

纤维素酶制剂活力的测定方法

颜秋生

(中国科学院遗传研究所)

蒋传葵

(中国科学院上海生物化学研究所
东风生化试剂厂)

由绿色木霉 EA₃-867 所制备的纤维素酶制剂是一种复合酶,除了纤维素酶外,还有半纤维素酶、果胶酶等。而纤维素酶本身又是一种多组分酶,一般认为它包括有 C₁ 酶、C_x 酶和 β-葡萄糖苷酶^[1-3]。C₁ 酶能使天然纤维素降解成直链纤维素,而 C_x 酶能使直链纤维素分解成纤维二糖等较小单位,纤维二糖等再经 β-葡萄糖苷酶作用,生成最终产物葡萄糖。

作为“生化试剂”的纤维素酶制剂,用途广泛。可以用不同活力单位(如 CMC 酶活,滤纸糖酶活)来表示酶的活性。但是,国内有关纤维素酶制剂活力的测定尚未统一标准,国际上多以滤纸糖酶活来表示。我们考虑到此种酶制剂目前国内主要用于降解植物细胞壁,即用于制备植物原生质体,所以根据纤维素酶对植物细胞壁降解的条件,定出纤维素酶制剂滤纸糖酶活的测定方法。

至于各实验室自行制备的纤维素酶制剂,除了用滤纸糖酶活测定法外,还可以用生物测定法(即采用酶法降解植物细胞壁分离获得原生质体的方法),直接测定纤维素酶对植物细胞去壁的效果。

一、滤纸糖酶活测定法^[4]

(一) 原理

纤维素酶能分解滤纸,产生葡萄糖等还原糖,与显色剂 3,5-二硝基水杨酸作用,可生成橙黄色络合物。用比色法能够定量测定还原糖的生成量。以最适条件下、单位时间内、一定量的酶制剂释放出的葡萄糖量,来表示纤维素酶制剂的活力。

(二) 试剂

1. 3,5-二硝基水杨酸显色剂 称取 10 克 3,5-二硝基水杨酸(市售 3,5-二硝基水杨酸熔点偏低,可用下法进行重结晶: 10 克 3,5-二硝基水杨酸,加 50 毫升水,加热溶解,冷却析出结晶,过滤,用冷水洗涤,干燥后得白色结晶,其熔点 168—169℃),溶于蒸馏水中,加入 20 克氢氧化钠,200 克酒石酸钾钠,加水 500 毫升,加热溶解后,加入重蒸酚 2 克、无水亚硫酸钠 0.5 克。加热搅拌,待全部溶解后,冷却,定量至 1,000 毫升,放置一周后过滤备用。此显色剂应贮存于棕色瓶中。

2. 0.04 M (克分子浓度) pH 4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液。

(三) 方法

1. 酶液制备 酶制剂用 0.04 M pH 4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液配置成 0.20 毫克/毫升酶液。如比色时光密度太低,可将酶液浓度提高。

2. 酶解 分别吸取酶液 0.5、1.0、1.5、2.0 毫升,置试管中,用 pH 4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液补足到 2.0 毫升。同时作空白 2.0 毫升缓冲液。于 40℃ 水浴中保温数分钟后,在每管酶液中加入 1 × 1 厘米² 的新华 1 号层析滤纸 6 片,立即记时,准确反应 60 分钟,接着立即在沸水浴中加热 10 分钟,使酶失活。

3. 显色 在上述每管酶解液中,加入 3 毫升 3,5-二硝基水杨酸显色剂,在沸水浴中加热 15 分钟,冷却,加蒸馏水 10 毫升,摇匀,用 72 型分光光度计在 550 毫微米波长下,用 1 厘米比色槽,以空白为对照,测定其光密度。以光密度为纵坐标,各管酶浓度为横坐标作图,应成

