

酸性纤维素酶活力的测定

张永凤¹, 卢红梅¹, 黄永光¹, 邓振坤², 何绪晓³

(1. 贵州大学贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州 贵阳 550003; 2. 苏州民惠食品有限公司, 江苏 苏州 215124; 3. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550003)

摘要: 用 DNS 法测定酸性纤维素酶活力。分析了酶促反应时间、pH、酶液稀释度、温度对酶活力测定结果的影响。研究表明, 该纤维素酶酶促反应的最适条件为: 酶促反应时间为 30 min, 最适 pH 为 5.0, 酶液稀释至 130 倍, 最适温度 50 。最适条件下的酶活力为 1685 IU/g。

关键词: 酸性纤维素酶; 酶活力; 测定

中图分类号: TQ920.1; Q55; X797 文献标识码: B 文章编号: 1001- 9286(2007) 12- 0099- 03

Determination of Acidic Cellulase Activity

ZHANG Yong-feng¹, LU Hong-mei¹, HUANG Yong-guang¹, DENG Zhen-kun² and HE Xu-xiao³

(1. Key Lab of Fermentation Engineering and Bio-Pharmaceutical, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550003; 2. Suzhou Minhui Food Co.Ltd., Suzhou, Jiangsu 215124; 3. Life Science College, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550003, China)

Abstract: Acidic cellulase activity was determined by DNS method. The effects of enzymatic reaction time, pH value, enzyme dilution degree and temperature on the determination results were investigated. The results suggested that the best enzymatic reaction conditions were as follows: 30 min enzymatic reaction, pH value as 5.0, enzyme solution diluted to 130 times, and temperature at 50 . Under the above conditions, cellulase activity could reach 1685 IU/g.

Key words: acidic cellulase; enzyme activity; determination

酒糟是酿酒业的副产物, 量大而集中。据统计, 我国年产各种酒糟高达 2700 多万吨, 酒精废糟液排放量高达 6500 多万吨, 以粮食为原料的酒糟分白酒糟、啤酒糟和酒精糟, 其中后两者的养分含量较高, 干物质中粗蛋白的含量达 28 % 左右, 含丰富的氨基酸、维生素和多种微量元素等, 营养比较丰富, 但是其酸度高, 易腐烂变质, 若不及时处理, 必然严重污染环境^[1]。纤维素酶特别是酸性纤维素酶在利用酒糟酿造食醋的进一步资源化中发挥了重要作用。纤维素酶可使纤维素降解为葡萄糖^[2]。实际使用上, 纤维素酶的酶解效率很低, 远没有达到淀粉酶的水平, 其主要原因是酶活力较低, 酶没有在最佳条件下反应。本研究的目的是通过试验确定纤维素酶酶促反应的最佳时间、最适 pH 值、酶液稀释度和最适温度, 以使其在应用中发挥最大酶活力。

1 材料与方法

1.1 材料

酸性纤维素酶: 由贵阳赛兰博公司提供。

基金项目: 2007 年度贵州省重点科学技术基金资助项目。

收稿日期: 2007- 09- 28

作者简介: 张永凤(1979-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事食品微生物的研究。

1.2 药品与试剂

1.2.1 葡萄糖

葡萄糖为分析纯。

1.2.2 3,5- 二硝基水杨酸(DNS)显色液^[3]

称取酒石酸钾钠 182.0 g 溶于 500 mL 水中, 在溶液中依次加入 3,5- 二硝基水杨酸 6.3 g, 氢氧化钠 20.96 g, 加热搅拌使之溶解, 再加 5.0 g 苯酚(C₆H₅OH)和 5.0 g 无水亚硫酸钠(Na₂SO₃), 搅拌使之溶解, 待冷却后移入 1000 mL 容量瓶中用蒸馏水定容至 1000 mL, 充分混匀。贮于棕色瓶中, 室温放置一周后使用。

