

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

## 生化反應器形成香氣化合物系統之建立： (3) 香蕉葉脂氧合一之固定化

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNFH-91-17

執行期間：91年1月1日至91年12月31日

計畫主持人：吳鴻程

共同主持人：整合型總主持人：郭建民

計畫參與人員：研究生：范美娟

執行單位：食品衛生系

中華民國 92 年 1 月 3 日

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

## 生化反應器形成香氣化合物系統之建立：

### (3) 香蕉葉脂氧合一之固定化

計畫編號：CNFH-91-17

執行期限：91年1月1日至91年12月31日

主持人：吳鴻程 執行機構：食品衛生系

#### 一、中文摘要

本研究乃探討香蕉葉脂氧合一之固定化方法及其特性。香蕉葉粗抽出液經 25-50% 硫酸銨分劃、hydroxyapatite 管柱層析及 Superdex pg 200 膠過濾分離後，脂氧合一活性純化了 327 倍，回收率為 9.9%。香蕉葉脂氧合一於不同之固定化方法中，以海藻酸鹽及 hydroxyapatite 之固定化效果較佳。若以多點式結合之 chitosan+ glutadialdehyde 方法來處理，其固定化之效果並不理想。香蕉葉脂氧合一經海藻酸鹽固定化後，以凍結乾燥之活性保留最多。所得之固定化酵素，其最適溫度及 pH 分別為 45°C 及 pH 6.8。將該固定化酵素於 4°C 放置 68 天後，仍保持 80% 以上活性。連續與基質作用 6 次後仍保持 50% 酵素活性。除此之外，本研究中首度採用 hydroxyapatite 之固定方法，於磷酸鹽 10 mM 濃度下其固定化效果約為海藻酸鹽者之兩倍，後續之研究目前仍進行中。

**關鍵詞：**脂氧合一、香蕉葉、固定化酵素、香氣、生化反應器

#### Abstract

The lipoxygenase (LOX, linoleate: oxygen oxidoreductase, E.C. 1.13.11.12) from banana leaf (*Giant Cavendishii*, AAA) were isolated and purified 327-fold using 25-50% saturation of ammonium sulfate fractionation, hydroxyapatite column separation, and gel filtration on Superdex 200. MW of the purified LOX was 85 kD. The banana leaf LOX was further immobilized with sodium alginate, chitosan, talc, DEAE Sepharose, marco-prep 50Q, and hydroxylapatite. Among them, sodium alginate and hydroxylapatite showed higher LOX activity during

immobilization. The multi-point-attachment immobilization with chitosan and glutadialdehyde seemed to be not suitable to the LOX from banana leaf. LOX activity from different drying methods of immobilized lipoxygenase with sodium alginate method was compared. LOX from freeze drying showed the highest enzyme activity followed by those from suction drying and air drying. The optimal temperature of the immobilized LOX was 45 and optimal pH was pH 6.8. The immobilized LOX retained 80 % enzyme activity for 68 days at 4 , and more than 50 % LOX activity for 6 reused cycles at 28 . Moreover, LOX activity immobilized with hydroxylapatite was 2-fold higher that with sodium alginate method. Further studies on the immobilization with hydroxylapatite are proceeding.

**Keywords:** *lipoxygenase, immobilized enzyme banana leaf, flavor, bioreactor*

#### 二、緣由與目的

近幾年來，消費者對天然香料的需求與日遽增，而添加天然香料之商品價格也都較添加人工者高出許多。天然香料中又以具有綠色植物氣味 (green)、果香 (fruity)、鮮魚味 (fresh fish-like) 等香氣特徵之香料被使用的相當廣泛，例如食品香料、水產香料、室內或汽車等空間之芳香劑以及添加於飼料中促進陸地或水生動物攝食加速生長等用途上。每年對此類香料的消費金額大約有 10~20 億台幣之間，且有逐年增加的趨勢。若單由傳統之天然來源萃取，已無法滿足每年龐大之需求。因此許多學者提出利用生物科技的方法來解決，其中酵素

法所獲得的香氣化合物經 FDA 認可為”天然香料”，似乎是可行且較便宜的方法。於酵素法中，利用脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)途徑相關酵素來產生此類”天然香料”被認為是較有效率、便宜且具有環保概念的方法(Wu et al., 2002)。

