

## 毕赤酵母木聚糖酶的活力测定条件研究

万红贵, 李喜连, 贾伟

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏南京, 210009)

**摘要** 为探讨毕赤酵母木聚糖酶的催化特性以及更好地发挥其催化功能, 从 pH、温度、底物浓度、反应时间、DNS 用量、DNS 显色时间等几个方面研究了木聚糖酶活性测定的最佳条件。研究结果表明, 木聚糖酶活力测定的适宜条件为: 1% 的木聚糖用 0.05 mol/L pH6.0 的柠檬酸缓冲液配制; 测定温度 70℃, 且该酶的热稳定性较好, 在 55~60℃ 下放置 2h 能保持 68% 以上的酶活; 酶促反应时间 10min; DNS 用量 3mL; DNS 显色时间 5min。

**关键词** 毕赤酵母, 木聚糖酶, 酶活力, 测定条件

木聚糖酶 (1, 4-β-D-xylan xylohydrolase, EC. 3. 2. 1. 8) 广泛存在于各种微生物体内, 它可由细菌、放线菌和真菌产生<sup>[1,2]</sup>。近几年来, 木聚糖酶在食品、造纸工业、能源、饲料以及环境等领域中, 显示了广阔的应用前景<sup>[3]</sup>。

酶活力是衡量酶生物活性的重要指标<sup>[4]</sup>, 在研究酶的性质、酶的分离纯化及酶的应用工作中都需要测定酶的活力, 而目前常用的 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 法因应用面的不同, 所采用的各项测定条件也有所不同, 由此对酶活力的最终测定结果有一定的影响, 以致难以进行比较。为选择适宜的酶活力测定条件, 提高测定结果的准确性, 笔者根据有关资料中所采用的测定条件, 对酶活力测定中的几个主要影响因素进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

木聚糖酶样由南京工业大学制药与生命科学学院实验室提供。

### 1.2 主要试剂

#### 1.2.1 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 的配制<sup>[5]</sup>

将 6.3g 3, 5-二硝基水杨酸和 262 mL 2 mol/L NaOH 溶液, 加到 500 mL 含有 185 g 酒石酸钾钠的热水溶液中, 再加 5 g 结晶酚和 5 g 亚硫酸钠, 搅拌溶解, 冷却后加蒸馏水定容至 1 000 mL, 贮于棕色瓶中, 放置 1 周后使用。

#### 1.2.2 柠檬酸缓冲溶液<sup>[6]</sup> (0.05 mol/L, pH6.0)

称取 10.5g 柠檬酸 ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) 溶解于 800 mL 蒸馏水中, 用 1 mol/L 的 NaOH 将 pH 调至 6.0,

然后再用蒸馏水定容至 1 000 mL。现用现配<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.3 1% 木聚糖

准确称取 1.0 g 木聚糖 (Xylan from birch wood, Sigma 公司提供), 用柠檬酸缓冲液稀释并定容至 100mL。

#### 1.2.4 木糖母液 (1mg/mL)

准确称取 0.1g 木糖 (D-木糖, Amresco), 用去蒸馏水定容至 100 mL, 4℃ 保存。

### 1.3 主要仪器设备

Spectrumlab 752s 紫外可见分光光度计 (上海棱光技术有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司); BS 124 S 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); LG10-2.4A 型高速离心机 (北京医用离心机厂)。

### 1.4 测定步骤与方法

#### 1.4.1 标准曲线的制作

精确称取经 105℃ 烘至恒重的无水木糖 1.000 g, 用蒸馏水定容至 100 mL, 即 10 g/L。分别吸取 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5 mL 于 50 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 即稀释成浓度为 0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 和 0.9 g/L 的木糖标准液。然后取不同浓度的木糖标准液 1 mL 于 20 mL 的具塞试管中, 分别加入 DNS 试剂 3 mL, 于沸水中反应 5min, 取出后立即放入冷水浴中冷却至室温, 定容至 20 mL, 以空白管调 0, 在波长 540 nm 处比色测定吸光度 A, 以所得吸光值为纵坐标, 以对应的标准木糖的浓度为横坐标, 绘制标准曲线。木糖溶液浓度标准曲线的拟合方程为:  $Y = 0.03239 + 1.13815X$ , 相关系数  $R^2 = 0.9997$ 。其中 X 表示吸光值, Y 表示木糖标准液浓度。

