

# α-鼠李糖苷酶最佳测定条件的建立及酶学性质研究

(中国农业大学食品学院, 北京 100094) 张振华 蔡同一 倪元颖 葛毅强 闫红

**摘要** 对 α-鼠李糖苷酶酶活的最佳测定条件及部分酶学性质进行了研究, 结果表明 α-鼠李糖苷酶的最佳测定条件为: 以 pH4.1 的磷酸氢二钠-柠檬酸为缓冲液, 5mmol/L 的 pNP-Rha 为底物, 于 45℃ 恒温水浴中反应 4min, 立即加入 2ml 1mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液终止反应, 400nm 测定其 O.D 值。α-鼠李糖苷酶适于酸性环境, 最适 pH4.1, 该酶为热不稳定性酶, 其稳定的温度范围为 35~55℃; 以 pNP-Rha (对硝基苯基-鼠李糖苷) 为底物, K<sub>m</sub> 值为 47.84mmol/L, V<sub>max</sub> 为 75.12 U。

**关键词** α-鼠李糖苷酶 酶学性质

**Abstract** The optimum determination condition of α-rhamnosidase activities was studied through investigation on substrate concentration of pNP-Rha, reaction temperature, time and pH. The characteristics of the enzyme, such as pH stability, heat stability and Michaelis constant were studied.

**Key words** α-Rhamnosidase; characteristics

中图分类号: TS201.2 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2002)02-0015-03

葡萄中含有大量的游离态芳香物质, 主要由里那醇、橙花醇、香味醇等萜烯类化合物组成<sup>[1]</sup>。近年来研究发现, 葡萄中还大量存在键合态芳香物质, 主要包括 6-O-α-L-鼠李吡喃-β-D-葡萄吡喃糖苷、6-O-α-L-阿拉伯吡喃-β-D-葡萄吡喃糖苷、β-D-葡萄吡喃糖苷、6-O-β-D-芹菜吡喃-β-D-葡萄吡喃糖苷, 这些糖苷的配糖基为里那醇、橙花醇、香叶醇等萜烯类化合物。葡萄键合态芳香物质本身并没有呈香功能, 但在糖苷酶的作用下裂解糖苷键释放配糖基, 产生游离态芳香物质。许多品种葡萄键合态芳香物质含量多于游离态芳香物质, 因而键合态芳香物质构成了葡萄中重要的、潜在的芳香成分<sup>[2-4]</sup>。

6-O-α-L-鼠李吡喃-β-D-葡萄吡喃糖苷是葡萄中主要的双糖糖苷, 其裂解遵循双糖糖苷的两步裂解理论, 即先由 α-鼠李糖苷酶作用于 6-O-α-L-鼠

李吡喃-β-D-葡萄吡喃糖苷, 使双糖糖苷之间的 1→6 双糖连接断开, 产生 α-L-鼠李糖和 β-D-葡萄糖苷, 然后在 β-D-葡萄糖苷酶的作用下, 产生葡萄糖和相应配糖基, 释放芳香物质<sup>[5]</sup>。

因此, 研究 α-鼠李糖苷酶的活力测定条件及酶学性质, 对于确定其最佳反应条件, 为葡萄汁和葡萄酒生产过程中提供糖苷酶增香调控的理论参数, 从而提高葡萄汁和葡萄酒的质量和档次, 具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

酶制剂 (NoVoferm12) 诺维信酶制剂公司提供; 底物 (pNP-Rha) Sigma 公司提供。

752 紫外光栅分光光度计 上海第三分析仪器厂; BP221S 电子天平 塞多利斯天平公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 α-鼠李糖苷酶活性测定 pNP-Rha 比色测定法。

1.2.2 蛋白质测定 考马斯亮蓝 G-250 法。

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准曲线的制作

配制不同浓度的对硝基苯酚溶液, 各取 0.5ml, 加入 2ml 1mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液, 400nm 测定其 O.D 值, 结果见图 1。

