

应用平板显色法测定单宁酶活力*

聂光军^{1,2} 刁金山¹ 刘会¹ 王丽¹ 郑之明^{1**}

(¹中国科学院离子束生物工程学重点实验室 合肥 230031)

(²安徽工程大学生物与化学工程学院 芜湖 241000)

摘要 为直观、批量、准确测定单宁酶的活力,以单宁酸为底物,溴甲酚绿为显色剂,采用平板显色法测定单宁酶的活力.对单宁酸浓度、溴甲酚绿浓度、琼脂浓度、酶加量以及反应时间的分析结果显示,平板组成为1%单宁酸、0.001%溴甲酚绿、3%琼脂,酶加量为30 μL ,40 $^{\circ}\text{C}$ 下反应24 h,透明圈清晰度最高,获得标准曲线的决定系数为98%,验证反应结果显示该方法准确、稳定.图7表1参11

关键词 单宁酶;溴甲酚绿;单宁酸;琼脂;平板显色法

CLC Q814

Determination of Tannase Activity by Color Plate Method*

NIE Guangjun^{1,2}, DIAO Jinshan¹, LIU Hui¹, WANG Li¹ & ZHENG Zhiming^{1**}

(¹Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

(²College of Biochemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China)

Abstract In order to make an audio-visual, batch and accurate assay of tannase activity, color plate method was applied with tannic acid and bromocresol green as substrate and chromogenic agent, respectively. The concentrations of tannic acid, bromocresol green and agar, addition of tannase and reaction time were studied and analyzed. The results showed that the 1% of tannic acid, 0.001% bromocresol green, 3% agar, 30 μL tannase addition and 24 hours at 40 $^{\circ}\text{C}$ for reaction were the optimum for the plate method. The corresponding adjustable *R* square of standard curve was 98%. Verification experiment was carried out and its result shows that this method is accurate and stable for assaying tannase. Fig 7, Tab 1, Ref 11

Keywords tannase; bromocresol green; tannic acid; agar; color plate method

CLC Q814

单宁酶(Tannase)又称单宁酸酰基水解酶,可降解单宁酸(Tannic acid, TA)中的酯键和缩酚键^[1].TA广泛存于植物叶子、水果、蔬菜等植物体内,能与蛋白、淀粉等生物大分子结合形成沉淀,降低可食用植物的营养价值.单宁酶应用于食品加工领域,可用来处理速溶茶^[2]、酒类等由单宁酸而产生的沉淀;可用于没食子酸(Galicacid, GA)和没食子丙酯等食品抗氧化剂的制备^[3];在环保方面,可应用单宁酶处理皮革加工厂排放富含TA的污水^[4].

在单宁酶的研究中,获得一种有效的单宁酶活力测定方法至关重要.目前,单宁酶测定方法有很多,如紫外光谱法、分光光度法^[5]、比色法^{[1][6]}、气相色谱法^[7]、蛋白质沉淀法^[8]和实时检测法等^[9],这些方法都存在不同程度的缺陷.为获得一个准确、有效的单宁酶测定方法,本文基于TA/GA-溴甲酚绿显色原理,建立一个新的单宁酶活力测定方法.

1 材料与方法

1.1 酶及试剂

单宁酶购自济南华鑽贸易有限公司,溴甲酚绿购自天津市天新精细化工开发中心,单宁酸购自上海展云化工有限公司,琼脂糖购自天津市福晨化学试剂厂.

收稿日期:2010-03-10 接受日期:2010-04-02

*中国科学院知识创新工程项目资助(No. KSCX2-YW-G-050) Supported by the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-YW-G-050)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zmzheng@ipp.ac.cn)

1.2 平板制备

将25 mL一定浓度的琼脂糖凝胶倒入方形塑料培养平板中,约30 min凝固后,在胶面上快速、均匀涂布一定浓度的单宁酸溶液,晾干后打孔,孔径(Φ)为0.506 cm.制备好的显色平板放置过夜后即可使用.

