

浙江大学 2025-2026 学年 秋冬 学期

《生物化学实验（甲）》实验报告

学生姓名：秦寒冰 专业：生物科学（强基计划） 学号：3240101189

课程名称：生物化学实验（甲） 课程号：BIO2012F

同组学生姓名： 指导老师：应颖慧

提交日期：2025 年 12 月 27 日

得分	
评语	
评卷人	

蔗糖酶基础综合实验与各类阳离子和 EDTA 的影响探究

摘要:

本实验以市面上的干酵母粉为原料，通过固体剪切研磨法破碎细胞，再经热处理、乙醇沉淀及阴离子交换层析等步骤实现蔗糖酶的分离纯化。采用 Folin-酚法测定蛋白浓度，DNS 法测定酶活性，结合 SDS-PAGE、活性电泳及 Western Blot 等技术对蔗糖酶进行定性分析与分子量测定。通过正交实验确定酶促反应最优条件，利用双倒数作图法测定蔗糖酶及去糖基化蔗糖酶的动力学参数，并探究 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 三种阳离子及螯合剂 EDTA 对蔗糖酶活性的影响。结果显示，蔗糖酶最适反应温度为 $50^{\circ}C$ 、最适 pH 为 4.6；蔗糖酶分子量约为 125 kD，去糖基化后降至 72 kD；去糖基化使酶与底物的亲和力增强； Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 对蔗糖酶呈抑制作用， Zn^{2+} 抑制效果更强， Ca^{2+} 对酶活性影响无规律变化，EDTA 则呈现先抑制后稳定的作用趋势。通过一系列蔗糖酶理化性质的探究，本实验为蔗糖酶的工业应用优化及高效改良提供了数据支撑与技术参考。

Abstract:

This experiment uses the yeast powder as raw material which is available on the market. Cells are broken down by solid shear grinding. Then use heat treatment, ethanol precipitation and anion exchange chromatography steps to achieve the isolation and purification of sucrase. The protein concentration was determined by the Folin-phenol method, the enzyme activity was determined by the DNS method, and the qualitative analysis and molecular weight determination of sucrase were carried out by combining SDS-PAGE, active electrophoresis and Western Blot techniques. The optimal conditions for enzymatic reactions were determined through orthogonal experiments. The kinetic parameters of sucrase and deglycosylated sucrase were measured by the double reciprocal plotting method. The effects of three cations, Zn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} , as well as the chelating agent EDTA, on the activity of sucrase were explored. The results show that the optimal reaction temperature of sucrase is $50^{\circ}C$ and the optimal pH is 4.6. The molecular weight of sucrase is approximately 125 kD, and it drops to 72 kD after deglycosylation. Deglycosylation enhances the affinity between enzymes and substrates. Zn^{2+} and Mg^{2+} have inhibitory effects on sucrase, with Zn^{2+} having a stronger inhibitory effect. The influence of Ca^{2+} on enzyme activity changes irregularly, while EDTA shows a trend of first

inhibiting and then stabilizing. Through a series of investigations into the physicochemical properties of sucrase, this experiment provides data support and technical references for the optimization and efficient improvement of the industrial application of sucrase.

关键词:

蔗糖酶, 离子交换层析, 酶动力学, 酶抑制剂, EDTA

Keywords:

Invertase, Ion-exchange chromatography, Enzyme kinetics, Enzyme inhibitor, EDTA

1 引言

蔗糖酶, 又称转化酶、呋喃果糖苷水解酶 (EC.3.2.1.26), 来源于酿酒酵母菌株, 特异地催化非还原糖中的 β -D-呋喃果糖苷键水解, 具有相对专一性。其能催化蔗糖水解生成葡萄糖和果糖, 也能催化棉子糖水解, 生成蜜二糖和果糖。蔗糖酶运用广泛, 可作为食品添加剂和配料, 也可以作为食品、酒精发酵、医药制药领域的生物催化剂。

蔗糖酶自1828年被首次发现以来便有许多研究。蔗糖酶广泛存在于自然界多种生物中, 不同生物体部位来源的蔗糖酶也具有不同的结构和特征。微生物来源的蔗糖酶具有催化活性多样、来源丰富和低成本等优点, 能广泛运用于工业生产。如酵母菌、黑曲霉等微生物均可以产生蔗糖酶, 考虑菌种类型和生物安全性, 酵母菌制取蔗糖酶成为最常见的方法。

酵母蔗糖酶的制备方法多样, 工业生产主要通过微生物发酵法制备蔗糖酶, 发酵方式如深层发酵和固态发酵法等。提取得到的粗蔗糖酶经过纯化可除去大部分杂质, 进一步提高蔗糖酶的酶活性和稳定性。可根据蛋白质的溶解度、带电差异和分子大小等相关特性进行分离纯化。

1.1 酵母蔗糖酶的理化特征

酵母中的蔗糖酶根据其定位可分为外蔗糖酶和内蔗糖酶, 两种酶在组成上的差别主要在于糖基化程度不同, 但其底物专一性和动力学性质十分相似。由于内酶含量很少, 极难提取, 本实验提取纯化的主要是外酶^[1]。

酵母蔗糖酶通常是二聚体。在不同条件下可形成二聚二聚体、三聚二聚体和四聚二聚体四级结构（图 1），均有不同的生物活性。酵母蔗糖酶最适 pH 为 4.5~6.0，最适温度为 40~55℃，在此条件下，酶活性达到最高。在低温下可长期保存，当温度超过 65℃ 时，酶蛋白快速变性失活；当 pH<3.0 或 pH>8.0 时，酶活性同样也显著下降。

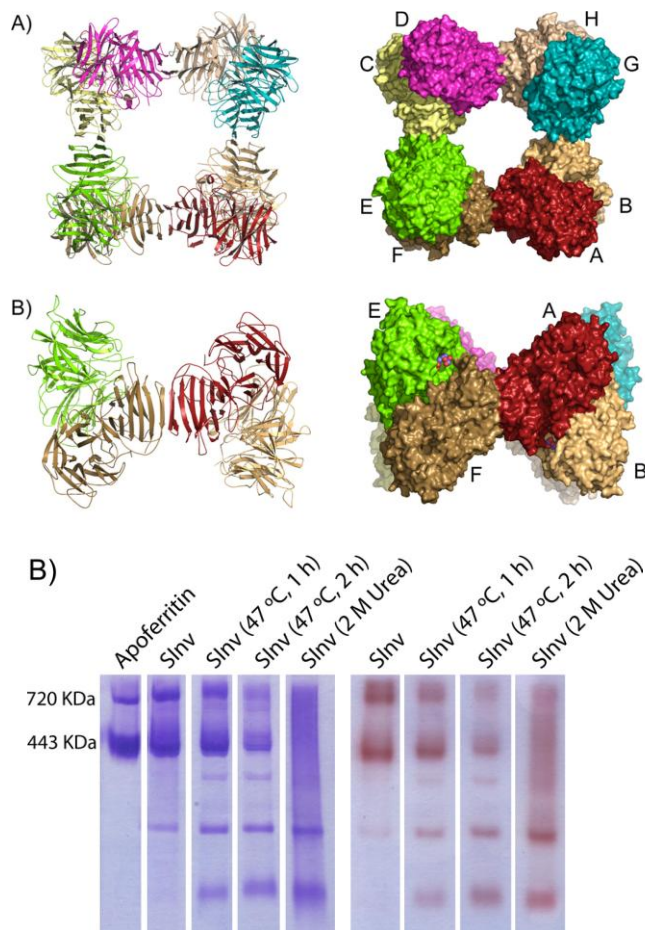


图 1 酵母外蔗糖酶四聚/二聚二聚体的三维结构以及蛋白电泳考马斯亮蓝染色和活性染色结果^[2]

1.2 主要实验技术的原理和应用

作为蛋白质，酵母蔗糖酶的纯化方法多样，如盐析法、等电点沉淀法、层析法等。本实验从干酵母粉出发进行蔗糖酶的提取纯化，利用固体剪切法裂解酵母细胞，释放出细胞内含物，再通过离心处理和乙醇沉淀等步骤，实现粗纯化蔗糖酶。后续进一步离子交换纯化并对其进行去糖基化处理，可通过稀释提取的酶液多组反应，以正交实验实现蔗糖酶最适条件的探究，以及双倒数作图法求出蔗糖酶以及去糖基化后的蔗糖酶 V_{max} 与 K_m 动力学参数。而通过 SDS-PAGE、活性电泳和 Western Blot 等电泳可进一步对蔗糖酶的物理性质进一步研究。

1.2.1 有机溶剂沉淀

利用有机溶剂可以降低蛋白质的溶解度，使其从溶液中分离出来。其根本原因是由于蛋白质的胶体性质，在水溶液中蛋白质表面会产生一层水化膜，使得蛋白质溶解。而有机溶剂（如乙醇、丙酮）与水的亲和力强，会夺取蛋白质表面的水分子，破坏周围的水化膜，从而使得蛋白质分子相互聚集并沉淀。同时，有机溶剂会降低溶液的介电常数，增加蛋白质分子间的静电相互作用，进而促进蛋白质分子凝聚成沉淀。

通过加入有机溶剂可以初步将溶液中的蛋白质沉淀分离出来，实现蛋白质的粗分离。

1.2.2 离子交换层析

蛋白质等生物大分子通常表面会携带不同的电荷，利用此特征可用带相反电荷的物质与目标蛋白质相结合，实现蛋白质的提纯。离子交换层析（ion-exchange chromatography, IEC）则以离子交换剂为固定相，根据流动相中的组分离子与交换剂上的反离子进行可逆交换时的结合力大小的差别而进行分离。而在某一pH值下，不同等电点的蛋白质所带的电荷存在差异，造成与离子交换剂的亲和力区别。当洗脱液的pH改变或者盐的离子浓度逐渐提高时，某一蛋白质的电荷被中和，与离子交换剂的亲和力降低，不同的蛋白质按所带电荷的强弱逐一被洗脱下来，达到分离的目的。

离子交换层析常用于蛋白质与酶的纯化。如对生物细胞内提取的系列蛋白质进行分离，除去其他杂质。同时离子交换层析也广泛用于核酸的分离纯化。如使用阳离子交换介质，在低盐缓冲液环境中，让带负电的质粒 DNA 吸附到介质上，而杂蛋白、RNA 等杂质因电荷特性不结合而被洗脱。

1.2.3 蛋白质印迹法

生物材料提取液通常含有大量杂质蛋白，在经过分离纯化后可除去大部分杂质。但要明确所研究的蛋白质表达量和含量则需要将不同蛋白质分离开进行确定。由于不同蛋白质的分子量通常不同，因此可以通过电泳将样品中的系列蛋白质迁移分离，使用SDS-PAGE可以屏蔽不同蛋白质的电荷差异对迁移速率的影响。

蛋白质印迹法（Western Blot, WB）是先通过SDS-PAGE电泳依照分子量将蛋白质展开成不同条带，再将凝胶上的条带转移到PVDF膜上，利用抗原-抗体的特异性结合，通过一抗识别目标蛋白、二抗携带信号分子放大信号，最终经化学发光或荧光等方式实

现目标蛋白的定性检测与半定量分析。该方法具有特异性和高灵敏度，广泛运用于蛋白质表达含量、修饰状态和蛋白质相互作用的检测。

1.3 本实验的研究目的

本实验旨在选取市面上的干酵母粉从头开始提取酵母蔗糖酶，并进行分离纯化、最适催化条件测定、酶动力学相关参数测定探究。同时针对金属离子与酶蛋白的相关影响具体探究其对蔗糖酶的作用，以及常用的金属离子螯合剂EDTA对蔗糖酶的活性影响。对市面上的酵母产生的外蔗糖酶研究为改进酵母蔗糖酶，研发更高效的蔗糖酶提供了基础。测定解除金属离子对酶的影响的最适EDTA浓度可更好地除去酶液中的多种离子影响，进一步提高酶活性，在工业大量生产中有重要启示。

