

转苷酶活性测定方法

陈烨璞 汪云 胡学铮

(无锡轻工大学化学工程系,无锡 214036)

摘要 对测定糖化酶中葡萄糖苷转移酶(转苷酶)酶活的方法进行了研究。采用 α -M G 为底物,用 knight-Allen 法测定转苷酶催化 α -M G 分解产生的葡萄糖,计算得转苷酶酶活值。通过条件试验,找到了底物浓度、碱性铜试剂用量、加热时间、滴定剂浓度等的最佳范围。并测定了 3×10^4 , 5×10^4 , $6 \times 10^4 \mu\text{mol}/\text{min}$ 糖化酶粉剂和发酵液中的转苷酶活性,做了酶法、光度法与该方法的对比试验。

关键词 葡萄糖苷转移酶;糖化酶;酶活

中图分类号 TQ925.9

0 前言

发酵法生产的糖化酶中常有转苷酶。在糖化酶催化麦芽糖及淀粉产生葡萄糖时,转苷酶则将少量底物催化产生低聚糖(如异麦芽糖),从而影响酶法生产葡萄糖的质量,所以在糖化酶生产中应监测和控制转苷酶的活性。另外,转苷酶催化葡萄糖产生的低聚糖对双歧杆菌生长有利,对人体保健有积极意义,人们对转苷酶的研究也日趋重视,而转苷酶的测定方法国内未见详细报道。笔者移植 Knight-Allen 定糖法^[1]测定转苷酶,则无需分离,且方法简便、快速、准确。

1 试剂和方法

1.1 主要试剂

α -M G 葡萄糖:生化试剂;

EDTA NaAc HAe NaOH AR试剂;

固体指示剂:0.5 g 紫脲酸铵、0.15 g 次甲基蓝和 40.00 g NaCl 混合研磨而成,放置干燥器内备用。

碱性铜试剂:1)取 40 mL 6 mol/L NaOH 加入约 600 mL 蒸馏水,加入 25 g 碳酸钠和 25 g 酒石酸钾钠摇匀、溶解。2)将 6.000 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶解于约 100 mL 蒸馏水中,将此溶液和上述碱性酒石酸钾钠溶液一并移入 1 000 mL 容量瓶中,稀释至刻度。

粉剂糖化酶、糖化酶发酵液:由无锡酶制剂厂提供。

1.2 实验方法

根据 $\alpha\text{-MG} \xrightarrow[40^\circ\text{C}]{\text{转糖苷}} \text{葡萄糖}$ 反应式中的 $\alpha\text{-MG}$ 只能被转苷酶催化分解,而糖化酶,淀粉酶对 $\alpha\text{-MG}$ 均无作用这一特征,在含糖化酶的 $\alpha\text{-MG}$ 试液中加入过量的碱性铜试剂,由 $\alpha\text{-MG}$ 分解产生的葡萄糖将试剂中部分的 Cu^{2+} 还原 Cu_2O 沉淀 再用 EDTA 标准液滴定过剩的 Cu^{2+} ,由求得的葡萄糖含量,计算出转苷酶酶活^[1]。

测定步骤如下:

- 1) 取 0.5 mL 4% $\alpha\text{-MG}$, 0.5 mL 0.002 mol/L NaAc-HAc, 0.500 mL 酶液,在 40°C 恒温槽反应 60 min.
- 2) 加入 0.5 mL 0.1 mol/L NaOH 终止酶反应。取出静置 5 min.
- 3) 准确加入 2.00 mL 费林试剂
- 4) 在沸水浴上加热 10 min,迅速冷却
- 5) 以紫脲酸铵为指示剂,用 0.002 mol/L EDTA 标准液滴定至溶液颜色由绿变紫为终点
- 6) 按标准曲线上查得体系中葡萄糖含量。