申請者於前幾年所參與之研究計畫對香蕉葉、綠豆芽等 LOX 途徑相關酵素做了一些探討。其中香蕉葉 LOX 已經完全純化，該酵素具膜結合較親油特性，其最適 pH 為 6.3，催化 18:2 或 18:3 之位置為 9-位置，其基質親和力常數(Km)小及最大反應速率(Vmax)大(Kuo et al., 2000a, Kuo and Yeh, 2001)。將 18:3 加入香蕉葉粗抽出液中則有香瓜(cucumber, melon)香氣之產生，此特性與香瓜或蕃茄 LOX 之特性較為接近。若以製備式正相 HPLC 純化之 18:2-9OOH 或 18:2-13OOH 為基質，香蕉葉粗抽出液中具有水解此兩種過氧化物之能力。除此之外，以比活性來看，由成熟香蕉葉嫩葉獲得之 LOX 與黃豆 LOX 活性相當，較蕃茄、香瓜之 LOX 則高出甚多(郭等，未發表)。因此，香蕉葉中具有活性高、親油性且較類似水果之 LOX 以及兼具水解 18:2-9OOH 或 18:2-13OOH 之 HPLS 的特性，為植物中相當難得之來源。再者，本省每年於香蕉採收時，必須將香蕉樹加以砍伐(屏東香蕉研究所，Personal Communication)，每年香蕉葉之產生量估計約有 12.4 萬公噸(台灣省農林廳統計資料，2000)，幾乎都被廢棄或燃燒並未充分利用。若大量的加以應用，除提高其經濟價值外並可解決環保上之問題。

故本計畫中將探討利用香蕉葉中高活性及較親油性之脂氧合酶與過氧化物水解酶形成香氣化合物之可能性，全程計畫將於兩年內完成。本年度計畫將探討香蕉葉脂氧合酶之固定化方法及固定化酵素之特性。藉 LOX 途徑之生物科技方法來產生天然香料，除解決此類香料日益嚴重缺乏之問題外，並可提高香蕉葉

之經濟價值、減緩廢棄香蕉葉衍生之環保問題以及提供今後發展此類天然香料之參考。

### 三、結果與討論

香蕉葉粗抽出液經 25-50% 硫酸銨分劃、hydroxyapatite 管柱層析及兩次 Superdex pg 200 膠過濾分離後，脂氧合酶活性(LOX)純化了 327 倍，回收率為 9.9% (表 1)。純化後之酵素於電泳圖上只呈現一個電泳帶，以膠過濾分析其分子量約為 85KD。將香蕉葉脂氧合酶經不同之固定化方法處理發現，以海藻酸鹽及 hydroxyapatite 之固定化效果較佳(表 2)。若以多點式結合之 chitosan+glutadialdehyde 方法來處理，可能因為 glutadialdehyde 本身即會抑制香蕉葉 LOX 活性(圖一)，使得固定化之效果欠佳。海藻酸鹽為固定化酵素常用之擔體，此擔體亦適用於本酵素。香蕉葉脂氧合酶經海藻酸鹽固定化後，比較不同之乾燥方法如表 3，似乎以凍結乾燥之活性保留最多。其次探討凍乾所得固定化酵素之特性，其最適溫度及 pH 分別為 45°C (圖二) 及 pH 6.8 (圖三)，最適溫度較未固定化之酵素增加了 5°C，最適 pH 增加了 0.5。圖四為該固定化酵素儲藏安定性之探討，於 4 °C 放置 68 天，該酵素仍保持 80% 以上活性。圖五為其操作穩定性之探討，將酵素與基質連續作用 6 次，發現該固定化酵素仍有 50% 以上之酵素活性。由上觀察，海藻酸鹽之固定化方法似乎為可行方法之一。除此之外，本研究中首度採用 hydroxyapatite 之固定方法，由於本膠體屬於無機膠，於室溫下微生物不容易作用，故具相當大之應用潛力。初步發現，將酵素與 hydroxyapatite 於磷酸鹽 10 mM 濃度下，反應 24 小時，其固定化效果約為海藻酸鹽者之兩倍(圖六、表 2)，其後續之研究目前仍進行中。

