

葡萄浆果中 β -葡萄糖苷酶活性测定条件的研究

李 华, 高 丽

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 以对-硝基苯酚 β -D-葡萄糖苷为底物, 对霞多丽葡萄浆果中 β -葡萄糖苷酶活性测定条件进行了研究。结果表明, 酶反应底物在 405 nm 处有最大的吸光值, 霞多丽葡萄浆果粗酶提取液 PVP 添加量为 3 % 最理想, 在 37 °C 酶促反应曲线线性最好, 在 40 °C 和柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 pH 6.0 中酶活性较高。通过正交试验确定霞多丽葡萄酒浆果的 β -葡萄糖苷酶最佳检测条件是 37 °C, 在磷酸-柠檬酸 pH 6.0 缓冲液中反应 90 min。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 反应温度; 反应时间; 缓冲液 pH

中图分类号: TS262.6; TS261.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2007)08-0146-04

Determination Conditions of β -Glucosidase Activity in Chardonnay Berries

Li Hua and Gao Li

(College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: The determination conditions of β -glucosidase activity in Chardonnay berries were investigated by using p-Nitrophenyl β -D-Glucopyranoside (pNPG) as substrate. The results showed that the highest absorbance of PNP was achieved at 405 nm, the best effects were achieved as the addition level of polyvinylpyrrolidone (PVP) as 3 % in enzyme extraction liquid, and the curve of β -glucosidase activity showed the best linearity as reaction temperature at 37 °C and displayed the powerful enzyme activity at 40 °C and in phosphate-citrate buffer pH 6.0. The orthogonal experiments were operated to set up the optimum determination conditions as follows: temperature at 37 °C and 90 min reaction time in pH 6.0 phosphate-citrate buffer.

Key words: β -glucosidase; reaction temperature; reaction time; buffer pH value

β -葡萄糖苷酶在葡萄和葡萄酒的香气形成过程中起着非常重要的作用。研究表明, 该酶通过分解葡萄浆果和葡萄酒中结合态的香气前体物质, 不仅增加和改良葡萄汁和葡萄酒的花香和果香, 而且产生的香气浓郁、自然^[1]。因此, 研究 β -葡萄糖苷酶在葡萄浆果中的检测方法对于探讨葡萄浆果和葡萄酒中香气物质的形成和改良葡萄酒的工艺有非常重要的理论价值和实践意义。目前, β -D-葡萄糖苷酶活性检测方法有以下几种^[2]: 一是 Barush 和 Swiain 法, 以水杨苷为酶反应底物, 酶解产物用 4-氨基安替比林作显色剂, 使释放出来的水杨醇显色, 再用分光光度计比色测定, 或者用 DNS 试剂测定生成的还原糖量来计算酶的活力; 二是荧光法, 利用伞形酮(7-羟基香豆素)与 4-甲基伞形酮具有强烈荧光的特点, 可以计算酶活力; 三是比色法, 以对-硝基苯基 β -D-葡萄糖苷(pNPG)为底物进行酶解, 底物水解后释放

出来的对-硝基苯酚可用分光光度计比色测定^[3]。另外还有电化法, 该方法是以前扁桃苷为底物, 根据所产生的氢氧化物, 用与自发(内)电解池相联结的一对银-铂电极的发放来测定 β -葡萄糖苷酶活性。最近, 梁华正^[4]等人提出了以京尼平苷为底物检测 β -葡萄糖苷酶活性的一种新方法。目前, 微生物和植物中糖苷酶活性分析检测以对-硝基苯基- β -D-葡萄糖苷为酶底物的比色法应用最为广泛和普遍, 且该方法操作简单, 快速, 灵敏度高, 重现性好。但是在测定过程中发现因不同来源的酶理化性质有所差异, 具体检测中条件各不相同^[2,5~6]。本文采用此法检测了霞多丽葡萄浆果中 β -葡萄糖苷酶活性的条件, 包括最佳吸收波长、PVP 的添加量、缓冲液类型、pH 值、反应温度和时间。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

收稿日期: 2007-04-16

作者简介: 李华(1959-), 男, 重庆梁平人, 教授、博士生导师, 院长, 研究方向: 葡萄与葡萄酒研究。

霞多丽葡萄, 来自宁夏贺兰山东麓, 采摘后立即保存在 -20°C 冰箱中备用。对-硝基苯酚(上海国药), 对-硝基苯酚- β -D-葡萄糖苷, p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranoside(pNPG), Sigma 公司产品。

