

电场对脂肪酶二级结构及其活性的影响

敖敦格日乐¹, 杨体强², 包斯琴高娃³, 石磊¹

(1. 内蒙古医科大学 计算机信息学院, 内蒙古 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古大学 物理科学与技术学院, 内蒙古 呼和浩特 010021; 3. 内蒙古工业大学 理学院, 内蒙古 呼和浩特 010051)

摘要: 脂肪酶被不同强度的电场处理 5 min, 用红外光谱法研究电场对其二级结构的影响, 并测定酶活性的变化。实验结果显示: 在 1.0~6.0 kV/cm 范围, 电场作用对脂肪酶二级结构单元相对含量的影响程度不同。与对照组相比, 处理组的 α -螺旋和 β -折叠含量普遍减少, 减少幅度分别为 4.9%~10.9% 和 3.2%~22.6%; β -转角和无规卷曲含量普遍增加, 增加幅度分别为 12.5%~37.7% 和 3.1%~24%。并且各种结构的含量在 3.0 kV/cm 电场强度条件下变化最为明显。经电场处理后脂肪酶活性显著增加, 这与 β -转角和无规卷曲含量的增加有一定的相关性。

关键词: 电场; 脂肪酶; 红外光谱; 二级结构; 酶活性

中图分类号: Q 683 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)12—1256—06

Study on the Effect of Electric Field on the Secondary Structure and Activity of Lipase

AO Dungerile¹, YANG Tiqiang², BAO Siqingaowa³, SHI Lei¹

(1. School of Computer and Information, Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010110, China; 2. School of Physical Science and Technology, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China; 3. School of Science, Inner Mongolia University of Technology, Huhhot 010051, China)

Abstract: The changes in the secondary structures and activity of lipase after 5 min treatment using electric field with different strength were studied by FTIR (Fourier-transformation infrared spectroscopy). The effect of electric field on the relative contents of the lipase secondary structures, i.e. α -helix, β -sheet, β -turn and random coil, varied within the range of 1.0 kV/cm to 6.0 kV/cm. Compared with the control groups, the relative contents of α -helix and β -sheet both decreased, namely, 4.9%~10.9% for α -helix and 3.2%~22.6% for β -sheet respectively. The relative contents of β -turn and random coil increased instead, namely, 12.5%~37.7% for β -turn and 3.1%~24% for random coil respectively. The most significant change of the relative contents for different secondary structure was observed at the 3.0 kV/cm electric field, which suggested the lipase activity was greatly improved after treatment by electric field. The improvement of the activity was related to the content increase of β -turn and random coil.

Keywords: electric field, lipase, FTIR, secondary structure, activity

收稿日期: 2014-10-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30260028); 内蒙古自治区重大科技项目(200508010101)。

作者简介: 敖敦格日乐(1980—), 女, 蒙古族, 内蒙古通辽人, 理学硕士, 讲师, 主要从事生物物理学研究。E-mail: adgrl@163.com

脂肪酶(Lipase, EC3. 1. 1.3)是一种单纯蛋白酶,它广泛存在于各种微生物、植物和动物体中。脂肪酶能催化天然油脂(甘油三酯)水解,反应过程中甘油三酯经甘油二酯、单酸甘油酯最终降解为甘油和脂肪酸,是一类特殊的酯键水解酶。脂肪酶作为生物催化剂可催化由不同底物出发的水解和合成反应,且反应不需要辅酶,反应条件温和,副产物少。脂肪酶由于其多重催化功能被广泛应用于食品工业中,如在奶制品的生产、烘焙食品的制作、油脂加工、酒类酿造、肉类加工及食品添加剂的生产等^[1-4]。

脂肪酶的催化特性与其分子空间结构有着密切的联系。理论研究表明,酶蛋白质的空间结构对酶的功能至关重要,即使极其细微的扰乱,也能够极大地影响酶的活性。而且,蛋白质不是刚性分子,它的功能依赖于结构的这种运动性^[5]。已有研究表明,电场处理可使酶的活性发生改变^[6-8],并提出酶活性发生变化的机制可能是电场处理导致酶的静电性质和构象发生改变^[9-10]。

作者所在课题组应用不同电场强度条件处理脂肪酶,并利用 FTIR 光谱法研究了脂肪酶对照组和处理组二级结构含量变化,同时测定了酶活性。初步探讨了电场对酶分子结构和活性的作用机理,并拟为脂肪酶催化功能强化提出新的物理方法。

