

## 花生叶提取物对电子束辐照后脂肪酶活性的保护作用

陈龙祥, 余国文\* (中-莫农业技术示范中心, 马普托 999068)

**摘要** [目的]研究不同剂量电子束辐照对脂肪酸的影响。[方法]通过不同花生叶提取物处理辐照下脂肪酶, 探明花生叶提取物在脂肪酶活性中的保护作用。[结果]当5个电子束辐照剂量辐照脂肪酶, 脂肪酶活力下降。当加入花生叶提取物后, 不同类型花生叶提取物对辐照处理后的鲈鱼脂肪酶活性起到了一个促进作用, 进一步 SDS-PAGE 分析发现, 不同花生叶提取物对辐照后脂肪酶活性保护作用不相同。[结论]查询相关文献可知心型、脑型脂肪酸结合蛋白在鲈鱼脂肪酶中含量较高, 说明该研究脂肪酸结合蛋白, 主要集中在线粒体以及过氧化物酶体 $\beta$ 氧化过程, 此研究结果表明花生叶提取物对鲈鱼脂肪酶活性起到了一定保护作用。

**关键词** 农业生物学; 鲈鱼; 辐照; 脂肪酶; 脂肪酸结合蛋白

中图分类号 S565.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)06-0173-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.06.052



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Protection of Peanut Leaf Extract on Lipase Activity Induced by Electron Beam Irradiation

CHEN Long-xiang, YU Guo-wen (China-Mozambique Agriculture Demonstration Center, Maputo 999068)

**Abstract** [Objective] In order to study the effect of different doses of electron beam irradiation on fatty acids. [Method] The protective effect of peanut leaf extract on lipase activity was studied by treating different peanut leaf extracts under irradiation. [Result] Lipase activity decreased when 5 electron beam irradiation doses were used. When peanut leaf extracts were added, different types of peanut leaf extracts promoted lipase activity in irradiated perch. Further SDS-PAGE analysis showed that different peanut leaf extracts had different protective effects on lipase activity after irradiation. [Conclusion] The content of heart-type and brain-type fatty acid binding proteins in lipase of perch was higher than that of brain-type fatty acid binding proteins, which indicated that the fatty acid binding proteins in this study were mainly concentrated in mitochondria and the oxidation process of peroxisome beta. The study showed that peanut leaf extracts had a protective effect on lipase activity of perch.

**Key words** Agrobiology; Perch; Irradiation; Lipase; Fatty acid binding protein

辐照技术是用 $\gamma$ 射线、x射线、电子束等对食品进行处理, 以达到杀虫、杀菌和抑制发芽等目的, 从而提高食品的质量、延长食品(农产品)货架期等。有报道认为, 在酶活性中心存在关键性氨基酸<sup>[1]</sup>, 如果其被破坏或被修饰, 则酶活力丧失<sup>[2]</sup>。辐照可能改变酶结构, 包括空间结构、二级结构、活性中心, 促使蛋白质发生一系列化学变化, 分子完整的一级结构遭到破坏, 丧失生物活性<sup>[3]</sup>。也有报道认为, 辐照使蛋白质发生交联和降解反应, 破坏白蛋白二级结构<sup>[4]</sup>。

鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*), 别名花鲈, 分布于近海, 河口海水淡水交汇处, 是一种常见的名贵经济鱼类。鲈鱼具有丰富的营养价值, 富含蛋白质及各种微量元素<sup>[5]</sup>。植物多酚是一类广泛存在于植物体内的具有多元酚结构的次生代谢物<sup>[6]</sup>, 主要存在于植物的皮、根、叶、果中。植物多酚中有多元氢键和大量疏水键<sup>[7]</sup>, 能同蛋白质等结合产生反应, 这是其最重要的化学特征。由于植物多酚提取技术的进步, 其已经被广泛应用于食品行业<sup>[8]</sup>。脂肪酶隶属于羧基酯水解酶类, 能够逐步地将甘油三酯水解成甘油和脂肪酸并且作为一种辅助剂, 因而被大量地应用到食品行业<sup>[9-10]</sup>。据报道, 国外科研人员已经从鲱鱼<sup>[11]</sup>、沙丁鱼<sup>[12]</sup>、鲑鱼<sup>[13]</sup>中分离纯化得到了脂肪酶, 但是对鲈鱼脂肪酶研究较少。研究发现, 茶多酚对白鱼中不饱和脂肪酸的氧化或分解具有显著的保护作用<sup>[14]</sup>。但花生叶多酚物质对鲈鱼脂肪酶是否具有保护作用是目前阶段亟需解决的课题。笔者研究不同剂量辐照对

