

文章编号: 1009-038X(1999)04-0020-07

# 纤维素酶活力测定方法的校正

管斌<sup>1</sup>, 谢来苏<sup>2</sup>, 袁日方<sup>2</sup>, 隆言泉<sup>2</sup>

(1. 山东轻工业学院食品工程系, 山东济南 250100; 2. 天津轻工业学院, 天津 300222)

**摘要:** 探讨了测定条件对纤维素酶活力测定的影响. 研究表明, 测定条件对测定结果影响较大, 因此进行纤维素酶活力测定时, 必须对测定条件作出规定. 纤维素酶是一种复合酶, 底物纤维素不溶于水, 底物的不饱和程度对纤维素酶活力测定的影响较大. 底物的不饱和程度越高, 所测得酶活力就越低. 利用酶液稀释率、蛋白质浓度和酶活力之间的关系建立一校正方程, 得出一种纤维素酶活力测定的校正方法.

**关键词:** 纤维素酶; 酶活力; 测定条件; 平均酶解速率; 校正方程

中图分类号: Q556.2 文献标识码: A

纤维素酶在植物纤维再生利用方面起着重要作用. 纤维素酶高产菌株的选育和纤维素的酶解效率的提高已成为当今这一领域的主要研究课题. 如何迅速、准确地测定纤维素酶活力是纤维素酶研究中的一个难题. 纤维素酶作用底物是结构不均一、水不溶性的高聚物<sup>[1-4]</sup>. 在纤维素多相反应体系中, 酶总处于底物不饱和的状态, 因此难以采用测酶反应初速的方法来测定该酶活力<sup>[5]</sup>. 另外, 酶与纤维素的反应速率还受到底物对酶蛋白的吸附速率和产物扩散速率的影响<sup>[6]</sup>. 在测定纤维素酶活力时, 国内外研究者通常不追求底物饱和度, 而是通过测定在一定时间内纤维素酶解的平均速率来表示酶活力. 目前, 较普遍使用的方法是 Mandels 等<sup>[7]</sup>的糖化型纤维素酶活力测定方法. 该方法是在 25 mL 的刻度试管中加入 1 mL 缓冲液, 并加入一条 1 cm × 6 cm 的滤纸 (或者加入 1% CMC 为底物的缓冲液) 和 0.5 mL 经适当稀释的酶液, 在一定反应条件下测定酶活力. 这种方法因所使用的酶浓度越大, 底物不饱和程度也就越高, 所以实际测得的酶活力偏低.

## 1 材料与方 法

### 1.1 各种酶液的制备

酶样 A 由本实验室发酵制备. 它是由 *T. reesei* 发酵后, 经过过滤、浓缩制成的酶液. 酶样 B 由 Novo 公司提供, 其中 B<sub>1</sub> 为酸性酶 (pH 4~6), B<sub>2</sub> 为中性酶 (pH 6~8).

### 1.2 分析方法

1.2.1 还原糖测定 采用 Miller 等<sup>[8]</sup>的方法.

收稿日期: 1999-06-7; 修订日期: 1999-09-20

作者简介: 管斌 (1957 年 11 月生), 男, 山东济南人, 工学博士, 教授.

1.2.2 纤维素酶活力测定 采用 Mandels<sup>[7]</sup>的方法.

1.2.3 纤维素结晶度测定 酶解样品的处理过程参照 Segal<sup>[9]</sup>方法.用 x 衍射分析仪来测定纤维素的结晶度.

## 2 结果与分析

### 2.1 底物对纤维素酶活力测定的影响

#### 2.1.1 CMC 对纤维素酶活力测定的影响

1) 不同种类 CMC 对纤维素酶活力测定的影响 以羧甲基纤维素钠 (Sodium carboxymethylcellulose, 简称为 CMC-Na) 为底物测定纤维素酶活力时, 在溶液中它仅部分溶解. 其溶解度取决于羧甲基的取代度和该化合物的聚合度. 通常取代度越大, 溶解度就越大; 且取代度越大, 作为底物被纤维素酶分解的效果就越差<sup>[10]</sup>. 不同产地的 CMC 对相同条件下同一种纤维素酶活力测定的影响较大, 如图 1 所示. 日本进口的 CMC 虽然吸光度较小, 但每次测定的可比性强. 另外, 据相泽孝亮<sup>[11]</sup>报道, 一般取代度为 0.55~0.65 的 CMC 作纤维素酶活力测定的底物较为适宜.

