

热处理方式对大豆脂肪氧合酶活力和构象的影响

孔月, 孙立娜, 李妍慧, 康子孟, 何甜, 吕文彪, 徐福, 张爽, 谢凤英*
(东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030)

摘要 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、圆二色谱、表面疏水性、荧光光谱以及分子对接等方法, 研究不同热处理方式对大豆脂肪氧合酶(LOX)活力和构象的影响。结果表明:高温短时热处理可以显著降低 LOX 活力, 其中 120 °C 80 s+140 °C 15 s 和 100 °C 10 min 热处理后, LOX 活力分别降低了 67.47%和 60.53%。SDS-PAGE 电泳结果显示高温热处理后 LOX 蛋白条带的分子质量并未发生明显变化, 而条带强度减弱;热处理迫使 LOX 蛋白的 α -螺旋和 β -折叠相对含量降低, 表面疏水性和内源性荧光强度增强, 说明其二级结构和三级结构发生变化, LOX 活力降低;通过分子对接模拟预测 LOX 活性中心非血红素铁周围的微环境, 其在热处理过程中发生改变。推断高温热处理是通过破坏维持酶蛋白结构稳定的非共价相互作用力, 促使 LOX 活性丧失, 其中高温短时升温钝化 LOX 活性是较为合适的热处理方式。试验结果为大豆产品加工中 LOX 活性控制提供了数据参考。

关键词 脂肪氧合酶; 热处理; 酶活力; 构象

文章编号 1009-7848(2024)07-0111-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.011

大豆分离蛋白(Soy protein isolate, SPI)是低温脱脂豆粕经碱溶酸沉法提取的优质植物蛋白。大豆分离蛋白因具有较高的营养价值和多种功能特性, 如溶解性、凝胶性、乳化性、起泡性和成膜性等, 而作为功能性食品添加剂在食品工业中得到广泛应用^[1-2]。

大豆脂肪氧合酶(Lipoxygenase, LOX)是由含有非血红素铁的蛋白质构成的单体酶, 其可专一催化具有顺, 顺-1, 4-戊二烯结构的多不饱和脂肪酸, 如亚油酸、亚麻酸等, 生成具有共轭双键的氢过氧化物, 这些氢过氧化物不稳定, 可进一步降解生成具有不同气味阈值短碳链的醇类、醛类和酮类等挥发性化合物^[3-5]。LOX 多存在于靠近大豆表皮的子叶中, 在大豆食品加工过程中, 大豆破碎与空气中的氧气接触, LOX 活性被激发, 不饱和脂肪酸被氧化, 经酶促和非酶促反应降解生成的挥发性化合物, 也可与大豆蛋白经可逆或不可逆结合, 形成较为复杂的化合物, 同样它们也是大豆豆腥味的呈味物质^[6]。大豆制品存在豆腥味, 不仅影响

感官品质也限制其在食品工业上的发展, 因此, 脱除豆腥味一直是豆类加工过程中提高产品质量的关键性技术难题之一。

大豆脱腥通常采用加热钝化、加碱去涩及辅以真空脱臭的配套工艺, 其中热处理灭活大豆 LOX, 操作简单, 易实施, 为目前工业加工中广泛应用的 LOX 灭活方法。因热处理时间过长, 蛋白质分子过度变性, 而使大豆分离蛋白功能特性受到一定影响^[7]。由于不同温度和时间处理 LOX, 其遵循的失活动力学模型不同, 导致 LOX 酶活力差异较大。Cai 等^[8]研究发现大豆焙烤需将烘烤温度提高到 170 °C 以上, 才能促使 LOX 完全失活。Yoo 等^[9]发现高温预处理可有效降低大豆 LOX 活力, 酶解促使挥发性化合物中己醛、戊醇和己醇峰面积显著降低, 并证实高温预处理和酶解相结合, 可有效灭活残留 LOX 活力, 从 SPI 中去除豆腥味。Peng 等^[10]研究发现对大豆热烫处理时, LOX 易与蛋白质结合形成聚集体, LOX 蛋白变性, 酶活力降低。为此, LOX 在热处理过程中, 研究酶分子的特性和构象变化可为探明 LOX 热失活机理, 以及改进大豆分离蛋白生产中 LOX 热灭活方法提供理论依据。