脂肪酶的影响, 通过酶活力测定、蛋白质凝胶电泳及物质谱鉴定, 拟在理论上解决辐照对鲈鱼脂肪酶的影响以及花生叶提取物对脂肪酶保护作用, 并在实践中指导花生叶多酚在辐照后鲈鱼脂肪酶保护中的应用。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 鲈鱼(购于武汉市中百超市)、电子束源(能量为4.9 MeV、束流为2 mA、传送速率为6 m/min)。

### 1.2 试剂与仪器

**1.2.1 试剂** 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、蛋白磷酸酶抑制剂混合物 P1260、对硝基苯酚、对硝基苯酚棕榈酸酯、异丙醇、Tris、盐酸、丙烯酰胺、过硫酸铵、甘氨酸、十二烷基硫酸钠、溴酚蓝、巯基乙醇、磷酸、考马斯亮蓝 G250、硫酸铵、甲醇、乙酸。

**1.2.2 仪器** MAXX 电子天平(丹佛仪器北京有限公司); LGJ-25C 冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司); Sartorius Talent 分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司); 匀浆机(弗鲁克流体机械制造有限公司); UH-5300 紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 脂肪酶样品制备** 鲈鱼洗净, 去除胆囊, 取内脏, 按照1:3比例加入磷酸盐缓冲液(25 mmol/L 缓冲液, 含150 mmol/L NaCl, 蛋白磷酸酶抑制剂, pH 调至6.5), 4℃匀浆机匀浆处理3次, 每次15~18 s, 低温搅拌50 min, 10 000 r/min离心30 min, 取上清液, 即为内脏粗酶液。利用80%硫酸铵分级沉淀, 沉淀过2 kDa 截留分子量的超滤管, 沉淀冷冻干燥, -20℃保存<sup>[15-17]</sup>。

**作者简介** 陈龙祥(1989—), 男, 安徽安庆人, 硕士, 从事植物生理生化研究。\*通信作者, 工程师, 从事农业栽培灌溉与水利工程研究。

**收稿日期** 2018-12-05; **修回日期** 2018-12-14

**1.3.2 蛋白质含量测定。**蛋白质含量测定方法按照 Bradford 法<sup>[18]</sup>(试剂购于联科生物公司)。先将所有试剂(G250 染色液、BSA 溶液、样品)平衡至室温,然后取 50  $\mu\text{L}$  BSA 溶液(2 mg/mL),用溶解蛋白样品的缓冲液稀释至 200  $\mu\text{L}$ ,终浓度为 0.5 mg/mL。标准曲线设置参考如下:标准品的用量分别为 0、1、2、4、8、12、16 和 20  $\mu\text{L}$ ,加标准品稀释液补足到 20  $\mu\text{L}$ 。样品孔中加入 20  $\mu\text{L}$  待测样品。如样品浓度过高,可适当稀释,使之落在标准曲线范围内。后每孔加入 200  $\mu\text{L}$  G250 染色液,室温放置 2~5 min,用酶标仪测定 OD<sub>595</sub>,或 560~610 nm 的其他波长的吸光度,根据标准曲线计算出样品中的蛋白浓度。