2) 不同质量分数的 CMC 对纤维素酶活力测定的影响 结果见图 2

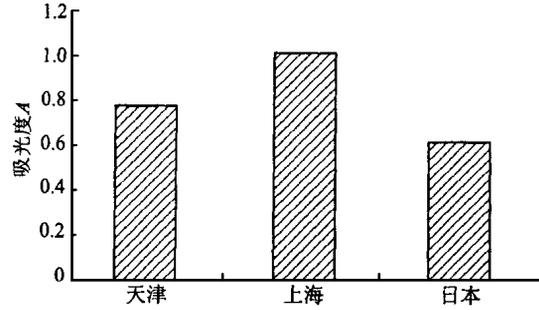


图 1 不同种类 CMC 对纤维素酶活力测定的影响

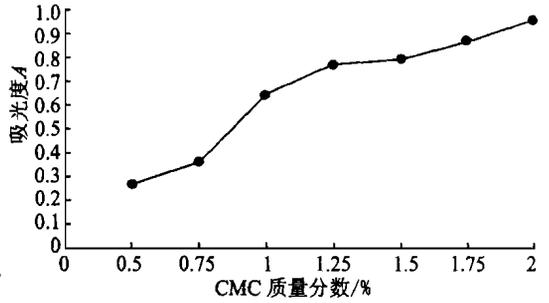


图 2 不同质量分数的 CMC 对纤维素酶活力测定的影响

在 0~2% CMC 的质量分数范围内, 针对 CMC 的质量分数对纤维素酶活力测定的影响进行了研究, 其结果如图 2 所示. 可以看出, 在试验条件下, 当加入一定的酶量, 在 CMC 可溶解的范围之内, 随着 CMC 的质量分数增加, 其吸光度值也随之增加. 适当增加 CMC 的质量分数, 可提高酶活力测定的灵敏度. 但过高的 CMC 的质量分数, 会有部分 CMC 不溶解, 这使得每次测定的 CMC 溶液的质量分数出现差异, 从而给酶活力测定带来误差. 一般进行纤维素酶活力测定时, CMC 溶液的质量分数为 1%.

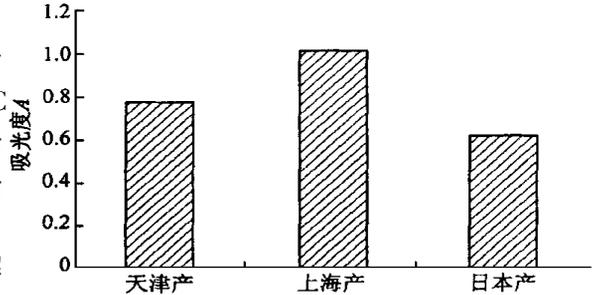


图 3 以 CMC 为底物的纤维素酶酶解进程曲线

3) 以 CMC 为底物的纤维素酶酶解进程曲线 图 3 为以 CMC 为底物的纤维素酶酶解进程曲线. 可以看出, 在反应的初期, 随着酶解时间的推移, 还原糖的产生量呈线性增加; 而后, 随着时间的推移, 还原糖的增加量趋缓. 当酶解时间很长时, 由于酶活力下降等原因使得还原糖的产生量趋于一个稳

定的量.

定值.还可看出,反应初期的前 30 min之内,随着时间的推移,酶解速率较快,几乎呈线性增加的趋势.其后随着时间的推移,酶解速率趋缓.因此,研究者们选定以 30 min作为 CM C酶活测定的时间区段.

