、50 μL 酶液迅速混匀后,立即在紫外光 234 nm 处观察 OD 值的变化,最适检测反应时间为 0~1.5 min。将吸光度代入公式计算酶活性。此外,芝麻脂肪氧化酶活性随酶液保存时间的延长而下降,应将酶液保存在 4 ℃ 条件下并于 1 h 内进行测定。酶液添加量为 10~50 μL 时,酶活力( $y$ )与酶液添加量( $x$ )成正比, $y = 0.0846x + 5.858$ ,且线性关系良好( $R^2 = 0.9998$ )。精密度试验结果显示  $RSD$  为 0.027%,建立的方法方便快捷,稳定性好,可广泛使用。

**关键词:** 芝麻;脂肪氧化酶;活性测定;紫外分光光度法

**中图分类号:** S565.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2017)11-0048-04

A Spectrophotometric Method for Determining the Activity of Lipoygenase in Sesame

CAO Shina,SUN Qiang\*,HUANG Jinian,GAO Jinhong  
(Institute of Agricultural Products Processing,Henan Academy of Agricultural Sciences,Zhengzhou 450002,China)

**Abstract:** In order to ascertain the suitable conditions for the determination of lipoygenase activity in sesame,the activity of lipoygenase in sesame was determined by ultraviolet spectrophotometry and the measured conditions were discussed. The results showed that the optimal reaction conditions were as follows: 2.95 mL of phosphate buffer (0.05 mol/L,pH 6.2),20 μL of sodium linoleate (10 mmol/L) as the substrate,and 50 μL of enzyme solution. Blend them quickly and immediately observe the change of OD value at 234 nm UV light. The optimal reaction time was 0—1.5 min. The enzyme activity was calculated using the equation according to the absorbance value. In addition,the activity of lipoygenase in sesame decreased with the elongation of the storage time of the enzyme solution,which should be kept at 4 ℃ and measured within 1 h. When the added volume of the enzyme solution was between 10—50 μL,the enzymatic activity( $y$ ) was in direct proportion to the enzyme volume( $x$ ), $y = 0.0846x + 5.858$ ,and the linear relationship was good ( $R^2 = 0.9998$ ). The results of the precision test showed that the  $RSD$  was 0.027%,and the established method was convenient,stable and suitable for wide application.

**Key words:** sesame; lipoygenase; activity determination; UV spectrophotometry

脂肪氧化酶(LOX)在动植物界广泛存在<sup>[1]</sup>,现 害生物和伤害的反应有关<sup>[2-4]</sup>。目前,LOX 活性的  
有研究表明,LOX 与动植物生长发育、衰老、抵抗有 检测方法主要有紫外分光光度法<sup>[5-6]</sup>、显色法<sup>[7]</sup>、单

收稿日期:2017-07-17  
基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201303072)  
作者简介:曹世娜(1983-),女,河南南乐人,中级工程师,硕士,主要从事油料加工研究。E-mail:407452454@qq.com  
\* 通讯作者:孙 强(1973-),男,河南信阳人,副研究员,硕士,主要从事油料加工与副产物综合利用研究。  
E-mail:qiangsunxy@126.com

克隆抗体检测法<sup>[8]</sup>、氧电极法<sup>[9]</sup>和量压法<sup>[10]</sup>,其中最为简易和常用的方法是紫外分光光度法。其原理为:LOX 能使催化底物亚油酸氧化形成具有共轭双键的过氧化氢衍生物,反应体系在 234 nm 波长处有吸收峰,通过吸光度可以推算出 LOX 活性<sup>[11]</sup>。研究表明,利用紫外分光光度法测定 LOX 活性的一个重要前提是底物溶液的透明度<sup>[12]</sup>,反应温度、反应底物浓度和反应缓冲体系的 pH 值等多种因素均会影响测定结果<sup>[13]</sup>。