1.3 酶活测定原理

溴甲酚绿检出pH范围:3.8~5.2,为酸性显色剂,而相同浓度的TA和GA的pH值不同,两者与显色剂反应形成复合物的颜色不同,单宁酶能降解单宁酸形成GA,改变TA-溴甲酚绿复合物的颜色.琼脂糖凝胶为网状结构,又称分子筛,可以阻挡和迟缓大分子的移动,同一种单宁酶的活力随浓度增加而增大,不同活力的单宁酶因浓度不同在琼脂糖凝胶中的扩散速度也不同,即相等量的单宁酶活力越大在凝胶中扩散速度越快,形成的显色圈就越大.因此,以琼脂糖凝胶作为固体支持物,单宁酸为底物,溴甲酚绿为显色剂,测量已知不同浓度的单宁酶降解圈的面积,以降解圈面积为横坐标,单宁酶活力为纵坐标制作标准曲线,通过标准曲线测定未知单宁酶活力.

2 结果与分析

2.1 原理及可行性分析

为分析TA/GA-溴甲酚绿平板显色方法的可行性,分别向不同显色平板中加入20 μL 蒸馏水和单宁酶40 $^{\circ}\text{C}$ 下反应24 h,结果如图1-1.比较各图可知,蒸馏水和单宁酶本身可以改变平板颜色(图1-1a, 1b),因二者本身具有一定的pH值;单宁

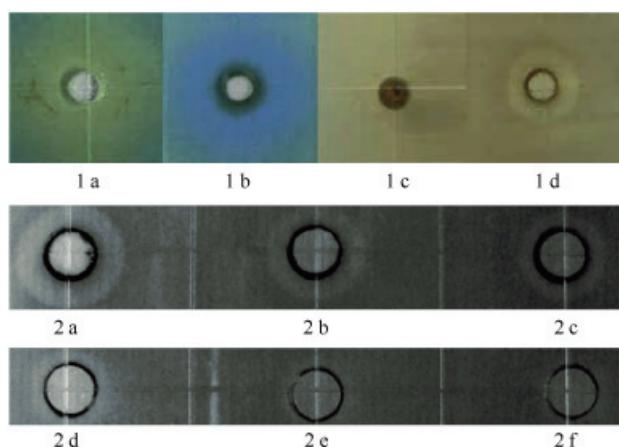


图1 显色反应原理图

Fig.1 Principle of color reaction

1a: 0 U (无TA); 1b: 100 U (无TA); 1c: 100 U加热失活 (有TA); 1d: 100 U (有TA). 2a: 200 U/mL; 2b: 100 U/mL; 2c: 50 U/mL; 2d: 25 U/mL; 2e: 10 U/mL; 2f: 5 U/mL. 图1-1平板中琼脂糖浓度2%、显色剂浓度0.004%; 图1-2平板中底物浓度2% (其他同上)

1a: 0 U (without TA); 1b: 100 U (without TA); 1c: Heat denatured 100 U enzyme (with TA); 1d: 100 U enzyme (with TA). 2a: 200 U/mL; 2b: 100 U/mL; 2c: 50 U/mL; 2d: 25 U/mL; 2e: 10 U/mL; 2f: 5 U/mL. Concentration of agar 2%, Concentration of chromogenic agent 0.004% in Fig. 1-1 plate. Concentration of substrate 2% in Fig. 1-2 plate (Others are the same as the above)

酸与溴甲酚绿反应后显土黄色, 因灭活后的单宁酶虽然在凝胶中扩散, 但不能降解扩散区域内的TA, 颜色并没有发生变化 (图1-1c), 在有活力的单宁酶扩散区域内, TA被降解形成

GA后原先的颜色变浅, 形成清晰的降解圈 (图1-1d). 因此, TA/GA-溴甲酚绿平板显色方法可行.

