

烟叶烘烤中淀粉酶和淀粉磷酸化酶的活性测定

王怀珠¹, 杨焕文², 郭红英¹

(1. 贵州省烟草科学研究所, 贵州 贵阳 550003; 2. 云南农业大学烟草学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 为探讨烘烤过程中烟叶淀粉降解酶活性的测定方法, 将烘烤过程中的烟叶样品研磨、离心得到酶粗提液, 然后采用 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定淀粉酶活性; 采用无机磷比色法可测定淀粉磷酸化酶活性。用考马斯亮兰 G-250 法可测定 2 种酶蛋白含量。结果表明, 2 种测定方法测定结果较准确, 较客观地反映了烘烤过程中 2 种酶的实际活性, 且简便易行, 一般实验室即可完成。

关键词: 烤烟; 烘烤; 淀粉酶; 淀粉磷酸化酶

中图分类号: S572 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)05-0032-03

Activity Determination of Amylase and Starch Phosphorylase in Tobacco Leaves during Flue-curing

WANG Huai-zhu¹, YANG Huan-wen², GUO Hong-ying¹

1. Guizhou Tobacco Science Research Institute, Guiyang 550003, China

2. College of Tobacco Science of Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: The experiment was carried out to establish a method determining the activity of starch degradation enzymes in tobacco leaves during flue-curing. Tobacco samples were abraded and centrifuged to obtain crude extracts of enzymes. Colorimetric method with 3, 5-dinitrosalicylic acid were applied to determine the content of maltose, then the activity of amylase was figured out. Colorimetric method with inorganic phosphorus was used to determine the activity of starch phosphorylase and Colorimetric method with coomassie brilliant blue G-250 was for determining the content of these two enzyme proteins. The result showed that the obtained data were relatively accurate and could objectively reflect the activity of enzymes of the tobacco samples during flue-curing.

Key words: Flue-cured tobacco; Amylase; Starch phosphorylase; Determination method

淀粉酶和淀粉磷酸化酶是植物组织中降解淀粉的 2 种关键酶类, 有关其他植物中淀粉酶和淀粉磷酸化酶活性测定的方法较多^[1, 2], 但关于烟叶中 2 种酶活性测定方法的研究较少, 特别是烟叶中有关淀粉磷酸化酶活性的测定未见报道。烘烤过程中烟叶大分子生物化合物急剧降解^[3], 在这个过程中, 如何创造有利条件使烟叶在大田期间积累的大分子生物化合物转化为有利于香吃味水平提高的小分子生物化合物必将日趋受到重视。特别是随着中式卷烟对原料要求的提高, 有必要对烘烤过程中降解各种大分子生物化合物的酶活性进行研究, 以便创造有利条件促使各种大分子化合物的降解。但在这个

过程中, 如何寻求科学的方法, 测定有关酶类的活性状态, 力求使测定结果与烟叶中酶的实际活性相一致还没有成熟的方法。本试验研究了烟叶烘烤过程中淀粉酶和淀粉磷酸化酶活性的测定方法。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

J2-MC 低温超速离心机, 美国贝克曼公司; HC5-721 型分光光度计, 上海分析仪器总厂; BC1-数显电热恒温水浴锅, 上海精密仪器公司。

1.2 试剂

麦芽糖(Sigma), 3, 5-二硝基水杨酸(Sigma),

收稿日期: 2005-11-17

基金项目: 云南省烟草公司项目(99A13)

作者简介: 王怀珠(1971-), 男, 河南确山人, 助理研究员, 硕士, 主要从事烟草生理生化研究。

牛血清蛋白(Sigma),考马斯亮兰 G-250(上海生工),其他常规试剂。

1.3 淀粉酶粗酶液制备

称取烘烤中烟样 3 g,于 4 °C 放置的研钵中加少许石英砂研磨成匀浆,加少量蒸馏水,混匀,移入 10 ml 离心管中,蒸馏水稀释至刻度,放置 15~20 min,每 2~3 min 摇 1 次,然后置于离心机中以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液 5 ml 置于 15 ml 刻度试管中,定容、备用。

