

对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖法测定饲用 α -半乳糖苷酶(黑曲霉)活力的方法

潘宝海* 李德发 陆文清 代建国

(中国农业大学 动物科技学院, 北京 100094)

摘要 旨在建立一种适合于测定饲用 α -半乳糖苷酶活力的检测方法。实验利用对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖(p -NPG)作为酶反应底物,通过400 nm 比色检测酶反应所释放的对硝基酚的量来测定饲用酶制剂中 α -半乳糖苷酶的活性。研究表明,反应液中所含的对硝基酚的量大于 $15 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,吸光值超过仪器的检测范围;酶制剂稀释倍数对对硝基酚比色法的影响较小,本底占总酶活的10%~16%,当酶稀释100倍时,本底对酶活的影响最小;在测定酶活反应时间为6 min时,已经有约10%的对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖水解,当酶液的酶活在 $2.0 \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以内,测试结果较为准确。考虑到饲用酶制剂的作用环境,建议反应温度为 37°C 、反应体系pH 5.0。

关键词 对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖; α -半乳糖苷酶; 饲用酶制剂; 检测方法

中图分类号 TQ 925.9

Determination of α -Galactosidase (*Aspergillus niger*) Used in Feed with p -Nitrophenyl- α -D-Galactospyranoside

Pan Baohai Li Defa Lu Wenqing Dai Jianguo

(College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract This experiment was conducted to determine the α -galactosidase activity produced by *Aspergillus niger*, which was used as an animal feed additive. p -Nitrophenyl- α -D-galactospyranoside (p -NPG) was used as substrate to measure the amount of p -nitrophenol released in the enzyme reaction with spectrometer at 400 nm. It was found that if the amount of p -nitrophenol was higher than $15 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, OD was beyond the limitation of measurement. The dilution rate had little effect on the enzyme activity with p -NPG as substrate, accounting about 10%~16% of the total enzyme activity. When the dilution rate is 100, the effect of substrate on the enzyme activity was lowest. The reaction time should be controlled for 6 min when about 10 percent of p -NPG was hydrolyzed. The enzyme activity in the dilution should be lower than $2.0 \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ for the sake of accuracy. It was showed that the temperature and pH of reaction solution should be controlled at 37°C and 5.0 respectively, considering the condition of animal digestive tracts. In conclusion, using p -NPG as a substrate to determine feed α -galactosidase is a practical and accurate method.

Key words p -nitrophenyl- α -D-galactospyranoside; α -galactosidase; feed enzyme; enzyme assay

重要的蛋白质饲料的豆类籽实中含有相当高的棉子糖和水苏糖,即胀气因子,近来研究表

收稿日期: 2002-03-21

国家自然科学基金资助项目(39770549)

* 潘宝海, 博士生, 研究方向为动物营养与饲料科学。北京圆明园西路2号



明也是抗营养因子。 α -半乳糖苷酶可以水解棉子糖和水苏糖的 α -半乳糖苷键,所以开发了相应的酶制剂,以降低饲料中 α -半乳糖苷对动物和人的不良影响,并取得了良好的社会经济利益^[1]。工业上主要有3种方法测定 α -半乳糖苷酶的活性即:1)葡萄糖氧化酶活力测定法是用 α -半乳糖苷酶与蜜二糖进行反应,然后测定水解的葡萄糖量^[2];2)还原糖法是以棉子糖或水苏糖作为底物,测定反应后的还原糖量^[2,3];3)硝基酚比色法是利用对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖或邻硝基酚- α -D-吡喃半乳糖与 α -半乳糖苷酶反应后,生成有色物质对硝基酚或邻硝基酚,测定其含量即可计算出酶活^[4-6]。但是饲用酶制剂的有效作用位点是动物的消化道,其反应的pH和温度与工业酶制剂最高酶活条件差异。另外,因为饲用酶制剂的载体含量较多,还原糖含量较高,酶活相对较低,酶的稀释倍数对 α -半乳糖苷酶检测酶活影响较大,所以前2种方法对此难以准确检测。目前饲用 α -半乳糖苷酶酶活检测的方法国内外未见报道。本实验旨在用对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖作底物建立一种简捷和准确的饲用 α -半乳糖苷酶测定方法。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