一通过原点的直线。取直线上任意一点计算即可。如成曲线关系(直线弯曲),应将酶液进一步稀释再进行测定。

4. 葡萄糖标准曲线绘制 准确配置 1,000 微克/毫升葡萄糖标准液。分别取 0、0.10、0.20、0.30……0.70 毫升葡萄糖标准液,用蒸馏水补足到 2.0 毫升,加 3 毫升 3,5-二硝基水杨酸显色剂,同上进行显色、比色。以光密度(O. D. 550 $m\mu$) 为纵坐标,葡萄糖微克数为横坐标作图,应得一直线。

5. 计算 在上述酶浓度和光密度对应的直线上取酶量 W , 对应 O. D. 550 $m\mu$ 在葡萄糖标准曲线上查得葡萄糖的微克数 A ; 按下列公式进行计算。

$$\text{纤维素酶活力(单位/克)} = \frac{A}{t \times W}$$

A ——由标准曲线查出释放葡萄糖的微克数;

t ——酶解所用的时间;

W ——反应中含酶量,以克计算。

单位定义:在上述条件下(pH4.5, 40°C), 每分钟分解滤纸产生 1 微克葡萄糖的酶量,为 1 单位的酶。

二、生物测定法

(一) 原理

植物细胞外面有一层含有纤维素的细胞壁包围着,细胞之间有含有果胶质的中胶层相连。用纤维素酶和果胶酶来处理植物的组织,使其去掉细胞壁,分离获得圆球形的原生质体。根据酶的浓度、处理时间的长短、分离所得原生质体的数量和质量,来测定纤维素酶制剂的活力。

(二) 方法

1. 材料 由于不同植物或不同组织细胞壁成份不同,其原生质体的分离所需酶的浓度及处理时间各不相同;而且同一组织在不同发育时期也往往会有差异。为此,在测定纤维素

酶制剂的活力时,必须固定一种或几种合适的材料。

通常以叶片为材料,如大麦应取出苗后4—6天的第一片嫩叶;蚕豆宜取开花前成熟植株的中部叶片;烟草选用苗龄60—100天植株的伸展叶片。

2. 酶液 纤维素酶制剂用0.50—0.70克分子浓度的甘露糖醇溶液配置成浓度为1.0%的酶液,pH调到5.6。

3. 分离原生质体 取健康的大麦、蚕豆或烟草的叶片,经蒸馏水冲洗后,用滤纸吸干表面的水分,接着用钟表镊子撕去下表皮。在每毫升酶液中放入0.1克叶片(去掉下表皮的一面向下),在28°C下保温,每隔30分钟轻轻摇动一次。用吸管吸取反应酶液,滴于血球计数板计数池中,按血球计数法统计完整的原生质体数。

4. 原生质体数目的计算

公式: $A \times 10,000 = \text{原生质体数/毫升}$;

A ——实际数得的原生质体数;

10,000——为一立方厘米(即1毫升)的缺数部分(因为实际数得的原生质体数等于1/10,000立方厘米数,故计数池内实际数得的原生质体数 $\times 10,000$ 等于1毫升数)。

如在2小时内,能分离得5—10 $\times 10^5$ 原生质体数/毫升,表示该批纤维素酶制剂的活力是符合要求的;如分离得10 5 原生质体数/毫升以下,表示该批纤维素酶制剂的活力很低,是不符合植物细胞去壁要求的。

参 考 文 献

- [1] 上海植物生理研究所细胞生理室: 1976. 分离植物原生质体的纤维素酶的制备及性质. 生物化学与生物物理学报, 8: 341—349.
- [2] 颜秋生、戈邦英、黄世英: 1978. 植物细胞壁降解酶的制备. 遗传与育种, (6): 28—29.
- [3] 北京大学制药厂: 1971. 微生物学和酶学基本知识. 科学出版社.
- [4] Mandels, M. & Weber, J., 1969. The production of cellulases. *Cellulases and Their Applications*. Gould, R.F. (ed.), Amer. Chem. Soc., Washington. p. 391.