

馬鈴薯脂加氧酶催化β胡蘿蔔素的共同氧化作用

摘要

在亞油酸存在時，β胡蘿蔔素可由馬鈴薯脂加氧酶催化共同氧化作用。共同氧化的速度與亞麻酸和β胡蘿蔔素的濃度有關。最大共同氧化作用的速度是當亞麻酸和β胡蘿蔔素莫耳濃度比率為 16 : 1。

1. 序言

脂加氧酶(亞油酸鹽：氧還原酶 EC 1.13.11.12)是目前最被廣泛研究的酵素 (Robinson, Wu, Domonry, & Casey, 1995)。而且它存在於 60 多種的動植物身上。脂加氧酶主要是催化多不飽和脂肪酸(PUFA)包含順式，順式，1,4 戊二烯單元的雙加氧作用，以形成共軛過氧化二烯酸。黃豆脂加氧酶是脂加氧酶中最被廣泛研究的，Boyington, Gaffiney and Amzel, (1993)已將它的分子結構發表出來。馬鈴薯脂加氧酶(至今仍未有完整的研究)是一個很不平常的酵素。它是植物酵素但是卻和哺乳動物的脂加氧酶很相似，可以催化有 20 個碳原子的 PUFA(花生四烯酸)的氧化作用，製造出 15-過氧二十碳四烯酸。這個過氧化物在動物身上是很多有生物活性化合物的先質。在藥理上是很重要的。所以，我們對馬鈴薯脂加氧酶非常感興趣，因為它非常容易取得，可以做為哺乳類動物酵素的替代模式。Royo, Vancanney, Perez, Sanz, Stormann, Roshahl and Sanchez-Serrano(1996)將馬鈴薯脂加氧酶的三種同工酶分離出來，並將其命名為: LOX-1, -2 和 -3。馬鈴薯 LOX-1 較偏好亞油酸為底物，而 9-過氧化物是其主要產物。另一方面，亞麻酸被認為是馬鈴薯 LOX-2 和 -3 的偏好底物，而 13-過氧化物是其主要產物。

有一些脂加氧酶在 PUFA 的存在下，也可以催化類胡蘿蔔素的共同氧化。黃豆第一類脂加氧酶(LOX-1)被用作麵粉漂白劑，也曾顯示可以改善麵包品質，有助於麵糰發酵過程(Frazier, Leigh-Dugmore, Daniels, Russell Eggitt, & Coppock, 1973; Cumbee, Hilderbrand, & Addo, 1997)。另一方面，因為類胡蘿蔔素是天然的染料和抗氧化物，當新鮮蔬菜如黃色的四季豆、水果或加工食品的顏色變白時，也代表其品質的惡化。也有相關的報導指出，黃豆、豌豆和小麥第二類的脂加氧酶(LOX-2 和 -3)如果有亞油酸存在的話也有漂白效果(Weber, Laskawy, & Grosh, 1974)。但是大部分類胡蘿蔔素共同氧化作用的研究都集中在黃豆 LOX-1。曾有聲稱在無氧狀態和 PUFA 或相當的醯基過氧化物存在下，這個酵素呈現強烈的共同氧化活性(Klein, Grossman, King, Cohen, & Pinsky, 1984)。然而，在有氧狀態下，它反而不能有效的催化漂白作用。因為黃豆不能在歐洲大陸廣泛種植，所以必須選擇其他替代的植物。我們最近的研究調查偏向於豌豆脂加氧酶的特性和使用，以及個別同工酶的選殖(Wu, Robinson, Casey, Hughes, West, & Hardy, 1995; Robinson et al., 1995; Casey, 1998; Hughes, Robinson, Hardy, West, Fairhurst, & Casey, 1998)。現在我們提出馬鈴薯脂加氧酶可能運用的漂白特性來作為另一種

而且是較便宜的脂加氧酶的來源。因為明白了類胡蘿蔔素是可在食物中取得的抗氧化物和具有對抗自由基的保護效果(Donnelly & Robinson, 1995)，所以才對這個研究感興趣。我們使用了全反式 β 胡蘿蔔素、維他命 A(視黃醇)、維他命 A 的醛式(視黃醛)和酸式(視黃酸)作為測試的底物。

2. 材料與方法

亞油酸、全反式 β 胡蘿蔔素、視黃醇、視黃醛和視黃酸和勞式法材料盒(包括牛血清清蛋白, BSA), 勞式試劑和佛林和喬卡梯奧酚試劑皆購自於 Sigma。硫酸胺、乙二胺四乙酸(EDTA)和其他的化學藥品皆來自 Fisher Scientific。紅馬鈴薯塊莖則是從當地超市取得。

