

淀粉酶活性测定方法的改进

李雯^{1,2} 邵远志¹ 陈维信^{2,*}

¹海南大学生命科学与农学院,海口570228; ²华南农业大学园艺学院,广州510642

Improved Method for Determining Amylase Activity

LI Wen^{1,2}, SHAO Yuan-Zhi¹, CHEN Wei-Xin^{2,*}

¹College of Life Science and Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China; ²College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

提要 以香蕉果实为试材,对常规的淀粉酶活性的测定方法进行了改进,取得了更好的效果。

关键词 淀粉酶活性;测定方法;改进

淀粉酶是反映淀粉分解速度、研究糖代谢规律的一个重要指标之一。香蕉是典型的贮藏淀粉的果实,果实采后其淀粉转化为可溶性糖。了解淀粉酶活性的变化规律对研究香蕉果实采后生理及贮藏保鲜十分重要。测定淀粉酶活性常采用的是酶动力学方法中的化学法^[1]。果实淀粉酶活性的测定一般是借鉴文献^{2~4}的方法,但这些方法在测定香蕉果实淀粉酶活性时,操作繁琐,重复性较差。本文就酶液的提取、反应步骤的取舍等方面对这些方法作了改进,取得了较好的效果。

材料与方 法

1 材料

实验在华南农业大学的广东省果蔬保鲜重点实验室进行。材料为巴西香蕉果实(*Musa* spp. AAA Group, Cavendish),购自水果市场。试材选3种成熟度差异非常明显的果实进行测定:(1)绿熟硬果,(2)中等黄熟微软果,(3)黄熟极软果。所选果实大小一致、无病虫害、无机械伤,每类果实9个果,重复3次。

2 方法

2.1 试剂配制 淀粉酶提取缓冲液:0.1 mol·L⁻¹柠檬酸溶液(pH 5.6);1%的淀粉溶液:用0.1 mol·L⁻¹的柠檬酸缓冲液(pH 5.6)配制;标准麦芽糖溶液(1 mg·mL⁻¹);3,5-二硝基水杨酸试剂(DNS试剂):称取6.5 g 3,5-二硝基水杨酸溶于少量水中,移入1 000 mL容量瓶中,加入325 mL 2 mol·L⁻¹ NaOH溶液,再加入45 g丙三醇,摇匀,冷却后定容到1 000 mL。淀粉和麦芽糖为Sigma产品,其余试

剂为国产分析纯试剂。

2.2 测定方法

2.2.1 酶液的提取 将每一个重复的3个果实去皮后切碎混匀,称取其果肉1 g,置于预冷的研钵中,加2 mL预冷的0.1 mol·L⁻¹柠檬酸溶液(pH 5.6)和少量石英砂研磨,将匀浆移入7 mL的离心管中,再分别用1 mL的0.1 mol·L⁻¹柠檬酸缓冲液(pH 5.6)冲洗2次,于4℃下以15 000×g离心15 min,上清液转移入另一个5 mL离心管中,作为酶提取液备用。

2.2.2 酶活性的测定 取洁净的试管18支,作好标记,每一个样品设1个对照。总反应体积为0.5 mL,测定管含0.2 mL的酶提取液和0.3 mL的1%淀粉溶液;对照管含0.2 mL的酶提取液和0.3 mL的0.1 mol·L⁻¹柠檬酸溶液(pH 5.6,不含底物淀粉)。将试管放入恒温40℃的水浴锅中,保温30 min后取出,立即加入1.5 mL的DNS试剂终止反应。再将试管置于沸水浴中10 min,取出后冰浴冷却。取反应液稀释10倍,测定波长520 nm处的吸光值,同上做麦芽糖标准曲线,从标准曲线上查出麦芽糖的含量,计算淀粉酶的总活性。

上述的酶的提取和测定,与文献²的常规方法相比较,有以下4个改进:(1)可用缓冲液作为淀粉酶的提取液和底物淀粉的溶液;(2)将原来的

收稿 2004-12-28 修定 2005-04-19

资助 广东省科技攻关项目(B202)。

*通讯作者(E-mail: Chenweix@sti.gd.cn, Tel: 020-85288280)。

3次稀释步骤改为只稀释1次; (3)不用NaOH溶液终止反应, 而用DNS试剂显色同时终止反应; (4)耗时从5 h 减少到3.5 h。

结果与讨论

从表1可以看出: (1)绿熟硬果、中等黄熟微软果、黄熟极软果3种不同成熟度的果实淀粉酶活性表现出低、高、低的趋势, 各成熟度果实间存在极显著差异($P < 0.01$), 2种测定方法得到的

结果是一致的, 说明改进方法可以反映香蕉果实后熟过程中淀粉酶活性的变化情况, 具有可操作性; (2)常规方法测得的淀粉酶活性比改进方法测得的低, 2种方法测得的3种成熟度果实的酶活性分别相差0.338、0.351和0.251 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$, 表明改进的方法可测得更高的淀粉酶活性; (3)3种成熟度果实中淀粉酶活性的标准误差和变异系数都小于常规方法, 说明改进的方法其实验误差比常规方法小。

表1 香蕉果实中淀粉酶活性测定方法的比较

果实类别	酶活性/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$		标准误差		变异系数/%	
	常规方法	改进方法	常规方法	改进方法	常规方法	改进方法
绿熟硬果	1.534 ^B	1.872 ^B	0.303	0.126	19.760	6.748
中等黄熟微软果	2.147 ^A	2.498 ^A	0.330	0.196	15.412	7.834
黄熟极软果	0.555 ^C	0.806 ^C	0.287	0.115	51.712	14.242

常规方法(对比测定)使用文献2的方法。

酶活性的测定受多种因素的影响^[5]。通过以上实验, 我们认为还须特别注意以下几点: (1)取样前, 要把水浴锅的水温调整到需要的温度, 为后续的反应过程做好准备; (2)研磨样品和转移样品时, 速度要快, 准确, 以避免样品损失带来的误差; (3)酶反应时, 先往反应管中加底物溶液, 后加酶提取液, 而且一次不要做太多的样品, 以避免加样先与后的时间差异对实验结果的影响; (4)测定吸光值时, 先要检查比色杯是否有差异, 哪怕是微小的差异也要避免, 以防止结果呈现负值的现象发生(由于比色杯本身的差异可造

成对照管的吸光值大于样品管的吸光值)。

参考文献

- 1 陈石根, 周润琪编著. 酶学. 上海: 复旦大学出版社, 2001. 221~228
- 2 韩亚珊主编. 食品化学实验指导. 北京: 中国农业出版社, 1996. 106~109
- 3 李合生主编. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000. 169~172
- 4 周蓓云. α -和 β -淀粉酶活性的测定. 见: 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会编. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 123~124
- 5 彭志英编著. 食品酶学导论. 上海: 中国轻工业出版社, 2002. 11~15