文章编号：1000-5773(2011)05-0475-06

高压处理对辣根过氧化物酶活性及构象的影响*

上官丽娟，马永昆，崔凤杰，范晓波

（江苏大学食品与生物工程学院，江苏镇江　212013）

摘要：高压处理对果蔬过氧化物酶活性的钝化程度会影响果蔬的感官品质和贮藏期，有必要研究高压条件下过氧化物酶的结构变化与其活性的关系。采用圆二色谱法和荧光光谱法，研究了室温下，100、300、500 MPa 压力分别处理 15 min 对辣根过氧化物酶二级、三级结构及活性的影响。结果表明：高压处理对辣根过氧化物酶（HRP）有钝化作用，随着处理压力的增加，HRP 的活性依次下降 2.36%、5.69%、10.36%，HRP 较耐压；HRP 的 α-螺旋、β-折叠和无规卷曲含量的升幅均小于 4%，β-转角含量显著下降，且下降程度均达到 11%；高压处理后的 HRP 在 234 nm 激发光谱和 308 nm 发射光谱特征峰的荧光强度下降，下降程度依次为 18.28%、5.46%和 4.04%，且 100 MPa 压力下处理的 HRP 荧光强度下降的程度最大。说明高压处理对 HRP 有钝化作用，且与其二级和三级结构的变化有关。

关键词：高压处理；辣根过氧化物酶；构象；圆二色谱；荧光光谱

中图分类号：O521.9；Q554.6　　**文献标识码**：A

1　引　言

在食品加工中通常采用热处理方法来钝化食品中的酶，以延长食品的贮藏期[1-2]。热处理对食品的色香味和营养损失很大，高压加工技术（High Pressure Processing，HPP）是近年来兴起的食品非热力加工技术，具有可保持食品原有风味、色泽、营养成分等优点[3-5]。

过氧化物酶广泛存在于蔬菜水果中，影响果蔬加工产品的风味、色泽和贮藏性，该酶耐热耐压，常被用作果蔬预处理和加工钝酶的目标酶[1,6]。高压处理技术对酶有较好的钝化作用，如 Liang 等人[7]报道了 50 ℃下、600 MPa 压力处理 30 min，猕猴桃过氧化物酶的残余活性仅剩 26.1%；Broeck 等报道了 32 ℃时橘汁中过氧化物酶经 400 MPa 压力处理 15 min 后其失活率达到 50%[8]。

随着对高压技术研究的不断深入，高压处理对酶活性影响的研究越来越多。酶的活性由其特定的空间结构决定，高压条件下蛋白质的活性变化与空间结构变化呈非线性关系。压力处理对酶活性的作用是有差异的，一般低压处理对酶有激活作用，高压处理可使酶失活[9]。揭示高压处理对酶的影响规律，可以从研究高压对酶蛋白质空间结构的影响入手。

酶蛋白的三级结构是形成酶活性中心的基础，Morild[10]研究了高压处理对酶催化活性的作用机理。HPP 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，导致酶的活性发生变化[11-12]。迄今为止国内外未见高压处理对酶活性中心影响机理的报道。

辣根过氧化物酶（HRP，相对分子质量 40000）是过氧化物酶家族成员中最重要、也是研究最多的一种[13-14]。本研究利用圆二色谱（Circular Dichroism，CD）和荧光光谱法，结合酶活性的变化以及高压对酶二级和三级结构的影响，探究高压加工技术对酶的影响规律，为 HPP 钝酶机理提供理论基础。

* **收稿日期**：2010-04-20；**修回日期**：2010-07-26

基金项目：国家 863 计划项目（2007AA100405）

作者简介：上官丽娟（1984—），女，硕士研究生，主要从事高压技术在生物微观方面的研究. E-mail：sglj3555@yahoo.com.cn

通讯作者：马永昆（1963—），男，教授，博士生导师，主要从事高压食品技术研究. E-mail：mayongkun@ujs.edu.cn

2 材料与方法

2.1 材料

辣根过氧化物酶:购自上海雪满生物科技有限公司,在 403 nm 处吸光度与其在 275 nm 处吸光度的比值(Reinheit Zahl,RZ)大于 330 u/mg。