本文以低温脱脂豆粕提取的 LOX 为对象, 研究热处理方法对 LOX 活力和构象的影响, 为大豆蛋白豆腥味去除和品质提升提供技术支持。

收稿日期: 2023-07-06

基金项目: “十四五”国家重点研发计划重点专项(2021YFD2100402); 黑龙江省自然联合引导基金项目(LH2022C044)

第一作者: 孔月, 女, 硕士生

通信作者: 谢凤英 E-mail: spxfy@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

低温脱脂豆粕, 山东省香驰粮油有限公司; SDS-PAGE 变性聚丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒、4×蛋白质上样缓冲液、彩虹 180 广谱蛋白 Marker, 北京索莱宝科技有限公司; 8-苯胺-1-萘磺酸 (8-(Phenylamino)naphthalene-1-sulfonic acid, ANS), 上海麦克林生化科技有限公司; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸铵、固体蔗糖、亚油酸、吐温-20、硼酸、硼砂等均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

UV-2600 紫外分光光度计, 岛津仪器(苏州)有限公司; BIO-RAD 电泳仪、凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad Laboratories 公司; Chirascan 圆二色光谱仪, 英国应用光物理公司; RF-6000 荧光分光光度计, 日本 Hitachi 公司; HH-DR1 油浴锅, 常州丹瑞实验仪器设备有限公司; THR16A 台式冷冻离心机, 长沙英泰仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 大豆 LOX 提取 大豆 LOX 提取均在低温 0~4 °C 条件下进行。参照 Sharma 等^[11]和 Mandal 等^[12]的方法并稍加修改, 将 20 g 研磨后的低温脱脂豆粕粉置于 100 mL 0.05 mol/L, pH 6.0 磷酸盐缓冲液中浸泡 1 h, 4 000 r/min 离心 30 min, 上清液加入研细无水硫酸铵(饱和度达到 30%), 溶解后静置 3 h, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液加入研细无水硫酸铵(饱和度达到 65%), 充分溶解后静置 3 h, 12 000 r/min 离心 20 min, 所得沉淀在磷酸盐缓冲溶液(0.05 mol/L, pH 7.0)中透析后浓缩, 即为粗酶液。

1.3.2 大豆 LOX 的热处理 参考 Zhang 等^[13]关于豆浆去除豆腥味的热处理方法并稍作修改, 量取适量的大豆 LOX 粗酶液于玻璃试管中, 分别在 65 °C 30 min; 100 °C 10 min; 140 °C 15 s; 120 °C 80 s+140 °C 15 s 条件下进行油浴加热处理, 之后取出试管浸入冷水中迅速冷却, 并测定酶活力、SDS-PAGE、圆二色谱、表面疏水性、荧光光谱, 研究大豆 LOX 在不同热处理条件下酶活力和构象的变化。

1.3.3 大豆 LOX 活力、质量浓度测定 按照 Gao 等^[14]的方法测定酶活力。140 μL 亚油酸和 140 μL

Tween 20 混合乳化于 8 mL 硼酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 9.0)中, 加入 1.1 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液, 并用硼酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 9.0)定容至 50 mL。使用前用硼酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 9.0)按体积比 1:40 稀释, 并将 50 μL 粗酶液加入到 3.5 mL 上述底物稀释液中, 快速混匀, 立刻计时, 测定其在波长 234 nm 处吸光度的增加量。吸光度每分钟增加 0.001 定义为 1 个酶活力单位。粗酶液质量浓度采用杜马斯燃烧法测定。

1.3.4 SDS-PAGE 测定 按照周雅琪等^[15]的方法对大豆 LOX 进行 SDS-PAGE 测定。将经过不同热处理的大豆 LOX 与 4×蛋白质加样缓冲液按体积比 3:1 混合。制备 8% 分离胶和 5% 浓缩胶, 样品和 Marker 的加样量分别为 10 μL 和 4 μL。采用恒压电源 80 V 先跑 0.5 h, 再 120 V 进行约 1.5 h。电泳结束后, 将凝胶浸泡在考马斯亮蓝 R-250 中染色, 用 25% 甲醇和 10% 乙酸溶液进行脱色。选择彩虹 180 广谱蛋白 Marker 估计蛋白质的表现分子量。