粗粹取物是用 Waring 攪拌器均質配製的。將紅馬鈴薯(250 g)削皮加上 2 倍體積的 100 mM 磷酸緩衝液(pH 6.3, 含 2 mM 焦亞硫酸鈉·2 mM 維他命 C 和 1 mM EDTA)。先透過兩層的棉布將勻漿過濾, 再利用 10000x g 的速度離心來淨化勻漿。在 4°C, 利用(15-45 %飽和)硫酸胺沉澱法來純化脂加氧酶。沉澱物用 pH 6.3, 40 mM 的磷酸鹽緩衝液重新懸浮。這就是後來提到的部份精練的酵素。然後利用勞式法來測量其蛋白濃度。

2.1 亞麻酸的氧化作用

加氧磷酸鈉緩衝液是將氧氣加入液體中 1 分鐘所製作的, 然後再加入特威恩 20 (Tween 20, 200 μ l)。接著是超音波處理。再用磷酸鹽緩衝液稀釋成 0.5 ml 到 50 ml。使用前, 用 18.6 μ l 的亞油酸和 1.733 ml 的 1 M 加氧磷酸鹽緩衝液混合, 連續攪拌後, 再用相同的磷酸鹽緩衝液稀釋 100 倍成為 0.3 mM 的亞油酸。保存在冰上的酵素出取物(5 μ l)加入 1 M 加氧磷酸鹽緩衝液(2 ml)和 0.3 mM 的亞油酸(1 ml)。每隔 15 秒鐘測量一次, 紀錄 5 分鐘。酵素的活性是測量在 234 nm 所增加的吸光率。活性單位的定義是增加的吸光率/0.001min。

2.2 類胡蘿蔔素的共同氧化作用

不管是 β 胡蘿蔔素、視黃醇、視黃醛或視黃酸(1 mg)皆存於用氮氣密封的燒瓶裡。用含 Tween 80(40 μ l)的氯仿(1 ml)來溶解, 然後將溶劑蒸發乾, 再溶解於 1 mM EDTA (10 ml)。測試的溶液含 pH 6 的加氧磷酸鹽緩衝液(2 ml)、0.3 mM 的亞油酸(1 ml)和 1 mM 含類胡蘿蔔素的 EDTA(50 μ l)。測試在 456, 328, 373 和 353 nm 處減少的吸光率, 依序來測試 β 胡蘿蔔素、視黃醇、視黃醛和視黃酸減少的量。酵素活性最適合亞油酸和類胡蘿蔔素的氧化作用是利用磷酸鹽緩衝液從 pH 5 到 6.5 來決定的。

3. 結果和討論

部份精練馬鈴薯脂加氧酶在pH 5.6 的比活性是 1.76×10^4 單位/mg的蛋白質。亞油酸和 β 胡蘿蔔素，在一定的底物濃度下，分別的氧化速度如圖 1 所顯示。部份精練的馬鈴薯脂加氧酶酵素活性最適合的亞油酸的氧化作用是在pH 5.6 到 5.7，和Gilliard and Phillips, (1971)的報告相似。但和Sekiya, Aoshima, Kajiwara, and Hatanaka, (1977)的報告不同，因為他們使用了純的馬鈴薯酵素。這個差異可以有許多不同的解釋。首先，可能是使用了不同品種的馬鈴薯造成的，還有在純化的過程中，不同的同工酶的分離(Sekiya et al., 1997)。也許是在乳化的底物裡含不同成分和大小的膠體樣微團的關係。在我們的馬鈴薯酵素活性實驗裡，最適合 β 胡蘿蔔素的共同氧化作用是在pH 6.0。與亞油酸氧化作用的最佳pH還要高些。然而，Hsieh and McDonald (1984)提出小麥脂加氧酶對PUFA氧化作用和類胡蘿蔔素的共同氧化作用的最佳pH還要更高(pH 10.2)。所以，這表示小麥脂加氧酶和黃豆第一類脂加氧酶相似，因為黃豆酵素是在pH 9.0 觀察到最大活性。

