

水稻谷糠中的草酸氧化酶及其特性研究

周海, 罗伟, 刘娥娥*, 彭新湘

(华南农业大学生命科学学院分子植物生理研究室, 广东 广州 510642)

摘要: 在水稻谷糠中检测到草酸氧化酶(OxO, EC1.2.3.4)的活性, 其主要存在于细胞壁中, 最适 pH 值为 2.5, K_m 值为 0.63 mmol/L, 当底物草酸的浓度大于 2.0 mmol/L 时会出现底物抑制; 此外, 该酶热稳定性很高, 而且对胃蛋白酶、SDS 和高浓度的 NaCl 不敏感; 1 mmol/L 的 EDTA、 NH_4^+ 、 Cl^- 、 Mn^{2+} 、 CO_3^{2-} 、 Na^+ 、 K^+ 、 H_2PO_4^- 、 SO_4^{2-} 、 Fe^{2+} 和 PO_4^{3-} 对其活性没有影响, 但 1 mmol/L 的 NO_3^- 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Al^{3+} 会抑制它的活性。因此, 谷糠中的 OxO 可能被广泛用于测定草酸含量。

关键词: 草酸氧化酶; 谷糠; 特性

Enzymological Properties of Oxalate Oxidase from Rice Bran

ZHOU Hai, LUO Wei, LIU E-e*, PENG Xin-xiang

(Laboratory of Molecular Plant Physiology, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The activity of oxalate oxidase (OxO, EC1.2.3.4) was detected in rice bran and this enzyme was found to be mainly rich in cell wall. The optimal reaction pH and K_m values of this enzyme towards oxalate as a substrate were 2.5 and 0.63 mmol/L, respectively. An inhibitory effect against OxO was observed when oxalate concentration was over 2.0 mmol/L. Meanwhile, the enzyme exhibited high thermo-stability and resistance to SDS, pepsin and NaCl. Although EDTA, NH_4^+ , Cl^- , Mn^{2+} , CO_3^{2-} , Na^+ , K^+ , H_2PO_4^- , SO_4^{2-} , Fe^{2+} and PO_4^{3-} at the concentration of 1 mmol/L had no effect on OxO activity, NO_3^- , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} and Al^{3+} at the identical concentration exhibited strong an inhibitory effect against OxO activity. Therefore, OxO from rice bran may be widely used to detect oxalate level, which will provide theoretical evidence for the ingredient analysis of functional foods.

Key words: oxalate oxidase; rice bran; property

中图分类号: Q554

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)05-0190-04

谷糠是大米生产中最丰富的副产物之一, 是维生素、矿物质和膳食纤维很好的来源。谷糠中还含有一些独特的天然的抗氧化剂复合物如谷维素、生育酚和生育三烯酚^[1]。此外, 谷糠能够预防或作为癌症、高血脂、脂肪肝、高钙尿症、肾结石和心脏病的保健食品^[2]。因此, 谷糠有希望成为功能食品的一种主要成分。但目前谷糠主要被用作动物饲料, 作为人类食物尚未被充分利用。

而草酸是哺乳动物代谢的终产物, 在体内过多积累会导致结石、关节炎与心肌炎等疾病, 如食用大量高草酸食物对人和动物可能是致命的^[3]。Malpass 等^[4]发现固定化的草酸氧化酶(OxO)在阻止草酸钙晶体的形成中起

积极作用。将含有包埋 OxO、过氧化氢酶和过氧化物酶的胶囊植入老鼠体内, 会导致草酸的降解^[5], 这为利用酶法治疗高草酸尿开辟了新的前景。此外, OxO 还是一个很有用的分析酶, 可用于比色法测定生物流体或饮料中的草酸含量^[6-8], 但主要被用于分析检测尿中的草酸水平。因为 OxO 分离纯化复杂, 市场上 OxO 的价格非常昂贵, 大大限制了其在实际中的应用。谷糠是大米生产过程中最廉价的副产物之一, 其中的 OxO 稳定性很高, 且易于提取, 因此可能在实际应用中具有更大的潜力。本实验通过分离纯化水稻谷糠中的草酸氧化酶对其特性进行研究。

