

高压脉冲电场对葡萄糖淀粉酶活化的研究

田美玲¹, 方婷², 杜木英¹, 张甫生¹

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆北碚 400715) (2. 福建农林大学食品科学学院, 福建福州 350001)

摘要: 为寻求高效、安全、快捷地运用高压脉冲电场 (PEF) 对酶进行活化改性的可行性。本项目以葡萄糖淀粉酶为对象, 研究 PEF 处理对其活性、酶学性质、动力学参数的影响, 并借助 SDS-PAGE、荧光光谱和圆二色谱 (CD) 等分析其构象变化。研究表明: 当电场强度为 15 kV/cm, 流速为 80 mL/min, 葡萄糖淀粉酶活性激活最为明显, 与原酶液相比增加 20.74±0.71%, 且该激活效应在 4 °C 环境下能维持 17 h; 并且 PEF 处理能拓宽葡萄糖淀粉酶的最适反应温度范围, 降低 K_m , 增大 V_{max} , 提高其催化效率, 但最适 pH 范围几乎不变。同时 SDS-PAGE 结果表明 PEF 处理不改变葡萄糖淀粉酶分子量, 其一级结构不变; 圆二色光谱结果表明, PEF 处理使其 α -螺旋、 β -折叠含量分别增加 3.00% 和 2.80%, 酶空间结构趋于有序化, 二级结构发生改变; 而内源荧光分析显示 PEF 处理使酶吸收峰增强, Trp 残基等微环境暴露, 三级结构发生变化。

关键词: 葡萄糖淀粉酶; PEF 处理; 酶学性质; 动力学; 构象

文章编号: 1673-9078(2015)8-248-253

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.039

Effect of Pulsed Electric Field Treatment on Glucoamylase Activation

TIAN Mei-ling¹, FANG Ting², DU Mu-ying¹, ZHANG Fu-sheng¹

(1. College of Food Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

(2. College of Food Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fujian 350001, China)

Abstract: The efficient, safe, and rapid application of pulsed electric field (PEF) technology to enzymatic modification was studied. The effect of PEF treatment on the enzymatic activity, properties, and kinetic parameters of glucoamylase were investigated, while conformational transitions were studied using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), circular dichroism (CD) and fluorescence spectroscopy. The results showed that the maximum increase in activity obtained was 20.74 ± 0.71% as compared to control, observed when 15 kV/cm electric field intensity and 80 mL/min flow rate were applied and this activation effect lasted for up to 17 h at 4 °C. Moreover, PEF treatment widened the range of optimum temperature for glucoamylase activity, increased the V_{max} and decreased the K_m , but had a negligible effect on the optimum pH of glucoamylase. Results of SDS-PAGE indicated that the primary structure of glucoamylase did not change after PEF treatment. However, according to CD and fluorescence spectra, PEF treatment enhanced the α -helix and β -sheet content in glucoamylase by 3.00% and 2.80%, respectively, leading to more ordered conformation. Additionally, intrinsic fluorescence spectra analysis showed that PEF treatment resulted in a red shift of the emission maximum of glucoamylase due to the exposed microenvironment of Trp residue. Therefore, based on these results, both, secondary and tertiary structures of glucoamylase were modified.

Key words: glucoamylase; pulsed electric field treatment; enzymatic property; enzymatic kinetics; conformation

葡萄糖淀粉酶 (Glucoamylase, EC.3.2.1.3) 又名 γ -淀粉酶 (γ -amylase) 或淀粉葡萄糖苷酶 (Amyloglucosidase), 简称糖化酶。它是一种酸性的单链外切型糖苷水解酶, 可以从生淀粉或可溶性淀粉和低聚糖的非还原末端依次水解 α -1, 4 糖苷键, 切下一个个葡萄糖单元, 并通过反相机理变成 β -D 葡萄糖^[1]。

收稿日期: 2014-09-12

项目基金: 重庆市自然科学基金项目 (cstc2012jjA80045)

作者简介: 田美玲 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品非热加工

通讯作者: 张甫生 (1983-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为果蔬加工、食品非热加工

