

文章编号:1673-1689(2009)04-0555-04

硫酸铵对 DNS 试剂测定几丁质酶活力的影响

赵祥瑞^{1,2}, 刘建军^{1,2}, 刘丽萍^{1,2}, 李静³, 张家祥^{1,2}, 田延军^{1,2}

(1. 山东省食品发酵工程重点实验室, 山东 济南 250013; 2. 山东省食品发酵工业研究设计院, 山东 济南 250013; 3. 青岛农业大学, 山东 青岛 266109)

摘要: 分析了硫酸铵盐析引起的几丁质酶活力损失的原因, 然后通过考察硫酸铵、硫酸钠、其他铵盐及氨水等对 DNS 试剂测定葡萄糖的影响, 得出结论, 硫酸铵等铵盐的存在, 破坏了 DNS 试剂与还原糖发生显色反应所需要的强碱性环境, 使显色反应不能正常进行, 通过补加氢氧化钠恢复反应体系的强碱环境, 这种干扰可被屏蔽; 最后通过几丁质酶硫酸铵盐析实验进一步验证了实验结论。

关键词: DNS 试剂; 还原糖; 几丁质酶; 糖苷酶; 硫酸铵

中图分类号: Q 939.97

文献标识码: A

Effects of Ammonium Sulfate on the DNS Assay of Chitinase Activity

ZHAO Xiang-ying^{1,2}, LIU Jian-jun^{1,2}, LIU Li-ping^{1,2}, LI Jing³,
ZHANG Jia-xiang^{1,2}, TIAN Yan-jun^{1,2}

(1. Shandong Key Laboratory of Food & Fermentation Engineering, Jinan 250013, China; 2. Shandong Food & Fermentation Engineering Research and Design Institute, Jinan 250013, China; 3. Qingdao Agriculture College, Qingdao 266109, China)

Abstract: Based on the inactivation mechanism of ammonium sulfate precipitation on chitinase, the effects of ammonium sulfate, sodium sulfate, ammonium salt and aqueous ammonia on the dinitrosalicylic acid (DNS) assay of glucose standards were investigated. The results showed that the alkaline conditions was favored the color reaction of the reducing sugars with DNS reagent, furthermore, the alkaline conditions changed when ammonium sulfate and other ammonium salt added to this reaction system which prevented the color reaction from advancing. Given the alkaline conditions of the reaction system recovered, the color reaction would develop again.

Key words: DNS reagent, reducing sugars, chitinase, glycoside hydrolase, ammonium sulfate

DNS 试剂(3,5-二硝基水杨酸)定糖是一种经典的葡萄糖以及其他还原糖的测定方法, 该方法的原理是, 在碱性条件下 3,5-二硝基水杨酸被还原糖还原成棕红色氨基化合物 3-氨基-5-硝基水杨酸, 在一定范围内样品中还原糖的含量与溶液的吸光值

呈线性关系^[1]。该方法方便、快速、灵敏度较高, 是实验室最常采用的测定还原糖的方法之一。

目前, 在微生物产几丁质酶、纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶等糖苷水解酶类的研究过程中, 一般是通过 DNS 试剂测定酶与底物反应生成的还原糖的

收稿日期: 2008-11-06

基金项目: 山东省科技发展资金资助项目(No. 031010115)。

作者简介: 赵祥瑞(1968-), 女, 江苏沛县人, 研究员, 主要从事工业微生物方面的研究。Email: xyzhao68@126.com。

量来反映酶活力的高低^[2-9]。在酶活力测定中,反应体系一般都比较复杂,除含有底物和产物外,还可能含有发酵液成分、提取过程中的添加物、缓冲液成分等。研究者通常关注的是这些成分对酶活性的影响,而往往忽视了它们对酶反应产物的分析是否存在影响。作者在研究微生物几丁质酶的过程中发现,采用硫酸铵分级沉淀对酶进行分离纯化时,所得蛋白沉淀和清液几乎都检测不到几丁质酶活力,而采用乙醇沉淀酶活力反而较高。同时,在研究粗酶性质时,也发现硫酸铵对酶活力有抑制作用,因此,初步推测可能是高浓度硫酸铵对该酶有抑制作用^[9]。然而,进一步研究发现,产生这一现象的原因,不是硫酸铵对酶活力有抑制作用,而是硫酸铵对 DNS 试剂测定还原糖有干扰。研究了硫酸铵以及其他铵盐对 DNS 试剂测定还原糖(采用葡萄糖标准溶液)的影响,并研究探讨了消除该影响的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