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、愈创木酚、过氧化氢等实验所用药品均为分析纯。

2.2 实验仪器

JASCO-810 型分光偏振仪,日本 JASCO 公司生产;Cary Eclipse 荧光分光光度计,美国 VARIAN 公司生产;UV1600 紫外/可见分光光度计,北京瑞利分析仪器生产;TGL-20M 台式高速离心机,湘仪离心机仪器有限公司生产;BCD-265 4 ℃冰箱,合肥荣事达电冰箱有限公司生产。

2.3 实验方法

2.3.1 高压处理

将酶液采用高压专用的双层聚乙烯塑料袋包装,每袋装样 10 mL,用封口机热封。在(100±5)MPa、(300±5)MPa、(500±5)MPa 压力下,于室温分别对样品加压,保压 15min,卸压后迅速置于 4 ℃冰箱中保存,并尽快进行后续实验。

2.3.2 酶活测定方法

采用邻甲氧基苯酚法[15]进行酶活测定。3 mL 反应体系包括:pH5.0 (0.2 mol/L)的醋酸缓冲液 1 mL,0.1%的邻甲氧基苯酚 1 mL,0.08% H_2O_2 1 mL,30 ℃水浴 10 min 后加入 0.5 mg/L 的 HRP 酶液 1 mL。加入酶液混合均匀后开始计时,在 470 nm 处测定其吸光度值。酶活性以 1 mL 酶液每反应 1 min所测定的吸光度变化值 Δ_{OD} 表示,一个酶活单位定义为 10^{-3}/min。压力处理后 2 h 内结束活性测定。

2.3.3 CD 光谱分析方法

将 HRP 用浓度为 0.05 mol/L、pH7.0 的磷酸缓冲液,配成浓度为 0.2 g/L 的缓冲液体系。进行高压处理后,采用 JASCO-810 型自动记录分光偏振仪测定其远紫外区段的 CD 谱,测定温度为 20 ℃,扫描范围为远紫外段(190~250 nm),扫描速度 100 nm/min,样品池光程 1 mm。用平均摩尔椭圆率[θ]来表示 CD 数据,单位为 10^{-3}deg·m^2/mol。通过仪器自带软件分析 CD 谱图数据,计算二级结构中各组分的含量。

2.3.4 荧光光谱分析方法

HRP 浓度为 1 g/L,用浓度为 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.0)配制。最大激发波长为 234 nm,最大发射波长为 308 nm,常温(25±1)℃下重复 3 次扫描。相对荧光强度计算公式为

$$\text{相对荧光强度} = \frac{\text{HPP 处理后 HRP 的荧光强度}}{\text{HPP 处理前 HRP 的荧光强度}}$$

3 结果与分析

3.1 HPP 对 HRP 活性的影响

实验条件为:室温、保压时间为 15 min、处理压力为(100±5)MPa、(300±5)MPa、(500±5)MPa,实验结果见图 1。

由图 1 看出,高压对 HRP 活性有一定的灭活效果,随着压力的升高,残余活性随之有一定的降低。随着压力的升高,辣根过氧化物酶的活性依次降低 2.36%、5.69%、10.36%,各处理之间差异显著($P<0.05$)。

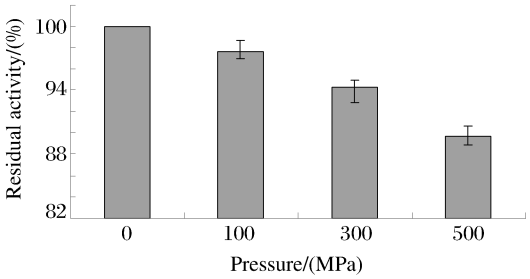


图 1 室温下不同压力保压 15 min 高压处理对 HRP 活性的影响

Fig. 1 The effect of HPP treatment for 15 min on the activity of HRP

3.2 HRP 的 CD 光谱分析

25 ℃下用圆二色仪扫描经不同压力处理的辣根过氧化物酶,得到不同处理压力对 HRP 二级结构的影响,结果见图 2。利用圆二色仪自带软件分析图谱,得到不同处理条件下 HRP 二级结构的含量,其结果列于表 1。