1.3 主要仪器

岛津 UV- 2550 紫外分光光度计, 由苏州岛津仪器有限公司提供; 电子精密天平, 由托利多奥豪斯国际贸易(上海)有限公司提供; 电热恒温水浴锅 GSY- 1, 由北京市医疗设备厂提供; PHS- 25B 型数字酸度计, 由上海大普仪器有限公司提供。

1.4 试验方法

1.4.1 葡萄糖标准浓度曲线的绘制

1.4.1.1 1 mg/mL 标准葡萄糖溶液

精确称取经过 105 °C 干燥 2 h 的分析纯葡萄糖 500.0 mg 加水溶解, 稀释定容至 500.0 mL。

1.4.1.2 葡萄糖标准浓度曲线的绘制

按表 1 中的容量取 1 mg/mL 标准葡萄糖液、3, 5- 二硝基水杨酸试剂(DNS 试剂)和去离子水于不同编号的 25 mL 容量瓶中。在沸水浴中反应 10 min, 冷却后定容到 25 mL, 在 $\lambda_{\text{max}}=492 \text{ nm}$ (已验证见图 1)下, 用岛津 UV- 2550 紫外分光光度计测定吸光度值, 以吸光度值为纵坐标, 葡萄糖含量为横坐标, 绘制标准曲线。

表 1 不同浓度标准葡萄糖溶液配比 (mL)

项目	1 mg/mL 标准葡萄糖溶液	去离子水	DNS 试剂
1 [#]	0.2	1.8	2
2 [#]	0.4	1.6	2
3 [#]	0.6	1.4	2
4 [#]	0.8	1.2	2
5 [#]	1.0	1.0	2
6 [#]	1.2	0.8	2

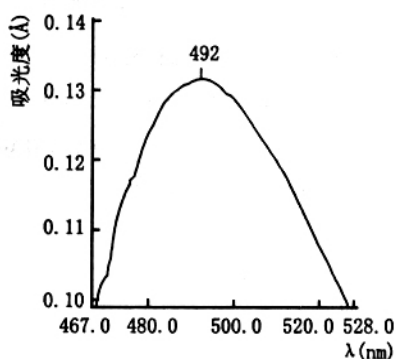


图 1 葡萄糖标准溶液的扫描图

1.4.2 酸性纤维素酶酶活力的测定

1.4.2.1 纤维素酶酶液制备^[4]

取酸性纤维素酶粉 2 g 加 200 mL 去离子水, 搅拌均匀后, 于 40 °C 水浴中保温 45 min, 用脱脂棉过滤到三角瓶中密封置冰箱中冷藏待用。

1.4.2.2 酶活力测定方法

采用 3,5- 二硝基水杨酸(DNS)法^[9]。

1.4.2.3 酶活力单位定义^[9]

在最适酶促反应条件下, 以 1 min 从底物溶液中分解产生 1 μmol 还原糖所需要的酶量定为 1 个酶活力单位, 简称为 IU。

1.4.2.4 酶促反应的速度曲线

取制备好的纤维素酶液 0.5 mL 与 0.5 % pH 值 5.2 的 CMC(羧甲基纤维素)柠檬酸缓冲液 1.5 mL 于不同标号的 25 mL 容量瓶中混匀, 空白用 0.5 mL 纤维素酶液加 1.5 mL 柠檬酸缓冲液, 在 40 °C 恒温水浴锅中糖化不同的时间, 取出后加入 2.0 mL DNS 试剂, 置于沸水

浴中显色 10 min 之后, 冷却至室温并定容至 25 mL, 充分摇匀后在 492 nm 下测其吸光度 $\text{\AA}$ 。

1.4.2.5 酶促反应的最适 pH

用 pH 值分别为 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、6.5 的柠檬酸缓冲液配制浓度为 0.5 % 的 CMC 底物溶液。取稀释到 140 倍的纤维素酶酶液 0.5 mL 与 0.5 % 上述不同 pH 的 CMC(羧甲基纤维素)柠檬酸缓冲液 1.5 mL 于不同标号的 25 mL 容量瓶中混匀, 空白用 0.5 mL 纤维素酶液加 1.5 mL 柠檬酸缓冲液, 在 40 °C 恒温水浴锅中糖化 30 min, 取出后加入 2.0 mL DNS 试剂, 置于沸水浴中显色 10 min 之后, 冷却至室温并定容至 25 mL, 充分摇匀后在 492 nm 下测其吸光度 $\text{\AA}$ 。