由于葡萄糖淀粉酶的催化特性, 适当延长保温时间也能水解 α -1,6 和 α -1,3 糖苷键从而将底物完全水解成葡萄糖^[2]。葡萄糖淀粉酶是典型的微生物酶, 主要存在于丝状真菌 (黑曲霉、米曲霉、根霉) 和酵母中, 古生菌、细菌和动植物中分布较少; 其中由黑曲霉 (*A. awamori* and *A. niger*) 生产的葡萄糖淀粉酶已广泛应用于淀粉加工、酿造、食品、医药等工业中, 是我国产量最大的酶制剂产品之一^[3]。然而葡萄糖淀粉酶在应用过程中存在酶活性低、稳定性差、再生困难等缺点, 极大地限制了其工业化应用, 也增加了实际生产成本。为此, 国内外企业及研究机构都迫切地期望通

过酶改性技术, 达到提高酶活、增强酶的热稳定性、延长酶寿命、降低生产用酶量的目的。

高压脉冲电场(PEF)技术是一种新兴的非热加工技术, 是指将食品置于带有两个电极的处理室中, 给予高压电脉冲, 形成脉冲电场的处理技术, 具有高强度、短时、温升小、能耗低等特点^[4]。PEF 已广泛应用于液体食品杀菌且能有效保存其营养成分和天然色、香、味, 是最具潜力的非热杀菌技术^[5]。近年来, 人们在应用 PEF 技术对钝酶过程中发现, 一些较低强度的 PEF 处理条件能迅速地提高酶的活性。如 Leong 等将电场应用于草莓汁加工中, 发现 PEF 处理可使果汁中脂肪氧合酶与 β -葡糖苷酶的活性分别提高 14.1% 与 18.8%^[4]; Ohshima 等研究显示 PEF 处理可使乳酸脱氢酶与烯醇酶活性提高 5% 以上, β -半乳糖苷酶与过氧化物酶活性提高 20% 以上^[6]; Najim 等研究表明中等强度 PEF 可使两种不同乳酸菌种来源的蛋白酶活性分别提高 11.6% 与 21.9%^[7]。但目前这些激活研究大多集中于对酶活性的影响, 对其性质和构象影响报道较少, 且研究层面也不够深入。为此, 本研究拟探讨 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶活性、酶学性质及构象的影响, 探析 PEF 对葡萄糖淀粉酶活化的机理, 以期 PEF 技术对酶活化改性提供重要基础数据和理论解释, 并推动 PEF 等非热加工技术在酶改性领域中的合理应用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

葡萄糖淀粉酶: 黄褐色液体, 比重 1.2, 酶活力 10 万 U/ml, 阿拉丁试剂(上海)有限公司。

可溶性淀粉、3, 5-二硝基水杨酸、磷酸氢二钠、柠檬酸、醋酸钠、冰乙酸、甲醇、考马斯亮蓝 R-250、甘氨酸、SDS、 β -巯基乙醇、TEMED、丙烯酰胺等均分析纯, 中国药品试剂有限公司。

1.2 PEF 试验装置系统

PEF 连续处理装置为福建农林大学设计开发。主要由脉冲发生器、处理室、示波器、蠕动泵组成。脉冲电场参数如下: 电场强度 0~50 kV/cm, 流速为 50~180 mL/min, 频率为 128 Hz, 脉冲宽度为 17 μ s, co-field 连续处理室, 脉冲周期 10~1 kHz, 单极脉冲, 试验波型为方波。

1.3 方法

1.3.1 实验设计

移液枪量取 0.1 mL 葡萄糖淀粉酶, 用 1 L 0.05 M pH 4.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液配置成酶待处理液。管路接入蛇形管于恒温水浴锅中以恒定 25 °C 反应温度, 测定不同电场强度 (3、6、9、12、15、18、21、24 kV/cm) 和流速 (50、60、80、100、120、140、160 mL/min) 对葡萄糖淀粉酶活性的影响。

1.3.2 葡萄糖淀粉酶活力测定

采用 DNS 比色法测定葡萄糖淀粉酶活性。在 20 mL 试管中依次加入 0.9 mL 1% 可溶性淀粉溶液 (乙酸-乙酸钠缓冲液 pH 4.5 配置) 和 0.1 mL 的酶液, 65 °C 混合反应 10 min 后, 加入 1 mL DNS 试剂, 摇匀, 沸水浴 5 min 中止反应, 取出流水冷却, 蒸馏水稀释至 10 mL, 于 540 nm 波长下测定吸光度, 并计算酶活。酶活力单位定义: 在 pH 4.5、温度 65 °C, 10 min 水解可溶性淀粉释放 1 mol 还原物质(以葡萄糖计算)时所需的酶量, 为 1 个酶活力单位(U)。