3,5-二硝基水杨酸:中国医药集团上海化学试剂公司产品;结晶酚:上海凌峰化学试剂有限公司产品;其他化学试剂均为分析纯。

紫外可见分光光度计:UV7500,上海天美科技仪器公司产品;分析天平 METTLER AE200,梅特勒-托利多上海仪器有限公司产品。

1.2 试剂的配制

甲液:称取 6.9 g 结晶酚溶于 15.2 mL 质量分数 10% 氢氧化钠溶液中,用水稀释到 69 mL,在此溶液中加入 6.9 g 亚硫酸氢钠^[1]。

乙液:称取 255 g 酒石酸钾钠溶于 300 mL 10% 氢氧化钠溶液中,再加入 880 mL 质量分数 1% 的 3,5-二硝基水杨酸溶液。将甲、乙二溶液混合贮于棕色瓶中室温平衡 7~10 d 后使用。

葡萄糖标准溶液:准确称取 0.1 g 分析纯无水葡萄糖(105 °C 干燥至恒重),用少量蒸馏水溶解后,定容于 100 mL 容量瓶中,质量浓度为 1 mg/mL。

1.3 葡萄糖标准曲线的制作

按照参考文献[1]制作葡萄糖标准曲线。

2 结果与分析

2.1 DNS 试剂测定葡萄糖标准溶液浓度

按照参考文献[1]中所述的方法,用 DNS 试剂测定葡萄糖标准溶液的浓度。以葡萄糖毫克数为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。结果表

明,用 DNS 试剂测定标准葡萄糖溶液的浓度,反应液的吸光值与葡萄糖浓度在一定范围内呈现良好的线性关系,所得回归方程为 $y = 0.572x - 0.0664$, R^2 值达 0.999 以上。因此, DNS 试剂用于标准葡萄糖溶液的浓度测定,结果准确可靠。

2.2 硫酸铵对 DNS 试剂测定葡萄糖的影响

研究通过在反应体系中额外添加硫酸铵的方法,考查了硫酸铵对 DNS 试剂对葡萄糖标准溶液浓度测定的影响。

取 6 只 25 mL 比色管,分别加入 0.1 mol/L 硫酸铵溶液 0、0.1、0.3、0.5、0.7 和 0.9 mL,再加入相应体积的蒸馏水补齐至 2.0 mL,每管加入 1.0 mL 葡萄糖标准溶液,其余操作同标准溶液浓度的测定,结果见图 1。

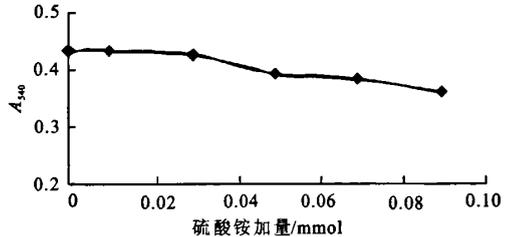


图1 硫酸铵对 DNS 试剂显色反应的影响(I)

Fig.1 Effect of Ammonium sulfate on the DNS reagent color reaction(I)

从结果可以看出,少量的硫酸铵对葡萄糖的测定基本没有影响,但随着硫酸铵浓度的增加,反应液的吸光值开始呈下降趋势。

作者进一步考察了高浓度硫酸铵对葡萄糖测定的影响。在比色管中加入 1.0 mL 葡萄糖标准溶液后,分别添加 0~1.0 mL 的硫酸铵溶液(1mol/L),用蒸馏水补齐至 2.0 mL,其余操作同标准溶液浓度的测定,结果见图 2。

