

高粱原花青素对 α - 淀粉酶活力抑制动力学的研究

刘 睿, 潘思轶, 刘 亮, 马立霞, 谢笔钧*
(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 本文旨在探讨原花青素对 α - 淀粉酶活力抑制作用; 采用酶抑制动力学方程进行分析。结果显示 SPC(高粱原花青素)对 α - 淀粉酶具有明显的抑制作用, 抑制的机理是通过可逆的竞争性抑制来实现的, 其抑制常数 K_i 是 2.71mg/ml。

关键词: 高粱原花青素; α - 淀粉酶; 抑制; 动力学方程

Research of Inhibition Kinetics for Activity of α -amylase by SPC

LIU Rui, PAN Si-yi, LIU Liang, MA Li-xia, XIE Bi-jun*
(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To study the inhibition effect of α -amylase by SPC (Sorghum procyanidins), the inhibition kinetics equation was established to analysis the inhibition type. Results showed that the activity of α -amylase was obviously inhibited by SPC via reversible competitiveness, the constant of inhibition (K_i) was 2.71mg/ml.

Key words: sorghum procyanidins; α -amylase; inhibition; kinetics equation

中图分类号 TS201

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)09-0189-04

固态小曲白酒生产系用整粒原料, 如高粱(优质小曲白酒尤其如此)等淀粉质原料, 利用小曲中的根霉产生的淀粉糖化酶, 将淀粉糖化后, 在酵母分泌的胞内酶和胞外酶的作用下, 将糖类发酵产生乙醇, 以及其他微生物和酶的作用下产生构成白酒风味的其他挥发性成分的过程。因此白酒的产量、质量及风味是同参与酿造的微生物的生命活动以及微生物代谢产生的酶密切相关。参与小曲白酒酿造的酶类主要是通过根霉、酵母和细菌在生长繁殖过程中产生的, 包括水解淀粉的 α - 淀粉酶和 β - 淀粉酶等糖化酶, 使单糖发酵产生乙醇的醇化酶系列, 以及蛋白质分解产生氨基酸的蛋白酶等^[1]。通过 GC-MS 分析结果显示, 高粱原花青素(以下简称 SPC)对小曲酒的挥发性成分产生了影响^[2], 由于高粱外种皮中富含原花青素^[3,4], 而原花青素具有抑菌特性和酶抑制特性, 因此本研究以影响小曲白酒生产中参与酿造的典型酶淀粉酶为研究对象, 通过观察和分析 SPC 对酶的抑制动力学特性, 探讨 SPC 对小曲白酒酿造质量

的影响机制。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

高粱原花青素 实验室制备, 含量大于 95%, 主要是由聚合度小于 6 的低聚体组成。

α - 淀粉酶 Sigma 公司, 酶活: 870U/mg。

紫外—可见分光光度计 上海分析仪器总厂。

1.2 方法

SPC 抑制 α - 淀粉酶动力学特性的研究采用非连续测定和作图法进行研究^[5], 酶活力的测定采用 Bernfeld 法进行^[6]。

1.2.1 最适酶量的确定

最佳酶量的确定按表 1 中顺序添加试剂及适当稀释酶液进行测定。取一定稀释倍数的 α - 淀粉酶, 测定反应的初始速率, 使得酶反应的速率在 0.03~0.25 $\Delta A/\text{min}$ 之间(其中 ΔA 为吸光值的变化), 将此时的酶量作为动

收稿日期 2005-07-15

*通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金(30270938); 科技部成果转化基金(021FN217101280); 武汉市科技局重大专项(600513402); 博士点基金(20040504013)

作者简介: 刘睿(1969-)男, 讲师, 博士, 研究方向为天然产物化学。

力学分析的酶量。酶反应开始后,准确计时,每间隔1min,加入1ml DNS 终止反应,将反应液置沸水浴5min,迅速冷却,加蒸馏水稀释到25ml,在540nm处,以空白作对照,测定吸光值。

表1 最适酶量的确定试验

Table 1 Experiment of choosing to the best of enzyme concentration

Reagents	Number of samples				
	1	2	3	4	5
pH6.9 phosphate saline buffered(ml)	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6
2% starch solution(ml)	0.5	0.2	0.5	0.5	0.5
Enzyme solution(ml)	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9

1.2.2 酶反应动力学方程的建立

当酶反应初速率的时间范围和酶反应体系中酶量被确定后,即可进行动力学常数的测定。按照底物浓度对酶作用的影响规律,在一系列不同底物浓度下测定反应初始速率,每种浓度作三个平行,再通过双倒数作图法可求出 K_m 和 V_{max} 。测定方法如表2。

