

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2025.02.022

杨琪, 纪佳仪, 蒋昕悦, 等. 人工合成带电短肽 T_1^+ 、 T_2^- 对 α -淀粉酶调控机制初探[J]. 粮油食品科技, 2025, 33(2): 163-170.YANG Q, JI J Y, JIANG X Y, et al. A preliminary study on the regulatory mechanism of synthetic charged short peptides T_1^+ and T_2^- to α -amylase[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2025, 33(2): 163-170.

人工合成带电短肽 T_1^+ 、 T_2^- 对 α -淀粉酶调控机制初探

杨琪, 纪佳仪, 蒋昕悦, 陈书书, 杨晓钰, 刘春莹, 窦少华✉

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. 大连市动物免疫学重点实验室, 辽宁 大连 116622)

摘要: 为探究酶与底物作用体系中带电短肽是否对酶活性及其结构产生影响, 探讨人工合成带电短肽对 α -淀粉酶的调控机制, 添加人工合成带电短肽 T_1^+ 和 T_2^- 到 α -淀粉酶催化体系中, 并测定酶活性、Zeta 电位等指标。结果表明, 短肽 T_1^+ 的加入使 α -淀粉酶活性降低 1.29%, 短肽 T_2^- 的加入使 α -淀粉酶活性升高 0.4%, 同时, 二者使酶结构发生了不同改变, 分子对接结果表明带电短肽使 α -淀粉酶与底物相互作用的构象发生了变化。推测人工带电短肽对酶的调控机制是通过改变酶表面及活性中心的结构, 从而改变酶的催化活性。

关键词: 带电短肽; α -淀粉酶; 酶活性; 调控机制

中图分类号: TS201; Q814.9 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2025)02-0163-08

网络首发时间: 2025-03-06 14:30:09

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.3863.TS.20250305.1803.004>

A Preliminary Study on the Regulatory Mechanism of Synthetic Charged Short Peptides T_1^+ and T_2^- to α -amylase

YANG Qi, JI Jia-yi, JIANG Xin-yue, CHEN Shu-shu, YANG Xiao-yu,
LIU Chun-ying, DOU Shao-hua✉

1. College of Life Sciences and Technology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China; 2. Liaoning Marine Microorganism Engineering and Technology Research Center, Dalian, Liaoning 116622, China;
3. Dalian Key Laboratory of Animal Immunology, Dalian, Liaoning 116622, China)

Abstract: This study aimed to investigate whether charged short peptides influence enzyme activity and structure in the interaction system between enzymes and substrates, and to explore the regulatory mechanism

收稿日期: 2024-07-24; 修回日期: 2024-09-06; 录用日期: 2024-09-09

基金项目: 辽宁省教育厅高校基本科研面上项目“人工设计短肽对淀粉酶催化特性的影响”(JYTMS20230376); 辽宁省大学生创新项目“带电短肽对 α -淀粉酶结构和功能的影响”(S202311258035); 辽宁省自然科学基金项目(2014020134)

Supported by: Liaoning Provincial Department of Education University Basic Research Project “The Effect of Artificially Designed Short Peptides on the Catalytic Properties of Amylase” (No. JYTMS20230376); Liaoning Provincial College Student Innovation Project “Effect of Charged Short Peptides on the Structure and Function of α -amylase” (No. S202311258035); Natural Science Foundation of Liaoning Province (No. 2014020134)

第一作者: 杨琪, 女, 2001 年出生, 在读硕士生, 研究方向为微生物学、酶工程, E-mail: 1223578321@qq.com

通信作者: 窦少华, 男, 1979 年出生, 博士, 副教授, 研究方向为微生物学、酶工程, E-mail: doushaohua@dlu.edu.cn

of synthetic charged short peptides on α -amylase. In this study, the synthetic charged short peptides T_1^+ and T_2^- were introduced into the α -amylase catalytic system, and key indicators such as activity of α -amylase and zeta potential were measured. The results showed that the addition of short peptide T_1^+ reduced the activity of α -amylase by 1.29%, and the addition of short peptide T_2^- increased it by 0.4%. Both peptides induced structural changes in the enzyme. The results of molecular docking showed that the conformational interaction between α -amylase and substrate was changed by the charged short peptide. Based on these findings, it is hypothesized that the regulatory mechanism of synthetic charged short peptides involves modifying the enzyme's surface structure and active site, thereby influencing its catalytic activity.

