

## 高压脉冲电场对脂肪氧化酶二级和三级构象的影响效果

钟葵<sup>1,2</sup>, 胡小松<sup>2</sup>, 吴继红<sup>2</sup>, 陈芳<sup>2</sup>, 廖小军<sup>2\*</sup>

1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070

2. 教育部果蔬加工工程中心, 中国农业大学, 北京 100083

**摘要** 应用圆二色谱和荧光光谱研究了高压脉冲电场(PEF)对脂肪氧化酶(LOX)的二级和三级构象的影响效果。研究表明 PEF 破坏了 LOX 二级和三级结构。PEF 处理后, LOX 的 CD 光谱中两个特征负峰值显著降低, 二级结构中  $\alpha$ -螺旋含量显著降低 ( $p < 0.05$ ), 并且 LOX 中  $\alpha$ -螺旋含量和电场强度之间存在良好线性关系。PEF 处理后 LOX 发射光谱中特征峰(337 和 583 nm)的荧光强度显著增大 ( $p < 0.05$ ), 特征峰相对荧光强度和电场强度之间存在良好线性关系。结果表明 PEF 酶活钝化跟酶二级和三级结构的破坏有关, 为 PEF 钝酶机理研究提供理论基础。

**关键词** 脉冲电场; 脂肪氧化酶; 构象; 圆二色谱; 荧光光谱

**中图分类号**: O657.3, Q683 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)03-0765-04

### 引言

食品加工通常采用热处理来杀死和钝化食品中的微生物和酶, 保证食品安全, 延长食品贮藏期, 这就使得食品的气味和营养损耗很大, 因此很多研究者着手研究非热力加工技术。高压脉冲电场(pulsed electric fields, PEF)是目前备受关注的非热力杀菌技术之一<sup>[1,2]</sup>, 能在常温下有效杀死和钝化食品中的微生物和酶的同时很好地保持食品的品质, 延长食品货架期。目前在美国已经有商业化产品上市。

关于 PEF 杀菌效果研究很多, 研究表明 PEF 对很多食品腐败菌和致病菌有很好的杀灭效果。食品内源酶对食品质量影响很大, 酶活存在会影响食品的风味、色泽和稳定性从而破坏食品的品质。但相关 PEF 酶处理的研究较少。PEF 技术对食品中很多酶都有较好的钝化作用, 但钝酶机理尚不清楚, 一种观点认为 PEF 处理后破坏了酶蛋白维持自身三维空间机构的弱共价键, 使酶蛋白构象发生变化, 导致酶最终失活<sup>[3]</sup>。

光谱学目前被广泛应用于蛋白构象和功能研究中, 圆二色性光谱法(CD)和荧光光谱分析法是最常用的分析蛋白质二级和三级结构的方法<sup>[4,5]</sup>。CD 谱能有效地分析蛋白二级构象, 并通过 CD 图谱分析能计算  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠等各组含量<sup>[6,7]</sup>。荧光光谱分析法利用酶中蛋白质芳香族氨基酸

(酪氨酸、色氨酸及苯丙氨酸)具有自然荧光, 测定荧光的变化能反映酶蛋白质局部三级结构的变化。

脂肪氧化酶(LOX, EC 1.13.11.12)能催化果蔬中不饱和脂肪酸氧化形成共轭氢过氧化物, 导致食品产生难闻的脂氧化气味<sup>[8]</sup>。本文利用 CD 色谱和荧光光谱法研究 PEF 处理对 LOX 二级和三级构象的影响, 旨在为 PEF 技术钝酶机理提供理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

实验用脂肪氧化酶(LOX)是美国 Fluka 公司, 产品编号 62340; 其他所用化学试剂是北京化学试剂公司, 所用化学试剂均分析纯。

#### 1.2 PEF 试验装置和试验仪器

##### 1.2.1 PEF 试验装置

实验使用的高压脉冲电场杀菌试验装置为自行设计, 图1是高压脉冲电场试验装置图, 主要由高压发生装置、高压脉冲发生装置处理室、蠕动泵、物料贮罐和冷却部分构成, 其中高压脉冲发生装置和处理室是装置的关键。物料在蠕动泵作用下按箭头所示方向流动, 即物料贮罐 蠕动泵 高压脉冲处理室 无菌贮罐。本装置的特点为, 物料贮罐安装在一个能够进行紫外消毒的相对密闭环境中, 可以减少环