为分析单宁酶活力与降解圈大小的关系, 依次向平板中加入20 μ L不同活力的单宁酶40 $^{\circ}$ C下反应24 h, 结果显示酶活力越高, 形成的降解圈清晰度越高, 面积越大. 说明酶活力与降解圈的大小和清晰度呈正相关 (图1-2). 因此, 通过比较降解圈的面积来判断单宁酶活力大小是可行的.

为有效提高酶活力测定的准确度, 需对显色平板的组分和部分反应条件进行优化.

2.2 显色剂的影响

为提高酶降解圈的清晰度, 分析显色剂对单宁酶活力测定的影响, 配制显色剂浓度不同的显色平板, 分别向其中依次加入20 μ L活力不同的单宁酶40 $^{\circ}$ C下反应. 结果显示降解圈面积和显色剂浓度不相关 (图2). 比较图2-a~c发现显色剂对低活力酶降解圈清晰度的影响较高活力酶的显著, 其中浓度为0.001%的显色剂浓度显色平板中降解圈面积随时间变化曲线波动最小, 且走势相对明显. 不同浓度的显色剂对降解圈色差的影响不同, 高浓度的显色剂与底物反应后的颜色变化较低浓度显色剂的小. 因此, 为了获得相对清晰的降解圈和扩大测量范围, 一般选择相对较低的显色剂浓度. 后续试验选用0.001%的显色剂浓度.

2.3 底物的影响

在酶解反应中底物浓度对反应的影响较大, 本方法中底物对平板的显色也有影响, 为分析TA对酶活力测定的影响, 向底物浓度不同的平板中分别加入20 μ L活力不同的单

