

带电短肽 T₇⁺、T₆⁻对 α-淀粉酶活性和构象的影响

杨晓钰^{1,2,3}, 李传博^{1,2,3}, 刘春莹^{1,2,3}, 孙付保⁴, 窦少华^{1,2,3*}

(¹大连大学生命健康学院 辽宁大连 116622

²辽宁省海洋微生物工程技术研究中心 辽宁大连 116622

³大连市动物免疫重点实验室 辽宁大连 116622

⁴江南大学生物工程学院 江苏无锡 214122)

摘要 利用带不同电荷的短肽 T₇⁺、T₆⁻,探讨正电荷短肽 T₇⁺和负电荷短肽 T₆⁻对 α-淀粉酶的活性和构象的影响。将短肽加入 α-淀粉酶体系后,测定其相对酶活、米氏常数(K_m)、活化能、Zeta 电位等指标。为了更清晰地观察不同带电量的短肽对 α-淀粉酶构象的影响,通过紫外吸收光谱、荧光光谱、同步荧光光谱、圆二色光谱进一步考察 α-淀粉酶构象的变化。结果表明,将带电短肽加入 α-淀粉酶的酶促反应中,正电荷短肽 T₇⁺抑制 α-淀粉酶酶活,当短肽质量浓度为 10⁻⁷ g/mL 时,α-淀粉酶相对酶活降低 2.40%,同时也使 α-淀粉酶与可溶性淀粉的亲合力降低,活化能升高,Zeta 电位增加。负电荷短肽 T₆⁻促进 α-淀粉酶酶活,当短肽质量浓度为 10⁻⁷ g/mL 时,α-淀粉酶相对酶活升高 1.40%,同时也使 α-淀粉酶与可溶性淀粉的亲合力升高,活化能降低,Zeta 电位增加。光谱分析表明,不同带电短肽使 α-淀粉酶的紫外-可见吸收光谱、荧光光谱以及二级结构发生不同程度的改变。这表明不同带电短肽可以发挥与电场相似的作用,即电场在作用于蛋白质时,产生的电场力促使蛋白质构象发生改变,人工设计合成短肽所带的表面电荷影响酶表面电荷的分布,进而导致酶的活性和构象发生改变。

关键词 α-淀粉酶; 带电短肽; 相对酶活; 构象

文章编号 1009-7848(2024)07-0014-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.002

α-淀粉酶 (EC 3.2.1.1), 属糖苷水解酶家族 (GHS; EC 3.2.1.x), 其可以快速水解淀粉, 是重要的淀粉水解酶, 由于末端的葡萄糖残基 C-1 呈现 α 构型, 称为 α-淀粉酶^[1]。α-淀粉酶具有温和、高效和专一的特点, 是目前生产量最大, 应用范围最广的一种水解酶, 也是工业生物技术中的重要催化剂^[2-3]。α-淀粉酶的市场需求量非常大, 在食品、洗涤、纺织、医疗等行业中应用广泛, 特别是在食品行业, 被广泛用于乳制品、肉制品、面制品、饮品、调味品等^[4-8]。如何提高酶活, 降低产业化生产成本, 是研究人员关注的问题。

酶的活性与其空间结构密切相关^[9], 构象发生改变能够引起酶活性的改变。1997 年, 华南理工大学以“高压电场对液化酶的活性研究”打开了电

场对酶促反应研究的新篇章^[10]。目前, 电场技术也应用于提高酶的活性, 从而提高高级代谢产物的生成。例如, Rodrigues 等^[11]在不同的预热温度下利用脉冲电场或欧姆加热优化胡萝卜和苹果胶, 它们的抗氧化活性和过氧化物酶活性都产生变化, 酶活的提高可以更好地保留胡萝卜和苹果泥中的植物次生代谢产物。2022 年, 张家威等^[12]通过电化学发酵研究阴、阳两极电荷对运动发酵单胞菌发酵效率的影响, 结果发现电荷的存在提高了甘油的产率, 影响运动发酵单胞菌的代谢途径。施加一定的电场力, 在一定程度上提高了酶的活性, 加快了代谢产物的生成, 然而, 此方法具有操作复杂, 不环保等缺陷, 需要寻找一种操作更简便、低耗能的方法, 来提高酶的活性, 降低产业化生产成本。

本研究设计不同带电量的短肽 T₇⁺和 T₆⁻, 将 T₇⁺和 T₆⁻溶液加入 α-淀粉酶作用体系中, 观察带电短肽对酶活性的影响, 并计算米氏常数、活化能、Zeta 电位。利用紫外吸收光谱、荧光光谱、同步荧光光谱、圆二色光谱等方法探究带电短肽对 α-淀粉酶构象的影响。

收稿日期: 2023-07-22

基金项目: 辽宁省教育厅高校基本科研面上项目 (JYTMS 20230376); 辽宁省自然科学基金项目 (2014020134)

第一作者: 杨晓钰, 女, 硕士生

通信作者: 窦少华 E-mail: doushaohua@dlu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

α-淀粉酶 A4551, 美国 Sigma-Aldrich 公司; NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、葡萄糖、可溶性淀粉、3,5-二硝基水杨酸 (3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS) (分析纯级), 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 仪器与设备

CS336X 多肽合成仪, 美国 CSBio 有限公司; Varioskan LUX 多功能酶标仪, Thermo Fisher Scientific Incorporated; V-560 型紫外-可见 (UV-Vis) 光谱仪、FP-6500 荧光/磷光光谱仪、J-810 圆二色光谱仪, 日本 Jasco Company; Zeta 电位仪, Brookhaven Instruments Inc。

1.3 方法

1.3.1 还原糖标准曲线的绘制 还原糖标准曲线在波长 540 nm 处测得吸光值, 参考 Millerr^[13]和 Ghose^[14]的方法绘制标准曲线, 见图 1。

