

唐 国 敏

(中国科学院微生物研究所,北京)

糖化酶也叫葡萄糖淀粉酶 (glucoamylase), 是应用于葡萄糖、酒精等生产的一种工业用酶。测定糖化酶活力是以在一定条件下作用于可溶性淀粉后生成的葡萄糖的毫克数来表示的。但在实际测定时,一般都采用斐林法和次亚碘酸盐法等定量测定还原糖总量的方法。我们在糖化酶研究工作中发现,用上述方法能比较准确地测定出红曲霉的糖化酶活力,但用来测定黑曲霉糖化酶活力时则往往数值偏高,尤其当发酵液  $\text{pH} > 4$  时,误差更大。其原因是由于黑曲霉发酵液中同时含有一定量的  $\alpha$ -淀粉酶,该酶作用于淀粉后生成了相当数量的还原糖。同时,黑曲霉发酵液中  $\alpha$ -淀粉酶含量随菌种而异,且当发酵液  $\text{pH}$  越高时, $\alpha$ -淀粉酶含量也越高。这就给糖化酶菌种的选育工作以及葡萄糖、酒精等工业生产上决定糖化酶的加酶量带来一定困难。为此我们采用粗制的葡萄糖氧化酶就专一测定糖化酶活力的方法进行了试验,得到了较好的结果。例如,我们在几乎不含有  $\alpha$ -淀粉酶的红曲霉菌株 UV-7、UV-14、UV-21、Co6-3 等的发酵液中添加了与黑曲霉 EN257 发酵液中等量的  $\alpha$ -淀粉酶(12 单位/毫升),以不添加  $\alpha$ -淀粉酶的红曲霉菌株发酵液作对照,分别用葡萄糖氧化酶法和碘量法测定其糖化酶活力,比较测定结果(见表 1)。

以上结果表明,当红曲霉各菌株发酵液中混有  $\alpha$ -淀粉酶时,用碘量法测定会造成 25% 以上的误差,但用葡萄糖氧化酶法测定的结果与对照差别不大。

## 一、原理

葡萄糖氧化酶专一地氧化  $\beta$ -型葡萄糖(在葡萄糖液中, $\alpha$ -型葡萄糖和  $\beta$ -型葡萄糖存在着动态平衡,随着  $\beta$ -葡萄糖的被氧化,最终所有  $\alpha$ -

表 1 添加与不添加  $\alpha$ -淀粉酶的红曲霉糖化酶液用两种糖化酶活力测定法测定结果的比较

红曲霉糖化酶液	$\alpha$ -淀粉酶	糖化酶活力(单位/毫升)	
		葡萄糖氧化酶法	碘量法
UV-7	不加	802	764
	加	790	959
UV-14	不加	796	764
	加	802	966
UV-21	不加	706	714
	加	700	908
Co6-3	不加	778	678
	加	760	944

葡萄糖全部转变成  $\beta$ -葡萄糖而被酶所氧化。)生成葡萄糖酸和过氧化氢。在有过氧化物酶同时存在的条件下,过氧化物酶催化过氧化氢氧化某些物质(如联[邻]甲氧苯胺、联[邻]甲苯胺、酚酞、亚铁氰化钾等),这些物质氧化后从无色型或白色型转变为有色型,显色的深度取决于氧化的程度,由比色测定就可以计算出葡萄糖的含量。

## 二、测定方法

### (一) 试剂

100 毫升葡萄糖氧化酶试剂由以下几部分组成:

葡萄糖氧化酶液(110 单位/毫升,由北京化工厂供给)10 毫升;

过氧化物酶(上海东风试剂厂生产的辣根过氧化物酶)25 毫克溶于 14 毫升水;

联[邻]茴香胺( $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_2$ , 即联甲氧基苯胺,北京化工厂出品)30 毫克溶于 6 毫升 95% 酒精;

Tris-甘油缓冲液(由 0.5M、 $\text{pH}7.0$  的三羟

甲基氨基甲烷溶液与等体积的纯甘油混合而成) 70 毫升。

## (二) 操作步骤

1. 将待测的糖化酶液稀释到 60 单位/毫升以下；

2. 吸 0.6 毫升稀释的糖化酶液至 9 毫升淀粉液(由 100 毫升 2% 可溶性淀粉液和 20 毫升 pH4.6 醋酸缓冲液组成)中,于 40℃ 反应 1 小时,煮沸 5 分钟以终止酶反应；