1.4.2.6 酶液稀释度对酶活测定的影响

将制备好的纤维素酶液以不同倍数(60、80、90、100、110、120、130、140、150 和 170)稀释。分别取 0.5 mL 的不同稀释倍数的稀释酶液与 0.5 % pH 值 5.0 的 CMC(羧甲基纤维素)柠檬酸缓冲液 1.5 mL 置于不同标号的 25 mL 容量瓶中混匀, 以下操作同 2.1.3.2。

1.4.2.7 酶促反应的最适温度

取稀释至 130 倍的纤维素酶液 0.5 mL 与 0.5 % pH 5.0 的 CMC(羧甲基纤维素)柠檬酸缓冲液 1.5 mL 置于不同标号的 25 mL 容量瓶中混匀, 空白用 0.5 mL 纤维素酶液加 1.5 mL 柠檬酸缓冲液, 在不同的温度(35、40、45、50、55、60 和 70 °C)下糖化 30 min, 以下操作同 2.1.3.2。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准浓度曲线的绘制

葡萄糖标准浓度曲线见图 2。其回归方程: $y=27.93781x-0.10285$, 线性相关系数为 $R^2=0.99967$, 线性相好, 可用于纤维素酶活力的测定。

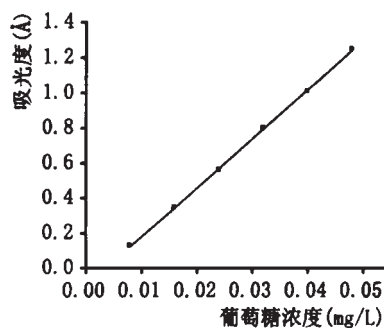


图 2 葡萄糖标准浓度曲线

2.2 酶反应的速度曲线

由于 3,5- 二硝基水杨酸是一种氧化剂, 能与还原糖作用, 使硝基还原成氨基, 溶液变为橙色, 在一定还原糖的浓度范围内, 橙色的深浅度与还原糖的浓度成正

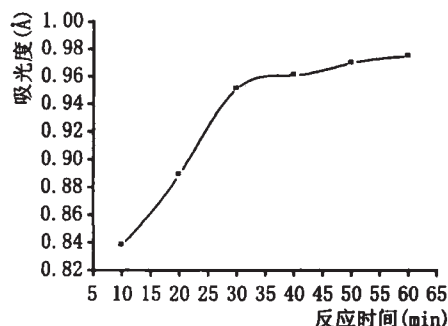


图3 酶反应速度曲线

比。因此,可采用比色法求得还原糖的浓度,生成的葡萄糖的含量与所测的吸光度 $\text{\AA}$ 成正比^[7]。酶反应的速度曲线见图 3。

由图 3 可知,反应速度随着反应时间的延长,酶反应速度下降。这主要是因为随着反应的进行,底物浓度降低,产物浓度增加,从而加速了逆反应的进行。因此,为准确地表示酶活力,需采用初速度来表示,试验结果证明酶促反应时间为 30 min 较好。

2.3 酶促反应的最适 pH 值

pH 对酶促反应影响的原因是多方面的。如过酸、过碱可使酶空间构象改变,使酶失活。根据过酸过碱的程度不同,酶可遭受可逆或不可逆失活。又如 pH 可改变底物的解离状态,影响它与酶的结合。研究 pH 对酶促反应影响最有意义的是, pH 能影响酶分子上一些氨基酸侧链的解离状态,特别是酶催化活性所需的侧链基团的解离状态^[8]。试验结果表明,在本实验条件下,纤维素酶的最适 pH 值为 5.0,见图 4。