1.3.2 α-淀粉酶活性的测定

1) 用 DNS 测定 α-淀粉酶活力^[13-14], 公式为:

$$\alpha\text{-淀粉酶活力 (U/mg)} = C/(t \times m) \quad (1)$$

式中: C 为标准曲线上查得的葡萄糖含量, mg; m 为 0.2 mL 酶液中含有的酶的质量, mg; t 为反应时间, min。

2) 依据鲁明杰等^[15]的方法并稍加改进, 100 μL 0.1 mg/mL α-淀粉酶溶液 (由 pH=6.9, 0.01

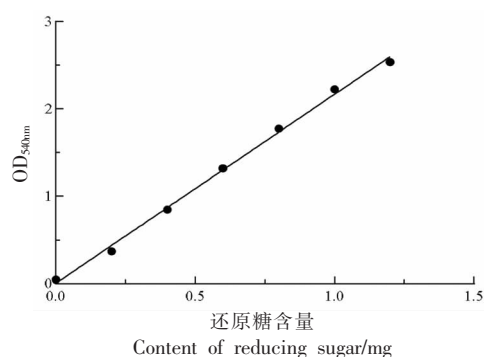


图 1 还原糖的标准曲线

Fig.1 Standard curve of reducing sugar

mol/L 磷酸盐缓冲液 PBS 配制), 40 °C 预热 2 min, 加入 150 μL 2.0% 淀粉溶液混匀, 40 °C 水浴 1 min, 加入 150 μL DNS 溶液沸水浴 5 min, 再加入 1 000 μL 超纯水稀释, 混匀加至 96 孔板, 多功能酶标仪在波长 540 nm 下测得酶活。

将 pH 值为 6.9, 温度为 40 °C 时, 每分钟水解淀粉产生 1.0 mg 的葡萄糖所需的 α-淀粉酶量定义为 1 个酶活力单位。

1.3.3 带电短肽对 α-淀粉酶酶促反应的影响 本试验通过实验室已合成的 2 条不同带电性、不同分子质量的短肽 T₇⁺和 T₆⁻。合成的短肽纯度均在 95% 以上, 可溶性较好, 且排除带电短肽与 α-淀粉酶相互作用, 符合试验所需条件。具体合成结果见表 1。

表 1 短肽合成结果

Table 1 Results of short peptide synthesis

短肽编号	序列	长度	相对分子质量	纯度/%	等电点	pH 6.9 电荷量
T ₇ ⁺	KHKGKAG	7	724.85	95.39	11.11	3.21
T ₆ ⁻	ADDKEAC	7	750.78	97	4.38	-1.05

1) 相关试剂配制 10⁻⁴ g/mL T₇⁺溶液: 1 mg T₇⁺加入 10 mL PBS (pH=6.9, 0.01 mol/L), 混匀备用。

10⁻⁴ g/mL T₆⁻溶液: 1 mg T₆⁻加入 10 mL PBS (pH=6.9, 0.01 mol/L), 混匀备用。

2) 方法 分别稀释 10⁻⁴ g/mL 的 T₇⁺、T₆⁻溶液至 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ g/mL; 向 α-淀粉酶作用体系中分别加入质量浓度 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ g/mL 的 T₇⁺、T₆⁻溶液; 以相同质量浓度 PBS 替代 T₇⁺溶液、T₆⁻溶液, 作为对照组。测定方法与 1.3.2 节 α-

淀粉酶活性的测定方法一致, 在波长 540 nm 下测定 α-淀粉酶活力变化。

1.3.4 带电短肽对 α-淀粉酶米氏常数的影响 将 2% 的淀粉溶液依次稀释至 0.25%, 0.5%, 1.0%, 1.5% 的底物浓度。把 200 μL 10⁻⁴ g/mL 的 T₇⁺、T₆⁻溶液加入 200 μL 不同浓度的淀粉酶溶液中, 40 °C 水浴反应 5 min, 测得还原糖的产量。按照底物浓度和反应速率的关系, 使用双倒数法作图, 可得到最大反应速率 V_m 和米氏常数 K_m^[16-17]。

1.3.5 带电短肽对 α-淀粉酶影响的动力学分析

1) 活化能的测定 将稀释后的 200 μL 10^{-4} g/mL 的 T_7^+ 、 T_6^- 溶液分别加入 200 μL 10^{-4} g/mL 的 α -淀粉酶溶液中, 在 30 $^\circ\text{C}$ 和 40 $^\circ\text{C}$ 下均按阿伦尼乌斯公式(Arrhenius)计算活化能^[18-19]。

2) Zeta 电位的测定 将 1.4 mL 的 α -淀粉酶溶液、 10^{-4} g/mL 的 T_7^+ 溶液、 α -淀粉酶溶液 (10^{-4} g/mL T_7^+ 处理)、 10^{-4} g/mL 的 T_6^- 溶液、 α -淀粉酶溶液 (10^{-4} g/mL T_6^- 处理) 分别加入到 Zeta 电位仪样品池中, 测得各自电位^[20-21]。

3) 紫外可见吸收光谱的测定 取 2 mL α -淀粉酶溶液置于 10 mm 石英比色皿中, 依次加入与 α -淀粉酶溶液物质的量比为 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 1:15 的 T_7^+ 溶液, 狭缝宽度 2 nm, 扫描波长范围 220~700 nm, 扫描速率 200 nm/min, 以未加短肽的 α -淀粉酶溶液作为对照进行紫外-可见吸收光谱测定^[22]。重新取 α -淀粉酶溶液 2 mL, 以同样方法测定 T_6^- 溶液紫外-可见吸收光谱。