芝麻是我国主要的油料作物之一,具有较高的应用价值,其种子含油量高达 55%。芝麻储存不当容易走油、生虫。LOX 是油料脂肪代谢途径中的关键酶<sup>[14-15]</sup>,能催化油料中不饱和脂肪酸氧化,产生醛、酮等有害物质,对油料的储藏<sup>[16-18]</sup>、加工<sup>[19]</sup>和种子发芽率<sup>[17]</sup>都有重要影响。为了延长芝麻的保质期,通常用热处理的方式来钝化芝麻中的 LOX,但过高的加热温度与过长的加热时间会导致芝麻中其他营养成分的损失,降低营养价值。因此,探索适当的加热温度和加热时间是高效钝化芝麻 LOX 的关键,在此过程中,及时准确地测定芝麻 LOX 的活性尤为重要。相对于大豆和花生,芝麻 LOX 活性的测定研究鲜有报道。鉴于此,采用紫外分光光度法对芝麻 LOX 活性的测定条件进行了探讨,并重点对 pH 值、磷酸缓冲液的浓度、酶液用量、酶的反应速度及酶液的保存时间进行了详细地分析,旨在为准确地测定芝麻 LOX 活性提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

主要仪器有 TGL 20M-II 台式高速冷冻离心机、JP0540 超声波萃取器、UV-6300 型紫外可见分光光度计、MTN-2800D 氮吹浓缩装置、XK96-B 快速混匀器;主要试剂有氢氧化钠(分析纯)、盐酸(分析纯)、亚油酸、磷酸二氢钠(分析纯)、磷酸氢二钠(分析纯)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 酶液的制备 将 1 g 完整的芝麻粉碎,加入 20 mL Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 值 7.0),超声提取 15 min,于 4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液放入 4 ℃ 冰箱备用。

1.2.2 底物(亚油酸钠,10 mmol/L)的制备 准确称取 140 mg 亚油酸和 140 mg 吐温 20,加入 8 mL 脱氧蒸馏水,在试管中反复振荡使其均匀,避免产生气泡。加入 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液 1.1 mL 后溶液变澄清,移入 50 mL 容量瓶中用脱氧水定容,分装在 2 mL 左右的带螺旋盖的小瓶中,拧盖前冲入氮气,

在 18 ℃ 下保存备用。

1.2.3 芝麻 LOX 活性的测定 采用 UV-6300 紫外可见分光光度计测定芝麻 LOX 活性,设定检测波长 234 nm,检测时间为 75 s,间隔 15 s 记录一次数据,重复 5 次取平均值,吸光度代入公式计算 LOX 活性。参比液:磷酸缓冲液 2.95 mL、10 mmol/L 亚油酸钠溶液 20  $\mu$ L、钝化处理的酶液 50  $\mu$ L,迅速混合均匀后放入分光光度计中归零;反应液:磷酸缓冲液 2.95 mL、10 mmol/L 亚油酸钠溶液 20  $\mu$ L、酶液 50  $\mu$ L,迅速混合均匀后放入分光光度计中读数并记录。

1.2.4 芝麻 LOX 活性计算 按照公式  $A = 4 \times (OD_{75s} - OD_{0s}) / 5 / 0.01$  计算芝麻 LOX 活性。式中, A 为 LOX 的活性单位数(U);  $OD_{75s}$  为反应 75 s 的吸光值;  $OD_{0s}$  为反应刚开始时的吸光值; 0.01 为常数,以每分钟增加 0.01 吸光值所需要的活性作为芝麻 LOX 的一个活性单位。

## 2 结果与分析

### 2.1 pH 值对芝麻 LOX 活性的影响

测定芝麻 LOX 活性时,反应体系的 pH 值直接影响测定的灵敏性和准确性<sup>[20]</sup>。分别配制 pH 值为 5.0、5.4、5.8、6.2、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,浓度为 0.1、0.2 mol/L 的磷酸缓冲液,然后分别取 2.95 mL 磷酸缓冲液、20  $\mu$ L 10 mmol/L 的底物(亚油酸钠)溶液和 50  $\mu$ L 芝麻酶液,混合均匀后测定吸光值,根据吸光值计算芝麻的 LOX 活性。

由图 1 可见,磷酸缓冲液的浓度分别为 0.1、0.2 mol/L 时,反应体系中 LOX 活性的变化基本相同:在 pH 值为 5.0~5.8 时,LOX 活性先稍微下降,而后又快速上升,在 pH 值为 6.2 时达到最大值,之后快速下降。当 pH 值为 5 时,0.1、0.2 mol/L 的磷酸缓冲液中 LOX 活性分别为 4.32、4.48 U;当 pH 值为 6.2 时,0.1、0.2 mol/L 的磷酸缓冲液中 LOX 活性分别为 9.44、8.80 U。因此,选用 pH 值为 6.2 的磷酸缓冲液作为酶反应体系。

