

文章编号: 1001-7453(1999)03-0074-06

还原糖测定方法的规范

管 斌¹, 袁 方², 谢来苏², 隆言泉²

(1. 山东轻工业学院, 山东济南 250100, 2. 天津轻工业学院, 天津 300222)

摘要: 探讨了 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 添加量、显色时间、氧的溶解量、离子强度以及 DNS 显色后存放时间对纤维素酶活力测定的影响。氧的溶解量对测定结果影响显著; 测定波长的变化对检测样品光吸收值的灵敏度和线性范围影响很大, 一般选定 540 nm 为进行纤维素酶活力测定的波长。另外, 当以葡萄糖为标准来测定还原糖时, 不同的测定方法会使得纤维二糖的测定值不同。因此, 在测定纤维素酶酶解产物时, 用 DNS 方法来测定还原糖, 使测定结果更加准确。

关键词: 纤维素酶; 酶活力; 测定条件; 还原糖; 3, 5-二硝基水杨酸

中图分类号: TS207. 3 **文献标识码:** A

纤维素酶活力测定方法的多样性、不准确性以及测定中存在着的难以克服的困难, 给纤维素酶的开发和利用带来了很多不利的影响。其主要原因为:

1) 纤维素酶是由内切 β -1, 4-葡聚糖酶、外切 β -1, 4-纤维二糖分解酶和纤维二糖酶 (或者 β -葡萄糖苷酶) 组成的复合酶系^[1, 2]。各组分的协同作用促使结晶纤维素转化为纤维二糖和葡萄糖。

2) 纤维素酶的作用底物纤维素是不溶于水的高聚糖^[3]。在纤维素与水组成的多相反应体系中, 酶总处于底物不饱和状态, 因此, 难以用测酶反应初速度的方法来测定酶活力^[4]。

3) 酶与纤维素的反应是在固体界面上进行的, 其酶解反应速率受到底物对酶蛋白的吸附速率和产物扩散速率的影响^[5]。

现今, 在纤维素酶活力测定中, 主要是采用测定纤维素酶解反应平均速率的方法。这主要包括测定酶解前后纤维素的溶解量, 如同以 CMC 作底物来测定粘度的方法; 而多数方法是测定底物酶解后还原糖的生成量, 如以葡萄糖为标准, 用 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 法^[6]或 Somogyi 法^[7]等。但是, 由于酶解产生还原糖的种类和氧化能力有所不同, 底物不饱和程度以及酶对纤维素结晶区域和过渡区域水解能力存在差异, 因此会给纤维素酶活力测定带来误差。所以说, 采用的纤维素酶活力测定方法以及测定条件, 都对测定结果有较大影响。本文对纤维素酶活力测定的影响因素进行了分析, 并提出了建议。

收稿日期: 1998-10-16; 修订日期: 1999-05-07

作者简介: 管斌 (1957年1月生), 男, 山东济南人, 工学博士, 副教授。

1 材料与方 法

1.1 材料

酶样 A 由作者所在实验室制备,它是由菌种 *T. reesei* GB 发酵后,经过滤、浓缩制成的酶液.酶样 B 由 Novo 公司生产并提供.

1.2 分析方法

1.2.1 还原糖测定方法 取上清液,按照 Miller^[6]的方法,使用 DNS 试剂,通过测定 540 nm 波长下的光吸收值来确定还原糖的含量,并以葡萄糖为标准来表示.另外,也可用 Somogyi^[7]方法来测定还原糖的生成量.

1.2.2 纤维素酶活力测定方法 采用 Mandels 等^[8]的测定方法.

1) 滤纸酶活 (Filter Paper Activity,简称 FPA): 取 25 mL 的刻度试管,加入经稀释的 0.5 mL 酶液和 1 mL 浓度为 0.05 mol/L 的柠檬酸缓冲溶液,并加入一条 1 cm×6 cm 的滤纸,50℃ 保温 1 h.用 DNS 试剂测定所形成的还原糖量,并扣去空白.其酶活力单位用国际单位 ($1\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$)来表示.

