

# 体外透析两步酶解法测定菜粕粗蛋白 消化适宜酶促反应条件的建立

席鹏彬 李德发 郑春田

(中国农业大学 农业部饲料工业中心,北京 100094)

**摘要** 通过建立体外透析胃蛋白酶-胰酶制剂两步酶解法测定菜粕粗蛋白消化率的标准测定步骤及适宜酶促反应条件,并研究在所建立条件下测得菜粕粗蛋白体外与体内消化率间的相关关系。结果表明,建立适宜酶促反应条件为:1 g 菜粕在 10 mL 胃蛋白酶溶液( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ),pH 2.0,37 $^{\circ}\text{C}$  条件下水解 1 h,调至中性后转入透析袋内,再加入 10 mL 胰酶溶液( $4 \text{ mg mL}^{-1}$ ),在  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ 、pH 7.5,37 $^{\circ}\text{C}$  磷酸缓冲溶液中水解 24 h,期间更换 5 次缓冲液。菜粕干物质和粗蛋白体外消化率与相应回肠表观(真)消化率之间显著相关( $r=0.86\sim 0.99$ ),粗蛋白体外消化率与赖氨酸、苏氨酸回肠表观(真)消化率与蛋氨酸回肠表观消化率之间显著相关( $r=0.80\sim 0.87$ )。

**关键词** 透析技术;胃蛋白酶-胰酶制剂;菜粕;粗蛋白;消化率

中图分类号 S 816.17

文章编号 1007-4333(2003)05-0088-05

文献标识码 A

## Enzymatic conditions of an in vitro method using dialysis tube to study digestion of protein in rapeseed meal

Xi Pengbin, Li Defa, Zheng Chuntian

(Ministry of Agriculture Feed Industry Centre, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** A pepsin-pancreatin in vitro method using dialysis tube was studied to measure digestibility value of CP in rapeseed meals (RSM). The results from the final condition of our in vitro digestion method were as follows: one hour predigestion of 1 g RSM with 10 mL  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  pepsin at pH 2.0, 37 $^{\circ}\text{C}$  in a closed system, was followed by a 24 hours digestion at pH 7.5, 37 $^{\circ}\text{C}$  in dialysis tube with 10 mL  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  pancreatin. The dialysis tubes with reactive mixtures were placed into a sodium phosphate buffer ( $0.01 \text{ M}$ , pH 7.5, 37 $^{\circ}\text{C}$ ), which was replaced for five times during digestion. In vitro digestibility of DM, CP were significantly correlated with in vivo ileal digestibility of the corresponding nutrients in RSM ( $r=0.86\sim 0.99$ ); In vitro digestibility of CP in RSM was significantly correlated with in vivo ileal digestibility of lysine, threonine and methionine ( $r=0.80\sim 0.87$ ).

**Key words** dialysis; pepsin-pancreatin; rapeseed meal; crude protein; digestibility

用动物消化试验测定饲料养分消化率操作过程复杂,消耗较大,测定结果变异较大。因此多有建议采用体外方法代替动物消化试验来评定饲料营养价值。体外消化测定方法能准确模拟体内消化生理过程,简单易行,且重复性好。胃蛋白酶-胰酶制剂两步酶解法是目前较为适宜的体外消化测定技术之一<sup>[1]</sup>。采用透析袋技术可将消化产物及时排出,如同被小肠吸收,从而消除产物抑制现象,且能更准确模拟体内动态消化过程。为了更好地满足以上要求,在体外消化测定试验中选择适宜的酶制剂、酶浓度、反应温度、pH 值以及时间至关重要。本试验将体外胃蛋白酶-胰酶制剂两步酶解法与透析技术结合,通

过研究不同酶促反应参数对菜粕粗蛋白消化率的影响,建立适宜酶促反应条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与制备