2 材料与方法

2.1 实验材料

圣琪酵母牌高活性干酵母粉1包（5克）

2.2 实验方案

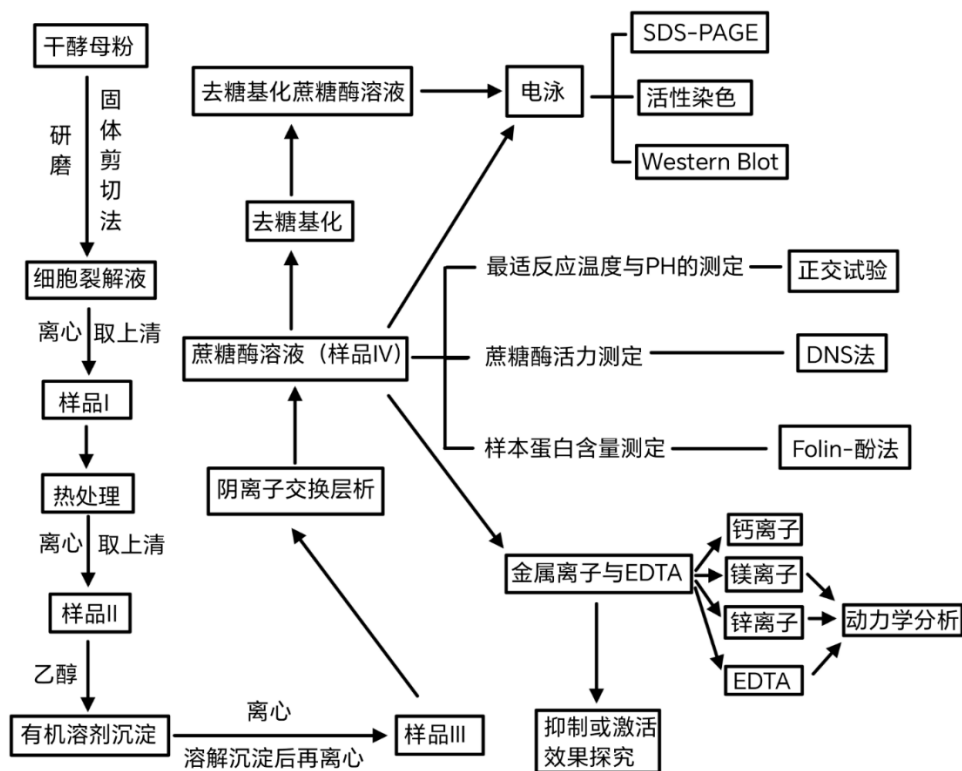


图2 酵母蔗糖酶提取及性质鉴定实验流程图

2.3 实验步骤

以下为各个实验步骤的主要操作过程，详细实验步骤见附页。

2.3.1 蔗糖酶纯化方法

1、酵母细胞破碎

取一包酵母粉于研钵加入石英砂研磨 25min 成细粉末状，分两次倒入 40ml 的 20mM Tris-HCl pH7.3 缓冲液，并研磨成糊状液体。再将糊状液体在 4℃、15000rpm 环境下离心 15min，收集并记录上清液（样品 I）体积 V_1 ，另留 0.5ml 上清液备用。

2、热处理

将样品 I 装入 2 支离心管在 50℃ 水浴下保温 30min，然后迅速将离心管冰浴冷却 3~5 分钟。再在 4℃，15000rpm 下离心 10min，收集上清液（样品 II）并记录体积 V_2 ，另留 0.5ml 上清液备用。

3、有机溶剂（乙醇）沉淀

将样品 II 装入小烧杯冰浴，5~10min 中逐滴加入相同体积的 -20℃ 的 95% 乙醇，并用滴管温和搅拌。冰上放置 15~20min 后离心取弃去上清液，并将沉淀溶解于 15ml 的缓冲液中。再次离心，收集并记录上清液（样品 III）体积 V_3 ，另留 0.5ml 上清液备用。

4、离子交换层析

组装并检查色谱系统，用凝胶填充色谱柱。先用 Buffer A 平衡约 25min，再将样品 III 缓慢加入层析柱中，用 Buffer A 洗脱未被吸附的杂蛋白 20min 左右直至 UV 穿流峰完全消失。然后进行梯度洗脱和部分收集，每 2min 收集一管，当 UV 线出现峰值时测定酶活力，并 -20℃ 保留酶活力最高的 2~3 管收集液作为样品 IV。

2.3.2 蛋白质浓度测定

配制系列标准蛋白溶液，并用 Folin-酚试剂处理后在 500nm 紫外下测定溶液的吸光度 A_{500} ，绘制 A_{500} -蛋白含量曲线图，得到拟合方程。待测溶液经一定倍数稀释后，用 Folin-酚法处理后测定 500nm 紫外吸光度，将吸光度代入拟合方程得到稀释后蛋白浓度。再根据加样体积和稀释倍数即可推算出原溶液的蛋白质浓度。

2.3.3 蔗糖酶活性测定

配制系列标准葡萄糖溶液，并 DNS 试剂处理后在 520nm 紫外下测定溶液的吸光度 A_{520} ，绘制 A_{520} -葡萄糖浓度曲线图，得到拟合方程。待测溶液经一定倍数稀释后，用 DNS

法处理后测定520nm紫外吸光度，将吸光度代入拟合方程得到稀释后葡萄糖浓度。根据单位时间、单位体积内产生的葡萄糖含量推算出稀释后的样品酶活性，再由稀释倍数和加样体积推算出原溶液的酶活性。

2.3.4 离子交换层析蛋白浓度与酶活性洗脱曲线制作

将保留整个洗脱峰的多组样品IV溶液稀释2000倍，调整不同样品的加样体积，使得测得的吸光度在标线范围内。根据测得的吸光度得到蛋白含量和葡萄糖产生量，进而推算出原样品的蛋白浓度和酶活性，绘制出蛋白浓度与酶活性洗脱曲线。

2.3.5 正交法的应用及酶促反应体系参数的确定

本实验选取酶浓度[E]、底物浓度[S]、温度、pH四个变量作为酶促反应的影响因素，每个因素选取3个水平，由此设计一个4因素3水平的正交实验。同时还将样品IV进行1000/2000/4000/8000倍稀释的预实验，确定进行正交实验的最佳稀释倍数，以保证吸光度均在可测量范围内。随后在最佳稀释倍数下进行正交实验并进行结果处理和极差分析，确定反应影响因素和最佳反应条件。

2.3.6 K_m 值与 V_{max} 测定

首先以葡萄糖含量为横坐标，以 A_{520} 为纵坐标制作葡萄糖浓度吸光标准曲线。再选取活性最高的样品IV和去糖基化的样品IV-E分别做预实验确定蔗糖酶液的最佳稀释倍数。再在最佳稀释倍数的基础上改变蔗糖浓度，进行梯度性的设置蔗糖浓度，分别测定520nm下的吸光度。最后用双倒数法求出蔗糖酶的 K_m 与 V_{max} 并做图。

2.3.7 蔗糖酶的去糖基化

将酶活性最高的样品IV原液60 μ l加入离心管中，再加入10 μ l反应缓冲液，26 μ l去离子水，4 μ l 500U/ μ l Endo H 溶液，混匀，37 $^{\circ}$ C保温3.5小时以上，再-20 $^{\circ}$ C保存备用。

2.3.8 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色与分子量测定

组装制胶装置，分别配制浓缩胶和分离胶，制备电泳胶并组装电泳槽。取样品I、II、III、IV和去糖基化处理的样品IV-E离心，取上清并处理样品。合理加样，开始电泳。样品在浓缩胶时控制电流在15~20mA/胶，待样品条带进入两层胶交界处时，调到30mA/胶保持恒流至迁移到下沿0.5cm处停止电泳。电泳结束后剥胶，将凝胶分别转移至对应的染色盒，去离子水漂洗凝胶A并进行考马斯亮蓝染色。

2.3.9 蔗糖酶活性电泳与染色

将漂洗后的C凝胶浸入Triton X-100溶液15min，去离子水漂洗3次。再用蔗糖-乙酸缓冲溶液50℃保温25min，去离子水洗再加入碘乙酰胺室温浸泡5min。最后将凝胶没入现配的TTC-氢氧化钠溶液中，95℃以上保温，出现红色谱带后去离子水漂洗。

2.3.10 蔗糖酶的 Western blotting 鉴定

将凝胶B用去离子水漂洗，PVDF膜浸入甲醇激活，再漂洗后浸入平衡液。使用eBlot L1转膜。将转印的PVDF膜用TBST漂洗，再冰箱中封闭一周。漂洗后将PVDF膜浸入一抗溶液中室温孵育1h，缓冲液漂洗3次。然后将PVDF膜浸入二抗溶液室温孵育1h，漂洗3次。最后滴加适量TMB显色液覆盖PVDF膜，避光孵育直至显色。

2.3.11 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 EDTA 对蔗糖酶活性探究（自主实验）

配制系列标准葡萄糖溶液，并DNS试剂处理后在520nm紫外下测定溶液的吸光度 A_{520} ，绘制 A_{520} -葡萄糖浓度曲线图，得到拟合方程。待测溶液经一定倍数稀释后，加入不同浓度梯度的金属离子或EDTA溶液，调整总体积保持不变，用DNS法处理后测定520nm紫外吸光度，将吸光度代入拟合方程得到稀释后葡萄糖浓度。根据单位时间、单位体积内产生的葡萄糖含量推算出稀释后的样品酶活性，再由稀释倍数和加样体积推算出增加不同浓度梯度的金属离子或EDTA溶液下的酶活性。

2.3.12 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 EDTA 对蔗糖酶动力学探究（自主实验）

首先以葡萄糖含量为横坐标，以 A_{520} 为纵坐标制作葡萄糖浓度吸光标准曲线。然后选取活性最高的样品IV做预实验确定蔗糖酶液的最佳稀释倍数。再根据预实验和金属离子作用效果选取3组离子或EDTA浓度，在固定浓度，最佳稀释倍数的基础上改变蔗糖浓度，进行梯度性的设置蔗糖浓度，分别测定520nm下的吸光度。最后用双倒数法求出同一离子3组不同浓度下的蔗糖酶的 K_m 与 V_{max} 并做图。

3 实验结果

3.1 酵母蔗糖酶的纯化结果

3.1.1 纯化流程各步骤所得样品比活力、目标物百分率、各步骤纯化倍数与活性回收率

通过蛋白质与Folin-酚试剂反应，可使溶液呈现深蓝色，由此配制系列标准蛋白质

浓度溶液并绘制紫外吸光下的标准蛋白吸光曲线(附录-表 1、附录-图 1)。测定不同样品的吸光度并借助标准曲线进行比对,可以估算出不同样品中蛋白质含量(附录-表 3)。随着样品的纯化,蛋白质浓度和总蛋白含量均呈下降趋势。

酶活力是在最适反应条件下,每分钟催化 $1\mu\text{mol}$ 底物或生成 $1\mu\text{mol}$ 产物所需的酶量。酶活力的大小能够通过特定条件下酶所催化的某一化学反应的转化速率来体现,即酶催化的转化速率越快,酶活力越高。因此,测定酶活力可以对酶促反应的转化速率进行测定,而酶转化速率可以用单位时间内单位体积中底物的减少量或产物的增加量来表示。本实验蔗糖酶的酶活力选取葡萄糖的产量来反映,即蔗糖酶在 50°C , $\text{pH}4.6$ 的条件下,每分钟水解产生 $1\mu\text{g}$ 葡萄糖所需的酶量。

同样地,配置系列葡萄糖浓度标准溶液并进行 DNS 反应可以测定溶液吸光度,并绘制紫外吸光下的标准葡萄糖吸光曲线(附录-表 2、附录-图 2)。再测定不同样品的吸光度并借助标准曲线进行比对,可以估算出不同样品的酶活力(附录-表 4)。