收稿日期: 2009-04-09

基金项目: 广东省自然科学基金项目(05300955)

作者简介: 周海(1982—), 男, 博士研究生, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: hai_zhou127@126.com

* 通信作者: 刘娥娥(1970—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为酶学与酶工程。E-mail: eeliu70@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

水稻(*Oryza sativa* L.)谷糠 市售。

草酸 Sigma 公司; 4-氨基氮替吡啶 Fluka 公司; 辣根过氧化物酶(POD) 上海伯奥公司; 胃蛋白酶 Amresco 公司; *N,N*-二甲基苯胺、琥珀酸等试剂皆为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

分光光度计、低温冷冻离心机、pH 计、氧电极 Hansatech 公司。

1.3 方法

1.3.1 OxO 的提取

按 1:10(*m/V*)的比例加入 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)匀浆水稻谷糠, 4℃下 500 × *g* 离心 15min, 收集沉淀。按 1:10(*m/V*)的比例加入提取缓冲液(50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, pH7.5)洗涤沉淀两次, 然后 12000 × *g* 离心 10min, 收集沉淀, 所得沉淀用于 OxO 活性分析。

为探讨 OxO 与细胞壁的结合方式, 分别用 0.4% SDS、1mol/L NaCl 及 0.6% 纤维素酶和 2.5% 果胶酶处理上述沉淀。SDS 和 NaCl 处理温度为 37℃, 时间为 30min, pH7.5; 纤维素酶和果胶酶处理温度为 28℃, 时间为 36h, pH4.0。处理完后于 4℃条件下 12000 × *g* 离心 10min, 收集沉淀, 接着用 0.05mol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲液洗涤沉淀两次, 然后离心收集沉淀测定 OxO 活力。

1.3.2 OxO 活性的测定

OxO 酶活性的测定可通过比色法测定 H₂O₂ 的产生, 也可通过氧电极法测定氧气的消耗。本实验参考 Zhang 等^[9]的方法用比色法测定 OxO 活性。反应液中含有 40mmol/L pH3.8 琥珀酸-NaOH 缓冲液, 60% 乙醇, 1mmol/L 草酸, 0.025% *N,N*-二甲基苯胺, 0.1mg/mL 4-氨基氮替吡啶, 5U/mL 辣根过氧化物酶溶液和 OxO 酶(40mg 沉淀)。30℃反应 10min 后加 40μL 50% TCA 终止反应, 然后 12000 × *g* 4℃离心 3min 在波长 555nm 处测定吸光度, 对照的反应体系中不加草酸溶液。以每分钟每克沉淀产生的 H₂O₂ 量表示酶活性, 以对照组为 100% 计算相对酶活力。氧气的消耗利用氧电极在 30℃条件下测定。1mL 反应体系中含有 50mmol/L 的琥珀酸钠缓冲液, 40mg 沉淀, 加入草酸后开始记录氧气消耗, 测定每克沉淀每分钟氧气的消耗量。

2 结果与分析

2.1 水稻谷糠中的 OxO 分离纯化及活性测定结果

按 1.3.1 节方法分别收集沉淀和上清液测定 OxO 活性。结果表明: 沉淀表现出较高的 OxO 活性, 上清液

中的 OxO 活性几乎为零。由于 500 × *g* 离心力下收集的沉淀主要是细胞壁残渣, 由此可知, 水稻谷糠中的 OxO 主要存在于细胞壁中。

为了证明谷糠中确实存在 OxO, 实验用 5% TCA 将上述沉淀悬浮, 室温放置 0.5h 后, 收集沉淀, 分析其在氧化草酸时的耗氧量和产生 H₂O₂ 的量(表 1)。结果表明: 经 TCA 处理的沉淀即不消耗 O₂ 也不产生 H₂O₂, 而未经 TCA 处理的沉淀催化此反应消耗 O₂ 的量和产生 H₂O₂ 的量几乎相等, 60mg 沉淀氧化草酸的耗氧量及产生 H₂O₂ 的量是 30mg 沉淀的 2 倍, 由此可知, 水稻谷糠中存在 OxO。