从我国油菜主产省采集 7 个品种的油菜籽,采用预榨-浸提工艺加工成菜粕。每种菜粕取 1 kg,经粉碎过 40 目筛,贮存在 -20 $^{\circ}\text{C}$  条件下,以备用于体外消化试验,同时取 100 g 用于动物消化试验。

### 1.2 体外消化试验

**1.2.1 消化酶与主要设备** 消化酶包括胃蛋白酶(SigmaP7000)、胰酶制剂(SigmaP1750)、胰蛋白酶

收稿日期:2003-06-09

作者简介:席鹏彬,博士,现在广东省农科院畜牧所工作;李德发,教授,博士生导师,主要从事动物营养与饲料研究

(SigmaT-4799)、透析管(SigmaD-9402)、胃蛋白酶溶液(将胃蛋白酶用  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  盐酸溶液配制成不同浓度溶液)、胰酶或胰蛋白酶溶液(将胰酶制剂或胰蛋白酶用  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  磷酸盐缓冲溶液配成不同浓度要求的溶液)。主要设备包括恒温水浴摇床、pH 测定仪、高速离心机、真空抽滤装置、全自动凯氏定氮仪等。

**1.2.2 基本步骤** 胃蛋白酶消化过程的研究采用 Gauthier 等<sup>[2]</sup>推荐方法进行。称 2.5 g 菜粕加入 100 mL 一定浓度的胃蛋白酶溶液,在 pH2.0、37 条件下培养,分别在培养开始后第 0.5、1、2、3、4、5 和 6 h 取 2 mL 反应液与等量 20% 三氯乙酸溶液混合均匀,经  $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,测定上清液含氮量,计算三氯乙酸可溶性氮百分率。

透析胃蛋白酶-胰酶制剂消化过程基本步骤是在黄瑞林等<sup>[3]</sup>推荐方法基础上做了改进,即在经孵育的反应混合液中添加 20% 水杨酸将溶解但未被消化的氮进行沉淀。

### 1.3 体内消化试验

采用回肠末端安装 T 型瘘管的 9 头平均体重为  $(34.5 \pm 2.1) \text{ kg}$  健康去势公猪进行体内养分消化率的测定,详细测定方法见文献<sup>[4]</sup>。

### 1.4 计算公式与统计分析

$$\text{干物质或粗蛋白体外消化率} = \frac{[\text{样品养分含量} - (\text{残渣中养分含量} - \text{对照})]}{\text{样品中养分含量}} \times 100\%$$

所有数据均采用 Spss6.0 统计软件进行单因子方差分析,差异显著则进行邓肯氏多重比较;此外采用皮尔逊偏相关法分析养分体内外消化率之间的相关性,采用线性回归分析法建立回归方程。

## 2 结果与分析

### 2.1 胃蛋白酶酶促反应条件的建立

图 1 为 2.5 g 菜粕分别加入 100 mL 5 种不同浓度胃蛋白酶溶液,在 pH2.0、37 条件下培养 6 h,以研究不同培养时间不同浓度胃蛋白酶溶液对反应液中三氯乙酸可溶性氮含量的影响。结果表明,在反应前 30 min,三氯乙酸可溶性氮的产生量直线增加,此后随反应时间延长,可溶性氮产生速率明显降低;反应开始 1 h 后,除  $2.0 \text{ mg mL}^{-1}$  胃蛋白酶浓度组仍有增加外,其他 4 种浓度组几乎不再产生或产生少量的可溶性氮。随着胃蛋白酶浓度增加,三氯乙酸可溶性氮的产生量也增加。经 0.5、1.0、

1.5、2.0 及  $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$  胃蛋白酶溶液消化产生的三氯乙酸可溶性氮含量分别为 14.5%、18.4%、18.4%、23.6% 和 50.9%。以  $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$  胃蛋白酶溶液消化产生的三氯乙酸可溶性氮含量最高,因此确定 2.5 g 菜粕加入 100 mL 含 250 mg 胃蛋白酶的溶液反应 1 h 可得到最佳消化效果。