1.3.5 圆二色谱的测定 参考 Aanangi 等^[16]的方法并稍作修改, 以磷酸盐缓冲溶液(0.05 mol/L, pH 7.0)作为空白对照, 将经过不同热处理的大豆 LOX 粗酶液稀释至 0.1 mg/mL 后, 放于样品池中立即扫描, 扫描波长范围 190~260 nm, 扫描速度 5 nm/min, 带宽 1 nm, 室温下重复扫描 3 次, 得到大豆 LOX 的圆二色光谱图, 其数据用平均摩尔椭圆率 $[\theta]$ 表示圆二色性, 单位 mdeg。采用 SELCON3 算法计算 LOX 二级结构的含量。

1.3.6 表面疏水性的测定 参考 Chen 等^[17]的方法稍作修改, 吸取稀释至 0.01~0.10 mg/mL, 经过不同热处理的大豆 LOX 粗酶液 4 mL, 加入 20 μL 8 mmol/L ANS 溶液, 迅速混匀, 在激发波长 386 nm, 发射波长 470 nm, 狭缝宽度 5 nm 的条件下, 测定荧光强度。以荧光强度对蛋白浓度作图, 表面疏水性指数表示为荧光强度与蛋白浓度之间的初始斜率。

1.3.7 荧光光谱的测定 参照赵谋明等^[18]的方法测定大豆 LOX 的荧光光谱。将经过不同热处理的大豆 LOX 粗酶液置于池径为 1 cm 石英比色皿中, 采用荧光光谱仪进行扫描, 激发波长为 280 nm, 扫描发射波长范围 250~480 nm, 激发和发射

狭缝宽度均为 5 nm, 荧光扫描速率为 600 nm/min, 室温下重复扫描 3 次, 得到大豆 LOX 的荧光光谱图。

1.3.8 分子对接 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org>) 下载 lipoxygenase (PDB ID: 1YGE) 的蛋白晶体结构 (含配体), 作为研究对接所用蛋白质, 下载为 PDB 格式。采用 Autodock Tools 1.5.7 软件对蛋白晶体结构进行除水、加氢等处理, 保存 PDBQT 格式。PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载亚油酸 (PubChemCID: 5280450) 化合物结构, 采用 Autodock Tools 1.5.7 软件对配体小分子加氢, 计算电荷等。

运用 AutoDock Tools 1.5.7 软件预测亚油酸与 LOX 的结合, 对接参数采用默认设置, 使用 autogrid 计算格点能量, 采用拉马克遗传算法, 用半经验的自由能计算方法评价亚油酸与酶蛋白受体之间的结合情况, 并进一步分析其结合位点, 采用 PyMOL 软件生成对接结果的视图。

1.4 统计分析

每组试验做 3 次平行, 并计算标准偏差。使用 SPSS 21.0 软件进行显著性分析, 采用 Origin 2021 软件绘制图表。

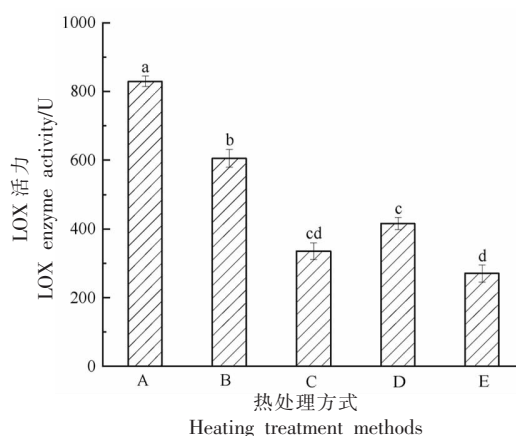
2 结果与分析

2.1 不同热处理对大豆 LOX 活力的影响

如图 1 所示, 大豆 LOX 粗酶液 (酶活力为 830 U, 蛋白含量为 5.76 mg/mL) 经过不同热处理后, 酶活力均有显著降低。其中, 100 °C 10 min, 140 °C 15 s, 120 °C 80 s+140 °C 15 s 热处理后 LOX 活力分别下降了 60.52%, 49.88%, 67.47%, 而 65 °C 30 min 热处理的酶活力下降略低, 仅为 26.99%。其原因可能是 LOX 作为单一的多肽蛋白质, 高温处理破坏了酶分子的非共价键结构, 酶蛋白空间结构改变, 致使酶的活性降低甚至丧失^[19]。60~90 °C 热处理过程中, LOX 失活遵循的是一级动力学规律^[20], 65 °C 30 min 热处理后 LOX 活力较高, 表明酶分子结构未被破坏, 酶的活性只是暂时降低或消失, 而未失活。因此, 考虑与 LOX 共存大豆蛋白的溶解性、凝胶性等功能特性, 选择高温短时、升温钝化 (120 °C 80 s+140 °C 15 s) 为降低 LOX 活力较为合适的热处理方法。