4) 荧光光谱的测定 取 2 mL α -淀粉酶溶液置于 10 mm 石英比色皿中, 依次加入与 α -淀粉酶溶液物质的量比为 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 1:15 的 T_7^+ 溶液, 激发波长 333 nm, 狭缝宽度 5 nm, 荧光光度计记录 290~750 nm 波长范围内的荧光发射光。再以 $\Delta\lambda=20$ nm 和 $\Delta\lambda=60$ nm 测定 α -淀粉酶的酪氨酸和色氨酸同步荧光光谱。以同样的方法测定 T_6^- 溶液的荧光光谱和同步荧光光谱^[23-24]。

5) 圆二色谱的测定 取 400 μL α -淀粉酶溶液置于 1 mm 比色皿中, 分别加入与 α -淀粉酶溶液最大物质的量比 1:15 的 T_7^+ 溶液、 T_6^- 溶液, 扫描速度 50 nm/min, 波长范围 190~250 nm, 狭缝宽度 4 nm, 进行圆二色谱的测定^[25]。

2 结果与分析

2.1 带电短肽对 α -淀粉酶活性的影响

不同带电短肽加入 α -淀粉酶作用体系中, 结果如图 2 所示。正电荷短肽 T_7^+ 溶液处理过的 α -淀粉酶, 相对酶活降低。当短肽质量浓度为 10^{-7} g/mL 时, α -淀粉酶相对酶活降低 2.40%; 当短肽质量浓度升高至 10^{-4} g/mL 时, α -淀粉酶相对酶活降低 5.35%。表明 T_7^+ 抑制了 α -淀粉酶的酶促反应, 且随着正电荷短肽浓度的增加, 抑制作用增强。负电

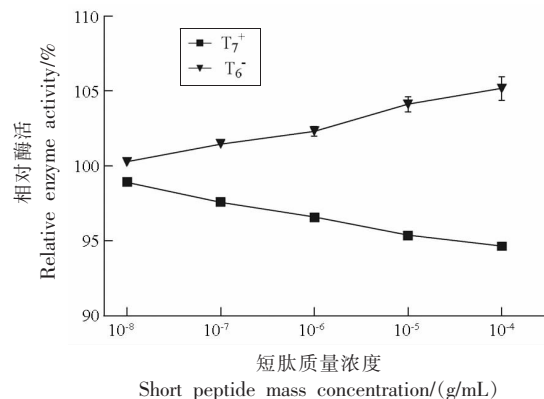


图 2 不同质量浓度的短肽对 α -淀粉酶活性的影响
Fig.2 Effect of different mass concentrations of short peptides on α -amylase activity

荷短肽 T_6^- 溶液处理过的 α -淀粉酶, 相对酶活升高。当短肽质量浓度为 10^{-7} g/mL 时, α -淀粉酶相对酶活升高 1.40%; 当短肽质量浓度升高至 10^{-4} g/mL 时, α -淀粉酶相对酶活升高 5.17%。表明 T_6^- 促进了 α -淀粉酶的酶促反应, 且随着负电荷短肽质量浓度的增加, 促进作用增强。

Li 等^[26]把强度为 10 kV/cm 脉冲电场作用于碱性蛋白酶与酪蛋白反应体系中, 碱性蛋白酶活性提高 11.26%。Okumura 等^[27]在电场强度 (4 000 kV/m) 和脉冲宽度 (10 μs) 条件下, α -淀粉酶活性随着脉冲电场强度的增加而降低。推测电场影响酶作用理论用于带电短肽对 α -淀粉酶酶促反应仍然可行, 然而作用效果与脉冲电场作用效果相同或相反, 原因可能是酶本身或是短肽本身带电性的不同导致不同的作用效果。

2.2 带电短肽对 α -淀粉酶米氏常数的影响

米氏常数 K_m 是酶的一个基本特征常数, K_m 和 V_m/K_m 表征酶促反应中 α -淀粉酶与底物的亲和力。由表 2 可知, T_7^+ 加入 α -淀粉酶体系后, K_m 减小, V_m/K_m 增大, 说明正电荷短肽使 α -淀粉酶与可溶性淀粉的亲和力增加; 当 T_6^- 加入 α -淀粉酶体系后, K_m 升高, V_m/K_m 减小, 故负电荷短肽的加入使 α -淀粉酶与底物的亲和力减小。Karube 等^[28]研究了脂肪酶-液晶膜在没有外加电场的情况下, 脂肪酶-液晶膜的表观米氏常数与常规条件下的表观米氏常数相同。而在外加电场作用下, 脂肪酶-液晶膜的最大流速 (V_m) 增大。结合本试验带不同电荷的短肽使 K_m 和 V_m/K_m 呈现不同变化趋势, 说明

带电荷短肽可以产生与外加电场相似的作用力,且所带电荷的电性不同,产生的作用力作用效果不同,与 2.1 节结果相印证。

Kulbacka 等^[29]用脉冲电场预处理过的牛血清白蛋白和姜黄素相互作用后,姜黄素和 BSA 结合常数提高了 6.77 倍。说明脉冲电场和电荷短肽预

处理 α -淀粉酶后,蛋白质结构更加无序,暴露更多疏水区域,从而增加了 α -淀粉酶的结合亲和力,这与正电荷短肽 T_7^+ 对 α -淀粉酶作用结果一致。推测在 T_7^+ 作用于 α -淀粉酶之后, α -淀粉酶的构象发生了改变。

表 2 α -淀粉酶加入短肽后的动力学参数

组别	米氏方程曲线	K_m /(mol/L)	V_m /[mol/(L·min)]	V_m/K_m
空白	$y=0.0129x+4.422$	62.07	0.23	0.0037
T_7^+	$y=0.0102x+3.4496$	40.91	0.43	0.0105
T_6^-	$y=0.0142x+5.3109$	64.29	0.20	0.0031