### 2.1.2 滤纸对纤维素酶活力测定的影响

1) 滤纸质量对纤维素酶活力测定的影响 滤纸酶活的测定主要以一条  $1\text{ cm} \times 6\text{ cm}$  的 Whatman No. 1 滤纸作为底物.滤纸主要由  $\alpha$ -纤维素组成.滤纸条与纤维素酶和水组成的溶液是一个多相体系.因此,滤纸条大小直接影响到与之发生作用的纤维素酶吸附.产物扩散速率,进而影响到还原糖的产生速率.图 4 为滤纸质量对纤维素酶活力测定的影响.可以看出,在酶活一定的情况下,随着滤纸质量的增加,吸光度也随之增加.从这一试验看,同一酶活,而底物浓度的变化,又使得所测定的酶活高低发生变化,这将给滤纸酶活测定带来误差.规定滤纸的品种和规格,才可使测定规范化.一般采用一条  $1\text{ cm} \times 6\text{ cm}$  的 Whatman No. 1 滤纸(质量约 50 mg,国内多用杭州 1 新华定量滤纸来代替).

2) 测定体系的振荡程度对纤维素酶活力测定的影响 多数研究人员在测定纤维素酶活力时采用静止测定体系.由于纤维素酶活力测定体系中的底物纤维素不溶于水,酶只是在固体颗粒的界面上.随着反应的进行,酶的吸附.产物的扩散将成为该反应速率的限制性因素.图 5 为体系的振荡程度对纤维素酶活力测定的影响.可以看出,同一酶活,伴随体系振荡程度的增大,滤纸酶活(或者吸光度)的测定值升高;而静止体系的滤纸酶活最低.这说明在静止体系中酶的吸附和产物扩散已成为该反应速率的限制性因素;而体系的振荡提高了反应体系的传质速率.解决这一问题的方法是采用往复式振荡恒温水浴,控制一定的往复振荡程度,减少酶吸附和产物扩散速度对测定的影响.

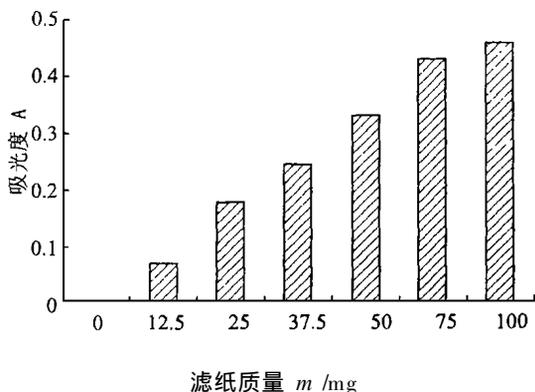


图 4 滤纸质量对纤维素酶活力测定的影响

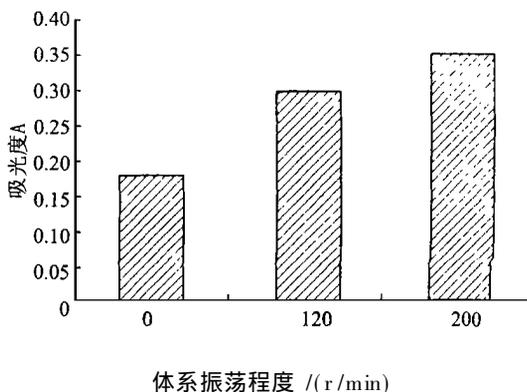


图 5 测定体系的振荡程度对纤维素酶活力测定的影响

3) 以滤纸为底物的纤维素酶解进程曲线 由 *T. reesei* 发酵产生纤维素酶,并以滤纸为底物测定得纤维素酶酶解进程曲线,如图 6 所示,可以看出,反应初期酶解速率较高;随着反应进行,酶促反应速率逐渐降低.试验中由于采用 *Trichoderma* 纤维素酶,酶解速率虽然会随着时间的推移而有所下降,但该反应却保持较高的酶解速率,还原糖产生速率也较快.产生这一结果的原因可能有两个方面:一是过渡区域的纤维素很快被酶解,而结晶区域的纤维素难以被酶解,因而造成后来的酶解速率大大降低;表 1 为不同纤维原料的  $x$ -衍射分析结果(用纤维素的结晶度来表示),不同纤维材料结晶度不同,酶解进程曲线也有所不同.