1.3 标准曲线的制作

在文中 1.2 测定步骤中第 1 步不加酶液,而加入系列浓度的葡萄糖 0.5 mL。其余步骤均同。制作 EDTA 用量—含糖量标准曲线,见图 1。

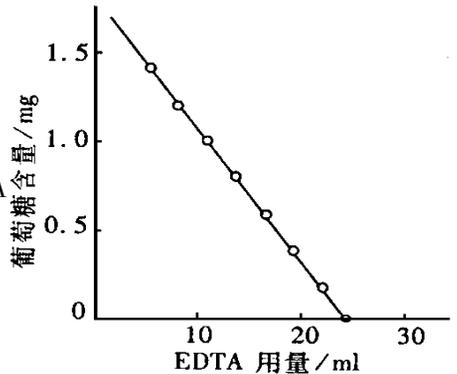


图 1 标准曲线

2 结果和讨论

2.1 底物浓度的选择

由动力学原理可知,只要底物浓度足够大,即可使 $\alpha\text{-MG}$ 分解产生的葡萄糖浓度只与酶浓度有关而与 $\alpha\text{-MG}$ 浓度无关。但试剂 $\alpha\text{-MG}$ 中常含有少量游离葡萄糖,随 $\alpha\text{-MG}$ 浓度增大游离葡萄糖浓度也增大,使空白值较高而影响测定。通过试验笔者认为: $\alpha\text{-MG}$ 的浓度在 2% ~ 4% 比较合适。此时底物浓度已足够大,游离葡萄糖含量尚不太高,不至影响测定。由于目前国内产糖化酶粉剂中转苷酶活性相当高,故此采用较高的底物浓度,笔者选定 $\alpha\text{-MG}$ 浓度为 4%。

2.2 终止酶反应条件的选择

2.2.1 酶反应时间 由图 2 可知, $\alpha\text{-MG}$ 在转苷酶催化下产生葡萄糖的量与反应时间成正比。因此,必须严格控制反应时间以保证测定结果的准确度。测定可取 30~60 min 为好。车间快速分析可取 30 min。

2.2.2 终止酶反应的酸度 转苷酶在 $\text{pH} > 12$ 时便失活。但当 pH 过大会使碱性铜试剂氧化葡萄糖的反应不易进行。若 $\text{pH} > 14$ 时,加入碱性铜试剂煮沸,体系中就没有或很少有 Cu_2O 产生,给测定带来很大误差。从试验结果看, pH 控制在 12.5~12.8 最为合适。

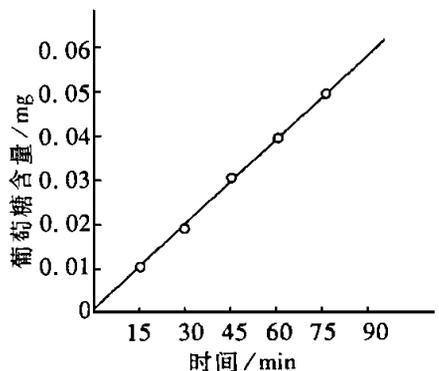


图 2 转糖量与时间的关系

2.2.3 放置时间 由于终止酶反应时溶液为碱性,使酶完全失活需放置一段时间。在此碱性体系中 α -MG分子中已无苷羟基转化为开链式,故在此条件下放置一段时间对测定无影响^[2]。试验结果表明,使酶完全失活放置5 min已足够了。

2.3 碱性铜试剂用量及还原反应条件

碱性铜试剂的作用是利用其含有的 Cu^{2+} 氧化葡萄糖,而过剩的 Cu^{2+} 则用EDTA来滴定。因此体系中含糖量越多,碱性铜试剂消耗也越多。所以,碱性铜试剂的用量要根据被测体系中葡萄糖含量的多少来确定。还原反应是在加热煮沸的条件下进行的,pH控制在12~13,加热时间只要在7 min以上即可。故此选择8~10 min。

以紫脲酸铵-次甲基蓝-NaCl混合物为指示剂,颜色由绿色变为紫色为指示终点。为减小滴定误差,取EDTA浓度为0.002 mol/L,消耗量在5 mL以上,此时滴定误差<1%。

为检验方法的可靠性,做了回收试验。把酶液和0.1 mol/L NaOH先行混合使酶完全失活后,再按制作标准曲线的步骤操作。结果表明,回收率在97%~101%之间,方法重现性良好。