制作空白时取 1mL 蒸馏水代替 1mL 标准木糖溶液, 以下步骤同标准曲线的制作。

第一作者: 硕士, 研究员。

收稿日期: 2007-04-25

### 1.4.2 待测酶液的制备

毕赤酵母液体培养发酵液经 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清液并适当稀释, 即为实验所用酶液。

### 1.4.3 酶活的测定与计算

取稀释酶液 0.1 mL, 加 1% 木聚糖 0.9 mL, 置 70℃ 水浴保温 10 min, 然后加入 DNS 试剂 3 mL 于沸水浴中显色反应 5 min, 迅速冷却至室温并加蒸馏水定容至 20 mL, 540 nm 处比色测定<sup>[8]</sup>。

酶活力单位定义<sup>[4,9]</sup>: 每毫升酶液每分钟水解木聚糖生成 1 μmol 木糖所相当的酶量 (IU/mL)。

$$\text{木聚糖酶活力单位 [IU/mL(g)]} = \frac{r \times Df}{150 \times t}$$

式中:  $r$ , 通过吸光值  $A$  从标准曲线上查得与标

准木糖溶液相对应的浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ );  $Df$ , 待测酶液的稀释倍数;  $t$ , 反应时间; 150, 木糖的分子质量。

由参考文献[4]和[10]得出, 稀释度低, 吸光值太大则结果偏低; 稀释度过高, 吸光值过小则结果也偏低。相对酶活随着稀释倍数的增加先增大后减小。因此应控制吸光值在 0.2~0.8, 所测酶活力值较稳定。

## 2 结果与分析

### 2.1 所用波长的选择

取不同浓度的木糖标准液, 分别加 DNS 试剂后定容至 20 mL, 在不同的波长下测吸光度。结果见表 1。

表 1 不同波长下酶活性的测定结果 IU/mL

木糖浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	波长/nm							
	500	510	520	530	540	550	560	570
0.2	0.153	0.122	0.117	0.102	0.089	0.081	0.065	0.054
0.3	0.277	0.257	0.230	0.205	0.179	0.154	0.139	0.114
0.4	0.380	0.361	0.326	0.288	0.251	0.214	0.181	0.153
0.5	0.499	0.452	0.405	0.357	0.309	0.263	0.222	0.186

由表 1 结果可以看出, 最大吸收波长为 500 nm。在比色分析时一般采用最大吸收波长, 这样可以获得最大的灵敏度。但在实际测定过程中发现, 使用 752s 紫外可见分光光度计, 选用较短波长 500~520 nm 时, 空白溶液不容易调 0, 仪器读数很不稳定; 波长越大, 灵敏度越低, 故一般选择波长 540~550 nm。这样既可以获得较高的灵敏度, 又可以提高测定的准确性, 较佳的重复性。

### 2.2 最适反应温度及热稳定性

通常测定酶的活力是在最适温度条件下进行的, 但不同来源的酶, 其最适温度是不同的。其他测定条件同 1.4.3, 仅改变酶解反应温度, 由图 1 可以看出, 70℃ 时所测酶活力最高, 即 70℃ 为该酶的最适酶解温度, 同时该酶在 80℃ 时也具有较高的酶活。此条件目前国内尚无报道。

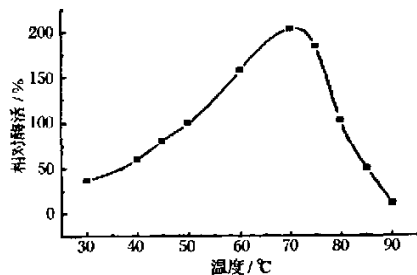


图 1 温度对酶活性的影响

图 1 注: 以大多数测定所采用的反应温度 50℃ 的测定值为 100%。

图 2 为木聚糖酶的热稳定性, 从图 2 可以看出, 在 55℃ 时保温 2 h, 木聚糖酶仍有很好的稳定性, 剩余相对酶活达 90% 左右; 在 60℃ 时保温 2 h, 剩余相对酶活为 68.3%; 当酶在 65℃ 时保温 2 h, 剩余相对酶活只有 14%, 损失了 86%; 70℃ 保温时失活较快, 30 min 后只有 22.5% 的相对酶活, 90 min 后基本上没有酶活。这主要是因为温度较高会增加构成酶本身蛋白质结构的分子热能, 增加多重弱非共价键相互作用破裂的机会, 最终导致酶的变性, 从而使酶活性降低<sup>[2,11,12]</sup>。由图 2 可以看出, 该酶体系在 55~60℃ 的热稳定性较好。