**1.3.3 酶活标准曲线建立。**参照 Winkler 法,并稍加改动,采用人工底物对硝基丁酸酯与对硝基棕榈酸酯,两者被脂肪酶催化水解后会释放黄色对硝基苯酚,在 410 nm 处测吸收波长,所得标准曲线方程为  $y=0.121 20x+0.028 67(R^2=0.992 9)$ 。

**1.3.4 酶活测定。**参照 Winkler 法,并稍作改动,称取 30 mg 的 p-NPP(对硝基苯酚棕榈酸酯)粉末溶于 10 mL 的异丙醇中,配成溶液 A,用 0.05 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液配制 0.5%浓度的 Tris-HCl 溶液,配成溶液 B,取溶液 A 100  $\mu\text{L}$  和溶液 B 2.6 mL 混合均匀后,再加入 1 mL 0.05 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 溶液,混合均匀,37  $^{\circ}\text{C}$  稳定 2 min。在平行样中加入 50  $\mu\text{L}$  的酶,37  $^{\circ}\text{C}$  水浴反应 15 min。在空白管内加入 50  $\mu\text{L}$  已经灭活的酶,并将所有的管放入 -20  $^{\circ}\text{C}$  5 min 以终止反应。在 410 nm 下用分光光度计测吸光值,并对照标准曲线计算酶活<sup>[19]</sup>。

**1.3.5 脂肪酶样品辐照剂量处理及 SDS-PAGE。**取 3 g 脂肪

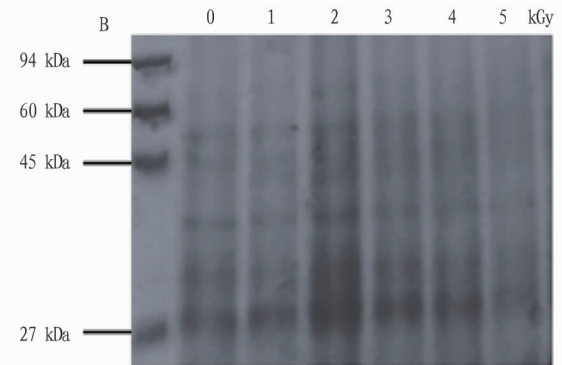
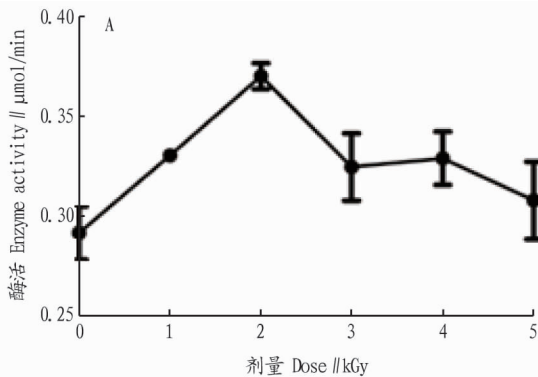
酶蛋白样品,充分溶解于 40 mL 蒸馏水中,即为酶液。量取 200  $\mu\text{L}$  酶液,配制如下浓度混合物,分别为粗提物(0.22 g/mL)、石油醚相(0.17 g/mL)、氯仿相(0.167 g/mL)、乙酸乙酯相(0.24 g/mL)、水相(0.36 g/mL),配制终浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 g/mL 共 8 个浓度梯度,分别进行 0、1、2 和 3 kGy 剂量辐照。样品按常规 SDS-PAGE 电泳<sup>[20]</sup>,0.05%考马斯亮蓝 G250 染色。

**1.3.6 目标蛋白相对分子质量测定。**将完成的胶片取出放在照胶机上,用直尺量出其溴酚蓝线底端的距离,记录下来,然后量出各个标准蛋白的迁移距离和鱼脂肪酶的迁移距离,再使用相对迁移率公式,将各个标准蛋白和鱼脂肪酶的相对迁移率计算出来。

$$\text{相对迁移率} = \frac{\text{蛋白迁移距离 (cm)}}{\text{溴酚蓝带迁移距离 (cm)}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

