

果胶酯酶 (pectinesterase, PE)

<滴定法 48 样>

注 意：正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

果胶酯酶, 属果胶酶系, 亦称为果胶酶、果胶甲酯酶、果胶氧化酶。催化水解果胶长链上的甲氧酯水解产生小分子物质果胶酸和甲醇, 从而增加果胶在水中的溶解度。广泛存在于高等植物和可以降解细胞壁的细菌和真菌中, 起内源调控植物细胞壁上及细胞之间果胶含量的作用, 在食品工业中具有及其重要的作用和开发前景。

测定原理

果胶酯酶催化水解果胶分子释放 H^+ , 使反应体系的 pH 下降, 用碱液维持体系的 pH 始终保持在 7.8(酚酞指示剂维持在粉红色), 通过碱消耗的 NaOH 量反映果胶酯酶的活性。

需自备的仪器和用品

天平、研钵、离心机、烘箱。

试剂的组成和配制

提取液: 粉剂×1 瓶, 4℃保存。临用前每瓶加双蒸水 100mL 充分溶解。**(如有不溶现象, 磁力搅拌器 40℃加热, 或者超声波清洗器超声至完全溶解)**

试剂一: 粉剂×1 瓶, 4℃保存。临用前加少量蒸馏水溶解, 然后转入 500mL 容量瓶, 用蒸馏水定容至 500mL。**(磁力搅拌器 40℃加热溶解 3 小时左右至完全溶解, 提前制备)**

试剂二: 液体×1 瓶, 4℃保存。易挥发, 使用后及时用封口膜封口。

试剂三: 液体 50mL×1 瓶, 4℃保存。

试剂四: 用蒸馏水将试剂三稀释 5 倍, 得试剂四。

样品处理

称取 1g 组织样品，加入 2mL 提取液冰浴充分研磨（研钵提前 -20℃预冷 10min，提取液提前4℃预冷。可以根据客户自己的样本特殊性，自行按比例调整），然后离心 15min（12000g离心力 4℃），取全部上清液待测。

测定操作

- 1、试剂一于 37℃烘箱保温 10min，样本全部提取上清（约 2mL）分别转移至 15 mL 离心管或者试管中。
- 2、向样本上清中分别加入 50μL 试剂二，混匀。然后每管加入 8 mL 试剂一混匀，并用试剂四调节 pH 至 7.8（粉红色）。
- 3、将上述各离心管或试管放置 37℃烘箱 60 分钟。每隔 20 分钟用试剂四调节 pH，使 pH 维持在 7.8（粉红色）。记录所消耗的试剂四的体积 V（mL）。

计算公式

酶活定义：每 g 组织每分钟消耗 1μmol NaOH 定义为一个酶活单位 U。

$$\begin{aligned}\text{PE 活性 (U/g)} &= 20VF/(TW) \\ &= VF/(3W)\end{aligned}$$

V：滴定所消耗的试剂四的量，mL；

F：样品稀释倍数；

T：反应时间，60 min；

W：样品质量，g

注意事项

- 1、试剂一提前预热，保证酶反应速率。
- 2、实验前先做预实验，如果酶活力太高，适当调整样本稀释倍数，如将样品稀释 2-5 倍进行测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。