2) CMC 酶活 (CM Case): 取 25 mL 的刻度试管,加入经适当稀释的酶液 0.5 mL 和 1 mL 质量分数为 1% 的 CMC 缓冲溶液,50℃ 保温 30 min.用 DNS 试剂来测定所形成的还原糖量,并扣去空白.其酶活力单位用国际单位 ($1\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$)来表示.

纤维素酶酶活力单位的定义:在酶的催化下,每分钟形成 $1\mu\text{mol}$ 葡萄糖时所用该酶量为 1 个酶活国际单位 ($1\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$).

2 结果与分析

2.1 DNS 测定条件对纤维素酶活力 (还原糖)测定的影响

2.1.1 DNS 与还原糖的显色时间对还原糖测定的影响 DNS 在碱性、沸腾的条件下与糖类化合物的还原基团发生反应并显色. DNS 与还原糖显色后,其颜色深浅的比例可作为还原糖测定的依据.另外,该反应对还原糖种类没有选择性^[9].在试验条件下,

DNS 与还原糖进行反应并显色,显色 (煮沸)时间对还原糖的测定有很大影响.图 1 为显色时间对还原糖测定的影响.可以看出,显色时间在 3 min 内显色液的吸光度随显色时间的延长而增加.3 min 之后,吸光度随时间变化不大.尤其在 5 min 之后,显色后的吸光度已基本趋于稳定.所以,一般取 DNS 与还原糖反应的显色时间为 5 min.

DNS 在碱性、沸腾的条件下与糖

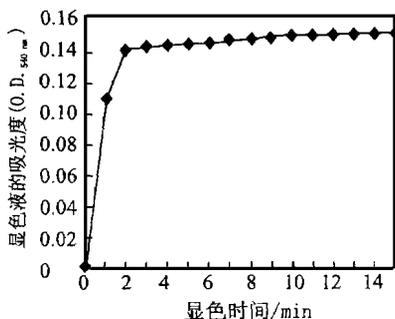


图 1 显色时间对还原糖测定的影响

2.1.2 DNS 添加量对还原糖测定的影响 在试验条件下,DNS 添加量对还原糖测定的影响如图 2 所示.可以看出,随着 DNS 添加量的增加,显色液的吸光度变化不大,但有逐渐增加的趋势.这可能是由于 DNS 添加量的增多使其吸光度增大的缘故. DNS 添加量主要与待测液的还原糖含量有关.一般在纤维素酶活力测定时, DNS 添加量为 3 mL 较适宜,且还原糖含量与吸光度之间的线性范围较宽.

2.1.3 氧的溶解量 (溶液的氧化能力)对还原糖测定的影响 在试验条件下,待测液或者蒸

馏水的氧化性高低直接影响到 DNS 与还原糖显色的比例性,进而影响到对糖测定的准确性.图 3 为氧的溶解量(用 H_2O_2 代替溶解氧添加到待测液中)对还原糖测定的影响.可以看出,随着氧在待测液中溶解量的增加,显色液的吸光度呈现明显的降低趋势.其原因可能是由于 DNS 与还原糖反应实际上是一种氧化还原反应.因此,待测液中氧溶解量的变化对该反应产生显著的影响.

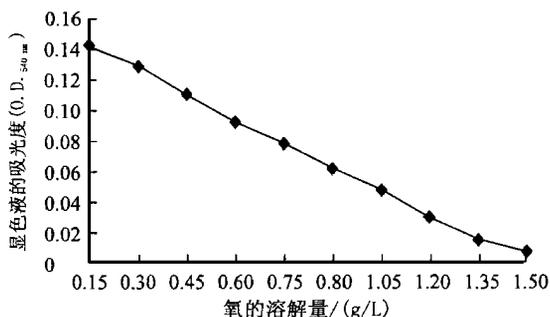
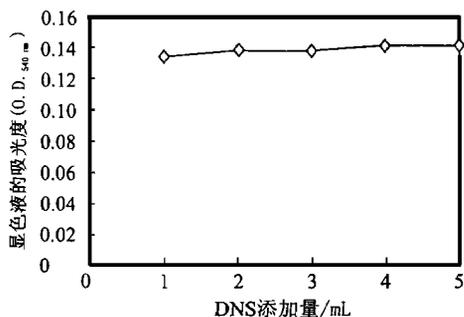