**2.1 不同辐照剂量对脂肪酶活力的影响** 由图 1A 可知,不同剂量的电子束辐照脂肪酶对酶活性产生不同的影响。当脂肪酶没有进行辐照时,酶活力是 0.291  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ;当吸收剂量为 1 kGy 时,酶活力显著提高,为 0.333  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ;当吸收剂量为 2 kGy 时,酶分子可能发生了交联反应,条带变深,出现了少量分子量略大于蛋白质分子,酶活力是 0.372  $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。低剂量的辐照促进了酶活力提高,而当辐照剂量达 3、4、5 kGy 时,脂肪酶活力开始下降,可能是由于蛋白质肽链发生了断裂,蛋白质发生降解,一级结构发生改变,酶活力降低(图 1B)。



注:A.0~5 kGy 辐照时酶活;B.0~5 kGy 辐照时 SDS-PAGE 情况

Note:A.Enzyme activity in 0-5 kGy irradiation;B.SDS-PAGE in 0-5 kGy irradiation

图 1 0~5 kGy 辐照鲈鱼脂肪酶酶活及 SDS-PAGE

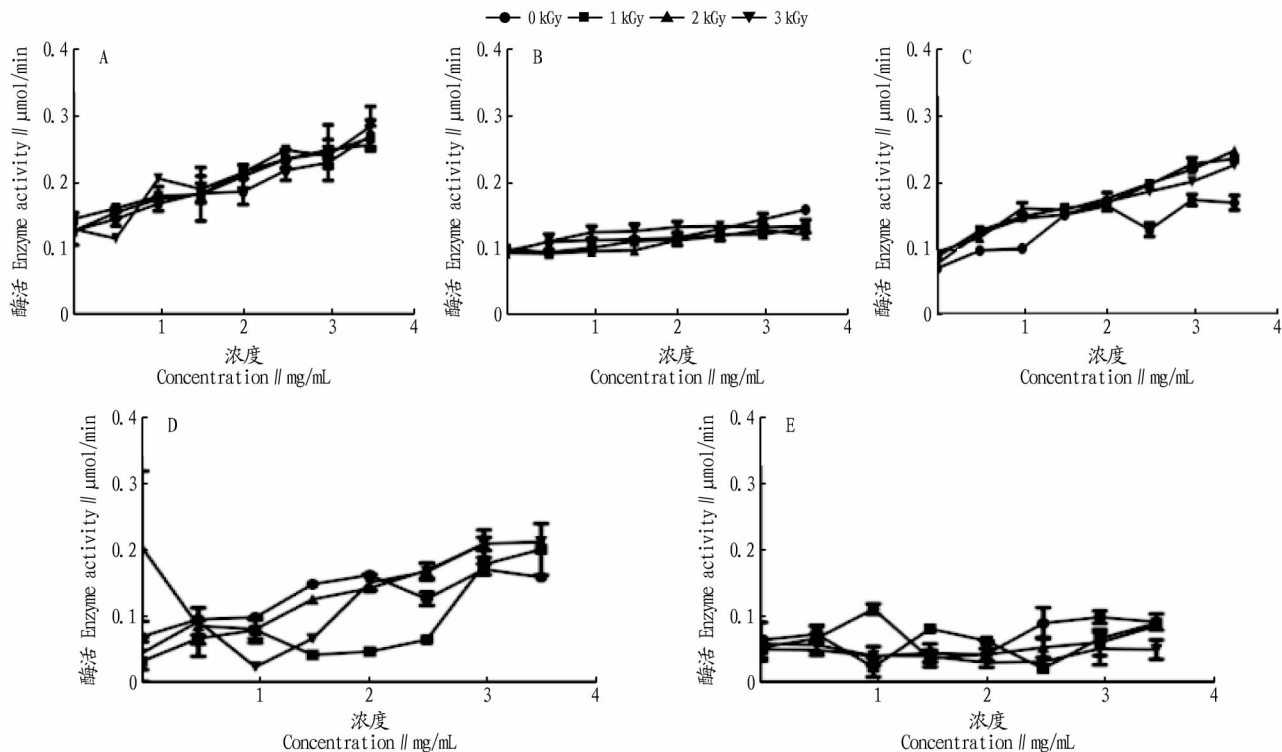
Fig.1 Lipase activity of *Lateolabrax japonicus* irradiated with 0-5 kGy and SDS-PAGE