表 1 HRP 的二级结构含量

Table 1 The content of secondary structure of HRP

Pressure/(MPa)	α-Helix/(%)	β-Sheet/(%)	β-Turn(%)	Random coil/(%)
0.1	19.2	34.9	11.5	34.5
100	22.9	38.9	0.0	38.2
300	22.7	39.4	0.1	37.8
500	22.4	39.4	0.1	37.5

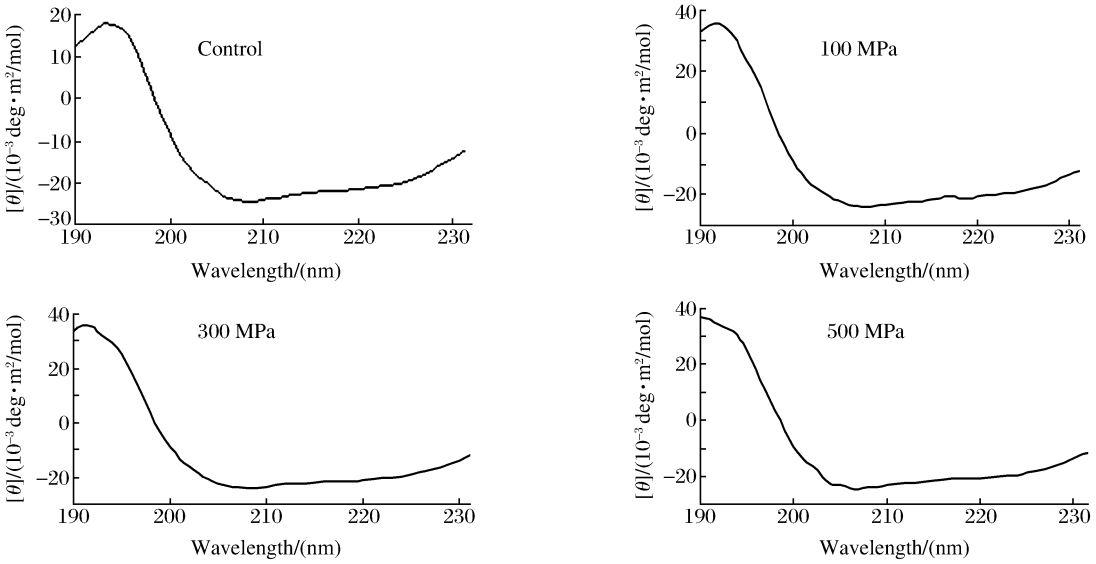


图 2 HPP 处理前后 HRP 的构象

Fig. 2 The conformation changes of HRP between pressurized and control

由图 2 可以看出:在 192 nm 处 HPP 处理前后 HRP 的谱图有较大的变化,其余则变化不明显。通常典型 α-螺旋结构在靠近 192 nm 有一正的谱带,在 208 和 222 nm 附近有 2 个负峰,典型 β-折叠结构在 216 nm 处有一负谱带,在 185～200 nm 有一正谱带;β-转角则在 206 nm 附近有一正 CD 谱带[18-19]。

高压处理后,HRP 的 α-螺旋的平均摩尔椭圆率显著升高,由表 1 可知,高压处理后 β-转角的含量降低,其余含量则均有所升高。实验结果说明:HPP 在一定程度上改变了 HRP 的二级结构,尤其是对 α-螺旋和 β-转角的影响。但是,在不同压力处理之间,HRP 的二级结构含量的变化并不明显。

蛋白质分子是由氨基酸以肽键的方式按照一定序列排列成为多肽,依靠肽键的维系折叠环绕成特定的三维结构,构成肽链,多肽链再以氢键、二硫键等进一步折叠成为独特的紧密结构,形成蛋白质大分子。高压处理不仅伴随着物质能量的吸收,卸压时还伴随巨大的能量释放,在被处理蛋白质对能量的吸收和释放过程中,可能会对氨基酸的结构产生一定的影响,导致键的弯曲甚至键能和键角发生一定的变化,虽然蛋白质的键能和键角发生的微小变化不会导致蛋白质整体结构的崩溃,但是如果键的变化发生在酶的活性部位,根据锁钥原理,将会导致酶活性发生较大的变化。据此可以认为,HPP 处理可以在一定程度上灭活 HRP 的活性,其二级结构也随之发生变化。

