

旋光法测定葡萄糖异构酶活力

胡学智

(上海市工业微生物研究所,上海)

史济平

(上海汽水厂,上海)

葡萄糖异构酶的活力以规定条件下单位时间内生成的果糖量表示。测定果糖的既有方法中,吡唑-半胱氨酸盐法手续麻烦^[1],旋光法则因多种糖混存而使工作量加大。因此这两种方法在测定大批样品时都不理想。我们参考丹麦 Novo 公司和美国 Miles 公司有关资料,以玫瑰暗黄链霉菌 (*Streptomyces roseofulvus*) KC-13-575 菌株的葡萄糖异构酶为对象,就旋光法测定葡萄糖异构酶活力进行了研究,对原有方法作了改进。本文所介绍的方法,较宜用于大批样品的常规测定。

一、原理

葡萄糖在葡萄糖异构酶的催化下转变为果糖。两种糖的比旋光度相差悬殊(葡萄糖为 $+53^\circ$,果糖为 -92°)。当两种糖共存时,由比旋光度的变化可测定果糖的生成量,从而计算出酶的活力。

二、测定方法

(一) 试剂

1. $0.25M$ $MgSO_4-0.025M$ $CoCl_2$ 溶液。
2. $2M$ 高氯酸。
3. pH 6.8 顺丁烯二酸钠缓冲液: 19.6 g 顺丁烯二酸酐或 23.2 g 顺丁烯二酸加 8 g NaOH 溶于 1 l 水中,配成 $0.2M$ 顺丁烯二酸钠溶液,取此溶液 50 ml,加 44.4 ml $0.2M$ NaOH 溶液配成。
4. 葡萄糖底物溶液: 用绝干葡萄糖配成 62.5% 的溶液,其中含有 5% 体积的试剂 1 (此溶液一周内有效)。测定时,先用 $2N$ NaOH 溶液调节 pH 至 6.8,再加入试剂 3 稀释 1 倍。

(二) 供试酶液

1. 发酵液: 玫瑰暗黄链霉菌 KC-13-575 培养于下述培养基中(%) : 麸皮 3, 脱脂黄豆粉 1, 米糠粉 1, Na_2HPO_4 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, NaH_2PO_4 0.1, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.024%, $30^\circ C$ 摇瓶培养 3 天后,用 60 目尼龙纱网滤去麸皮即作为供试酶液,含胞内酶与胞外酶各 50%,细胞破壁与否不影响本菌胞内酶活力测定。

2. 固定化酶: 取 1 g 固定化酶,加少量生理食盐水,研钵中研成浆状,加生理盐水定容到

50 ml 后供试。

(三) 测定操作

取 25 ml 带塞比色管二支, 各加底物溶液 10 毫升, 70°C 预热 5 分钟, 各加入酶液 1 ml (含 124—372 单位范围内), 一支先加入高氯酸 1ml 作空白对照, 70°C 水浴保温 1 小时后, 另一支加入高氯酸 1ml。再分别用蒸馏水定容到 25 ml, 过滤得透明滤液, 各取滤液用 10cm 测量管在国产 WXG-6 型自动旋光仪上测定比旋光度。设样品的比旋光度为 α_1 , 空白对照的比旋光度为 α_2 。

(四) 酶活力的计算

规定每小时由每 ml (或 g) 异构酶溶液催化生成 1 mg 果糖为 1 个酶活力单位 (1GIU)。即:

$$\text{酶活力} = \frac{(\alpha_2 - \alpha_1) \times 1000}{145}$$

$$\times 25 \text{mg 果糖/ml} \cdot \text{h}$$

式中“145”为假定全部葡萄糖均变为果糖时的比旋光度变化(由 +53° 变为 -92°), “1”为反应时间, “25”为供试反应液总体积。

三、改良方法的研究

上述改良方法是经一系列对比试验后建立的。这些试验主要着眼于测定手续的简化。

(一) 缓冲液的选择

Miles 公司采用 pH7.6 的 Tris 缓冲液。我们发现, 在测定葡萄糖异构酶活力时, 如果反应系统的 pH 在 7.0 以上时, 即使没有酶, 葡萄糖也会有较多量转变为果糖, 在 pH 6.5 时转化率为 6.2%, 而 pH 7.5 时则可高达 20%。因此以前的测定方法中除了测定反应液的 α_2 与酶空白 α_1 外, 还必须增测底物空白与碱转化空白的 α 值, 以致手续很繁。要简化手续, 关键是降低 pH, 减少碱转化率, 需要选择一种既不产生碱转化又不影响酶活力的 pH 环境。我们使用 pH 6.8 的顺丁烯二酸钠缓冲液, 由于非酶催化的葡萄糖异构化反应较弱, 故可免去后二种对照。