**2.2 不同花生叶提取物对不同剂量辐照后脂肪酶活力的影响** 由图 2 可知,粗提物对酶活力的促进影响最大,并显著大于其他相酶活力,氯仿相次之,石油醚相和水相酶活力保持较稳定水平,而乙酸乙酯相酶活力波动较大。据以上可以推测,植物多酚含有某种物质,对脂肪酶活力起到了保护作用,随着粗提物的逐层萃取分离,该物质的含量也随之降低。

**2.3 目标蛋白相对迁移率** 蛋白质的相对分子质量分数的对数和其迁移率有着线性关系,以标准蛋白质相对分子质量的

对数 lgMW 为纵坐标,相对迁移距离为横坐标做图,得到标准曲线(图 3)。然后根据样品蛋白质的相对迁移距离,从标准曲线所得方程求出其相对分子质量。

蛋白质的迁移率和分子量的对数呈线性关系,符合下式:  $\lg MW = K - bX$ ,式中, MW 为分子量, X 为迁移率, K、b 均为常数,测量目标蛋白迁移距离是 4.94 cm,带入方程,即所得目标蛋白大小为 34.08 kDa。



注:A、B、C、D、E 分别为粗提物相、石油醚相、氯仿相、乙酸乙酯相、水相

Note:A,B,C,D and E are crude extract phase,petroleum ether phase,chloroform phase,ethyl acetate phase and water phase respectively

图2 0~3 kGy 条件下不同花生叶提取物对脂肪酶活性的保护作用

Fig.2 Protective effects of different peanut leaf extracts on lipase activity under 0~3 kGy conditions

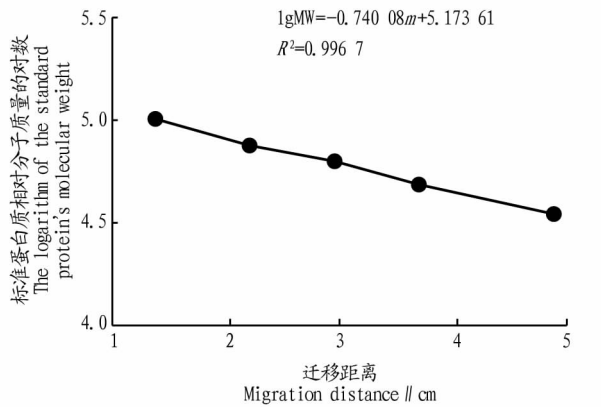


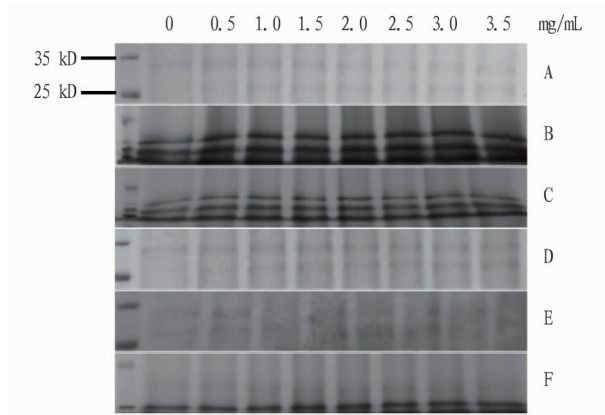
图3 标准蛋白相对迁移率标准曲线

Fig.3 Relative mobility standard curve of standard protein

**2.4 不同剂量辐照对目标蛋白的影响** 根据以上结果,与对照相比,在3 kGy 电子束辐照时,花生叶提取物分别起到了不同的保护脂肪酶的作用,花生叶粗提物对脂肪酶的保护作用最强烈,并且随着浓度的增加,保护作用增强,石油醚相作用也比较明显,但不如粗提物相明显,氯仿相在一定程度上也起到了保护作用,与前3个相对比,乙酸乙酯相和水相保护作用最弱(图4)。由上可以推测,随着花生叶提取物分级萃取,各个相含有脂肪酶有效保护物质减少。

