

不同金属离子对米糠解脂酶活性影响的研究

王吉中, 冯昕, 王丽娟

(郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 实验用CaCl₂溶液从脱脂米糠中提取解脂酶, 经(NH₄)₂SO₄沉淀后, 获得粗酶。用分光光度法测定了六种不同的金属离子对酶活力的影响, 实验结果表明, 在浓度为0.01 mol/L时, Zn²⁺、Fe²⁺、Mg²⁺等金属离子对米糠解脂酶起激活作用, Ca²⁺、Ba²⁺、Cu²⁺等离子对酶活性起抑制作用。当离子浓度在0.001 mol/L到0.1 mol/L之间变化时, 随着离子浓度的增加, Ca²⁺、Ba²⁺、Cu²⁺三种金属离子会使酶的活性逐渐降低; 而Zn²⁺、Fe²⁺、Mg²⁺三种金属离子浓度在0.001~0.02 mol/L的变化范围内, 酶活性随着离子浓度的升高而逐渐升高, 在0.02~0.1 mol/L的变化范围内, 酶活性随着离子浓度的升高而逐渐降低。

关键词: 米糠; 解脂酶; 金属离子; 吸光度; 活性。

中图分类号: TS201.2⁺5; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)02-0028-03

Influence of Metal ions on Activity of Rice Bran Lipase

WANG Ji-zhong, FENG Xin, WANG Li-juan

(School of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Crude lipase was extracted from defatted rice bran with calcium chloride and subsequently precipitated with CaCl₂ solution. Effects of six kinds of metal ions on the lipase activity were investigated. Results showed that when several metal ions, including Zn²⁺、Fe²⁺ and Mg²⁺ with suitable concentration being of 0.01 mol/L, could enhance the lipase activity, while Ca²⁺、Ba²⁺ and Cu²⁺ inhibited its activity. When the concentration of metal ions (Ca²⁺、Ba²⁺ and Cu²⁺) ranged from 0.001mol/L to 0.1 mol/L, its activity decreased with the increase of concentration of those metal ions, but was improved by increasing the concentration of other metal ions (Zn²⁺、Fe²⁺ and Mg²⁺) from 0.001mol/L to 0.02 mol/L. However, further raising the concentration of Zn²⁺、Fe²⁺ and Mg²⁺ from 0.02 mol/L to 0.1 mol/L. will lower its activity.

Key words: rice bran; lipase; metal ion; light absorption degree; activity

米糠是稻谷碾米加工过程中的主要副产物, 约占整个糙米的8%~10%, 我国年产米糠1000万t以上。国内外的研究表明米糠是最具开发潜力的一种高附加值的资源^[1], 它不仅含有高含量的脂肪和蛋白质, 而且还含有抗微生物、抗癌和其他能促进健康的物质。因而联合国工业发展组织把米糠称为一种未能充分利用的宝贵资源, 可从这些廉价产品中获取高价值蛋白和其他营养的或具生物活性的物质^[2]。但由于稻谷加工企业比较分散, 生产规模也不大, 再加上新鲜米糠稳定性较差, 不易贮存和运输, 因此难以集中生产。目前, 米糠有效利用率尚不足20%, 大部分作为饲料, 甚至作为废料, 资源浪费严重^[3]。

要充分地利用米糠这一丰富的资源, 我们就要研究米糠的保藏技术, 而米糠保藏的关键技术就在于对米糠中解脂酶性质的研究。因此, 从米糠中提取解脂酶并对其性质进行研究, 将为我国米糠的保藏及米糠的经济合理地利用提供有效的技术支持。

收稿日期: 2006-11-21

作者简介: 王吉中, 讲师, 主要从事米糠解脂酶和米糠蛋白方面的研究

1 实验材料与方法

1.1 实验材料和仪器

新鲜米糠由河南原阳县台新米业有限公司提供; 橄榄油购于北京京都利德食品有限责任公司; 石油醚购于莱阳市双化工有限公司; 其他常用药品为分析纯。

SP-2100型可见分光光度计: 上海光谱仪器有限公司; 微量进样器: 上海安亭微量进样器厂; TGL-16GB型台式离心机: 上海安亭科学仪器厂; 电子分析天平: 北京赛多利斯天平有限公司; PHSJ-4A型实验pH计: 上海科学仪器有限公司; 数显恒温水浴锅: 国华电器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 米糠中粗酶的提取和活力测定