1.3.3 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶的最适温度与最适 pH 的影响

固定 pH 4.5 条件下测定经 PEF 处理过葡萄糖淀粉酶溶液在 40~80 °C 的酶活力, 用不同 pH (磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 pH 2.5~4.0, 乙酸-乙酸钠缓冲液 pH 4.5~6.0, tris-盐酸缓冲液 pH 6.5~7.0) 0.05 M 缓冲液配置酶底物溶液测定经 PEF 处理后葡萄糖淀粉酶活性, 以最高酶活力为 100%, 计算相对酶活力, 分析其最适温度及 pH 变化。

1.3.4 PEF 处理激活葡萄糖淀粉酶的保存稳定性测定

将 PEF 处理过的葡萄糖淀粉酶冷藏于 4 °C 环境, 以原酶液作为空白, 每隔一小时测定其残余酶活。

1.3.5 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶的动力学参数的影响

将经 PEF 处理和未处理的葡萄糖淀粉酶溶液在不同底物(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.6%、0.8% 可溶性淀粉)浓度的反应体系中, 65 °C 反应 10 min, 测定 A_{540} 以计算酶反应的初速度, 作 Lineweaver-Burk 双倒数图。

1.3.6 PEF 处理的葡萄糖淀粉酶 SDS-PAGE 分析

将经 PEF 处理和未处理的葡萄糖淀粉酶溶液(1 mg/mL)在 Bio-Rad 电泳仪进行电泳实验, 分离胶和浓缩胶浓度分别为 15% 和 5%, 采用稳压先将电压调至 60 V, 待样品从浓缩胶进入分离胶时电压调至 110 V 并保持电泳结束。考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色后用 UMAX 扫描仪扫描得到电泳图。

1.3.7 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶二级结构的

影响

取适量 PEF 处理和未处理的葡萄糖淀粉酶溶液, 采用 MOS-450 圆二色谱仪, 以 0.05 M、pH 4.5 醋酸钠缓冲液为空白, 比色皿厚度 0.1 cm, 扫描范围 190~260 nm, 室温下重复扫描 3 次, 扫描速度 30 nm/min。圆二色性用平均残基椭圆值 $[\theta]$ 表示, 单位为 $\text{deg cm}^2/\text{dmol}$ 。葡萄糖淀粉酶二级结构含量应用在线工具 DICROWEB 分析^[8]。

1.3.8 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶三级结构的影响

采用 RF-5310PC 荧光光度计, 取适量经 PEF 处理的葡萄糖淀粉酶酶液, 使用激发波长 $\lambda_{\text{ex}}=295 \text{ nm}$, 常温(25±1) °C 重复扫描 3 次, 扫描波长 λ_{em} 范围为 310~400 nm, 狭缝宽度为 5 nm, 以未经过 PEF 处理的葡萄糖淀粉酶酶液为对照。

1.4 实验数据的分析方法

每组实验重复三次, 实验数据运用 SPSS19.0 和 OriginPro8.6 进行分析处理和图形绘制。

2 结果与分析

2.1 不同电场强度对葡萄糖淀粉酶活力的影响

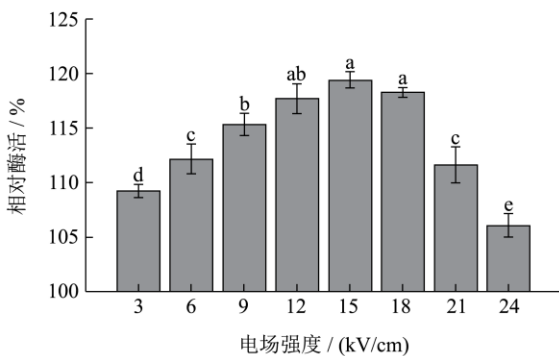


图 1 不同电场强度下葡萄糖淀粉酶的相对酶活

Fig.1 Relative activity of glucoamylase treated under different electric field intensity

注: 不同字母表示各组之间的显著性差异。

由图 1 可知, 葡萄糖淀粉酶在不同电场强度 PEF 处理后, 酶活力呈先增加后降低的趋势。在固定流速 50 mL/min 条件下, 电场强度为 15 kV/cm, 葡萄糖淀粉酶活性增加 $19.41 \pm 0.75\%$, 与原酶液相比显著增加 ($p < 0.05$)。而电场强度增加至 21 kV/cm、24 kV/cm 时, 葡萄糖淀粉酶相对酶活增加幅度降低, 分别为 $11.64 \pm 1.65\%$ 、 $6.07 \pm 1.06\%$ 。这可能是由于适当的电