Key words: charged short peptide; α -amylase; enzyme activity; regulatory mechanisms

α -淀粉酶 (E.C.3.2.1.) 是一种淀粉降解酶, 由高等动物、植物和微生物分泌, 可催化淀粉中低分子量产物 (如葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖) 内部 α -1,4 和 α -1,6 糖苷键的水解^[1]。淀粉酶是最重要的蛋白酶之一, 对生物技术具有重要意义, 同时 α -淀粉酶在食品、纺织和造纸等工业得到广泛应用^[2]。

酶催化一直以绿色、温和、高效的方式参与着生物反应过程, 现在越来越多的应用于工业中, 为人类社会制造食品、药品、材料等^[3]。因此, 改变酶的催化活性对工业生产具有重要意义。目前, 为了向食品工业提供既能保存食品又能保持其新鲜特性的技术, 人们开发了非热处理方法来改变酶的活性^[4]。相较于其他非热技术 (高强度超声处理、高压冷等离子体等), 电场具有瞬时性、可持续性、可调性等优点^[5]。Ohshima 等^[6]评估了脉冲电场处理对 6 种内源性酶的影响, 发现它们的活性有所增加, 特别是过氧化物酶和半乳糖苷酶, 经过 60 s 的脉冲电场处理后, 酶活性高达 20%。Li 等^[7]发现脉冲电场处理可以提高从地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 中分离得到的碱性蛋白酶的活性, 同时发现其二级结构和三级结构均发生改变。然而, 电场处理虽然具有效果好、快速等优点, 但相关的设备造价高、耗能大、不环保, 且强烈的高强度电场会破坏肽分子内和分子间的静电相互作用, 影响各种食品的质量^[8]。因此, 寻找能发挥相似作用的带电物质以改变 α -淀粉酶活性, 对扩大和提升 α -淀粉酶在食品发酵工业的应用范围和效果具有重要意义。

刘荣娜等^[9]研究发现, 不同带电蛋白质的加

入使 α -淀粉酶的活性增大, 反应速率加快。人工合成短肽是由多肽键连接的聚氨基酸, 是一种独特的可生物降解和生物相容性的合成聚合物, 其结构模仿天然蛋白质^[10]。相较于带电蛋白质, 人工设计带电短肽具有结构更简单、合成更方便等优点。鲁明杰等^[11]合成两条带电短肽 T_8^+ 和 T_9^+ , 验证了带电荷短肽 T_8^+ 使 α -淀粉酶体系活化能降低, T_9^+ 则相反, 但其并未探究带电短肽对酶的调控机制。

综上, 本研究利用人工设计带不同电荷的短肽 T_1^+ 和 T_2^- , 以不同浓度加入 α -淀粉酶作用体系中, 并对 α -淀粉酶与带电短肽反应过程中酶活性和结构变化进行检测, 探讨带电短肽对 α -淀粉酶的影响。本实验设计的短肽是以具有一定安全性的牛血清白蛋白为模板设计合成的, 且短肽相较于电场具有经济成本低、成分确定且简单、易于操控、能耗低、危害性小等优点, 中和了电场作用的不足, 因此通过添加带电物质使酶活性改变具有一定的应用前景, 为增强和改进酶工业提供思路, 可以将带电短肽作为激活剂应用在食品发酵中, 也可作为抑制剂应用在食品储藏等工业中。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、葡萄糖、NaOH: 上海一恒科学仪器有限公司; 可溶性淀粉、酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸、HCl: 天津市科密欧化学试剂有限公司; α -淀粉酶 A4551: Sigma-Aldrich 公司。

1.2 仪器与设备

LDZX-40BI 立式压力蒸汽灭菌器：上海一恒科学仪器有限公司；Varioskan LUX 多功能酶标仪：赛默飞世尔科技公司；pH 计：梅特勒-托利多集团；Zeta 电位仪：布鲁克海文仪器公司；FP-6500 荧光/磷光光谱仪、J-810 圆二色光谱仪、V-560 型紫外-可见 (UV-Vis) 光谱仪：日本分光株式会社。

1.3 实验方法

1.3.1 多肽合成

根据氨基酸的带电性，将安全性较高、适用于食品发酵等工业领域且结构清晰的牛血清白蛋白氨基酸序列作为模板，利用多肽固相合成技术设计合成含 4 个氨基酸的肽链 T_1^+ 和 T_2^- ，合成路线

如图 1，通过多肽性质计算器分别计算分子量、等电点、净电荷以及疏水性等性质，以确定短肽合成的可行性。且需注意短肽中不能含色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr)、苯丙氨酸 (Phe) 等对光谱检测有影响的氨基酸。并利用高效液相色谱分析纯度，图 2、图 3 分别为 T_1^+ 和 T_2^- 的高效液相色谱分析图，由表 1 可知， T_1^+ 和 T_2^- 合成纯度均在 95% 以上，且可溶性正常，符合实验要求。

表 1 带不同电荷的短肽

短肽编号	序列	氨基酸长度	分子量/Da	纯度/%	等电点/pI	pH6.9 电荷量/C
T_1^+	KHGV	4AA	440.61	95.04	10.09	1.1
T_2^-	VDAD	4AA	419.46	95.98	2.93	2.0