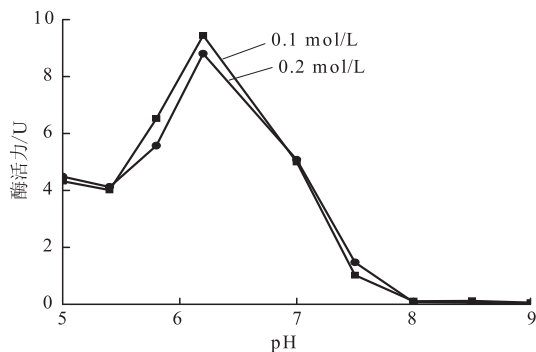


图 1 pH 值与芝麻 LOX 活性的关系

2.2 磷酸缓冲液浓度对芝麻 LOX 活性的影响

分别以 pH 值为 5.0、6.2, 浓度为 0.05、0.10、0.20 mol/L 的磷酸缓冲液作为反应体系测定芝麻 LOX 活性。由表 1 可见,pH 值为 5.0 条件下,磷酸缓冲液浓度为 0.20 mol/L 时 LOX 活性最大;pH 值为 6.2 条件下,磷酸缓冲液浓度为 0.05 mol/L 时测得的 LOX 活性最大,比 pH 值为 5.0 时高 5.88 U。因此,选用 0.05 mol/L 磷酸缓冲液作为酶反应体系。

表 1 不同浓度与不同 pH 值磷酸缓冲液中芝麻 LOX 活性 U

| 磷酸缓冲液浓度/(mol/L) | pH = 5.0 | pH = 6.2 |
|-----------------|----------|----------|
| 0.05            | 3.84     | 9.72     |
| 0.10            | 4.44     | 9.28     |
| 0.20            | 4.76     | 8.36     |

2.3 酶液用量对芝麻 LOX 活性的影响

用 2.95 mL 磷酸缓冲液(0.05 mol/L,pH 值6.2)与 20 μL 底物混合均匀,然后分别取 10 ~ 90 μL 酶液,测定 LOX 活性,结果如图 2 所示。由图 2 可知,当酶液添加量为 10 ~ 50 μL 时,LOX 活性随酶液添加量的增加而不断增大,呈明显的线性关系[酶活力(y)与酶液添加量(x)成正比: $y = 0.084\ 6x + 5.858$ ,且线性关系良好( $R^2 = 0.999\ 8$ ),图 3]。因此,在本试验方法中,测定芝麻 LOX 活性时,酶液用量选定为 50 μL 比较合适。

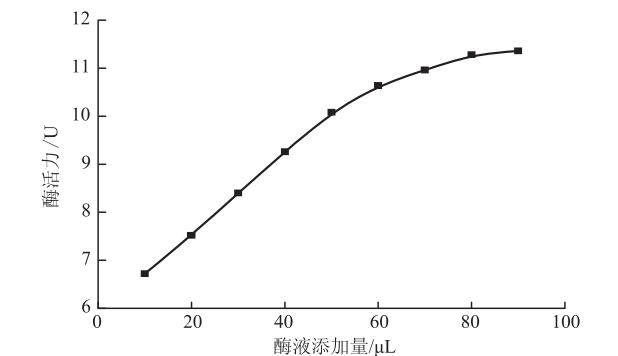


图 2 酶液添加量与 LOX 活性的关系

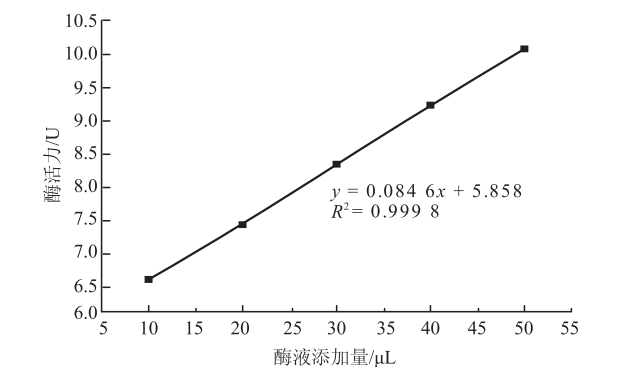


图 3 酶液添加量与 LOX 活性的线性关系

2.4 反应时间对芝麻 LOX 活性的影响

选用浓度为 0.05 mol/L、pH 值为 6.2 的磷酸缓冲液,以 50 μL 酶液添加量为试验条件,监测吸光度值的变化,结果如图 4 所示。在 0 ~ 1.5 min,酶反应速度非常快;1.5 min 以后,酶反应速度随反应时间的增加而缓慢增长。根据图 4 可知,测定时宜取 0 ~ 1.5 min 的平均反应速度来反映芝麻的 LOX 活性。