**2.5 脂肪酸结合酶促进脂肪分解** 脂肪酸结合蛋白属于脂结合蛋白超家族成员,是一类分子量较小而对脂肪酸有高亲和力的可溶性蛋白质<sup>[21]</sup>,广泛存在于脊椎动物和非脊椎动

物的细胞质中。它是细胞内重要的脂肪酸载体蛋白,广泛参与脂肪酸的吸收、转运和代谢<sup>[22]</sup>。最基本的功能主要是参与脂肪酸从细胞膜转运到脂肪酸在细胞内被利用的位置。脂肪酸通过各种细胞质膜的转运一般认为是简单扩散和脂类分离的被动过程,这种转运随之就结合到细胞质上,然后运输到细胞器里,或者沿着细胞内膜继续移动<sup>[23]</sup>。目前长



注:A 为对照;B、C、D、E、F 为添加不同浓度的粗提物相、石油醚相、氯仿相、乙酸乙酯相、水相

Note:A is the control;B,C,D,E,F and F are crude extract phase,petroleum ether phase, chloroform phase,ethyl acetate phase and water phase with different concentrations

图4 3 kGy 条件下不同花生叶提取物 SDS-PAGE 验证

Fig.4 SDS-PAGE validation of different peanut leaf extracts under 3 kGy condition



- try, 2010, 122(3):495-499.
- [11] 武玉婷,李春,王晨旭,等.化学修饰改进脂肪酶催化特性的研究及食品中应用[J].食品工业科技,2013,34(21):366-368,373.
- [12] DENOVAN-WRIGHT E M,PIERCE M,SHARMA M K,et al.cDNA sequence and tissue-specific expression of a basic liver  $\gamma$ -type fatty acid binding protein in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J].Biochemical & biophysical acta,2000,1492:227-232.
- [13] SMICHI N,FENDRI A,CHAÂBOUNI R,et al.Purification and biochemical characterization of an acid-stable lipase from the pyloric caeca of sardine (*Sardinella aurita*) [J].Applied biochemistry and biotechnology, 2010,162(5):1483-1496.
- [14] KURTOVIC I,MARSHALL S N,ZHAO X,et al.Purification and properties of digestive lipases from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and New Zealand hoki (*Macruronus novaezelandiae*) [J].Fish physiology and biochemistry,2010,36(4):1041-1060.
- [15] 彭益强,邓峰,刘宇,等.富士苹果中多酚氧化酶活性的中心必需基因与抑制动力学[J].华侨大学学报(自然科学版),2012,33(1):51-54.
- [16] SMICHI N,GARGOURI Y,MILED N,et al.A grey mullet enzyme displaying both lipase and phospholipase activities;Purification and characterization[J].International journal of biological macromolecules,2013,58:87-94.
- [17] BRADFORD M M.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J].Analytical biochemistry,1976,72(1/2):248-254.
- [18] 江慧芳,王雅琴,刘春国.三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进[J].化学与生物工程,2007,24(8):72-75.
- [19] GENTILI C,CERMELLI S,TACCHETTI C,et al.Expression of the extra-cellular fatty acid binding protein (Ex-FABP) during muscle fiber formation *in vivo* and *in vitro* [J].Exp Cell Res,1998,242(2):410-418.
- [20] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,2005:66-68,106-108.
- [21] HER G M,YEH Y H,WU J L.Functional conserved elements mediate intestinal-type fatty acid binding protein (I-FABP) expression in the gut epithelia of zebrafish larvae [J].Developmental dynamics,2004,230(4):734-742.
- [22] DENOVAN-WRIGHT E M,PIERCE M,SHARMA M K,et al.cDNA sequence and tissue-specific expression of a basic liver-type fatty acid binding protein in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J].Biochemical & biophysical acta,2000,1492:227-232.
- [23] SMICHI N,FENDRI A,CHAÂBOUNI R,et al.Purification and biochemical characterization of an acid-stable lipase from the pyloric caeca of sardine (*Sardinella aurita*) [J].Applied biochemistry and biotechnology, 2010,162(5):1483-1496.
- [24] VETRI V,LIBRIZZI F,LEONE M,et al.Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH;comparison with human serum albumin [J].Eur Biophys J,2007,36:717-725.
- [25] NILSSON A,LANDIN B,SCHOTZ M C.Hydrolysis of chylomicron arachidonate and linoleate ester bonds by lipoprotein lipase and hepatic lipase [J].J Lipid Res,1987,28(5):510-517.
- [26] KERN P A,RANQANATHAN G,YUKHT A,et al.Translational regulation of lipoprotein lipase by thyroid hormone is via a cytoplasmic repressor that interacts with the 3' untranslated region [J].J Lipid Res,1996,37(11):2332-2340.