2.2 SDS-PAGE 分析

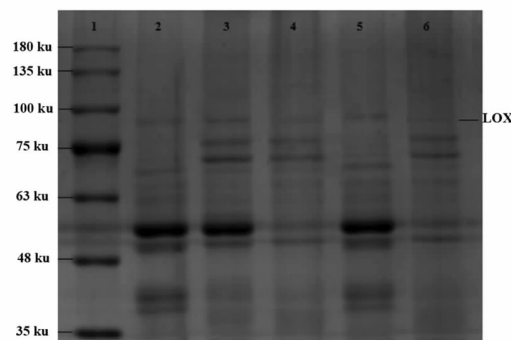
如图 2 所示, 电泳后凝胶经考马斯亮蓝染色后出现的 LOX 蛋白条带, 其分子质量约为 94 ku, 其与 Shi 等^[21]描述的大豆 LOX 分子质量约为 94~97 ku 的结论相符。图中经过不同热处理的大豆 LOX 的 SDS-PAGE 图谱蛋白条带数目与位置并未发生明显改变, 表明热处理未改变酶蛋白的一级结构, 而 100 °C 10 min 和 120 °C 80 s+140 °C 15 s 热处理后的 LOX 条带强度减弱, 这应该是由热处理过程中酶蛋白热聚集所致。其原因可能是热处理后酶蛋白分子聚集形成较大质量的 LOX 粒子, 不能进入凝胶的分离胶所致^[22]。



注: A: 未处理 LOX; B: 65 °C 30 min; C: 100 °C 10 min; D: 140 °C 15 s; E: 120 °C 80 s+140 °C 15 s。小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 图 4 同。

图 1 不同热处理方式对大豆 LOX 活力的影响

Fig.1 Effect of heating treatment methods on LOX enzyme activity



注: 1: Marker; 2: 未处理 LOX; 3: 65 °C 30 min; 4: 100 °C 10 min; 5: 140 °C 15 s; 6: 120 °C 80 s+140 °C 15 s。

图 2 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis

2.3 圆二色谱分析

圆二色谱 (Circular dichroism spectra, CD) 是一种灵敏地测定蛋白质和多肽二级结构的技术^[23]。如图 3 和表 1 所示, LOX 分子中主要生色基团肽链骨架中肽键的吸收峰分布在 CD 谱的紫外区段(190~240 nm), 其中 208 nm 处椭圆率可真实地反映蛋白质中最常见的 α -螺旋结构变化^[24]。LOX 在波长 208 nm 处出现明显的负峰, 表明 LOX 的 α -螺旋结构含量最为丰富, 此试验结果与 Pellicer 等^[25]的研究结果一致。随着热处理的进行 α -螺旋结构特征吸收峰强度和峰值波长均发生改变, 降低较为显著的是热处理条件为 100 °C 10 min 和 120 °C 80 s+140 °C 15 s, 其 α -螺旋结构相对含量由 27.20% 分别降至 20.00% 和 22.10%。由此可以推测上述热处理破坏了维持蛋白质结构稳定的非共价力(氢键、疏水相互作用等)引起酶分子部分伸展, 致使 α -螺旋和 β -折叠的相对含量降

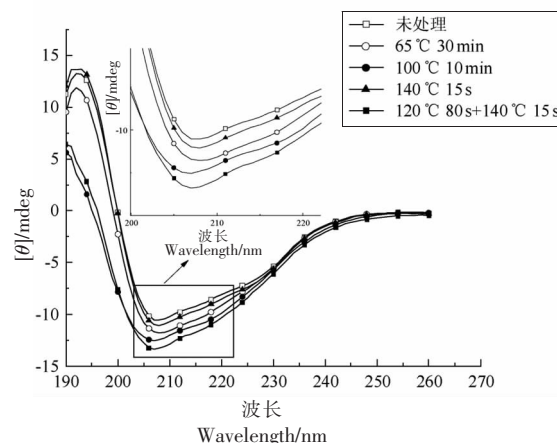


图 3 不同热处理方式对大豆 LOX 二级结构构象的影响

Fig.3 Effect of heating treatment methods on the secondary conformation of soybean LOX