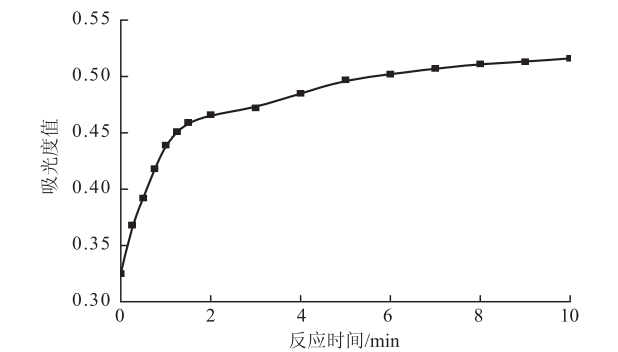


图 4 不同反应时间的酶反应速度

2.5 酶液保存时间对芝麻 LOX 活性的影响

酶液提取后置于 4 ℃ 条件下,分别保存 1、2、3、4、5、6 h 后测定 LOX 活性,结果如图 5 所示。由图 5 可知,LOX 活性随酶液保存时间的延长明显降低,保存 3 h 后,LOX 活性已经降低 1/2,说明酶液提取后 LOX 活性较难保持,因此,测定 LOX 活性应在酶液提取后(4 ℃ 条件下保存)1 h 内进行。

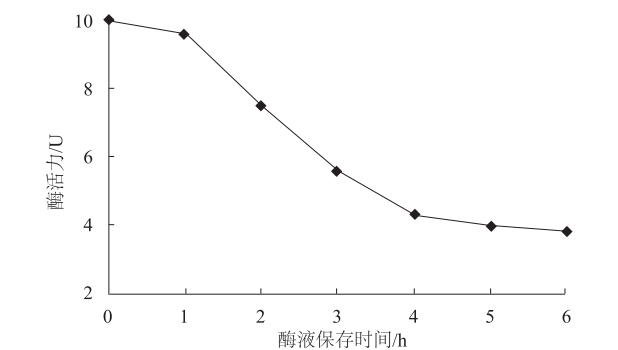


图 5 酶液保存时间与 LOX 活性的关系

2.6 精密度试验结果

取 2.95 mL pH 值为 6.2、浓度为 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液与 20 μL 亚油酸钠溶液混合后,快速加入 50 μL 酶液并混合均匀,在 234 nm 处观察 OD 值,测定 LOX 活性。对样品做了 3 次平行,平行 1 的 LOX 活性分别是 9.72 U 和 9.68 U,均值为 9.72 U;平行 2 的 LOX 活性分别是 9.44 U 和 9.20 U,均值为 9.32 U;平行 3 的 LOX 活性分别是 9.52 U 和 10.08 U,均值为 9.80 U。3 次平行的平均值为 9.61 U,重复性标准偏差较小(0.26),方法可靠性较高,RSD 为