收稿日期: 2007-11-29, 修订日期: 2008-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371003)和国家科技支撑计划项目(2006BAD05A02)资助

作者简介: 钟葵, 女, 1979年生, 华中农业大学食品科学与技术学院讲师 e-mail: zhongk@mail.hzau.edu.cn

\* 通讯联系人 e-mail: liaoxjun@hotmail.com

境的不卫生引起的污染;循环回路中连接冷却装置,通过冰水浴来有效控制 PEF 处理时导致的物料温升,使 PEF 处理时酶液最高温度控制在 40 以下。温度计及时监控处理室出口温度。高压脉冲电场系统处理参数见表 1。

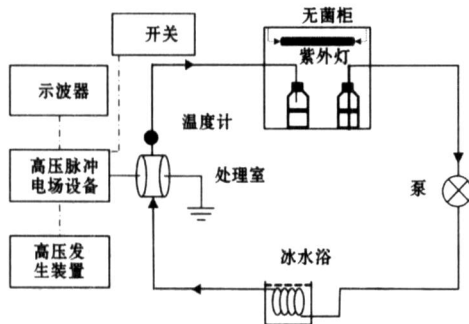


Fig 1 Schematic diagram of the pulsed electric field equipment

Table 1 Parameter of PEF processing

电极	波形	电容/ $\mu\text{F}$	脉宽/ $\mu\text{s}$	频率/ $\text{Hz}$	处理室参数		初始物料温度/ $^{\circ}\text{C}$
					容量/ $\text{mL}$	间距/ $\text{cm}$	
同轴式	衰减波	0.5	37	1	1	0.5	15~17

试验装置的清洗方法为:回路先用 60~70、2% NaOH 循环 5 min,然后用无菌水清洗 5 min,30  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  二氧化氯溶液循环 5 min,再用无菌水清洗 5 min。每次试验处理都按程序进行清洗处理。

### 1.2.2 试验仪器

J-720 型分光偏振仪,日本 JASCO 公司; F-4500 型荧光分光光度计(日本 HITACHI 公司)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 CD 谱分析方法

CD 光谱扫描波长范围为 250~200 nm,常温下(25  $\pm$  1) 4 次重复扫描。扫描速度为 50  $\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$ ,带宽 1 nm。LOX 酶液浓度为 1.852  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,用 0.05  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸缓冲液(pH 值 6.8)配制。用平均摩尔椭圆率[ $\theta$ ]来表示 CD 数据,单位为  $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ 。通过 K2D(Bork 公司,德国海德堡)软件分析 CD 谱图数据,计算二级结构中各组分含量。

#### 1.3.2 荧光光谱分析方法

LOX 的酶液浓度分别为 0.617  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,用 0.05  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸缓冲液(pH 6.8)配制。激发波长  $\lambda_{\text{ex}}$  为 285 nm,常温下(25  $\pm$  1) 4 次重复扫描,扫描波长  $\lambda_{\text{em}}$  范围为 300~600 nm。相对荧光强度计算公式如下

相对荧光强度/% =

$$\frac{\text{PEF 处理后 LOX 酶液绝对荧光强度}}{\text{PEF 处理前 LOX 酶液绝对荧光强度}} \times 100 \quad (1)$$

#### 1.3.3 电场条件设置

电场强度设置 4 个梯度:8,12,16 和 20  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ ;脉冲时间为 300  $\mu\text{s}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 LOX 的 CD 光谱分析

圆二色性光谱法(CD)是最常用的分析蛋白质二级的方法,通过 CD 图谱分析能计算  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠等各组分量<sup>[4,5]</sup>。通常典型  $\alpha$ -螺旋结构在 208 和 222 nm 左右处有 2 个负峰,典型  $\beta$ -折叠结构在 214 nm 处有 1 个负峰<sup>[9,10]</sup>。

图 2 是 PEF 处理前后 LOX 的 CD 图谱,由图可见 PEF 处理前在 208 nm 处有明显负峰,215 到 222 nm 范围内形成一平肩,表明在 LOX 二级构象中同时存在  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠结构。PEF 处理后 LOX 的 CD 图谱发生变化,208,215,222 nm 之间的平肩处的负峰值显著下降,并随电场强度增强负峰值下降显著增加( $p < 0.05$ )。