图 2 DNS添加量对还原糖测定的影响

图 3 氧的溶解量对还原糖测定的影响

2.1.4 离子强度对还原糖测定的影响 进行纤维素酶的酶活力测定时,必须在一定缓冲液存在时完成.缓冲液和待测液中的离子强度对还原糖测定的影响如图 4所示.通过在 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液中改变氯化钠浓度来改变溶液的离子强度.可以看出,随着溶液的离子强度增加,其吸光度变化不大,但有缓慢降低的趋势.

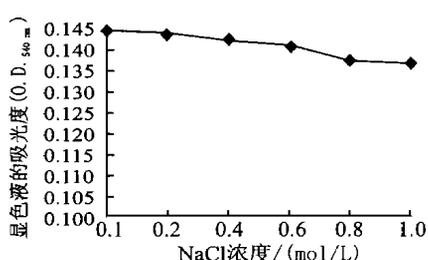


图 4 离子强度对还原糖测定的影响

2.2 测定波长对纤维素酶酶活力测定的影响

在分光比色分析测定时,一般选定最大光吸收值作为测定波长,这样做可获得最大的灵敏度.但在纤维素酶酶活力测定过程中,不同的研究人员^[11,10]所选择的波长有所不同.作者用紫外可见分光光度仪比较了波长对葡萄糖的光吸收的影响,如图 5所示.发现在可见光范围内,显色液在 486 nm 处有较大吸收.作者分别在 486, 510, 540, 570 nm 波长下测得葡萄糖的标准曲线以及相关系数,如表 1和图 5所示.从表 1可看出,不同波长下所得的标准曲线和相关系数存在着差异.波长越短,其标准曲线的相关系数偏离

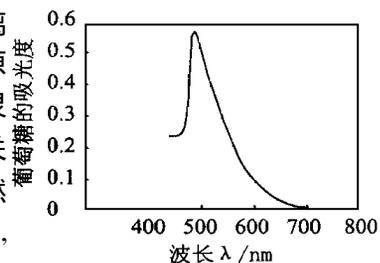


图 5 测定波长对纤维素酶活力测定的影响

的数值越大;随着波长的增加,这种偏离程度变小.究其原因可能是在 486 nm 波长下测定时,存在最大光吸收,所以灵敏度最高;但在此波长下测定,所测得的数据稳定性差,相关系数偏离 1 的数值趋大.在 570 nm 波长下测得的数据,虽然数据稳定性好,但灵敏度偏低.从图 5可以看出,为兼顾两者,540 nm 是在最大光吸收的波长和灵敏度最低的波长中间,既能获得较高的灵敏度,且所测得的数据稳定性又较好.因此,在纤维素酶的酶活力测定过程中,一般取 540 nm 为测定波长.另外,在光比色分析过程中,一般取透光度 20% ~ 80%,吸光度在 0.1~ 0.7 范围内时,测定的数据较准确.从表 1可看出,波长越长,标准曲线的线性范围越宽,这对纤维素酶的酶

活力测定非常有利;另一方面它又使测定的灵敏度降低,给测定带来不利影响.从上面分析可看出,兼顾两者,又照顾到纤维素酶活力测定的实际需要,选 540 nm 为还原糖比色测定的波长较为适宜.

