

超声波对淀粉酶催化活性的影响

陈小丽¹, 黄卓烈¹, 巫光宏¹, 何平¹, 詹福建¹, 丘泰球²

(1 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642; 2 华南理工大学 食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 为了探索不同参数超声波对淀粉酶活性的影响效果, 将水稻淀粉酶经分级盐析初步纯化后, 用 DEAE-纤维素进行柱层析。层析结果分离出两个蛋白峰。第 1 个蛋白峰无酶活力; 第 2 个蛋白峰有很高的酶活力, 且酶活力峰与蛋白峰吻合。将此峰中蛋白成分进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结果显示的蛋白带比粗酶的蛋白带明显减少。经柱层析后淀粉酶被纯化 13.726 倍。将部分纯化的淀粉酶用适宜参数的超声波处理可以使酶活力提高 9.09%~33.09%。

关键词: 淀粉酶; 超声波; 酶活力; 纯化

中图分类号: Q645.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2005) 01-0076-04

Effect of ultrasound on catalytic activity of amylase

CHEN Xiao-li¹, HUANG Zhuo-lie¹, WU Guang-hong¹, HE Ping¹, ZHAN Fu-jian¹, QIU Tai-qiu²

(1 College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 College of Food and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to probe into the effects of ultrasound in different parameters on amylase activity, coarse amylase of rice was purified with diethylaminoethyl cellulose chromatography after being salted out with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Two single protein peaks were separated with gradient elution. The second protein component showed quite high amylase activity and the activity peak inosculated with the protein peak. The ingredient having the highest activity in the second protein peak was used to process polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that there were less ingredients in the purified sample than in the coarse sample. Ultrasound treatment with suitable parameters could increase the enzyme activity by 9.09%—33.09%.

Key words: amylase; ultrasound; enzymatic activity; purification

淀粉酶家族有 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1)、 β -淀粉酶 (EC 3.2.1.2)、葡萄糖淀粉酶 (EC 3.2.1.3)、麦芽四糖淀粉酶 (EC 3.2.1.60) 等几种, 是一类能催化 α -D-吡喃葡萄糖基之间 (1 $\rightarrow$ 4) 糖苷键水解的酶类。另外, 还有水解支链淀粉的 R 酶等。不同种淀粉酶之间氨基酸等同性很低。近期研究表明, α -淀粉酶和麦芽四糖淀粉酶在空间结构和功能上有一定程度的类似性, 其他两种淀粉酶则具有另外的结构和功能特点^[1]。 α -淀粉酶广泛应用于食品、酿造、制药、纺织、医药及石油开采等方面^[2], β -淀粉酶多应用于饴糖、啤酒和高麦芽糖的生产^[3]。近年来有研究发现, 适

当强度超声波处理可增强细胞膜的透性^[4], 促进生物酶的催化活性^[5,6]。声场对酶催化过程影响的研究将对酶学理论产生积极的影响, 在酶的工业生产利用方面也有很大的应用前景。本研究试图确定声场能量与淀粉酶催化反应速度的关系, 为其在工业催化上的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

淀粉酶从水稻 *Oryza sativa* L. (品种丰丝占) 的发芽种子中提取。水稻种子取自广东省农科院水稻所。

收稿日期: 2004-02-12

作者简介: 陈小丽 (1978-), 女, 硕士, 现在湛江海洋大学工作。通讯作者: 黄卓烈 (1950-), 男, 教授; E-mail: zhulieh@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (10074016)

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 酶活力和蛋白质含量测定

参照 Bradford^[7] 方法测定蛋白质浓度, 参考赵贇^[8] 方法测酶活力。酶活力以每分钟每毫克蛋白质催化生成 1 mg 麦芽糖所要的酶量为一个活力单位 (U), 即 U/(mg·min)。

1.3 酶纯度鉴定

采用聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳(质量分数为 4% 浓缩胶, 质量分数为 10% 分离胶)^[9] 进行。