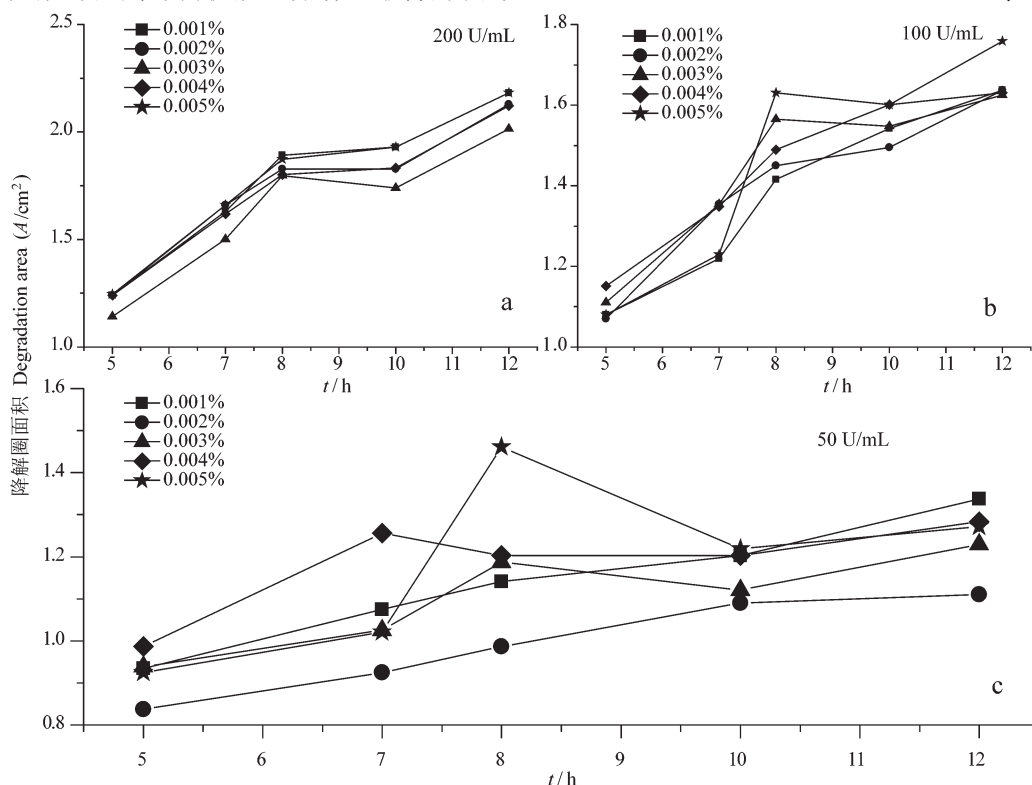


图2 显色剂对酶活力测定的影响

Fig. 2 Effect of chromogenic agent on assay of tannase activity

平板中琼脂糖浓度2%、底物浓度2% Concentration of agar 2%, and concentration of substrate 2% in the plate

宁酶在40℃下,反应不同时间后,结果显示底物浓度与酶降解圈面积呈负相关,底物浓度越高,降解所需的时间越长,

在一定时间内形成降解圈相应变小.当底物浓度较大和较小时,其降解圈面积曲线波动较大并发生交叉现象(图3-a, b,

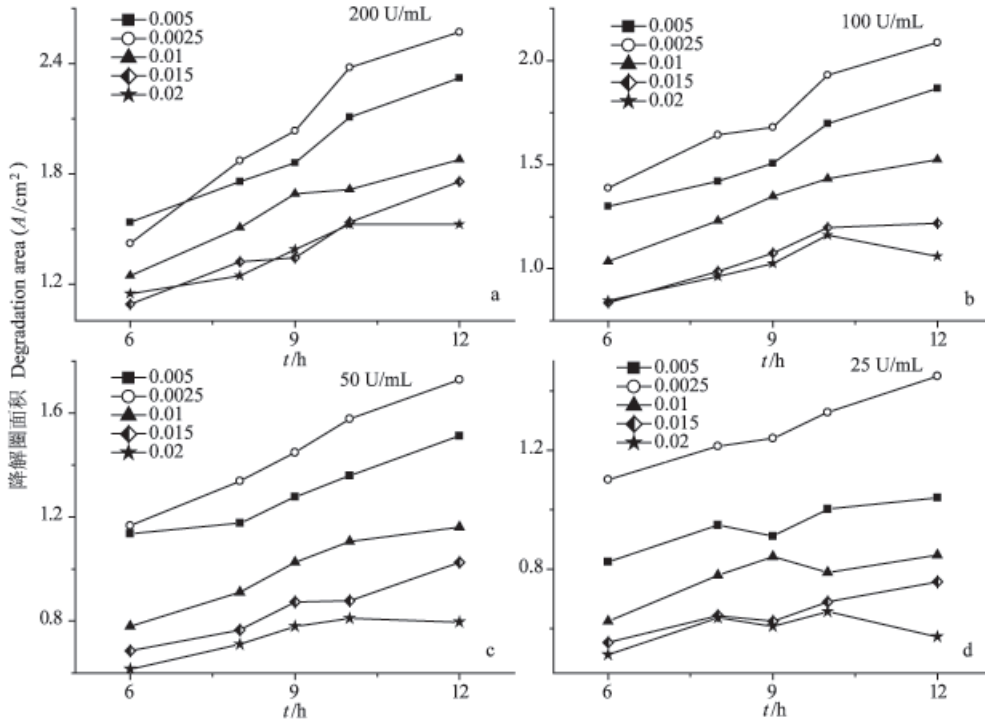


图3 底物浓度对酶活力测定的影响

Fig. 3 Effect of substrate concentration on assay of tannase activity

平板中琼脂糖浓度2%、显色剂浓度0.001% Concentration of agar 2%, and concentration of chromogenic agent 0.001% in the plate