### 四、謝辭

感謝本校校長王昭雄博士於研究經費及實驗環境之支持使得實驗得以順利進行。

## 五、參考文獻

- Kuo, J.M. and Pan, B.S. Effect of lipoxygenase on formation of cooked shrimp flavor compound- 5,8,11-tetradecatrien-2-one. *Agric. Biol. Chem.* **1991**, 55, 847-848.
- Kuo, J.M. and Pan, B.S. Occurrence and properties of 12- lipoxygenase in the hemolymph of shrimp (*Penaeus japonicus* Bate) *J. Chinese Biochem. Soc.*, **1992**, 21, 9-16.
- Kuo, J.M., Pan, B.S., Zhang, H. and German, J.B. Identification of 12-lipoxygenase in the hemolymph of tiger shrimp (*Penaeus japonicus* Bate), *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 1620-1623.
- Kuo, J.M., Hwang, A., Hsu, H.H., and Pan, B.S. Preliminary identification of lipoxygenase in algae (*Enteromorpha intestinalis*) for aroma formation, *J. Agric. Food Chem.*, **1996a**, 44, 2073-2077.
- Kuo, J.M., Hwang, A., Hsu, H.H., and Pan, B.S. Identification of lipoxygenase isozymes in marine green algae for aroma formation, Volunteered paper of IFT Meeting on 1996, **1996b**, section No: 80D-18.
- Kuo, J.M., Hwang, A. and Yeh, D.B. 1997 Purification, Substrate Specificity and Products of a  $Ca^{2+}$ -Stimulating Lipoxygenase from Sea Algae (*Ulva lactuca*) *J. Agric. Food Chem.*, 45(6), 2055-2060.
- Kuo, J.M. (郭建民), Lin, A.C. (林安琪), Lin, Y.C. (林雅純), Yuan, L.L. (袁巧玲), Chen, L.S. (陳麗淑) and Wu, C.H. (吳佳慧) 2000 Characterization of lipoxygenase from mung bean seedlings, 第30屆食品科技學會年會論文, Sec. No.: PE-21
- Kuo, J.M. (郭建民), Li, W.F. (李武峰) and Lin, A.C. (林安琪) 2001 Characterization of Hydroperoxide lyase from mung bean seedlings 第31屆食品科技年會論文。
- Kuo, J.M., Hwang, A., Wu, H.C., Chu, H.L. and Yeh, D.B. 2001 Lipoxygenase from Banana Leaf: Purification of an enzyme that catalyzed the oxygenation of linoleic acid at 9-position IFT Annu. Meet., Abstract 44C-2.
- Pan, B.S. and Kuo, J.M. Flavor of shellfish and kamaboko flavorants, In *Seafoods: Chemistry, Processing, Technology and Quality*; F. Shahidi and J.R. Botta Eds.; Blackie Academic & Professional, London, **1994**; pp.85-114 .
- Pan, B.S. and Kuo J.M 2000 Lipoxygenase in Seafood Enzymes edited by Norman F. Haard and Benjamin K. Simpson pp.317-336, Marcel Dekker, Inc , New York.
- Wu, C.M., Kuo, J.M. and Pan, B.S. 2002 Flavor compounds in Chemical and Functional Properties of Food Components edited by Zdzisław E. Sikorski, CRC Press, Boca Raton, Florida (in press).

## Table 1: Purification of lipoxygenase from banana leaf

stage	total activity ( $\mu\text{mole}/\text{min}$ )	total protein (mg)	specific activity ( $\mu\text{mole}/\text{mg}\cdot\text{min}$ )	recovery (%)	purification (fold)
crude extract	498.4	330.20	1.51	100	1.0
25-50 % (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	199.9	63.06	3.17	40.1	2.1
Hydroxyapatite	114.1	3.62	31.52	22.9	20.9
Superdex pg 200 <sup>1</sup>	58.3	0.46	126.74	11.7	83.9
Superdex pg 200 <sup>2</sup>	49.3	0.10	493.01	9.9	326.5

Table 2. Effect of different matrix on the immobilization\* of lipoxygenase from banana leaf.

immobilized matrix	LOX activity (%)
free enzyme	100
sodium alginate	1.61
chitosan	0.27
chitosan+glutadialdehyde	0.65
DEAE Sepharose (fast flow)	0.75
marco-prep 50Q	0.08
hydroxylapatite typeII (Bio-Rad)	3.50
hydroxylapatite (Merck)	3.66