2 结果与分析

2.1 淀粉酶的提取、部分纯化与鉴定

取稻种在 30℃ 浸种 24 h, 然后 30℃ 培养至露白。取已露白种子研磨匀浆, 12 000 r/min 离心 20 min, 上清液为粗酶液。向粗酶液中加入固体硫酸铵至饱和度 35%, 4℃ 盐析 3 h 后 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 添加硫酸铵至饱和度 60%。4℃ 盐析 6 h 后 12 000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀。将沉淀溶于少量 0.02 mol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液, 于 4

℃ 透析至酶液中不含硫酸根离子, 测定酶活力。

将经硫酸铵分级沉淀的粗酶上 DEAE-纤维素柱层析, 2 cm×30 cm。采用分段洗脱与梯度洗脱结合法洗脱, 先用 0.02 mol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液洗脱, 第 1 个蛋白峰全部出来后换为梯度洗脱; 洗脱瓶中为 250 mL 含 0.05 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液, 贮液瓶中为 250 mL 含 1.0 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液。每 10 min 洗脱速度为 4 mL/管。梯度洗脱后分离出 2 个单独的蛋白峰区域, 其中洗脱体积较小的蛋白峰无酶活力, 洗脱体积较大的蛋白峰有很高的酶活力, 且酶活力峰与蛋白峰吻合(图 1), 故其中含淀粉酶, 可进行下一步研究。层析后酶的活力比粗酶液提高了 13.726 倍(表 1)。将酶活力最高的成分进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果见图 2。从图 2 可见, 未经纯化的图谱上可观察到十多条蛋白带, 而纯化后蛋白带只有 6 条, 说明层析后酶已得到进一步纯化。

表 1 淀粉酶部分纯化
Tab. 1 Partial purification of amylase

步骤 process	ρ(蛋白 protein) / (μg·mL ⁻¹)	酶活力 enzyme activity / (U·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	纯化倍数 purification folds
粗酶液提取 enzyme extraction	6 857.1	0.441	1.000
硫酸铵分级沉淀(饱和度 60%)(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation (60% saturation)	9 755.4	1.584	3.592
DEAE-纤维素层析 DEAE-cellulose chromatography	247.1	6.053	13.726

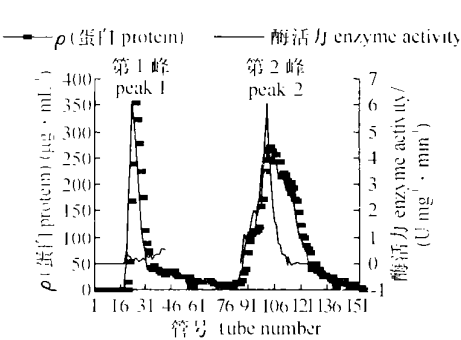


图 1 淀粉酶 DEAE-纤维素层析图谱

Fig. 1 DEAE-cellulose chromatography of amylase

2.2 超声波对淀粉酶催化活力的影响

2.2.1 不同功率超声波处理对淀粉酶活力的影响
效果 淀粉酶经过 16.5 kHz、不同功率的超声波处理 5 min 后, 酶活力均有较大的提高, 激活酶的最适功率为 150 W(表 2), 酶活力比对照提高了 31.88%。方差分析表明, 不同功率超声波处理淀粉酶的效果达到显著水平 [$F=3.151>F_{0.05(5,29)}$]。

1~3: 经 DEAE 分离后; 4, 5: 未经 DEAE 分离
1—3: After DEAE column; 4, 5: Before DEAE column

图 2 淀粉酶电泳结果

Fig. 2 Results of amylase by polyacrylamide gel electrophoresis

2.2.2 超声波处理不同时间对淀粉酶活性的影响效果
淀粉酶经过 16.5 kHz、150 W 的超声波处理不同时间后, 酶活力均得到激活, 最适处理时间为 5 min(表 3)。在此条件下, 酶活力比对照提高 33.09%。方差分析得到, 超声波处理不同时间对淀粉酶活力的影响效果达到显著水平 [$F=5.576>F_{0.05(8,29)}$]。

