

## 岩藻多糖酶的 FTIR 光谱研究

马爽<sup>1,2</sup>, 肖厚荣<sup>2</sup>, 吴茜茜<sup>2</sup>, 潘仁瑞<sup>2</sup>, 蔡敬民<sup>1,2\*</sup>

1. 安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036

2. 合肥学院生物与环境工程系, 安徽 合肥 230022

**摘要** 通过海洋真菌 LD8 固态发酵获得岩藻多糖的粗蛋白, 并进一步采用柠檬酸缓冲液浸提、丙酮沉淀和葡聚糖凝胶 G-100 层析, 分离纯化至单一组分; 利用傅里叶变换红外光谱 (fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 及曲线拟合等技术研究了岩藻多糖酶的二级结构组成, 增强因子为 2.2, 半峰宽为 20.2  $\text{cm}^{-1}$ ; 为提高分析测定的准确性, 对酰胺带与酰胺带分别进行拟合归属。结果表明: 根据酰胺带所获得的二级结构,  $\alpha$ -螺旋占 11.5%,  $\beta$ -折叠为 58.6%, 无规卷曲 14.5%,  $\gamma$ -转角 15.9%; 酰胺带所得二级结构,  $\alpha$ -螺旋含 12%,  $\beta$ -折叠含 57.3%, 无规卷曲含 14.5%,  $\gamma$ -转角含 16.3%。由此可见, 酰胺带与酰胺带所以对二级结构的分析是十分吻合的。在室温下, 岩藻多糖酶的二级结构以  $\beta$ -折叠的含量占优势, 约占 58%,  $\gamma$ -转角和无规卷曲次之, 各占 15% 左右,  $\alpha$ -螺旋含量较低, 仅占 12%。

**关键词** 岩藻多糖酶; 傅里叶变换红外光谱; 二级结构

**中图分类号**: Q743 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2008)03-0590-04

### 引言

分子量在一定范围内的岩藻多糖具有特殊的生理功能, 主要表现为抗病毒作用, 可以阻止 HIV 病毒侵入寄主细胞, 此外还具有抗凝血、抗高血脂、抗肿瘤等重要作用。一般情况下, 天然岩藻多糖经降解后得到的低分子量岩藻多糖具有更强的生理活性<sup>[1-5]</sup>。目前低分子量岩藻多糖主要是通过化学水解方法来获得, 其缺点是所得低分子量岩藻多糖的聚合度大小不一, 纯化难度大, 效率低; 而利用酶法降解则是另一种正在积极探索的途径, 岩藻多糖酶可部分降解岩藻多糖得到低分子量组分。因此, 对岩藻多糖酶的研究具有十分重要的意义。

蛋白质的特定生理活性在很大程度上由其构象决定<sup>[6,7]</sup>。研究蛋白质分子构象的方法很多, 如: 圆二色谱法、X 射线衍射法、红外光谱法、核磁共振法等, 它们各有优缺点<sup>[8]</sup>。X 射线衍射法需得到蛋白质的单晶体, 这往往是非常困难的; 核磁共振技术只能测定分子量小于 15 000 同状态, 不同浓度及不同环境中蛋白质和多肽<sup>[9]</sup>。各种红外光谱实验技术的发展, 为研究蛋白质及多肽的结构与功能的关系提供了有力手段。蛋白质的二级结构与其分子内形成的不同氢键

类型密切相关, 傅里叶变换红外光谱技术是研究氢键的有力手段<sup>[10,11]</sup>。它可以在各种环境条件下得到几乎所有生物物质的红外光谱图。此外, FTIR 还具有样品用量少, 蛋白质分子的大小几乎无影响, 没有光散射和荧光的影响及使动力学性质的研究成为可能等优点, 容易得到高质量的图谱。本文采用 FTIR 研究岩藻多糖酶的二级结构, 尚未见这方面的文献报道。

### 1 实验部分

#### 1.1 试剂和仪器

海洋真菌 LD-8 分离于德国北海海沙中; 聚丙烯酰胺, 甲叉丙烯酰胺, 均购于上海生工生物工程有限公司; Sephadex G-100 为 Pharmacia 公司产品; 其余化学试剂都是分析纯。岩藻多糖酶由本实验室制备。

752 型紫外-可见分光光度计 (上海光谱仪器股份有限公司); LG-10 冷冻干燥机 (北京四环科学仪器厂); Z 型系列层析柱 (上海锦华实验器械厂); V16 夹心式垂直电泳槽 (上海精益有机玻璃制品仪器厂); DYA 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); MAGNA-IR750 傅里叶红外光谱仪 (美国热电尼高力公司 INCOLET INSTRUMENT W. S. A.)。