1.2 主要仪器

低温离心机、SP-2102UV 紫外可见分光光度计、水浴锅等。

1.3 试验方法

1.3.1 粗酶液提取

称取 10.0 g 葡萄浆果, 立即在液氮条件下研磨成粉末。然后把粉末悬浮在约 14 mL 的粗酶提取液中, 粗酶提取液用 pH7.2 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液, 提取液中包含 10 mM EDTA; 4 mM DTT; 1 % PEG4000(w/v), 3 % PVP(w/v)。在 4°C 下提取 150 min, 得到的泥浆在 4°C 条件下以 11000 r/min 离心 30 min, 取上清液定容到 20 mL, 保存在 4°C 冰箱中备用^[5~8]。

1.3.2 酶活测定

在 3 个 10 mL 具塞试管中顺次加入 0.6 mL pH5.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液, 0.2 mL 粗酶提取液, 0.2 mL 10 mM pNPG, 迅速盖上试管塞立即放到 37°C 的水浴锅中反应 30 min, 然后立即加入 2.0 mL 1 M Na_2CO_3 溶液终止反应, 在对-硝基苯酚的最佳吸收波长处检测吸光值。空白对照: 0.2 mL 的 10 mM pNPG 用 0.2 mL pH7.2 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液代替酶粗提液, 其他同上^[7]。

1.3.3 波长选择

准确称量对-硝基苯酚 139.0 mg, 用蒸馏水定容至 1000 mL。再分别吸取该溶液 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL 和 6 mL 至 100 mL 的容量瓶中, 用 1 mol/L Na_2CO_3 溶液定容后混匀, 使 1 mL 稀释液分别含有对-硝基苯酚 0.01 μmol 、0.03 μmol 和 0.05 μmol 。然后用分光光度计在 380~450 nm 进行全波段扫描。

1.3.4 PVP 加入量的选择

粗酶提取液时, PVP 的加入量分别为 0、2 %、3 %、5 % 和 7 %。其他试验步骤如 1.3.1 和 1.3.2。

1.3.5 不同温度对酶活性的影响

酶活反应温度设 30°C 、 40°C 、 50°C 、 60°C 、 70°C 共 5 个温度梯度。

1.3.6 不同温度、不同反应时间对酶活性的影响

反应时间设 0、30 min、60 min、90 min、120 min, 酶活反应温度为 30°C 、 40°C 、 50°C 、 60°C 和 70°C 进行实验, 检测得出最佳的酶反应温度。设酶活反应温度 30°C 、 37°C 、 45°C 和 50°C , 设反应时间为 0、30 min、60 min、90 min、120 min 条件下进行, 检测酶促反应曲线。

1.3.7 不同缓冲液类型和 pH 的试验

选择 2 种酶反应缓冲液体系, 即用柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0), 柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液(pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0) 浓度均为 0.1 mol/L 检测酶活反应的最适缓冲液类型和 pH。

1.4 数据统计分析

试验结果所得数据采用 SPASS 软件进行相关的统计分析。

2 结果与分析

2.1 波长的选择

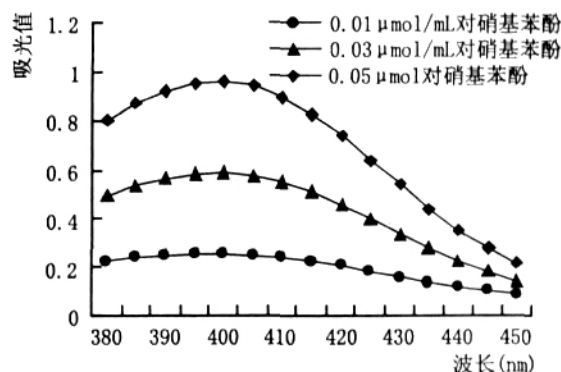


图 1 对-硝基苯酚波长扫描

扫描 β -葡萄糖苷酶的反应底物对-硝基苯酚(浓度为 0.01 μmol 、0.03 μmol 、0.05 μmol) 在 380~450 nm 的吸光值, 结果见图 1。从图 1 可看出, 不同浓度的对-硝基苯酚均在 400~410 nm 处有最大吸收波长。本实验选择 405 nm 为实验检测波长。