表 1 5% TCA 处理对沉淀氧化草酸的影响
Table 1 Effect of 5% TCA treatment on oxalate precipitation

| 测定项目 | 经 5%TCA 处理 | | 未经 TCA 处理 | |
|--|------------|------|-------------|-------------|
| | 30mg | 60mg | 30mg | 60mg |
| 耗氧量 / (nmol/min) | 0.00 | 0.00 | 2.74 ± 0.50 | 5.74 ± 0.53 |
| 产生 H ₂ O ₂ 的量 / (nmol/min) | 0.00 | 0.01 | 2.94 ± 0.16 | 5.86 ± 0.11 |

NaCl、SDS 处理对沉淀中的 OxO 活性未产生明显影响, 纤维素酶和果胶酶处理则使相对酶活力略有升高(图 1), 说明谷糠中的 OxO 与细胞壁结合紧密。

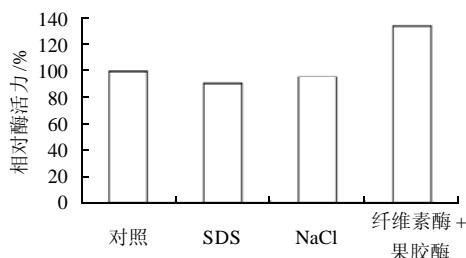


图 1 SDS、NaCl 及纤维素酶和果胶酶处理对 OxO 活性的影响
Fig.1 Effects of SDS, NaCl and cellulase combined with pectinase on oxalate oxidase activity

2.2 谷糠中 OxO 的酶学特性

2.2.1 OxO 的最适底物浓度及 *K_m* 值

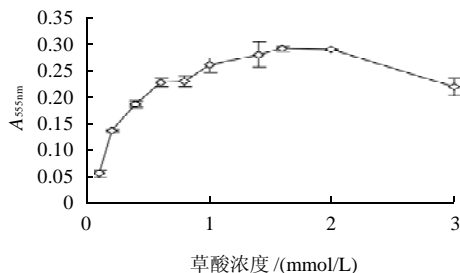


图 2 草酸浓度对 OxO 活性的影响
Fig.2 Effect of oxalate concentration on oxalate oxidase activity

由表 2 可见, 当草酸浓度小于 1.6 mmol/L 时, 随着草酸浓度的增大酶活性逐渐升高, 而当草酸浓度进一步提高时, 酶活性降低, 浓度为 3 mmol/L 时, 酶活性为 1.6 mmol/L 时的 75.36%。说明高浓度的草酸会抑制 OxO 活性。

