

# 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)

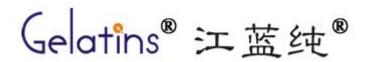
试剂一: 粉剂×1 瓶, 4℃保存。临用前加少量蒸馏水溶解, 然后转入 500mL 容量瓶, 用蒸馏水定容至 500mL。(磁力搅拌器 40℃加热溶解 3 小时左右至完全溶解,提前制备)

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。

PEC-D48-N(1620) 1/2



### 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。

PE 活性 (U/g) = 20VF/(TW) = VF/(3W)

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。