

## 脉冲电场对木瓜蛋白酶影响的荧光光谱分析

曾新安, 于淑娟, 徐娅莉

华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640

**摘要** 木瓜蛋白酶溶液在电场强度为  $50 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 频率  $1500 \text{ Hz}$ , 脉冲宽度  $40 \mu\text{s}$  的脉冲电场下接受  $19800$  个脉冲处理后, 其活性降低了  $56.5\%$ 。文章采用荧光偏光光谱对处理前后的样品进行了分析。处理后酶样的荧光强度明显大于处理前, 在峰值位置其荧光强度增加超过  $50\%$ , 峰位从  $342 \text{ nm}$  移到了  $346 \text{ nm}$  左右, 其荧光偏振幅度明显减小。由此推断出木瓜蛋白酶经脉冲电场处理后酶蛋白的  $\alpha$ -螺旋结构松散拉伸, 分子内部的氨基酸残基暴露于分子表面, 并有部分发生离解游离于溶液中, 导致活性部位的结构发生变化, 最终导致酶失活。

**关键词** 脉冲电场; 木瓜蛋白酶; 酶活; 荧光光谱

**中图分类号**: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2007)12-2558-04

### 引言

高强脉冲电场处理技术(pulsed electric field, 简称 PEF)是近 10 多年来涌现的一种非热灭菌技术。随着科技的进步和受关注程度的日益提高, 其基础和应用技术研究越来越深入和广泛<sup>[1-3]</sup>。目前, 该领域研究主要集中在脉冲电场的产生技术及其处理器的设计和系统能量变化<sup>[4, 5]</sup>, PEF 对各种微生物的致死作用及与其他杀菌剂的协同作用<sup>[6]</sup>, PEF 处理对食品等待处理物质的营养、风味和感观的影响等方面<sup>[7]</sup>。

酶是一种蛋白质, 存在于新鲜的食物中, 如果汁、乳品、蔬菜及鲜肉、鱼和蛋中均含有一定数量的酶。在人们摄入的酶中, 不仅有动物和植物来源的酶, 而且还有微生物来源的酶。在发酵和腌制食品中, 例如干酪、酸奶、啤酒和腌黄瓜中, 就含有微生物来源的酶。酶对食品质量影响很大, 直接影响到食品的感官特性、理化指标及卫生要求等。对大多数果蔬汁、乳制品等来说, 在制成成品前除了需要进行灭菌外, 也必须将其中的过氧化物酶、脂肪酶、蛋白酶等酶类进行钝化以保持产品质量稳定。本课题组曾研究了不同电场强度、温度和频率的 PEF 处理对过氧化物酶、脂肪酶和木瓜蛋白酶的活性影响规律<sup>[8]</sup>。

高强脉冲电场对酶活性能够产生不同程度的影响, 但由于酶活性影响与诸多因素有关, 如 PEF 处理条件、酶的种类、溶液环境等。目前, 酶在脉冲电场作用下的失活机理还

不是很清楚。不同电场参数的脉冲处理设备或不同环境的酶溶液都可能导致脉冲电场对酶活性影响产生差异, 出现不同的实验结果, 由此导致针对其作用机理还存在较多争议。总的归纳起来存在两种观点: 一种观点认为, 脉冲电场影响或破坏了酶原有的自身结构, 如蛋白质螺旋解体、蛋白质变性等而引起失活; 另一种观点认为, 强脉冲电场直接影响酶的活性部位, 可能破坏了酶与底物结合的部位, 增大或改变了酶的活性部位, 从而导致酶的活性发生变化<sup>[9, 10]</sup>。还有少量的研究者质疑酶活的影响或许就是热效应所致<sup>[11]</sup>。本文以木瓜蛋白酶为对象, 以荧光光谱为检测手段研究了 PEF 处理后木瓜蛋白酶的结构变化。

### 1 试液与主要仪器设备

**木瓜蛋白酶样**: 样品用  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 L-半胱氨酸盐溶解, 稀释成  $1 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 缓慢萃取  $30 \text{ min}$ , 再经过透析去除半胱氨酸盐。

