

pNPG 法测定纤维素酶系中 β -葡萄糖苷酶

姚卫蓉 丁霄霖

(无锡轻工大学食品学院 60# 无锡 214036)

摘要 本文报道快速测定 β -葡萄糖苷酶活力的方法。此法以 pNPG 为底物,利用 β -葡萄糖苷酶将其分解成 pNP 及葡萄糖,而 pNP 在碱性条件下显色的原理测定酶活。通过对各测定条件的研究,确定了测定方法。

关键词 β -葡萄糖苷酶,酶活,测定

分类号 Q93-37

以对硝基酚- β -葡萄糖苷(pNPG)为底物测定纤维素酶活,目前,没有一个统一的标准,很难比较各文献中的酶活大小。本文通过试验,以期有一个共同的标准。

1 材料与方法

1.1 试剂

pNPG:Sigma 公司,水杨酸:Boyer 进口分装。

1.2 缓冲液及其它溶液

0.2mol/L Na_2HPO_4 -0.1mol/L 柠檬酸缓冲液 pH3.0~7.5(间隔 0.5);

1mol/L Na_2CO_3 溶液; pNPG 溶液: 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5mmol/L。

1.3 菌种

无花果曲霉 101:上海工业微生物研究所菌种站提供。

1.4 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法

见参考文献 [1]。

2 结果与讨论

2.1 β -葡萄糖苷酶活力的测定

由于 pNPG 试剂国内没有生产,因此国内测该酶活力通常用 DNS 比色法,而国外用 pNPG 为底物测酶活方法中条件各不一样。而且酶的来源不同,其酸、碱及温度适应性就不同,酶活力测定条件就有差异。

2.1.1 缓冲液 pH: 用 0.2mol/L Na_2HPO_4 -

0.1mol/L 柠檬酸缓冲液,试验 pH4~6 范围内酶活的最高点,得到最佳 pH 为 4.5 左右。

2.1.2 底物浓度:根据 Henri 研究^[2],低底物浓度时,并非所有的酶分子都能与底物相结合,随着底物浓度的增加,愈来愈多的酶分子与底物相结合,最后,直至所有分子都与底物相结合,此时,进一步增加底物浓度也不能提高反应速度,速度达到最高值。试验了不同底物浓度(1~10mmol/L)对反应速度的影响,浓度在 0~2mmol/L 之间时,随着底物浓度的增加,反应速度直线上升,浓度达到 5mmol/L 时,速度至最高值,再提高浓度,速度不再增加。因此,测酶活力时,底物浓度可取 5mmol/L。

2.1.3 反应时间和反应温度:当反应时间为 5min 时,在反应温度为 30~60℃ 范围内,反应速度随着温度的升高而呈直线上升;当反应进行至 10min,在 60℃ 的反应温度时,反应速度有所下降;当反应进行到 15min,55℃ 时,反应速度已经开始下降。测酶活力时,希望反应速度较大,而 3,5-二硝基水杨酸比色法测酶活时,反应温度为 50℃,为了与此法有可比性,反应温度取 50℃,时间 10min。

2.1.4 最大吸收峰:验证了最大吸收峰在 410nm 处。

本课题为国家“八五”攻关项目

1997-05-14 收稿

综上所述,得到酶活力测定方法如下:取 0.1ml 适度稀释的酶液,加入 0.9ml pH4.5 的 $0.2\text{mol/L Na}_2\text{HPO}_4$ - 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液, 50°C 水浴预热 10min,再加入已预热 10min 的 5mmol/L pNPG 溶液 1ml,计时,10min 后立即加入 1ml $1\text{mol/L Na}_2\text{O}_3$ 溶液终止反应,室温放置 5min,410nm 处测消光值 OD。以加热失活的酶液按照同样方法处理作空白。

酶活单位定义:每 min 每 ml 酶液水解 $1\mu\text{mol}$ pNPG 的酶活力为一个酶活单位 u。

2.2 与 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法相对比

用两种方法分别测定无花果曲霉 β -葡萄糖苷酶活力,以 pNPG 为底物用作者得到的最佳条件测得的酶活为 12.54u/ml ,而以水杨酸为底物,DNS 比色法得到的酶活力为 9.30u/ml ,两者之比 100:74.2。根据文献报道^[3],一般 β -葡

萄糖苷酶对 pNPG 及水杨酸的水解活力为 100:70,两者数值相符。因此,本方法是可行的。

本文所述方法在测定无花果曲霉 β -葡萄糖苷酶时总结得到的,采用此方法测定 β -葡萄糖苷酶活力,不受纤维素酶系中其它组分影响,得到的酶活力完全反映 β -葡萄糖苷酶的活力,而且此方法简便快速,非常适合于大批量筛选菌种时采用。作者运用此法成功地选育出 β -葡萄糖苷酶高产菌株,为课题的进一步深入奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 蔡武城,袁厚积编. 生物物质常用化学分析法. 北京:科学出版社,1982.
- [2] 王璋编著. 食品酶学. 北京:轻工业出版社,1990.
- [3] Bruce Eberhart. J Bacteriology. 1964.87(4):761~770.