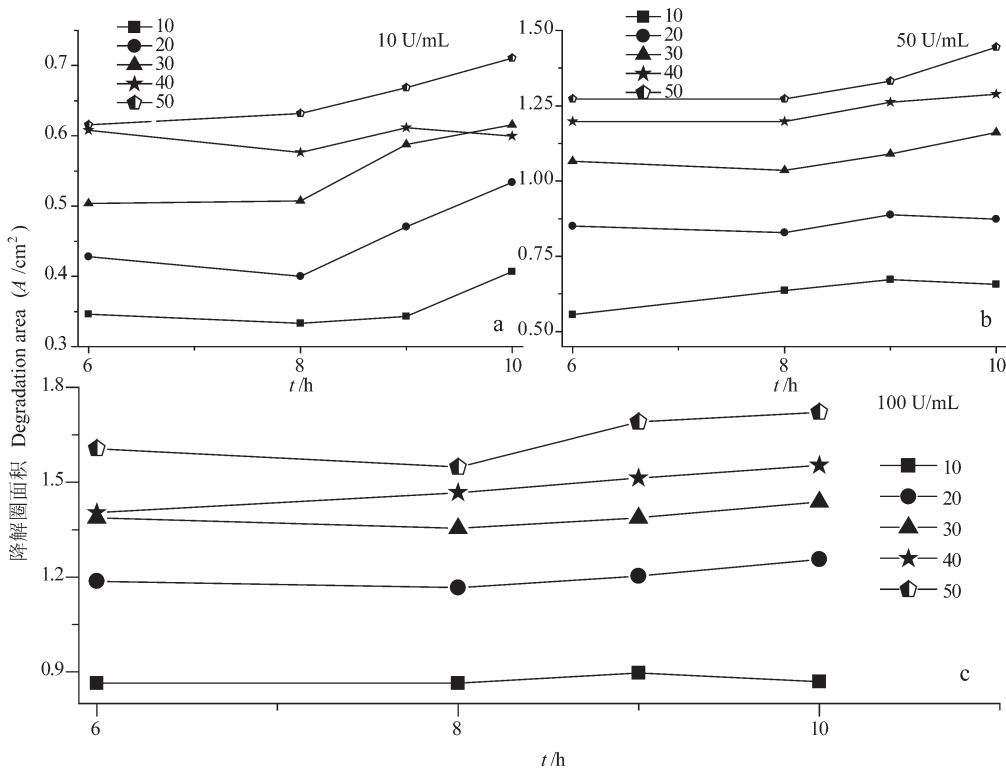


图4 酶加量(μL)对酶活力测定的影响

Fig.4 Effect of tannase addition (μL) on assay of tannase activity

平板中琼脂糖浓度2%、显色剂浓度0.001%、底物浓度1%

Concentration of agar 2%, concentration of chromogenic agent 0.001%, concentration of substrate 1% in the plate

d), 当底物浓度为1%时, 其降解圈面积曲线走势明显, 波动较小(图3). 相同活力的酶和相同反应时间内酶解底物的量是一定的, 当底物浓度较低时, 显色不明显, 产生测量误差; 当底物浓度较高时, 其显色变化较低浓度底物慢, 酶解圈色差明显, 导致降解圈面积变小, 并产生测量误差. 只有当底物浓度适中时, 其降解圈色差明显, 测量误差低. 因此, 后续试验选择底物浓度为1%.

2.4 酶加量的影响

酶与底物比对酶解反应及显色的影响较大, 为确定合适的酶加量, 依次向平板中加入不同体积、不同活力的单宁酶40℃下反应. 结果显示降解圈面积和酶加量呈正相关(图4), 一定活力的单宁酶酶加量越大, 总活力越高, 降解底物的能力越强, 形成的降解圈的面积就越大. 为了提高测量准确度, 理论上选择较高酶加量, 以增大降解圈面积, 降低测量误差. 但酶加量较高时, 酶溶液容易从点样孔溢出, 且不易晾干. 因此, 在实际操作时一般选择适中的酶加量. 比较图4-a~c可知, 不同酶活力下, 酶加量为30 μL时降解圈面积比较接近于40 μL, 其曲线变化趋势较为一致, 结合试验实际, 后续试验选择酶加量为30 μL.