表 1 蔗糖酶各步骤纯化样品分离纯化效果的评价指标

	样品 I	样品 II	样品 III	样品 IV		
				8 号	9 号	10 号
体积(ml)	37.0	33.0	20.5	2	2	2
蛋白浓度(mg/ml)	24.83	14.87	13.95	3.208	7.996	7.784
总蛋白(mg)	918.71	490.77	286.01	6.416	15.992	15.568
总蛋白回收率	100%	53.42%	31.13%	0.70%	1.74%	1.70%
酶活力(U/ml)	707742.94	465426.04	542766.3	558453.96	1462857.96	1050376.2
酶总活力 U	26186489	15359059	11126709	1116907.9	2925715.2	2100752.4
酶活性回收率	100%	58.6%	42.5%	4.3%	11.2%	8.0%
比活力 U/mg	28503.5	31295.8	38903.2	174081.7	182948.7	134940.4
各步骤纯化倍数	1.0	1.10	1.24	4.48	4.70	3.47
总纯化倍数	1.0	1.10	1.36	6.11	6.42	4.73

根据表 1 可知,随着热处理、有机溶剂沉淀和阴离子交换层析的进行,总蛋白质含量和蛋白浓度都逐渐降低,且热处理和阴离子交换层析之后蛋白质含量下降尤为显著(总蛋白回收率由样品 I 的 100%到样品 II 的 53.42%;样品 III 的 31.13%到样品 IV 近似 1%),反映出阴离子交换层析纯化效果较好。样品 I~样品 IV 的酶总活力也明显下

降，酶活性回收率下降明显。

而样品I~ 样品IV的比活力(U/mg)逐渐升高，且从样品III到样品IV显著上升。纯化倍数和总纯化倍数也逐渐增大（样品IV最高总纯化倍数达6.42）。这说明随着纯化操作的进行，蔗糖酶纯度逐渐上升，但是伴随着大量蛋白的损耗。

3.1.2 离子交换层析活性洗脱峰、各收集管的蛋白浓度与酶活性洗脱曲线关联图谱

本次实验在阴离子交换层析过程中共收集 20 管洗脱溶液，其中第 8, 9, 10 管在梯度洗脱峰（UV 值）的最高峰及其附近（图 3 A），同时记录第 1、5、8、9、10、15、16、17 管收集液进行了 DNS 法，通过观察颜色深浅间接地比较第一个洗脱峰的蔗糖酶含量分布（附录-图 3）。由于未保留覆盖整个洗脱峰的收集液，仅保留了蛋白含量最高的 8、9、10 号管，因此未对洗脱曲线和酶活力曲线进行处理，此处对收集的 3 管溶液蛋白含量和酶活力，以及双洗脱峰的情况进行讨论。

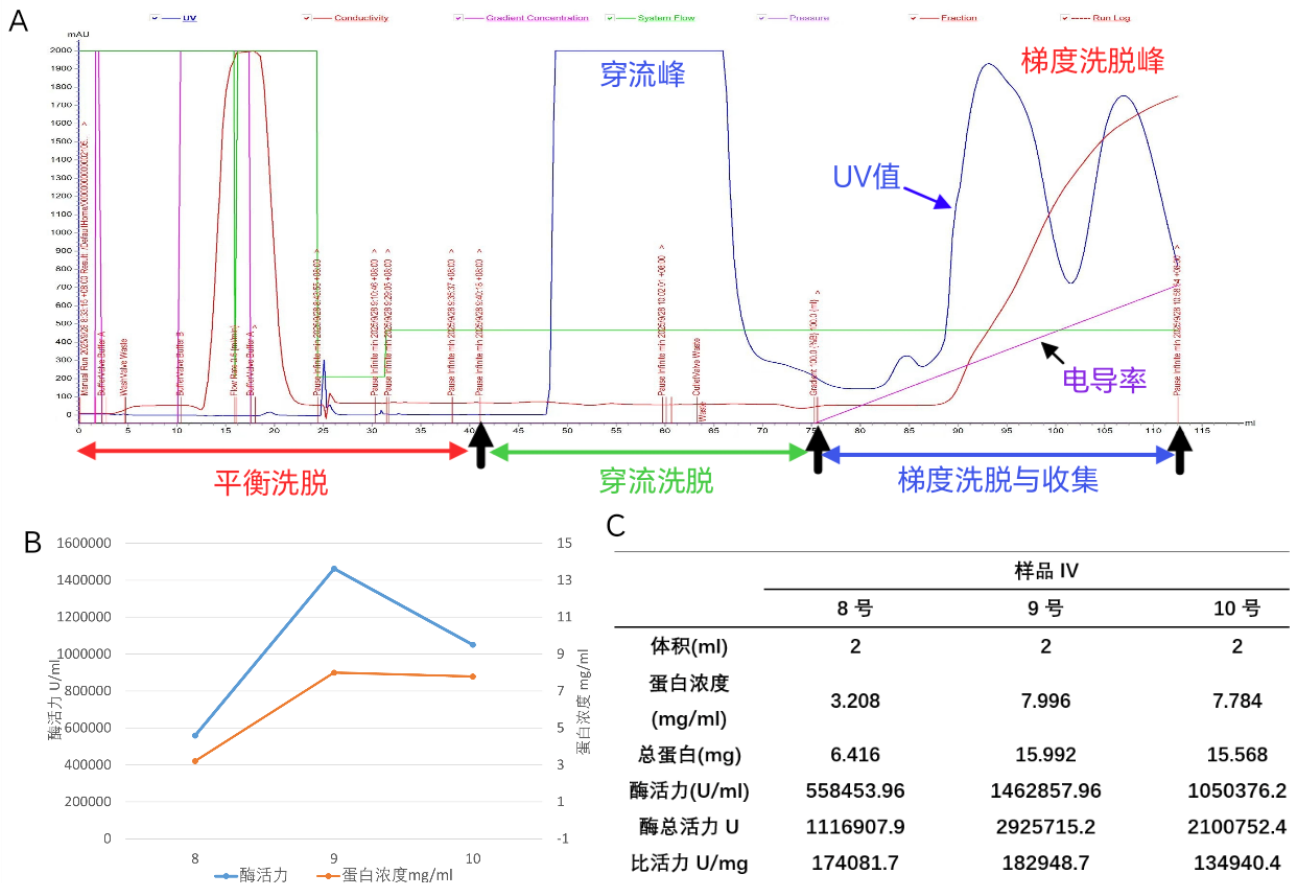


图 3 阴离子交换层析洗脱峰和样品 IV 活性分析图

(A) 离子交换层析处理样品 III 得到的洗脱曲线 (B)洗脱峰附近 3 管样品 IV 的蛋白浓度与酶活力图 (C) 洗脱峰附近 3 管样品 IV 的蛋白与酶活力相关分析

如图 3A 可观察到梯度洗脱时存在两个相邻的洗脱曲线，且紫外吸收峰值接近 2000mAU，而 8、9、10 来自第一个洗脱峰且刚好覆盖洗脱峰，因此类似于洗脱曲线对 3 管溶液进行酶活力和蛋白浓度作图 3B，此处第 9 管溶液有最大蛋白浓度和酶活力，而第 10 管溶液酶活力开始下降，蛋白浓度略微下降。推测最多的酵母蔗糖酶存在于第 9 管。

而根据图 3C 进一步对 3 管溶液酶总活力与比活力分析，虽然 9、10 号管蛋白浓度接近，但第 10 管比活力明显低于第 8、9 管；而第 8 管虽然蛋白含量和酶活力相对较低，但其比活力与第 9 管接近。由此可知，洗脱液中淀粉蔗糖酶在第 8 到 9 管最纯，且第 9 管达到最大含量。而后续蛋白含量较高和存在第二个洗脱峰则是由于其他蛋白质的洗脱。

3.1.3 SDS-PAGE 电泳、活性电泳以及蛋白免疫印记图谱

蔗糖酶的样品顺序依次为 I、II、III、IV 和去糖基化的样品 IV。根据三种电泳以及处理结果，从样品 I 至样品 IV，条带颜色更深，条带的数量减少，可见蔗糖酶的含量是逐渐上升的，且蔗糖酶的分子量主要集中在 100~130 kD。而两个去糖基化的蔗糖酶样品 IV-8E 和 IV-9E 条带位置均偏下方位置，可见酶切之后的蔗糖酶分子量下降，这也证明了蔗糖酶是含有多个亚基的酶。

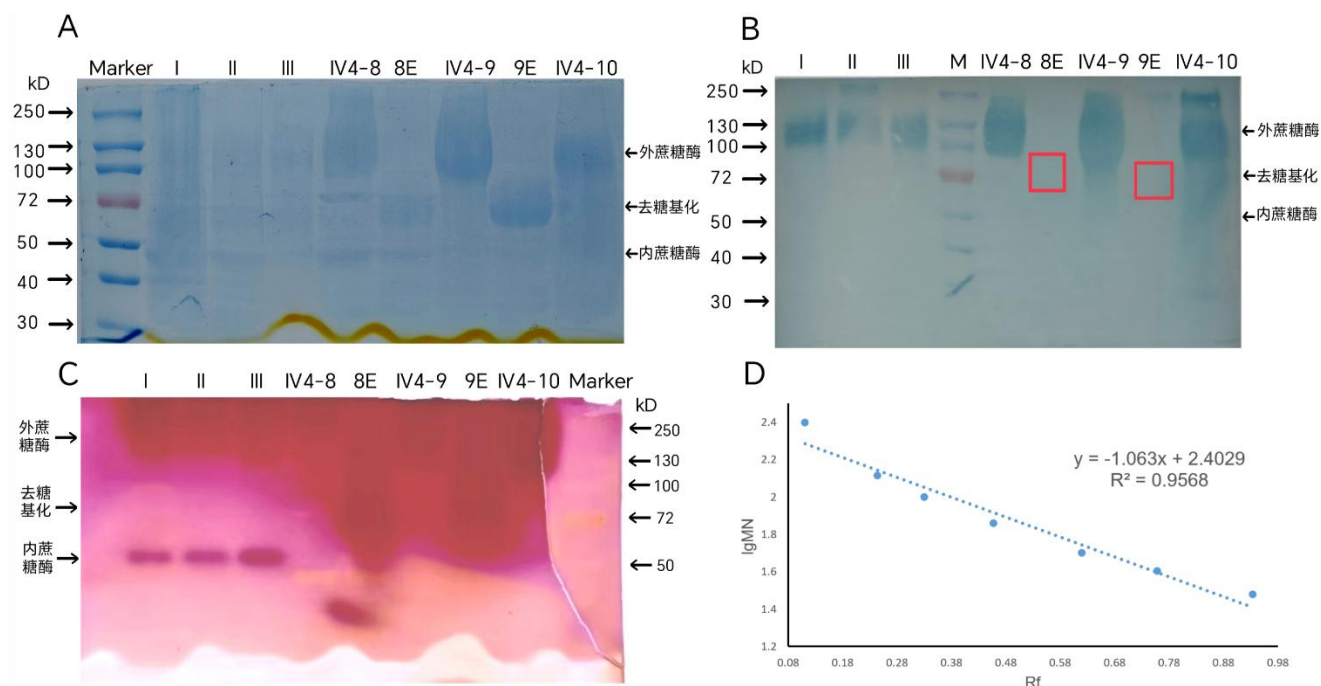


图4 SDS-PAGE电泳、蛋白质免疫印迹和活性电泳结果图谱

(A) 各蔗糖酶样品溶液SDS-PAGE电泳后的图谱结果 (B) 蔗糖酶样品溶液Western-Blot图谱

(C) 蔗糖酶样品活性染色图谱 (D)基于SDS-PAGE的Marker分子量对数与相对迁移率的线性拟合图

图4B的Western-Blot通过特异性结合抗体并染色，可更加清晰观察到蔗糖酶的位置。图中红色区域IV-8E与IV-9E肉眼可观察到较浅的条带，应是酶切之后的去糖基化蔗糖酶。