米糠中粗酶的提取采用奈氏法, 详见“米糠中解脂酶酶学性质研究”^[4]。

酶活力测定采用分光光度法, 具体方法如下:

底物乳化液的配制: 将橄榄油和异辛烷按V_(橄榄油):V_(异辛烷)=2:3混合, 经高速搅拌均质化, 即得底物乳化液。

铜指示剂的配制：称取5 g乙酸铜，溶解于100 mL的蒸馏水中，过滤，通过酸度计用吡啶将溶液的pH值调至6.1，从而得到铜指示剂。

将5mL底物乳化液在35 °C下预热后，加入1 mL粗酶液、1 mL 0.005 mol/L的氯化钙溶液、1 mL 0.5 mol/L的氯化钠溶液、5 mL pH 7.5的Tris-HCl缓冲液，35 °C水浴条件下搅拌30 min。反应完毕后加入6 mol/L的盐酸，加热，沸腾5 min；冷却后加入5 mL异辛烷，再将溶液混合均匀，静置后取上层异辛烷溶液；加入1 mL铜指示剂，搅拌后静置，取上层溶液；在715 nm处测定其吸光度，以未反应的作空白对照。

1.2.2 不同金属离子对粗酶活力的影响

取7个三角瓶编号，各瓶均加入10 mL底物乳化液并在35 °C下预热；然后1号瓶加入2 mL蒸馏水（为对照），2号瓶加入2 mL 0.005 mol/L的CaCl₂溶液，3号瓶加入2 mL 0.005 mol/L的ZnCl₂溶液，4号瓶加入2 mL 0.005 mol/L的BaCl₂溶液，5号瓶加入2 mL 0.005 mol/L的FeCl₂溶液，6号瓶加入2 mL 0.005 mol/L的MgCl₂溶液，7号瓶加入2 mL 0.005 mol/L的CuCl₂溶液；最后各瓶均加入1 mL粗酶液，2 mL 0.5 mol/L的NaCl溶液，10 mL pH 7.5的Tris-HCl缓冲液。35 °C条件下搅拌30 min，反应完毕后加入10 mL 6 mol/L的HCl溶液加热沸腾5 min，冷却后，加入5 mL异辛烷，再将溶液混匀静置后，取上层异辛烷溶液加入1 mL铜指示剂，搅拌后静置，取上层溶液在715 nm处测得溶液的吸光值。

1.2.3 不同浓度的金属离子对粗酶活力的影响

为测不同浓度的金属离子对酶活性的影响，分别选用了Ca²⁺、Ba²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺和Mg²⁺等6种金属离子的氯化物进行实验研究。测定不同浓度的Ca²⁺离子对酶活力的影响时，取11个50 mL的三角瓶编号，各瓶均加入10 mL底物乳化液并在35°C下预热；然后1号瓶加入2 mL蒸馏水（为参照），2~11号瓶分别加入(mol/L)：0.002、0.004、0.006、0.008、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1的CaCl₂溶液2 mL；其余的都相同，即各加入粗酶液1 mL，2 mL 0.5 mol/L的NaCl溶液，10 mL pH 7.5的Tris-HCl缓冲液。35 °C水浴条件下搅拌30 min，冷却后加入5 mL异辛烷溶液，再将溶液混匀，静置后取上层异辛烷溶液，加入1 mL铜指示剂，搅拌后静置，取上层溶液，在715 nm处测溶液的吸光度。不同浓度的其它离子对酶活力影响同Ca²⁺离子对酶活力的影响的测定方法一样。