1.4 淀粉磷酸化酶粗酶液制备

称取鲜烟样或烘烤中烟样 1 g,加 4 ml 提取缓冲液(内含 100 mmol/L 丁二酸钠, pH 5.8; 10% 甘油, 15 mmol/L 巯基乙醇, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L MgCl₂),于冰浴上放置的研钵中研磨成匀浆,先在离心机以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1 ml,再以 16 000 r/min 离心 10 min,此上清液为粗酶液。

2 结果与分析

2.1 淀粉酶活性测定

取 10 ml 试管 2 支,1 支作测试管,1 支作对照管。测试管中加入 1 ml 淀粉酶粗酶液和 1 ml pH 5.6 的柠檬酸缓冲液,于 37 °C 水浴中预热 15 min;对照管中加入 1 ml 淀粉酶粗酶液和 1 ml pH 5.6 的柠檬酸缓冲液,再加入 4 ml 0.4 mol/L 的 NaOH 于 37 °C 水浴中预热 15 min;然后在测试管和对照管中各加入 2 ml 37 °C 预热的 1% 可溶性淀粉,准确反应 10 min 后,在测试管中加入 4 ml 0.4 mol/L 的 NaOH 终止酶活性。

2.1.1 麦芽糖标准曲线绘制及定量 取 15 ml 刻度试管 6 支,编号,依次加入浓度为 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml 的麦芽糖标准溶液 2.0 ml,再加入 3,5-二硝基水杨酸溶液各 2 ml,沸水浴中准确煮沸 5 min,取出冷却,加入 10 ml 蒸馏水,于 525 nm 下比色,记录 OD 值,绘出 1 条 0~0.5 mg/ml 的麦芽糖标准曲线(图 1)。

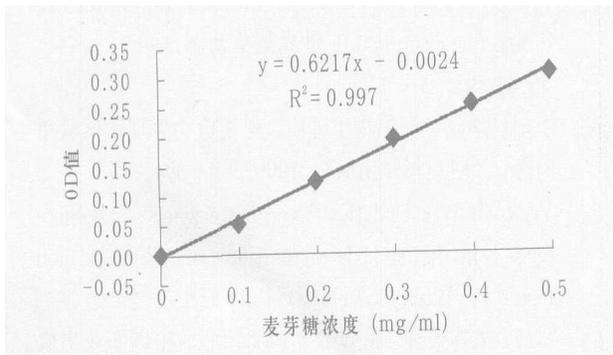


图 1 麦芽糖标准曲线

取 15 ml 刻度试管 3 支,分别加入 2.0 ml 蒸馏水、2.0 ml 对照管液和 2.0 ml 测试管液,每管再加入 3,5-二硝基水杨酸溶液 2 ml,沸水浴中准确煮沸 5 min,取出冷却,加入 10 ml 蒸馏水,摇匀,于 525 nm 下比色,记录 OD 值,根据标准曲线计算出麦芽糖浓度。

2.1.2 酶蛋白标准曲线绘制及定量 取 10 ml 干洁刻度试管 6 支,编号,依次加入浓度为 0, 40, 80, 120, 160, 200 μg/ml 的蛋白质标准溶液 1.0 ml,再向各管加入 5 ml 考马斯亮兰 G-250 溶液,摇匀,静置 2 min,于 595 nm 下比色,记录 OD 值,绘出 1 条 0~200 μg/ml 的蛋白质标准曲线(图 2)。