2.2 PVP 加入量的影响(表 1)

PVP 含量(%)	重复 1	重复 2	重复 3	平均值
0	0.036	0.039	0.042	0.039d
2	0.093	0.090	0.098	0.094c
3	0.227	0.232	0.224	0.228b
4	1.179	1.489	1.214	1.180a
5	—	—	—	—
7	—	—	—	—

注: “—” 未检出; 采用 DUNCAN 新复极差法进行方差分析, $\alpha=0.05$ 。

PVP 分子能吸附多酚类物质, 一般在粗酶提取时, 为防止多酚类物质对酶活性的影响, 通常在粗酶提取液中加入适量的 PVP^[6,9]。经方差分析(采用 DUNCAN 新复极差法进行方差分析, $\alpha=0.05$), 结果表明, 不同量的 PVP 对 β -葡萄糖苷酶活性影响很大, 结果差异显著。不加 PVP 时酶活性很低, 随着粗酶提取液中 PVP 量的增加, 酶活性显著提高, 当 PVP 量加到 4 % 时酶活性变化不再明显, 不再提高, 此时酶反应液澄清度不好; 当 PVP 含量到达 5 % 以上时, 酶反应液明显浑浊, 无法准确检

测吸光度。由此得出,提取霞多丽葡萄浆果的 β 葡萄糖苷酶粗酶提取液的 PVP 最适含量为 3 %。

2.3 不同温度和时间对酶活性的影响(表 2)

温度(℃)	重复 1	重复 2	重复 3	平均值
30	0.058	0.055	0.055	0.056c
40	0.214	0.215	0.235	0.221a
50	0.075	0.085	0.078	0.079b
60	0.038	0.035	0.034	0.036d
70	0.023	0.018	0.023	0.021e

注:采用 DUNCAN 新复极差法进行方差分析, $\alpha=0.05$ 。
方差分析结果表明,不同温度的酶活检测结果差异显著($\alpha=0.05$),在 40℃时检测效果最好。

在 30℃、37℃、45℃和 50℃这 4 种温度条件下,酶反应在 0 min、30 min、60 min 和 120 min 后检测吸光度,根据生成的酶底物量对-硝基苯酚浓度作图,见图 2。30℃、37℃、45℃和 50℃数据分析得回归方程分别为, $y=0.0001 \times x-4E-05$, $R=0.9921$; $y=0.0002 \times x+4E-05$, $R=0.9994$; $y=0.0001 \times x+0.0016$, $R=0.9251$; $y=0.0001 \times x+0.0014$, $R=0.9314$,从以上数据可知,酶促反应在 120 min 内的线性关系 37℃最好,30℃次之,而 50℃和 45℃较差,并且在 37℃时酶活性最好,更适合检测酶活性。由此得出, β 葡萄糖苷酶活性分析以 37℃最适。

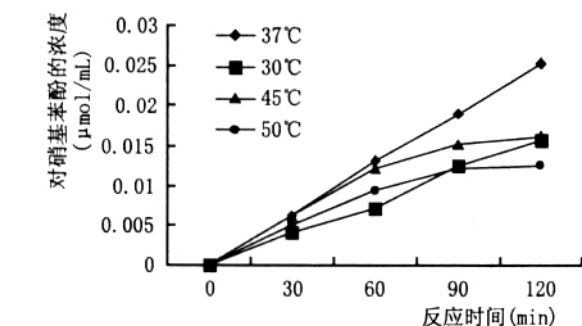


图 2 不同温度、时间的酶促反应曲线

2.4 不同缓冲液 pH 对酶活性的影响

缓冲液的类型和 pH 对 β 葡萄糖苷酶活性影响较大,结果见图 3。由图 3 可看出,随着 pH 的增大,2 种缓冲液体系的酶反应活性均呈现出先增加后下降的趋势。柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液在 pH6.0 时酶活性达到最大,柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液在 pH5.0 时达到最大,且柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液体系的酶反应活性比柠檬酸-柠檬酸三钠的效果好。由此得出,柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 pH6.0 用于测定霞多丽葡萄中 β 葡萄糖苷酶活性效果最好。

2.5 正交实验结果(表 3~表 5)