和亞油酸氧化作用的速度比起來， β 胡蘿蔔素的共同氧化作用較慢，就如圖 1 所顯示。但是在 456nm 的吸光率卻是隨時間降低，可能與某些被氧化產物的吸光率也是在這個波長的關係。這樣的產物可能和一些尚未發表的嘗試性需確認的產物相似(Wu et al., 1998)。這些產物它的共軛雙鍵數並沒有改變。所以，真正胡蘿蔔素的氧化作用速度應該比在 456nm 所測到的共同氧化速度還要快。反應物(β 胡蘿蔔素和亞油酸)和酵素的濃度會影響到共同氧化作用的速度。對於類胡蘿蔔素的漂白作用， β 胡蘿蔔素和亞油酸有其最適宜的底物濃度(圖 2)。對 β 胡蘿蔔素而言，它的濃度是 6.0 μ M(當亞油酸濃度是 0.1 mM 時)。對亞油酸而言，它的濃度是 0.05 mM(當 β 胡蘿蔔素是 3 μ M 時)。而且，亞油酸和 β 胡蘿蔔素的濃度比也會影響到共同氧化的速度。圖 3 顯示當[亞油酸]/[β 胡蘿蔔素]是等於 16，共同氧化速度比其他的濃度比的速度還要快。另一方面，當酵素的濃度是 5.9 到 40.8 單位/ml 時，和共同氧化的速度成線性關係。

β 胡蘿蔔素的共同氧化作用是同時氧化兩種底物(PUFA 和類胡蘿蔔素)，這個觀念是被廣泛接受的。在實驗條件下，最高速度出現在當[亞油酸]/[β 胡蘿蔔素]莫耳濃度比等於 16 時(圖 3)。這可能是在乳化膠體樣微團中最適合的亞油酸和 β 胡蘿蔔素的莫耳濃度比有關。或者只是需要較高濃度的亞油酸基來偶聯類胡蘿蔔素分子的氧化作用。Hughes et al. (1998) 提出在某些同工酶裡，過氧化基較容易釋放。因為化學歧化反應的關係，提高了羰基衍化物的形成。這也表示過氧化基的釋放可以漂白和降解可溶性 β 胡蘿蔔素。當底物是視黃醇、視黃醛和視黃酸時，沒有明顯的共同氧化作用產生。這表示這些較具極性的類胡蘿蔔素並不能接近這個酵素。