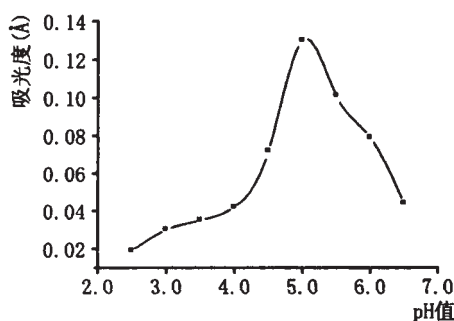


图4 pH 值对酶活力测定结果的影响

2.4 酶液稀释度对酶活力测定的影响

酶液稀释度对酶活力测定结果见表 2。由表 2 可知,酶液稀释度的改变,会明显改变酶活力测定的结果。在一定范围内稀释度大,结果偏高,稀释度小,结果偏低,但是稀释度过大,结果也偏低。由表 2 还可知,吸光度控制在 0.1~0.3 时所测得的酶活力值较稳定,并且酶液稀释至 130 倍时酶活力达到最高。

2.5 酶促反应的最适温度

温度对酶促反应影响的原因主要有两个方面,一是

表 2 酶液稀释度对酶活力测定结果的影响

编号	稀释倍数	吸光度 (A)	酶活 (IU/g)
1 [#]	80	0.245	889
2 [#]	90	0.239	1000
3 [#]	100	0.229	1111
4 [#]	110	0.214	1120
5 [#]	120	0.204	1222
6 [#]	130	0.196	1324
7 [#]	140	0.165	1296
8 [#]	150	0.098	972
9 [#]	170	0.052	944

温度对酶蛋白稳定性的影响,即对酶热变性失活作用;二是温度对酶促反应本身的影响,其中可能包括影响酶和底物的结合,影响 $V_{\max}$,影响酶和底物分子解离基团的 pK,影响酶与抑制剂、激活剂或辅酶的结合等^[9]。温度对酶活力测定结果的影响见表 3。由表 3 可见,50 所测得的酶活力最高,即 50 为此酶的最适酶解温度。

表 3 温度对酶活力测定结果的影响

编号	温度 (°C)	吸光度 (A)	酶活 (IU/g)
1 [#]	35	0.136	1083
2 [#]	40	0.169	1204
3 [#]	45	0.210	1324
4 [#]	50	0.288	1685
5 [#]	55	0.228	1444
6 [#]	60	0.174	1204

3 结论

酶活力是指在一定条件下,酶所催化反应的速度。在实际测定中,测定的结果与所采取的各项测定条件有关,测定的条件不同,得出的结果就不同。试验结果表明,该纤维素酶酶促反应的最适条件为:酶促反应时间为 30 min,最适 pH 为 5.0,酶液稀释至 130 倍,最适温度 50。最适条件下测得的酶活力为 1685 IU/g。

参考文献:

- [1] 王冬梅.酒糟及废液综合利用的研究[D].北京:中国农业大学,2002.
- [2] 无锡轻院,等.发酵工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1984.238-243.
- [3] 刘德海,杨玉华,张发旺,等.饲用纤维素酶活力测定方法的探讨[J].饲料工业,2002,23(4):34-35.
- [4] 夏服宝,邱雁临,孙宪迅.纤维素酶活力测定条件研究[J].饲料工业,2005,26(16):23-26.
- [5] 杨文博,李明春,牛淑敏.微生物实验[M].北京:化工出版社,2004.
- [6] 王在贵,张莉,张宏福,等.纤维素酶的酶学性质研究[J].中国饲料,2006,(1):12-17.
- [7] 宋贤良,温其标,朱江.纤维素酶法水解的研究进展[J].郑州工程学院学报,2001,22(4):67-71.
- [8] 邹国林,朱汝璠.酶学[M].武汉:武汉大学出版社,1997.187-204.