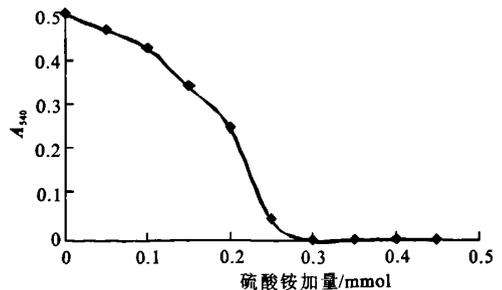


图2 高浓度硫酸铵对 DNS 试剂显色反应的影响(II)

Fig.2 Effect of Ammonium sulfate on the DNS reagent color reaction(II)

结果表明,提高反应体系中的硫酸铵的含量之后,反应液吸光值随着体系中硫酸铵量的增加呈快速下降趋势,当反应液中硫酸铵的含量达 0.3 mmol

以上时,吸光值降为零,反应体系几乎不显色。

2.3 硫酸钠对 DNS 试剂测定葡萄糖的影响

为了进一步确认硫酸铵对 DNS 试剂显色反应的影响是铵离子的效应或是硫酸根离子的效应,本文又考察了硫酸钠对 DNS 试剂测定葡萄糖的影响。试验方法同上,结果见图 3。

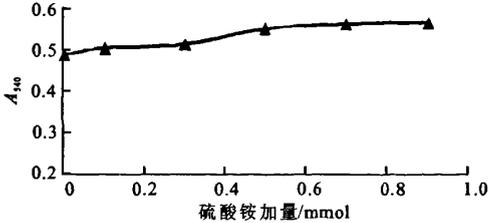


图 3 硫酸钠对 DNS 试剂显色反应的影响

Fig. 3 Effect of Sodium sulfate on the DNS reagent color reaction

结果表明,反应体系中添加硫酸钠,随着浓度的升高,反应液的吸光值略有增加,初步说明硫酸铵对 DNS 试剂测定葡萄糖的影响主要是铵离子的存在引起的。

2.4 铵盐对呈色反应的影响

作者选取氯化铵、乙酸铵、硝酸铵等培养基配制的常用铵盐,进一步考察了铵盐对显色反应的影响,结果见图 4。

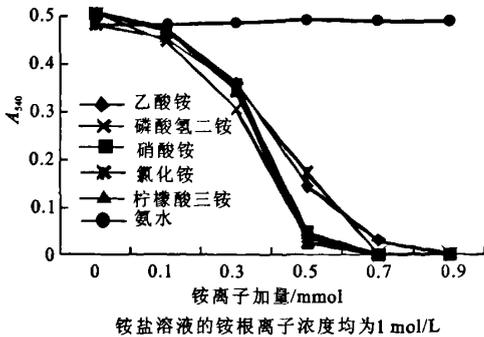


图 4 铵盐对 DNS 试剂显色反应的影响

Fig. 4 Effect of Ammonium salt on the DNS reagent color reaction

由图 4 可以看出,所有供试铵盐对 DNS 试剂测定葡萄糖显色的影响趋势是相同的,随着反应体系中铵离子浓度的增加,反应液在 540 nm 处吸光值逐渐降低,当反应体系中铵离子量达一定量时,反应体系均不显色。以上试验结果表明,硫酸铵对 DNS 测定葡萄糖显色反应的影响,是铵根离子造成的。但作者同时也注意到,反应体系中如添加氨水, DNS 试剂的显色反应则基本不受到影响。

2.5 铵盐抑制 DNS 试剂显色原因分析

DNS 试剂测定还原糖的原理是:在碱性条件

下,3,5-二硝基水杨酸被还原糖还原成棕红色氨基化合物 3-氨基-5-硝基水杨酸,此化合物在过量的氢氧化钠碱性溶液中呈橘红色。试验发现,反应体系中添加高浓度的铵盐,在加热过程中,比色管中有氨气溢出,原因是添加的铵盐与 DNS 试剂中的氢氧化钠发生反应。该反应使反应体系中的氢氧化钠被消耗,反应体系碱性降低,可能是使显色反应不能正常进行的原因。而氨水不与氢氧化钠反应,体系仍维持碱性条件,所以,显色反应未受影响。

