

饲料中植酸酶活性的测定方法研究

李淑梅 杨帆^a 黄建华

(河南科技学院化工学院 河南省新乡市华兰大道东段 453003)

^a(新乡医学院微生物学教研室 河南省新乡市 453003)

摘 要 采用偏钒酸铵法对饲料中植酸酶的活性进行检测, 对 pH 值进行筛选, 与国家标准测定结果进行比较, 结果表明本法具有操作简便、重复性好、准确性高的优点。

关键词 植酸酶, 活性, 分光光度法。

中图分类号: O 657. 32 文献标识码: B 文章编号: 1004-8138(2008)06-1254-03

1 引言

植酸酶是催化植酸(肌醇六磷酸)及其盐水解成肌醇与磷酸(或磷酸盐)的一类酶的总称, 广泛存在于植物、动物和微生物中^[1]。植酸酶不仅可以解除植酸的抗营养作用, 提高食物和饲料中多种矿物元素和蛋白质、氨基酸的可利用性, 而且能够降低粪便排泄磷造成的环境污染, 是一种新型的绿色饲料添加剂, 现被广泛的应用于单胃动物饲料添加剂^[2]。但对于商品植酸酶含量与活性的检测没有统一的标准, 因此亟须一种简便快速高灵敏度的定量检测方法检测植酸酶的活性, 以鉴定植酸酶饲料添加剂质量的好坏。本研究采用分光光度法测定饲料中植酸酶的活性, 旨在建立一种简便高灵敏度的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

721 型紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂)、GSY 4-II 电热恒温水浴锅(北京市医疗设备厂); CJB-22 磁力搅拌器(郑州爱博特科技发展有限公司)、pHS-3 数字式酸度计(金坛市金南仪器厂)。植酸钠(美国 Sigma 公司 p-3168)、钼酸铵、偏钒酸铵、乙酸、乙酸钠、磷酸二氢钾等为分析纯。实验用水为双蒸水。

2.2 测定原理

本研究采用偏钒酸铵法测定, 该方法是利用植酸酶可以水解植酸钠释放出无机磷的原理, 通过加入酸性钒钼酸铵试剂使水解反应停止, 同时与水解释放出来的无机磷产生颜色反应, 形成黄色的含磷络合物, 在 415nm 波长下测定磷的含量。以标准植酸酶为参照物, 计算被测样品中植酸酶的含量。

联系人, 电话: (0373) 2282652; E-mail: lsm033@163.com

作者简介: 李淑梅(1975—), 女, 山西省河曲县人, 讲师, 硕士, 从事生物化学教学研究工作。

收稿日期: 2008-07-19; 接受日期: 2008-08-04

2.3 测定方法

准确称取试样按表 1 的反应步骤进行操作, 反应后的试样溶液在室温下静置 20min, 如出现混浊, 4000r/min 离心 10min, 取上清液在 415nm 波长处测定试料空白(A₀)和试料溶液(A)的吸光值, A - A₀ 为实测吸光值。用直线回归方程计算植酸酶的活性。

表 1 植酸酶活性测定反应步骤

反应顺序	试剂及操作	样品、标准品(mL)	样品空白(mL)	标准品空白(mL)
1	加入乙酸缓冲液	1.8	1.8	2.0
2	加入待反应液	0.2	0.2	-
3	混合	+	+	-
4	37 预热 5min	+	-	-
5	依次加入底物	4	4	4
6	混合	+	+	+
7	37 水解 30min	+	-	-
8	依次加入终止液	4	4	4
9	混合	+	+	+
总体积		10	10	10

$$\text{植酸酶活性}(U/g) = C \times F / m \times 30$$

式中: C——根据实际试样液的吸光值由曲线回归方程计算出的y 值(U); F——试样溶液反应前的总稀释倍数; m——试样质量(g); 30——反应时间(min)。

3 结果与分析

3.1 校准曲线的建立

以磷酸二氢钾为基准物, 用乙酸缓冲液溶解, 按倍比稀释的方法稀释成不同浓度进行吸光度测定, 以无机磷浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘出校准曲线, 见图1, 由图1 求得方程为 $y = 0.0322x - 0.011$, $r^2 = 0.9989$ 。由图1 可见, 磷含量与吸光度均具有良好的相关性, $r^2 = 0.9989$, 表明该法对微量无机磷的测定都是可行的。