图4C为活性染色结果，上部分条带位置呈现深红色证明了内蔗糖酶、去糖基化后的蔗糖酶和外蔗糖酶均有活性。且可以观察到样品I、II、III在50~72 kD的位置之间明显存在一条带，纯化的样品IV及酶切样品IV均为观察到该条带。根据考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE结果可根据条带推算出蔗糖酶的分子量大小，蔗糖酶的分子量约为125 kD，去糖基化的蔗糖酶分子量约为72 kD。

3.2 酵母蔗糖酶的理化性质测定结果

3.2.1 影响蔗糖酶酶促反应速度的四个主要因素的主次序列及优化参数

通常情况下，影响酶促反应速度的关键因素主要有底物浓度、酶浓度、温度、pH和抑制剂与激活剂等，本实验则对前四个因素进行分析。每个因素设置了3个水平，设计了正交实验高效地对影响因素进行分析（附录-表5-1）。根据正交实验结果（附录-表5-2），可以对每个因素的3水平结果作出折线图如下图5

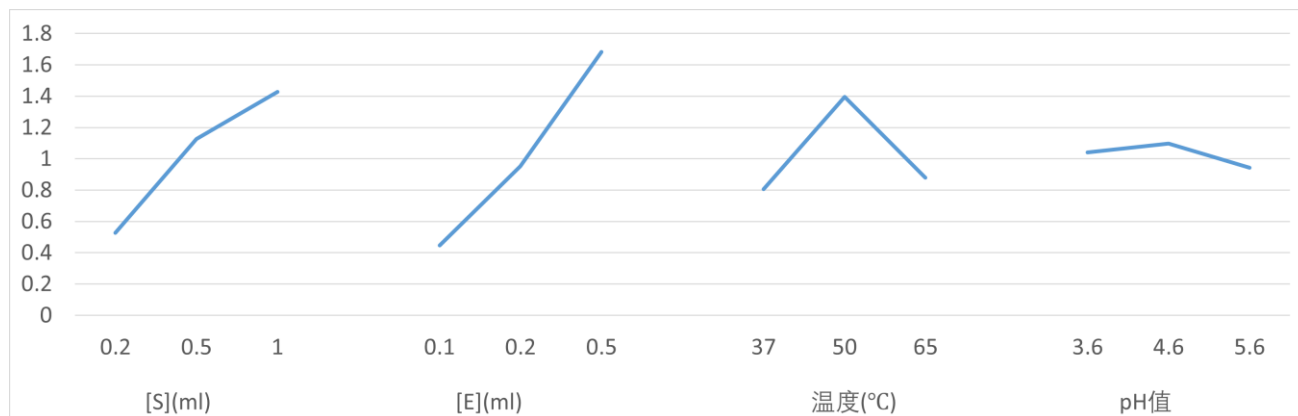


图5 四个主要因素对应的正交实验结果

根据折线图可知，[E]的极差最大，pH极差最小，依次可知四个主要因素对酶促反应速度的影响为：酶浓度>底物浓度>温度>pH。同时由温度和pH曲线对应的最大值拐点可知本实验中蔗糖酶最适的温度为50℃，最适pH为4.6。

3.2.2 蔗糖酶酶促反应 K_m 值与 V_{max}

根据葡萄糖浓度-吸光度测量数据(附录-表6)可以绘制出标准曲线图(附录-图5)。经过预实验后将样品IV-9稀释500倍和样品IV-9E稀释300倍并确定加样量,测定吸光度后根据标准曲线得到反应速率,根据蔗糖含量得到底物浓度,再线性拟合可以得到两个样品中蔗糖酶的双倒数拟合曲线,最终得到如下结果。

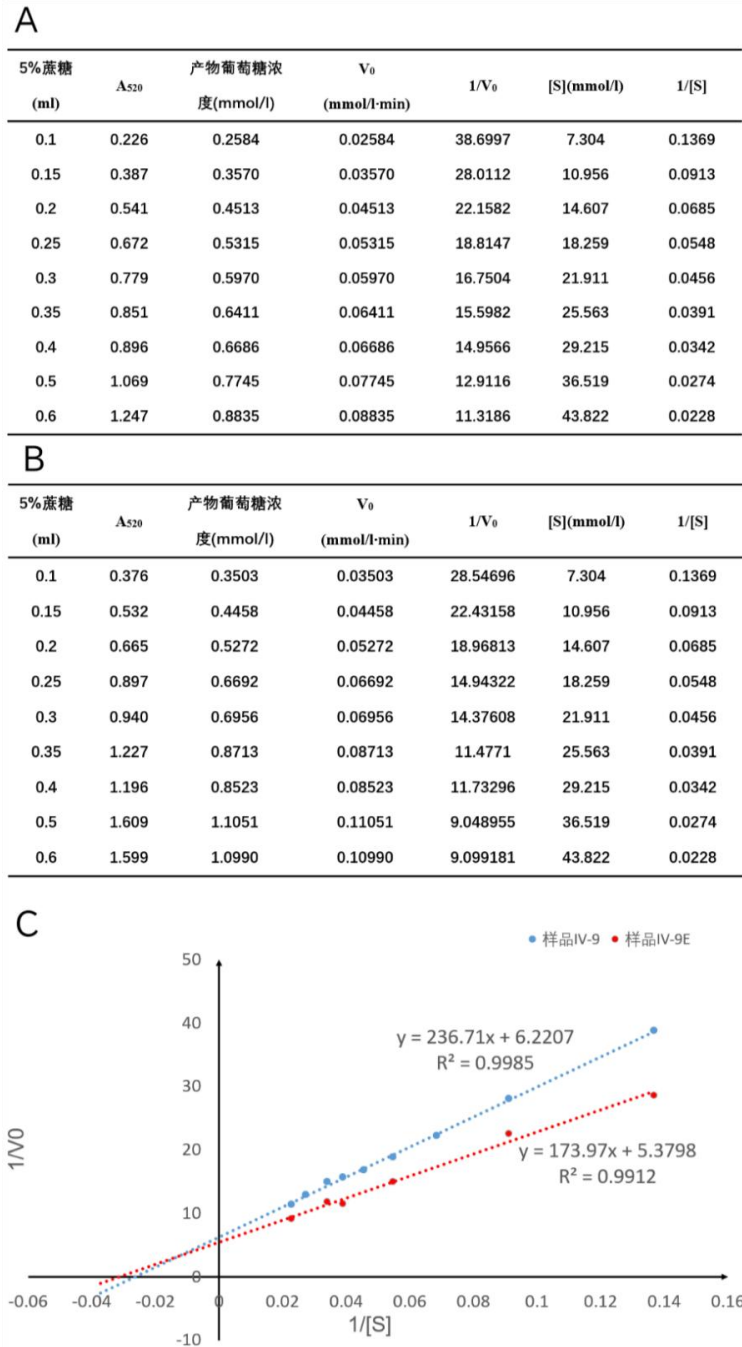


图6 蔗糖酶酶促反应 K_m 与 V_{max} 相关图表

(A) 不同底物浓度下样品IV-9蔗糖酶的动力学数据

(B) 样品IV-9E蔗糖酶的动力学数据

(C) 样品IV-9与IV-9E的 $1/V_0 - 1/[S]$ 线性图

根据绘制所得的双倒数曲线图,可根据米氏方程计算得到两个样品中酶的米氏常数 K_m 。蔗糖酶的 $K_m = 38.05 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\max} = 0.1608 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$, 而去糖基化后的蔗糖酶为 $K_m = 32.34 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\max} = 0.1859 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ 。可见去糖基化以后使得蔗糖酶与底物的亲和能力更强。但由于此次实验蔗糖酶与去糖基化蔗糖酶加样量与稀释倍数不一致, V_{\max} 的大小无法准确反映两者酶活性大小, 仅 K_m 可反应两者对底物的亲和力大小。

3.2.3 糖链结构对蔗糖酶活性的影响

根据去糖基化和糖基化的蔗糖酶的酶促反应动力学双倒数分析,去糖基化的蔗糖酶对底物的亲和力更强,同时对两者的酶活性分析比较可得表2。根据两者的酶活力可知,相同条件下,糖基化的蔗糖酶活力明显大于去糖基化的蔗糖酶活力,表明糖基化的糖链影响了蔗糖酶的结构稳定和酶活性。

表2 去糖基化和糖基化蔗糖酶活性比较

5%蔗糖 (ml)	糖基化蔗糖酶		去糖基化蔗糖酶	
	葡萄糖含量 (mg)	酶活力(U/ml)	葡萄糖含量 (mg)	酶活力(U/ml)
0.1	0.093121	310402.9	0.126211	189315.8
0.15	0.128637	428790.3	0.160624	240935.6
0.2	0.162609	542030.5	0.189963	284944.9
0.25	0.191507	638358.1	0.241142	361712.9
0.3	0.215111	717037.9	0.250628	375941.4
0.35	0.230994	769981.4	0.313939	470908.7
0.4	0.240921	803071	0.307101	460650.9
0.5	0.279085	930282.3	0.398207	597311.1
0.6	0.318351	1061170	0.396001	594002.2

3.2.4 分子量 M_r 测定结果

根据考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE结果可根据条带推算出蔗糖酶的分子量大小。如图4D所拟合出来的线性曲线可近似估算出蔗糖酶和Endo-H酶切之后的去糖基化蔗糖酶

的分子量，根据图4A中两者的相对位置计算出相对迁移率，代入可推测出蔗糖酶的分子量约为125 kD，去糖基化的蔗糖酶分子量约为72 kD。

3.3金属离子和EDTA影响探究结果（自主探究实验）

3.3.1 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 EDTA 对蔗糖酶的活性影响

根据系列离子浓度梯度下的吸光度测定，吸光度随着离子浓度增加逐渐下降，可初步判定随着 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度增加，酶活性逐渐下降（附录-表 7、附录-表 8）。而酶活力随着 Ca^{2+} 浓度增加而波动变化，且多次重复实验依旧呈现波动状态（附录-图 7）。随着 EDTA 浓度增加，蔗糖酶酶活力先减小后到一定程度而几乎保持不变。根据离子溶液加样和酶活性测定可绘制图 7 如下。