场强度处理使维持酶蛋白分子结构次级键发生变化, 从而使酶活力提高, 但过高电场强度破坏酶蛋白螺旋结构的偶极矩而使酶结构部分展开, 酶活性降低或增加幅度降低^[9]。因此处理工艺应选择适宜的电场强度, 本实验条件下最佳电场强度为 15 kV/cm。

2.2 不同流速处理对葡萄糖淀粉酶的活力的影响

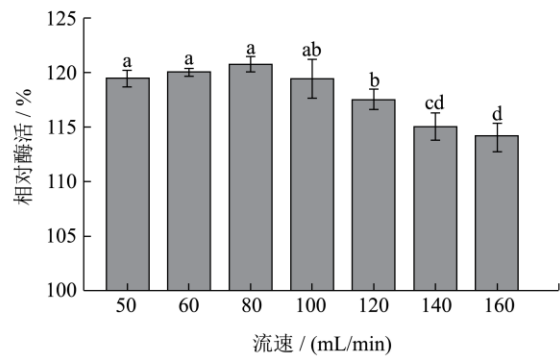


图 2 不同流速处理下葡萄糖淀粉酶的相对酶活

Fig.2 Relative activity of glucoamylase treated under different flow rates

注: 不同字母表示各组之间的显著性差异。

固定电场强度为 15 kV/cm, 不同流速处理的葡萄糖淀粉酶活性如图 2 所示。流速大小决定酶液通过电场时间长短, 而酶活性大小与 PEF 处理时间的长短有密切关系^[6]。从图中可以看出, 当流速从 50 mL/min 增至 80 mL/min 时, 葡萄糖淀粉酶酶活逐渐升高, 并在流速为 80 mL/min 时酶活达到最高, 与原酶液相比, 此时活性增加 $20.74 \pm 0.71\%$; 但在在此流速区间内各酶活无显著性差异, 说明在此区间内酶已被完全激活; 而当流速大于 80 mL/min 并继续增大时, 葡萄糖淀粉酶活性显著降低 ($p < 0.05$), 这可能是由于处理时间过短, 酶未被完全激活而导致其活性降低。因此, 综合考虑处理效率等因素, 选择 80 mL/min 为 PEF 处理的最佳流速条件; 同时后期 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶性质及构象影响的试验研究, 也依据上述单因素试验结果的最优条件 (电场强度 15 kV/cm, 流速 80 mL/min) 来进行。

2.3 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶最适温度和 pH 的影响

PEF 处理对葡萄糖淀粉酶最适温度的影响见图 3, 从图中可以看出, PEF 处理和未处理的葡萄糖淀粉酶最适反应温度均为 65 °C, PEF 处理并不改变葡

葡萄糖淀粉酶的最适温度；但经过 PEF 处理的葡萄糖淀粉酶的最适温度范围(酶活保持在 95% 以上的温度范围)变大, 未经 PEF 处理的葡萄糖淀粉酶最适温度范围为 65~70 °C, 而 PEF 处理后葡萄糖淀粉酶最适温度范围为 60~70 °C。