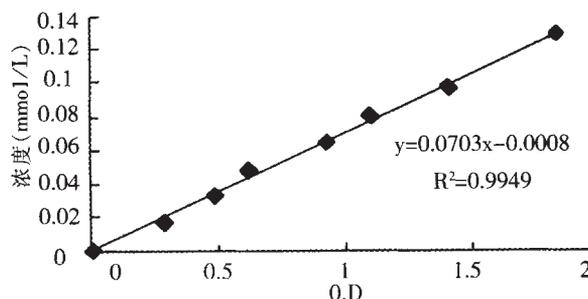


图 1 对硝基苯酚-光密度标准曲线

对硝基苯酚-光密度标准曲线方程为  $y = 0.0703x - 0.0008$

### 2.2 α-鼠李糖苷酶酶活最佳测定条件的确定

收稿日期: 2001-10-25

作者简介: 张振华 (1971-), 男, 博士研究生, 研究方向: 果蔬加工。

基金项目: 国家自然科学基金资助 (9970531), 中华农业科教基金资助 (99-01-E05)。

2.2.1 反应时间对  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活性的影响 本实验在 pH4.1,45℃条件下,分别测定了反应 1、2、3、4、5、8、10min 的酶活,得到了  $\alpha$ -鼠李糖苷酶的反应进程曲线,结果见图 2。

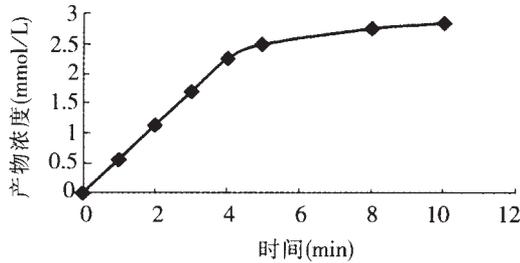


图 2  $\alpha$ -鼠李糖苷酶的反应进程曲线

$\alpha$ -鼠李糖苷酶的反应进程曲线表明,在 0~4min 内,产物的变化量随反应时间而线性地增加,反应速度恒定,代表  $\alpha$ -鼠李糖苷酶的反应初速度;4min 后这条曲线逐渐地弯曲下来,斜率发生改变,反应速度下降。其原因是,底物浓度在下降,产物在增加,逆反应从无到有逐渐变得显著起来;同时酸、碱、热等也在慢慢地使酶丧失部分活性。因此,这种情况下测得的反应速度已是一种表现的、多种因素影响下的综合结果,不能代表酶的真正活性。真正能代表酶催化活性的是反应初始阶段的速度,即反应初速度。

为了减少实验误差,本实验选择 4min 作为最佳反应时间。

2.2.2 底物浓度对酶活的影响 本实验在 pH 4.1,反应温度 45℃时,考察了不同底物浓度与酶比活力的关系,结果见图 3。

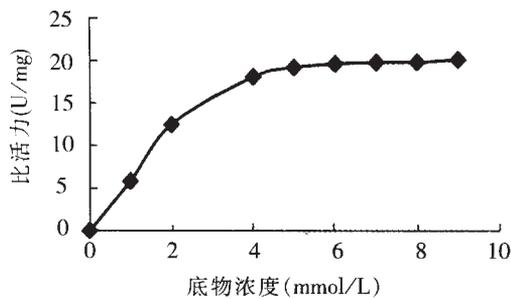


图 3 底物浓度与酶比活力的关系

图 3 表明,在此反应条件下,当底物浓度由 0 增大至 2mmol/L 时,反应速度呈直线比例上升,表现为一级反应;继续增大底物浓度,由 2mmol/L 增大至 5mmol/L 时,反应速度不再呈正比例增大,表现为混合级反应;当底物浓度达到 5mmol/L 时,再增大浓度,反应速度不再增加,接近最大反应速度,表现为零级反应,此时,反应速度与底物浓度无关。因此,本实验确定此反应体系的最适底物浓度为 5mmol/L。

2.2.3 温度对  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活性的影响 本实验在 pH 4.1,反应 4min 的条件下,分别考察了 30、35、