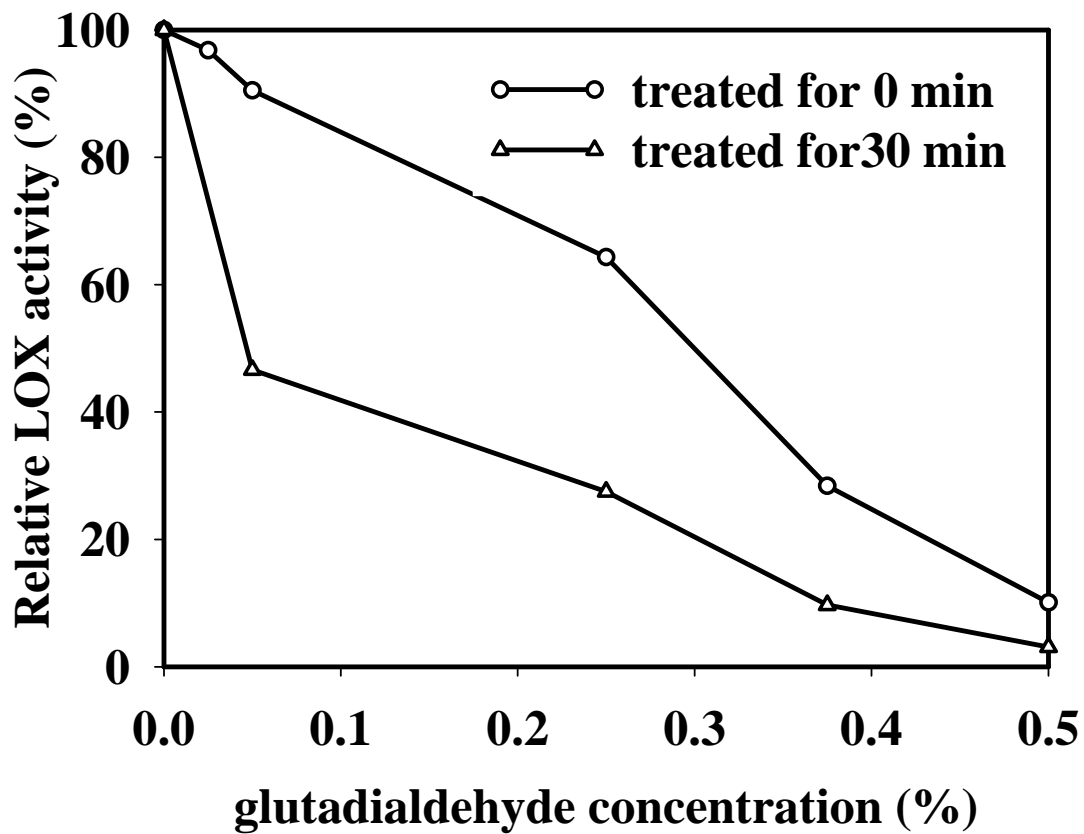
\* Lipoxygenase from banana leaf was treated with different immobilized matrix for 24 h.

Table 3. Effect of different drying methods on the enzyme activity of immobilized lipoxygenase\* from banana leaf.

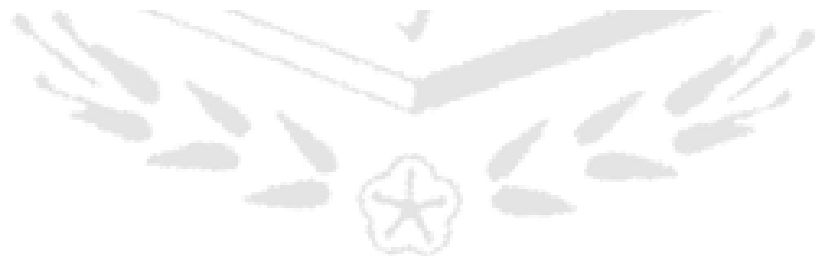
drying methods	LOX activity (%)
control	100
air drying	23
suction drying	30
freeze drying	48