低, β -转角和无规则卷曲相对含量增加, LOX 二级结构稳定性下降, 酶的活性部位损坏, 酶活力降低。

表 1 不同热处理方式对大豆 LOX 二级结构比例的影响

Table 1 Effects of heating treatment methods on the proportion of secondary structure of soybean LOX

| 热处理方式 | 比例/% | | | |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | α -螺旋 | β -折叠 | β -转角 | 无规则卷曲 |
| 未处理 | 27.20 ± 0.10 ^a | 19.60 ± 0.20 ^a | 20.70 ± 0.40 ^d | 30.70 ± 0.50 ^d |
| 65 °C 30 min | 27.00 ± 0.20 ^a | 16.70 ± 0.30 ^c | 22.60 ± 0.30 ^c | 34.00 ± 0.30 ^b |
| 100 °C 10 min | 20.00 ± 0.10 ^c | 16.70 ± 0.30 ^c | 27.60 ± 0.30 ^a | 40.60 ± 0.40 ^a |
| 140 °C 15 s | 27.00 ± 0.30 ^a | 17.70 ± 0.20 ^b | 20.70 ± 0.40 ^d | 32.80 ± 0.50 ^c |
| 120 °C 80 s+140 °C 15 s | 22.10 ± 0.30 ^b | 15.10 ± 0.50 ^d | 27.30 ± 0.20 ^b | 40.50 ± 0.40 ^a |

注: 小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 表面疏水性分析

蛋白质表面疏水性是表征蛋白质构象变化和描述极性环境中蛋白质表面疏水性氨基酸残基分布情况的重要指标^[26], LOX 作为一种酶蛋白, 其分子表面疏水性变化可能会引起酶蛋白结构的改变, 进而影响 LOX 活力。如图 4 所示, 不同热处理的 LOX 表面疏水性差异显著, 100 °C 10 min 和 120 °C 80 s+140 °C 15 s 热处理后 LOX 表面疏水性指数分别增至 27 405.29 和 27 845.58, 说明在上述热处理条件下, 酶蛋白三级结构发生了改变。热处理诱导了酶蛋白结构的展开, 包埋于分子内部的疏水性氨基酸残基暴露于蛋白质表面^[13], 酶蛋白周边区域微环境发生变化, 影响蛋白分子间

相互作用, 进而促使 LOX 构象稳定性和酶蛋白的功能性发生改变。

2.5 荧光光谱分析

荧光光谱是表征蛋白质分子构象变化的有效手段, 蛋白质内源性荧光通常是由色氨酸 (Tryptophan, Trp)、酪氨酸 (Tyrosine, Tyr) 和苯丙氨酸残基 (Phenylalanine, Phe) 在激发波长 280 nm 处激发产生的, 其中 Trp 残基荧光强度最强^[27]。如图 5 所示, 经过不同热处理的 LOX 均表现出比未处理 LOX 更高的荧光强度, 热处理条件为 120 °C 80 s+140 °C 15 s 和 100 °C 10 min 时, LOX 表现出最大的荧光强度, 说明上述热处理方式可以有效破坏酶蛋白构象, 导致蛋白质结构展开和荧光发色基团

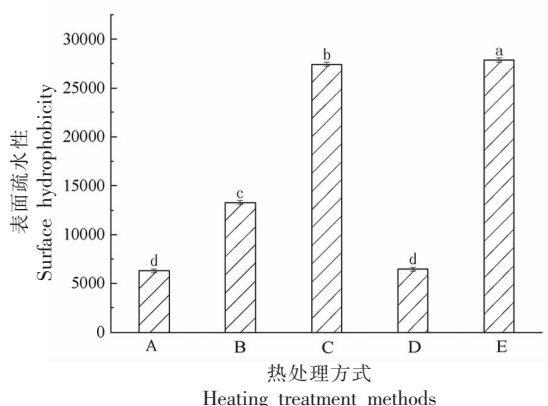


图 4 不同热处理方式对大豆 LOX 表面疏水性的影响

Fig.4 Effect of different heating treatment methods on the surface hydrophobicity of soybean LOX