二是 *Trichoderma* 纤维素酶是一个由内切- $\beta$ -葡聚糖酶、外切- $\beta$ -纤维二糖分解酶和纤维二糖酶(或者 $\beta$ -葡萄糖苷酶)组成的多酶体系.由于多种酶组分的协同作用,使得酶促反应一直保持较高的速率.

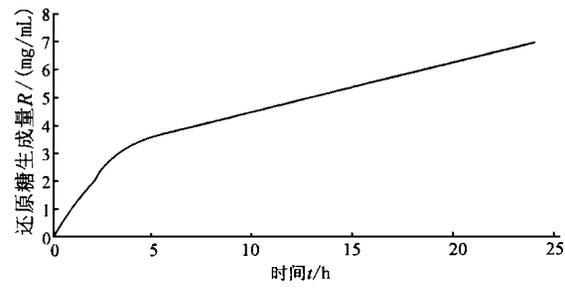


图 6 滤纸为底物的纤维素酶酶解进程曲线

表 1 不同纤维原料的 x-衍射分析结果 (用纤维素的结晶度来表示)

纤维原料	过渡区域的纤维素 %	结晶区域的纤维素 %
脱脂棉	12.4	87.6
微晶纤维素	15.5	84.5
滤纸No. 1	38.9	61.1

## 2.2 不同酶类对纤维素酶酶活力测定的影响

*Trichoderma* 纤维素酶其酶系由三组分组成,对纤维素原料的酶解能力较强,而 *Asp. niger* 纤维素酶其酶系主要由内切- $\beta$ -葡聚糖酶和纤维二糖酶组成,对过渡区域的纤维素酶解能力较强,但对结晶区域的纤维素酶解能力较弱.图 7 为不同酶类对 CM C 滤纸酶解的进程曲线.可见,两类酶对滤纸酶解能力存在较明显的差异,主要原因是 *Asp. niger* 纤维素酶酶系中的外切- $\beta$ -纤维二糖分解酶活力较低缘故.一般常用 CM C 酶活力表示内切- $\beta$ -葡聚糖酶和纤维二糖酶的协同作用的酶活力,而且滤纸酶活力表示酶系 3 个组分协同作用的酶活力.

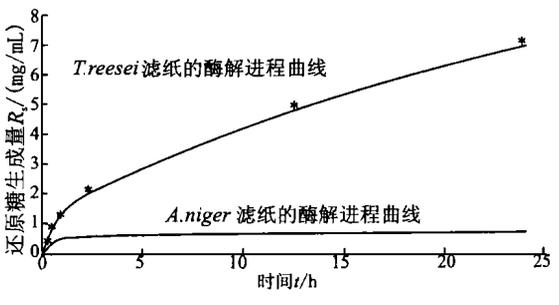


图 7 不同酶类对滤纸酶活测定的影响

## 2.3 稀释率对纤维素酶酶活测定的影响

**2.3.1 稀释率对纤维素酶酶活测定的影响** Mandels<sup>[7]</sup>以不含有外切- $\beta$ -纤维二糖分解酶,只含有内切- $\beta$ -葡聚糖酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶的 *Pestalotiopsis westerdizkii* 酶解滤纸时,只生成 0.5 mg 葡萄糖,继续酶解还原糖增加甚微;用酶系较全的 *Trichoderma viride* 作用于滤纸时,还原糖生成量持续增加幅度较大.为区分这种差异,在滤纸酶活测定中应把酶量调整到生成约 2 mg 葡萄糖的水平,相当于滤纸的糖化分解率达到 4%.好象这才能反映出两种纤维素酶测定方法的差异<sup>[12-13]</sup>.高培基等<sup>[13]</sup>发现,当还原糖量达到 2 mg 时,多数纤维素酶稀释率与还原糖生成的关系曲线已偏离线性范围;由于各种纤维素酶的偏离程度不同,即使在相同反应时间和相同还原糖生成量进行比较,也失去了可比性.根据以上分析,在 IDPAC 委员会所规定的纤维素酶标准测定方法<sup>[14]</sup>中,滤纸酶活的还原糖生成量要达到 2 mg; CM C 酶活的还原糖生成量要达到 0.5 mg.当滤纸酶活的还原糖量达到 2 mg 时,酶量与还原糖量关系曲线已偏离线性范围,而且不同来源的纤维素酶其偏离程度也不同.因此,用这种规定测得的滤纸酶活的可比性较差.为解决这一问题,作者提出了平均酶解速率的概念.在滤纸酶活测定的条件下,对纤维素酶作稀释率与还原糖生成量之间的关系曲线.如果将酶的稀释率作对数变换,可以发现酶的稀释率与还原糖生成量的关系曲线中有一段呈线