1 材料与方法

1.1 材料

麦芽脂肪酶,比活力为 10 U/mg,购自美国 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的电场处理 电场处理装置由平板电极形成,极板电压波形为 50 Hz 半波整流。实验中分别取等量脂肪酶样品经电场处理,电场处理条件分别为 $E=1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0$ kV/cm,共 6 个场强处理条件,对照组记为 $E_0=0.0$ kV/cm。电场处理时间 5 min。

1.2.2 红外光谱测试方法 红外光谱测定采用 Nexus™670 傅立叶变换红外光谱仪(Nicolet 公司制)。经不同强度电场处理后的脂肪酶,干燥保存 12 h 后,与 KBr 粉末按 1:100 的质量比均匀混合,取等量压片进行红外光谱测定。红外光谱测试范围为 $400\sim4\,000\text{ cm}^{-1}$,分辨率 4 cm^{-1} ,经 32 次扫描获得红外图谱。

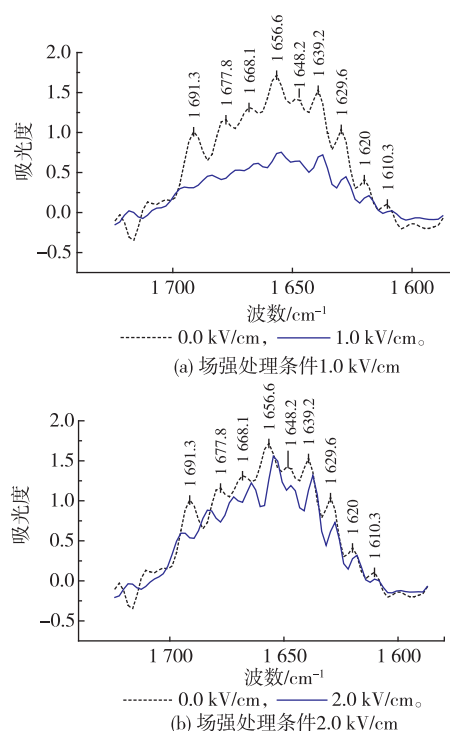
1.2.3 光谱处理 用仪器自带的 OMNIC E.S.P.5.1 软件包对所得红外光谱酰胺 I 带进行两点基线校正,并进行 7 点 Savitsk-Golay 函数平滑处理,再作二阶导数和傅立叶去卷积谱,控制半峰全宽(Band width)18,增强因子(Enhancement factor)2.3。结合二阶导数谱和去卷积谱得到的子峰峰位进行相应的二级结构谱峰指认。根据各子峰的吸收频率,利用 Microsoft origin 数学软件对谱图进行高斯曲线拟合。拟合过程中进行基线校正,多次拟合使残差最小。

1.2.4 活性的测定 活性的测定按参考文献方法^[11]进行。脂肪酶水解油酯为油及游离脂肪酸,用酸碱滴定法滴定生成游离脂肪酸以测定脂肪酶活性。

2 实验结果

2.1 电场对脂肪酶红外图谱的影响

图 1 为脂肪酶酰胺 I 带的去卷积谱。对照组在酰胺 I 存在 8 个子峰,分别为 $1\,691, 1\,678, 1\,668, 1\,656, 1\,648, 1\,638, 1\,629\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,620\text{ cm}^{-1}$ 。与对照组相比,不同电场强度处理对脂肪酶去卷积谱子峰峰位和峰强有不同影响:经电场处理后,脂肪酶酰胺 I 带表现为 9 个子峰, $1\,678\text{ cm}^{-1}$ 峰红移至 $1\,672\text{ cm}^{-1}$, $1\,668\text{ cm}^{-1}$ 蓝移至 $1\,663\text{ cm}^{-1}$,且在 $1\,682\text{ cm}^{-1}$ 附近有新峰; $1\,638, 1\,629\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,691\text{ cm}^{-1}$ 处子峰相对强度明显下降。