作者在添加过量铵盐不能正常显色的体系内,再补加相应的氢氧化钠溶液,室温下放置仍不能显色,如果将补加氢氧化钠溶液后的体系再进行沸水浴加热,则能够恢复显色,这说明 3,5-二硝基水杨酸和还原糖之间的氧化还原反应需要碱性条件,添加铵盐仅仅改变了反应体系的碱性环境,而对葡萄糖和 3,5-二硝基水杨酸等参与显色反应的物质并没有造成破坏,恢复碱性条件后,显色反应仍能正常进行。试验还发现,正常反应体系显色后再添加铵盐,仍可使反应体系的吸光值大大降低,说明呈色物质的呈色也需要维持较强的碱性环境。

2.6 铵盐引起的 DNS 试剂测定还原糖误差的消除

通过提高反应体系中氢氧化钠的浓度,试图消除铵盐对显色反应的影响。

取 9 只 25 mL 比色管,分别加入 2 mol/L 的氢氧化钠溶液 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1、1.3 和 1.5 mL,加入相应体积的蒸馏水补齐至 2.0 mL,在每管中加入 1.0 mL 标准葡萄糖溶液和 0.5 mL 1.0 mol/L 的硫酸铵溶液,其余操作同上,结果如图 5 所示。

试验结果表明,随着氢氧化钠添加量的增加,显色反应逐渐被恢复。说明反应体系中再补加氢氧化钠可以屏蔽铵盐对显色反应的影响。实践中需根据反应体系的实际情况,确定补加氢氧化钠的量。

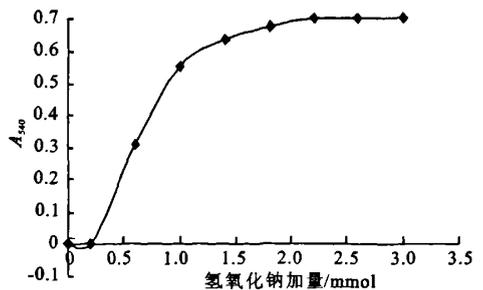


图 5 氢氧化钠补加对铵盐影响的修复

Fig. 5 Effect of additional sodium hydroxide on the DNS reagent color reaction

2.7 几丁质酶的硫酸铵盐析结果

从发酵液中分离纯化酶蛋白,第一步通常采用

硫酸铵盐析。因为,相比有机溶剂沉淀而言,采用硫酸铵盐析,酶蛋白回收率高,酶活损失小。但李静^[9]在采用硫酸铵从发酵液中分离几丁质酶的过程中,却出现酶活“消失”的现象。

重新进行了硫酸铵沉淀发酵液中几丁质酶试验,酶活测定采用作者建立的校正方法,结果见图6。

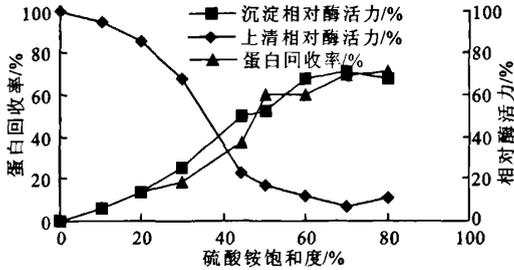


图6 硫酸铵从发酵液中沉淀回收几丁质酶

Fig. 6 Ammonium sulfate from the fermentation broth recovery chitinase

结果表明,采用硫酸铵沉淀从发酵液中分离纯化几丁质酶,几丁质酶酶活回收率可达60%以上。这表明先前的酶活力“消失”现象,确实是因为粗酶液中含有较高浓度的硫酸铵所致。