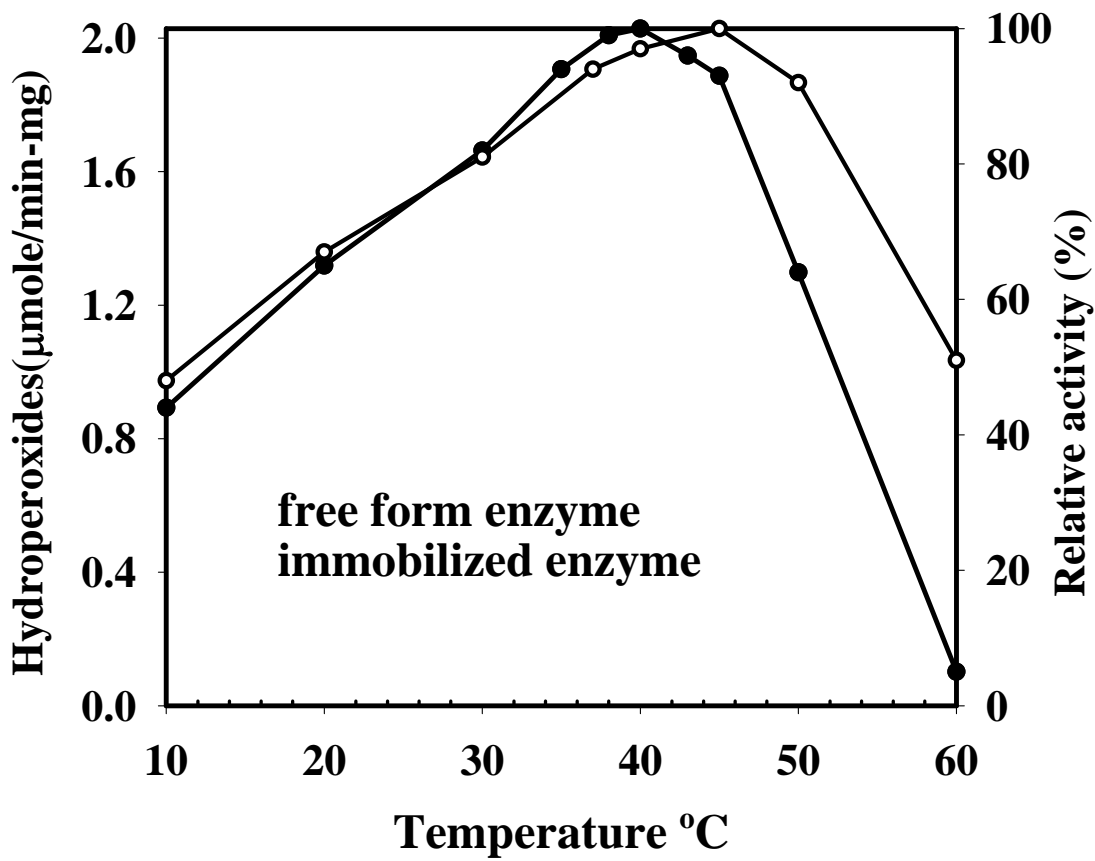
\* The immobilization was performed with sodium alginate method.