2.3 带电短肽对 α -淀粉酶活化能的影响

如图 3 所示,加入 T_7^+ 溶液后,与空白对照组相比,活化能升高。当短肽质量浓度为 10^{-8} g/mL 时, α -淀粉酶的活化能无限接近对照组;当短肽质量浓度升高至 10^{-4} g/mL 时, α -淀粉酶的活化能升高 5.1%,随着正电短肽浓度的升高,活化能升高幅度增大。加入 T_6^- 溶液后,与空白对照组相比,活化能降低。当短肽质量浓度为 10^{-8} g/mL 时, α -淀粉酶的活化能降低 1.01%;当短肽质量浓度升高至 10^{-4} g/mL 时, α -淀粉酶的活化能降低 0.8%。 T_7^+ 加入 α -淀粉酶作用体系后,活化能升高,酶活降低; T_6^- 加入 α -淀粉酶作用体系后,活化能降低,酶活升高,与实际相符。

Krzemińska 等^[30]在 HIV-1 蛋白酶催化蛋白质水解反应中,发现蛋白质在 HIV-1 酶的活性部位产生了电场,所产生的电场力作用于酶活性部位,活性部位的结构发生变化,导致酶促反应中活化能升高,酶活降低。这与本试验 T_7^+ 作用于 α -淀粉酶酶促反应的结果相符,进一步验证了 T_7^+ 溶液所带的正电荷和 HIV-1 酶活性部位的电场作用相同,作用于酶活性部位,活性部位构象发生变化,导致酶促反应中活化能升高,以及酶活降低。

2.4 带电短肽对 α -淀粉酶 Zeta 电位的影响

带电短肽 T_7^+ 、 T_6^- 加入 α -淀粉酶体系后摇匀进行电位测定,结果如表 3 所示。由表 3 可知, T_7^+ 加入 α -淀粉酶体系后,Zeta 电位增加了 85%; T_6^- 加入 α -淀粉酶体系后,Zeta 电位增加了 7%,说明 T_7^+ 和 T_6^- 的加入影响了 α -淀粉酶表面电荷的分布,酶的构象可能发生了改变。

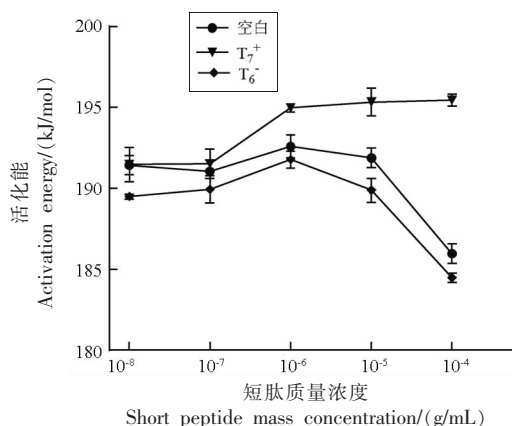


图 3 α -淀粉酶的活化能

Fig.3 Activation energy of α -amylase

表 3 α -淀粉酶 Zeta 电位结果

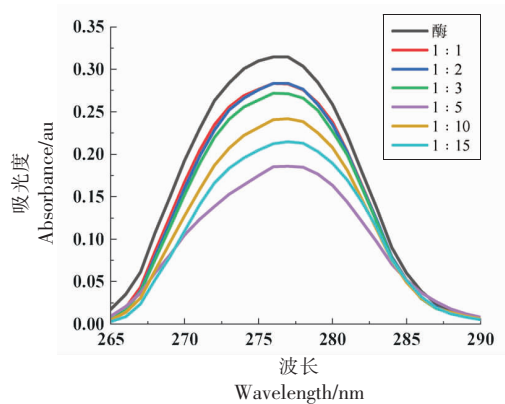
样品	Zeta 电位/mV
α -淀粉酶(未处理)	-20.77
T_7^+	1.64
α -淀粉酶(T_7^+ 处理)	-3.02
T_6^-	-3.03
α -淀粉酶(T_6^- 处理)	-19.33

Wu 等^[31]利用电场强度为 25 kV/cm 的脉冲电场处理蛋清溶液,Zeta 电位同样呈上升趋势,增加 36.9%。本试验中带电短肽也使 α -淀粉酶的 Zeta 电位值发生变化,由此可知,带电短肽也产生了与脉冲电场相似的作用, α -淀粉酶表面电荷发生重排,从而导致 α -淀粉酶 Zeta 电位和构象发生改变。

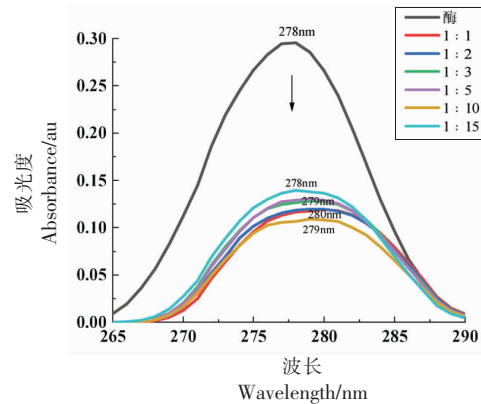
2.5 紫外可见吸收光谱测定结果

如图 4a 所示, α -淀粉酶溶液中加入一定物质的量比的 T_7^+ 溶液处理后, 发现溶液中 α -淀粉酶吸收峰位置没有明显变化, 吸收强度均降低。如图 4b 所示, α -淀粉酶溶液中加入一定物质的量比的

T_6^- 溶液处理后, 发现当 T_6^- 与 α -淀粉酶溶液物质的量比为 1:15 时, α -淀粉酶吸收峰略微红移 1 nm, 吸收强度降低且降低不均匀, 表明 T_6^- 处理导致 α -淀粉酶芳香氨基酸残基周围的微环境疏水性降低^[32], α -淀粉酶的构象可能发生了改变。