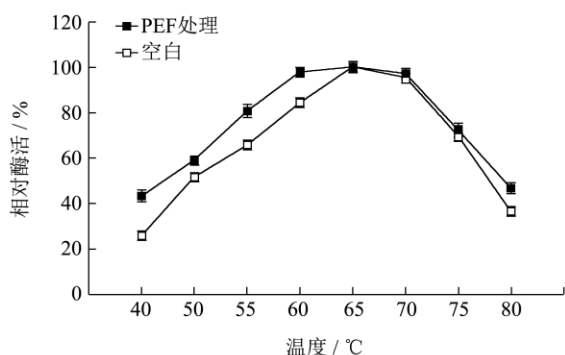


图 3 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶的最适反应温度影响

Fig.3 Temperature profile of glucoamylase treated with PEF

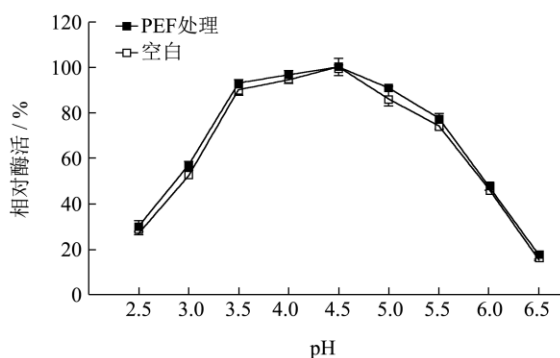


图 4 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶的最适 pH 影响

Fig.4 pH profile of glucoamylase treated with PEF

pH 是影响酶活性的重要因素之一, 其能影响酶分子上酸性或碱性氨基酸侧基的离解状态, 进而影响酶和底物的结合或酶的空间构型, 从而影响酶活性^[10], 当介质的 pH 值对最适宜值偏离较大时, 可导致酶的变性失活。由图 4 可以看出, PEF 处理并未改变葡萄糖淀粉酶的最适 pH 范围, PEF 处理和未经 PEF 处理的葡萄糖淀粉酶的最适 pH 范围均为 3.5~5.5。

2.4 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶激活的保存稳定性分析

通过每隔一小时测定其残余酶活得到 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶激活保存稳定性, 结果如图 5 所示。从图中可以看出, 由电场导致葡萄糖淀粉酶酶活性增加效应随时间的推移而趋于消失, 在放置第 18 h, 葡萄糖淀粉酶的相对酶活为 99.86±0.83%, 低于葡萄糖淀粉酶原酶液活性。而在相同条件下, 18 h 后未经 PEF 处理的葡萄糖淀粉酶相对酶活与原酶液相比为

88.06%; 而后随着时间延长, 酶活性继续下降, 约在 36h 后二者活性基本相当(原酶液图未在文中给出)。说明电场导致的酶活性增加效应有时效性, 在该实验条件下这种激活效应能保持 17 h。

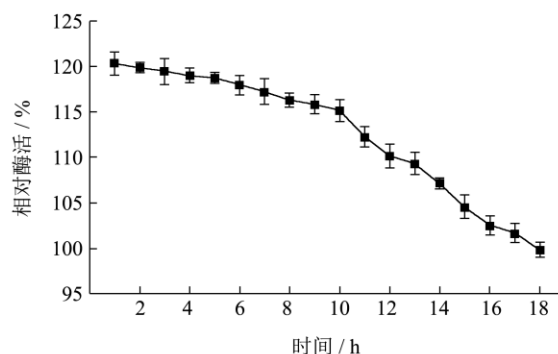


图 5 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶激活保存稳定性

Fig.5 Glucoamylase stability of PEF treatment during refrigerated storage

2.5 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶的动力学参数影响

表 1 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶动力学参数的影响

Table 1 PEF effect on kinetics parameters of glucoamylase

	V_{max} /(10^{-4} M/min)	K_m /(10^{-3} M)	K_{cat} / M^{-1}	k_{cat}/K_m /($M^{-1} min^{-1}$)
空白	3.85±0.14	8.58±0.06	2770.87	323133.49
PEF 处理	4.37±0.03	8.43±0.07	3148.19	373397.58

由经典的 Michaelis-Menten 动力学方程, 作图法可得到米氏常数(K_m)、最大反应速率(V_{max}), 催化常数(k_{cat})通过 V_{max} 与酶浓度的比值得到, 结果如表 1 所示。由表 1 可知, 经 PEF 处理的葡萄糖淀粉酶与未处理的相比 V_{max} 增大, K_m 降低, 说明此时酶与底物亲和力增大, 其在饱和浓度下的限制反应速度也增大。同样, 经 PEF 处理的葡萄糖淀粉酶的 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m 也高于未处理的, 说明 PEF 处理能影响葡萄糖淀粉酶催化效率, 使反应底物以增加的速率转换为产物。这可能是由于 PEF 处理导致酶结构变化, 酶的底物的亲和力增加, 葡萄糖淀粉酶与基质结合更容易且表现出更高的催化能力。

2.6 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶一级结构影响

SDS 凝胶电泳结果如图 6 所示, 与未经过任何处理的葡萄糖淀粉酶的分子量相比, 经 PEF 处理的葡萄糖淀粉酶分子量没有改变。说明 PEF 处理未引起葡萄糖淀粉酶肽键没有断裂, 一级结构未发生改变。