**底物溶液**: 称取  $10 \text{ g}$  酪蛋白溶于  $500 \text{ mL}$   $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液中, 沸水浴  $30 \text{ min}$ , 不断搅拌, 冷却至室温后, 用  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的柠檬酸调 pH 至  $6.0$ , 最后用蒸馏水定容至  $1000 \text{ mL}$ 。

**荧光偏光光谱仪**: 日本日立公司 F-4500 型, 测定波长  $200 \sim 730 \text{ nm}$ , 分辨率  $1 \text{ nm}$ 。还有电场处理设备。

收稿日期: 2006-08-08, 修订日期: 2006-11-26

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划课题项目(2006BAD05A02)和广东省自然科学基金项目(04020063)资助

作者简介: 曾新安, 1972 年生, 华南理工大学轻工与食品学院副教授 e-mail: xazeng@scut.edu.cn

## 2 实验方法

### 2.1 电场处理

将配制好的酶样以  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速通过连续式脉冲电场处理装置进行电场处理。电场处理设备同文献[8]。处理条件: 场强  $E=50 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 频率  $f=1500 \text{ Hz}$ , 脉冲宽度为  $40 \mu\text{s}$ , 在此流速下酶样接受处理的脉冲个数为 19800 个, 样品经过处理器的时间为 792 ms。

### 2.2 荧光检测

将未处理和处理后的酶样放入  $1 \text{ cm}$  光径的石英比色皿中, 放入荧光偏光光谱仪中进行荧光比色和荧光偏振比色测定, 仪器自动扫描找出其最大吸收波长, 分别测其激发光谱和发射光谱, 并测两种样品的偏振荧光光谱。

## 3 结果与讨论

### 3.1 木瓜蛋白酶活性变化

在本实验条件下, 经过 PEF 处理后木瓜蛋白酶的活性下降了 56.5%。电场强度增大, 处理脉冲个数增加均可导致酶活性的进一步降低<sup>[8]</sup>。

### 3.2 荧光比色结果分析

荧光光谱法是研究水溶液中蛋白质分子构象的一种新方法<sup>[12]</sup>。由于其本身具有灵敏度高, 选择性好和多样性的特点, 使得其在各领域发挥越来越重要的作用。利用该法研究蛋白质在水溶液中的构象有两条途径: 其一是测定蛋白质分子自身的荧光; 其二是向蛋白质分子的特殊部位, 引入荧光探针剂测定其荧光<sup>[13]</sup>。在蛋白质分子中, 能发射荧光的氨基酸的只有色氨酸 Trp, 酪氨酸 Tyr 及苯丙氨酸 Phe。个别蛋白质分子含有的黄素腺嘌呤二核苷酸 FAD 亦能发射荧光。其中, Trp 的荧光强度最大, Phe 的荧光强度很小。因此, 蛋白质内源性荧光主要是由 Trp 和 Tyr 所发射的。其发射峰位通常在  $325 \sim 350 \text{ nm}$  之间<sup>[9, 10]</sup>。

在木瓜蛋白酶中, 三种氨基酸 (Trp, Tyr, Phe) 都存在, 因此无需引入荧光探测剂, 可直接进行荧光分析。

图 1 和图 2 分别显示的是两种酶样的激发光谱和发射光谱。由图 1 可知, 两种酶样的激发波长都在  $280 \text{ nm}$  左右, 基

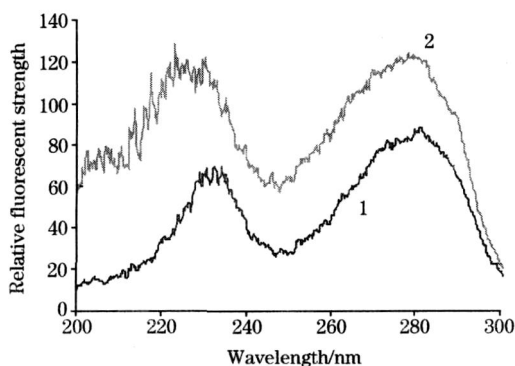


Fig 1 Fluorescence excitation spectra of papain

1: Control; 2: PEF treated

本相同。但处理后的酶样 2 的荧光强度要明显大于处理前的酶样 1, 在峰值位置处理样的荧光强度增加值超过 50%。由此可见, 处理前后, 酶蛋白的结构发生了变化, 可能是蛋白链发生了断裂或者分解, 导致游离出来的荧光氨基酸含量大增。