(a) 与 α -淀粉酶溶液不同物质的量比的 T_7^+ 溶液作用于 α -淀粉酶的紫外光谱



(b) 与 α -淀粉酶溶液不同物质的量比的 T_6^- 溶液作用于 α -淀粉酶的紫外光谱

图 4 α -淀粉酶的紫外光谱

Fig.4 UV spectrum of α -amylase

2.6 荧光光谱测定结果

内源荧光光谱法可以测定芳香侧链微环境改变引起的蛋白质三级结构的变化^[33]。测定结果如图 5a 所示, 在 α -淀粉酶中添加不同物质的量比的 T_7^+ 溶液, 随着 T_7^+ 溶液占比增加, α -淀粉酶的荧光强度逐渐增强, 进一步说明 α -淀粉酶经过 T_7^+ 处理后, α -淀粉酶表面电荷排布发生了变化, 其构象也发生改变, 与上述紫外-可见吸收光谱结果一致。如图 5b 所示, 加入 T_6^- 溶液后, 当物质的量比为 1:10 以下时, α -淀粉酶的荧光强度降低; 物质的量比高于 1:10 时, α -淀粉酶的荧光强度升高, 而吸收峰位置并未发生变化, 这一现象可能是当短肽质量浓度过低, 不能使 α -淀粉酶构象构发生改变。不同浓度的负电荷短肽对 α -淀粉酶构象影响也各不相同。

Guionet 等^[34]向 α -淀粉酶施加电场, 发现 α -淀粉酶的荧光强度和荧光吸收峰发生变化, 并且电场强度越高, α -淀粉酶活性降低越快。这与本研究 T_7^+ 处理 α -淀粉酶的结果相吻合, 证实了电场可以改变酶的活性和构象, 并且人工设计合成的带电荷短肽具备与电场类似的作用, 可以产生同等

的作用效果, 进一步验证, 不论是电场还是带电短肽都可以改变酶的构象进而改变酶的活性。

利用同步荧光光谱进一步研究蛋白质芳香侧链微环境的变化, 确定 Tyr 和 Trp 微环境的特征变化^[35]。同步荧光光谱如图 5c 所示, 当 $\Delta\lambda=20$ nm 时, 加入 T_7^+ 和 T_6^- 溶液后, α -淀粉酶荧光峰轻微蓝移, 说明少量 Tyr 残基暴露在疏水环境中, 极性微环境减少, 疏水性增强^[36]。如图 5d 所示, 当 $\Delta\lambda=60$ nm 时, T_7^+ 和 T_6^- 处理的 α -淀粉酶荧光峰红移至 346 nm 且荧光强度上升, 说明 Trp 残基周围的极性微环境增加, 疏水性减弱, 进一步证实酶的构象发生了改变。

2.7 圆二色谱测定结果

圆二色谱经常用于测量蛋白质二级结构的含量^[37]。如图 6a 所示, 加入 T_7^+ 后, 在波长 222 nm 处的负吸收峰先上升再逐渐消失, α -淀粉酶“W 形”吸收峰转变为“V 形”吸收峰, 波长 208 nm 处负吸收峰上升, 发生红移且峰强度增加。说明 T_7^+ 对 α -淀粉酶具有一定的影响, 使 α -淀粉酶的二级结构发生明显变化, 进而 α -淀粉酶的构象发生改变。如图 6b 所示, 加入 T_6^- 后, α -淀粉酶“W 形”吸收峰