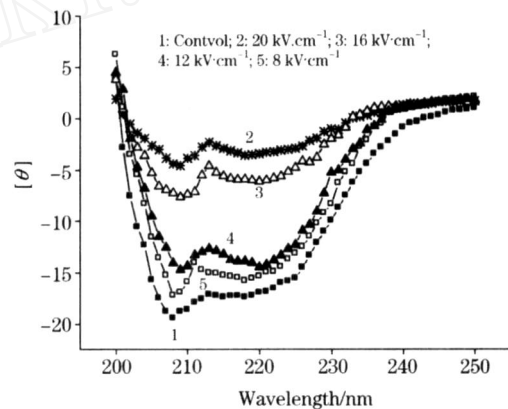


Fig 2 Far-UV CD spectra of LOX before and after PEF treatment

Tsong 等研究发现 PEF 可以打乱蛋白的正常有序状态<sup>[11]</sup>。Yeom 等研究发现 PEF 处理(50  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 2 ms)后木瓜蛋白酶的 CD 光谱在 222 和 210 nm 的 2 个特征峰峰值显著降低<sup>[3]</sup>。钟葵等研究发现 PEF 处理后辣根过氧化物酶(HRP)CD 光谱在 208 和 222 nm 处的 2 个特征负峰峰值显著下降<sup>[12,13]</sup>。这些研究结果同样表明 PEF 处理影响了酶蛋白的二级结构。

目前关于 PEF 对酶蛋白构象影响的研究较少,而研究电场强度和  $\alpha$ -螺旋含量之间相关性的尚未见报道。表 2 列出了 PEF 处理前后 LOX 二级结构中各组分含量的变化,由表可见 PEF 处理前 LOX 二级构象中  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规则卷曲的量分别是 31%、24% 和 45%。在 Malvezzi-Campeggi 等(2001)的研究中发现未经任何处理的 LOX 二级构象中  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规则卷曲的量分别是 35%、28%、37%,我们计算的结果与 Malvezzi-Campeggi 等基本一致<sup>[14]</sup>。PEF 处理后 LOX 二级结构中  $\alpha$ -螺旋含量下降, $\beta$ -折叠含量增加,随电场强度增强  $\alpha$ -螺旋含量进一步显著下降, $\beta$ -折叠含量进一步显著增加( $p < 0.05$ )。电场强度为 8  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时 LOX 二级构象中  $\alpha$ -螺旋含量降低为 29%, $\beta$ -折叠含量增加为 43%。随电场强度增强  $\alpha$ -螺旋含量继续下降, $\beta$ -折叠含量继续增加,到 20  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  时 LOX 二级构象中  $\alpha$ -螺旋含量降

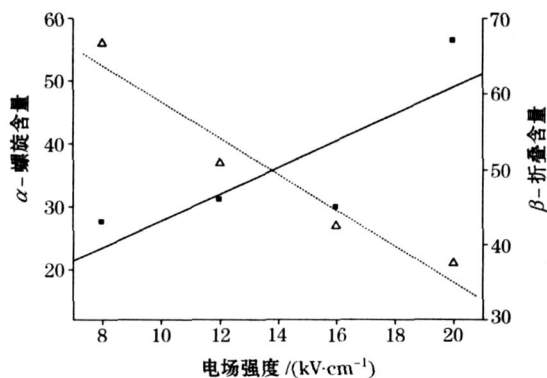
低为 16%， $\beta$ -折叠含量增加为 67%。

**Table 2** Relative content in secondary structure of LOX before and after PEF treatment

样品	LOX		
	$\alpha$ -helix/ %	$\beta$ -sheets/ %	其他/ %
对照	31	24	45
8 kV $\cdot$ cm $^{-1}$	29	43	28
12 kV $\cdot$ cm $^{-1}$	25	46	29
16 kV $\cdot$ cm $^{-1}$	21	45	33
20 kV $\cdot$ cm $^{-1}$	16	67	17

图 3 是 PEF 不同电场强度下 LOX 二级构象中  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠相对含量变化图，由图可见随电场强度增强 LOX 中  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠相对含量变化与电场强度之间有很好的相关性， $R^2$  都在 0.900 以上。

PEF 破坏了 LOX 的二级构象，随电场强度增强这种破坏程度增大， $\alpha$ -螺旋含量下降， $\beta$ -折叠含量增加。前期研究结果表明 PEF 能钝化 LOX 酶活，随电场强度增强钝化效果增强。LOX 中  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠相对含量变化与电场强度之间有很好的相关性，因此酶活钝化和二级结构的破坏之间可能存在对应关系。