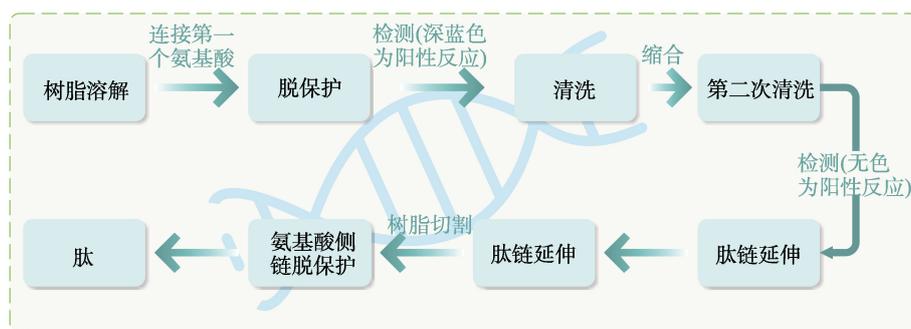


图 1 短肽合成路线图

Fig.1 Roadmap for short peptide synthesis

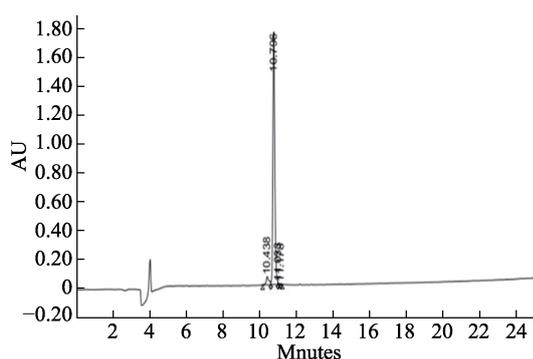


图 2 T_1^+ 的高效液相色谱图

Fig.2 The HPLC chromatogram of T_1^+

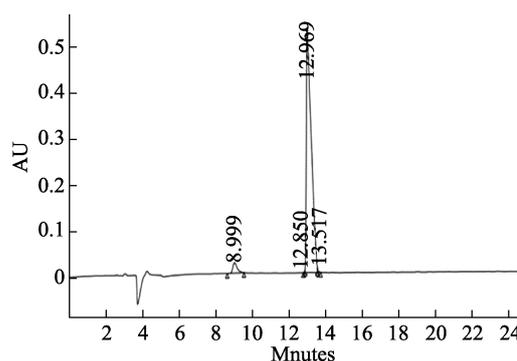


图 3 T_2^- 的高效液相色谱图

Fig.3 The HPLC chromatogram of T_2^-

1.3.2 T_1^+ 、 T_2^- 对 α -淀粉酶活性的影响

一个酶活力单位 (U/mg) 为在最适条件 (40 °C、0.01 mol/L、pH 6.9^[11]) 下，1 min 内水解淀粉转化生成 1.0 μ mol 葡萄糖所需的 α -淀粉酶量。取 200 μ L 浓度为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} U/mL 的 T_1^+ 和

T_2^- 溶液，分别与 200 μ L 10^{-4} g/mL α -淀粉酶溶液混合，用缓冲液代替短肽作为空白对照，反应 5 min。在 540 nm 条件下观察酶活力变化。采用二硝基水杨酸 (3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS) 法^[12]测 α -淀粉酶酶活，计算公式如下：

$$U/mg = \frac{C}{(t \times m)} \quad \text{式 (1)}$$

式中： C 为标准曲线上查得的葡萄糖含量， mg ； t 为反应的时间， min ； m 为 0.2 mL 淀粉酶液中酶的质量， mg 。

1.3.3 紫外可见吸收光谱测定

将 2 mL α -淀粉酶溶液置于 10 mm 石英比色皿中，依次加入与 α -淀粉酶溶液摩尔比为 $1:1$ 、 $1:2$ 、 $1:3$ 、 $1:5$ 、 $1:10$ 、 $1:15$ 的 T_1^+ 溶液， T_2 溶液同 T_1^+ 溶液处理，扫描波长范围在 $220\sim 700\text{ nm}$ ，扫描速率为 200 nm/min ，狭缝宽度为 2 nm ，响应时间中等，对照组为未加短肽的 α -淀粉酶溶液^[13]。

1.3.4 Zeta 电位的测定

向 Zeta 电位仪样品池中分别加入 1.4 mL T_1^+ 溶液、 T_2 溶液、磷酸盐缓冲溶液和 α -淀粉酶溶液，测量其电位。同时在 Zeta 电位样品池中以 $1:1$ （总体积 1.4 mL ）的比例加入 T_1^+ 溶液和 α -淀粉酶溶液、 T_2 溶液和 α -淀粉酶溶液，测量电位。

1.3.5 荧光光谱测定

将 2 mL α -淀粉酶溶液置于 10 mm 的石英比色皿中，依次加入与 α -淀粉酶溶液摩尔比为 $1:1$ 、 $1:2$ 、 $1:3$ 、 $1:5$ 、 $1:10$ 、 $1:15$ 的 T_1^+ 溶液， T_2 溶液同 T_1^+ 溶液处理，波长范围为 $290\sim 750\text{ nm}$ ，激发波长为 333 nm ，狭缝宽度为 5 nm ，用荧光光度计记录荧光发射光。在 $\Delta\lambda=20\text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 下测定 α -淀粉酶的酪氨酸和色氨酸同步荧光光谱^[14]。