40、45、50、55、60、65℃时的酶活,结果见图 4。

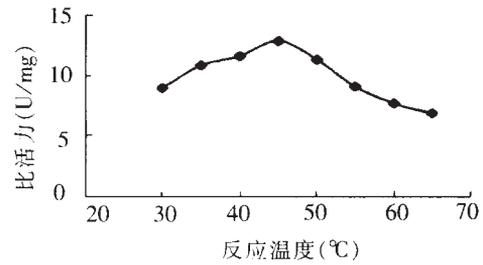


图 4  $\alpha$ -鼠李糖苷酶的最适反应温度的研究

由图 4 可知,当温度为 45℃时,酶活性最大;40~50℃范围内酶相对稳定,因此,本实验确定此反应体系的最适反应温度为 45℃。

2.2.4 pH 对  $\alpha$ -鼠李糖苷酶活性的影响 在温度为 45℃,反应时间 4min 条件下,分别测定了 pH3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 时酶的活性,结果见图 5。

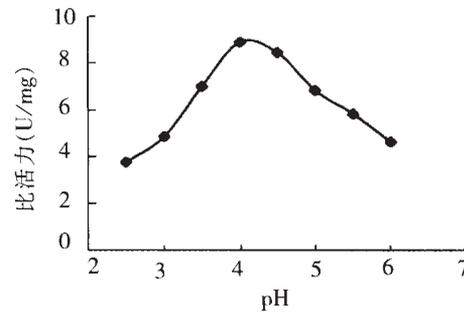


图 5  $\alpha$ -鼠李糖苷酶的最适反应 pH 的研究

由图 5 可知, $\alpha$ -鼠李糖苷酶在 pH4.0~4.5 条件下有较好的稳定性,pH4.1 时酶活最大,因此,本实验确定此反应体系的最适反应 pH 为 4.1。

2.2.5  $\alpha$ -鼠李糖苷酶酶活的最佳测定方法 取一试管,加入 400 $\mu$ l pH4.1 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,45℃保温 5min;然后加入 50 $\mu$ l 酶液和 50 $\mu$ l pNP-Rha,于 45℃恒温水浴中反应 4min;立即加入 2ml 1mol/LNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液终止反应,400nm 测定其 O.D 值。

酶活定义:在 45℃、pH4.1 的条件下,每分钟反应产生 1 $\mu$ mol 对硝基苯酚定义为一个酶活单位 (U)。

### 2.3 $\alpha$ -鼠李糖苷酶酶学性质的研究

2.3.1  $\alpha$ -鼠李糖苷酶的 pH 稳定性 将酶液置于不同 pH 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中,在 4℃冰箱中保存 24h,然后将 pH 调回 4.1,测剩余酶活力,结果见图 6。

图 6 表明, $\alpha$ -鼠李糖苷酶适于酸性环境,在 pH 3.0~5.0 之间酶活基本稳定,可保持活力的 90%以上; pH 2.0、6.0 及 7.0 时,酶活力仅为 80%;而 pH8.0 时,酶活力仅为 60%。

2.3.2 酶的热稳定性 将酶液分别在不同温度 (35、45、55、60、65℃) 下保温不同时间 (5、10、20、30、40min),然后测剩余酶活力,结果如图 7 所示。