表 1 不同波长下葡萄糖曲线的回归方程相关系数和线性范围

测定波长 /nm	葡萄糖曲线的回归方程	相关系数	线性范围
486	$y = 0.3467x$	0.9796	0.28~ 2.02
510	$y = 0.5852x - 0.1238$	0.9973	0.38~ 1.41
540	$y = 0.4306x - 0.09524$	0.9991	0.45~ 1.85
570	$y = 0.2583x - 0.05714$	0.9992	0.61~ 2.93

2.3 还原糖的种类对纤维素酶活力测定的影响

Miller 等人^[12]曾经指出,用 DNS 等分析试剂对还原糖进行测定时,其纤维素酶解产物不同(如葡萄糖、纤维二糖和其它纤维寡糖).不同的还原糖氧化还原能力存在差异,这种差异不可避免地给测定带来误差,而这些却一直被人们所忽略.图 6 为还原糖的种类对还原糖测定的影响.从图中可看出,以葡萄糖为标准,纤维二糖测定值较之低一些,而木糖测定值则高一些.在进行纤维素酶活力测定时,酶解液中主要含有葡萄糖和纤维二糖以及少量纤维寡糖^[13].由此可以看出,以葡萄糖为标准测定纤维素酶活力,所得到的结果比实际酶活偏低.

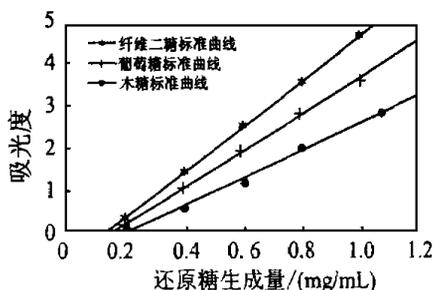


图 6 还原糖的种类对纤维素酶活力测定的影响

2.4 不同测定方法对纤维素酶活力测定的影响

常用的还原糖分析方法有两种,即 DNS 法和 Somogyi 法,能够分析测定葡萄糖和纤维二糖.以葡萄糖为基准,分别用两种方法分析相同含量的纤维二糖,会得出不同的测定值,其结果见表 2.在还原糖测定中, Somogyi 方法会得到更准确的值.可是,纤维素酶解产物,通常不是形成某一类还原糖,而是形成以葡萄糖和纤维二糖为主的,并含有寡聚糖的混合物.在这种情况下, DNS 方法仅有最小误差^[13].

表 2 不同测定方法对纤维素酶活力测定的影响

测定方法	葡萄糖	纤维二糖
DNS	100	85~ 88
Somogyi	100	55~ 58

3 讨 论

3.1 DNS 测定方法的原理和适用性

DNS 方法适于碱性条件, DNS 与还原糖发生氧化还原反应,生成了 3-氨基-5-硝基水杨酸,其产物在煮沸条件下显色,其颜色深浅与还原糖含量有比例关系,利用这一原理测定还原糖的含量.

DNS 与还原糖显色后,其颜色的深浅与糖类游离出还原基团的数量有关,而对还原糖的种类没有选择性. DNS 方法适合用在多糖(如纤维素、半纤维素和淀粉等)水解产生多种还原糖的体系中.对于测定纯的、单一的外切 β -纤维二糖分解酶或者内切 β -葡聚糖酶,用 Somogyi 方法为宜.如果测定一个纤维素酶系对不溶性纤维素的酶解能力,用 DNS 方法较

适宜.

3.2 DNS试剂的组成及其作用

DNS试剂是由 DNS 氢氧化钠、酒石酸钾钠、苯酚和亚硫酸氢钠加蒸馏水配制而成. 配制方法是把 DNS加入一定量的氢氧化钠溶液中,待完全溶解后,加入已溶解的酒石酸钾钠溶液,混合均匀,再加入苯酚和亚硫酸氢钠,贮存于棕色试剂瓶中.在室温下,放置 7~ 10 d后即可使用.

酒石酸钾钠在 DNS试剂中的作用是防止溶解氧的侵入;苯酚的作用是增加 DNS显色后的颜色深度,以及平衡脲形成时对糖测定的影响;亚硫酸氢钠与苯酚配合使显色后颜色更加稳定;碱性环境是 DNS与还原糖作用的条件.

3.3 进行纤维素酶活力测定时 DNS方法的规范

在 25 mL刻度试管中盛有进行纤维素酶活力测定的溶液,加入 3 mL DNS试剂,在沸水中煮沸 5 min进行显色,然后在流水中急速冷却.用蒸馏水定容到 25 mL. 1 h内,在 540 nm波长下比色测定光吸收值,对照葡萄糖标准曲线,查出还原糖的含量.