性关系.用最小二乘法求出该曲线的回归方程,其斜率即为平均酶解速率.图 8 图 9 分别为酶样 A 和酶样 B<sub>1</sub> 的酶解进程曲线,图 10 图 11 为酶样 A 和酶样 B<sub>1</sub> 以滤纸和 CMC 为底物的酶稀释率对数与还原糖生成量之间的关系.表 2 为两种酶样的回归方程和平均酶解速率.平均酶解速率的单位定义为: mg / (mL · h) 或者 mg / (mL · 30 min). 所得的纤维素酶的回归方程,如同一标准曲线,由此可方便地由还原糖生成量计算出样品的酶活.

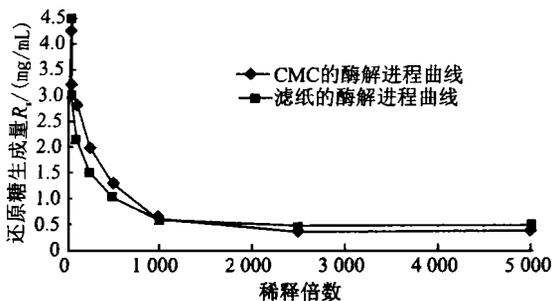


图 8 酶样 A 的酶解进程曲线

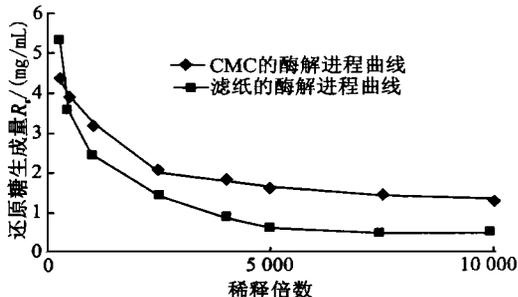


图 9 酶样 B<sub>1</sub> 的酶解进程曲线

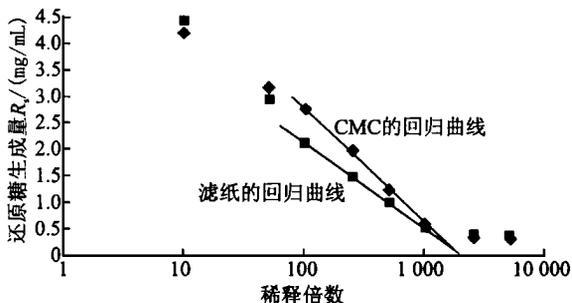


图 10 酶样 A 以滤纸和 CMC 为底物的酶稀释率对数与还原糖生成量之间的关系

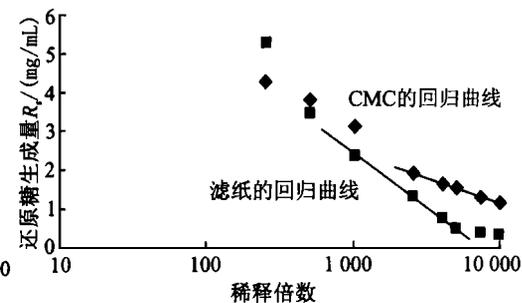


图 11 酶样 B<sub>1</sub> 以滤纸和 CMC 为底物作酶稀释率对数与还原糖生成量之间的关系

表 2 两种酶样的回归方程和平均酶解速率

酶样	底物	回归方程	平均酶解速率
A	滤纸	$S = -1.549 \lg N + 5.211$	1.549
	CMC	$S = -2.169 \lg N + 7.127$	2.169
B <sub>1</sub>	滤纸	$S = -2.625 \lg N + 10.261$	2.625
	CMC	$S = -1.256 \lg N + 6.201$	1.256