表2 建立酶反应动力学方程试验

Table 2 The experiment of establishing kinetics equation of enzyme reaction

reagents	Number of samples					
	0	1	2	3	4	5
2% starch solution(ml)	0.5	0.5	0.7	0.9	1.1	1.3
pH6.9 phosphate saline buffered(ml)	1.5	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2
Preheating time at 40°C(min)	3	3	3	3	3	3
Enzyme solution(ml)	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Reacting time at 40°C(min)	3	3	3	3	3	3
DNS(ml)	1	1	1	1	1	1
Bolling (100°C) time (min)	5	5	5	5	5	5
Distilled water(ml)	22	22	22	22	22	22
Abs540nm						

1.2.3 SPC对 α -淀粉酶抑制类型(可逆或不可逆)的研究

在固定抑制剂浓度的条件下,以一系列不同浓度的酶进行反应初速率的测定,每种浓度作三个平行,抑制剂为一组,无抑制剂为另一组,同时进行初速率测

表3 SPC对 α -淀粉酶抑制类型(可逆或不可逆)试验Table 3 The experiment of inhibition type (reversibility or irreversibility) for α -amylase by SPC

Reagents	Without inhibitor			Addition inhibitor			Blank
	0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5	
Enzyme solution(ml)	0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5	0
pH6.9 phosphate saline buffered(ml)	1.4	1.2	1.0	1.3	1.1	0.9	1.5
1.0mg/mL SPC(ml)	0	0	0	0.1	0.1	0.1	0
Preheating time at 40°C(min)	3	3	3	3	3	3	3
2% starch solution(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Reacting time at 40°C(min)	3	3	3	3	3	3	3
DNS(ml)	1	1	1	1	1	1	1
Bolling (100°C) time(min)	5	5	5	5	5	5	5
Distilled water(ml)	22	22	22	22	22	22	22
Abs540nm							

定。试验设计见表3。以酶浓度(横坐标)对反应速率 A_{540nm} 作图,根据动力学图的特征分析,推断SPC对 α -淀粉酶的抑制类型属于可逆或不可逆抑制类型。

1.2.4 SPC对 α -淀粉酶可逆性抑制类型的研究

通过表4的试验结果,判断SPC对 α -淀粉酶的抑制作用是属于竞争性还是非竞争性抑制类型。具体方法是:先向试管中加入不同体积的淀粉溶液和磷酸缓冲溶液(pH6.9),配制成不同底物浓度的分析体系(按表4进行试验)。通过双倒数作图法结果比较分析,可判断SPC对 α -淀粉酶的可逆性抑制类型。

2 结果与分析

2.1 酶反应动力学进程曲线的制作和最适酶量的确定

不同酶量 α -淀粉酶在7min内的酶反应动力学进程曲线见图1所示。酶活力测定就是要使酶反应的初速率(V_0)达到最大速率 V_m ,即在过量底物存在下的零级反应期的速率,此时反应速率和酶浓度 $[E]$ 之间有线性关系。确定用于动力学分析的最适酶量是重要的关键步骤,如果反应液中酶量太少,在反应一段时间后,吸光值将改变很少,以至于显示底物浓度改变和抑制剂作用差异引起的变化很困难;另一方面,若是反应中酶量太多,将使反应进程太快,由于底物迅速消失,时间历程曲

表4 SPC对 α -淀粉酶抑制类型分析试验Table 4 The experiment of inhibition type for α -amylase by SPC

	Without inhibitor				Addition inhibitor				Blank
Starchsolution(ml)	0.3	0.5	0.7	0.9	0.3	0.5	0.7	0.9	0.3
pH6.9phosphate saline buffered(ml)	1.5	1.3	1.1	0.9	1.3	1.1	0.9	0.7	1.7
1.0mg/ml SPC(ml)	0	0	0	0	0.2	0.2	0.2	0.2	0
Preheating time at 40℃(min)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Enzyme solution(ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0
Reacting time at 40℃(min)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
DNS(ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bolling (100℃) time (min)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Distilledwater(ml)	22	22	22	22	22	22	22	22	22
Abs540nm									