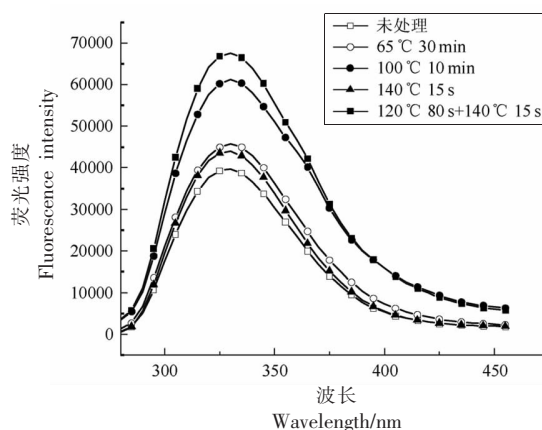


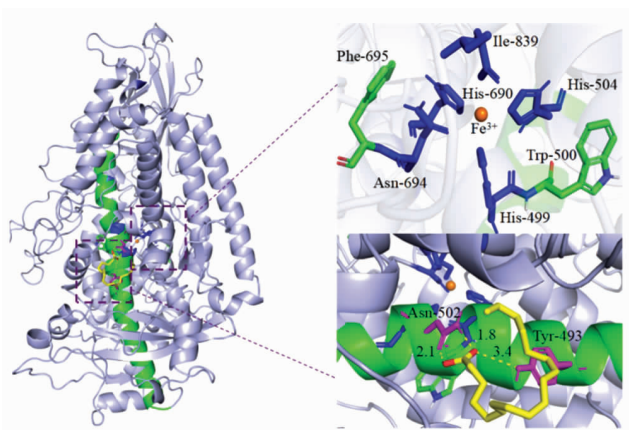
图 5 不同热处理对大豆 LOX 三级结构构象的影响

Fig.5 Effect of different heating treatment methods on the tertiary conformation of soybean LOX

暴露。同时,还观察到热处理可以引起 LOX 的 λ_{\max} 发生轻微红移。因此,推测高温热处理可促使 LOX 分子构象发生部分去折叠,导致 Trp 等疏水性氨基酸残基暴露于酶蛋白表面,促使酶蛋白分子三级结构发生改变,酶活力随之下降。

2.6 分子对接分析

LOX 与底物亚油酸分子对接的最优结果如图 6 所示。大豆 LOX 催化结构域主要由 α -螺旋结构中 473~517 号氨基酸残基组成,并含有催化活性的非血红素铁^[28]。在酶与底物分子相互作用中,氢键被认为是表征基团间相互作用的重要指标^[29],图中 LOX 的 α -螺旋结构中 Asn-502、Tyr-493 与底物亚油酸发生了相互作用,形成平均距离为 2.43 Å 的 3 个氢键。非血红素铁位于催化活性中心,通常包含 5 个内源配体,它们分别是 3 个组氨酸 (His-499, His-504, His-690) 残基侧链,Asn-694 残基上的 δ -氧原子和 C 端 Ile-839 的羧基^[30]。Trp 残基对微环境的微小变化很敏感,常被用来反映蛋白质三级结构。Phe 残基可作为供体将共振能量转移到 Tyr 残基上,从而增加 Trp 残基的荧光强度,LOX 催化活性中心非血红素铁内源配体 His-499、Asn-694,通过肽键与 Trp-500、Phe-695 相连。结合 LOX 在热处理前、后荧光吸收特性的变化,推测高温热处理导致 LOX 催化结构域非血红素铁周围的微环境发生改变,酶蛋白三级结构被破坏致使 LOX 活性丧失。



注:红色结构代表 Fe^{3+} ,蓝色、绿色、紫色结构代表 LOX 的不同氨基酸残基;绿色螺旋结构代表 LOX 中心结构;黄色代表亚油酸,黄色虚线表示氢键。

图 6 LOX 与底物亚油酸分子对接示意图

Fig.6 Schematic diagram of molecular docking of LOX with substrate linoleic acid

3 结论

比较研究不同热处理方式对大豆 LOX 活力和构象的影响,发现热处理并没有改变 LOX 的一级结构,而 120 °C 80 s+140 °C 15 s 与 100 °C 10 min 热处理都可以显著促使酶蛋白从有序结构向无序结构转变,造成 α -螺旋和 β -折叠相对含量降低, β -转角和无规则卷曲相对含量增加,同时其表面疏水性和内源性荧光强度又有增强的趋势。结合分子对接构象结果分析高温热处理更易引起酶蛋白分子部分伸展,催化活性部位受损,酶活性降