2.5 凝胶浓度的影响

显色平板中, 琼脂糖浓度通过调节酶的扩散速度影响酶降解圈的大小, 为选择合适的琼脂糖浓度, 分别向不同凝胶浓度的显色平板中(显色剂浓度0.001%、底物浓度1%)加入30 μL 100 U/mL的单宁酶于40℃下反应不同时间后, 结果显示凝胶浓度与降解圈面积呈负相关(图5-a), 与降解圈的清晰度呈正相关. 凝胶中酶的扩散速度与凝胶浓度有关, 凝胶浓度越高, 胶孔径越小, 扩散阻力越大, 导致酶扩散速度降低, 扩散区域变小, 产生的降解圈面积相应减小; 随着酶扩散速度降低, 导致其同一区域停留的时间延长, 于是提高了底物的降解程度, 增加了降解圈的色差, 最终提高了降解圈的清晰度, 降低面积测量误差. 因此, 后续实验选择凝胶浓度为3%. 由图5-b可知, 高酶活的降解圈面积随时间变化

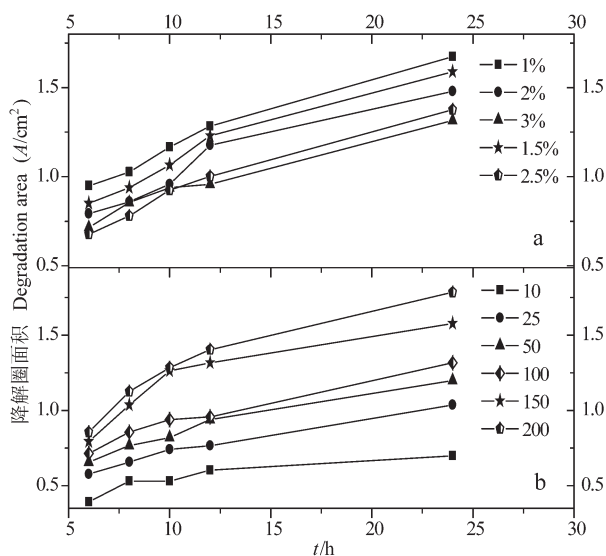


图5 凝胶浓度对酶活力测定的影响

Fig.5 Effect of agar gel concentration on assay of tannase activity

较低酶活大, 当酶活力低于10 U/mL以下时, 面积变化不大. 随着酶活力的降低, 其在高浓度的凝胶中的扩散速度变得更低, 其降解圈面积就越小, 进而增加了低活力酶的测量误差. 为了提高酶活测定的准确度, 可应用高浓度凝胶测定高活力酶, 相应降低凝胶浓度测量较低活力酶.

2.6 反应时间的影响

在测量不同活力单宁酶时, 反应时间对测量准确度的影响较大, 为选择合适的反应时间, 向平板中加入30 μL不同活力的单宁酶于40℃下依次反应不同时间. 反应初期不同酶活的降解圈面积变化较大, 面积曲线走势不稳定, 有交叉倾向, 尤其是低活力酶的曲线交叉趋势更为明显; 反应后期不同酶活的降解圈面积变化较初期小, 走势稳定, 不同酶活间的降解圈面积差增大(图6). 不同活力单位的酶浓度也不同, 其在凝胶中的扩散速度也不同, 高活力酶浓度较低活力酶浓度高, 在凝胶中的扩散速度要大, 反应初期因扩散时间短, 不同活力的酶的扩散区域都较小, 底物降解的程度较低, 降解圈清晰度不高, 降解圈面积差距不大, 所以测量误差的影响增大; 随着反应时间的延长, 酶扩散区域增加, 底物降解程度提高, 降解圈清晰度提高, 面积增大, 测量误差的影响随之降低. 因此, 后续实验选择反应时间为24 h.