4 结 语

纤维素酶系作用于水不溶性纤维素,其分解能力可分别用糖化型纤维素酶活力或者纤维素溶解的纤维素酶活力来表述.前者指分解产生还原糖的能力,通常用滤纸酶活和 CM C酶活来表示;后者指纤维素降解为低分子糖的能力,常用 CM C粘度降低法^[14]和滤纸崩溃法^[15]来表示.

由于微生物分泌纤维素酶系的复杂性,底物纤维素又是处于多相复杂体系,天然纤维素除含有纤维素之外还有半纤维素和木素等,这些都给纤维素酶活力和纤维素酶作用机制的分析和纤维素酶的分离精制带来困难.这就要求进一步探讨和改进现有的研究和分析手段,使纤维素酶的研究和利用有所突破,开发和利用丰富的可再生纤维素资源,使之造福于人类.

参考文献:

- [1] GERRIT B, PETERSSON B. Extracellular enzyme system utilized by the fungus for the breakdown of cellulose[J]. Eur J Biochem, 1985, 146: 301~ 308
- [2] WOOD T M. Purification and some properties of a (1,4)-D-glucan glucohydrolase associated with the cellulase[J]. Biochem J, 1968, 109: 217~ 227
- [3] GHOSE T K. Studies on the mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulose[J]. Biotechnol Bioeng, 1979, 21: 131~ 146
- [4] OKAKI M, MOO- YOUNG M. Kinetic of enzymatic hydrolysis of cellulose: Analytical description of a mechanistic model[J]. Biotechnol Bioeng, 1978, 20: 637~ 663
- [5] ERIKSSON K E. Properties and mode of action of cellulase[J]. FEBS Lett, 1974, 49(2): 282
- [6] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Anal Chem, 1959, 31(3): 426~ 428
- [7] SOMOGYI M. A new reagent for the determination of reducing sugar[J]. J Biol Chem, 1952, 195: 119
- [8] MANDELS M. Measurement of saccharifying cellulase[J]. Biotechnol Bioeng, 1976, (6): 21~ 33
- [9] 福田作藏. 还原糖の定量法 [M]. 东京: 学会出版センター, 1989.

- [10] 北京大学生物化学教研室著.生物化学实验指导 [M].北京:人民教育出版社,1979.
- [11] GHOSE G T. Measurement of cellulase activities [J]. Pure Applied Chem, 1968, 59: 257~ 268
- [12] MILLER G L. Measurement of carboxymethylcellulase activity [J]. Anal Biochem, 1961, 2: 521~ 528
- [13] 高培基,刘垂群.研究纤维素酶活时测定还原糖方法的选择 [J].植物生理通讯,1985,2: 51~ 54.
- [14] ALMIN K E. Viscometric determination of carboxymethylcellulase in standard international [J]. Biochem Biophys Acta, 1967, 39: 248~ 253
- [15] NUMMI M, FOX C P. Nephelometric and turbidometric assays of cellulase [J]. Anal Biochem, 1981, 116: 133~ 136

The Modification of the DNS Method for the Determination of Reducing Sugar

GUAN Bin¹, DING You-fang², XIE Lai-su², LONG Yan-quan²

(1. Shandong Institute of Light Industry, Jinan 250100; 2. Tianjin Institute of Light Industry, Tianjin 300222)

Abstract In this paper, the procedure and condition (for example, the dosage of DNS reagent, heating time, dissolving oxygen and ionic strength) on the measurement of reducing sugar were studied. Results show that the choice of measuring wavelength was affected by hydrolysis products. Therefore, the measuring wavelength at 540nm was chosen to expand the liner range of glucose and obtain proper sensitivity and stabler data. On the other hand, when glucose was used as standard, various methods for reducing sugar would give different values. When determining the saccharifying effect of a cellulase complex, the result should be independent of the type of sugar formed. Thus, the error is actually smallest with the DNS method in the case.

Key words saccharifying cellulase activity; testing condition; DNS; reducing sugar