低。综上,高温短时升温钝化热处理法通过改变 LOX 的空间构象降低 LOX 活力,可能是大豆蛋白在生产中灭酶的同时,其功能性获得改善的有效途径之一。

参 考 文 献

- [1] YANG H, QU Y Z, LI J T, et al. Improvement of the protein quality and degradation of allergens in soybean meal by combination fermentation and enzymatic hydrolysis[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 128: 109442.
- [2] LI X Y, CHEN L Y, HUA Y F, et al. Effect of preheating-induced denaturation during protein production on the structure and gelling properties of soybean proteins[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 105: 105846.
- [3] CAI K, FANG Y, XIA Y M, et al. Effect of exogenous iron on aerobic catalytic mechanism of soybean lipoxygenase[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 32(1/2): 21-26.
- [4] KUMARI S, MEMBA L J, DAHUJA A, et al. Elucidation of the role of oleosin in off-flavour generation in soymeal through supercritical CO₂ and biotic elicitor treatments [J]. Food Chemistry, 2016, 205: 264-271.
- [5] VIANA L, ENGLISH M. The application of chromatography in the study of off-flavour compounds in pulses and pulse by-products[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 150: 111981.
- [6] WANG B, ZHANG Q, ZHANG N, et al. Insights into formation, detection and removal of the beany flavor in soybean protein[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 112: 336-347.
- [7] NASRABADI M N, DOOST A S, MEZZENGA R. Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 118: 106789.
- [8] CAI J S, ZHU Y Y, MA R H, et al. Effects of roasting level on physicochemical, sensory, and volatile profiles of soybeans using electronic nose and HS-SPME-GC-MS[J]. Food Chemistry, 2021, 340: 127880.
- [9] YOO S H, CHANGY H. Volatile compound, physicochemical, and antioxidant properties of beany flavor-removed soy protein isolate hydrolyzates obtained from combined high temperature pre-treatment and enzymatic hydrolysis[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2016, 21(4): 338.
- [10] PENG X Y, WANG Y H, XING J Y, et al. Characterization of particles in soymilks prepared by blanching soybeans and traditional method: A comparative study focusing on lipid-protein interaction[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 1-7.
- [11] SHARMA B, CHUGH L K. Two isoforms of lipoxygenase from mature grains of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.)R. Br.]: Purification and physico-chemico-kinetic characterization[J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54(6): 1577-1584.
- [12] MANDAL S, DAHUJU A, KAR A, et al. *In vitro* kinetics of soybean lipoxygenase with combinatorial fatty substrates and its functional significance in off flavour development[J]. Food Chemistry, 2014, 146: 394-403.
- [13] ZHANG Y, GUO S T, LIU Z S, et al. Off-flavor related volatiles in soymilk as affected by soybean variety, grinding, and heat-processing methods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(30): 7457-7462.
- [14] GAO Z L, SHEN P Y, LAN Y, et al. Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate [J]. Food Research International, 2020, 131: 109045.
- [15] 周雅琪, 黄佳茵, 陈美玉, 等. 亚牛磺酸对南美白对虾多酚氧化酶活性及酶构象的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(4): 100-106.
ZHOU Y Q, HUANG J Y, CHEN M Y, et al. Effects of hypotaurine on the activity and conformation polyphenol oxidase in *Penaeus vannamei* [J]. Food Science, 2021, 42(4): 100-106.
- [16] AANANGI R, KOTAPATI K V, PALAKA B K, et al. Purification and characterization of lipoxygenase from mung bean (*Vigna radiata* L.) germinating seedlings[J]. 3 Biotech, 2016, 6(1): 1-8.
- [17] CHEN M S, LU J H, LIU F, et al. Study on the emulsifying stability and interfacial adsorption of pea proteins[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 88: 247-255.
- [18] 赵谋明, 焦铭, 林恋竹, 等. 含邻苯二酚结构的植物多酚对脂肪氧合酶的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(6): 57-64.
ZHAO M M, JIAO M, LIN L Z, et al. Inhibitory