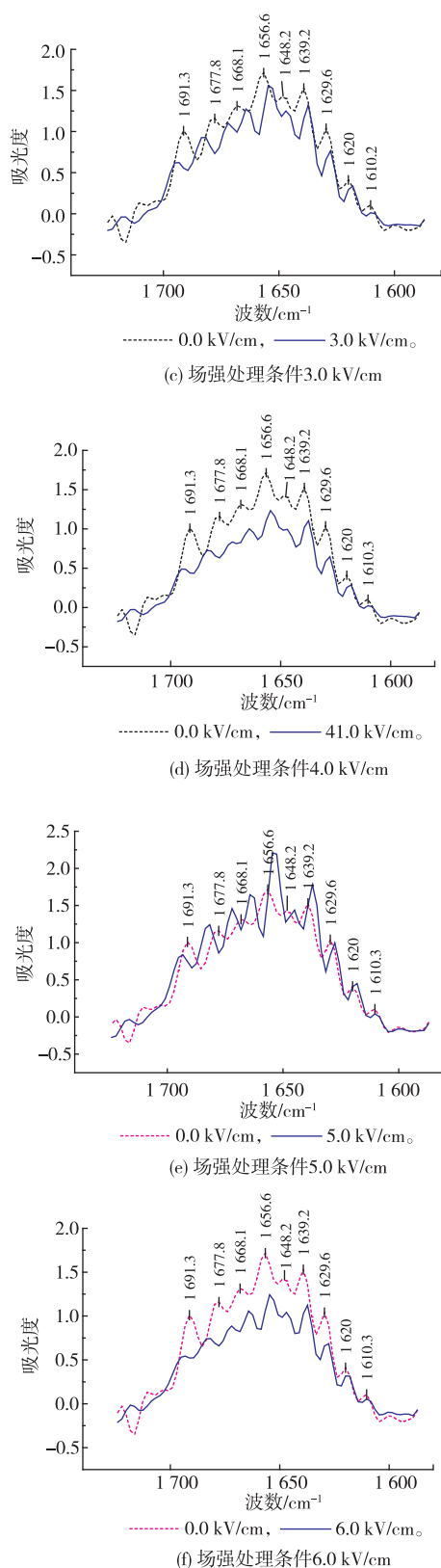


图1 不同电场强度处理对脂肪酶酰胺I带去卷积谱图的影响
Fig. 1 Effects of electric strength on the deconvolved spectra in the amide I region of lipase

2.2 电场对脂肪酶二级结构的影响

按文献报道^[12-15],结合二阶导数谱,可将脂肪酶酰胺I带各子峰归属不同二级结构:(1 656±2)cm⁻¹峰归属为 α -螺旋结构;(1 639±2)、(1 629±2)、(1 620±2)cm⁻¹和(1 691±4)cm⁻¹峰归属为 β -折叠结构;(1 678±2)、(1 667±2)、(1 682±2)cm⁻¹峰归属为 β -转角结构;(1 646±3)cm⁻¹峰归属为无规卷曲结构。从各子峰的相对强度和面积分数估计,脂肪酶二级结构应以 β -折叠结构为主。这与已有报道较为一致^[16-17]。

从脂肪酶去卷积谱的变化情况可以看出,电场处理后脂肪酶的 α -螺旋、 β -折叠的特征峰相对强度均降低,表明其结构含量也降低。在1 682 cm⁻¹附近有新增子峰,表明 β -转角结构含量明显增加。1 647 cm⁻¹峰相对强度增加,表明无规卷曲结构含量的增加。对酰胺I带去卷积谱进行曲线拟合,计算出各电场处理条件下脂肪酶二级结构含量,如表1所示。

表1 不同电场强度处理后的脂肪酶二级结构含量

Table 1 Contents of secondary structures of lipase treated by electric field with different strength

样本	场强/ (kV/cm)	二级结构面积分数/%			
		α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
E_0	0.0	18.3	46.4	25.7	9.6
E_1	1.0	16.3	42.8	29.6	11.3
E_2	2.0	17.3	36.8	34.5	11.3
E_3	3.0	16.8	35.9	35.4	11.9
E_4	4.0	17	37.9	33.6	11.4
E_5	5.0	17.4	38.6	33.3	10.6
E_6	6.0	16.3	44.9	28.9	9.9

图2是脂肪酶在不同电场强度下各二级结构含量相对对照组的变化。与对照组相比,电场处理后:

1) α -螺旋含量降低,降幅在4.9%~10.9%,并且随着电场强度增加,其降幅不同,在1.0、6.0 kV/cm和3.0 kV/cm时降幅较大。

2) β -折叠含量有不同程度减少,降幅在3.2%~22.6%,其中场强为3.0 kV/cm时降幅最大,6.0 kV/cm时降幅最小。

3) β -转角含量大幅度增加,增幅在12.5%~37.7%,其中场强3.0 kV/cm时增幅最大,6.0 kV/cm时增幅最小。

4)电场的作用使无规卷曲含量不同程度的增

加,增幅在 3.1%~24%,其中以 3.0 kV/cm 时增幅最大,6.0 kV/cm 时增幅最小。

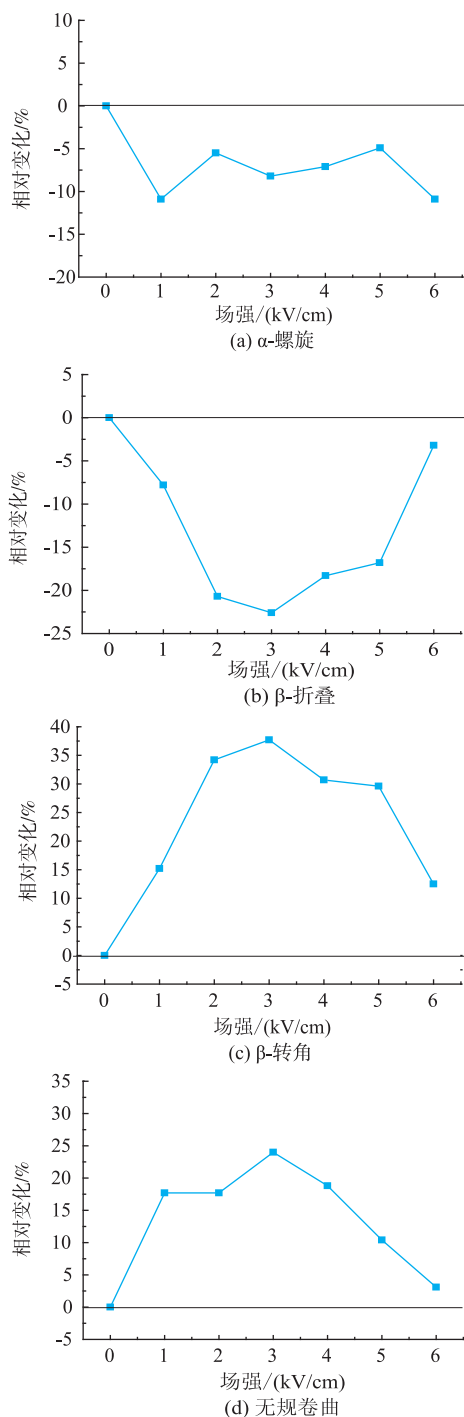


图 2 不同电场强度下脂肪酶二级结构相对变化量

Fig. 2 Relative change of secondary structure content of lipase treated with electric field of different strength

总体而言,脂肪酶经不同电场强度处理后,其二级结构各单元面积分数有不同程度的变化,且其

变化规律呈非单调型变化。电场具有使脂肪酶的二级结构由 α -螺旋、 β -折叠向 β -转角、无规卷曲转化的作用。这与 CD 光谱法研究的结果一致^[18]。

2.3 脂肪酶二级结构与活性变化关系

脂肪酶经不同强度电场处理后,其活性有不同程度的变化。图 3 是处理组相对对照组脂肪酶活性的变化规律。可以看出,经不同电场强度处理后脂肪酶活性都有较大幅度增加,并在 3.0 kV/cm 和 4.0 kV/cm 电场强度条件时活性增加幅度较大。

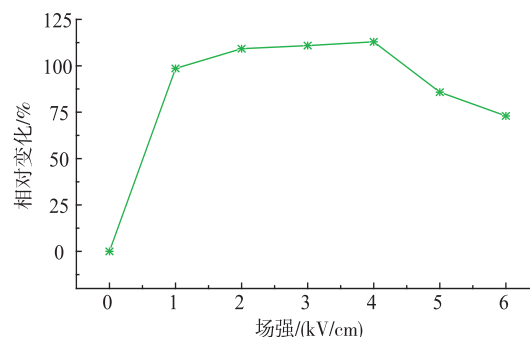


图 3 不同电场强度下脂肪酶活性的相对变化量

Fig. 3 Relative change of lipase activity treated with electric field of different strength

电场处理后脂肪酶相对活性的增加与其二级结构含量的变化有一定的相关性。随着电场强度的增加, α -螺旋和 β -折叠结构的含量变化规律与脂肪酶活性的变化规律呈负相关,而 β -转角和无规卷曲含量变化与酶活性呈正相关。并且在 3.0 kV/cm 场强条件时,脂肪酶结构含量和活性均出现了明显的变化。