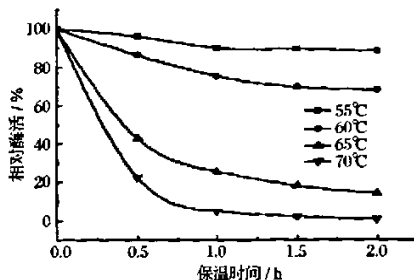


图 2 木聚糖酶的热稳定性

### 2.3 pH 值

各种酶在一定条件下都有其特定的最适 pH,因此最适 pH 是酶的特性之一<sup>[13]</sup>。但酶的最适 pH 不是一个常数,受许多因素的影响,随底物种类和浓度、缓冲液种类和浓度的不同而改变,因此最适 pH 只有在一定条件下才有意义。其他测定条件同 1.4.3,仅改变 pH 大小。测定结果如图 3 所示。

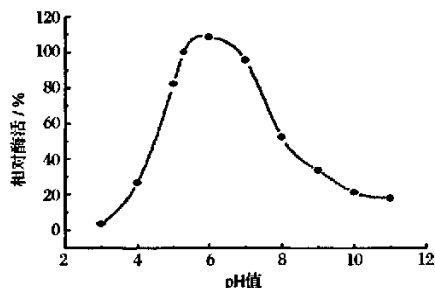


图3 pH对酶活性的影响

由图3可以看出,木聚糖酶的最适 pH 为 6.0,在 pH5~7,相对酶活力均在 80% 以上,说明此酶在中性和偏酸性条件下酶活较高。

## 2.4 反应时间

酶催化反应动力学表明,当酶解产物达到一定浓度时会对酶产生反馈抑制作用。因此反应速度随着时间的延长而下降。这主要是因为随着反应进行,底

物浓度降低,产物浓度增加,从而加速逆反应的进行。故酶的反应时间须在酶的初速度时间范围内选择。其他测定条件同 1.4.3,仅改变酶促反应时间,结果如图 4 所示。

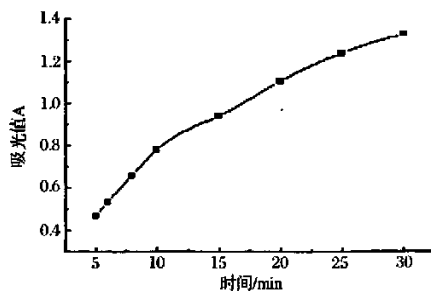


图4 反应时间对酶活性的影响

由图4可以看出,5~10min内吸光值与反应时间几乎成线性增长,其斜率可以代表酶促反应的初速度,此后速度减慢,相对酶活逐渐降低。由此可以得出反应时间以 10 min 为宜。

## 2.5 DNS 显色时间

DNS是在碱性、沸腾条件下与糖类化合物的还原基团发生反应并显色,在一定浓度范围内,还原糖的量与该物质的颜色深浅成一定比例,其颜色深浅的程度表征酶活力的高低<sup>[10]</sup>。实验结果如表 2 所示。

表2 显色时间对酶活性的影响

显色时间/min	2	3	5	8	10	15	20	25
$\bar{A}$	0.503	0.724	0.907	0.923	0.958	1.103	1.108	1.109

由表2结果可以看出,开始沸腾 5 min 内,反应液的吸光度增加较快,显色时间越长,测定值越大。但是 5 min 之后变化不大,吸光值趋于稳定,故显色时间定为 5 min。

## 2.6 DNS 用量

分别取 DNS 试剂 2.0、2.5、3.0、3.5 和 4.0 mL,其他测定条件同 1.4.3,测定结果如表 3 所示。

表3 DNS用量对酶活性的影响

DNS/mL	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
$\bar{A}$	0.517	0.574	0.618	0.593	0.557
相对酶活/%	83.66	92.88	100	95.96	90.13

由表3结果可以看出,随着 DNS 用量的增加,测得的酶活性先增大后减小。DNS 用量在 3 mL 时酶活性最高。

## 2.7 底物浓度

根据酶反应动力学原理,即当底物浓度较低时,

酶反应速度与底物浓度成正比<sup>[13]</sup>。改变底物浓度,其他测定条件同 1.4.3,结果由图 5 可以看出,当底物浓度>2.5%时,由于高浓度底物的抑制作用,使酶活力下降。一般选择底物浓度 1%。