2 结果与讨论

2.1 粗酶活力测定

解脂酶活力的测定方法有多种，如滴定法^[5]、分光光度法^[6]、荧光分析法、染色法、液相色谱法、放射性元素标记法等，参考前人的研究，本文选用了用分光光度法来测定酶活力。分光光度法测酶活力时，选择橄榄油作为底物，将底物配制成均匀分散的乳化液，以增大油水界面的面积，从而提高反应速度；酶与底物反应结束后加入盐酸不仅可以终止反应进行，而且还有利于提取游离脂肪酸。另外，分光光度法采用乙酸铜-吡啶溶液作为指示剂，在异辛烷-乙酸铜-吡啶溶液体系中，只有游离脂肪酸与铜指示剂结合产生颜色，不受单酰甘油、二酰甘油及其它脂类物质的影响，因此最终确定采用分光光度法测定粗酶活力，即用吸光度表示反应产物中脂肪酸的含量，也即表示解脂酶的活力。得到粗酶后，我们研究了温度、pH、反应时间等因素对酶活力的影响，结果与王静等人的研究结果一致：解脂酶的最适温度为35 °C，最适pH值在7.5~8.0之间，反应时间为30 min。

2.2 不同金属离子对粗酶活力的影响

用六种不同的金属离子测定在0.01 mol/L浓度时对解脂酶活力的影响，结果如表1。

表1 不同的金属离子对酶活的影响 单位：nm

不同离子	水	Ca ²⁺	Zn ²⁺	Ba ²⁺	Fe ²⁺	Mg ²⁺	Cu ²⁺
吸光度	0.514	0.425	0.731	0.359	0.628	0.792	0.316

表1结果表明：同等条件下，同一浓度的不同金属离子对粗酶的活力都有不同程度的影响，其中Ca²⁺、Ba²⁺、Cu²⁺等离子在0.01 mol/L的浓度时对解脂酶起抑制作用，抑制程度Ca²⁺<Ba²⁺<Cu²⁺，分别达17.3%、30.1%、38.9%；而Zn²⁺、Fe²⁺、Mg²⁺等离子在0.01mol/L的浓度时对解脂酶起激活作用，激活程度Fe²⁺<Zn²⁺<Mg²⁺，分别达22.2%、42.2%、54.1%。结果表明金属离子的存在会影响解脂酶的活性，但不同的金属离子对酶活性的影响方式却不同，在0.01 mol/L浓度时，Ca²⁺、Ba²⁺、Cu²⁺等离子对酶起抑制作用，而Zn²⁺、Fe²⁺、Mg²⁺等离子对酶起激活作用；方差分析表明不同金属离子对解脂酶活力的影响差异显著（*p*<0.01）。

2.3 不同浓度的金属离子对粗酶活力的影响

实验测定了六种不同的金属离子在不同浓度下对解脂酶活性的影响，结果见表2。

表2结果表明不同的金属离子对酶活性有不同的影响，同一金属离子在不同浓度时对酶活性也用不同的影响。在不加金属离子时，酶反应后的吸光度为0.518，而金属离子的存在将导致反应体系吸光度的改变。从结果可看到：离子浓度为0.002~0.01 mol/L时，Ca²⁺、Ba²⁺、Cu²⁺等金属离子的存在导致解脂酶活性降

低, 而 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属离子的存在则导致解脂酶活性升高; 随着离子浓度的继续升高(0.01~0.1 mol/L时), 六种金属离子都会导致解脂酶活性的降低, 而使酶活性下降最快的离子是 Cu^{2+} 离子, 然后是 Ba^{2+} 离子, 接着是 Ca^{2+} 离子。

Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 等三种金属离子对酶活性的影响有双重作用, 低浓度时(0.002~0.01 mol/L)随着离子浓度的升高, 酶活性也随之升高, 使酶活性最高时的离子浓度在0.01~0.02 mol/L之间, 其中 Mg^{2+} 离子使酶活性升高的最多, 在浓度为0.01 mol/L时可使吸光度从0.518上升到0.719, 提高了54%; 而在高浓度时(0.01~0.1 mol/L), 酶的活性则随着离子浓度的升高而逐渐降低, 其中 Zn^{2+} 离子则使酶活性下降的趋势最快, 吸光度从0.735下降到0.123, 下降了84%, Fe^{2+} 离子使酶活性下降了67%, Mg^{2+} 离子则使酶活性下降了35%。