收稿日期: 2006-11-10, 修订日期: 2007-02-20

基金项目: 教育部留学回国人员启动基金项目, 安徽省优秀青年科技基金项目 (04043051), 安徽省教育厅自然科学基金项目 (2006 KJ189B) 和国家自然科学基金项目 (30270321) 资助

作者简介: 马爽, 女, 1980 年生, 安徽农业大学微生物专业硕士研究生 \* 通讯联系人 e-mail: caijingmin@hfuu.edu.cn

### 1.2 岩藻多糖酶的制备

岩藻多糖酶的制备按文献[12]进行。发酵液粗酶液 - 20 预冷的丙酮(至丙酮终浓度 50%) 静置 4 000 rpm 离心 10 min 沉淀 柠檬酸缓冲液(pH 6.0)复溶 10 000 rpm 离心 10 min 上清液 Sephadex G100 层析柱纯度鉴定。

### 1.3 傅里叶红外变换光谱及数据处理

将岩藻多糖酶加入到干燥的 KBr 晶体粉末中, 压片后再转移至窗片中央直接测定。样品测定前先用 KBr 晶体粉末做空白实验测定, 样品实测的 FTIR 均需扣去空白峰, 以消除空气中水汽影响。分辨率: 4 cm<sup>-1</sup>, 扫描次数: 32 次, 增强因子: 1.8, 半峰宽: 20.2 cm<sup>-1</sup>, 观察 1 500 ~ 2 200 cm<sup>-1</sup> 波段水汽吸收最小并不再发生变化时收集样品光谱。根据 FTIR 谱确定酰胺带和酰胺带的各子峰位置。

利用软件 Peakfit4.2 得到二阶导数谱和去卷积谱, 在二阶导数谱指导下, 应用 Origin7.5 软件对酰胺带和酰胺带去卷积图谱进行高斯曲线拟合, 对峰位、峰高、峰宽、高斯比值等参数反复进行非线性回归, 找出各结构成分与各子峰的对应关系, 求出各子峰的积分面积, 从而定量计算出蛋白质的二级结构。

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 纯度检验

所获得的岩藻多糖酶在 PAGE 电泳上呈现一条带, 表明其已达到单一组分。

### 2.2 岩藻多糖酶的 FTIR 谱

图 1 为天然岩藻多糖酶 FTIR 谱, 参考有关文献<sup>[13]</sup>, 对

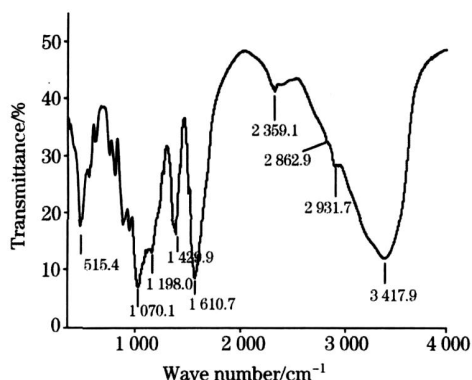


Fig 1 FTIR spectrum of fucoidanase

Table 1 Peak positions and their attribution for fucoidanase in FTIR

红外吸收峰频率/cm <sup>-1</sup>	归属
3 417.9	N-H
2 931.7, 2 862.9	C-H
1 610.7	酰胺 C-O, N-H
1 429.9	O-H, C-C
1 198.0	C-O, C-N
1 070.1	C-O

各子峰产生的原因进行了分析和归属, 结果见表 1。

### 2.3 岩藻多糖酶酰胺带的拟合结果分析

目前对于酰胺带的谱峰归属比较成熟, 二级结构与子峰的对应关系如下: 1 600 ~ 1 640 cm<sup>-1</sup> -折叠; 1 640 ~ 1 650 cm<sup>-1</sup> 为无规卷曲; 1 650 ~ 1 658 cm<sup>-1</sup> 为 -螺旋; 1 660 ~ 1 695 cm<sup>-1</sup> 为 -转角<sup>[14, 15]</sup>。为精确确定各子峰的位置, 对原谱进行去卷积和二阶导数处理, 结果见图 2。根据子峰与二级结构的对应关系, 进一步对各子峰进行拟合, 结果见图 3。表 2 给出岩藻多糖酶天然状态下酰胺带各子峰的归属, 表中数据为 3 次测定结果的平均值。