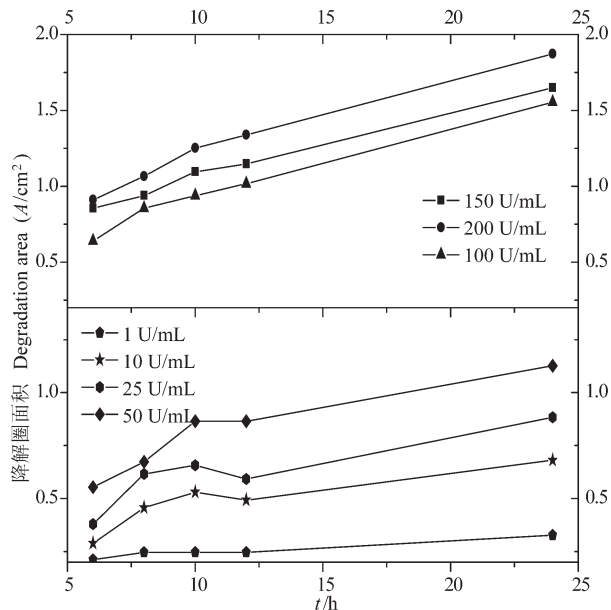


图6 不同活力单宁酶降解圈大小随时间变化曲线

Fig.6 The curves of degradation areas caused by the tannase with different activities vs. time

平板中琼脂糖浓度3%、显色剂浓度0.001%、底物浓度1%
Concentration of agar 3%, concentration of chromogenic agent 0.001%, and concentration of substrate 1% in the plate

综上, 选择凝胶浓度3%、显色剂浓度0.001%、底物浓度1%的显色平板, 在酶加量30 μL, 反应温度40℃和反应时间24 h的条件下, 以酶活力单位为横坐标、降解圈面积为纵坐标作曲线(图7), 结果显示酶降解圈面积与其活力呈指数关系, 曲线方程如下:

$$y = 1.894 - 1.507e^{-0.015x} \quad (1)$$

式中, y 为酶降解圈的面积(cm^2), x 为酶活力(U/mL). 该方程的相关系数为98%, 可作为单宁酶活力测定的标准曲线.

为验证上述标准曲线的可行性, 通过测定已知活力的单

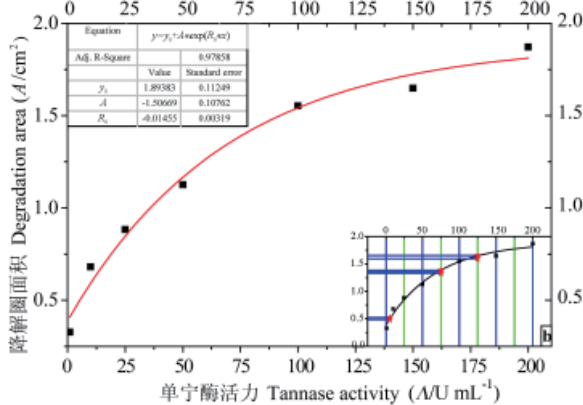


图7 单宁酶标准曲线与验证结果

Fig.7 Standard curve of tannase and verification

宁酶进行验证。但在实际应用时,通常以测量酶降解圈面积来计算酶活力,因此需对上述方程进行转换,转换后的方程如下:

$$y = \frac{200}{3} \ln\left(\frac{1507}{1894 - 1000x}\right) \quad (2)$$

式中, y 为酶活力(U/mL), x 表示酶降解圈的面积(cm^2)。依次向上述最佳平板中加入30 μL 不同活力的单宁酶,40 $^{\circ}\text{C}$ 下反应24 h后测量其降解圈面积,再通过公式(2)计算酶活力。验证结果显示3个验证点几乎都落在标准曲线上(图7-b),对测量值与真实值进行比较分析显示,测定低活力酶时的误差对测定准确度的影响较高活力酶大。测定中、高活力酶的准确度高于测定低活力酶。比较变异系数发现,该方法测定中、高活力酶的稳定性好,而测定低活力酶的温度性相对较低。因此,该方法具有一定准确度和稳定性,尤其是测定高活力的单宁酶,其准确度和稳定性较高(表1)。