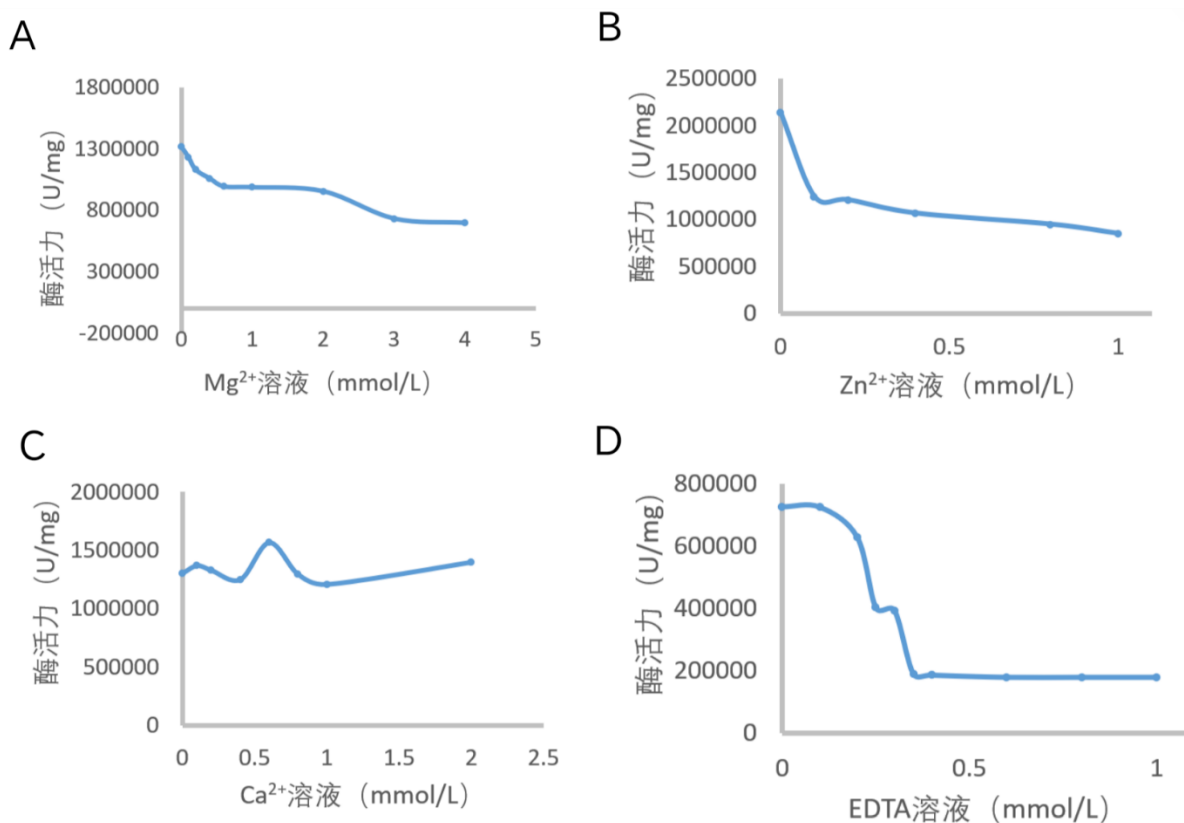


图7 金属离子与EDTA对蔗糖酶活力影响图

(A) Mg^{2+} 用量对蔗糖酶活性影响曲线图

(B) Zn^{2+} 用量对蔗糖酶活性影响曲线图

(C) Ca^{2+} 用量对蔗糖酶活性影响曲线图

(D) EDTA用量对蔗糖酶活性影响曲线图

可见， Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 对蔗糖酶均呈现抑制作用，且的抑制效果 Zn^{2+} 比 Mg^{2+} 更加强烈，在同等 0.20ml 离子用量下， Zn^{2+} 对蔗糖酶活力的抑制率约 60.2%； Mg^{2+} 对蔗糖酶活力的抑制率约 25.0%。而 Ca^{2+} 呈现不规律性变化，而非绝对抑制效果；EDTA 呈现始终抑

制，且过量后酶活力不再下降，最合适的 EDTA 用量约为 0.02ml，此时可整合酶溶液中存在的离子影响且不对酶活性造成较大影响。

3.3.2 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 EDTA 对蔗糖酶的抑制效果 V_{max} 和 K_m 测定

已知 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 EDTA 对酵母蔗糖酶的抑制作用，而 Ca^{2+} 未呈现明显规律性抑制作用，因此对不同蔗糖浓度和加入 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 EDTA 情况下进行动力学测定。根据初步对活性影响的结果，选取加入离子用量为 0.02ml、0.10ml、0.20ml 三组对两种离子的动力学测定，而选取 0.05ml 和 0.06ml 两组对 EDTA 的动力学测定。考虑到实验过程中不同人员操作、误差和吸光测定等因素，根据结果选取数据符合预实验的用量进行双倒数作图。

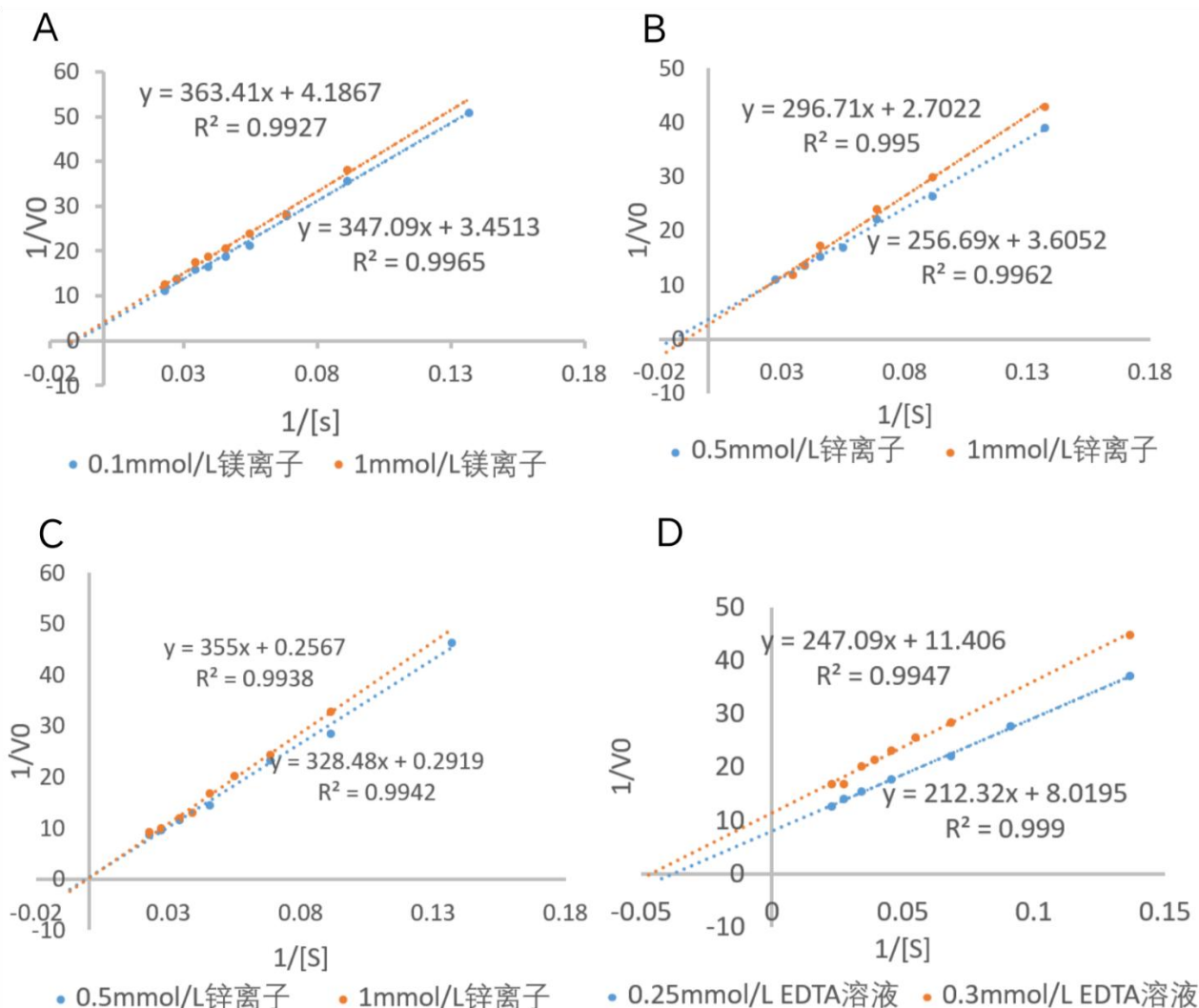


图7 金属离子与EDTA对蔗糖酶动力学测定

- (A) 不同 Mg^{2+} 浓度对蔗糖酶动力学测定曲线图 (B) 不同 Zn^{2+} 浓度对蔗糖酶动力学测定曲线图
(C) 不同 Zn^{2+} 浓度对蔗糖酶动力学测定曲线图（重复实验组）

(D) 不同EDTA浓度对蔗糖酶动力学测定曲线图

由双倒数曲线作图可知, Mg^{2+} 对蔗糖酶的抑制效果近乎呈现非竞争性抑制, 在加入 Mg^{2+} 溶液 0.1mmol/L 下的 $K_m=100.57\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max}=0.290\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$; 在加入 Mg^{2+} 溶液 1mmol/L 下的 $K_m=86.80\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max}=0.239\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$ 。 Zn^{2+} 对蔗糖酶也近似为竞争性抑制, 重复实验可能是实验所用的 DNS 试剂存在一定问题, 因此仅对第一次实验结果分析。在加入 Zn^{2+} 溶液 0.5mmol/L 下的 $K_m=71.20\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max}=0.277\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$; 在加入 Zn^{2+} 溶液 1mmol/L 下的 $K_m=109.80\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max}=0.370\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$ 。在加入 EDTA 溶液 0.25mmol/L 下的 $K_m=26.48\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max}=0.125\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$; 在加入 EDTA 溶液 0.3mmol/L 下的 $K_m=21.66\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max}=0.088\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$ 。

4 讨论

4.1 纯化流程讨论

本次实验在初步提取蔗糖酶时选取的是固体研磨法, 该方法能够有效地破坏细胞壁, 释放出酵母细胞的蔗糖酶, 考虑课堂时间成本该方法为较好的选择, 但可能存在研磨不充分, 蛋白质被水解酶降解等情况, 因此在有条件的情况下可以尝试离心法、机械破碎法等其他方法来提取蔗糖酶。

离子交换层析是本次分析纯化蔗糖酶最核心的一步, 其通过吸附、洗脱能够有效地将蔗糖酶与样品中其他杂质分离开。在本次实验的洗脱过程中, 可以观察到存在两个紫外吸收峰, 并且吸收峰的高达 2000mAU , 吸收峰的偏高可能是洗脱速度过快造成大量蔗糖酶被洗脱下来, 也可能是前期分离时未除去的核酸等杂质的干扰。具体原因则应当进一步探究测量来确定。而第二个紫外吸收峰的存在则应当是细胞内其他杂蛋白的洗脱, 通过DNS检验也验证了该结果。那么对于可能存在的与蔗糖酶电性相近的杂蛋白可以选取更多的纯化方法, 如凝胶过滤等方式。

4.2 实验结果讨论

4.2.1 蛋白含量、酶活力和蛋白回收率等讨论

根据蔗糖酶各步骤纯化样品分离效果评价指标(表1), 可绘制总蛋白含量和比活

力比较图(图 8),纯化过程中总蛋白含量逐渐下降且每步纯化总蛋白含量均下降明显,且最后得到的样品 IV 总蛋白含量最低,可见在纯化过程中除去了样品中含有的大量杂蛋白。而根据比活力变化可见样品 I 到样品 III 比活力略有上升,样品 IV 的比活力显著高于前三组样品,由此可见经历阴离子交换层析样品除去了绝大多数杂质,纯化效果好。

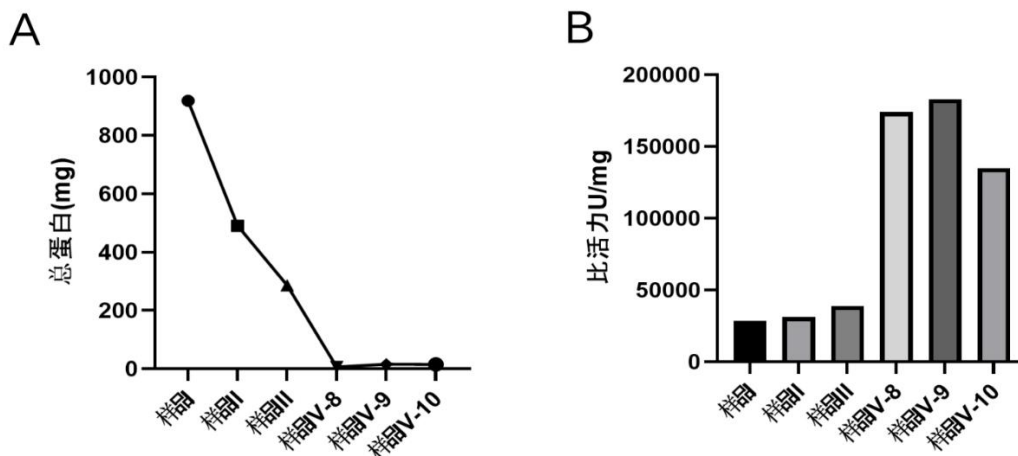


图 8 纯化过程结果评价图

(A) 纯化过程中总蛋白含量变化折线图

(B) 纯化过程中比活力变化柱状图

但可以观察到样品的酶活性回收率随着纯化而逐渐降低,总蛋白回收率也快速下降,其中与除去的大量杂蛋白有一定关系,也可能由于蔗糖酶回收不充分,存在优化空间。

4.2.2 电泳结果讨论

本次实验电泳均很好地将蔗糖酶与去糖基化蔗糖酶分离开,由考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 可以明显观察到蔗糖酶的浓缩,随纯化过程条带颜色加深,去糖基化的蔗糖酶也有明显条带,同时样品 IV-9 无论是原液还是去糖基化处理后的条带都比样品 IV-8 更深,由此也验证了比活力和蛋白含量比较结果,说明之前的结果分析是准确无误的。