从表 2 可以看出,酶样 A

以 CMC 为底物的平均酶解速率高于酶样 B<sub>1</sub> 的,这说明酶样 A 的内切  $\beta$ -1, 4- 葡聚糖酶和纤维二糖酶活力较高;而酶样 B<sub>1</sub> 以滤纸为底物的平均酶

解速率高于酶样 A,说明酶样 B<sub>1</sub> 的纤维素酶酶系的 3 个组成协同作用能力较强.在上述方法中,对不同来源的纤维素酶,根据其平均酶解速率可推断出它们的酶系特性差异.该方法较方便、合理、实用,纤维素酶酶活力测定结果有可比性.

2.3.2 用动力学方法分析稀释率对纤维素酶酶活力测定的影响 纤维素酶酶活力测定的方法中,经常提到“取适当稀释的酶液”.为探讨稀释率与还原糖生成量之间的关系,定义:稀释率  $N = \text{稀释后酶样的体积} / \text{稀释前取酶样的体积} [E]$ .上式可改写为

$$[E] = V / N \quad (1)$$

在实际测定中,取稀释后的酶液体积为 0.5 mL,将 (1) 式改写为:

$$N' = (1/0.5) \times N = 2V / [E] \quad (2)$$

图 8 图 9 分别为酶样 A B 的酶解进程曲线 . 其回归方程关系式为

$$S = a^{\circ} \lg N' + b \quad (3)$$

(3)式中:  $S$  为还原糖生成量;  $a$   $b$  为常数项 .

从上述分析可知 , 在反应曲线的线性范围 , 可用酶液的稀释与还原糖生成量之间的关系 , 推算出纤维素酶酶活 .

#### 2.4 空白 (对照) 试验对纤维素酶酶活测定的影响

国际理论和应用化学协会 (IUPAC)<sup>[14]</sup>对纤维素酶酶活测定中的空白试验有无底物作对照无明确的规定 . 实际测定中采用的方法不同 , 这就使得同一酶样品的酶活测定值各异 . 表 3 为空白试验对纤维素酶酶活力测定的影响 . 可以看出 , 进行 CM C 酶活和滤纸酶活测定时 , 分别以蒸馏水和底物作对照 , 其空白对酶活测定结果的差异率分别为 1.4% 和 31.4% . 特别是对滤纸酶活 , 以蒸馏水作为空白比底物作为空白的酶活测定值高出 31.4% . 这使得纤维素酶酶活力测定值失去了可比性 . 另外 , 空白以底物作为对照 , 可消除酶活测定的系统误差 . 因此 , 为了消除人为因素造成的误差和提高酶活测定值的可比性 , 建议采用以底物作为对照的空白试验来进行纤维素酶酶活力测定 .

表 3 空白试验对纤维素酶酶活力测定的影响

酶活种类	以蒸馏水作空白	以底物作空白	空白对酶活测定的差异率 %
CM C 酶活	14.4	14.2	1.4
滤纸酶活	6.53	4.48	31.4

### 3 纤维素酶酶活校正方程的推导及讨论

实际上 , 对同一种酶液来说 ,  $[E]$  正比于酶液  $[E]$  中酶蛋白的含量 , 两者的关系为:

$$[E] = k [P_r] \quad (4)$$

(4)式中:  $k$  为比例常数;  $[P_r]$  为酶液  $[E]$  中酶蛋白的含量 .

