

扁玉螺淀粉酶的动力学研究

A KINETIC STUDY OF THE AMYLASE FROM *Neverita didyma*

刘 迅 龚雪琴

(烟台大学生化系 264005)

关键词 扁玉螺, 淀粉酶, 动力学

长期以来人们一直认为玉螺科软体动物是肉食性动物。扁玉螺(*Neverita didyma*)是烟台地区常见的经济螺种。为了解扁玉螺的生活习性,作者测定了其各类物质的消化能力,发现其有植物消化能力。其中淀粉酶活性突出^[1]。为了进一步了解扁玉螺的植物消化性质,作者测定了其淀粉酶的动力学性质。

1 材料与方法

1.1 淀粉酶制备

扁玉螺(直径 2~2.5 cm)采集于烟台芝罘湾。取 5 只扁玉螺肝脏(共 9.1 g),加约 5 ml pH 5.4, 50 mmol/L 的 Tris-醋酸缓冲液匀浆,离心(4 000 r/min, 20 min),取上清液于蒸馏水中透析过夜。将透析好的上清液定容至 20 ml,用于淀粉酶活性测定。酶提取液在 48 h 内使用,在此期间酶提取液保存于 -70 ℃。

1.2 酶学性质的测定及其结果

酶活性用 3,5-二硝基水杨酸显色法测定。反应液含 0.4 ml pH 5.4, 50 mmol/L 的 Tris-醋酸缓冲液,0.5 ml 1% 的淀粉,0.1 ml 酶提取液,于 32 ℃ 分别反应。反应以加入 0.5 ml 3,5-二硝基水杨酸终止。反应液经沸水浴 5 min 显色后,加入 3.5 ml 蒸馏水稀释,在 540 nm 波长测定。用麦芽糖作标准。

测定反应 0.5, 1, 2, 3 和 4 h 后的酶促反应速度,可见在 1 h 内,底物浓度的变化与反应速度的变化成正比(图 1),所有测定过程都选择反应时间为 0.5 h。

1.2.1 各种离子对酶活性影响的测定 为了解各种离子对扁玉螺淀粉酶活性的影响,在 pH 5.4, 50 mmol/L 的醋酸缓冲液配置的反应体系中分别加入 10% 的 NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, ZnCl₂ 和 CuCl₂ 10 μl,于 32 ℃ 反应,测定其活性变化。进一步测定抑制酶

活性的离子的浓度与抑制活性的变化。

1.2.2 酶的最适 pH 和最适温度测定 为了解扁玉螺淀粉酶活性在不同 pH 和不同温度下的综合表现,以含 1% NaCl, pH 为 3.6, 4.2, 5.0, 5.4, 5.8, 6.2 和 6.8 的缓冲液配置反应液,分别于在 10, 20, 32, 40 和 50 ℃ 条件下反应,测定酶活性。在多数温度下扁玉螺淀粉酶的最适 pH 在 5.8 附近,在 40 ℃ 时最适 pH 向 5.4 移动。酶的最适温度在 32 ℃ 附近(图 3)。

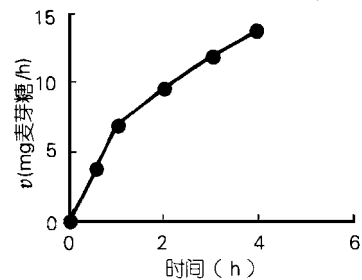


图 1 植酸酶酶促反应速度随反应时间

表 1 离子对扁玉螺淀粉酶活性 (U) 的影响

离子	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺
u (mg 麦芽糖/h)	1.53	7.06	2.72	4.15	4.99	2.35
u (%)	100	460	178	271	326	153

1.2.3 酶的耐活力测定 分别测定在 pH 3.6, 5.0 和 6.8, 在 10, 20, 32 和 40 ℃ 条件下放置 6 h 后的酶活性变化。测定酶活性在 32 ℃, pH 5.4 的条件下随时间的变化。扁玉螺淀粉酶在 pH 5.0 时,在 40 ℃ 以下放置 6 h 后都可以保持较高活性。在 40 ℃ 放置 6 h 后酶活性下降近 50%。在偏中性的 pH 6.8 的条件下,酶的活性随温度升高而下降(图 4)。在偏酸的 pH 3.6

收稿日期:2000-02-01;修回日期:2000-09-25

的条件下,酶的活性都在较低水平。扁玉螺淀粉酶在 32 ℃时置于 pH 5.4,活性在最初 6 h 内下降较快,但在 24 h 后活性仍能保持在 40%以上(图 5)。