3.3 HRP 的荧光光谱分析

蛋白质三级结构侧链上的芳香族氨基酸——色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸具有内源荧光，其中色氨酸的荧光强度最大，酪氨酸次之，苯丙氨酸最小[19-20]，甚至在大多数情况下苯丙氨酸的荧光不被激发，大部分蛋白质的荧光都来自色氨酸和酪氨酸，因此测定 HPP 处理前后 HRP 荧光发射和激发光谱和荧光强度的变化在一定程度上可以反映 HPP 是否破坏了 HRP 的三级结构。图 3 是 HPP 处理前后 HRP 的发射和激发光谱，图 4 是荧光强度的变化。

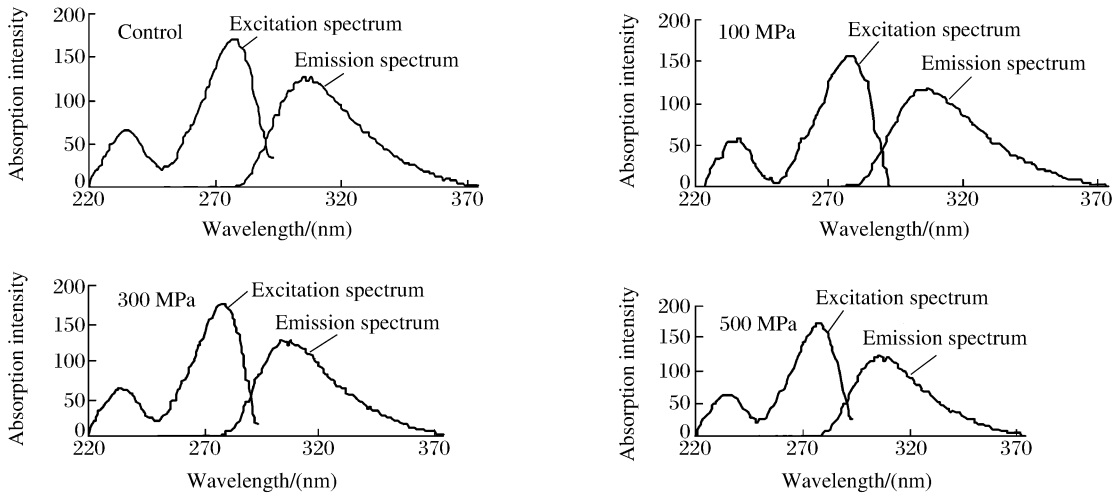


图 3 HPP 处理前后 HRP 的激发和发射光谱

Fig. 3 The excitation spectrunm and emission spectrum of pressurized HRP and control

图 3 给出的 HPP 处理前后 HRP 的激发和发射光谱图中，其激发波长为 234 nm，发射波长为 308 nm。由图 3 可见，HRP 在 234 nm 附近有吸收峰，其中以 100 MPa 压力处理时的吸收峰最低，随着压力的增加，吸收峰有所回升，但与空白对照，经 HPP 处理后 HRP 的荧光强度有所下降，见图 4。