1.3.6 圆二色光谱测定

为进一步研究短肽对 α -淀粉酶结构的影响，用圆二色光谱检测 α -淀粉酶二级结构的变化。在波长范围 $190\sim 250\text{ nm}$ ，扫描速度为 50 nm/min ，狭缝宽度为 4 nm 的条件下^[15]，将 $400\text{ }\mu\text{L}$ α -淀粉酶溶液加入 1 mm 比色皿中，再分别加入与 α -淀粉酶溶液最大摩尔比 $1:15$ 的 T_1^+ 溶液和 T_2 溶液进行测定。

1.3.7 分子对接

为了更好地探究短肽对酶本身结构的影响，基于以上实验的结果，在 RCSB PDB 蛋白质数据库中检索并下载 α -淀粉酶（ID: 6XSJ）的 3D 结

构，PubChem 数据库中下载 D-葡萄糖的结构。利用 Discovery Studio2019 软件通过分子对接技术分析带电短肽的加入对 α -淀粉酶反应体系的影响。

1.4 数据处理

通过 GraphPad Prism 9.0 和 SPSS 26.0 软件统计和分析实验数据。每个实验重复 3 次，计算平均值，以平均值 \pm 标准偏差表示结果。在统计分析过程中，当 $P < 0.05$ 时，则表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 T_1^+ 、 T_2 对 α -淀粉酶酶活的影响

经不同浓度短肽处理的 α -淀粉酶酶活结果如图 4 所示。在短肽浓度为 10^{-7} g/mL 时，相对酶活降低程度最大为 1.29% ，说明带正电荷短肽抑制了 α -淀粉酶的酶促反应。在短肽浓度为 10^{-5} g/mL 时 T_2 使相对酶活提高了 0.4% 。以上结果表明，带电短肽影响酶活性。

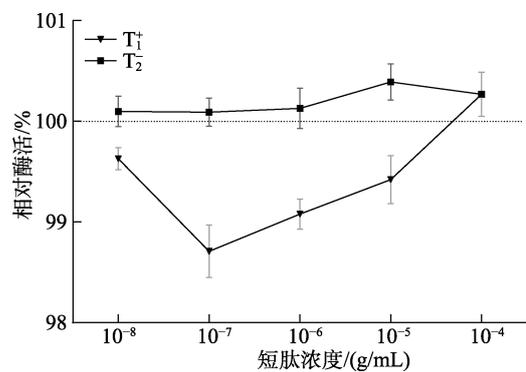


图 4 不同浓度的短肽对 α -淀粉酶活性的影响
Fig.4 Effects of different concentrations of short peptides on α -amylase activity

2.2 Zeta 电位的变化

Zeta 电位反映带电蛋白质分子表面电荷量的变化情况^[16]。将 T_1^+ 和 T_2 加入 α -淀粉酶溶液体系中，摇匀后进行电位测定，如表 2 所示， T_1^+ 使原有体系电位增加了 64% ， T_2 则使原有体系电位增加了 70% ，说明短肽所带的电荷使 α -淀粉酶表面的电荷发生了重排，改变了 α -淀粉酶的表面电位。

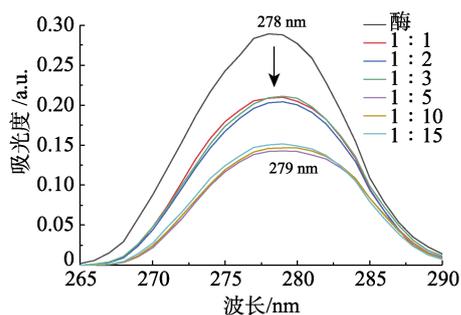
2.3 紫外-可见吸收光谱的测定

紫外光谱是监测 Trp 和 Tyr 残基周围扰动和

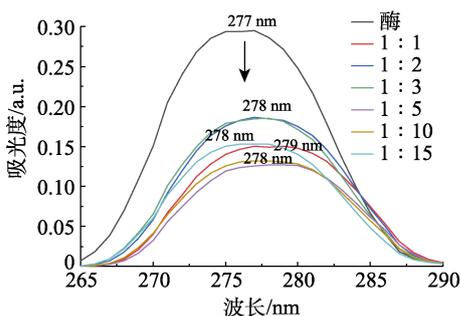
表 2 α -淀粉酶 Zeta 电位结果
Table 2 α -Amylase zeta potential results

样品	Zeta 电位/mV
α -淀粉酶 (未处理)	-20.77
α -淀粉酶 (T_1^+ 处理)	-7.52
α -淀粉酶 (T_2^- 处理)	-4.16