(上接第 165 页)

含量最高,较对照提高 4.59%,O/L 值也比对照提高了 0.2。

综上所述, $T_1$  和  $T_2$  处理对花生农艺性状有较好的促进作用, $T_2$  处理对花生荚果及籽仁产量提高最显著, $T_1$  处理次之;对花生品质方面,以  $T_1$  处理的效果最好。因此在花生生产上若是单追求提高花生产量,可应用  $T_2$  处理;若兼顾提升花生的品质,可应用  $T_1$  处理。

#### 参考文献

- [1] 郑圣先,聂军,熊金英,等.控释肥料提高氮素利用率的作用及对水稻效应的研究[J].植物营养与肥料学报,2001,7(1):11-16.
- [2] 杨俊刚,曹兵,徐秋明,等.控释肥料在旱地农田的应用研究进展与展望[C]//第四届国际缓处理产业发展高层论坛论文集.北京:中国化工信息中心,全国农业技术推广服务中心,2011.
- [3] 汤自光,李强,易光明,等.不同缓控释肥对棉花农艺性状、产量和效益的影响[J].安徽农业科学,2015,43(21):104-106.
- [4] 陈妍,何万春,海龙,等.不同控释肥对甘肃中部覆膜马铃薯产量和土壤矿质氮水平的影响[J].西北农业学报,2015,24(11):72-79.
- [5] 杨吉顺,李尚霞,吴菊香,等.控释肥对花生产量及干物质积累的影响[J].山东农业科学,2013,45(10):98-100,107.
- [6] 王艳华,董元杰,邱现奎,等.控释肥对坡耕地花生生理特性、产量及品质的影响[J].作物学报,2010,36(11):1974-1980.
- [7] 李钟平,张昆,叶川,等.控释肥不同配比对丘陵红壤花生产量和主要农艺性状的影响[J].花生学报,2013,42(3):38-42.
- [8] 董亮,张玉凤,刘兆辉,等.不同包膜控释肥对花生生物性状及养分含量的影响[J].现代农业科技,2009(23):23-24,26.
- [9] 张玉树,丁洪,卢春生,等.控释肥料对花生产量、品质以及养分利用率的影响[J].植物营养与肥料学报,2007,13(4):700-706.
- [10] 张海焱,王月福,张晓军,等.控释肥对花生田土壤养分含量及产量品质的影响[J].花生学报,2016,45(2):27-32.
- [11] 邱现奎,董元杰,史衍玺,等.控释肥对花生生理特性及产量、品质的影响[J].水土保持学报,2010,24(2):223-226,250.