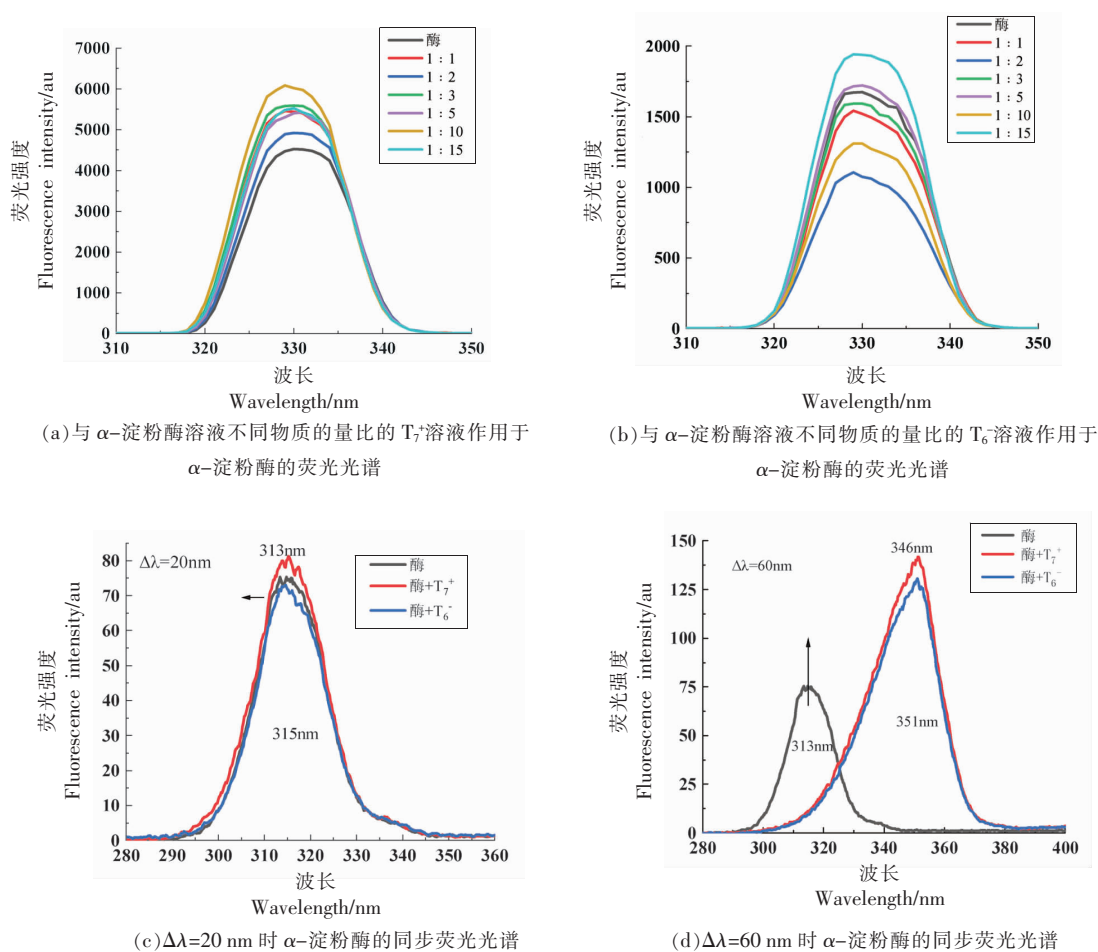


图 5 α-淀粉酶的荧光光谱和同步荧光光谱

Fig.5 Fluorescence spectra and simultaneous fluorescence spectra of α-amylase

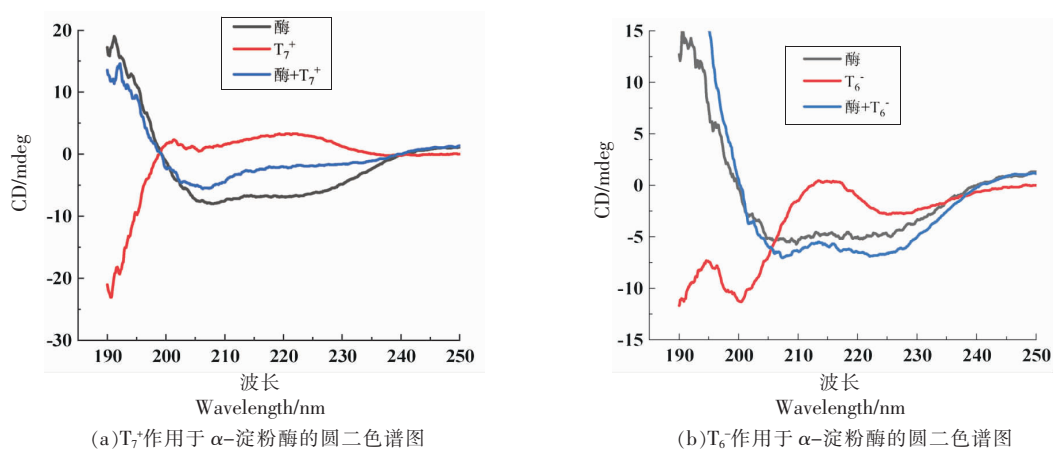


图 6 α-淀粉酶的圆二色谱图

Fig.6 Circular dichroism of α-amylase

形无明显变化,波长 208 nm 处的负吸收峰强度上升,说明 T₆⁻ 的加入也让 α-淀粉酶的二级结构发生

一定变化,导致酶整体构象发生改变。

根据圆二色谱试验结果,利用 Yang 方程计算

表4 α -淀粉酶结构中 α -螺旋含量变化Table 4 Changes in α -helix content in the structure of α -amylase

样品	α -螺旋含量/%
α -淀粉酶	34.60
T_7^+ α -淀粉酶	33.53
T_6^- α -淀粉酶	40.06

α -淀粉酶的 α -螺旋百分含量^[38],结果如表4所示。 T_7^+ 使 α -淀粉酶的 α -螺旋含量降低3%。 T_6^- 使 α -淀粉酶的 α -螺旋含量升高16%。Yang方程计算得到的 α -螺旋含量变化同样说明 T_7^+ 和 T_6^- 使 α -淀粉酶构象发生了改变,影响了 α -淀粉酶的活性。

3 结论

在 α -淀粉酶酶促反应条件为40℃,缓冲液浓度为0.01 mol/L,pH值为6.9时,将带电短肽 T_7^+ 、 T_6^- 加入酶促反应体系后,发现 T_7^+ 抑制了 α -淀粉酶的酶活, T_6^- 促进了 α -淀粉酶的酶活,说明 α -淀粉酶酶活性与短肽所带电荷种类有关。通过对 α -淀粉酶米氏常数、活化能、Zeta电位的计算,发现 T_7^+ 降低了 α -淀粉酶与可溶性淀粉的亲合力,增加了 α -淀粉酶的活化能, T_6^- 增加了 α -淀粉酶与可溶性淀粉的亲合力,降低了 α -淀粉酶的活化能,Zeta电位均升高。最后利用紫外可见光谱、荧光光谱、圆二色谱检测,推测带电短肽发挥与电场相似的作用,改变了 α -淀粉酶周围微环境,导致酶的构象发生变化,从而使 α -淀粉酶活性改变。

目前,带电物质对酶的影响研究处于起步阶段,虽然国内外已有大量研究采用高频、低频电场作用于实际应用中,但是电场应用于生产中具有较大困难。本文探究了不同带电短肽对 α -淀粉酶的活性和构象的影响,由于不同的酶有不同的特性,带电短肽电荷量不足,故结论尚不具备广泛性,需要以更多的酶为研究对象,设计合成带更多电量的短肽来验证,寻找更加直接的技术手段做进一步研究,为未来工业化生产新型酶激活剂或酶抑制剂奠定基础,使酶制剂更广泛地应用于食品、医疗等领域。