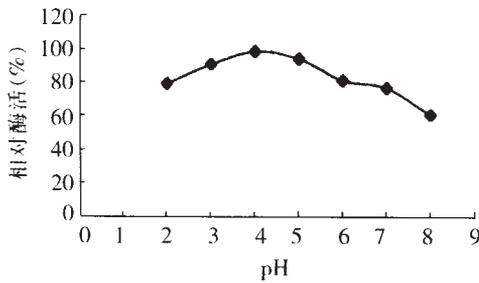


图6 α-鼠李糖苷酶 pH 稳定性研究

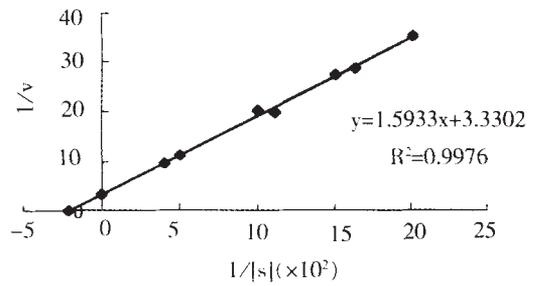


图8 α-鼠李糖苷酶的米氏方程

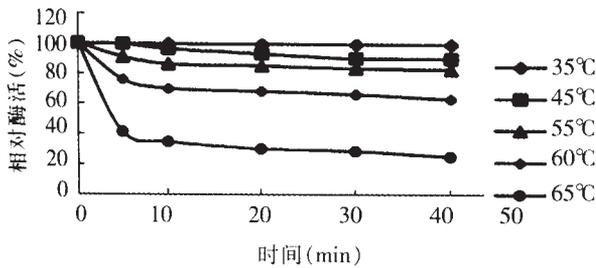


图7 α-鼠李糖苷酶的热稳定性的研究

由图7可知 α-鼠李糖苷酶为热不稳定性酶,其稳定的温度范围为35~55℃;在35、45℃条件下,分别处理不同时间对酶活的影响很小,酶活相对稳定,可保存活力的90%以上;在55℃条件下,处理不同时间对酶活的影响也不显著,可保存活力的80%以上;在60℃条件下,处理不同时间后酶可保存活力的70%;在65℃条件下处理,对酶活的影响较大,酶失活60%以上。

2.3.3 酶的动力学常数-K<sub>m</sub> (米氏常数) 由图8可知,1/v对1/[s]作图得出的米氏方程为y=1.5933x+3.3302,以pNP-Rha为底物,米氏常数K<sub>m</sub>=47.84mmol/L,最大反应速度V<sub>max</sub>=75.12U。

### 3 结论

3.1 α-鼠李糖苷酶的最佳测定条件为:以pH 4.1的0.2 mmol/L 磷酸氢二钠-0.1mmol/L 柠檬酸为缓冲液,5mmol/L的pNP-Rha为底物,于45℃水浴中精确反应4min后,加入2ml 1mol/LNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液终止反

应400nm测定其O.D值。

3.2 α-鼠李糖苷酶适于酸性环境,最适pH 4.1;该酶为热不稳定性酶,其稳定的温度范围为35~55℃;以pNP-Rha为底物,K<sub>m</sub>值为47.84mmol/L,V<sub>max</sub>为75.12U。

### 参考文献

- Gayon P,Ribereau,J.N.Boidron,and A.Tertier.Aroma of Muscat grape varieties.J.Agric.Food.Chem,1975,23 (6):1042 ~ 1047
- Williams P.J.,C.R.Strauss and B.Wilson.Use of C<sub>18</sub> reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and nor-isoprenoin precursors from grape juice and wines.J.of.Chromatography,1982,235:471~480
- Williams P.J.,Christopher,R.Strauss,Bevan.Wilson and Ralph A.Mass-WestroppNovel monoterpene disaccharide glycosides of Vitis vinifera grapes and wines.Phytochemistry,1982,21 (3): 2013~2020
- Voirin,S.G,Baumes.S.M and Gunata.Z.Y.Novel monoterpene disaccharide glycisides of Vitis vinifera,J.Agric.Food.Chem, 1990,38:1373~1378
- Gunata Y.Z.,C.L.Bayonove,R.L.Baumes,and R.E.Cordonnier. The aroma of grapes-Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components.J.of.Chromatography,1985,331:83~90

## 《食品工业科技》订阅办法

月刊

本刊读者服务部随时办理《食品工业科技》的订阅工作。即使错过邮局征订期,本刊也可补寄当年散刊和过刊合订本。2002年本刊每册8元,全年96元;92、93、94、95年各年合订本,每年一册,每册40元;96、97、98年各年合订本,每年一册,每册50元;99年、2000年、2001年合订本,每年一册,每册60元;92年增刊20元一册;1995年增刊20元一册;99年增刊30元一册。另外,本刊读者服务部还代售二百余种食品科技书籍,详细书目见每期的“新书讯”。

购买《食品工业科技》杂志免收邮资,购买代售图书收取15%邮寄挂号费。

地址:北京市永外沙子口路70号 邮编:100075

电话:010 87215557-3065

传真:010 87287944