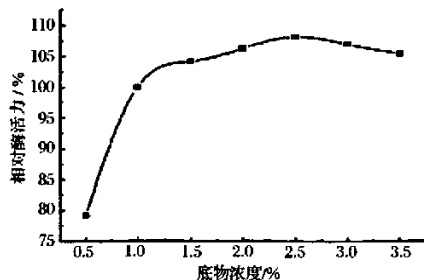


图5 底物浓度对酶活性的影响

## 3 结 论

酶活力测定是进行酶的研究、应用、生产的基础,

探寻一个精确、快速、简便的测定方法非常重要。综合上述实验结果分析,可以得出,采用DNS法测定毕赤酵母木聚糖酶活性时,其最适测定条件为:1%的木聚糖用0.05 mol/L pH6.0的柠檬酸缓冲液配制,于70℃恒温水浴中精确反应10 min,然后加入DNS试剂3 mL于沸水浴中显色反应5 min,迅速冷却后定容至20 mL,波长540 nm比色测定。其中一定要严格控制酶与底物的反应时间,准确反应10 min后应迅速终止反应,否则误差会较大。底物浓度的影响遵循酶促反应动力学原理,即当底物浓度较低时,酶促反应速度与底物浓度的增加成正比。当底物浓度过高时,由于高浓度底物的抑制作用,使得酶反应速率下降,所以测定木聚糖酶活性时宜选用底物浓度1%。酶液稀释度的选择应根据木糖标准曲线,将吸光值A控制在适宜的范围内。另外反应温度的选择也是比较重要的,以往文献中的温度测定条件一般为50℃左右,实验中,该酶在70℃条件下的酶活力几乎是50℃条件下的酶活力的两倍。当考虑到酶制剂用于工业中的时候,热稳定性是一个非常重要的方面。因此寻找耐高温的木聚糖酶是当今木聚糖酶应用工业中的一个热点。

#### 参 考 文 献

- 1 吴克,张洁,刘斌,等.真菌木聚糖酶生产和应用研究[J].合肥联合大学学报,1999,9(2):88~91
- 2 Júlio Xandro Heck, Simone Hickmann Flores, Plinho Francisco Hertz, et al. Optimization of cellulose-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-cultivation [J]. Process Biochemistry, 2005, 40 (1), 107~112
- 3 郑建仙.功能性食品生物技术[M].北京:中国轻工业出版社,2004
- 4 曾莹,钟晓凌,夏服宝.木聚糖酶活力测定条件研究[J].生物技术,2003,13(5):21~22
- 5 周晓云.酶技术[M].北京:石油工业出版社,1995
- 6 聂国兴,李春喜,张建新,等.底物浓度、DNS量对木聚糖酶活性测定结果的影响[J].饲料工业,2002,23(11):24~25
- 7 李彩夏,刘书钗,房桂干.木聚糖酶活力测定方法的探讨[J].西北轻工业学院学报,2002,20(6):95~96
- 8 王清吉,尹西竹.DNS法测定饲用木聚糖酶活力[J].兽药与饲料添加剂,2000,5(1):10~10
- 9 Badal C Saha. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum* [J]. Process Biochemistry, 2002, 37(1):1 279~1 284
- 10 费笛波,冯观泉,袁超.饲用木聚糖酶活性测定方法的研究[J].浙江农业学报,2004,16(2):53~58
- 11 陆登俊,肖凯军,郭祀远,等.康氏木霉木聚糖酶的分离纯化及特性[J].华南理工大学学报,2006,34(3):111~116
- 12 Júlio Xandro Heck, Simone Hickmann Flores, Plinho Francisco Hertz, et al. Statistical optimization of thermotolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circularis* on solid-state cultivation [J]. Bioresource Technology, 2006, 97(15):1 902~1 906
- 13 沈同,王镜岩,赵邦悌,等.生物化学[M].上海:人民教育出版社,1980

## Studies on Method of Measuring the Activity of Xylanase from *Pichia*

Wan Honggui, Li Xilian, Jia Wei

(College of Pharmacy and Life Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT** To find out the catalysis character of xylanase in *Pichia* and exhibit its maximum catalysis rate, pH value, reaction temperature, substrate concentration, reaction time, the quantity of DNS, coloration time etc. were researched to determined the optimum conditions. The results showed that the optimum conditions for determination high xylanase activity were 1% xylan resolution, pH6.0, 0.05mol/L citric acid buffer, reaction temperature of 70℃ and the thermal stability of xylanase was preferable between 55~60℃ to keep relative xylanase activity above 68%, reaction time 10 min, DNS 3mL, coloration time 5min for xylanase activity.

**Key words** *Pichia*, xylanase, enzyme activity, measurement condition