**Figure1. Effect of glutadialdehyde concentration on lipoxygenase activity form banana leaf.**

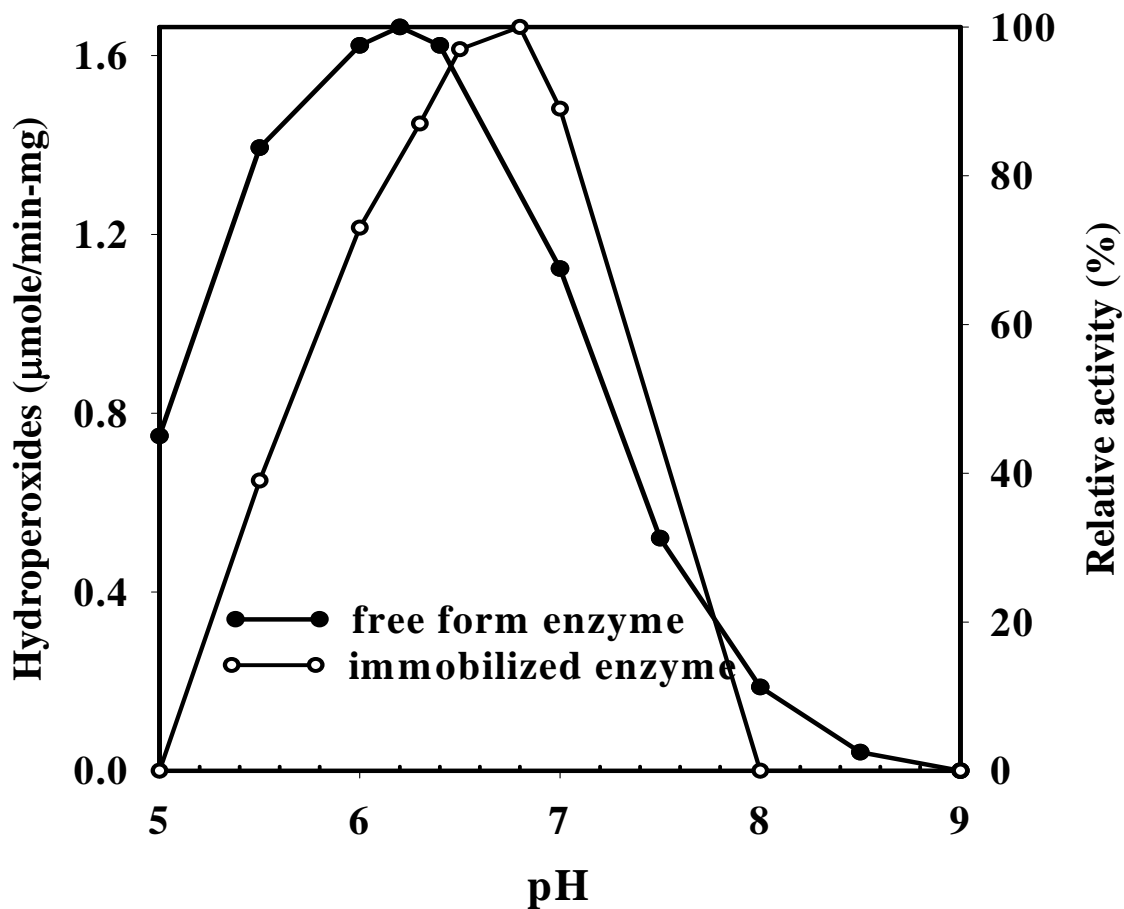




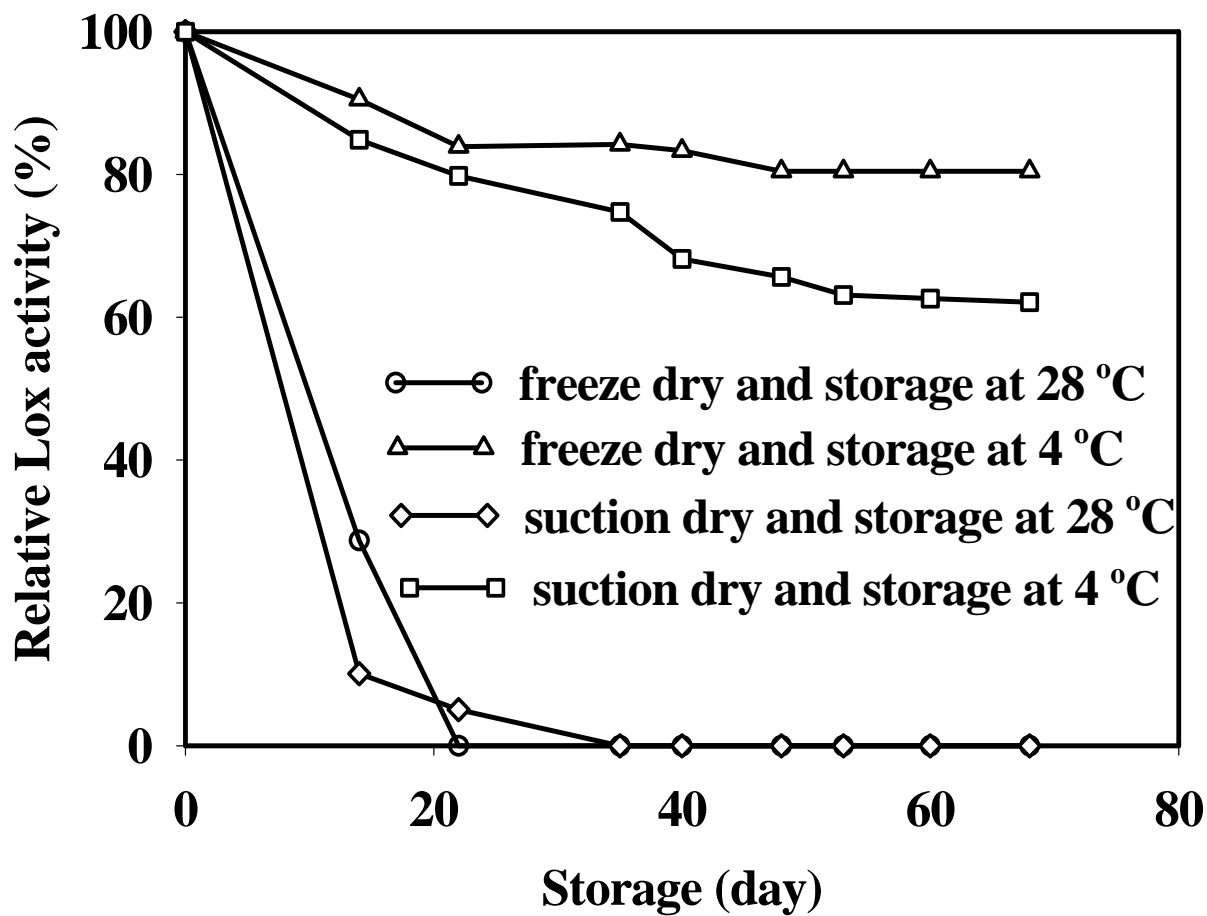
**Fig. 2. Temperature profile of LOX activity from banana leaf. in 0.05M potassium phosphate buffer (pH6.3) containing 0.1 % Triton X-100 using linoleic acid as substrate.**