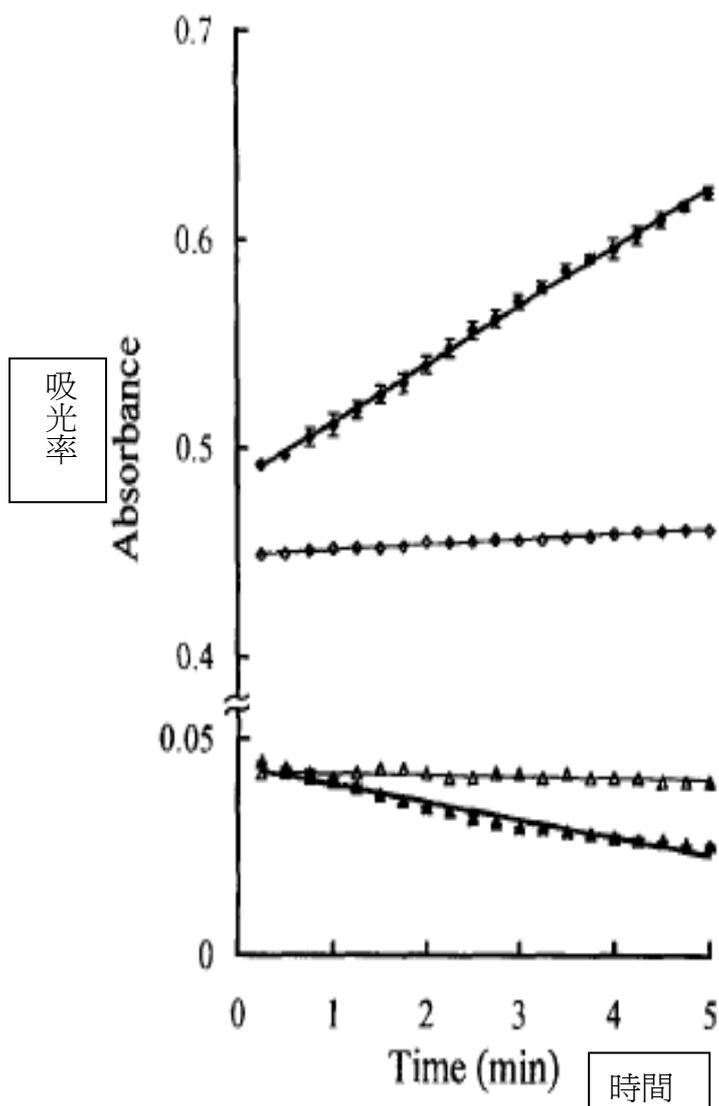


圖 1：馬鈴薯脂加氧酶(來自部份精練樣本，也就是硫酸胺純化的部分)的雙加氧作用(-◆-和-◇-)和共同加氧作用(-▲-)和(-△-)。-◆-和 (-▲-)：加入馬鈴薯酵素(誤差條是得自 3 次測量結果在 95%信心水準裡)；-◇-和-△-：沒有加入酵素。(雙加氧作用的測量條件是：0.1 mM 亞油酸溶解於 pH 5.6 的 1 M 磷酸鹽緩衝液含 5 μ l 部份精練馬鈴薯脂加氧酶。測量在 234 nm 的吸光率。共同加氧作用的測量條件是：0.1 mM 亞油酸和 3 μ M 的胡蘿蔔素溶解於 pH 5.6 的 1 M 磷酸鹽緩衝液含 5 μ l 部份精練馬鈴薯脂加氧酶。測量在 456 nm 的吸光率。

E

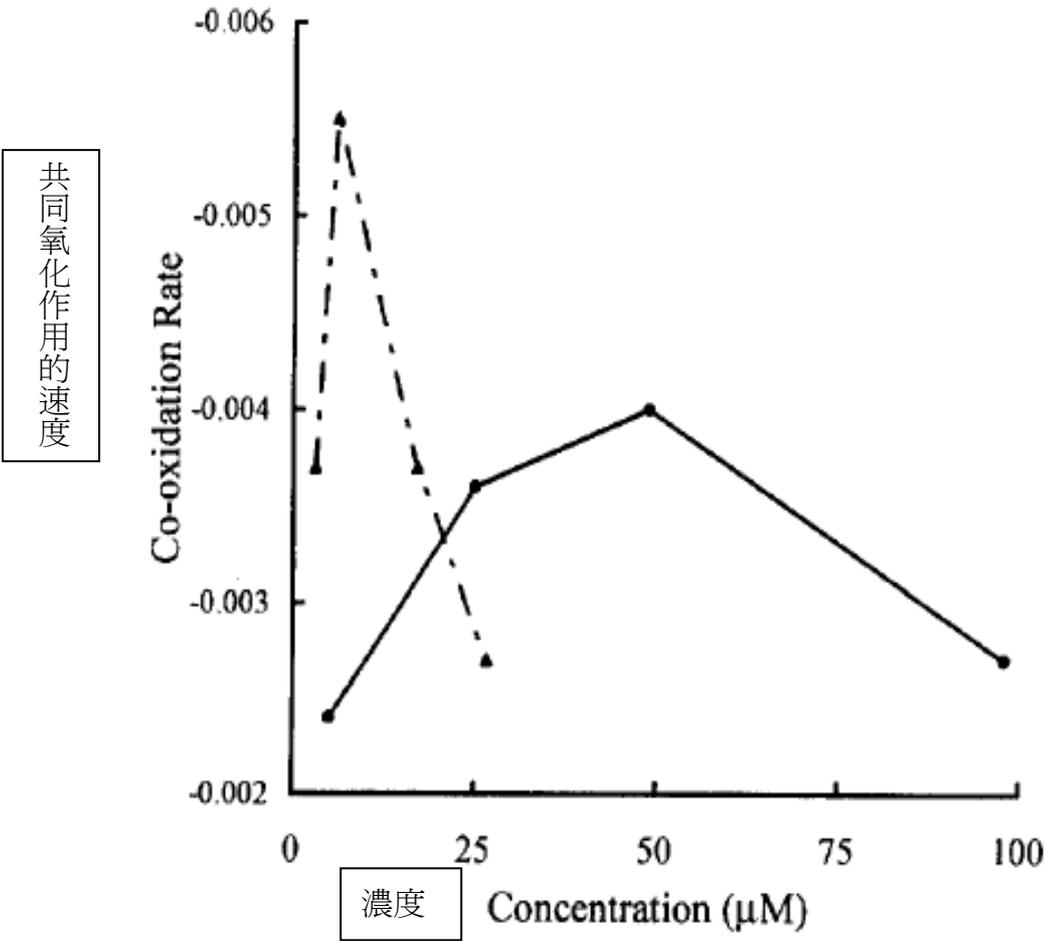


圖 2：亞油酸濃度(當β胡蘿蔔素的濃度固定在 3 μM)與共同氧化作用的速度
的關係(-●-)。和β胡蘿蔔素濃度(-▲-) (當亞油酸的濃度固定在 98 μM)與共同
氧化作用的速度速度的關係。