0.027%。

### 3 结论与讨论

芝麻中粗脂肪含量在 50% 以上, LOX 活性的大小与芝麻耐储藏性、产品风味及其产品保质期有直接联系。这是因为, LOX 是一类含非血红素铁的蛋白酶家族, 主要通过催化多元不饱和脂肪酸发生双加氧反应生成脂肪酸氢过氧化物, 再经一系列不同酶的作用, 最终生成具有一定生理功能的小分子醛、醇和酮等代谢产物, 从而对芝麻耐储藏性、产品风味及其产品保质期产生直接影响。因此急需建立一种高效、准确的芝麻 LOX 活性测定方法, 以有效监测芝麻及其制品在储藏过程中品质的变化。本研究采用分光光度法, 探讨了芝麻 LOX 活性测定的适宜条件, 结果显示, 芝麻 LOX 活性测定的优化条件为: 磷酸缓冲液浓度为 0.05 mol/L, pH 值 6.2; 酶液用量 50  $\mu$ L; 最适检测反应时间为 0 ~ 1.5 min。此外, 芝麻 LOX 活性随酶液保存时间的延长而下降, 应将酶液保存在 4  $^{\circ}$ C 条件下, 并于 1 h 内测定。在优化条件下, 酶液添加量为 10 ~ 50  $\mu$ L 时, 酶活力( $y$ )与酶液添加量( $x$ )成正比:  $y = 0.0846x + 5.858$ , 且线性关系良好 ( $R^2 = 0.9998$ )。精密度试验结果显示 RSD 为 0.027%, 该方法方便快捷, 稳定性好, 可广泛使用。

#### 参考文献:

- [1] Salzmann V. Pentane formation during the anaerobic reactions of reticulocyte lipoxygenase: Comparison with lipoxygenases from soybeans and green pea seeds[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1984, 795(3): 535-542.
- [2] Hildebrand D F. Lipoxygenases [J]. *Physiologia Plantarum*, 1989, 76(2): 249-253.
- [3] 王海滨. 植物的脂肪氧化酶[J]. *植物生理学通讯*, 1990(2): 63-67.
- [4] Suzuki Y, Yasui T, Matsukura U. Oxidative stability of bran lipids from rice variety [*Oryza sativa* (L.)] lacking lipoxygenase-3 in seeds[J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44(11): 3479-3483.
- [5] Siddiqi A M, Al-Obaidy H M. Properties of broad bean lipoxygenase[J]. *Journal of Food Science*, 1981, 46(2): 622-625.

- [6] 侯美玲, 苗华荣, 陈静, 等. 花生种子脂肪氧化酶的活性测定研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(32): 14033-14035.
- [7] Hammond E G, Duvick D N, Fehr W R, *et al.* Rapid screening techniques for lipoxygenases in soybean seeds[J]. *Crop Sci*, 1992, 32(3): 820-821.
- [8] Suzuki Y, Higo K, Hagiwara K, *et al.* Production and use of monoclonal-antibodies against rice embryo lipoxygenase-3[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1992, 56(4): 678-679.
- [9] Galliard T, Phillips D R. Lipoxygenase from potato tubers[J]. *Biochemical Journal*, 1971, 124(2): 431-438.
- [10] 钟芳, 王璋, 许时婴. 3 种脂肪氧合酶酶活测定方法[J]. *无锡轻工大学学报*, 2001, 20(1): 77-78, 91.
- [11] Schewe T, Weisner R, Rapoport S. Methods in enzymology[M]. New York: Academic Press, 1981, 71: 430-441.
- [12] Rao H P, Kumar G V. Studies on stabilization of wheat-germ[J]. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 1980, 13(6): 302-307.
- [13] Gökmen V, Bahçeci 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.
- [14] 左进华, 董海洲. 大豆脂肪氧化酶研究现状[J]. *粮食与油脂*, 2007(9): 1-3.
- [15] 高山, 张瑛, 宋美, 等. 水稻脂肪氧化酶研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2005, 33(1): 126-127, 141.
- [16] 蒋家月, 宋美, 吴跃进, 等. 水稻种胚脂肪氧化酶 Lox-1, Lox-2 缺失对种子储藏特性的影响[J]. *激光生物学报*, 2008, 17(3): 395-399.
- [17] 张瑛, 吴跃进, 卢义宣, 等. 脂肪氧化酶同功酶缺失对水稻耐储藏特性的影响[J]. *安徽农业科学*, 2003, 31(6): 911-913.
- [18] 高奇, 吴洪义, 张瑛, 等. 花生种子 LOX3 活力测定及其对储藏特性的影响[J]. *中国油料作物学报*, 2012(4): 384-389.
- [19] 麻浩, 官春云. 大豆种子脂肪氧化酶与豆制品产生豆腥味关系的研究进展[J]. *中国油料作物学报*, 1999, 21(2): 73-76.
- [20] Droillard M J, Rouet-Mayer M A, Bureau J M, *et al.* Membrane-associated and soluble lipoxygenase isoforms in tomato pericarp[J]. *Physiologia Plantarum*, 1993, 103(4): 1211-1219.