3.2 测定方法的影响因素

由于偏钒酸铵法基本上不受反应时间和温度的影响, 故本研究中主要考虑pH 值对测定的影响。饲料中植酸酶活力测定的pH 一般选择在 5.0—6.0 之间。本研究选择了4 个不同的样品, 分别在pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 的5 个不同的pH 条件下测定酶活力。结果见图2, 由图2 可见4 个样品的酶活力在pH 为 5.0 的条件下是最高的。本研究选择了pH 5.0 为测定条件, 与国标 GB/T 18634-2002 规定的酶活力单位的pH 值不同。

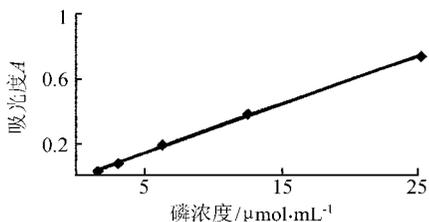


图 1 偏钒酸铵法标准磷的校准曲线

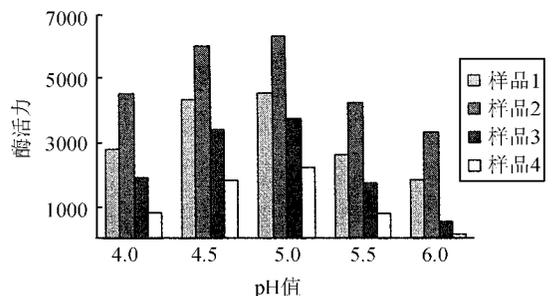


图 2 pH 值对酶活力的影响

3.3 测定方法准确度的验证

为了考察本研究采用方法的准确度,我们采用多样品重复检测的手段来验证方法的准确度,每一个产品分别作5个平行,测定结果见表2。由表2可见本研究测定的结果比国标测定的结果更符合实际含量,更准确一些,而且本法操作简单,适应于实际生产中应用。

表 2 不同标准对样品检测的结果

样品	采用标准	平均酶活(U/g)	已知酶活(U/g)	占标识量(%)
样品1	本标准	1825	2000	91.25
	国标	1064		53.2
样品2	本标准	4262	5000	85.24
	国标	2483		49.7
样品3	本标准	4603	5000	92.06
	国标	2684		53.68
样品4	本标准	6929	8000	86.61
	国标	4365		54.56

注:平均酶活为5次平行测定的平均值。

4 结论

随着植酸酶在饲料中的广泛应用,摆在饲料管理部门、饲料质检机构、科研部门以及生产企业面前是植酸酶定量测定的工作。植酸酶活性测定没有统一的标准^[3],尽管国家于2002年发布了植酸酶的检测国标(GB/T 18634-2002),但我们在多次试验中发现,按GB/T 18634-2002测定一般只是实际含量的一半,无法准确测定结果。因此,我们对常用的检测方法(偏钒酸铵法)进行了改进,调整了其作用的pH值环境,结果发现检测出酶活性比国标要高很多,更接近于实际标识量。这可能是由于饲料生产中加入植酸酶的来源不同,而采用的测定标准也不同。国家标准完全采用AOAC(美国公定化学分析)中2000.12中试验条件的规定进行,国家标准更适用于以曲霉类菌种为来源的植酸酶活性检测^[4]。目前国内生产植酸酶的厂商多采用提取毕赤酵母中有效基因片断在大肠杆菌中得到表达,并用于批量生产。因此无法按照国标方法对其进行检测。本研究采用改良的偏钒酸铵法具有操作简便、重复性好、准确性高的优点,更适合生产中应用。

参考文献

- [1] 马玺,单安山.植酸酶研究进展及其在饲料工业中的应用[J].粮食与饲料工业,2001,(4):27—30
- [2] 单安山,刘大森,马玺.植物植酸酶及其饲用价值[J].东北农业大学学报,2002,33(2):184—190
- [3] Ward N E, Campbell D R. Phytase Assessment Requires Understanding[J]. *Feedstuffs*, 2007, (5): 26—28
- [4] 阮静,刘晓娟.植酸酶的相关介绍及活性检测方法的探讨[J].饲料工业,2006,27(10):54—55

Study on Measurements of Phytase Activity in Feed

LI Shu-Mei YANG Fan^a HUANG Jian-Hua

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, P. R. China)
^a(Department of Microbiology, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453003, P. R. China)

Abstract The phytase activity was measured by methods of vanadium-acid-ammonium at optimized pH. The results were compared with those by national criterions, and shows that this method was advantage with higher veracity and better repetition and easily operated.

Key words Phytase, Activity, Spectrophotometry.