探测蛋白质与配体之间复合物形成的有效工具^[17]。一定摩尔比的 T_1^+ 和 T_2^- 溶液分别加入 α -淀粉酶溶液,结果如图 5 (a~b) 所示。短肽的加入使最大吸收峰峰值降低,但并没有随着短肽比例的增加而发生规律性的变化,推测可能由于 T_1^+ 和 T_2^- 分子量较小且处理后导致 α -淀粉酶结构不稳定。最大吸收峰产生了微弱的红移 (278~279 nm),这可能是短肽对酶蛋白中的芳香族氨基酸所处的微环境产生影响^[18]。结果表明,经过短肽 T_1^+ 和 T_2^- 处理, α -淀粉酶的芳香族氨基酸残基的环境发生了变化, α -淀粉酶的疏水性增强,酶的结构发生了改变。



(a) T_1^+ 作用的浓度光谱



(b) T_2^- 作用的浓度光谱

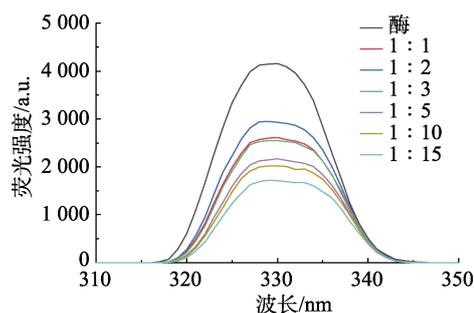
图 5 α -淀粉酶和带电短肽作用的紫外光谱

Fig.5 The UV-Vis absorption spectra of α -amylase interaction with charged short peptides

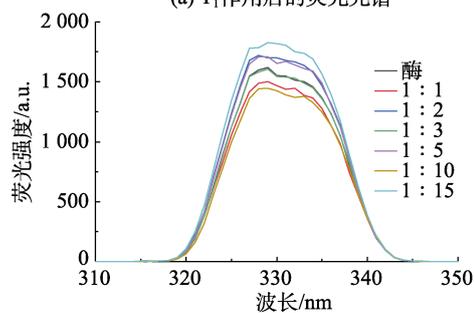
2.4 荧光光谱的测定

分子内荧光光谱可以表征蛋白质三级结构的变化,Trp 和 Tyr 是促进蛋白质固有荧光发射的主要荧光基团^[19]。如图 6 (a) 所示,随着不同浓度 T_1^+ 溶液的加入,荧光强度逐渐降低,表明短肽 T_1^+

使蛋白空间构象变紧密,游离的 Trp、Tyr 变少,影响 α -淀粉酶的三级结构。如图 6 (b) 所示,随着不同浓度 T_2^- 溶液的加入,在 1:10 以下摩尔比浓度,荧光强度降低,当高于 1:10 摩尔比浓度时, α -淀粉酶的荧光强度增加,推测短肽浓度使 α -淀粉酶结构发生改变达到临界值, T_2^- 溶液的加入同样改变了 α -淀粉酶荧光基团的位置及和微环境。



(a) T_1^+ 作用后的荧光光谱



(b) T_2^- 作用后的荧光光谱

图 6 带电短肽和 α -淀粉酶作用的荧光光谱

Fig.6 The fluorescence spectra of charged short peptides and α -amylase

同步荧光被广泛用作研究蛋白质荧光团微环境变化。如图 7 (a) 所示,当 $\Delta\lambda=20$ nm 时,在 315 nm 处有 α -淀粉酶溶液 Trp 的同步荧光峰出现。加入 T_1^+ 和 T_2^- 后, α -淀粉酶荧光峰轻微蓝移 (315~313 nm),峰强度均增加,说明短肽使酶的酪氨酸残基所处的微环境极性增大,改变了其构象。如图 7 (b) 所示,当 $\Delta\lambda=60$ nm 时 α -淀粉酶在 313 nm 有 Trp 的同步荧光峰。加入 T_1^+ 和 T_2^- 后荧光峰值发生了一定的红移现象,这表明短肽使蛋白质变形展开,Trp 暴露。此结果与紫外光谱结果一致,进一步证明了短肽 T_1^+ 和 T_2^- 对 α -淀粉酶的三级结构有一定的影响。

2.5 圆二色谱的测定

利用圆二色谱检测蛋白质的二级结构,其中 α -螺旋 (特征峰分别为+192、-208 和-222 nm) 外

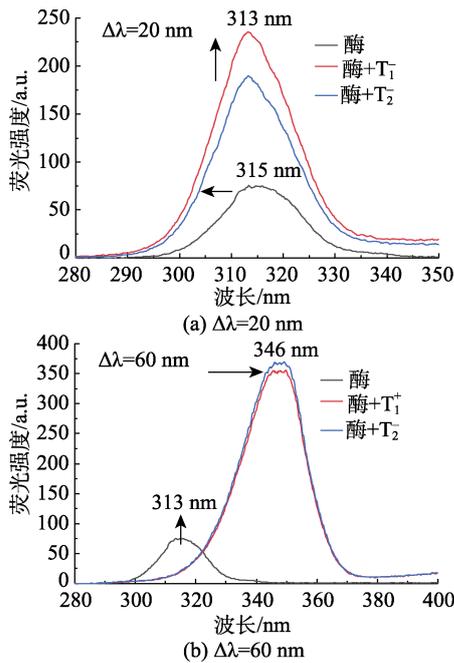


图 7 带电短肽作用于 α -淀粉酶后的同步荧光光谱图
Fig.7 Synchronous fluorescence spectra of charged short peptides acting on α -amylase