3 讨论

蛋白质的二级结构是指多肽链骨架中局部肽段的构象。 α -螺旋和 β -折叠结构中存在较多的氢键,其作用使得规则二级结构具有一定的稳定性和刚性。无规卷曲中氢键只有很弱的作用,使肽段中的各个残基间有更大的自由度,从而表现出极大的柔性。蛋白质分子中 α -螺旋和 β -折叠的稳定性主要取决于分子内部的氢键。电场作用导致脂肪酶二级结构中 α -螺旋与 β -折叠含量减少, β -转角和无规卷曲含量增加。这表明电场的作用影响了脂肪酶蛋白质分子内部的电荷分布,使原有维系其螺旋和折叠结构稳定性的氢键取向发生改变,稳定性降低,柔性加大。除此以外,脂肪酶的催化活性中心是

由Ser-His-Asp/Glu组成的催化三联体结构构成,而催化部位被埋在分子中,表面被对它们起保护作用的 α -螺旋盖状结构覆盖。脂肪酶“盖子”结构不仅影响酶活性,而且影响酶底物的特异性和稳定性。电场作用可能导致了脂肪酶二级结构中 α -螺旋盖状结构被打开,将活性中心暴露出来,从而底物能够更靠近活性中心,催化过程得以进行。

4 结 语

目前,人们对生物大分子的电磁效应研究较为普遍。然而,由于生物大分子的结构和功能的特异

性,对其处理条件、剂量和时效性的研究仍存在不同的意见。作者研究结果表明,50 Hz 高压电场处理脂肪酶 5 min,具有使脂肪酶的二级结构由 α -螺旋、 β -折叠向 β -转角、无规卷曲转化的作用,且对不同结构含量和活性的影响均呈非单调性变化。脂肪酶在 3.0 kV/cm 场强处理条件下表现出其结构含量和活性变化幅度较大。这说明 3.0 kV/cm 电场强度处理条件对脂肪酶催化功能起到了较好的促进作用。因此 3.0 kV/cm 电场强度可作为最佳处理条件。电场处理对蛋白酶时效性的影响还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 刘志东,郭本垣,王荫榆,等. 脂肪酶酶解黄油制备天然乳味增香物的研究[J]. 食品工业科技,2010,31(9):208-210.
LIU Zhidong, GUO Benyuan, WANG Yinyu, et al. Study on hydrolysis of milkfat by lipase for natural flavouring agent [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2010, 31(9):208-210. (in Chinese)
- [2] 谢少梅,郭桦,周雪松. 脂肪酶与预糊化马铃薯变性淀粉对面包抗老化效果的影响[J]. 中国食品添加剂,2013(5):150-155.
XIE Shaomei, GUO Hua, ZHOU Xuesong. Study of lipase and modified potato starch on bread staling [J]. **China Food Additives**, 2013(5):150-155. (in Chinese)
- [3] 韦伟,冯凤琴. sn-1,3 位专一性脂肪酶在食品中的应用[J]. 中国粮油学报,2012,27(2):123-128.
WEI Wei, FENG Fengqin. Application of sn-1,3 specific lipase in food [J]. **Food Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**, 2012, 27(2):123-128. (in Chinese)
- [4] 丁双,杨江科,闫云君. 酶法改良大豆油制备质构脂质的研究[J]. 食品科学,2008(1):173-176.
DING Shuang, YANG Jiangke, YAN Yunjun. Enzymatically modified of soybean oil to produce structured lipids [J]. **Food Science**, 2008(1):173-176. (in Chinese)
- [5] 郝柏林. 理论物理与生命科学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1997:3.
- [6] Vega-Mercado H, Powers J R. Plasmin inactivation with pulsed electric field[J]. **Food Sci**, 1995, 60(5):1143-1146.
- [7] 姚占全,敖敦格日勒,许强,等. 应用圆二色光谱研究电场对淀粉酶二级结构的影响[J]. 分析测试学报,2006,25(4):24-26.
YAO Zhanquan, AO Dungerile, XU Qiang, et al. Study on the effect of electric field on the secondary structure of α -amylase by circular dichroism[J]. **Journal of Instrumental Analysis**, 2006, 25(4):24-26. (in Chinese)
- [8] Giner J, Grouberman P, Gimeno V, et al. Reduction of pectinesterase activity in a commercial enzyme preparation by pulsed electric fields: comparison of inactivation kinetic models [J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2005, 85(10):1613-1621.
- [9] 李祥,陈树德,王丽英,等. 荧光光谱法研究低频脉冲电场对胰岛素分子的作用[J]. 光谱学与光谱分析,2001,21(3):406-408.
LI Xiang, CHEN Shude, WANG Liying, et al. Effects of low frequency pulsed electric field on insulin studied by fluorescent spectrum[J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, 2001, 21(3):406-408. (in Chinese)
- [10] 何熙,胡飞. 高压电场对毛霉蛋白酶活力的影响及应用用于腐乳催熟[J]. 无锡轻工大学学报,2003,22(4):65-68.
HE Xi, HU Fei. Study on mucor protease activity change and furu aging acceleration by high voltage electric field[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2003, 22(4):65-68. (in Chinese)
- [11] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2004:146.
- [12] Byler D M, Brouille J N, Susi H. Quantitative studies of protein structure by FTIR spectra deconvolution and curve-fitting[J]. **Spectroscopy**, 1986, 1(3):29-32.
- [13] Hollosi M, Majer Z, Ronai A Z, et al. CD and fourier-transform IR spectroscopic studies of peptides. II. detection of beta-turns in linear peptides[J]. **Biopolymers**, 1994, 34:177-185.
- [14] DONG Aichun, James Matsuura S, Allison Dean, et al. Infrared and Circular dichroism spectroscopic characterization of