参 考 文 献

- [1] BURHANOĞLU T, SÜRMELE Y, ŞANLI-MOHAMED G. Identification and characterization of novel thermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. GS33[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 578-585.
- [2] AEHLE W, MISSET O. Enzymes for industrial applications[M]. Netherlands: Biotechnology Set, 2008: 189-216.
- [3] PAUL J S, GUPTA N, BELIYA E, et al. Aspects and recent trends in microbial α -amylase: A review[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(8): 2649-2698.
- [4] 吴襟,彭平,沈文,等.嗜碱性芽孢杆菌碱性 α 淀粉酶的纯化和性质[J].中国生物化学与分子生物学报,2005,21(6):852-856.
WU J, PENG P, SHEN W, et al. Purification and characterization of α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. strain BG-CSN[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 21(6): 852-856.
- [5] HENDRIKSEN H V, PEDERSEN S, BISGARD-FRANTZEN H, et al. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches: AU1663799A[P]. 1999-07-26.
- [6] GUPTA R, GIGRAS P, MOHAPATRA H, et al. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective[J]. Process Biochemistry, 2003, 38(11): 1599-1616.
- [7] NAZIR D J, MORI L, PADALA V R, et al. Evaluation of a turbidimetric procedure for apolipoproteins A1 and B on the Ciba coming 550 EXPRESS[J]. Clinical Biochemistry, 1993, 26(6): 477-482.
- [8] 荒胜俊,佐伯胜久,五十岚一晓,等.液化碱性 α -淀粉酶、其制备方法及其含有它的洗涤剂组合物:CN1110058[P].日本,1995-10-11.
KATSUTOSHI A, KATSUHISA S, ICHIYO I, et al. Liquefied alkaline alpha-amylase, its preparation method and detergent composition containing it: CN1110058[P]. Japan, 1995-10-11.
- [9] 柯涛. α -淀粉酶的分子定向进化及其突变体结构与功能研究[D].武汉:华中科技大学,2006.
KE T. Molecularly directed evolution of α -amylase and its mutant structure and function[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology,

- 2006.
- [10] 曾新安, 高大维, 李国基, 等. 高压电场对液化酶的活性影响及其机理探讨[J]. 食品科学, 1997, 18(6): 3-5.
- ZENG X A, GAO D W, LI G J, et al. Effect of high voltage electric field on the activity of liquefied enzymes and its mechanism[J]. Food Science, 1997, 18(6): 3-5.
- [11] RODRIGUES R M, AVELAR Z, MACHADO L, et al. Electric field effects on proteins - Novel perspectives on food and potential health implications[J]. Food Research International, 2020, 137: 109709.
- [12] 张家威, 王亮, 爱赛姆克热尼, 等. 生物电化学系统对运动发酵单胞菌代谢的影响[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2513-2522.
- ZHANG J W, WANG L, AISEMKHENI, et al. Effect of bio-electrochemical system on the metabolic changes of *Zymomonas mobilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2513-2522.
- [13] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [14] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure & Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257-268.
- [15] 鲁明杰, 李传博, 谢丹丹, 等. 人工设计短肽对 α-淀粉酶催化作用的影响[J]. 中国酿造, 2021, 40(11): 198-202.
- LU M J, LI C B, XIE D D, et al. Effect of artificially designed short peptides on the catalytic action of α-amylase[J]. China Brewing, 2021, 40(11): 198-202.
- [16] 陈立功, 吴家葳, 张冉, 等. 发光杆菌产几丁质酶的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 110-114, 131.
- CHEN L G, WU J W, ZHANG R, et al. Process optimization of chitinase production by *Bacillus luminescence*[J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(1): 110-114, 131.
- [17] 吴梅芬, 王晓岗, 许新华. 蔗糖酶米氏常数测定实验方法的改进[J]. 实验技术与管理, 2014, 31(7): 43-45, 49.
- WU M F, WANG X G, XU X H. Improvement of experimental method for the determination of sucrase Mie constant[J]. Experimental Techniques and Management, 2014, 31(7): 43-45, 49.
- [18] 李金鹏, 齐晓琴, 刘建花, 等. 库特氏杆菌 β-类胡萝卜
- 萝卜素降解酶的酶学性质[J]. 中国食品添加剂, 2017(4): 59-66.
- LI J P, QI X Q, LIU J H, et al. Enzymatic properties of β-carotenoid degrading enzymes from *Bacillus couturier*[J]. China Food Additives, 2017(4): 59-66.
- [19] 刘莹, 李跃腾, 王标. 基于蔗糖水解反应速率常数及活化能的测定实验催化剂和反应条件的优化[J]. 教育信息化论坛, 2018, 2(9): 14-16.
- LIU Y, LI Y T, WANG B. Optimization of experimental catalysts and reaction conditions based on the determination of sucrose hydrolysis reaction rate constants and activation energy[J]. Education Information Technology Forum, 2018, 2(9): 14-16.
- [20] 周娱. 蛋白溶液中粒子间相互作用及其在食品中的应用研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2020.
- ZHOU Y. Research on inter-particle interactions in protein solutions and their applications in food[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology and Industry, 2020.
- [21] YANG Q, WANG B C, ZHANG Z, et al. The effects of macromolecular crowding and surface charge on the properties of an immobilized enzyme: Activity, thermal stability, catalytic efficiency and reusability[J]. RSC Advances, 2017, 7(60): 38028-38036.
- [22] 张寒俊, 刘大川, 杨国燕. 紫外光谱法定量测定不同种蛋白酶活力的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2004(9): 44-45.
- ZHANG H J, LIU D C, YANG G Y. Quantitative determination of different protease activities by ultraviolet spectroscopy [J]. Grain and Feed Industry, 2004(9): 44-45.
- [23] 马雪红, 肖文浚, 李金芳, 等. 同步荧光法研究大蒜辣素与不同类型蛋白的相互作用[J]. 化学研究与应用, 2020, 32(7): 1161-1169.
- MA X H, XIAO W J, LI J F, et al. Simultaneous fluorescence method to study the interaction of allicin with different types of proteins [J]. Chemical Research and Applications, 2020, 32(7): 1161-1169.
- [24] 陈莉华, 黄飞, 刘六战, 等. 吡罗红为底物的辣根过氧化物酶催化荧光反应测定葡萄糖[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(5): 917-921.
- CHEN L H, HUANG F, LIU L Z, et al. Determination of glucose by horseradish peroxidase-catalyzed fluorescence reaction with pyrrolizidine as a substrate