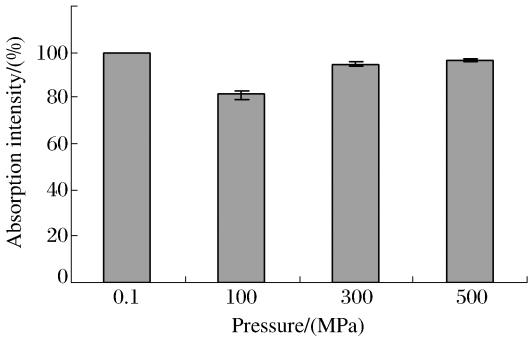


图 4 不同压力处理下 HRP 的荧光强度

Fig. 4 Fluorescence under different pressure in HRP

酶的荧光强度是由构成其结构的氨基酸的荧光强度决定的。由于不同的处理方式会使不同的氨基酸产生影响，所以结果中所反映的荧光强度先下降后上升，有可能是因压力处理造成了不同种类和数量的氨基酸发生了变化。此外随着压力的升高，蛋白质结构的变化会导致一定数量氨基酸外露，也是导致荧光强度变化的因素之一。由图 4 可见，当压力分别升高至 100、300、500 MPa 时，HRP 在 234 nm 处的相对荧光强度分别下降了 18.28%，5.46%和 4.04%，说明随着压力的升高，可能使酶蛋白的结构展开或者进一步卷曲，使其不同种类和数量的氨基酸暴露出来，使 HRP 的结构随之产生一定的变化，导致荧光强度下降。

4 结 论

高压降低了辣根过氧化物酶的活性，随着压力的升高，辣根过氧化物酶的残余活性在一定程度上有所降低；高压在一定程度上破坏了 HRP 的二级和三级结构，从而导致了 HRP 的圆二色吸收降低，荧光吸收强度也有所降低。

References:

[1] Ludikhuyzea L, van Loeya A, Indrawatia, et al. The Effect of Pressure Processing on Food Quality Related Enzymes: From Kinetic Information to Process Engineering [J]. Prog Biotech, 2002, 19: 517-524.

[2] Sila D N, Duvetter T, de Roeck A, et al. Texture Changes of Processed Fruits and Vegetables: Potential Use of High-Pressure Processing [J]. Trends Food Sci Tech, 2008, 19, (6): 309-319.

[3] Sila D N, Smout C, Satara Y, et al. Combined Thermal and High Pressure Effect on Carrot Pectinmethylesterase Stability and Catalytic Activity [J]. J Food Eng, 2007, 78: 755-764.

[4] Zeng Q M, Pan J, Xie H M, et al. Effect of High Pressure (HP) Treatments on Polyphenoloxidase [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2004, 18(12): 144-148. (in Chinese)
曾庆梅,潘　见,谢慧明,等. 超高压处理对多酚氧化酶活性的影响 [J]. 高压物理学报, 2004, 18(2): 144-148.

[5] Oey I, Lille M, van Loey A, et al. Effect of High-Pressure Processing on Colour, Texture and Flavour of Fruit- and Vegetable-Based Food Products: A Review [J]. Trends Food Sci Tech, 2008, 19, (6): 320-328.

[6] Sila D N, Smout C, Satara Y, et al. Combined Thermal and High Pressure Effect on Carrot Pectinmethylesterase Stability and Catalytic Activity [J]. J Food Eng, 2007, 78, (3): 755-764.

[7] Liang F, Jiang B, Zhang T. Effect of Combined High Pressure and Thermal Treatment on Kiwifruit Peroxidase [J]. Food Chem, 2008, 109: 802-807.

[8] Broeck I V D, Ludikhuyze L R, Loey A M V, et al. Inactivation of Orange Pectinesterase by Combined High-Pressure and Temperature Treatments: A Kinetic Study [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(5): 1960-1970.

[9] de Cordt S, Ludikhuyze L, Weemaes C, et al. Enzyme Stability under High Pressure and Temperature [J]. Progress in Biotechnology, 1996, 13: 203-208.

[10] Morild E. The Theory of Pressure Effect on Enzymes [J]. Adv Protein Chem, 1981, (34): 93-166.

[11] Wang Z C, Xu X. Effect of Ultra High Pressure Disposal on Protein Structure and Property [J]. Cereals and Oils, 2007, 11: 10-12. (in Chinese)
王章存,徐　贤. 超高压处理对蛋白质结构及功能性质影响 [J]. 粮食与油脂, 2007, 11: 10-12.

[12] Heremans K. High Pressure Effects on Proteins and Other Biomolecules [J]. Annual Rev Biophys Bioeng, 1982, 11: 1-21.

[13] Morild E. The Theory of Pressure Effect on Enzymes [M]. Anfinsen C B, Edsall J T, Richards F M. Advances in Protein Chemistry Vol 34. New York: Academic Press, Inc, 1981: 93-166.

[14] Wang Z. Food Enzymology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1996: 229-253. (in Chinese)
王　璋. 食品酶学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 229-253.