3. 将上述已终止反应的酶反应液稀释至适当浓度(即葡萄糖含量为 10—90 微克/毫升)；

4. 取 2 毫升稀释酶反应液装入试管中,再加入 2 毫升葡萄糖氧化酶试剂, 37℃ 水浴反应 30 分钟,加 4 毫升 5N 硫酸中止反应,摇匀后用 72 型分光光度计于 525 毫微米作比色测定,记录光密度(O. D.)值。呈现的红紫色在室温下 12 小时内比较稳定。

5. 用 10—100 微克/毫升的标准葡萄糖代替稀释酶反应液进行同样操作,绘制标准曲线。

用蒸馏水代替样品进行同样操作,作为以上比色的对照。

## (三) 糖化酶活力\*的计算

$$\begin{aligned} \text{酶化酶活力(单位/毫升)} = & \\ & \frac{\text{酶反应液中葡萄糖浓度(毫克/毫升)} \times}{0.6 \text{ (加酶液毫升数)}} \times \\ & \frac{9.6 \text{ (酶反应液总体积毫升数)}}{\text{酶液稀释倍数}} \end{aligned}$$

## 三、几点说明

1. 实验确定试液葡萄糖浓度在 0—90 微克/毫升范围内时,标准曲线为通过原点的一直线(如图),故酶反应液必须稀释到这个范围内才能进行测定。

由于要得到完全重复的标准曲线,需要比较严格的操作。因此为了确保测定的结果准确,最好每次测定时都选取某个浓度的标准葡萄糖液(如 50 微克/毫升)同时进行测定,作为计算时的标准,则:

$$\text{酶反应液中的葡萄糖浓度(毫克/毫升)} =$$

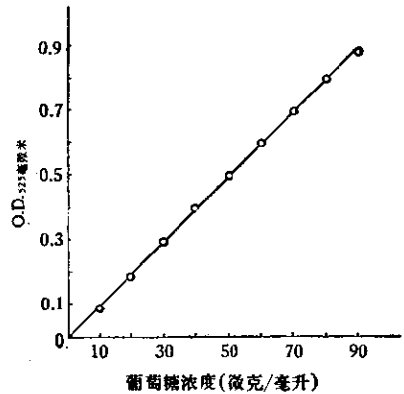


图 1 葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖浓度的标准曲线

$$\frac{\text{标准葡萄糖液浓度(微克/毫升)} \times \text{试液 O.D. 值}}{\text{标准葡萄糖液 O.D. 值}}$$

$$\times \text{酶反应液稀释倍数} \times \frac{1}{1000}$$

若标准曲线不通过原点,适当增加葡萄糖氧化酶试剂中的过氧化物酶浓度即可纠正。

2. 葡萄糖氧化酶试剂最好使用时现配,如配制后置冰箱暗处可保存半个月。

3. 由于葡萄糖氧化酶液中同时混杂有麦芽糖酶和其它  $\alpha$ -葡萄糖苷酶,因此为了达到专一测定糖化酶活力的目的最好用 Tris-甘油缓冲液。因为缓冲液中的两种成分都有抑制麦芽糖酶和其它  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的能力。实验证明,若在葡萄糖液中加入 10 倍于葡萄糖浓度的麦芽糖,再分别用 Tris-甘油和磷酸缓冲液配制的葡萄糖氧化酶试剂测定其中的葡萄糖浓度,结果发现用 Tris-甘油缓冲液时,混入的麦芽糖对葡萄糖的测定几乎没有影响,但用磷酸缓冲液时,测得的葡萄糖浓度偏高 4.3%。

4. 根据我们的实验得知,当发酵液中糖化酶活力(糖化酶活力单位/毫升)与  $\alpha$ -淀粉酶活力( $\alpha$ -淀粉酶活力单位/毫升\*\*)之比值  $\geq 50$  时,才适用于葡萄糖氧化酶法测定,若此比值  $< 50$ ,由于  $\alpha$ -淀粉酶作用使糖化酶的底物分子变小也会使测定结果造成较大的误差。

\* 糖化酶活力定义: 酶液作用于可溶性淀粉, 1 小时生成的葡萄糖毫克数。

\*\*  $\alpha$ -淀粉酶活力系按无锡酶制剂厂的测定和计算方法。