采用双倒数作图法测得水稻谷糠中 OxO 对底物草酸的 K_m 值为 0.63 mmol/L (图 3)。

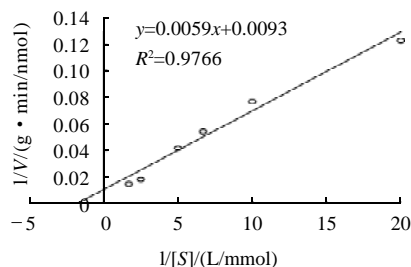


图 3 OxO 的 Lineweaver-Burk 图

Fig.3 Lineweaver-Burk plot of oxalate oxidase

2.2.2 OxO 的最适 pH 值

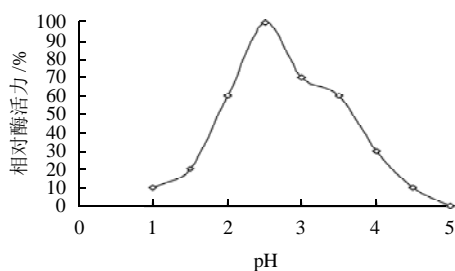


图 4 pH 值对 OxO 活性的影响

Fig.4 Effect of pH on oxalate oxidase activity

在 KCl-HCl (pH1.0~2.5)、柠檬酸-柠檬酸钠 (pH3.0)、琥珀酸-NaOH (pH3.5~5.0)。分别为 50 mmol/L 缓冲体系中用氧电极法测定谷糠 OxO 的活性, 分析 pH 值对 OxO 活性的影响。图 4 结果显示, 谷糠中 OxO 的最适 pH 值为 2.5, 与玉米根中 OxO 的最适 pH 值^[10]比较接近。当 pH 值小于 2.0 或大于 3.5 时, 谷糠中 OxO 的活性迅速下降。同样的, 苔藓^[11]、大麦根^[12]和高粱叶^[13]中的 OxO 也是在酸性条件下有活性。

2.2.3 OxO 的稳定性分析

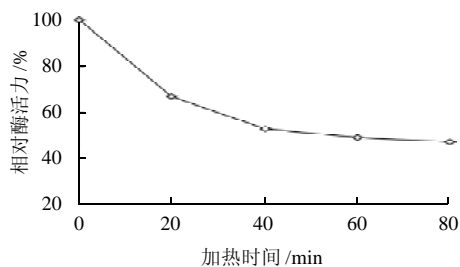
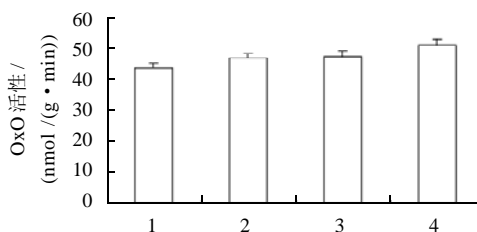


图 5 90 °C 水浴不同时间对 OxO 活性的影响

Fig.5 Time course of oxalate oxidase activity during 90 °C water bath

将 $500 \times g$ 离心力下收集的沉淀在 90 °C 水浴中分别保温 20、40、60、80 min 后, 迅速冷却, 然后测定沉淀中的 OxO 活性。图 5 结果显示, 谷糠中的 OxO 是一个热稳定性很高的酶, 90 °C 水浴 60 min 后, 仍能维持 50% 左右的酶活性。此外, 用胃蛋白酶在 37 °C 处理沉淀 30 min, 酶活性也无显著变化 (图 6)。



1. 未经任何处理的酶; 2. 在 37 °C 水浴中保温 30 min 的样品 (pH7.5); 3. 在 37 °C 水浴中保温 30 min 的样品 (pH2); 4. 胃蛋白酶溶液在 37 °C 水浴中保温 30 min 的样品 (每毫升加 0.0526 mg 胃蛋白酶, pH2)。

图 6 胃蛋白酶对 OxO 活性的影响

Fig.6 Effect of pepsin on oxalate oxidase activity

2.2.4 化合物和金属离子对谷糠中 OxO 活性的影响

表 2 化合物和金属离子对 OxO 活性的影响

Table 2 Effects of chemical compounds and metal ions on oxalate oxidase activity

| 化合物 | H ₂ O | NaCl | KCl | CaCl ₂ | MgCl ₂ |
|-----------|-------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 相对酶活力 / % | 100.00 | 104.67 | 100.81 | 6.85 | 80.72 |
| 化合物 | AlCl ₃ | CoCl ₂ | NH ₄ NO ₃ | KNO ₃ | K ₂ SO ₄ |
| 相对酶活力 / % | 4.72 | 33.89 | 48.14 | 54.38 | 97.23 |
| 化合物 | MnSO ₄ | ZnSO ₄ | CuSO ₄ | CuSO ₄ +EDTA | FeSO ₄ |
| 相对酶活力 / % | 68.13 | 22.96 | 35.42 | 86.16 | 108.60 |
| 化合物 | FeSO ₄ +EDTA | K ₂ CO ₃ | Na ₂ HPO ₄ | NaH ₂ PO ₄ | EDTA |
| 相对酶活力 / % | 134.68 | 96.64 | 97.03 | 100.13 | 117.25 |