同时, 现有研究也表明 PEF 处理不能诱导酶多肽链的化学变化, 如 Ohshima 等对过氧化物酶、烯醇酶、 β -半乳糖苷酶、乳酸脱氢酶进行 SDS-PAGE 分析发现 PEF 处理未能引起肽键断裂或解离^[6]; Swanson 等也证明 PEF 处理对碱性磷酸酶的一级结构没有影响^[11]。

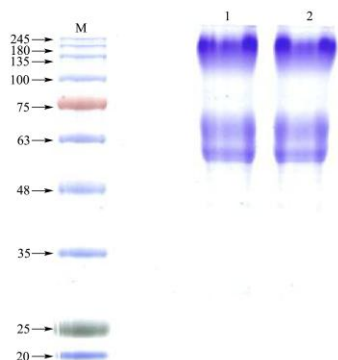


图 6 PEF 处理与未处理的葡萄糖淀粉酶凝胶电泳图

Fig.6 The electrophoretogram of PEF-treated glucoamylase and control

注: M: Standard proteins; Lane 1: Control; lane 2: PEF-treated glucoamylase.

2.7 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶的荧光光谱分析

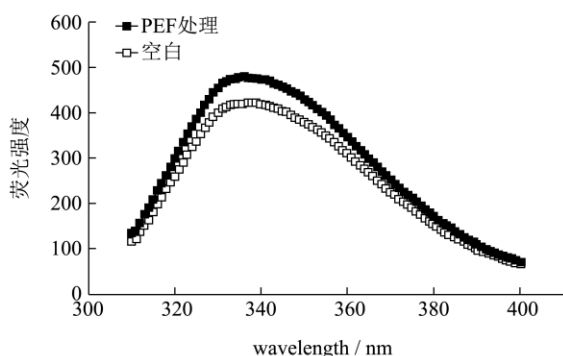


图 7 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶的荧光光谱的影响

Fig.7 Intrinsic fluorescence spectra of control and PEF-treated glucoamylase

蛋白质的内源性荧光主要由于色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)及苯丙氨酸(Phe)这三种芳香族氨基酸的侧链生色基团不同而产生。Phe 残基在一般情况难被激发, Tyr 残基的荧光光谱最大发射波长一般位于 303 nm 左右, 而 Trp 残基对微环境的变化很敏感, 导致其峰位多在 325~350 nm 之间变动^[12]。因此, 色氨酸荧光光谱常被认为是能可靠地确定蛋白质的构象变化, 并用于探索酶的三级结构的特征光谱^[12]。从图 7 可以看出, 经 PEF 处理和未处理的葡萄糖淀粉酶的荧光吸收强度峰值均位于 340 nm 波长处, 说明 PEF

处理并不改变酶的最大吸收波长; 但经 PEF 处理的葡萄糖淀粉酶的荧光强度显著高于未处理的, 说明 PEF 处理使得葡萄糖淀粉酶中 Trp 等芳香族氨基酸残基微环境的变化, 部分残基暴露, 三级结构发生改变^[13]。

2.8 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶的圆二色谱分析

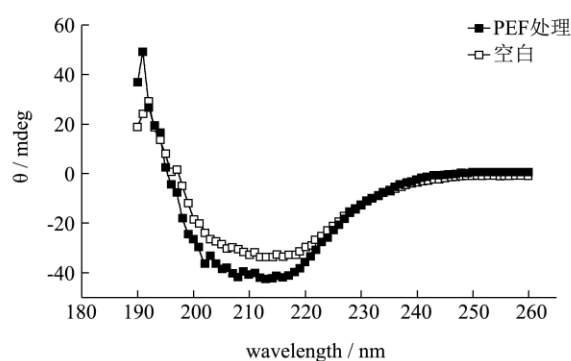


图 8 PEF 处理对葡萄糖淀粉酶的圆二色谱的影响

Fig.8 Far-UV CD spectra of control and PEF-treated glucoamylase

圆二色性(CD)是一种特殊的吸收光谱, 由于其高灵敏度、可靠性和便捷性, 常用于溶液中酶二级结构的研究。运用圆二色谱分析 PEF 对葡萄糖淀粉酶二级结构的影响, 结果如图 8 所示。从图 8 可以看出经 PEF 处理后的葡萄糖淀粉酶峰位和峰高都发生不同程度的变化, 192 nm 正峰蓝移 1 nm 单位, 峰高增加, 而 210 nm 左右负峰经 PEF 处理的后峰位不变但峰高降低, 降低幅度为 25.65%。二级结构含量变化计算结果如表 2 所示, 从表中可知, α -螺旋、 β -折叠含量分别增加 3.00%和 2.80%, 而转角、无规卷曲含量分别降低 3.00%和 3.10%, 说明电场作用使葡萄糖淀粉酶二级结构趋于有序化。这可能是由于 α -螺旋等有易受电场影响的偶极矩, PEF 处理作用于偶极矩后使酶分子发生重折叠^[6,9], 酶二级结构趋于有序化, 酶活性提高^[14]。