**Fig 3**  $\alpha$ -Helix and  $\beta$ -sheets content of LOX at varied electric field strength by PEF treatment

## 2.2 LOX 的荧光光谱分析

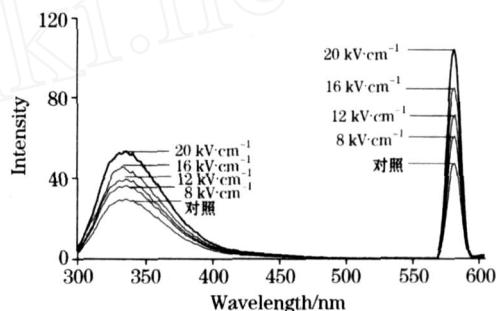
LOX 蛋白中含有 13 个色氨酸残基<sup>[13]</sup>，因此通过测定 PEF 处理前后 LOX 荧光发射光谱和荧光强度的变化可以研究 PEF 是否破坏了 LOX 蛋白局部三级结构。

图 4 是 PEF 处理前后 LOX 的发射光谱图，激发波长 ( $\lambda_{ex}$ ) 为 285 nm。由图可见 LOX 在 337 nm 左右有发射峰，这个吸收峰是色氨酸的发射峰。随电场强度增强，吸收峰越来越高，荧光强度增强。结果表明 PEF 处理影响了 LOX 的三级结构，导致更多色氨酸暴露出来，荧光强度增强。图 5 表明当电场强度分别增强到 8, 12, 16 和 20 kV  $\cdot$  cm $^{-1}$  时，LOX 的 337 nm 处相对荧光强度分别增至 122.73%，133.33%，149.33% 和 180.00%，同时 LOX 发射光谱 337 nm 吸收峰的相对荧光强度和电场强度之间存在良好线性相关性，相关系数  $R^2$  是 0.973。

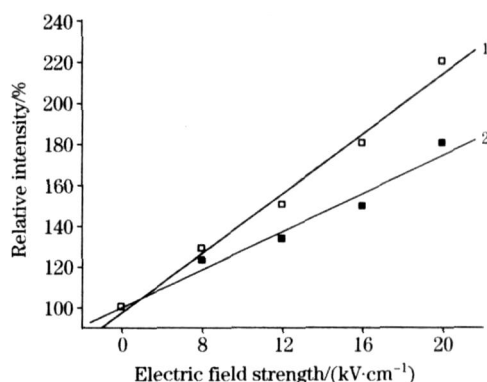
同样，LOX 的发射光谱图中在 583 nm 附近也有一个吸

收峰。同色氨酸峰一样，随电场强度增强这个吸收峰也越来越高，荧光强度增强。图 5 表明当电场强度增强到 8, 12, 16 和 20 kV  $\cdot$  cm $^{-1}$  时，LOX 的 583 nm 处相对荧光强度分别增至 128.62%，150.00%，180.00% 和 220.00%。LOX 发射光谱 583 nm 吸收峰的相对荧光强度和电场强度之间也存在良好线性相关性，相关系数  $R^2$  是 0.986。

PEF 处理后 LOX 的荧光强度都增强，表明 PEF 改变了酶蛋白的三级构象。随 PEF 电场强度增加 LOX 荧光强度也增大，与廖小军(2004) PEF 处理辣根过氧化物酶(HRP)和果胶酯酶(PE)结果一样，随 PEF 电场强度增强 HRP 与 PE 荧光强度也进一步增大。研究结果表明 PEF 能钝化 LOX 酶活，而且随电场强度增强钝化效果增强。因此酶活钝化和三级结构的改变之间可能存在对应关系。



**Fig. 4** Fluorescence emission spectra of LOX before and after PEF treatment



**Fig 5** Intrinsic relative fluorescence intensity at 337 and 583 nm of LOX at varied electric field strength by PEF treatment

1: 583 nm; 2: 337 nm

## 3 结论和讨论

(1) PEF 处理破坏了 LOX 的二级结构。

PEF 处理后 LOX CD 光谱图都发生变化，随电场强度增加平均摩尔椭圆率 $[\theta]$ 显著降低，特征负峰高度显著下降， $\alpha$ -螺旋含量显著降低， $\beta$ -折叠含量显著增加 ( $p < 0.05$ )。LOX 中  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠含量和电场强度之间存在良好的线性关系。由此看出，PEF 处理影响了 LOX 酶结构中连接其螺旋结构的弱共价键，使酶二级结构被破坏，稳定性降低，结构