观形状似 W 形, β -折叠的特征峰为 +195 nm, 外观形状似 V 形。本实验中 α -淀粉酶的吸收峰为 W 形吸收峰, 以未加短肽的 α -淀粉酶为对照。结果如图 8 所示, 加入 T_1^+ 和 T_2^- 后, 特征峰发生了显著变化, 在 222 nm 处的负吸收峰呈先上升再逐渐消失的趋势。图 8 (a) 中 208 nm 处, T_1^+ 短肽溶液使酶负吸收峰上升, 发生蓝移且峰强度增加, 而图 8 (b) 中 T_2^- 溶液使酶负吸收峰呈略微下降的趋势, α -淀粉酶从 W 形吸收峰转变为 V 形吸收峰, 说明短肽的加入能够改变 α -淀粉酶的结构。根据以上结果, 利用 YANG 方程^[20]计算出 α -淀粉酶的 α -螺旋百分含量, 公式如下式 (2) ~ (3), 结果如表 3 所示, T_1^+ 使 α -淀粉酶的 α 螺旋含量降低了 43%, T_2^- 使 α -淀粉酶的 α 螺旋含量降低了 30%, 说明短肽 T_1^+ 和 T_2^- 的加入影响了 α -淀粉酶的结构, 使其结构部分展开, 从而影响了酶活性。

$$[\theta] = \frac{medg}{l \times c} \quad \text{式 (2)}$$

式中: $[\theta]$ 为摩尔椭圆度, $(\text{deg} \cdot \text{mm}^2) / \text{mmol}$; $medg$ 为 CD 谱上面 y 轴的数值; l 为光径, mm; c 为样品浓度, mmol。

$$\alpha\text{-Helix} = \left[\frac{-[\theta]_{208} - 4\,000}{33\,000 - 4\,000} \right] \times 100\% \quad \text{式 (3)}$$

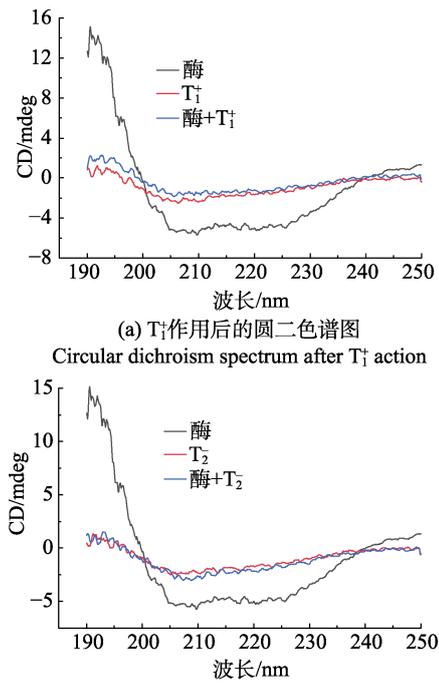


图 8 带电短肽作用于 α -淀粉酶后的圆二色谱图
Fig.8 Circular dichroism diagram of charged short peptides acting on α -amylase

表 3 α -淀粉酶结构中 α -螺旋含量变化

Table 3 Changes of α -Helix content in α -amylase structure

序号	样品	α -Helix/%
1	α -淀粉酶	34.60
2	T_1^+ + α -淀粉酶	19.72
3	T_2^- + α -淀粉酶	24.37

式中: $[\theta]_{208}$ 为在 208 nm 处的摩尔椭圆度, $(\text{deg} \cdot \text{mm}^2) / \text{mmol}$ 。

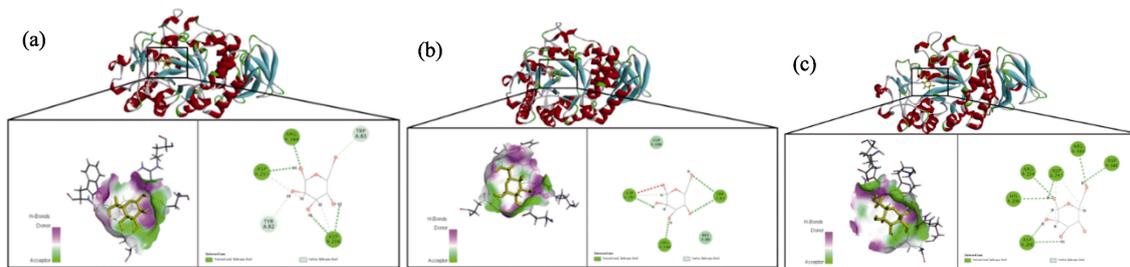
2.6 分子对接结果

分子对接是针对已知的两种分子结构, 依据“锁和钥匙”原理, 利用化学计量法模拟、识别以及预测两个分子复合物结构的方法^[21]。具体的对接 LibDockScore 分数如表 4 所示, 分子对接相互作用关系如图 9 所示。 T_2^- 氢键数高于空白组和 T_1^+ 组, T_1^+ 组和空白组氢键数相差不大; 三组共有氨基酸天冬氨酸 (ASP A:297)、天冬氨酸 (ASP A:206) 和精氨酸 (ARG A:344) 与葡萄糖分子的