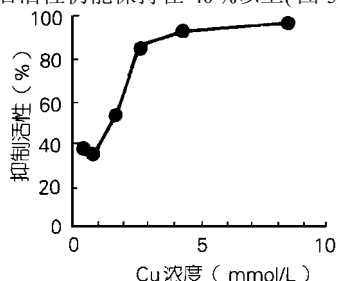


图 2 不同浓度的 Cu 对酶活性的抑制比率

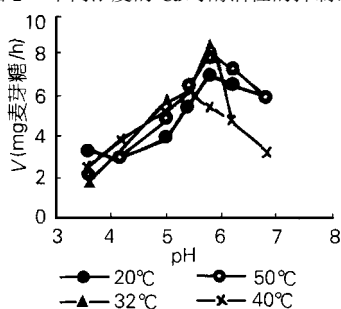


图 3 不同温度和不同 pH 下对番茄种子酸性植酸酶活性的变化

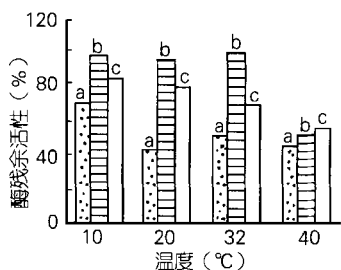


图 4 在不同 pH 和温度下放置 6 h 后酶的活性的变化

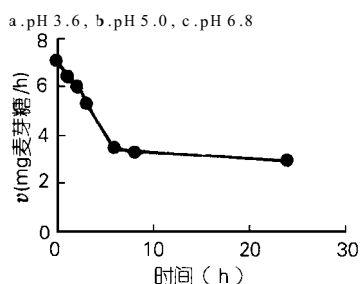


图 5 在 pH 5.4 的条件下,酶活性随时间的变化

1.2.4 酶的 K_m 测定 取 6 个管分别加入 0.1, 0.2, 0.4 ml 0.5% 的淀粉,及 0.3, 0.4, 0.5 ml 1% 的淀粉测定酶活性。蛋白质浓度用考马氏亮蓝法测定。

测定结果用 Michaelis-Menten 方程,以双倒数法做图(图 6),求得扁玉螺淀粉酶的 K_m 为 0.099%, V_{max} 为 9.76 mg 麦芽糖/h·mg 蛋白质。

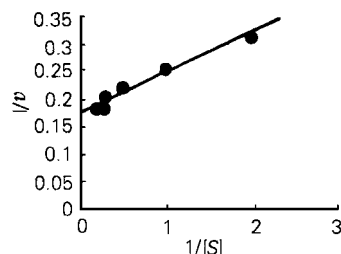


图 6 植酸酶 K_m (米氏常数)测定结果的双倒数图
 v 是酶活性,单位为 mg 麦芽糖/h, $[S]$ 的单位是 mg 淀粉。回归方程

$$(Y = 0.162 + 0.016 X)$$

2 讨论

不同生物的淀粉酶的时间变化有很大不同。如甲壳纲生物和菲律宾蛤仔,在反应 30 min 内底物浓度的变化与反应速度的变化成正比,绿贻贝在反应 1 h 内底物浓度的变化与反应速度的变化成正比。扁玉螺淀粉酶与绿贻贝酶的此性质相似。

在各种离子对扁玉螺淀粉酶活性的影响中, Na^+ 对酶有很强的激活作用,除 Cu^{2+} 外,所测其他几种离子都对酶有一定激活作用, Cu^{2+} 对酶有强烈抑制作用(见表 1)。 Cu^{2+} 抑制 50% 酶活性的浓度约在 0.8 mmol/L (图 2)。与绿贻贝相比(Cu^{2+} 抑制 50% 酶活性的浓度 0.8 mmol/L),扁玉螺的淀粉酶对 Cu^{2+} 的抑制更为敏感。与 Ca^{2+} 抑制绿贻贝淀粉酶不同, Ca^{2+} 对扁玉螺的淀粉酶有激活作用。

pH 和温度对酶活性综合影响的测定结果表明,其最适的 pH(5.8) 与绿贻贝相似。较菲律宾蛤仔和墨西哥扇贝(pH 6.2)低。酶的最适温度(32 ℃)不同于绿贻贝的 43 ℃,比较接近于菲律宾蛤仔的最适温度(36 ℃)。

绿贻贝和菲律宾蛤仔淀粉酶活性都表现随温度升高突然降低。绿贻贝淀粉酶在 50 ℃保温 4.4 min,活性丧失 50%; 菲律宾蛤仔淀粉酶在 55 ℃放置 5 min,活性丧失 88%,在 45 ℃放置 10 min,活性丧失 83%。扁玉螺淀粉酶在 32 ℃时置于 pH 5.4,活性在最初 6 h 内下降较快,但在 24 h 后活性仍能保持在 40%以上(图 5)。绿贻贝淀粉酶在 50 ℃放置 160 h 后,活性仍能保持在 20%以上。

绿贻贝淀粉酶的 K_m 是 0.455%, 其他软体动物

未见报道。扁玉螺淀粉酶的 K_m 为 0.099%, 与绿贻贝淀粉酶的 K_m 差异较大。

通过比较扁玉螺与绿贻贝和菲律宾蛤仔淀粉酶的各项动力学性质, 可见扁玉螺淀粉酶对温度、pH 和

离子的适应与绿贻贝较为相似。🌊

参考文献

- 1 刘迅、任虹、刘玉鹏等。烟台大学学报, 1997, 10(3): 199 ~ 202 (本文编辑: 李本川)