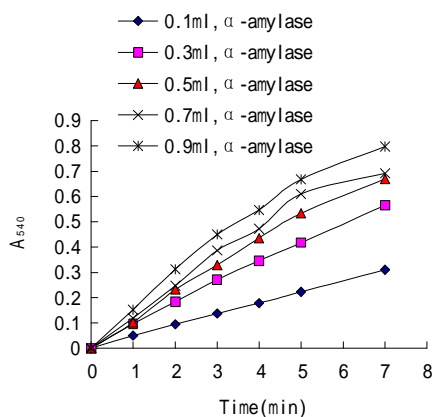


图1 α -淀粉酶不同酶量反应进程曲线
Fig.1 Curves of reaction process of α -amylase

线趋向平坦,反应达到平衡的时间过早出现,因此测不到产物生成量与酶反应时间成线性关系的这一段时间内的初速率,即得不到反应速率和酶量成正比关系的结果。为避免这两种极端情况的出现,必须使测定的反应速率(以 $\Delta A/\text{min}$ 表示)的吸光值在 $0.03/\text{min} \sim 0.25\text{min}$ 之间^[5]。在不同浓度下得到的酶反应进程曲线(反应时间曲线)如图1所示。

从图中可以看出, $[E]$ 越大, 线性反应期越短。比较不同酶量反应进程曲线方程的线性时间范围, 发现即使在酶量为 0.7ml 时的反应进程曲线, 在 4min 内也有较好的线性关系, 这也说明所有酶量的酶反应进程曲线在 3min 反应时间内, 皆有很好的线性关系, 因此在 3min 内测得的速率为反应初始速率。比较反应的初始速率后, 选定酶量为 0.5ml , 反应时间 3min 进行动力学常数的测定。

2.2 米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{\max} 的测定

当上述酶反应初始速率的时间范围和酶反应系统中的酶量被确定后, 按照底物浓度对酶作用的影响规律, 在一系列不同底物浓度下测定反应初始速率, 再通过双倒数作图法求出米氏常数 $K_m=2.459\text{mg/ml}$ 和最大反应速率 $V_{\max}=0.687/\text{min}$, 所以 α -淀粉酶的米氏方程为:

$$V = \frac{v_0[s]}{K_m + [s]} = \frac{0.687/\text{min}[s]}{2.459\text{mg/ml} + [s]}$$

双倒数作图结果如图2所示。

2.3 SPC 对 α -淀粉酶的抑制类型

按照抑制剂与酶结合的特点和作用方式, 可将抑制剂分为可逆性抑制剂和不可逆性抑制剂两大类。抑制剂对酶的抑制类型可以通过酶反应动力学的方法加以区别。在测定酶活力的混合液中加入固定量的抑制剂, 然后用不同的酶浓度测定酶活力, 用反应初速率对酶浓度作图, 当测定酶活力的体系中不存在抑制剂时, 速率

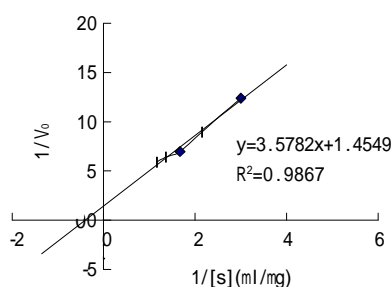


图2 α -淀粉酶的米氏方程曲线
Fig.2 Michaelis-Menten equation of α -amylase

直线通过原点, 当有不可逆抑制剂存在时, 其速率直线不通过原点, 不可逆抑制剂的作用相当于将原点平行向右移动; 若有一定量的可逆性抑制剂时, 因为抑制剂的量是恒定的, 可得到一条通过原点而斜率较低的直线。因此可以根据他们的动力学曲线判断抑制剂的抑制类型。SPC 对 α -淀粉酶的抑制动力学曲线见图3所示。从图中酶抑制动力学曲线特征, 可以推断 SPC 对 α -淀粉酶的抑制类型是可逆性抑制。

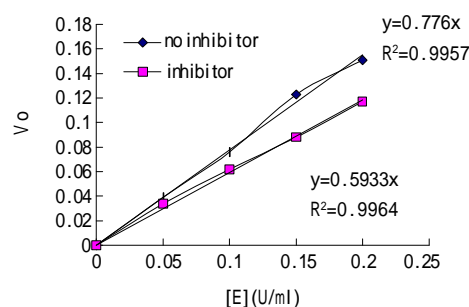


图3 SPC 对 α -淀粉酶的抑制动力学曲线
Fig.3 Kinetics curves of inhibition of α -amylase

2.4 SPC 对 α -淀粉酶的可逆性抑制类型

按照动力学方法区分抑制剂对酶的可逆性抑制作用, 以及抑制剂、底物和酶之间的相互关系, 可逆性抑制又可分为竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性