各种化合物对谷糠中 OxO 活性的影响如表 2 所示。化合物的浓度皆为 1 mmol/L。1 mmol/L K⁺、Cl⁻、CO₃²⁻、H₂PO₄⁻和 PO₄³⁻对 OxO 活性没有影响; 1 mmol/L 的 NO₃⁻、Zn²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺、Co²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺和 Al³⁺抑制 OxO 活性, 而 1 mmol/L EDTA、Na⁺和 Fe²⁺对 OxO 活性有促进作用。

3 讨论

在高等植物中, OxO 有 3 种形式: 分别为可溶的、膜束缚的和细胞壁结合的。其中大麦幼苗^[14]、香蕉皮^[15]和高粱叶^[16]中的 OxO 是可溶性的, 现已被提纯并对其特性进行了报道。苋菜叶子^[17]中的 OxO 是膜束缚型的; 玉米幼苗根中的 OxO 则位于细胞壁上^[10]。本研究发现水稻谷糠中存在 OxO (表 1), 其主要存在于细胞壁中, 用 NaCl、SDS 或纤维素和果胶酶都不能将其游离出来。之

前有报道显示玉米根^[10]和大麦叶中^[18]的OxO也位于细胞壁。用NaCl或SDS也不能将其游离出来。本研究结果还显示,此酶的特性与小麦胚中的萌发素、大麦幼苗^[19]和玉米根中^[10]的OxO相似,是一个热稳定性高且对胃蛋白酶不敏感的酶^[20]。

OxO在酸性pH值条件下起作用,最适pH值在3.2左右。谷糠中OxO的最适pH值与玉米根(pH3.2)^[10]和大麦幼苗中(pH3.2)^[14]的相似,但是同高粱中的(pH5.0)^[21-22]不同。本实验测得谷糠OxO K_m 值为0.63mmol/L,比高粱叶中^[16]的高一个数量级,但略低于玉米根^[10]和大麦幼苗根中^[23]OxO的 K_m 值。

在所测试的各种阴离子中,只有 NO_3^- 显著抑制OxO的活性,同苋菜叶^[17]和玉米根中的OxO^[10]一样。但 Cl^- 可抑制来源于大麦幼苗^[14]、甜菜茎^[6]和香蕉皮^[15]中的OxO的活性,虽然来源于上述3种材料中的OxO已被用作测定尿和血浆中的草酸,但由于其受生物样品中 Cl^- 和 NO_3^- 的抑制,使其成功应用受到限制。EDTA不抑制谷糠中的OxO,这同苋菜叶^[17]、玉米根^[10]、大麦幼苗^[14]和根^[12]中的OxO相似,但其却强烈抑制高粱叶^[13]和根^[22]中的OxO。在所测试的金属离子中,只有 Na^+ 和 Fe^{2+} 可激活谷糠中的OxO,但高粱叶^[13]和根^[22]中的OxO要达到最大活性分别需要 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 的激活。

由于谷糠中OxO的高度热稳定,对 Cl^- 、胃蛋白酶水解不敏感,而且在酸性条件下起作用,所以谷糠细胞壁中的OxO可能在实际应用中具有更大的潜力,特别在开发治疗和预防与高草酸相关疾病的功能食品中。更有趣的是,谷糠中的OxO正如一个天然的固定在纤维或半纤维上的固定化酶,这使得其在实际应用中更易于操作。

参考文献:

- [1] MOLDENHAUER K A, CHAMPAGNE E T, MCCASKILL D R, et al. Functional products from rice[M]// MAZZA G. Functional foods. Switzerland: Technomic Publishing Co Inc, 2003: 71-89.
- [2] JARIWALLA R J. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine[J]. Drugs Exp Clin Res, 2001, 27(1): 17-26.
- [3] SANZ P, REIG R. Clinical and pathological findings in fatal plant oxalosis[J]. Am J Forensic Med Pathol, 1992, 13: 342-345.
- [4] MALPASS C A, MILLSAP K W, SIDHU H, et al. Immobilization of an oxalate-degrading enzyme on silicone elastomer[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 63(6): 822-829.
- [5] RAGHAVAN K G, TARACHAND U. Degradation of oxalate in rats implanted with immobilized oxalate oxidase[J]. FEBS Lett, 1986, 195 (1/2): 101-105.
- [6] BERCKMANS R J, BOER P. An inexpensive method for sensitive enzymatic determination of oxalate in urine and plasma[J]. Clin Chem, 1988, 34: 1451-1455.
- [7] LADWIG P M, LIEDTKE R R, LARSON T S, et al. Sensitive spectrophotometric assay for plasma oxalate[J]. Clin Chem, 2005, 51: 2377-2379.
- [8] OBSANZKY D M, RICHARDSON K E. Quantification of urinary oxalate with oxalate oxidase from beet stems[J]. Clin Chem, 1983, 29: 1815-1818.
- [9] ZHANG Z, COLLINGE D B, THORDAL-CHRISTENSEN H. Ethanol increases sensitivity sensitivity of oxalate oxidase assay and facilitates direct activity attaining in SDS gels[J]. Plant Mol Biol Rep, 1996, 14: 266-272.
- [10] VULETIC M, SUKALOVIC V H T. Characterization of cell wall oxalate oxidase from maize roots[J]. Plant Sci, 2000, 157: 257-263.
- [11] DATTA P K, MEEUSE B J D. Moss oxalic acid oxidase: a flavoprotein [J]. Biochem Biophys Acta, 1955, 17: 602-603.
- [12] KOTSIRA V P, CLONIS Y D. Oxalate oxidase from barley roots: purification to homogeneity and study of some molecular, catalytic and binding properties[J]. Arch Biochem Biophys, 1997, 340(2): 239-249.
- [13] PUNDIR C S, NATH R. Occurrence of an oxalate oxidase in grain sorghum leaves[J]. Phytochem, 1984, 23: 1871-1874.
- [14] SUGUIRA M, YAMAMURA H, HIRANO K, et al. Purification and properties of oxalate oxidase from barley seedling[J]. Chem Pharm Bull, 1979, 27: 2003-2007.
- [15] RAGHAVAN K G, DEVASAGAYAM T P A. Oxalate oxidase from banana peel for determination of urinary oxalate[J]. Clin Chem, 1985, 31 (4): 649.
- [16] SATYAPAL, PUNDIR C S. Purification and properties of an oxalate oxidase from leaves of grain sorghum hybrid CSH-5[J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1161: 1-5.
- [17] GOYAL L, THAKUR M, PUNDIR C S. Purification and properties of a membrane bound oxalate oxidase from *Amaranthus* leaves[J]. Plant Sci, 1999, 142: 21-28.
- [18] ZHOU Fasong, ZHANG Zigu, GREGERSEN P L, et al. Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus[J]. Plant Physiol, 1998, 17: 33-41.
- [19] DUMAS B, SAILLAND A, CHEVIET J P, et al. Identification of barley oxalate oxidase as a germin-like protein[J]. CR Acad Sci Paris, 1993, 316: 793-798.
- [20] GRZELCZAK Z F, LANE B G. Signal resistance of a soluble protein to enzymic proteolysis. An unorthodox approach to the isolation and purification of germin, a rare growth-related protein[J]. Can J Biochem Cell Biol, 1984, 62: 1351-1353.
- [21] PUNDIR C S. Purification and properties of oxalate oxidase from sorghum leaves[J]. Phytochem, 1991, 30: 1065-1067.
- [22] PUNDIR C S, KUCHHAL N K. Detection of an oxalate oxidase in grain sorghum roots[J]. Phytochem, 1989, 28: 2909-2912.
- [23] REQUENA L, BORNEMANN S. Barley (*Hordeum vulgare* L.) oxalate oxidase is a manganese-containing enzyme[J]. Biochem J, 1999, 343: 185-190.