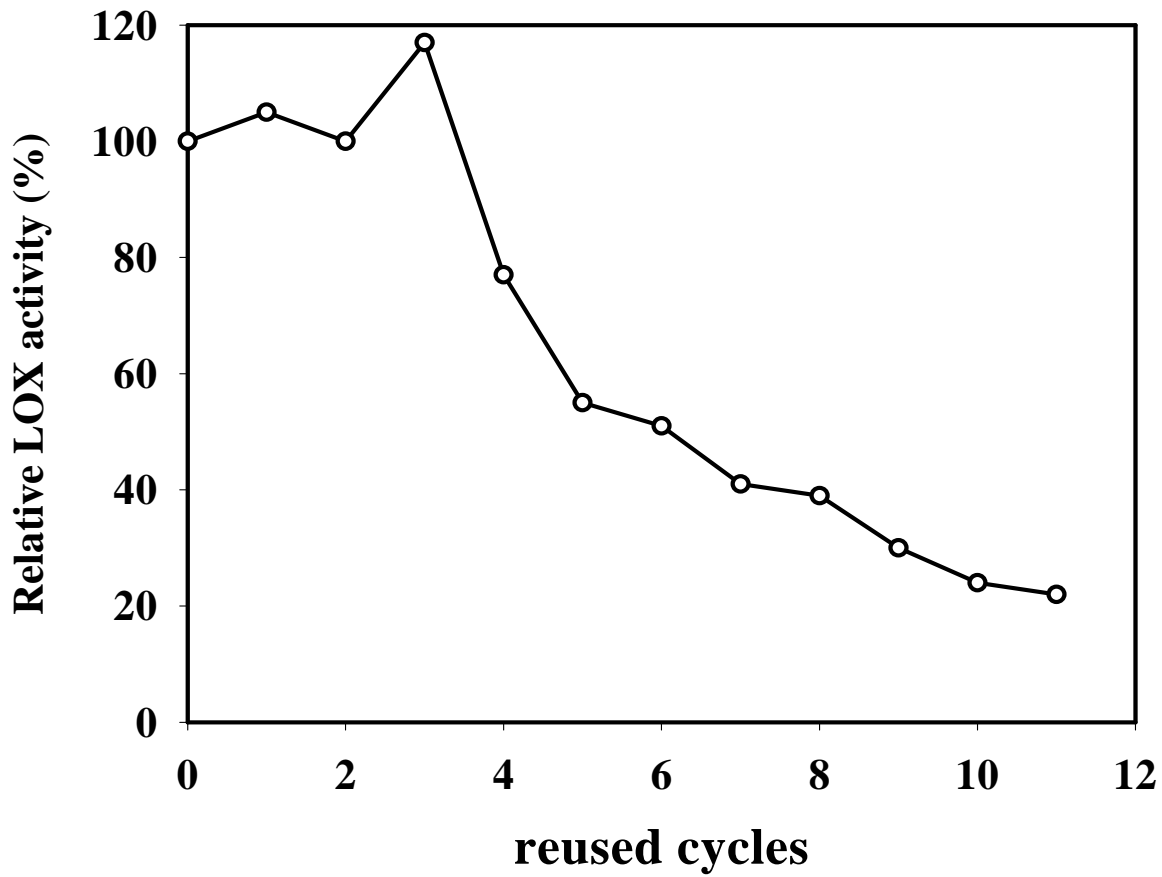




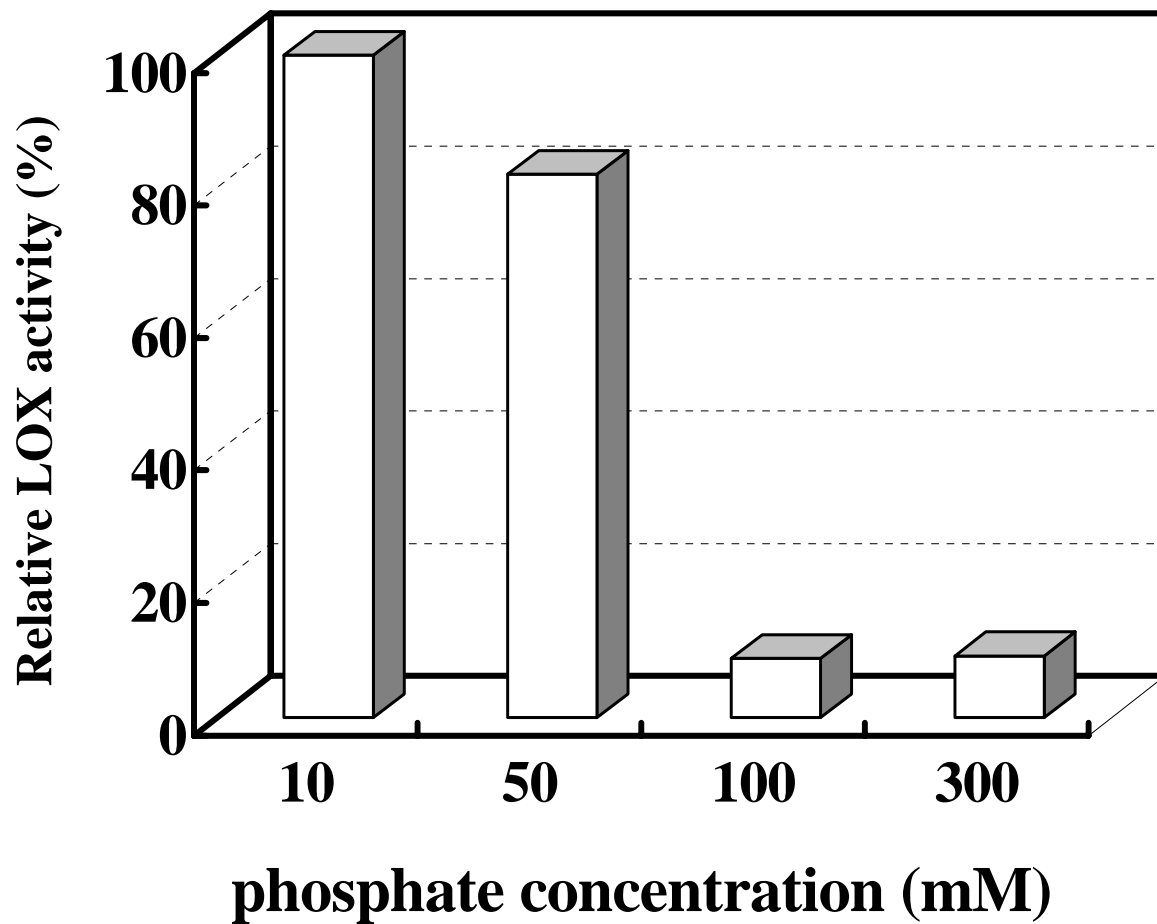
**Fig.3 pH profile of LOX activity from banana leaf. Linoleic acid was used as substrate and reacted at 28 °C for 5 min. The buffer systems included acetate buffer ranged pH 5.0 to 6, phosphate buffer ranged pH 6.5 to 7.5, tris buffer pH 8 and 8.5 and borate buffer pH 9.**



**Figure 4. Storage stability of immobilized lipoxygenase from banana leaf at 28 and 4 °C.**



**Figure 5. Operation stability of immobilized lipoxygenase from banana leaf at 28 °C.**



**Figure6** Effect of phosphate concentration on enzyme activity of immobilized LOX from banana leaf with hydroxyapatite method.