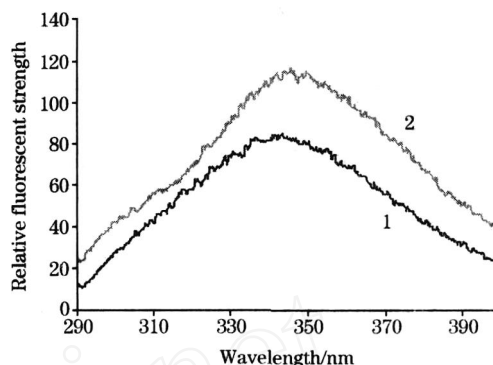


Fig 2 Fluorescence emission spectra of papain

1: Control; 2: PEF treated

由图 2 木瓜蛋白酶的荧光发射光谱图可知, 处理后的酶样在荧光强度明显增加的同时, 峰位也发生了红移, 从  $342 \text{ nm}$  左右移到了  $346 \text{ nm}$  左右。由于蛋白质位于极性溶剂水中, 发生红移可能是更多的 Trp 残基从蛋白质分子内部的疏水区暴露到蛋白质分子表面亲水区域。此时, 蛋白质螺旋结构伸展开来, 整个三维结构发生变化, 从而导致酶蛋白变性失活。

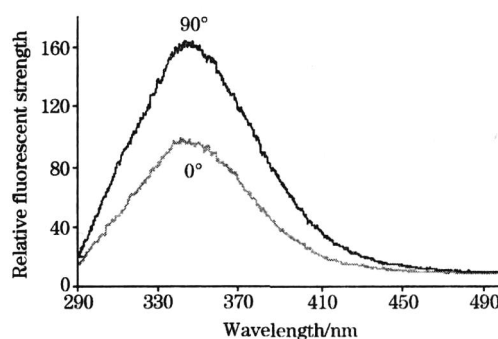


Fig 3 Fluorescence polarization spectra of untreated papain

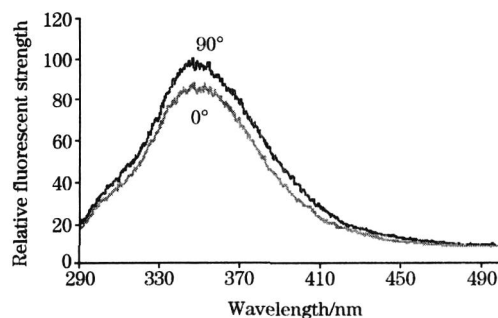


Fig 4 Fluorescence polarization spectra of papain treated by PEF

### 3.3 荧光偏振比色分析

为进一步了解 Trp 和 Tyr 的微环境变化情况,运用荧光偏振的方法来验证蛋白质分子结构的变化。荧光偏振技术是在荧光光谱的发展下完善起来的,在荧光光度计上增添两个偏振滤片装置,即可进行偏振光谱分析。将偏振角度从 0 调至 90°,激发和发射波长不变,测其荧光光谱。结果如图 3 和图 4 所示。

荧光偏振度与荧光强度所反应的微环境的特征性质不一样。荧光强度变化主要反应的是环境介质中荧光物质所处微环境的猝灭因素;荧光偏振度通常反应的是蛋白分子所处微环境中的去偏因素的变化。所以荧光偏振度的测量可以进一步了解蛋白质构象的变化。