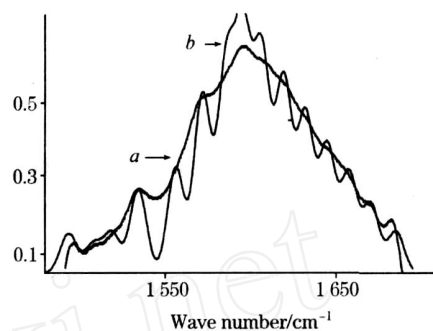


Fig. 2 FTIR spectra of fucoidanase in the amide I region  
a: Deconvoluted spectra; b: Second-derivative spectra

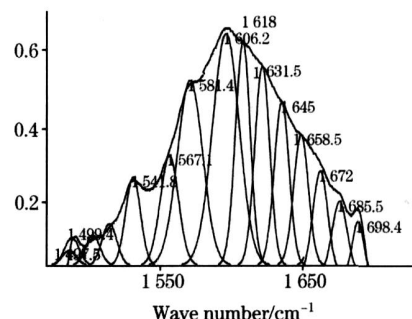


Fig. 3 Gaussian fitting to the deconvoluted spectra of fucoidanase in amide I region

Table 2 Results of gaussian fitting of fucoidanase in amide region

峰位/cm <sup>-1</sup>	面积	含量/%	归属
1 606	7.9	21.1	-sheet
1 618	7.4	19.8	-sheet
1 631	2.4	17.7	-sheet
1 645	5.4	14.5	random
1 658	4.3	11.5	-helix
1 672	3.4	9.06	-turn
1 685	6.6	6.33	-turn

### 2.4 岩藻多糖酶酰胺带的拟合结果分析

酰胺带主要是蛋白质分子中的 N-H 键面内弯曲振动和 C-N 键伸缩振动的偶合<sup>[16]</sup>。由于酰胺带信号较弱, 一直没有得到足够的重视。然而水蒸气在此吸收带范围内没

有吸收峰,如果用酰胺带解析蛋白质二级结构不仅解决了严重的水汽干扰问题,而且不同二级结构在酰胺带的光谱性质更加特征,拟合过程易于将它们分开,尤其是酰胺带中由于谱峰重叠难以区分的螺旋和无规卷曲结构,在酰胺

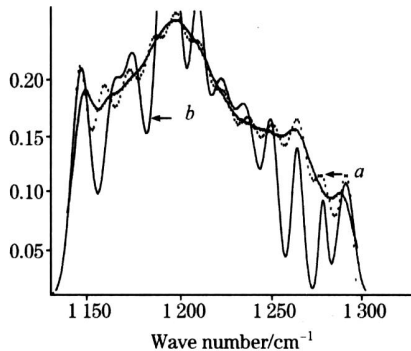


Fig. 4 FTIR spectra of fucoidanase in the amide III region

a: Deconvoluted spectra; b: Second-derivative spectra

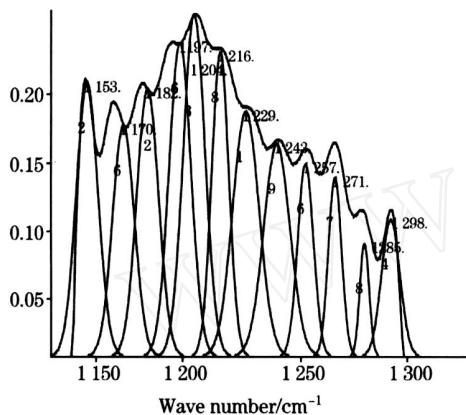


Fig. 5 Gaussian fitting to the deconvoluted spectra of fucoidanase in amide III region

带得以明显的分离<sup>[17]</sup>。因此应用酰胺带辅助酰胺带定量分析岩藻多糖酶的二级结构,可以扬长避短,更加精确获得蛋白质二级结构信息。图4是对酰胺带原谱进行去卷积和二阶导数处理,根据子峰与二级结构的对应关系,进一步对各子峰进行拟合,结果见图5。

Table 3 Results of Gaussian fitting of fucoidanase in amide region

峰位/cm <sup>-1</sup>	面积	含量/%	归属
1 229	2.82	30.7	-sheet
1 243	2.44	26.6	-sheet
1 257	1.33	14.5	random
1 271	1.03	11.2	-turn
1 285	0.46	5.01	-turn
1 298	1.11	12.0	-helix

通过酰胺带和带高斯拟合,根据各子峰与二级结构的对应关系,可以得到岩藻多糖酶二级结构的相对含量(见表3): $\beta$ -折叠约占58%, $\beta$ -转角约占15%左右,无规卷曲占15%左右, $\alpha$ -螺旋约占12%左右。比较表2和表3的数据,不难发现酰胺带与酰胺带两者的拟合结果十分吻合。同时表明上述对酰胺带的谱峰归属是可靠的。