酶制剂 α -半乳糖苷酶购于 Easybio System Co. (韩国)。该产品用黑曲霉液体发酵液的粗提物,以麦芽粉为载体而制得的酶活为 $100 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 的饲用酶制剂。

试剂 对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖(p-NPG) (批号:90K1646)和对硝基酚(批号:19H5077) 购于 Sigma 公司(美国);无水醋酸钠、冰醋酸和无水碳酸钠均为分析纯。

1.2 仪器设备

752C 紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂),酸度计,秒表,水浴锅,天平(感量 0.001 g),磁力搅拌器,漏斗,W hatman No. 1 滤纸。

1.3 试验所用溶液

除另有规定外,试验中所用的试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

$0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液: A 液——称取无水醋酸钠 4.2 g 定容至 1000 mL 。B 液——冰醋酸 3.0 mL 定容至 1000 mL 。用 B 液调节 A 液至 $\text{pH} 5.0$ 。

$0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠溶液: 准确称取 21.198 g 无水碳酸钠,定容至 1000 mL 。

对硝基酚标准溶液: 准确称取 1.3910 g 对硝基酚,用碳酸钠溶液定容至 100 mL ,然后配制成浓度分别为: $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$ 及 $9 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准对硝基酚溶液以制成标准曲线。

酶液制备: 称取 α -半乳糖苷酶 1 g 左右,用 80 mL 醋酸钠缓冲液浸泡,磁力搅拌 $20 \sim 30 \text{ min}$,醋酸钠缓冲液定容至 100 mL ,用滤纸过滤。

$10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖溶液: 称取 3.031 g 该试剂,用醋酸钠缓冲液定容至 1000 mL ,冷冻保存。

1.4 测定方法

1.4.1 对硝基酚标准曲线绘制 吸取 1 mL 对硝基酚标准溶液(做6个平行)于试管中,加入 1 mL 醋酸钠缓冲液;在对照的空白样试管中加入 2 mL 醋酸钠缓冲液(做6个平行);在所有的试管中加入 8 mL 碳酸钠溶液,振荡,在 400 nm 处测定吸光度 OD 值。

1.4.2 酶液反应 本实验酶液反应温度为 37°C (同动物消化道)。将上述稀释酶液和对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖底物溶液于 37°C 下振荡 10 min 预热,然后再吸取各溶液 1 mL 充分混合,于 37°C 恒温振荡 10 min ,加入 8 mL 碳酸钠溶液,振荡混匀,终止酶反应。以蒸馏水调零,

在 400 nm 处测定吸光度 OD 值。酶液空白用经过预热的酶液各 1 mL, 然后加入 8 mL 碳酸钠溶液, 振荡混匀, 再各加入 1 mL 预热的对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖底物溶液振荡 37 10 min。测定吸光度 OD 值。

1.4.3 酶活计算 以酶反应液 OD 值处于 0.3~3.0 的测定值为基础并计算酶活。酶活定义: 在 pH 5.0 并 37 条件下, 每分钟内底物降解释放 1 μ mol 对硝基酚所需的酶量为一个酶活单位, U。

样品中的对硝基酚酶活 A ($U \cdot g^{-1}$):

$$A = \frac{([A_x - A_0] \times K + C_0) \times D_f}{m \times t}$$

A_x ——样品酶液的吸光度 OD 值, A_0 ——对应酶液的空白吸光度 OD 值, K ——对硝基酚标准曲线的斜率, C_0 ——对硝基酚标准曲线的截距, D_f ——稀释倍数, m ——称取酶制剂的质量/g, t ——反应时间/min。

1.5 酶浓度对 α -半乳糖苷酶活力测定值的影响

将 1.3.2 所制备酶液, 再用醋酸钠缓冲液分别稀释至 50, 100, 200, 400, 800 和 1 600 倍。然后, 测其酶活, 每个点有 6 个平行, 计算平均值。