表 2 16.5 kHz 不同功率超声波处理淀粉酶 5 min 的效果¹⁾

Tab. 2 Effect of ultrasound treatment with 16.5 kHz different power and 5 min on amylase activity

超声功率 ultrasound power/W	酶活力平均数 average of enzyme activity/(U·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	比对照提高百分率 percentage above control/%
0	0.276±0.026 b	
25	0.359±0.016 a	30.07
50	0.354±0.015 a	28.26
100	0.360±0.016 a	30.43
150	0.364±0.015 a	31.88
200	0.343±0.022 a	24.48

1)表中的字母为多重比较结果(α=0.05),不同字母表示差异显著,相同字母表示差异不显著

表 3 16.5 kHz 150 W 超声波对淀粉酶处理不同时间效果¹⁾

Tab. 3 Effect of treatment by ultrasound with 16.5 kHz 150 W and different time on amylase activity

t(超声处理 ultrasound treatment) /min	酶活力平均数 average of enzyme activity /(U·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	比对照提高 百分率 percentage above control/%
0	0.275±0.003 c	
1	0.338±0.016 ab	22.91
2	0.338±0.019 ab	22.91
3	0.339±0.011 ab	23.27
4	0.347±0.021 a	26.18
5	0.366±0.009 a	33.09
10	0.300±0.012 b	9.09
15	0.299±0.010 b	8.73
20	0.300±0.019 b	9.09

1)表中的字母为多重比较结果(α=0.05),不同字母表示差异显著,相同字母表示差异不显著

2.2.3 不同频率超声波处理对淀粉酶活力的影响效果 淀粉酶经过 150 W、不同频率的超声波处理 5 min 后,酶活力均有提高,但不同频率处理下增幅差别不大,对酶活力提高最多的频率为 16.5 kHz(表 4)。方差分析得到,在本试验中用不同频率超声波处理时,淀粉酶活力的激活没有显著的差异[$F=0.5198<F_{0.05(5,35)}$]。

各种参试频率的超声波均有接近相同的效果。综合超声波功率、时间参数,可知激活淀粉酶的最佳超声波参数组合为:功率 150 W,频率 16.5 kHz,处

理时间为 5 min。

表 4 150 W 不同频率超声波处理淀粉酶 5 min 效果¹⁾

Tab. 4 Effect of treatment by ultrasound with 150 W, 5 min and different power on amylase

超声频率 ultrasound frequency/kHz	酶活力平均数 average of enzyme activity/(U·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	比对照提高百分率 percentage above control/%
对照 control	0.279±0.034 b	
13.5	0.334±0.037 a	19.71
15.0	0.327±0.036 a	17.20
16.5	0.357±0.034 a	27.96
17.0	0.320±0.043 a	14.69
18.0	0.320±0.040 a	14.69

1)表中的字母为多重比较结果(α=0.05),不同字母表示差异显著,相同字母表示差异不显著

3 讨论

一般认为较低的超声波功率对酶起激活作用,大功率的超声波会让酶失活。本研究中适宜的超声波处理使淀粉酶活力提高,激活的最适功率为 150 W,属于大功率。可见,激活酶的超声波参数因酶而异,且影响规律要综合考虑功率、频率等参数。超声波对一种酶的酶促反应究竟有何影响,要看不同的参数和试验条件而定,并不能一概而论。曾有研究表明,超声场条件下,固定化糖化酶表现较对照条件高 2 倍多的酶活力^[10],本试验中超声波可激活淀粉酶,但最大增幅比上述增幅小得多,可能的原因是:超声波对溶液酶的促进作用不如对固定化酶明显;酶的来源不同。