而活性染色结果也可以清晰观察到外蔗糖酶、去糖基化蔗糖酶和内蔗糖酶条带,但染色时间过长导致颜色过深。Western Blot 结果蔗糖酶条带随纯化而加深效果也明显可观察,但去糖基化蔗糖酶条带观察不明显,可能与转膜或者孵化抗体时的操作有关。

4.3 基础实验问题反思与改进

整体而言,蔗糖酶基础实验结果均符合实验预期,但仍存在一些能够改进优化的地方,此处对这些存在的能改进的方面进行讨论。

首先在进行阴离子层析时出现峰值过高的情况,推测可能时是洗脱速度过快导致大量蛋白被洗脱下来,可以尝试调整洗脱速度观察峰值是否存在变化。虽然并未对本次实

验产生影响，但该操作在进行其他蛋白纯化洗脱时速度过快可能会导致部分电性相似的蛋白共同洗脱，因此对此操作的改进是有必要的。

其次在电泳过程中对电泳结束的条件判断产生了失误，稍微提前结束了电泳，实验蔗糖酶和去糖基化蔗糖酶条带已经跑出未受影响，但该操作仍值得注意，到底端约一厘米左右时再结束电泳。接着在剥胶时失误剥坏了胶，导致Western Blot转膜时偏下部分的条带歪斜，并且稍有影响下部分转膜的质量。Western Blot去糖基化蔗糖酶与外蔗糖酶条带不明显可能与孵抗体或含量相关，整体实验操作需要进一步熟练。而活性染色时间过长，导致整体颜色较深，条带间观察区分较为模糊，因此操作间要注意时间的把握。

最后测定去糖基化蔗糖酶的 K_m 和 V_{max} 时初始数据的线性拟合效果不佳，需要舍去3个数据点来优化线性拟合结果，这与反应时间和溶液的加样密切相关，虽然是难以避免的实验误差，但可以设置多次重复实验来优化结果。

4.4 自主实验讨论

4.4.1 自主实验设计讨论

本次自主实验基于蔗糖酶基础实验的相关研究，查阅相关文献表明： Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 为蔗糖酶的竞争性抑制剂，且浓度越高抑制效果越强； Mg^{2+} 在不同文献中对不同来源的蔗糖酶有竞争性抑制效果，也有呈现低浓度促进，高浓度抑制效果；EDTA呈现的抑制作用，且逐渐下降后保持不变。

因此选取了 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和EDTA作为变量，探究其对于本实验分离纯化得到的蔗糖酶是抑制效果、激活效果，还是浓度相关的抑制或激活作用。考虑到基础实验已有过DNS法显色相关练习，因此选取增加离子和EDTA条件下对蔗糖酶活性的测定，以及蔗糖酶动力学参数 K_m 和 V_{max} 测定。

4.4.2 金属离子与 EDTA 对蔗糖酶的活性影响讨论

根据不同金属离子与EDTA对蔗糖酶活力影响图（图7）可知，随着金属离子浓度增大， Zn^{2+} 与 Mg^{2+} 作用下蔗糖酶始终呈现抑制状态，且抑制作用随浓度增大而增强， Zn^{2+} 抑制作用比 Mg^{2+} 更强。EDTA呈现始终抑制，且过量后酶活力不再下降。而 Ca^{2+} 对蔗糖酶的作用并非简单的抑制或者激活作用，本自主探究重复3次 Ca^{2+} 浓度影响，结果始终为波动状态，整合重复实验结果得到图9，可见虽然 Ca^{2+} 对蔗糖酶活力始终呈现波动状态，其

大致规律表现为在浓度为0~1 mmol/L时先上升后下降，再上升再下降。但由于缺乏更多 Ca^{2+} 浓度实验数据，无法得出后续酶活力变化规律，因此存在一定的深入探究空间。

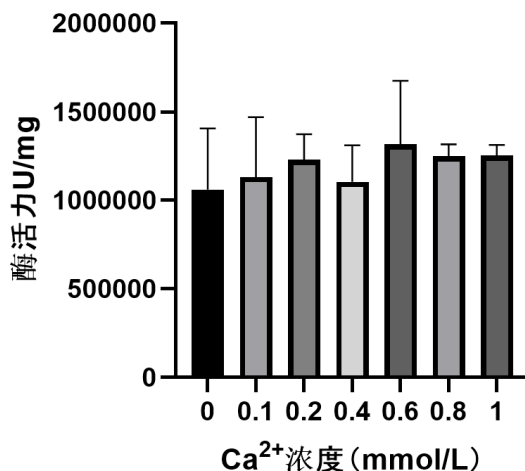


图9 多组 Ca^{2+} 浓度对蔗糖酶活力影响结果整合图

4.4.3 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 与 EDTA 对蔗糖酶的动力学探究讨论

初步探究金属离子与 EDTA 对蔗糖酶活力影响之后，选取始终呈现抑制效果的 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 与 EDTA 作用下来进行动力学分析。实验结果部分计算得到了不同浓度作用下的 K_m 与 V_{max} 值，与基础实验的 K_m 值比较如下（图 10）。可见加入 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 后蔗糖酶的 K_m 和 V_{max} 均上升，表明金属离子作用下蔗糖酶与底物的结合能力减弱。

但 V_{max} 呈现上升与理论的抑制剂作用下结论存在出入，考虑到双倒数作图会导致的放大误差，以及实验时重复 Zn^{2+} 动力学作用实验组（图 7-C）可能存在的 DNS 试剂问题，因此 V_{max} 结果无法反应实际酶的最大催化速率变化。DNS 法来测量酶动力学参数此处仅对 K_m 比较，这也是实验方法误差可能带来的结果。

而 EDTA 作用下结果较为理想， K_m 与 V_{max} 均呈现下降，EDTA 作用下蔗糖酶与底物的结合能力增强，最大反应速率下降。这与前期文献中的结果一致，但仅根据本实验中的 EDTA 两条双倒数图，在误差存在且被双倒数处理放大的情况下难以判断其为何种抑制类型，观察到 K_m 值相近而 V_{max} 下降，初步推测 EDTA 可能为非竞争性抑制剂，具体判断则需后续更多对照试验组验证。

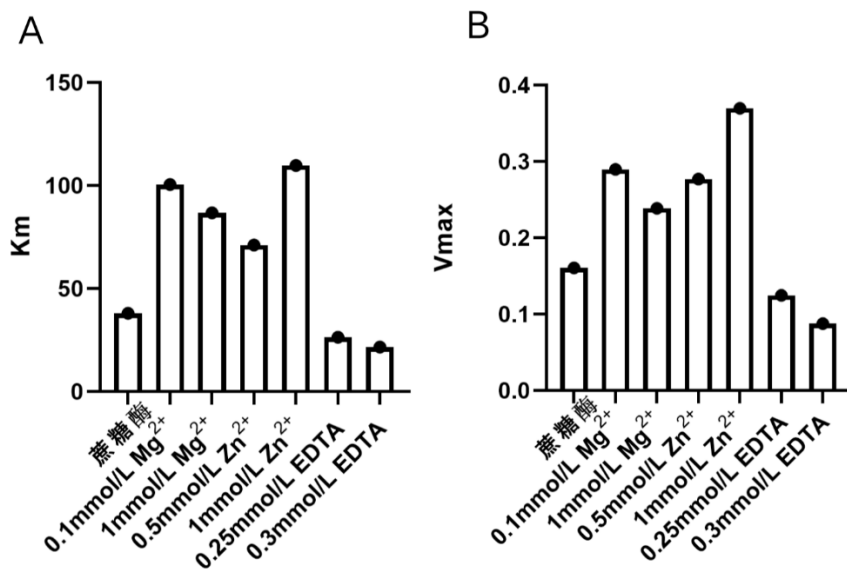


图 10 不同作用条件下蔗糖酶的 Km 和 Vmax 比较图

(A) 不同作用下蔗糖酶 Km 比较图

(B) 不同作用下蔗糖酶 Vmax 比较图

4.4.4 自主实验总结与反思

本次自主实验总体结果上符合相关文献结果和预期，实验得到 Ca^{2+} 对本实验提取的蔗糖酶呈现波动性的酶活力影响而非竞争性抑制效果，且经过多次重复实验结果具有复现性。而 Mg^{2+} 经过验证始终为抑制效果，而非低浓度激活高浓度抑制。

本自主实验核心是借助 DNS 法对还原糖的检测，进而来测定酶活力和反应速率。该方法简便、实操性强，但也成为测定动力学参数时的误差主要来源。吸光度和标曲测量时的微小误差经过倒数处理会被放大，放大的误差进而对拟合曲线的线性程度产生影响。因此要更加准确的探究动力学参数的变化应选取更加准确的方法。动力学测定结果均只选取了符合预实验的两组进行处理，无论是对标准曲线还是酶活性测定，均出现过整体偏差的现象，这与反应时间的控制相关。因而在多次重复实验的同时，还要注意对反应时间的准确控制。

整体而言，考虑方法自身的局限性与误差，自主探究实验得到的抑制效果和 Km 与 Vmax 曲线符合实验预期，实验结果也较为理想。而对于具体离子的影响和动力学精准测量则需要进一步改进方法探究。

5 结论与展望

本实验旨在从市面上的酵母粉中提取蔗糖酶，通过多步纯化分离，研究其最适的反

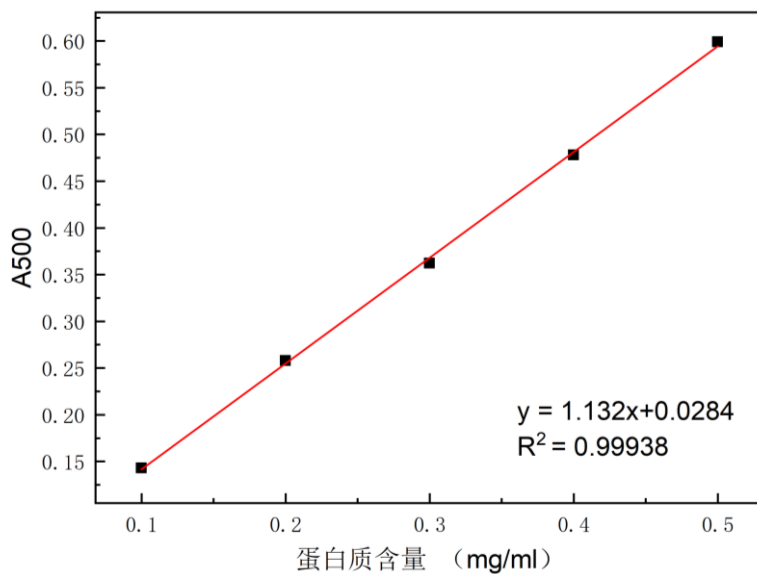
应条件以及动力学参数和糖基化修饰。再而探究抑制剂对其活性和动力学相关影响。通过一些列实验，成功得到了高纯度的蔗糖酶。对蔗糖酶反应条件的正交实验设计，得到四个主要因素对酶促反应速度的影响为：酶浓度>底物浓度>温度>pH，本实验蔗糖酶最适的温度为 50℃，最适 pH 为 4.6。对蔗糖酶去糖基化处理后，测定得到蔗糖酶的分子量约为 125 kD，去糖基化的蔗糖酶分子量约为 72 kD，蔗糖酶的 $K_m = 38.05 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $V_{\max} = 0.1608 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ ，而去糖基化后的蔗糖酶为 $K_m = 32.34 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $V_{\max} = 0.1859 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ 。对多个离子和 EDTA 的酶活性和动力学结果表现为 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 EDTA 的抑制效果， Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 作用下 K_m 增大，EDTA 作用下 K_m 减小。