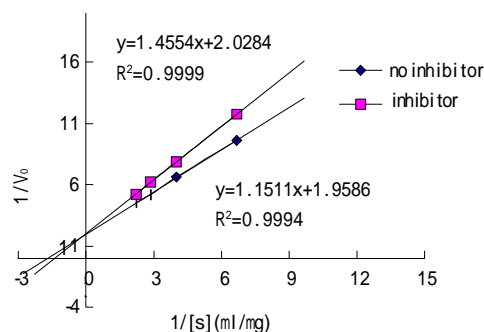


图4 SPC 对 α -淀粉酶的可逆性抑制双倒数图(Lineweaver-Burk)
Fig.4 Lineweaver-Burk plot of reversible inhibition of SPC on α -amylase

对羟基苯甲酸壳聚糖酯的制备、表征和抗菌活性

赵希荣^{1,2}, 夏文水¹

(1.江南大学食品学院, 江苏 无锡

214036 2.淮阴工学院食品工程系, 江苏 淮安

223001)

摘 要: 壳聚糖经氨基保护、与对乙酰氧基苯甲酰氯发生酯化、再水合肼去保护合成得到了对羟基苯甲酸壳聚糖酯。在适宜的反应条件下, 对羟基苯甲酸壳聚糖酯酯化度可达130%、得率80%以上。产物经IR分析, 酸与壳聚糖之间生成了酯, 该酯溶解性略优于对羟基苯甲酸庚酯, 而醇溶性显著提高; 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抗菌试验表明, 该酯抗菌活性大于对羟基苯甲酸庚酯, 更优于壳聚糖。

关键词: 对羟基苯甲酸酯; 抗菌活性; 表征

Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Para-hydroxybenzoate Chitosan Ester

ZHAO Xi-rong^{1,2}, XIA Wen-shui¹

(1.School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi

214036, China

2.Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223001, China)

Abstract: After protection of amine group, chitosan reacted with 4-acetoxy-benzoate chloride to form an ester, and the ester was reacted with hydrazine hydrate to be deprotected, para-hydroxybenzoate chitosan ester was obtained. Under optimum reaction conditions, esterification degree of para-hydroxybenzoate chitosan ester was 130%, and yield reached 80%. IR spectrum showed the ester bond was formed between para-hydroxybenzoic acid and chitosan. Water solubility of the ester was slightly better than heptyl para-hydroxybenzoate, but alcohol solubility was greatly improved. The antimicrobial activity for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was better than heptyl para-hydroxybenzoate and much better than chitosan.

收稿日期: 2005-06-18

作者简介: 赵希荣(1961-), 男, 副教授, 在读博士生, 研究方向为多糖的改性和应用。

抑制三种类型。用 $[S]^{-1}$ 对 V_0^{-1} 作图, 如图4所示。当有竞争性抑制剂存在时, 表观 K_m' 会增大, K_m/V_{max} 也增大, 但是 V_{max} 不变。图中所示结果表明, SPC对 α -淀粉酶的可逆性抑制属于竞争性抑制类型。由公式 $K_m' = K_m(1 + [I]/K_i)$ 可计算出抑制剂常数 $K_i = 2.71 \text{ mg/ml}$ 。

3 结 论

通过研究酶活性被抑制的动力学方法, 发现SPC对 α -淀粉酶具有明显的抑制作用, 抑制的机理是通过可逆的竞争性抑制来实现的。SPC对 α -淀粉酶的抑制常数 K_i 是 2.71 mg/ml 。

参考文献:

- [1] 吴建平. 小曲白酒酿造法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995.
- [2] 刘睿, 潘思轶, 李涛, 等. 高粱原花青素对小曲酒酿造过程中挥发性成分影响的研究[J]. 食品科学, 2005.
- [3] 刘睿, 谢笔钧, 潘思轶, 等. 高粱种子外种皮中原花青素提取、纯化及其抗氧化活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2003, 18(4): 43-47, 51.
- [4] 刘睿, 段玉清, 谢笔钧, 等. 高粱外种皮中原花青素的提取工艺及其组分鉴定[J]. 农业工程学报, 2004, 20(1): 242-245.
- [5] 陈曾, 刘兢, 罗丹. 生物化学试验[M]. 合肥: 中国科技大学出版社, 1994.
- [6] B 施特马赫, 著. 钱嘉渊, 译. 酶的测定方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992.