如果把 (2)式  $N'$  代入 (3)式 , 则得:

$$S = a^{\circ} \lg \{2V/[E]\} + b = a^{\circ} \lg(2V) - a^{\circ} \lg[E] + b$$

令  $b' = a^{\circ} \lg(2V) + b$ , 则

$$S = -a^{\circ} \lg[E] + b' \quad (5)$$

同理 , 把 (4)式代入 (5)式 , 整理得到

$$S = -a^{\circ} \lg[P_r] + c \quad (6)$$

其中:  $c = -a^{\circ} \lg k + b'$  .

从 (3) (5)和 (6)式看出 , 酶量、酶蛋白浓度和酶液稀释率与还原糖生成量之间的关系可用回归方程来表示 , 由此可求出平均酶解速率 , 从而方便地推算出酶活力 .

### 4 结 语

纤维素酶是由内切  $-\beta-$  葡聚糖酶、外切  $-\beta-$  纤维二糖分解酶和纤维二糖酶组成 . 本文作者探讨性地提出了测定糖化型纤维素酶酶活的方法 , 并由稀释率与还原糖生成量之间的关系 , 导出了酶量和酶蛋白浓度与还原糖生成量之间关系的回归方程 . 由此方法测定的纤维素酶酶活值有可比性 , 在纤维素酶菌种的选育、酶生产过程中的优化培养以及酶的分离精制方面有一定参考价值 .

## 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] MANDELS M. Cellulose hydrolysis with enzyme system [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1981, 23: 2009-2026
- [3] SHIN S B. The nature and mode of action of the cellulolytic component C<sub>1</sub> of *Trichoderma koningii* on native cellulose[J]. *J Ferment Technol*, 1978, 56: 396-402
- [4] WOOD T M. Purification and some properties of a (1,4)- $\beta$ -D-glucan glucohydrolase associated with the cellulase [J]. *Biochem J*, 1978, 171: 61-72
- [5] OKAKI M, MOO Young. Kinetic of enzymatic hydrolysis of cellulose Analytical description of a mechanistic model[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1978, 20: 637-663
- [6] ERIKSSON K E. Properties and mode of action of cellulase [J]. *FEBS Lett*, 1974, 49(2): 282
- [7] MANDELS M. Measurement of saccharifying cellulase [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1976, 6: 21-33
- [8] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426-428
- [9] LOWERY O H, Rosebrough A L. Protein measurements with the folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*. 1951, 45: 2353-2361
- [10] SEGAL I. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer [J]. *Text Res J*, 1959, 29: 786
- [11] 相泽 孝亮. 酵素利用ハンドブック [M]. 东京: 地人书店, 1980.
- [12] 张振清. 纤维素酶活力的计算方程 [J]. *植物生理学通讯*, 1980, 3: 69-73.
- [13] 高培基, 刘垂. 研究纤维素酶活时测定还原糖方法的选择 [J]. *植物生理学通讯*, 1986, 2: 46-48.
- [14] Ghose T K. Measurement of cellulase activities [J]. *Pure Applied Chem*, 1968, 59: 257-268

## The Improvement of Measurement of Saccharifying Cellulase Activity

GUAN Bin<sup>1</sup>, XIE Lai-su<sup>2</sup>, DING You-fang<sup>2</sup>, LONG Yan-quan<sup>2</sup>

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

**Abstract** In this paper, the effects of testing condition (for example, the different type of CMC, the different concentration of CMC, the size of filter paper and stirring rate) on the measurement of saccharifying cellulase activity were discussed. The data showed that these variables had great influence on the testing results. Therefore, the testing condition must be standardized. Cellulase is a complex enzyme composed of several components. Insoluble cellulase in water is resistant protein to the cellulase. Since the substrate level can't be high enough, it limits the conversion. The higher the enzyme concentration, the lower the cellulase activity. Therefore, in this paper, the relationship between enzyme dilution or protein concentration and reducing sugar was used to obtain a modifying equation for measuring cellulase activity. According to the equation, a modifying method for the measurement was studied. Furthermore, the average rate of enzyme hydrolysis was used to assay cellulase activity.

**Key words** cellulase, activity, testing condition, average rate of enzyme hydrolysis, modifying equation