总体而言对于蔗糖酶基础研究实验结果均较符合已知背景和实验预期，其中存在部分实验操作失误、数据拟合略有偏差等问题则需熟悉实验操作、多次重复实验和对离群值的舍去来分析。对蔗糖酶的理化性质和酶的相关反应条件、动力学分析结果也为市面上蔗糖酶的选取和食品加工相关领域的研究提供数据支持。

6 附录：实验表格与原始数据记录

附录-表1 Folin-酚法测定蛋白浓度的标准曲线原始数据

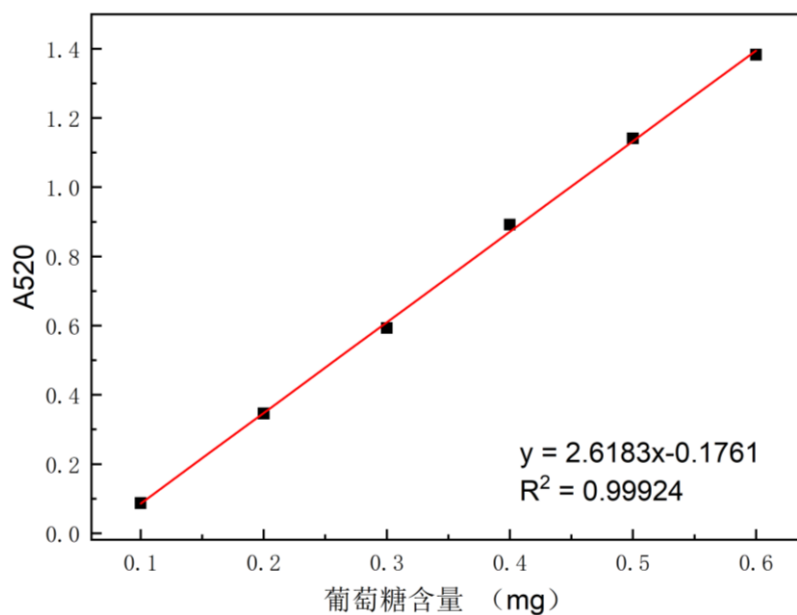
试管号	1	2	3	4	5	6
标准蛋白质含量 (mg/ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
0.5g/L标准蛋白质溶液 (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
去离子水 (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Folin - 甲试剂 (ml)	5					
	涡旋仪混匀，室温放置 (25 °C水浴) 10 min					
Folin - 乙试剂 (ml)	0.5					
	即刻涡旋仪混匀，室温放置 (25 °C水浴) 15min					
A_{500}	较零	0.143	0.258	0.362	0.478	0.599



附录-图1 蛋白质含量-吸光度标准曲线

附录-表2 DNS法测定葡萄糖浓度的标准曲线原始数据

编号	0	1	2	3	4	5	6
葡萄糖含量 (mg)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
1g/L葡萄糖标准溶液 (ml)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
去离子水 (ml)	2.0	1.9	1.8	1.7	1.6	1.5	1.4
DNS试剂 (ml)	0.5						
	涡旋仪混匀, >95°C水浴加热5min, 冷水冷却至室温						
去离子水 (ml)	立即加水5ml, 涡旋仪混匀						
A ₅₂₀	较零	0.087	0.346	0.593	0.892	1.141	1.383



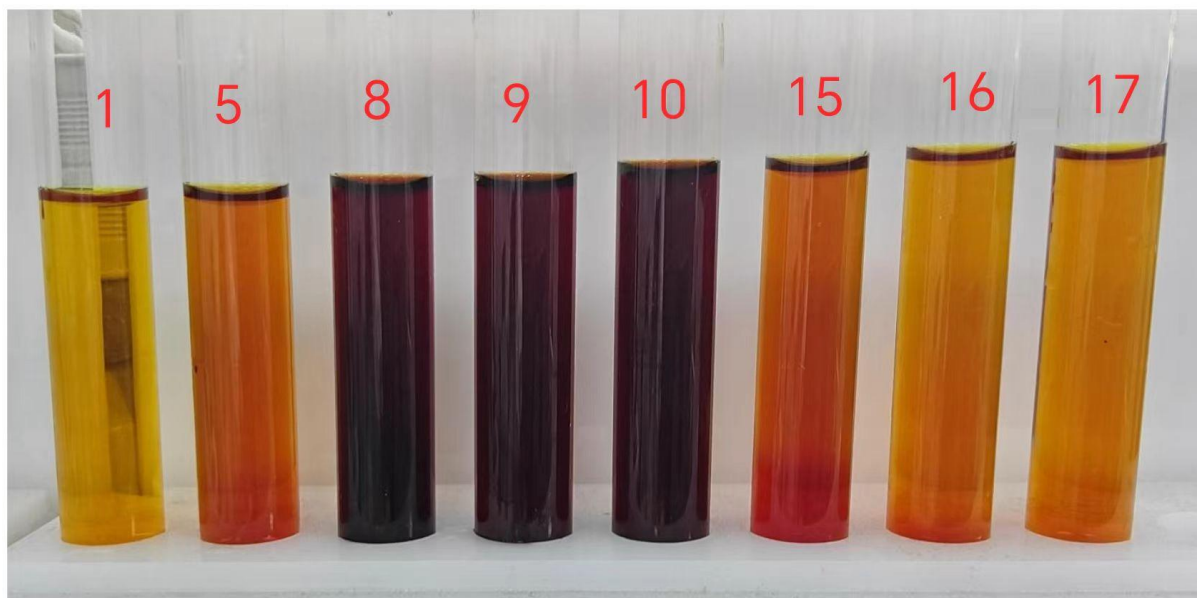
附录-图2 葡萄糖含量-吸光度标准曲线

附录-表3 Folin-酚法测定各蔗糖酶样本的蛋白含量

样品	空白	I (10×稀释)			II (5×稀释)			III (5×稀释)			IV(原液)		
编号	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	8号	9号	10号
水(ml)	1.0	0.95	0.9	0.8	0.95	0.9	0.8	0.95	0.9	0.8	0.95	0.95	0.95
稀释蔗糖酶液(ml)	<u>0.0</u>	<u>0.05</u>	<u>0.1</u>	<u>0.2</u>	<u>0.05</u>	<u>0.1</u>	<u>0.2</u>	<u>0.05</u>	<u>0.1</u>	<u>0.2</u>	<u>0.05</u>	<u>0.05</u>	<u>0.05</u>
Folin-甲(ml)	5.0												
	涡旋仪混匀, 室温放置 (25 °C水浴) 10min												
Folin-乙(ml)	0.5ml, 加一管混一管												
	即刻涡旋仪混匀, 室温放置 (25 °C水浴) 15min												
A ₅₀₀	较零	0.186	0.297	0.547	0.201	0.379	0.657	0.191	0.342	0.646	0.210	0.481	0.469
蛋白浓度mg/ml	0	0.139	0.237	0.458	0.152	0.310	0.555	0.144	0.277	0.554	0.160	0.400	0.389
原样品蛋白含量mg/ml	0	27.84	23.73	22.91	15.25	15.48	13.88	14.36	13.85	13.64	3.208	7.996	7.784
平均值	0	24.83			14.87			13.95			6.330		

附录-表4 测定各蔗糖酶酶活力

样品	空白	I (10000×稀释)			II (5000×稀释)			III (5000×稀释)			IV (2000×稀释)		
编号	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	8号管	9号管	10号管
0.1M 乙酸缓冲液 (ml)	0.5												
去离子水 (ml)	1	0.95	0.9	0.8	0.95	0.9	0.8	0.95	0.9	0.8	0.95	0.95	0.95
稀释蔗糖酶液 (ml)	0	0.05	0.1	0.2	0.05	0.1	0.2	0.05	0.1	0.2	0.05	0.05	0.05
5%蔗糖溶液 (ml)	0.5												
	涡旋仪混匀, 50°C水浴保温10min, 冷水冷却												
DNS试剂 (ml)	0.5												
	涡旋仪混匀, >95°C水浴保温5min, 冷水冷却												
去离子水 (ml)	立即加水5ml, 涡旋仪混匀												
A ₅₂₀	较零	0.089	0.159	0.317	0.146	0.288	0.532	0.189	0.367	0.688	0.555	1.739	1.199
还原糖含量 mg	/	0.101	0.128	0.188	0.123	0.177	0.27	0.139	0.207	0.330	0.279	0.731	0.525
酶活力 (U/ml)	/	10124 89	63991 9	47082 0.8	61509 3.8	44313 1	33805 3.3	69720 8.1	51856 1.7	41252 9.1	55845 4	14628 58	10503 76
平均酶活力 (U/ml)	/	707742.9			465426.0			542766.3			/		



附录-图3 DNS法处理第一个洗脱峰周围收集液

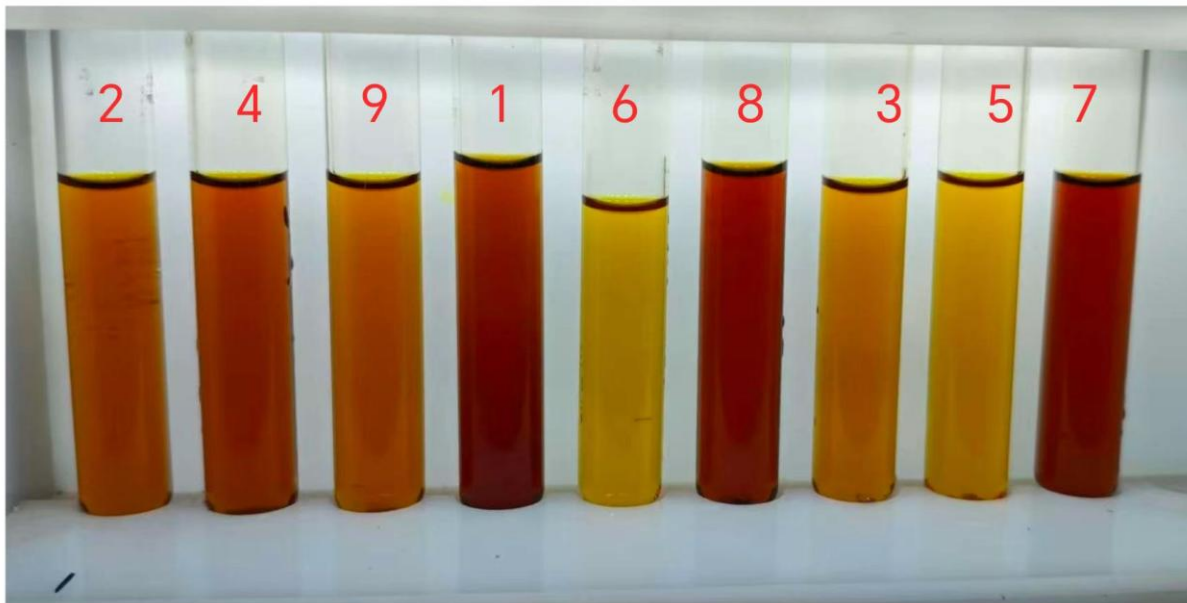
附录-表5 正交实验相关表

附录-表5-1 正交实验原始数据记录

实验号 试剂 (ml)	2	4	9	1	6	8	3	5	7	对照
5%蔗糖溶液[S]	0.5	0.2	1.0	0.5	0.2	1.0	0.5	0.2	1.0	0.5
0.1M 乙酸缓冲溶液[pH]	pH5.6 0.5	pH4.6 0.5	pH3.6 0.5	pH3.6 0.5	pH5.6 0.5	pH4.6 0.5	pH4.6 0.5	pH3.6 0.5	pH5.6 0.5	pH4.6 0.5
去离子水	0.8	0.8	0.4	0.5	1.2	0.3	0.9	1.1	0	1.0
	混匀后37°C 预热			混匀后50°C 预热			混匀后65°C 预热			
稀释蔗糖酶样品IV[E]	0.2	0.5	0.1	0.5	0.1	0.2	0.1	0.2	0.5	/
样品体系总体积	2 ml。混匀。									
温度[T]	37°C反应10min			50°C反应10min			65°C反应10min			/
DNS试剂	0.5ml。混匀。									
	>95°C保温5min, 冷水冷却。									
去离子水	5ml。在涡旋仪上充分混匀。									
A ₅₂₀	0.747	1.032	0.639	2.165	0.231	1.792	0.469	0.318	1.852	校零