- [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2003, 23(5): 917-921.
- [25] 吴明和. 圆二色光谱在蛋白质结构研究中的应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2010, 32(4): 77-80.
WU M H. Application of circular dichroism spectroscopy in protein structure studies[J]. Amino Acids and Bioresources, 2010, 32(4): 77-80.
- [26] LI Y L, ZHANG S Y, BAO Z J, et al. Exploring the activation mechanism of alcalase activity with pulsed electric field treatment: Effects on enzyme activity, spatial conformation, molecular dynamics simulation and molecular docking parameters[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2022, 76: 102918.
- [27] OKUMURA T, YAEGASHI T, FUJIWARA T, et al. Influence of pulsed electric field on enzymes, bacteria and volatile flavor compounds of unpasteurized sake[J]. Plasma Science and Technology, 2018, 20(4): 044008.
- [28] KARUBE I, YUGETA Y, SUZUKI S. Electric field control of lipase membrane activity[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1977, 19(10): 1493-1501.
- [29] KULBACKA J, WILK K A, BAZYLIŃSKA U, et al. Curcumin loaded nanocarriers with varying charges augmented with electroporation designed for colon cancer therapy [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(3): 1377.
- [30] KRZEMIŃSKA A, MOLINER V, ŚWIDEREK K. Dynamic and electrostatic effects on the reaction catalyzed by HIV-1 protease[J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(50): 16283-16298.
- [31] WU L, ZHAO W, YANG R J, et al. Effects of pulsed electric fields processing on stability of egg white proteins [J]. Journal of Food Engineering, 2014, 139: 13-18.
- [32] GAO W H, LI N N, CHEN Y W, et al. Study of interaction between syringin and human serum albumin by multi-spectroscopic method and atomic force microscopy[J]. Journal of Molecular Structure, 2010, 983(1/2/3): 133-140.
- [33] ZAMORANO L S, PINA D G, GAVILANES F, et al. Two-state irreversible thermal denaturation of anionic peanut (*Arachis hypogaea* L.) peroxidase[J]. Thermochimica Acta, 2004, 417(1): 67-73.
- [34] GUIONET A, FUJIWARA T, SATO H, et al. Pulsed electric fields act on tryptophan to inactivate α -amylase[J]. Journal of Electrostatics, 2021, 112: 103597.
- [35] DUAN R, WU D, TANG L, et al. Interactions of the cis and trans states of an azobenzene photo-switch with lysozyme induced by red and blue light [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 229: 117965.
- [36] LI Y, KOOPAL L K, CHEN Y, et al. Conformational modifications of lysozyme caused by interaction with humic acid studied with spectroscopy[J]. Science of the Total Environment, 2021, 768: 144858.
- [37] ZHONG K, WU J H, WANG Z F, et al. Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO [J]. Food Chemistry, 2007, 100(1): 115-123.
- [38] 刘红江, 于云霞. Hom-Yang-Baxter 方程的解[J]. 许昌学院学报, 2013, 32(2): 14-16.
LIU H J, YU Y X. Solution of Hom-Yang-Baxter equation[J]. Journal of Xuchang College, 2013, 32(2): 14-16.

Effect of Charged Short Peptides T_7^+ and T_6^- on the Activity and Structure of α -Amylase

Yang Xiaoyu^{1,2,3}, Li Chuanbo^{1,2,3}, Liu Chunying^{1,2,3}, Sun Fubao⁴, Dou Shaohua^{1,2,3*}

¹School of Life and Health, Dalian University, Dalian 116622, Liaoning

²Liaoning Marine Microbial Engineering and Technology Research Centre, Dalian 116622, Liaoning

³Key Laboratory of Animal Immunity, Dalian 116622, Liaoning

⁴School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu)

Abstract In this experiment, differently charged short peptides T_7^+ and T_6^- were used to investigate the mechanism of the change in α -amylase activity and conformation by the positively charged short peptide T_7^+ and the negatively charged

short peptide T₆⁻. The changes of α-amylase activity and conformation were verified by the determination of relative enzyme activity, Mie's constant (K_m), activation energy and zeta potential after the addition of short peptides to α-amylase system. In order to observe more clearly the effects of different charged short peptides on the conformation of α-amylase, UV absorption spectra, fluorescence spectra, simultaneous fluorescence spectra and circular dichroism spectra were also introduced to further investigate the conformational changes of α-amylase. The results showed that the addition of the charged short peptide into the enzymatic reaction of α-amylase, the positively charged short peptide T₇⁺ inhibited the α-amylase enzyme activity, and the relative enzyme activity of α-amylase decreased by 2.40% when the short peptide concentration was 10⁻⁷ g/mL, and also decreased the affinity of α-amylase with soluble starch, increased the activation energy and increased the zeta potential. The negatively charged short peptide T₆⁻ promoted the α-amylase enzyme activity, and when the short peptide concentration was 10⁻⁷ g/mL, the relative enzyme activity of α-amylase increased by 1.40%, and also made the affinity of α-amylase with soluble starch increase, the activation energy decrease and the zeta potential increase. Spectroscopic analysis showed that different charged short peptides changed the UV-visible absorption spectrum, fluorescence spectrum and secondary structure of α-amylase to different degrees. It was demonstrated that different charged short peptides could play a role similar to that of electric field, the electric field force generated by the electric field when acting on the proteins contributed to the conformational change of the proteins, and the surface charge of the artificially designed synthetic short peptides affected the distribution of the surface charge of the enzyme, which led to the change of the enzyme activity and conformation.

Keywords α-amylase; charged short peptide; relative enzyme activity; conformation