1.6 饲用 α -半乳糖苷酶的时间进程

将 1.4.2 所示反应液于 37 下分别精确保温 2, 4, 6, 8, 10, 12 和 14 min, 测反应液中对硝基酚的生成量, 每个点有 6 个平行, 计算平均值。

1.7 pH 对 α -半乳糖苷酶活力测定值的影响

用冰醋酸、醋酸钠和氢氧化钠溶液配制 pH 值从 1.0 开始, 级差为 0.5, 共 19 级的缓冲溶液。用该溶液分别制备酶液和对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖溶液。然后取对应的酶液和对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖溶液各 1 mL 混合后, 立即测定 pH, 然后依据 1.4.2 方法测定酶活, 每个方法设 6 个重复, 计算平均值。

2 结果与讨论

2.1 酶浓度对 α -半乳糖苷酶活力测定值的影响

图 1 为对硝基酚的标准曲线。对硝基酚-吸光度的回归公式为 $y = 5.2057 \times x$ ($R^2 = 0.9993$)。依此计算出对硝基酚法所测得的每毫升反应液中所含的对硝基酚的量。同时, 由此回归公式可以得出当酶液反应液释放出对硝基酚的量超过 15 μ mol \cdot mL $^{-1}$ 时, 吸光度值超过仪器的检测范围。

利用对硝基酚比色法测定的本底占总酶活的 10%~16% (表 1, 图 1)。本底吸光度随着稀释度的增加对总吸光度的影响也在增加, 在稀释倍数较低(100 倍)的情况下, 本底吸光度与总吸光度的比例最小(8.4%), 测试值的系统误差最小(图 2)。

无论是利用液体发酵还是固体发酵生产饲用酶制剂, 还原糖的存在是无法避免的。因此在利用葡萄糖氧化酶活力测定法和还原糖法测定

表 1 酶浓度对 α -半乳糖苷酶活力测定值的影响

稀释倍数	测定值的影响			$U \cdot g^{-1}$
	本底	总酶活酶活	实际酶活	
100	9.5	112.96	103.43	
200	13.86	138.18	124.34	
400	18.97	159.92	141.03	
800	27.15	177.83	150.72	
1 600	56.61	350.55	294.07	

注: 空白对照含有的对硝基酚量;
反应液中总对硝基酚量;
酶反应释放的对硝基酚量。

α -半乳糖苷酶酶活时,必须扣除本底酶活。这样就使这2种方法变得复杂,而且测定的误差较大^[2]。饲用酶制剂的载体基本相同,对硝基酚的含量少而且比较稳定,因而本底酶活影响小。