在低浓度时, 金属离子对酶活性的影响可分为两类: 激活剂和抑制剂。对于米糠解脂酶来说, 低浓度的 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 等三种金属离子为激活剂, 而 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 等金属离子为抑制剂。但高浓度的金属离子又会导致蛋白的变性而使酶活性丧失, 因此高浓度的 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属离子也会使酶催化反应体系的吸光度降低。

表2 离子浓度对解脂酶活性的影响 单位: nm

离子类别	离子浓度/(mol/L)					
	0	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01
Ca^{2+}	0.518	0.532	0.513	0.475	0.458	0.430
Ba^{2+}	0.518	0.509	0.479	0.452	0.417	0.361
Cu^{2+}	0.518	0.492	0.467	0.416	0.362	0.319
Zn^{2+}	0.518	0.532	0.573	0.615	0.671	0.735
Fe^{2+}	0.518	0.535	0.562	0.594	0.618	0.632
Mg^{2+}	0.518	0.542	0.580	0.646	0.719	0.797

离子类别	离子浓度/(mol/L)				
	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
Ca^{2+}	0.406	0.356	0.316	0.249	0.167
Ba^{2+}	0.318	0.236	0.187	0.125	0.051
Cu^{2+}	0.224	0.106	0.056	0.038	0.03
Zn^{2+}	0.719	0.635	0.503	0.329	0.123
Fe^{2+}	0.650	0.589	0.498	0.371	0.213
Mg^{2+}	0.781	0.743	0.684	0.619	0.516

注: 吸光度可间接地表示酶活性的大小, 故表中所测数据为吸光度, 单位为: nm。

3 结论

3.1 在浓度为0.01 mol/L时, Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属

离子对米糠解脂酶起激活作用, Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 等离子对酶活性起抑制作用。

3.2 金属离子浓度在0.001~0.1 mol/L的浓度范围内, 随着离子浓度的增加, Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 三种金属离子会使酶的活性逐渐降低; 而 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 三种金属离子在浓度在0.001~0.02 mol/L的范围内, 随着浓度的升高而使酶活性升高, 在0.02~0.1 mol/L的浓度范围内, 随着浓度的升高而又使酶的活性降低。

3.3 不同的金属离子在不同的浓度条件下对米糠解脂酶的活性有不同的影响, 铜离子的存在对解脂酶活性的抑制作用最为显著。这些结果可为我国米糠储存工艺的研究提供一定的理论支持。

4 展望

我国米糠资源丰富, 米糠质量好, 如能进一步认识米糠开发利用的意义和经济效益, 必定能加快国内米糠的科研和产品开发的步伐。但由于米糠中解脂酶的作用, 使米糠极易腐败变质, 大大的影响了米糠的开发与利用。通过对米糠解脂酶性质的研究, 可以更好的解决这一问题, 促进米糠的开发利用。

随着对米糠解脂酶提取技术、营养功效和其他功能特性更深入的研究, 米糠解脂酶作为尚未充分利用的米糠资源中的主要成分之一, 必将会更广泛而科学地用于食品工业, 进一步推动米糠资源的综合利用和深度开发, 提高米糠的附加值和稻米加工业的经济效益, 增加其产品的市场竞争力。展望未来, 在我国开展米糠的综合利用是大有可为的, 米糠开发应用前景将十分广阔, 其产生的社会效益和经济效益不可估量。

参考文献

- [1] 朱文华, 姚惠源, 谈新刚. 米糠的不稳定机理及稳定化的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2001, (10): 40-41.
- [2] 顾华孝. 米糠的食用性和在保健功能食品中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2001, (5): 46-48.
- [3] 陈正行, 周彤. 米糠: 一种潜在的健康食品优质原料[J]. 粮食与饲料工业, 1999, (10): 40-43
- [4] 王静, 朱永义. 米糠中脂酶学性质的研究[J]. 中国粮油学报, 2000, 15, (5): 10-13
- [5] Aizono, M. Funatsu, M. Sugano. Biochemical Studies on Rice Bran Lipase. Part III. Enzymatic Properties of Rice Bran Lipase[J]. Agric. biol. chem., 1973, 37(9): 2031-2036
- [6] DaeY. Jwon and Joon S. Rhee. A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay[J]. J. Am. Oil Chem. Soc., 1986, 63(1): 89-92