

# 一种纤维素酶活性换算方法

## 从滤纸酶解率推算木粉酶解率

李 传 友

(中国科学院微生物研究所,北京)

**摘要** 根据纤维素酶是一个复合酶系的特点,兼顾到菌体生长在不同条件下酶系的可能变化,选择了十个不同的条件制取酶液,用以考察滤纸酶活性与木粉酶活性之间的定量关系。实验证明,二者的酶活性具有一致的相关性,并从中导出  $y = kx + b$  直线方程,直线的斜率  $k = 3.15$ , 截距  $b = 26.4$ 。应用这个方程,可以用滤纸代替木粉为底物,用 2 小时的酶解时间测定滤纸的酶解率,代入方程推算出酶解 72 小时的木粉酶解率。计算值与实测值极为接近。

**关键词** 纤维素酶;木粉

在纤维素酶的应用研究工作中,多以底物的最终转化率来表示酶活性的高低。从酶解底物的最大效果着眼,这无疑是一种可靠的方法。然而,反应时间较长,以纤维素酶水解木粉为例,要达到最大的酶解率,需要反应 72 小时以上。而一些现成的、用于相对比较的一般基础酶学方法,虽然快速方便,但都不能直接代表木粉的真正酶解率。Mandels 等人<sup>[1-3]</sup>曾建立了用滤纸作底物测定纤维素酶活性的方法,并与其它底物进行了比较,认为滤纸对酶的敏感性不算太小,对酶的抗性也不算大,反应速度较快,是测定酶活性的一种较好的底物。我们赞同这

种观点。为了能够直接而又及时地监测发酵罐中酶活性的状况以选择最优的放罐时机,根据纤维素酶是一个复合酶系的特点,兼顾到菌体生长过程中酶系的不断变化,我们摸索了以滤纸为底物的快速测定方法与以木粉为底物的费时测定方法的共同规律(羧甲基纤维素钠也常被用作测定纤维素酶活性的底物,酶解速度比滤纸快,但那是一种极度变性的纤维素,与天然木粉相差甚远,故不采用),找出它们的相关性,建立一个快速监测纤维素酶生产过程中酶活性

---

谢玉梅同志参加部分测定工作,特此致谢。

变化的方法。

### (一) 计算的基础——相关性

用不同培养时间得到的酶液作了大量酶解试验,证明滤纸酶解率与木粉酶解率之间呈正相关性。用两种底物测定酶活性,其相关性的存在提供了相互换算的基础。下面是10种不同培养条件的酶液分别水解滤纸与木粉的酶解率情况(表1)。

表1 不同产酶阶段的酶液对滤纸及木粉的酶解效果

不同培养时间的酶液(h)	酶活性		培养基 A*		培养基 B**	
	滤纸酶解率(%)	木粉酶解率(%)	滤纸酶解率(%)	木粉酶解率(%)	滤纸酶解率(%)	木粉酶解率(%)
40	0.57	20.71	0.21	20.38		
48	2.90	36.00	1.65	30.79		
57	4.66	41.42	3.53	37.66		
72	4.99	41.76	3.88	37.80		
120	5.78	43.86	4.48	40.54		

\* 以血陈作氮源培养的酶液

\*\* 以黄豆饼粉作氮源培养的酶液

### (二) 测算方法

#### 1. 固定酶解条件

①木粉酶解条件: 阔叶树混合木粉<sup>[4]</sup> 1g, 加 0.1M pH 4.6 醋酸缓冲液 5ml (含 0.02% 苯甲酸钠防腐), 带菌体酶液 5ml, 摇匀, 45℃ 保温 72 小时, 定容到 500ml, 过滤, 取滤液 1ml 移入 25ml 比色管中, 加 DNS 试剂<sup>[5]</sup> 3ml, 摇匀, 在沸水浴中煮沸 15 分钟, 用蒸馏水定容到 25ml, 摇匀, 在 550nm 测定吸光度。对照是等量的酶液及缓冲液。用葡萄糖作标准曲线计算木粉酶解率。用酶解率来表示酶活性的高低。

② 滤纸酶解条件: 这里关键的问题是酶解时间的选择。(图1)

从酶解速度曲线中看出,酶解在 2—4 小时内是一条直线,说明这是酶解初速度的时间范围。由于酶解 2 小时的结果较稳定,尚能满足时间短这一要求,所以我们选定酶解时间为 2 小时。下面是滤纸酶解的具体条件: 在 12 × 14 mm 试管中加入酶液 1ml, 0.1M pH 4.6 醋酸缓冲液 5ml, 摇匀, 45℃ 水浴中预热 10 分钟, 加入 1 × 5cm Whatman 滤纸条 1 条(或新华滤纸),