文献报道^[2-5], 磷酸盐和 Tris 缓冲液对葡萄糖异构酶有抑制作用。我们用三种缓冲液对凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 的固定化葡

萄糖异构酶, 米苏里游动放线菌 (*Actinoplanes missourinensis*) 和玫瑰暗黄链霉菌发酵液的葡萄糖异构酶活力进行了测定, 结果证实磷酸盐对三种不同来源的该种酶都有抑制作用, 而使用顺丁烯二酸钠缓冲液时, 即使在 pH 6.8 测定的酶活力也比其他缓冲液最适 pH 时为高(表 1)。

表 1 磷酸盐对异构酶的抑制作用

缓冲液	酶活力		
	凝结芽孢杆菌	玫瑰暗黄链霉菌	米苏里游动放线菌
磷酸盐缓冲液(pH 6.8)	1360	80*	248
Tris 缓冲液 (pH 7.6)	2790	118	420
顺丁烯二酸钠缓冲液 (pH 6.8)	3070	127	481

* pH 7.4 (此 pH 为用该缓冲液测定时的最适 pH)。

(二) 关于酶反应温度与时间的选择

我们分别用 pH 6.72 的顺丁烯二酸钠缓冲液和 pH 7.53 的 Tris 缓冲液配制底物溶液, 用 60°, 2 小时和 70°C, 1 小时分别进行反应, 测定酶活力, 结果(表 2)表明, 两种条件都可以采用。但为了节省时间, 我们采用 70°C, 1 小时的测定条件。

表 2 两种反应条件下的酶活力测定结果

酶活力 (单位) 缓冲液	反应条件	
	60°C, 2小时	70°C, 1小时
pH 6.72 顺丁烯二酸钠	54.63	113.72
pH 7.53 Tris	52.22	102

(三) 反应体系的体积

Miles 公司所采用的方法中, 反应体系中底物溶液为 40 ml, 我们将其减少到 10 ml。结果两种方法的效果很接近。这样可以节省较多试剂, 并利于操作。

(四) 其它

1. 金属离子对酶活性的影响: Mg^{2+} 和 Co^{2+} 对酶有明显激活作用, 与文献报道^[6]一致; Ni^{2+} , Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 等有明显抑制作用。

2. 酶液浓度: 在 20 ml 底物中加入浓度不同的酶液, 测定酶的活力。发现在 124—372 单位的酶量范围内, 酶量与果糖生成量呈线性关系, 酶量在 370—620 单位范围内测定结果比 124 单位者低 8% 因此, 用 10ml 底物时, 加 1 ml 含酶在上述范围内的酶液即可。

3. 底物浓度: 葡萄糖浓度在 20% 以上时, 对酶活力的测定无影响。

4. 微生物细胞壁的影响: 用超声波处理和加溶菌酶使发酵液中微生物细胞壁破坏, 然后再用不同浓度底物测定其中葡萄糖异构酶活力, 发现与未处理时结果一样, 所以细胞壁对此酶活性测定无影响。

四、方法的准确性

用改进后的旋光法和吡唑-半胱氨酸盐法测定三种葡萄糖异构酶 (Miles 公司产固定化酶和链霉菌 KC-13-575 以及游动放线菌产生的酶) 的活力, 其结果见表 3。由此可见两种方法所得结果几乎完全相同。用以上两种方法

分别对 KC-13-575 菌株 11 个发酵液样品进行测定, 平均偏差为 $\pm 1.9\%$ 。

表 3 两种方法测定葡萄糖异构酶活力之比较

酶来源	方法		B/A
	旋光法 (A)	吡唑-半胱氨酸盐法 (B)	
Miles 公司生产	4733	4950	1.04
链霉菌 KC-13-575 产	90.8	96.2	1.05
游动放线菌	643	610	0.95

参 考 文 献

- [1] Zacharlas, D. et al.: *J. Biol. Chem.*, **192**: 583, 1951.
- [2] Danno, G.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**: 1805 1970.
- [3] Kasumi, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **52**: 321, 1974.
- [4] Yamanaka, K.: *Methods in Enzymol.*, Vol. 9 (ed. by Colowick, S. P.), Academic Press, New York, 1966, p. 588.
- [5] Vakeri, M. et al.: *Process Biochem.*, **8**: 5, 1977.
- [6] Takasaki, Y.: *Agr. Biol., Chem.*, **30**: 1247, 1966.