表 4 α -淀粉酶与葡萄糖的对接分数

Table 4 The docking score of α -amylase with glucose molecule

	对接分数
未加电荷	74.2
T_1^+ 正电荷	73.1
T_2^- 负电荷	73.4



注：(a) 未加电荷组；(b) T_1^+ 正电荷组；(c) T_2^- 负电荷组
Note: (a) uncharged group; (b) T_1^+ positive charge group; (c) T_2^- negative charge group

图 9 分子对接示意图

Fig.9 Molecular docking diagram

连接方式均不同；而未加电荷组与实验组对接分数相比，未加电荷组的得分高于 T_1^+ 和 T_2^- 组的对接分数。说明短肽的加入改变了 α -淀粉酶反应体系环境作用力，使酶与底物相互作用的构象发生了相应的变化，由此改变了酶促反应，实验组对接分数低于未加电荷组可能与短肽的带电量较小有关。

3 讨论与结论

根据诱导契合学说，当底物与酶结合时，酶分子上的某些基团常常发生明显的变化，在酶催化反应过程中，活性中心带电的氨基酸残基产生了电荷作用。鲁明杰等^[11]合成短肽 T_8 和 T_9^+ 验证了人工设计短肽对 α -淀粉酶催化作用有影响，本文使用的短肽 T_1^+ 和 T_2^- 与 T_8 和 T_9^+ 在长度、分子量、带电荷

量等方面均不同，表 5 为 4 种短肽对比结果。在短肽浓度为 10^{-4} g/mL 时， T_9^+ 使酶活降低了 1.36%， T_8 升高了 3.13%，酶活改变效果较本研究明显。因此可以验证带电短肽的带电量以及带电性质会不同程度地影响酶活，短肽带电量越高对酶活影响程度越大。同时 Li 等^[22]发现不同分子量的带电短肽对不同的酶都会使其结构发生变化。因此，我们初步认为，人工带电短肽对酶的调控机制是通过电荷改变酶表面及活性中心的结构，从而改变酶的催化活性。如图 10 所示，以带正电荷的短肽为例，当它加入酶与底物的作用机制，通过电荷的作用，酶表面以及活性中心的结构会发生相应的变化，从而改变酶活。然而带电荷不同，产生的变化也是截然不同的。

表 5 4 种不同短肽的信息

Table 5 Information on 4 different short peptides

短肽编号	序列	氨基酸长度	分子量/Da	纯度/%	等电点/pI	pH6.9 电荷量/C
T_1^+	KHGV	4AA	440.61	95.04	10.09	1.1
T_2^-	VDAD	4AA	419.46	95.98	2.93	-2.0
T_9^+	RKHYRQSTEFKKVHQ	15AA	1 972.26	98.04	10.45	4.2
T_8	YEDEFHNDQEYSETD	15AA	1 920.85	98.88	3.66	-6.9

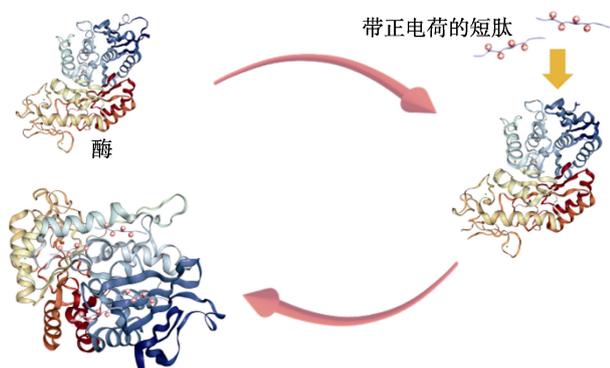


图 10 人工带电短肽对酶的调控机制
Fig.10 Regulatory mechanism of artificial charged short peptides on enzymes

本研究利用人工设计带不同电荷的短肽 T_1^+ 和 T_2^- ，以不同浓度加入 α -淀粉酶作用体系中，对短肽加入后 α -淀粉酶的酶活性、Zeta 电位进行测定，结果表明 T_1^+ 短肽的加入降低了 α -淀粉酶的活性，在短肽浓度为 10^{-7} g/mL 时，相对酶活降低程度最大，为 1.29%； T_2^- 短肽能增强 α -淀粉酶的活性，在短肽浓度为 10^{-5} g/mL 时使相对酶活提高了 0.4%。通过紫外可见吸收光谱、荧光光谱和圆二色光谱探讨带电短肽对 α -淀粉酶结构的影响。结果表明，带不同电荷的短肽 T_1^+ 和 T_2^- 能够改变 α -