3 结 语

在微生物产酶的研究中,酶活力的测定一般贯穿于菌种的分离、发酵条件的优化、酶的分纯化

以及酶学性质的研究过程中,通常分两个阶段,酶与底物反应阶段和产物分析阶段。在酶与底物反应体系中含有底物、酶液和缓冲液等。菌种的筛选、发酵条件优化等过程中,酶活力的分析测定一般直接分析粗酶液(发酵液,粗提液等),酶样品中就会携带培养基的残留成分、提取过程中添加的各种物质等。实际操作中,大家往往只考虑这些成分对酶的活性的影响,出现异常结果也通常归咎于各种因素对酶反应的抑制或激活,而对酶产物分析测定却很少关注。但酶产物的分析测定的准确性,却直接关系到酶活力的的大小。目前,许多酶反应产物的定量分析,仍采用化学分析方法测定,酶反应体系中的各种成分都可能对产物的分析造成干扰,使产物分析结果产生误差,然后通过计算,造成酶活力的变化的假象,从而使研究者得出错误的结论。本文所讨论的铵盐对DNS试剂测定还原糖的影响,就是一个范例。DNS试剂是比较经典的测定还原糖的方法,因此,使用中一般按照教科书中的方法操作,很少考虑被测物质对该方法的影响。而作者等对几丁质酶盐析过程中出现的酶活“消失”的现象,追根溯源发现了铵盐对DNS试剂测定还原糖的影响。因此,在微生物产酶的研究工作中,有关酶产物的分析方法对酶活力造成的“影响”,应该引起大家的广泛关注。

参考文献(References):

- [1] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术(第二版)[M]. 高等教育出版社, 1997.
- [2] 陶刚, 刘杏忠, 王革, 等. 产几丁质酶木霉生防菌株的生化测定[J]. 西南农业学报, 2005, 18(4): 452-455.
TAO Gang, LIU Xing-zhong, WANG Ge, et al. Determination of biocontrol strain THS-1 of *Trichoderma harzianum* Producing Chitinase by biochemical methods[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2005, 18(4): 452-455. (in Chinese)
- [3] 汪世华, 胡开辉, 黄碧芳, 等. 黑曲霉 LH2446 产纤维素酶液体发酵条件的研究[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(3): 466-468.
WANG Shi-hua, HU Kai-hui, HUANG Bi-fang, et al. Studies on the optimum conditions for submerged fermentation of *aspergillus niger* LH2446 to produce cellulase[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2005, 27(3): 466-468.
- [4] 王小敏, 吴文龙, 阎连飞, 等. 分光光度计法测定果胶酶活力的方法研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(5): 227-229.
WANG Xiao-min, WU Wen-long, LV Lian-fei, et al. Study on pectinase activity analysis by spectrophotometry[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, 28(5): 227-229 (in Chinese)
- [5] 冯金荣, 惠丰立, 文桢中. 拮抗性酵母几丁质酶的纯化、性质及抗菌活性[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(1): 90-94.
FENG Jin-rong, HUI Feng-li, WEN Zhen-zhong. Purification, properties and antifungal activity of a chitinase produced by antagonistic yeast[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(1): 90-94 (in Chinese)
- [6] 唐湘华, 许锁链, 慕跃林, 等. 米曲霉 ASP-m21 产果胶酶及其酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 28(7): 112-115.
TANG Xiang-hua, XU Suo-lian, MU Yue-lin, et al. Study on characteristics of polygalacturonase production from *Aspergillus oryzae*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 28(7): 112-115. (in Chinese)
- [7] 许婧, 欧阳嘉, 何冰芳. 组成型纤维素酶高产菌的筛选及产酶条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 28(4): 85-90.
XU Jing, OUYANG Jia, HE Bing-fang. Screening of an efficient constitutive-producing strain and fermentation optimization for cellulase production[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 28(4): 85-90. (in Chinese)
- [8] Katapodis P, Christakopoulou V, Kekos D, et al. Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using response surface methodology[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, (35): 136-141.
- [9] 李静. 几丁质酶产生菌的筛选[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2006.

(责任编辑: 杨萌)