从以上可见,利用对硝基酚比色法测定 α -半乳糖苷酶酶活时操作简单,试验结果受稀释倍数影响小,试验系统误差小。

2.2 饲用 α -半乳糖苷酶的时间进程

α -半乳糖苷酶制剂在酶反应的最初阶段,即反应开始的前2~8 min反应速度最快,此时的反应液中对硝基酚的含量呈线性增加,以后反应速度减缓(图3)。

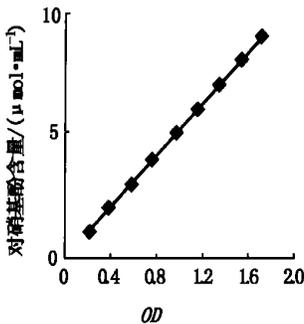


图1 对硝基酚-吸光度标准曲线

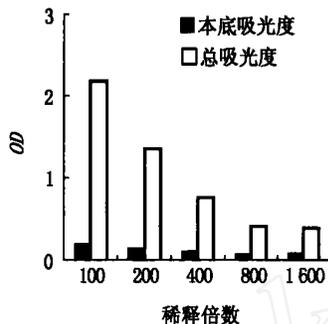


图2 酶浓度对吸光度的影响

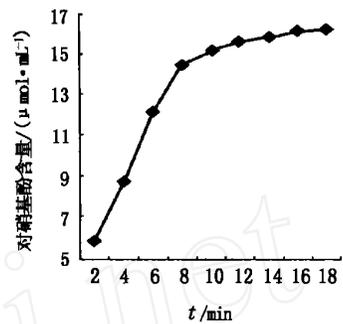


图3 饲用 α -半乳糖苷酶的时间进程

在酶化学反应过程中,由于酶反应的即时速度很难检测,并且反应后期酶的反应速度下降,因此通常在酶反应的最初阶段测定初始反应速度^[2]。本实验表明,用对硝基酚法测定饲用 α -半乳糖苷酶活性,反应时间6 min合适,此时已经有10%左右的对硝基酚- α -D-吡喃半乳糖水解,而且此时的产物生成量与时间的比值恒定(图3)。因此根据酶活计算公式,考虑到对硝基酚-吸光度的回归公式的取值范围、仪器性能和本底对检测结果的影响,建议将酶制剂稀释成酶活低于 $2.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的酶液。

2.3 pH对 α -半乳糖苷酶活力测定值的影响

本实验所用 α -半乳糖苷酶最适pH 6.0, pH低于2.5或高于8.5,酶活力迅速下降, pH 4.0~8.0时酶活性比较稳定。

由于饲用酶制剂的最终作用位点是动物的消化道,因此在测定饲用 α -半乳糖苷酶活性时,不仅要考虑到酶的最适pH,而且还要考虑到动物消化道的pH。国内外其他饲用酶制剂的检测所用反应液的pH均为5.0^[8-11]。因此,建议测定饲用 α -半乳糖苷酶的酶活时,反应液pH为5.0。

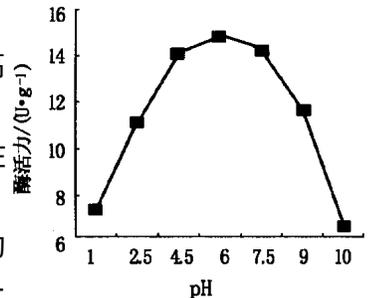


图4 pH对酶活测定值的影响

3 结论

利用对硝基酚比色法来测定饲用酶制剂中 α -半乳糖苷酶的活性是一种比较简捷准确的方法,建议样品酶稀释到酶活低于 $2.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,反应体系pH为5.0左右,温度 37°C ,反应时间6 min。

参 考 文 献

- 1 潘宝海, 李德发, 谯仕彦 饲用酶制剂的应用研究进展 中国饲料, 2001, 18: 18~ 20
- 2 张树政 酶制剂工业 北京: 科学出版社, 1998
- 3 Shibuya H, Kobayashi H, Park G G, et al Purification and some properties of alpha-galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, 59: 2333~ 2335
- 4 Shibuya H, Hiroaki N, Satoshi K, et al Cloning and high level expression of α -galactosidase cDNA from *Penicillium purpurogenum*. *Appl Environ Micro*, 1998, 64: 4489~ 4494
- 5 Brumer H, Sims P F G, Sinnott M L. Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: purification and characterization of the main alpha-galactosidase *Biochem J*, 1999, 339: 43~ 53
- 6 刘波, 彭万霖, 赵淑贞 乳糖对黑曲霉合成 α -半乳糖苷酶的间接诱导作用的初步研究 微生物学报, 1979, 19: 225~ 226
- 7 Dey PM. Characteristic features of an alpha-galactosidase from mung beans *European J Biochem*, 1984, 140: 385~ 390
- 8 Ghazi S, Rooke J A, Galbraith H, Morgan A. Effect of feeding growing chicks semipurified diets containing soybean meal and amounts of protease and alpha-galactosidase enzymes *Br J Poult Sci*, 1997, 38 (Suppl): S29
- 9 Irish G G, Barbour G W. Removal of the α -galactosides of sucrose from soybean meal using either ethanol extraction or exogenous α -galactosidase and broiler performance *Poult Sci*, 1995, 74: 1484~ 1494
- 10 美国饲料协会编 美国饲料协会(NFA)分析方法概要 李伟格, 李美同, 苏晓鸥, 等译 北京: 中国农业科技出版社, 1998
- 11 Veldman A, Veen W A G, Barug D, et al Effect of α -galactosides and α -galactosidase in feed on ileal piglet digestive physiology. *J Anim Physiol*, 1993, 69: 57~ 65