淀粉酶表面的电荷排布, 影响其结构, 从而影响了 α -淀粉酶的催化作用。利用这些技术手段可以有效探索酶与底物的催化作用和短肽表面所带电荷的相关性, 以期为食品、生物医药、酶制剂、生物反应器等领域提供新思路、新方法。

参考文献:

- [1] RANA N, WALIA A, GAUR A. α -Amylases from microbial sources and its potential applications in various industries[J]. National Academy Science Letters, 2013, 36: 9-17.
 - [2] YANG T, ZHONG L L, JIANG G S, et al. Comparative study on bread quality and starch digestibility of normal and waxy wheat (*Triticum aestivum* L.) modified by maltohexaose producing α -amylases[J]. Food Research International, 2022, 162: 112034.
 - [3] CAO Y F, LI X Y, GE J. Enzyme catalyst engineering toward the integration of biocatalysis and chemocatalysis[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(11), 1173-1183.
 - [4] PELLICER A, NAVARRO P, GÓMEZ-LÓPEZ M. Pectin methylesterase inactivation by pulsed light[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2020, 62.
 - [5] WANG Q L, WEI R R, HU J, et al. Moderate pulsed electric field-induced structural unfolding ameliorated the gelling properties of porcine muscle myofibrillar protein[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2022, 81: 103145.
 - [6] OHSHIMA T, TAMURA T, SATO M. Influence of pulsed electric field on various enzyme activities[J]. Journal of Electrostatics, 2006, 65(3): 156-161.
 - [7] 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.
 - [8] PARK S, BOXER G. Origins of the sensitivity of molecular vibrations to electric fields: Carbonyl and nitrosyl stretches in model compounds and proteins[J]. The Journal of Physical Chemistry, B. Condensed Matter, Materials, Surfaces, Interfaces Biophysical, 2002, 106(22): 5800-5806.
 - [9] 刘荣娜. 酶的催化反应规律及不同蛋白质之间相互作用本质研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2016.
LIU R N. Study on the enzyme catalytic reaction and interaction between proteins[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2016.
 - [10] DEMING J T. Synthetic polypeptides for biomedical applications [J]. Progress in Polymer Science, 2007, 32(8): 858-875.
 - [11] 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 α -amylase catalysis[J]. China Brewing, 2021, 40(11): 198-202.
 - [12] 王俊丽, 聂国兴, 李素贞, 等. DNS 法测定还原糖含量时最适波长的确定[J]. 河南农业科学, 2010, (4): 115-118.
WANG J L, NIE G X, LI S Z, et al. Optimal wavelength for determining the content of reducing sugar by DNS method[J]. Henan Agricultural Sciences, 2010, 39(4): 115-118.
 - [13] 李军. 紫外分光光度法测定果蔬中的维生素 C[J]. 河北职业技术师范学院学报, 2000, 14(1): 41-44.
LI J. Determination of ascorbic acid in fruit and vegetable by ultraviolet spectrophotometry[J]. Journal of Hebei Vocation-Technical Teachers College, 2000, 14(1): 41-44.
 - [14] 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. Study on the interaction of allicin with different types of protein by synchronous fluorescence[J]. Chemical Research and Application, 2020, 32(7): 1161-1169.
 - [15] 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 spectrum in the research of protein structure[J]. Amino Acids & Biotic Resource, 2010, 32(4): 77-80.
 - [16] YUN R Q, JING Q. Electrokinetic characterization of poly (vinyl butyral) hollow fiber membranes by streaming potential and electroviscous effect[J]. Journal of Membrane Science, 2013, 425-426: 71-76.
 - [17] JIANG S S, LI M, CHANG R R, et al. *In vitro* inhibition of pancreatic α -amylase by spherical and polygonal starch nanoparticles[J]. Food Funct, 2018 Jan 24, 9(1): 355-363.
 - [18] 刘钰婉. 大豆多肽基复合纳米颗粒的制备及与 α -淀粉酶的相互作用和抑制机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
LIU Y W. Preparation of soybean polypeptide-based composite nanoparticles and study on their interaction and inhibition mechanism with α -amylase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.
 - [19] KONG F H, KANG S M, TIAN J L, et al. Interaction of xylitol with whey proteins: Multi-spectroscopic techniques and docking studies[J]. Food Chem, 2020 Oct 1, 326: 126804.
 - [20] LIU Y Y, ZENG X A, DENG Z P, et al. Effect of pulsed electric field on the secondary structure and thermal properties of soy protein isolate[J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(5): 841-850.
 - [21] 陈淑妍, 程诗琦, 马世堂. 基于分子对接技术模拟预测黄连用于清热解热毒物质基础[J]. 畜牧与饲料科学, 2015, 36(8): 19-21.
CHEN S Y, CHENG S Q, MA S T. Simulation and prediction of material foundation of coptis chinensis franch. for clearing away heat and toxic material based on molecular docking technology[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2015, 36(8): 19-21.
 - [22] LI C B, YANH X Y, LANG Y J, et al. Effect of artificially designed short peptide addition strategy on glucose oxidase activity[J]. Process Biochemistry, 2023, 134: 341-350. 
- 备注:** 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。