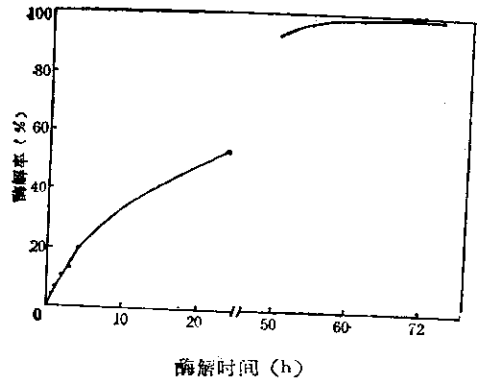


图1 滤纸酶解速度曲线

让滤纸条自然浸没于酶液中,在 45℃ 保温 2 小时,取出立即将滤纸条除去,冷却,离心取上清液 1ml,加 DNS 试剂 3ml,在沸水浴中煮沸 15 分钟,在 550nm 比色测定还原糖。对照用同量酶液及缓冲液,但不加滤纸条。根据葡萄糖标准曲线计算滤纸酶解率,用滤纸酶解率来表示酶活性的高低。

2. 绘制测算曲线及导出计算方程式: 表1即是按照上述条件测算出来的两套数据。这些数据可以代表整个菌体培养过程中各个阶段酶系的变化,也代表了在两种培养基中可能的酶系上的差别。可以明显地看出,它们都具有一致的相关性。这样,就可以用木粉酶解率为纵坐标,滤纸酶解率为横坐标,一一对应作图,得到如下的曲线(图2)。

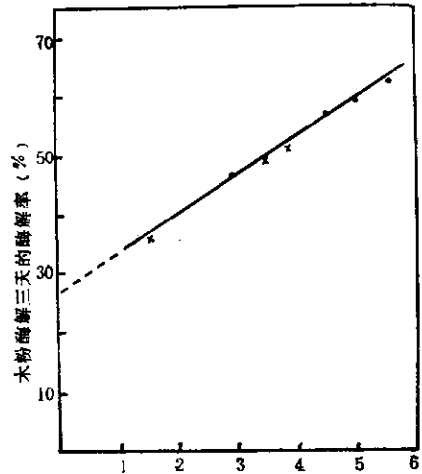


图2 测算曲线

在选定的实验条件下, 滤纸酶解率在 2—6% 区间是一条直线, 可用直线方程  $y = kx + b$  表示。延伸直线与  $y$  轴相交, 得截距  $b = 26.4$ , 直线斜率  $k = 3.15$ 。当条件不变时, 用测得的滤纸酶解率查出直线中相应的纵坐标位置, 便是木粉酶解率的值。当然, 也可以把滤纸酶解率的值代入方程式中计算, 求出木粉酶解率的值。

表 2 实测值与计算值对照表

实测值		计算值*	实测值		计算值*
滤纸 2 小时的酶解率(%)	木粉 72 小时的酶解率(%)		滤纸 2 小时的酶解率(%)	木粉 72 小时的酶解率(%)	
2.13	32.19	33.10	3.98	39.88	38.94
3.34	38.81	36.92	4.67	40.76	41.11
4.70	40.68	41.21	5.19	43.62	42.75
5.49	43.33	43.69	3.38	34.20	37.05
5.14	42.29	42.59	3.66	37.14	37.93
5.49	43.10	43.69	3.74	38.40	38.18
5.38	42.55	43.35	3.64	38.50	37.87
5.38	42.88	43.35	3.74	38.90	38.18
5.38	43.53	43.35	4.23	39.20	39.73
5.38	43.91	43.35	3.92	39.50	38.75
5.50	43.58	43.72	3.43	39.70	37.20
5.23	42.29	42.87	4.13	41.60	39.41
5.41	43.73	43.44	4.90	42.20	41.84
2.18	33.59	33.27	4.90	42.70	41.84

\* 数据按  $y = kx + b$  计算得到

利用这个方程式作了一些实地测算, 结果列于表 2。

从结果看出, 实测值与计算值都很接近, 其偏差一般都在误差范围之内。因此, 这一测算方法是正确可行的。

### (三) 讨论

滤纸酶解率在 2—6% 区间内, 计算值与实测值相符。滤纸酶解率 6% 不是上限。

本法用作监测发酵罐中以木粉转化率表示酶活性的状况, 便于判断放罐时机。这不仅可以保持计量单位的连贯性, 且避免引进其它间接的计量单位使得数据处理复杂化。从滤纸酶活性与木粉酶活性的线性对应关系看来, 也从某种程度证明, 用纸滤为底物反映纤维素酶的活性具有一定的普遍意义。

### 参 考 文 献

- [1] Mandels, M. et al.: *Biotechnol. and Bioeng. Symposium*, 6: 21, 1976.
- [2] Mandels, M. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 16: 1471, 1974.
- [3] Mandels, R. and J. Werber: *Advan. Chem. Ser.*, 95: 391, 1969.
- [4] 中国科学院微生物研究所纤维素酶组: 微生物学通报, 6(3): 17, 1979.
- [5] Miller, G. L.: *Analyt. Chem.*, 31: 426, 1959.