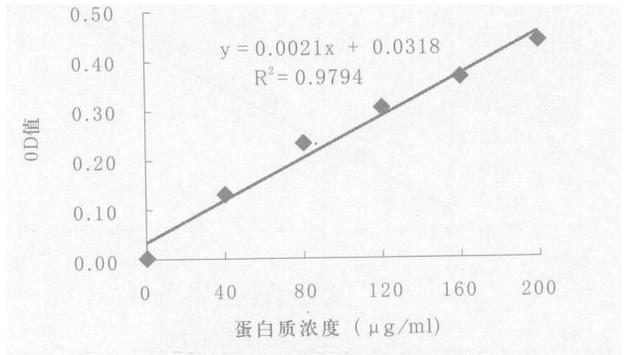


图 2 牛血清蛋白标准曲线

取酶液 1 ml 加入 5 ml 考马斯亮兰 G-250 溶液,摇匀,静置 2 min,于 595 nm 下比色,记录 OD 值,从标准曲线上计算出所含的酶蛋白量。

$$\text{酶活力(U)} = (C_{\text{测试管}} - C_{\text{对照管}}) \times V / t \cdot m_{\text{酶}}$$

式中, $C_{\text{测试管}}$ ——测试管液麦芽糖浓度; $C_{\text{对照管}}$ ——对照管液麦芽糖浓度; V ——测试管或对照管液体积; t ——反应时间; $m_{\text{酶}}$ ——酶蛋白含量。1 mg 酶蛋白在 37 °C、pH 5.6 条件下,10 min 分解可溶性淀粉产生 1 mg 麦芽糖为 1 个酶活性单位(1U)。

2.2 淀粉磷酸化酶活性测定

取 10 ml 刻度试管 2 支,1 支作对照管,1 支作测试管,各加入 0.8 ml 稀释缓冲液(内含 100 mmol/L 丁二酸钠, pH 5.8; 0.1% 牛血清蛋白, 10 mmol/L 巯基乙醇, 0.2 mmol/L EDTA, 10% 甘油),30 °C 预保温 5 min,加入 0.1 ml 淀粉磷酸化酶粗酶液,保温 5 min,对照管中先加入 2.6 ml 反应终止液(900 ml 无离子水中含 14 ml 浓硫酸和 2.5 g 钼酸铵),然后各加入 0.1 ml 底物混合物(内含 100 mmol/L 丁二酸钠, pH 5.8; 100 mmol/L 葡萄糖-1-磷酸, 2 mmol/L AMP, 5% 可溶性淀粉),30 °C 下准确反应 10 min,测试管中加入 2.6 ml 反应终止液,然后各加入 0.4 ml 还原液(0.5% 氯化亚锡, 0.1 mol/L HCl),保温 5 min 后,3 000 r/min 离心 10 min,在 660 nm 下比色,从标准曲线上计算无机磷

含量。

酶活力(U)=反应生成的磷量/ $t^{\circ}\text{m}$ 酶。

式中, t ——反应时间; $m_{\text{酶}}$ ——酶蛋白含量。

1 mg 酶蛋白在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH5.8 条件下, 10 min 内反应生成 1 μg 无机磷为 1 个酶活性单位(1U)。

2.2.1 无机磷标准曲线绘制 分别取浓度为 0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的无机磷标准溶液 1.0 ml 于 6 支试管中, 然后各加入 2.6 ml 反应终止液和 0.4 ml 还原液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 在 660 nm 下比色, 记录 OD 值, 绘出 1 条 0~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的无机磷标准曲线(图 3)。

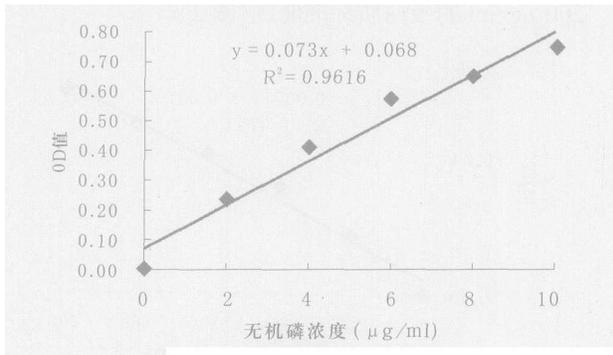


图 3 无机磷标准曲线

2.2.2 酶蛋白含量的测定 分别吸取浓度分别为 0, 200, 400, 600, 800, 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的牛血清蛋白(BSA)标准溶液 100 μl 于 6 支试管中, 然后分别加入 5 ml 考马斯亮兰 G-250 溶液, 摇匀, 静置 2 min, 于 595 nm 下比色, 记录 OD 值, 绘出 1 条 0~1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白质标准曲线(图 4)。