由表 4 可看出,以酶活值为指标,各因素对酶活的影响程度为:温度和时间对酶活的影响相当,二者大于

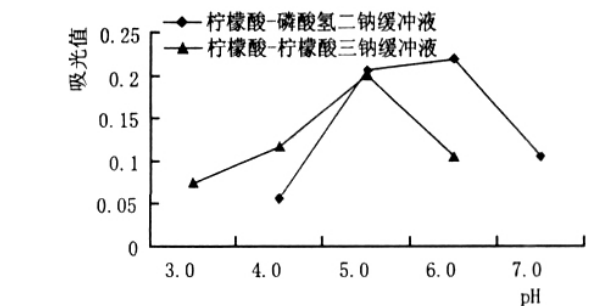


图 3 不同类型的缓冲液及 pH 对 β -葡萄糖苷酶活性的影响

水平	A 温度(℃)	B 时间(min)	C 缓冲液类型
1	37	30	磷酸-柠檬酸 pH7.2
2	40	60	磷酸-柠檬酸 pH6.0
3	45	90	柠檬酸-柠檬酸三钠 pH5.0

试验号	因素	吸光值	酶活性
1	1	0.155	0.003029
2	1	0.458	0.008956
3	1	0.515	0.010064
4	2	0.129	0.002521
5	2	0.334	0.006527
6	2	0.330	0.006455
7	3	0.211	0.004117
8	3	0.114	0.002221
9	3	0.309	0.006032
K_1	0.938	0.449	0.553
K_2	0.705	0.752	0.919
K_3	0.603	1.066	0.788
R_1	0.150	0.150	0.184
R_2	0.251	0.251	0.306
R_3	0.355	0.355	0.263
极差 R	0.206	0.206	0.122

方差来源	Df	SS	MS	F
A	1	0.007668	0.007668	153.8 ^{***}
B	1	0.012195	0.012195	244.6 ^{***}
C	1	0.02464	0.02464	494.2 ^{***}
误差 e	16	0.0007977	0.00004986	
总和	19			

注: $F_{0.05}(1, 16)=4.49$, $F_{0.01}(1, 16)=8.53$ 。

缓冲液类型和 pH 对酶活性的影响。根据各因素的 K 值和直接的结果比较得出 $A_1B_3C_2$ 为酶活的最佳反应条件。

由表 5 方差分析结果可知,温度、时间、缓冲液类型和 pH 值、温度×时间、温度×缓冲液类型和 pH 值、时间×缓冲液类型和 pH 值均达到显著水平。

3 结论与讨论

据报道,已检出的葡萄酒中的挥发性香气成分有 800 多种^[3~4,10],主要包括萜烯类、酯类、醛酮类及醇类等,其中含量较高的萜烯类香气的生成主要依赖于 β -

D-葡萄糖苷酶的催化作用。因此确定葡萄和葡萄酒中 β -D-葡萄糖苷酶的测定方法将对今后进一步研究葡萄酒中香气成分和香气形成的机理具有促进作用。目前,国内茶叶中 β -葡萄糖苷酶活性的检测方法研究比较成熟,但是条件各不相同^[5~6,8~9]。

本试验采用分光光度计法研究了检测霞多丽葡萄浆果中的 β -葡萄糖苷酶活性测定条件,从而得出,检测波长选择在 405 nm 最为理想,粗酶提取液中 PVP 加入量为 3%,反应温度和时间选择 37 °C, 90 min 的条件检测酶活性最为理想,且酶反应缓冲液体系为柠檬酸-磷酸氢二钠 pH 为 6.0 时酶活性最大,选用酶活反应温度、时间和缓冲液 pH 的正交试验,得出霞多丽葡萄浆果酶活测定的最佳检测条件是 37 °C,在磷酸-柠檬酸 pH6.0 缓冲液中反应 90 min。

参考文献:

- [1] Gueguen Y, Chemardin P, Janbon G, Amaud A, and Galzy P. A very efficient β Glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and precursors of wines and fruit juices. [J]. J. Agric Food Chem, 1996, 44: 2336- 2340.
- [2] 江昌俊,李叶云.茶叶中 β -D-葡萄糖苷酶活性测定条件的研

究[J].安徽农业大学学报,1999,26(2): 212- 215.