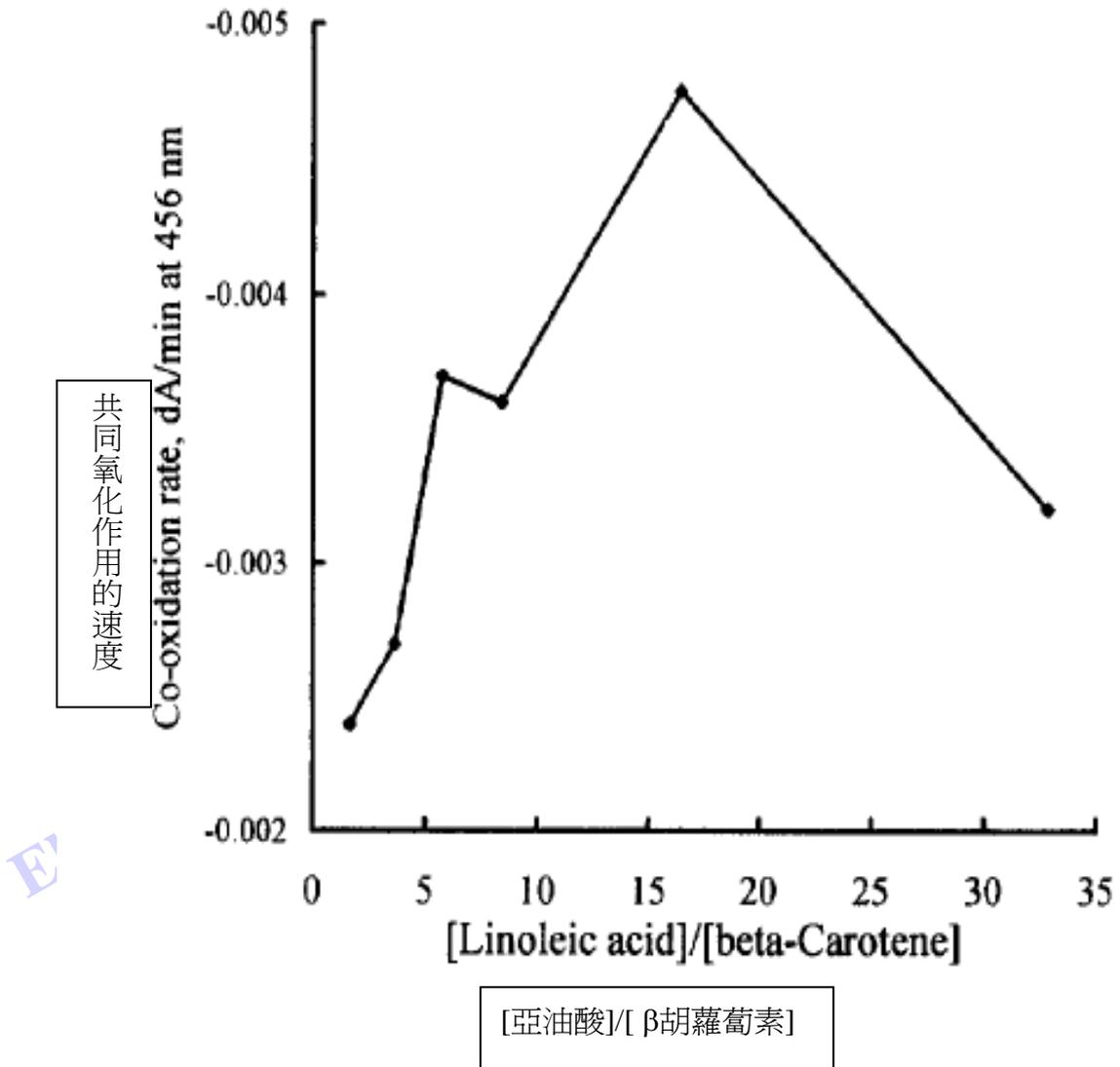


圖 3：[亞油酸]/[β胡蘿蔔素]的濃度比率(墨耳比率)與共同氧化作用的速度關係。