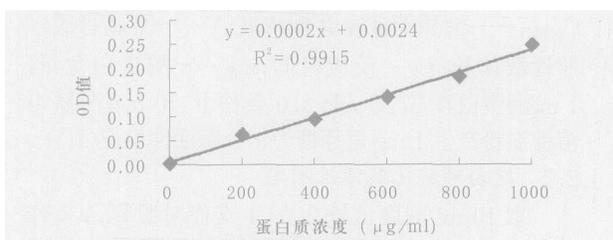


图 4 蛋白质标准曲线

取淀粉磷酸化酶粗酶液 0.1 ml, 加入 5 ml 考马斯亮兰 G-250 溶液, 摇匀, 静置 2 min, 于 595 nm 下比色, 记录 OD 值, 从标准曲线上计算出酶蛋白含量。

2.3 测定结果

表 1 为烘烤过程中 2 种酶活性测定结果。由表 1 可看出, 烘烤过程中采用上述方法测定的 2 种酶活性结果精确度均较高, 淀粉酶活性在 12 h 和 36 h 的相对标准偏差分别为 3.11% 和 1.83%, 淀粉磷酸化酶活性在 12 h 和 36 h 的相对标准偏差分别为 2.06% 和 1.15%, 因此, 采用本试验方法测定出的 2 种酶活性结果能较准确的反映烟叶中酶的实际活性。

表 1 烘烤过程中烟叶样品测定结果

烘烤时间(h)	重复	淀粉酶活性(U)	相对标准偏差(%)	淀粉磷酸化酶活性(U)	相对标准偏差(%)
12	1	1.16	3.11	3.65	2.06
	2	1.22		3.57	
	3	1.27		3.72	
36	1	1.87	1.83	4.28	1.15
	2	1.81		4.41	
	3	1.78		4.32	

3 讨论

酶活性有多种测定方法, 本试验测定了酶蛋白量^[4, 5], 用单位酶蛋白在单位时间内反应生成产物的量来表示酶活性, 较准确地反映了烟叶中酶的实际活性。特别是在烟叶烘烤过程中, 随烟叶含水率进一步下降, 用单位鲜叶重在单位时间内生成产物的量来表示酶活性与烟叶中酶的实际活性存在较大差距^[6]。

烟叶在烘烤过程中, 处于动态变化的温湿度环境中, 而酶的活性受多种因素影响, 如环境温度及相对湿度, 叶组织自身的温度及其水分、pH 值等。但本试验测定酶活性均在适宜条件下进行的, 这难免与烟叶中的酶所处的实际环境有所差异。因此, 在生产实践和科学研究中应进一步探讨测定酶活性的方法, 力求试验条件与烟叶所处实际条件尽量一致, 使测定结果尽可能反映酶活性实际高低。

参考文献:

- [1] 吴国良, 潘秋红, 张大鹏. 核桃果肉发育过程中糖含量及相关酶活性的变化[J]. 园艺学报, 2003, 30(6): 643-646.
- [2] 门福义, 毛雪飞, 刘梦云, 等. 马铃薯不同品种淀粉积累生理基础研究——淀粉积累与磷酸化酶、蔗糖转化酶的关系[J]. 中国马铃薯, 1997, 11(1): 1-6.
- [3] BACON C W, WENGER R. Chemical transformations during flue-curing[J]. 世界烟草动态, 1997(2): 44-48, 43.
- [4] 中国科学院上海植物生理所. 现代植物生理学试验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 392-394.
- [5] YANAGOWA, HORIE. Activating enzyme of phosphorylase b in the fat body of the silkworm, Bombyx mori Insect[J]. Biochem, 1978(8): 155-158.
- [6] 邹琦. 植物生理学测试技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.