- [3] Robinson D. The fluorimetric determination of β Glucosidase: its occurrence in the tissues of animals, including insects[J]. Biochemistry Journal, 1956, 63: 39- 42.
- [4] 梁华正,刘富梁,彭玲西,等.京尼平苷为底物测定 β -葡萄糖苷酶活力的方法[J].食品科学,2006,27(4): 182- 185.
- [5] 王华夫,游小清.茶叶中 β -葡萄糖苷酶活的测定[J].中国茶叶, 1996, (3): 16- 17.
- [6] 董尚胜,童启庆,渡边修治,等.茉莉花中 β -D-葡萄糖苷酶活性测定条件的探讨[J].福建茶业,1997, (4): 23- 25.
- [7] Gunata Z, Blondeel C, Vallier MJ, Lepoutre JP, Sapis JC, and Watanabe N. An endoglycosidase from grape berry skin of Cv. M. Alexandria hydrolyzing potentially aromatic disaccharide glycosides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46: 2748- 2753.
- [8] 董尚胜,童启庆,渡边修治,等.茉莉花粗酶液提取条件对 β -D-葡萄糖苷酶活性的影响[J].中国茶叶加工,1997, (2): 32- 33.
- [9] 江昌俊,李叶云.茶叶鲜叶中 β -葡萄糖苷酶提取条件的研究[J].南京农业大学学报,2000,23(2): 93- 96.
- [10] Van den Breemt K, Delvaux F.R., Verachttert H, and Derdelinckx G. 1 Biongeneration of Flavors: Performance of Candida methanolovescens strains in nonalcoholic beer[J]. American Society of Brewing Chemist, Inc, 2001, 80- 83.

(上接第 145 页)

表 3 正交试验结果及数据处理

试号	A	B	C	D	有机硒含量 (mg/kg)
1	1	1	1	1	0.07
2	1	2	2	2	0.08
3	1	3	3	3	0.10
4	2	1	2	3	0.09
5	2	2	3	1	0.17
6	2	3	1	2	0.16
7	3	1	3	2	0.11
8	3	2	1	3	0.12
9	3	3	2	1	0.13
K ₁	0.25	0.27	0.35	0.37	
K ₂	0.42	0.36	0.30	0.35	
K ₃	0.36	0.39	0.38	0.31	
R	0.17	0.12	0.08	0.06	

的次要关系是 A> B> C> D。即以大曲丢糟生产白地霉富硒蛋白饲料的最优生产条件是: Na₂SeO₃ 添加量为 0.50 mg/kg, 富硒白地霉接种量为 15%, 纤维素酶添加量为 0.03%, 培养时间 4 d。

2.3 发酵前后丢糟成分的比较

将最佳水平条件下获得的富硒丢糟蛋白饲料与未经发酵的丢糟进行粗蛋白、有机硒、还原糖等主要指标的比较,检测结果见表 4。

从表 4 中可知,经发酵后的丢糟饲料的粗蛋白、有

表 4 发酵前后丢糟成分

项 目	粗蛋白(%)	有机硒(mg/kg)	还原糖(%)
发酵前	8.30	0.01	0.63
发酵后	18.90	0.18	2.57

机硒及还原糖含量都有明显提高。

3 结论

丢糟经白地霉发酵后,其蛋白质、有机硒和还原糖含量明显增加,因此经转化后的丢糟饲料营养价值大幅提高,是一种较为理想的富硒饲料蛋白质资源,具有明显的社会效益、经济效益和环保效益。

参考文献:

- [1] 王贞富.白酒厂酒糟的利用[J].酿酒,1990, (1): 32- 34.
- [2] 无锡轻工业学院,华南工学院,天津轻工业学院,等.微生物学[M].北京:轻工业出版社,1996.
- [3] 天津轻工业学院,大连轻工业学院,无锡轻工业学院,等.工业发酵分析[M].北京:轻工业出版社,2000.
- [4] 侯少范,王五一.微量硒的测定方法简介[J].分析化学,1998, (2): 183.
- [5] 宋照军,王树宁,潘润淑,等.富硒乳酸菌的分离、筛选、驯化及富硒研究[J].中国酿造,2004, (11): 5- 6.
- [6] 黄秀梨.微生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2001.
- [7] 钟平安.生物统计[M].长沙:湖南科学技术出版社,1983.