附录-表5-2 正交实验结果分析

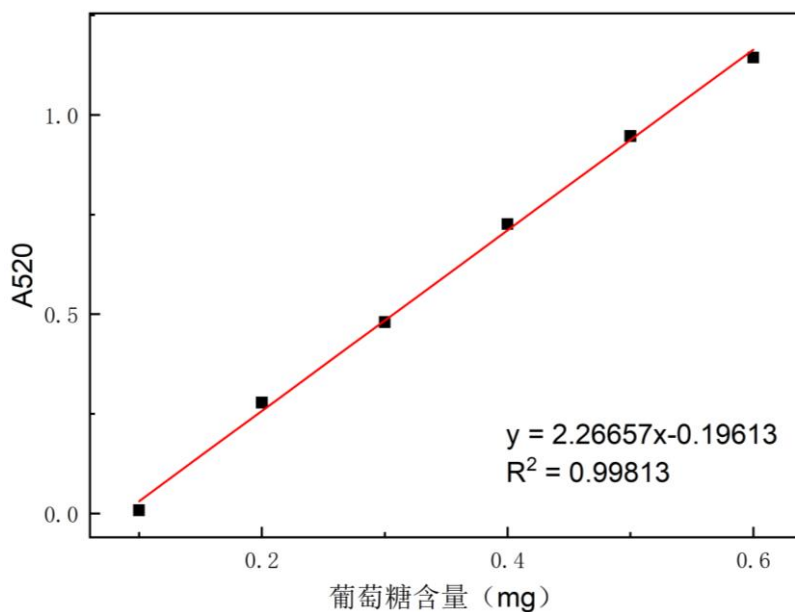
实验号	水平	因素	1 [S](ml)	2 [E](ml)	3 温度(°C)	4 pH值	试验结果 A ₅₂₀
1	I	0.5	I 0.5	I 0.5	I 50	I 3.6	2.165
2	I	0.5	I 0.5	II 0.2	II 37	II 5.6	0.747
3	I	0.5	I 0.5	III 0.1	III 65	III 4.6	0.469
4	II	0.2	II 0.2	I 0.5	II 37	III 4.6	1.032
5	II	0.2	II 0.2	II 0.2	III 65	I 3.6	0.318
6	II	0.2	II 0.2	III 0.1	I 50	II 5.6	0.231
7	III	1.0	III 1.0	I 0.5	III 65	II 5.6	1.852
8	III	1.0	III 1.0	II 0.2	I 50	III 4.6	1.792
9	III	1.0	III 1.0	III 0.1	II 37	I 3.6	0.639
Ki 值 I (一水平试验结果A ₅₂₀ 总和)			3.381	5.049	4.188	3.122	/
Ki 值 II (二水平试验结果A ₅₂₀ 总和)			1.581	2.857	2.418	2.830	/
Ki 值 III (三水平试验结果A ₅₂₀ 总和)			4.283	1.339	2.639	3.293	/
Ki 值 = Ki 值 I /3			1.127	1.683	1.396	1.041	/
Ki 值 = Ki 值 II /3			0.527	0.952	0.806	0.943	/
Ki 值 = Ki 值 III /3			1.428	0.446	0.880	1.098	/
极差R = Max(Ki) - Min(Ki)			0.901	1.237	0.590	0.155	/



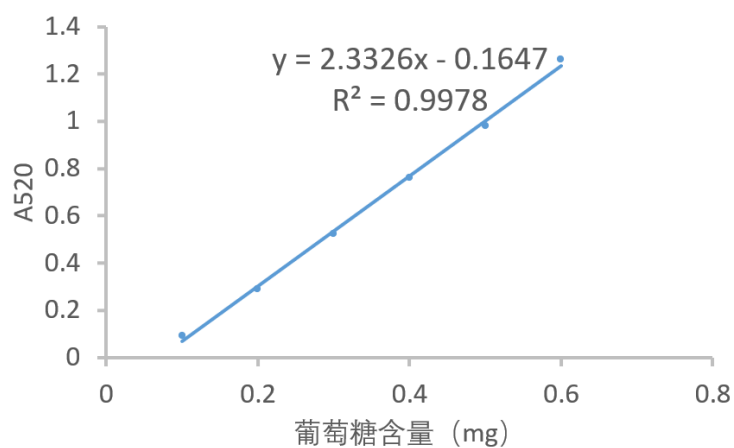
附录-图4 正交实验比色图

附录-表6 葡萄糖含量-吸光度数据

编号	0	1	2	3	4	5	6
葡萄糖含量 (mg)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
1g/L葡萄糖标准溶液 (ml)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
去离子水 (ml)	2.0	1.9	1.8	1.7	1.6	1.5	1.4
DNS试剂 (ml)	0.5						
	涡旋仪混匀, >95°C水浴保温5min, 冷水冷却						
去离子水 (ml)	立即加水5.0ml, 涡旋仪混匀						
A_{520}	较零	0.080	0.278	0.480	0.726	0.947	1.144



附录-图5 葡萄糖含量-吸光度标准曲线图



附录-图6 探究离子浓度影响时标准曲线

附录-表7 不同Zn²⁺离子浓度下蔗糖酶活力

10mmol/L Zn ²⁺ 溶液(ml)	A ₅₂₀	葡萄糖含量(mg)	酶活力(U/ml)
0	2.333	0.53539	2141559
0.02	1.289	0.311605	1246420
0.04	1.247	0.302602	1210409
0.08	1.081	0.26702	1068079
0.12	2.041	0.472799	1891194

0.16	0.943	0.237439	949755.6
0.2	0.828	0.212788	851153.2

附录-表8 不同Mg²⁺离子浓度下蔗糖酶活力

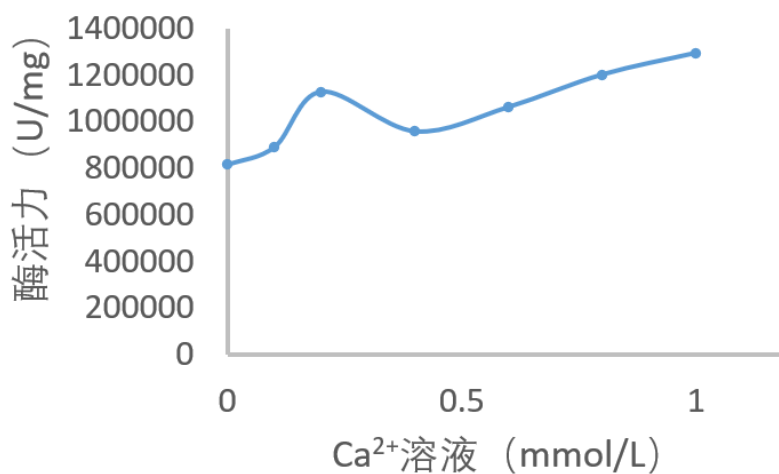
10mmol/L Mg ²⁺ 溶液(ml)	A ₅₂₀	葡萄糖含量(mg)	酶活力(U/ml)
0	1.372	0.329396	1317586
0.02	1.271	0.307747	1230987
0.04	1.154	0.282667	1130670
0.08	1.071	0.264876	1059504
0.12	0.995	0.248585	994341.1
0.2	0.988	0.247085	988339.2
0.4	0.950	0.238939	955757.5
0.6	0.689	0.182993	731972.9
0.8	0.649	0.174419	697676.4

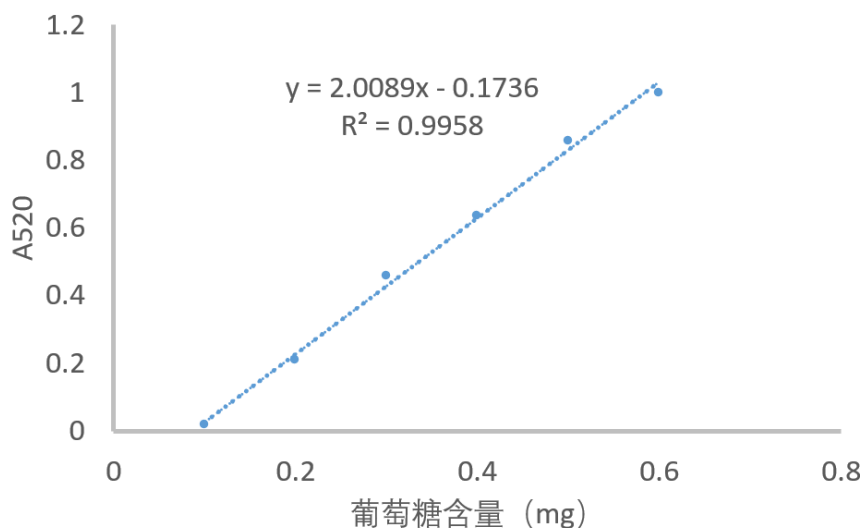
附录-表8 不同Ca²⁺离子浓度原始数据

IV-9 稀释2000倍							
空白	0.02	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2	空白
酶液	0.05ml						
0.1M乙酸	0.5ml						
去离子水	0.93	0.91	0.87	0.83	0.79	0.75	0.95
50°C水浴10min 冷水冷却							
DNS	0.5ml						
95°C水浴5min 冷水冷却							
5 ml水 混匀检测吸光度							
吸光度	1.091	0.907	0.991	0.967	1.244	1.112	0.858

附录-表9 不同EDTA浓度原始数据

IV-9 稀释2000倍							
空白	0.02	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2	空白
酶液	0.05ml						
0.1M乙酸	0.5ml						
去离子水	0.93	0.91	0.87	0.83	0.79	0.75	0.95
50°C水浴10min 冷水冷却							
DNS	0.5ml						
95°C水浴5min 冷水冷却							
5 ml水 混匀检测吸光度							
吸光度	0.683	0.571	0.053	0.045	0.464	0.045	0.684

附录-图7 重复实验下Ca²⁺浓度增加酶活性呈波动变化



附录-图8 探究EDTA溶液下酶动力学时标准曲线

参考文献

- [1] Gascón, S., Neumann, N. P., and Lampen, J. O. (1968) Comparative Study of the Properties of the Purified Internal and External Invertases from Yeast, *Journal of Biological Chemistry* 243, 1573-1577.
- [2] Sainz-Polo, M. A., Ramírez-Escudero, M., Lafraya, A., González, B., Marín-Navarro, J., Polaina, J., and Sanz-Aparicio, J. (2013) Three-dimensional Structure of Saccharomyces Invertase: ROLE OF A NON-CATALYTIC DOMAIN IN OLIGOMERIZATION AND SUBSTRATE SPECIFICITY, *Journal of Biological Chemistry* 288, 9755-9766.
- [3] 徐雯映,彭子强,朱晓明,等.EDTA 和金属离子对酵母蔗糖酶天然酶和修饰酶酶活力的影响及其作用机理研究[J].现代农业科技,2012,(10):41-44+46.
- [4] Nadeem H, Rashid MH, Siddique MH. Effect of Mg^{2+} and Al^{3+} Ions on Thermodynamic and Physicochemical Properties of *Aspergillus niger* Invertases. *Protein Pept Lett*. 2015;22(8):743-9. doi: 10.2174/0929866522666150529161657. PMID: 26021385.
- [5] Sirisatesuwon, C., Ninchan, B. & Sriroth, K. Effects of Inhibitors on Kinetic Properties of Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Sugar Tech* 22, 274–283 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00757-2>