- effects of plant polyphenol with a catechol structure on the lipoxygenase[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(6): 57–64.
- [19] KUBO M, REIS B, SATO L, et al. Microwave and conventional thermal processing of soymilk: Inactivation kinetics of lipoxygenase and trypsin inhibitors activity[J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2021, 145: 111275.
- [20] KONG X Z, LI X H, WANG H J, et al. Effect of lipoxygenase activity in defatted soybean flour on the gelling properties of soybean protein isolate[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(3): 1093–1099.
- [21] SHI Y, MANDAL R, SINGH A, et al. Legume lipoxygenase: Strategies for application in food industry[J]. *Legume Science*, 2020, 2(3): e44.
- [22] LIAN X J, ZHANG Y, BEI J, et al. Alterations of molecular properties of lipoxygenase induced by dense phase carbon dioxide[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2009, 10(1): 47–53.
- [23] 邱春江. 超高压对鲢鱼中关键酶与结构蛋白质构象影响的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- QIU C J. Effect of ultra-high pressure technology on key enzymes and structural proteins in silver carp processing[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [24] 王帮国, 余振宇, 林琳, 等. 超声波、超高压对白鲢鱼肌肉脂肪氧合酶构象及酶活力的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(3): 169–175.
- WANG B G, YU Z Y, LIN L, et al. Effect of ultrasonic wave and ultra high pressure treatment on conformation and enzyme activity of lipoxygenase in silver carp muscle[J]. *Food Science*, 2018, 39(3): 169–175.
- [25] PELLICER J A, NAVARRO P, SÁNCHEZ P H, et al. Structural changes associated with the inactivation of lipoxygenase by pulsed light[J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2019, 113: 108332.
- [26] WANG C, JIANG L Z, WEI D X, et al. Effect of secondary structure determined by FTIR spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate[J]. *Procedia Engineering*, 2011, 15: 4819–4827.
- [27] ZHANG J, YU X J, XU B Y, et al. Effect of intensive pulsed light on the activity, structure, physico-chemical properties and surface topography of polyphenol oxidase from mushroom[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2021, 72: 102741.
- [28] IVANOVI I, HEYDECK D, HOFHEINZ K, et al. Molecular enzymology of lipoxygenases[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 503(2): 161–174.
- [29] ZHOU H L, WANG F H, NIU H H, et al. Structural studies and molecular dynamic simulations of polyphenol oxidase treated by high pressure processing[J]. *Food Chemistry*, 2022, 372: 131243.
- [30] NEWCOMER M E, BRASH A R. The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis[J]. *Protein Science*, 2015, 24(3): 298–309.

Effects of Heating Treatment on the Activity and Conformation of Soybean Lipoxygenase

Kong Yue, Sun Lina, Li Yanhui, Kang Zimeng, He Tian, Lü Wenbiao,
Xu Fu, Zhang Shuang, Xie Fengying*
(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract In this research, the effects of heating treatment conditions on LOX activity and conformation were studied by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE), circular dichroism spectroscopy, surface hydrophobicity, fluorescence spectroscopy and molecular docking. The results showed that 120 °C 80 s+140 °C 15 s and 100 °C 10 min heating treatment could inhibit 67.47% and 60.53% of LOX activity. SDS–PAGE results showed that the molecular mass of the enzyme did not change significantly with heating conditions, but the band strength decreased. Moreover, heating treatment caused the decrease in α -helix and β -sheet, and increased in fluorescence intensity and surface hydrophobicity, suggesting that the greatly changed secondary and tertiary structures of LOX lead to a rapid decline in LOX activity. Molecular docking determined that the microenvironment surrounding the non heme iron at the ac-

tive center of LOX was susceptible to temperature changes. Therefore, it was speculated that high-temperature heating treatment may affect the LOX activity by destroying the non-covalent interaction force that maintains the structure of enzyme. High-temperature short-time elevated-temperature inactivation of LOX is an appropriate heating method. The findings could provide a theoretical reference for the widespread application of LOX activity control in soybean processing.

Keywords lipoxygenase; heating treatment; enzyme activity; conformation