超声波在媒质中传播时使媒质质点进入振动状态,二者相互作用主要产生空化现象。空化现象分为瞬态空化与稳态空化。前者短暂而剧烈(发生在较高声强下),空化泡迅速涨大并破裂;后者空化泡的大小变化是有规律和缓和的(在较低声强作用下)。两种空化现象在超声波处理时几乎同时存在。空化泡破裂时发出的冲击波能引起空化泡周围物质的机械破坏作用,同时也引起围绕小泡的液体物质的剧烈流动,即微声流现象的发生,低速微声流可使空化泡周围的物质混匀^[11]。倘若在稳态空化气泡附近存在有酶或细胞,它们将会在微声流作用下受到较大的切向力作用^[12]。超声波作用于化学反应,不仅来源于分子间的相互作用,更主要的是来源于超声波空化现象。

前人曾研究了超声波对淀粉的作用,发现超声波处理引起淀粉颗粒物理降解,导致淀粉表观粘质的下降,使淀粉分子变小,温和的超声波条件使淀粉水溶性增加,而较强的超声处理使支链淀粉降解^[13]。在淀粉糊化开始温度或该温度以上,超声波对降解速率有加快作用,高的声功率也加快降解速率^[14]。所以,结合本试验结果,初步认为超声波在淀粉酶酶促反应过程中起作用的机理可能是:超声波直接作用于底物,使其溶解度增大,或产生部分降解,进而使酶促反应更易进行;超声波作用产生的微声流对底物和酶分子产生一定程度的冲击,使二者接触次数增加,进而促进反应速率增加,产物在此微声流作用下也可能释放速度加快;稳态空化产生一定的能量,传递给反应系统,从而改善底物进入酶及产物进入溶质的传质扩散过程;超声波作用也可能改变了酶分子构象,使其空间结构更适宜与底物结合发挥催化功能。

参考文献:

[1] 邹 俊,马建华,毕汝昌. 淀粉酶的同源性研究[J] . 生物物理学报, 1997, 13(4): 536— 537.

[2] 王林海. 高纯度 α -淀粉酶的研制[J] . 中国生化药物杂志, 1998, 19(1): 48— 49.

[3] 邱宏瑞,李志达,沈卫星,等. 植物 β -淀粉酶的提取与酶粉剂的制备[J] . 福州大学学报(自然科学版), 1996, 24(6): 104— 108.

[4] 刘晓艳,丘泰球,黄卓烈. 不同方法对酵母细胞膜通透性的影响[J] . 华南农业大学学报(自然科学版), 2004,

25(1): 74— 76.

[5] 朱国辉,黄卓烈,徐凤彩,等. 超声波对菠萝果蛋白酶活性和光谱的影响[J] . 应用声学, 2003, 22(6): 10— 14, 38.

[6] 黄卓烈,林 茹,何 平,等. 超声波对酵母过氧化氢酶及多酚氧化酶活性的影响[J] . 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 89— 93.

[7] BRADFORD R M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J] . Anal Biochem, 1976, 72: 248— 254.

[8] 赵 赣,陈鑫磊. 生物化学实验指导[M] . 南昌:江西科学技术出版社, 2000. 53— 54.

[9] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M] . 北京:科学出版社, 1999, 54— 122.

[10] 高大维,陈满香,梁 鑫等. 超声波催化糖化酶水解淀粉的初步研究[M] . 华南理工大学学报(自然科学版), 1994, 22(1): 70— 74.

[11] 丁志山,沃兴德. 超声波的生物学效用及其在转基因中的应用[J] . 生命科学, 1997, 9(4): 187— 189.

[12] 冯 若,赵逸云,李化茂,等. 超声在生物技术中应用的研究进展[J] . 生物化学与生物物理进展, 1994, 21(6): 500— 503.

[13] SEGUCHI M, HIGASA T, MORI T. Study of wheat starch structures by sonication treatment[J] . Cereal Chemistry, 1994, 71(6): 636— 639.

[14] YOSHINOBU I, TAKEHISA K, TOSHIYUKI W. Ultrasound degradation of waxy rice starch[J] . Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(10): 1 799— 1 802.

【责任编辑 柴 焰】