从图 3 和图 4 可以看出,处理后的酶样其荧光偏振幅度明显减小。荧光偏振度越大,则荧光物质在微环境中的流动

性就越小,反之,则越大。因此荧光偏振强度的降低可能与酶蛋白分子的离解有关,酶蛋白在电场作用下发生离解,分子变小,使其在溶液中的旋转速度加快,偏振强度降低。这与以前所研究的游离氨基酸增加的实验结果相吻合<sup>[14]</sup>。结合荧光发射光谱分析,脉冲电场处理后,酶蛋白发生小部分的离解,氢键断裂而导致肽链的螺旋结构拉伸松散,位于分子内部的氨基酸残基暴露到分子外部,蛋白三维结构发生变化。活性部位的氨基酸残基也发生离解,导致活性巯基数量减少,最终导致酶的活性降低。作者认为,脉冲电场对酶的影响是由整体到局部的一个过渡阶段,即由于电场作用而导致酶在溶液中紧密的三维结构发生变化,从而导致酶的活性部位的构象也发生了变化,引起了酶的失活,而不是直接作用于活性部位产生的结果。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Knorr D, Heinz V. Development of Nonthermal Methods for Microbial Control. In S. S. Block (Ed.), Disinfection, Sterilization, and Preservation). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 853, 877.
- [ 2 ] ZENG Xin-an, ZHANG Ben-shan, GENG Yu-huan(曾新安, 张本山, 耿予欢). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(1): 29.
- [ 3 ] ZENG Xin-an, FU Xiong, LI Guo-ji, et al(曾新安, 扶 雄, 李国基, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(6): 748.
- [ 4 ] Van den Bosch H F M, Morshuis P H F, Smit J J. Proceedings of the IEEE Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena, 2001. 552.
- [ 5 ] Zhang Q H, Barbosa-Canovas G V, Swanson B G. Journal Food Engineering, 1995, 25: 261.
- [ 6 ] Mara L Calderon-Miranda, Gustavo V Barbosa-Canovas, Barry G Swanson. International Journal of Food Microbiology, 1995, 51: 7.
- [ 7 ] ZHANG Ying, ZENG Xin-an, ZHU Si-ming(张 鹰, 曾新安, 朱思明). Food Technology(食品科技), 2004, (3): 12.
- [ 8 ] XU Ya-li, ZENG Xin-an, YU Shu-juan(徐娅莉, 曾新安, 于淑娟). High Voltage Engineering(高电压技术), 2005, 31(12): 39.
- [ 9 ] Ho S Y, Mittal G S, Cross J D. Journal of Food Engineering, 1997, 31(1): 69.
- [ 10 ] Van Loey A, Verachtert B, Hendrickx M. Trends in Food Science and Technology, 2002, 12: 94.
- [ 11 ] Vega-Mercado H, Powers J R, Barbosa-Canovas G V, et al. Journal of Food Science, 1995, 60: 1143.
- [ 12 ] WANG Gui-hua, TAN Bing-he(王桂华, 谭秉和). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(2): 328.
- [ 13 ] GU Song-hai, SONG Yi, LI Xu-hui(谷松海, 宋 义, 李旭辉). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(3): 400.
- [ 14 ] Masatsugu Ken, Itoh Hiroshi. Regulatory Peptides, 2003, 111(3): 13.

## Fluorescence Spectra Analysis of Papain Treated by Pulsed Electric Field

ZENG Xin-an, YU Shurjuan, XU Ya-li

College of Light Industry and Food Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

**Abstract** Tryptophane, tyrosine and phenylalanine are three kinds of fluorescent amino acids and exist in papain, so the structure change of papain can be measured by fluorescence spectra analysis without exterior fluorescence probe. Fluorescence excitation spectrum, emission spectrum and polarization spectrum were used to analyze the possible mechanisms of papain's activity change after being treated by pulsed electric field (PEF). Results demonstrated that the relative activity of papain was decreased by 56.5% after PEF treatment under the condition of electric field strength  $50 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ , frequency 1500 Hz, pulse width 40  $\mu\text{s}$  and pulse number 19800. The spectra of fluorescence excitation showed that the relative fluorescence strength of the treated sample was distinctly higher than the untreated one, even at peak position (280 nm) which was 80 and 120 for untreated and treated samples, respectively. The peak position in the fluorescence emission spectrum of treated sample was shifted from the original 342 nm to about 346 nm, and its fluorescence polarization degree was much smaller compared to the untreated sample. These phenomena indicated that the  $\alpha$ -helix structure of papain was loosened or broken down after being treated by PEF. This treatment made the amino acid's residue exposed from inside to outside, and even some fluorescent amino acids such as tryptophane, tyrosine and phenylalanine were decomposed from the  $\alpha$ -helix structure of protein and went into the solution which helped increase the fluorescent strength. This effect led to the active site change of the enzyme and finally inactivated it.

**Keywords** Pulsed electric field; Papain; Activity of enzyme; Fluorescence spectrum

(Received Aug. 8, 2006; accepted Nov. 16, 2006)