- structural differences between lactoglobulin A and B^{*}[J]. *Biochemistry*, 1996, 35: 1450-1457.
- [15] 卞为东,孙素琴,黄岳顺,等. FTIR 光谱法研究天花粉蛋白的热去折叠过程[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(4): 471-473.
BIAN Weidong, SUN Suqin, HUANG Yueshun, et al. Study on thermal unfolding process of trichosanthin by FTIR Spectroscopy [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2000, 20(4): 471-473. (in Chinese)
- [16] 李正强,陶艳春,沈家骢. 脂肪酶结构与功能关系的 FT-IR 研究[J]. 光散射学报, 1999, 11(4): 338-341.
LI Zhengqiang, TAO Chunyan, SHEN Jiacong. The structure and function studies of lipase using FTIR[J]. *The Journal of Light Scattering*, 1999, 11(4): 338-341. (in Chinese)
- [17] 杨红,高修功,曹淑桂,等. 用傅立叶变换红外光谱研究有机溶剂对脂肪酶构象的影响[J]. 无锡轻工大学学报, 1997, 16(2): 42-46.
YANG Hong, GAO Xiugong, CAO Shugui, et al. Conformation studies of lipase in nonaqueous solvents by fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 1997, 16(2): 42-46. (in Chinese)
- [18] 姚占全,敖敦格日勒,许强,等. 应用圆二色光谱研究电场对脂肪酶二级结构的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(12): 2311-2314.
YAO Zhanquan, AO Dungerile, XU Qiang, et al. Study on the effect of electric field on the secondary structure of lipase by circular dichroism[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, 26(12): 2311-2314. (in Chinese)

科技信息

美国 FDA 征询对食品标签中使用“天然”术语的意见

2015 年 11 月 10 日,美国 FDA 官网消息,因为食品配料和食品生产不断变化,以及消费者要求 FDA 研究如何使用术语“天然”(natural)的请求,FDA 正向公众征求对食品标签上使用该术语的信息和意见。

FDA 收到 4 位公民的请求,3 位要求 FDA 对食品标签中术语“天然”进行定义,1 位要求 FDA 禁止在食品标签中使用“天然”一词。一些联邦法院在诉讼中也曾要求 FDA 澄清是否含有转基因配料的食品或含有高果糖浆的食品可以标示为“天然”。

虽然 FDA 没有制定规则确立术语“天然”的正式定义,但确实有长期的政策有关食品标签中“天然”术语的使用。FDA 认为,“天然”意味着没有添加任何人造或合成的东西(包括所有色素,不论其来源)。但是,该政策没有解决食品生产方法的问题,例如农药的使用,也没有解决食品加工和制造的问题,例如热处理技术、巴氏消毒或辐照。FDA 也没有考虑到是否术语“天然”应该描述营养或其他健康益处。

FDA 特别希望得到有关以下问题的信息和意见:

对术语“天然”进行定义是否合适?

如果是,要如何定义“天然”?

要如何定义食品标签中该术语的合理使用?

[信息来源]厦门 WTO 工作站. 美国 FDA 征询对食品标签中使用“天然”术语的意见 [EB/OL]. (2015-11-13). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=50198>