### 3 结论

蛋白质结构是形成复杂生物组织和实现生物功能的前提和基础。对岩藻多糖酶结构的研究为进一步了解其生物活性提供重要的参考。本实验首次采用了傅里叶变换红外光谱对岩藻多糖酶的二级结构进行分析测定。FTIR结果显示,天然岩藻多糖酶的二级结构以 $\beta$ -折叠的含量占优势, $\beta$ -转角和无规卷曲次之, $\alpha$ -螺旋含量相对较少,酰胺带与酰胺带的拟合结果吻合,说明所获得的数据是可靠的。

### 参 考 文 献

- [1] Chevolut L, Foucault A, Chaubet F, et al. Carbohydrate Res., 1999, 319: 154.
- [2] Mauray S, de Raucourt E, Talbot J, et al. Biochim. Biophys. Acta, 1998, 1378: 184.
- [3] Nishino T, Yamauchi T, Horie M, et al. Thromb. Res., 2000, 99: 623.
- [4] Baba M, Snoeck R, Pauwels R, et al. Antimicrob. Agents Chemother., 1988, 32: 1742.
- [5] Lynch G, Low L, Li S, et al. J. Leukocyte Biology, 1994, 56(3): 266.
- [6] YANG Chi-ming (杨池明). Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学报), 2002, 23(2): 243.
- [7] JIANG Jun-guang, WANG Zhen-xin, LIU Chang-wei, et al (蒋俊光, 王振新, 刘长伟, 等). Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学报), 2001, 22(7): 1131.
- [8] WANG Bin, WANG Jing, YU Jiang, et al (王斌, 王靖, 余江, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 1999, 19(5): 674.
- [9] Parvez I H, Feride S J. Molecular Catalysis B, Enzymatic, 1999, 7: 207.
- [10] Xie Mengxia. Spectroscopy Letters, 1996, 29(1): 53.
- [11] Xie Mengxia, Liu Yuan. Spectrochimica Acta Part A, 2002, 58(13): 2817.
- [12] Wu Ke, Cai Jingmin, et al. Marine Biotechnology an Overview of Leading Fields, in 1<sup>th</sup> ESMB Meeting, Nattes, 12-14, May, 2003, 122.
- [13] Xiao Hourong, Xie Yongshu, Liu Qingliang, et al. Spectrochimica Acta Part A, 2005, 61: 2840.
- [14] Byler D M, Brouillette J N, Susi H. Spectroscopy, 1986, 1(3): 29.

- [15] YANG Jiao-lan, LUO Tian(杨姣兰, 罗 添). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(4): 610.  
[16] Dong Aichun, Huang Ping, Caughey W S. Biochemistry, 1990, 29: 3303.  
[17] Singh B R, DeOliveira D B, Fu F N, et al. Proc. Biomol. Spectr. SPIE, 1993, 1890: 47.

## Investigation of Fucoidanase by FTIR Spectra

MA Shuang<sup>1,2</sup>, XIAO Hou-rong<sup>2</sup>, WU Qian-qian<sup>2</sup>, PAN Ren-rui<sup>2</sup>, CAI Jing-min<sup>1,2\*</sup>

1. College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

2. Department of Biology and Environment Engineering, Hefei College, Hefei 230022, China

**Abstract** Fucoidanase was isolated and purified from marine fungus LD8 by solid state fermentation, extraction with citric acid buffer, acetone precipitation and column chromatography on Sephadex G100. A single band on PAGE shows that pretty pure fucoidanase has been obtained. FT-IR spectra and its derivation, self-deconvolution and curve-fitting methods were used to analyze the secondary structure of the fucoidanase. Composite bands of the amide and amide were studied by using Fourier self-deconvolution (FSD) with an enhancement factor of  $K=2.2$  and a half width of  $20.2 \text{ cm}^{-1}$ . The relative average fractions of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, random coil,  $\gamma$ -turn are 11.5%, 58.6%, 14.5% and 15.9%, respectively, according to amide region, while the content of  $\alpha$ -helix is 12%,  $\beta$ -sheet 57.3%, random coil 14.5%, and  $\gamma$ -turn 16.3% on amide region. In other words, both the conclusions were exactly consistent. All the above results show that  $\beta$ -sheet was the dominant component, which is about 58%, and that  $\gamma$ -turn is about 15%, random coil 15%, and  $\alpha$ -helix 12% at room temperature.

**Keywords** Fucoidanase; FTIR; Secondary structure

(Received Nov. 10, 2006; accepted Feb. 20, 2007)

\* Corresponding author