表 2 PEF 处理与未处理的葡萄糖淀粉酶二级结构含量

Table 2 Content of the secondary structure of α -amylase in the presence and absence of PEF treatment

	α -螺旋 /%	β -折叠 /%	转角 /%	无规卷曲 /%
空白	11.60	29.60	21.40	37.60
PEF 处理	14.60	32.40	18.40	34.50

3 结论

不同电场强度和流速对葡萄糖淀粉酶的活力都有着不同的影响, 最佳 PEF 处理条件下酶活性增加 20.74±0.71%, 且该激活效应在 4 °C 环境下能持续 17 小时, 说明在适宜 PEF 处理用于激活酶是可行的。同时 PEF 处理能拓宽葡萄糖淀粉酶的最适反应温度范围, 降低 K_m , 增大 V_{max} , 使酶与底物亲和力增加, 催化效率提高, 但对最适 pH 几乎没有影响。SDS-PAGE, 圆二色谱和荧光光谱研究表明, PEF 处理激活酶的可能机制是电场处理作用于偶极矩后使酶发生重折叠, 葡萄糖淀粉酶中 Trp 等芳香族氨基酸残基微环境的变化, 酶空间结构改变, 从而使酶与底物结合更加容易, 酶活性提高。

参考文献

- [1] Norouzian D, Akbarzadeh A, Scharer J M, et al. Fungal glucoamylases [J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(1): 80-85
- [2] Mar í-Navarro J, Polaina J. Glucoamylases: structural and biotechnological aspects [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(5): 1267-1273
- [3] James J A, Lee B H. Glucoamylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology-a review [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 1997, 21(6): 1-52
- [4] Leong S Y, Oey I. Effect of pulsed electric field treatment on enzyme kinetics and thermostability of endogenous ascorbic acid oxidase in carrots (*Daucus carota* cv. Nantes) [J]. *Food Chemistry*, 2014, 146: 538-547
- [5] Salvia-Trujillo L, Morales-de la Peña M, Rojas-Graü M A, et al. Microbial and enzymatic stability of fruit juice-milk beverages treated by high intensity pulsed electric fields or heat during refrigerated storage [J]. *Food Control*, 2011, 22(10): 1639-1646
- [6] Ohshima T, Tamura T, Sato M. Influence of pulsed electric field on various enzyme activities. [J]. *Journal of Electrostatics*, 2007, 65(3): 156-161
- [7] Najim N, Aryana K J. A mild pulsed electric field condition that improves acid tolerance, growth, and activity of *Lactobacillus acidophilus* LA-K and *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* LB-12 [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(6): 3424-3434
- [8] Whitmore L, Wallace B A. DICHROWEB, An online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: W668-W673
- [9] Zhao W, Yang R, Zhang H Q. Recent advances in the action of pulsed electric fields on enzymes and food component proteins [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2012, 27(2): 83-96
- [10] Saha B C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides* [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(12): 1871-1876
- [11] Swanson B G, Dunker A K. Pulsed electric field denaturation of bovine alkaline phosphatase [J]. *Pulsed Electric Fields in Food Processing: Fundamental Aspects and Applications*, 2001: 83
- [12] 胡勇, 扶雄, 陈旭东, 等. 聚乙二醇与蛋白质相互作用的荧光和共振散射光谱研究[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(4): 353-357
- HU Yong, FU Xiong, CHEN Xu-dong, et al. Study of interaction between protein and polyethylene glycol revealed by fluorescence spectra and resonance light-scattering spectra [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2009, 25(4): 353-357
- [13] Jafari-Aghdam J, Khajeh K, Ranjbar B, et al. Deglycosylation of glucoamylase from *Aspergillus niger*: effects on structure, activity and stability [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2005, 1750(1): 61-68
- [14] Bashari M, Abdelhai M H, Abbas S, et al. Effect of ultrasound and high hydrostatic pressure (US/HHP) on the degradation of dextran catalyzed by dextranase [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, 21(1): 76-83