3 样品测定

3.1 粉剂糖化酶中转苷酶的测定

3.1.1 酶液制备 称取5.00 g酶粉剂,加入少量水湿润碾碎,加入缓冲液,转入100 mL容量瓶中定容。4层纱布过滤,取澄清液备用。

3.1.2 测定 空白值:取0.5 mL酶液加0.5 mL 0.1 mol/L NaOH,再加0.5 mL α -MG以及0.5 mL NaAc-HAc缓冲液,按测定步骤进行,测得含糖量即为空白值。

转化值:按测定步骤操作,将测得的总糖量减去空白值,即为转化值。实测数据见表1。

表1 粉剂糖化酶中转苷酶活值

样品种类	$3 \times 10^4 \mu\text{mol/min}$ 粉剂			$5 \times 10^4 \mu\text{mol/min}$ 粉剂			$6 \times 10^4 \mu\text{mol/min}$ 粉剂		
空白 EDTA/mL	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.5	23.5	23.5
空白糖量 μg	110	110	110	110	110	110	90.0	90.0	90.0
总糖 EDTA/mL	18.7	18.6	18.8	15.3	15.4	15.3	15.1	15.2	15.0
总糖量 μg	440	435	445	688	686	688	700	690	710
平均酶活 $/(mol/s)$	2.04×10^{-8}			3.56×10^{-8}			3.76×10^{-8}		

3.2 糖化酶发酵液中转苷酶的测定

3.2.1 酶液制备 发酵液用4层纱布过滤,取澄清液,可根据转苷酶含量和发酵液中含糖量的多少来确定稀释倍数。

3.2.2 测定 同粉剂。实测数据见表2。

表2 发酵液中的转苷酶活值

发酵液种类	发酵 99 h			发酵 83 h		
空白 EDTA/mL	23.7	23.7	23.7	22.2	22.2	22.2
空白糖量 μg	70.0	70.0	70.0	170	170	170
总糖 EDTA/mL	20.5	20.5	20.4	20.8	20.7	20.7
总糖量 μg	300	300	309	280	285	285
平均酶活 $/(mol/s)$	7.10×10^{-9}			3.40×10^{-9}		

3.3 与其他方法比较

我们曾把本方法和 3,5-二硝基水杨酸比色法,葡萄糖氧化酶法比较,结果见表 3.

表 3 几种方法的对比 mol/s

方 法	酶 活			
	$3 \times 10^4 \mu\text{mol}/\text{min}$	$5 \times 10^4 \mu\text{mol}/\text{min}$	$6 \times 10^4 \mu\text{mol}/\text{min}$	99 h 发酵液
比色法	2.16×10^{-8}	3.56×10^{-8}	3.82×10^{-8}	7.23×10^{-9}
氧化酶法	2.02×10^{-8}	3.47×10^{-8}	3.62×10^{-8}	6.87×10^{-9}
本方法	2.03×10^{-8}	3.47×10^{-8}	3.67×10^{-8}	6.92×10^{-9}

由表 3 可知,本方法测定结果介于比色法和酶法之间,而与酶法比较接近。然而,本方法测定步骤远较氧化酶法简便,而重现性更好。

参 考 文 献

- 1 郑集. 普通生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1982, 373~ 375
- 2 王律均. 糖品分析. 北京: 轻工业出版社, 1982, 80~ 82

Determination of Glucosyltransferase Activity

Chen Yepu Wang Yun Hu Xunzhen

(Dept. of Chem. Eng., Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract In this paper, a determination method of glucosyltransferase activity in saccharogenic enzyme is developed. Taking α -MG as a substrate, glucose decomposed from α -MG catalyzed by glucosyltransferase is determined with Knight-Allen method and the activities of glucosyltransferase is calculated. By conditional test, the best limits are obtained for concentration of the substrate, heating period, and concentration of titrant. The activities of glucosyltransferase in saccharogenic enzyme powder and fermentation liquid per 3000, 5000, 6000 unit are determined. The result suggests that this determination method has the advantages of accuracy, quickness and simplicity.

Key words glucosyltransferase; saccharogenic enzyme; enzyme activity

(责任编辑: 陈 娇)