[15] Xu Q, Yang T Q, Ao D G R L, et al. Study on the Effect of Electric Field on the Secondary Structure of HRP by Circular Dichroism [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2007, 27(3): 565-568. (in Chinese)
许　强,杨体强,敖敦格日勒,等. 应用圆二色光谱研究电场对辣根过氧化物酶二级结构的影响 [J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(3): 565-568.

[16] Zhong K, Sun Z J, Liao X J, et al. Effciency of High Pulsed Electric Field on the Activity and Conformation of Horseradish Peroxidase [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2005, 5(1): 31-36. (in Chinese)
钟　葵,孙志健,廖小军,等. 高压脉冲电场对辣根过氧化物酶活性及构象的影响效果 [J]. 中国食品学报, 2005, 5(1): 31-36.

[17] Li J R, Yu J. Effect of High Pressure Treatments on Enzyme Activeness [J]. Food Science and Technology, 2006, (9): 18-20. (in Chinese)
励建荣,俞　坚. 超高压对酶活的影响 [J]. 食品科技, 2006, (9): 18-20.

[18] Tarasiuk A, Grossman Y. High Pressure Reduces pH Sensitivity of Respiratory Center in Isolated Rat Brainstem

[J]. Respirat Physiol,1991,86:369-379.

[19] Zhong K,Hu X S,Wu J H,et al. Effects of High Pulsed Electric Field on the Secondary and Tertiary Structure of Lipoxygenas [J]. Spectroscopy and Spectral Analysi,2009,19(3):765-768. (in Chinese)
钟 葵,胡小松,吴继红,等. 高压脉冲电场对脂肪氧化酶二级和三级构象的影响效果 [J]. 光谱学与光谱分析,2009,19(3):765-768.

[20] Shen X C,Liang H,He X W,et al. Recent Trends and Spectroscopic Methods for Analysis of the Protein Conformation with Circular Dichroism [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry,2004,32(3):388-394. (in Chinese)
沈星灿,梁 宏,何锡文,等. 圆二色光谱分析蛋白质构象的方法及研究进展 [J]. 分析化学评述与进展,2004,32(3):388-394.

[21] Liang G Z,Sun S L,Chen M Y,et al. The Effect of High-Intensity Pulsed Electric Field on the Activity and Conformation of Horseradish Peroxidase [J]. Food and Machinery,2008,24(3): 21-24. (in Chinese)
梁国珍,孙沈鲁,陈梅英,等. 高压脉冲电场对辣根过氧化物酶活性及构象影响 [J]. 食品与机械,2008,24(3): 21-24.

Effects of High Pressure Processing on the Activity and the Conformation of Horseradish Peroxidase

SHANGGUAN Li-Juan, MA Yong-Kun,
CUI Feng-Jie, FAN Xiao-Bo

(*School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang* 212013, *China*)

Abstract: High pressure treatment on the activity of peroxidase in fruits and vegetables can affect the sensory quality and shelf life of fruit and vegetable products, and thus it is necessary to study the relationship between the changes of peroxidase activity and its structure under the conditions of high pressure. Circular dichroism(CD) and fluorescence spectrometry (FP) were used to study the effect of high pressure treatment at 100, 300, 500 MPa for 15 min at room temperature on the secondary and tertiary structure of horseradish peroxidase (HRP) and its activity. The results showed that HRP was pressure-resistant and HRP activities were decreased respectively by 2.36%, 5.69% and 10.36% with the increase of the above pressure. The contents of α-helix, β-sheet and random coils in HRP were all increased by less than 4%, while the content of β-turn was significantly decreased by over 11%. After HRP was processed by high pressure, the HRP fluorescence intensities at the excitation spectra peak of 234 nm and emission spectra peak of 308 nm were decreased respectively by 18.28%, 5.46% and 4.04%. The fluorescence intensity of HRP treated at 100 MPa, 15 min was decreased to the largest extent. The results showed that high pressure processing obviously inactivated the activity of horseradish peroxidase that was related to its structural changes.

Key words: high pressure processing; horseradish peroxidase; conformation; circular dichroism; fluorospectrophotometer