松散。

(2) PEF 处理改变了 LOX 的三级结构。

PEF 处理后 LOX 的荧光强度增加, 随电场强度增加荧光强度增加幅度显著增大, 20 kV·cm<sup>-1</sup> 时 LOX 的相对荧光强度最高为 220%, LOX 发射光谱中特征峰的相对荧光强度和电场强度之间存在良好的线性关系。

由此可见, PEF 处理破坏了 LOX 的二级结构, 改变了 LOX 的三级结构, 并且这种破坏和改变和电场强度之间存在良好线性关系。因此 PEF 钝酶效果跟酶二级和三级构象之间的破坏存在一定对应关系, 为 PEF 钝酶机理研究提供了一定理论依据。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Raso J, Calderon M L, Gónzaga M, et al. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 1998, 31: 668.
- [ 2 ] Barbosa-Cánovas G V, Gongora-Nieto M M, Pothakamury U R, et al. Preservation of Foods with Pulsed Electric Fields. San Diego: Academic Press, USA, 1999.
- [ 3 ] Yeom H W, Streaker C B, Zhang Q H, et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(10): 4597.
- [ 4 ] Ahmad H, Okubo M, Kamatari Y O, et al. Colloid & Polymer Science, 2002, 280: 310.
- [ 5 ] Keiderling T A. Current Opinion in Chemical Biology, 2002, 6: 682.
- [ 6 ] Tang J L, Jiang J G, Song Y G, et al. Chemistry and Physics of Lipids, 2002, 120: 119.
- [ 7 ] XU Qiang, YANG Ti-qiang, AO Dun-ge-ri-le, et al (许强, 杨体强, 敖敦格日勒, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2007, 27(3): 565.
- [ 8 ] Ganthavorn C, Nagel C W, Powers J R. Journal of Food Science, 1991, 56: 47, 79.
- [ 9 ] Chang C T, Wu C S C, Venyaminov S Y, et al. Analytical Biochemistry, 1978, 91: 13.
- [ 10 ] Myer Y P. Biological Chemistry, 1968, 243: 2115.
- [ 11 ] Tsong T Y, Astunian R D. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1986, 15: 457.
- [ 12 ] Zhong K, Hu X S, Zhao G F, et al. Food Chemistry, 2005, 92(3): 473.
- [ 13 ] Zhong K, Wu J H, Wang Z F, et al. Food Chemistry, 2007, 100(1): 115.
- [ 14 ] Malvezzi-Campeggi F, Rosato N, Finazzi-Agrò A, et al. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 289(5): 1295.

## Effects of High Pulsed Electric Field on the Secondary and Tertiary Structure of Lipoygenase

ZHONG Kui<sup>1,2</sup>, HU Xiao-song<sup>2</sup>, WU Ji-hong<sup>2</sup>, CHEN Fang<sup>2</sup>, LIAO Xiao-jun<sup>2\*</sup>

1. College of Food Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2. Center for Fruit & Vegetable Processing Engineering Research, China Agricultural University, Beijing 100083, China

**Abstract** The effect of pulsed electric field (PEF) on the secondary and tertiary structure of lipoygenase (LOX) in a buffer solution was analyzed using far UV-circular dichroism (CD) and fluorescence spectrophotometry, respectively. The secondary and tertiary structure of LOX changed after PEF treatment. The CD spectra of LOX also changed, with the intensity of two negative peaks and the content of  $\alpha$ -helix significantly decreased ( $p < 0.05$ ). The decrease in  $\alpha$ -helix content in LOX showed a good linear correlation with the electric field strength. The fluorescence intensity of LOX increased, and the relative fluorescence intensity of the two characteristic peaks of LOX emission spectra at 337 nm and 583 nm also showed a good linear correlation with the electric field strength. These results showed that the activity inactivation of LOX may be due to the alteration in secondary structure, and both had a good relation.

**Keywords** Pulsed electric field (PEF); Lipoygenase (LOX); Conformation; Circular dichroism (CD); Fluorescence spectrum

(Received Nov. 29, 2007; accepted Mar. 2, 2008)

\* Corresponding author