表1 验证试验数据分析

Table 1 Analysis of the data in validation experiment

酶活 Enzyme activity (A/U mL ⁻¹)	平均测定酶活 Mean assaying enzyme activity (A/U mL ⁻¹)	变异系数 Coefficient of variation	误差 Error	相对误差(%) Relative error
125	126.41	7.60%	1.41	1.10
75	73.28	5.10%	1.7	2.30
5	5.92	22.10%	0.9	18

3 讨论

3.1 应用范围

本方法主要用来测定液体酶活力,对高活力酶测量的准确度较高,测量最佳范围为1 U/mL以上。本方法应用平板显色,每个平板可检测9~15个样品,因此,可根据实际需要增加平板数目进行批量检测,非常适用于微生物筛选。

3.2 优点与缺点

在研究酶的过程中,拥有一个准确、有效的检测方法

十分重要。但目前很多检测单宁酶方法都存在局限性,最原始的单宁酶测定方法是酸碱滴定法,该法滴定点不明显^[10]。Iibuchi等建立的紫外分光光度法,反应混合物的最大吸收波长为310 nm,介于278 nm(单宁酸)和263 nm(没食子酸),区间窄,不适合检测含有诱导物的粗酶液^[5]。Jean D等应用气相色谱法检测单宁酶,该方法对仪器要求较高^[7]。Cheng等建立的实时测定方法,对设备要求高^[9]。目前常用的蛋白沉淀法^[8]、分光光度分析法^[11]和比色法^[1]步骤多,也不适合检测粗酶液。本方法步骤少,影响因素少,结果直观,准确,可进行定性和定量分析,适合于大批量检测;但也存在检测时间长,对低活力酶检测的准确度不高等缺点,可根据实际需要适当调整凝胶浓度和检测时间来弥补不足。

References

- Mondal KC, Banerjee D, Jana M, Pati BR. Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity. *Anal Biochem*, 2001, **295** (2): 168~171
- Coggon P, Sanderson GW. Manufacture of instant tea. German patent 2,304,73 (cl. A. 23f), 1972
- Banerjee R, Mukherjee G., Patra KC. Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co-culture method. *Biores Technol*, 2005, **96**: 949~953
- Lekha PK, Lonsane BK. Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the art. *Adv Appl Microbiol*, 1997, **44**: 215~260
- Iibuchi S, Minoda Y, Yamada K. Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms 2. A new method setermning enzyme activity using change of ultra violet absorption. *Agric Biolol Chem*, 1967, **31** (5): 513~518
- Nishitani Y, Osawa R. A novel colorimetric method to quantify tannase activity of viable bacteria. *J Microbiol Meth*, 2003, **54** (2): 281~284
- Jean D, Pourrat H, Pourrat A, Carnet A. Assay of tannase (tannin acyl hydrolase EC 3.1.1.20) by gas chromatography. *Anal Biochem*, 1981, **110**: 369~372
- Hagerman A, Butler L. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J Agric & Food Chem*, 1978, **26** (4): 809~812
- Chang FS, Chen PC, Chen RLC, Lu FM, Cheng TJ. Real-time assay of immobilized tannase with a stopped-flow conductometric device. *Bioelectrochem*, 2006, **69** (1): 113~116
- Nishira H. Studies on tannin decomposing enzyme of molds. Tannase fermentation by molds in liquid culture with phenolic substances. *J Ferment Technol*, 1961, **39**: 137~146
- Katwa LC, Ramakrishna M, Raghavendrarao MR. Spectrophotometric assay of immobilized tannase. *J Biosci*, 1981, **3** (2): 135~142