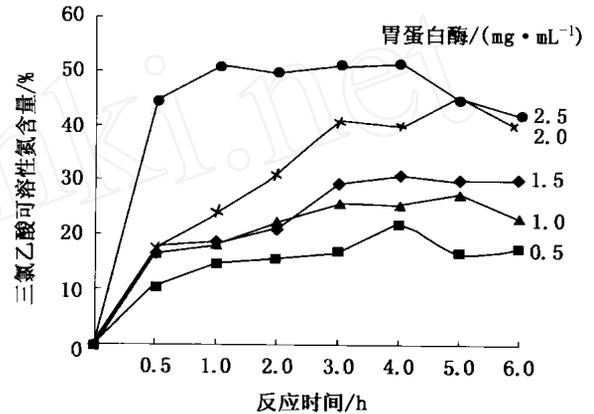


图 1 培养时间和胃蛋白酶浓度对反应混合液中三氯乙酸可溶性氮含量的影响

Fig. 1 Time-course production of trichloroacetic acid-soluble nitrogen by the digestion of rapeseed meal with five pepsin concentrations

### 2.2 胰蛋白酶制剂酶促反应条件的建立

**2.2.1 胰酶制剂适宜浓度的选择** 1 g 菜粕经 100 mg 胃蛋白酶在 pH2.0、37 条件下培养 1 h,反应液调至中性后加入 10 mL 不同浓度的胰酶溶液,并在 pH7.5、37 条件下培养 24 h(表 1)。在培养过程中一组不更换磷酸缓冲溶液(静态透析体系)、另一组则更换 5 次磷酸缓冲溶液(动态透析体系)。结果表明,在静态和动态透析体系内,  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  胰酶溶液浓度组粗蛋白体外消化率显著高于  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  浓度组 ( $P < 0.05$ ),而与 8 和  $12 \text{ mg mL}^{-1}$  浓度组无显著差异 ( $P > 0.05$ )。因此确定胰酶溶液的适宜浓度为  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ (含 40 mg 胰酶制剂)。此外与静态体系相比,动态体系的消化率测定值变异较小,重复性较好,以下研究将采用动态体系进行。

**2.2.2 适宜胰蛋白酶制剂的选择** 在保持其他反应条件与 2.2.1 相同情况下,研究不同胰蛋白酶制剂(40 mg 胰酶制剂或胰蛋白酶)对菜粕干物质和粗蛋白体外消化率的影响。结果表明,经胰酶制剂消化的菜粕干物质和粗蛋白体外消化率显著高于经胰蛋白酶消化的对应养分消化率 ( $P < 0.05$ )。因此本试验选用胰酶制剂进行下面的研究。

**2.2.3 最佳反应时间的选择** 在反应条件与 2.2.1

相同情况下,研究胰酶制剂反应的最佳时间。结果表明,随着反应时间延长(8、12、24和28 h),菜粕干物质和粗蛋白体外消化率均呈线性增加( $P = 0.0000$ )。当反应时间由8 h延长至24 h,菜粕干物

质和粗蛋白体外消化率显著升高( $P < 0.05$ ),继续延长至28 h,则消化率测定值无明显变化,因此本试验确定胰酶制剂作用的最佳时间为24 h。

表1 不同透析体系和胰酶制剂浓度对菜粕干物质和粗蛋白体外消化率的影响

Table 1 Effects of different dialysis systems and pancreatin concentrations on *in vitro* digestibility of DM and CP in rapeseed meals

胰酶溶液质量浓度/ (mg mL <sup>-1</sup> )	干物质体外消化率		粗蛋白体外消化率	
	静态透析体系	动态透析体系	静态透析体系	动态透析体系
1	55.14	58.21	74.25 a	73.66 a
4	61.47	57.07	80.10 b	78.88 b
8	56.59	60.00	79.63 b	79.52 b
12	54.19	56.39	78.05 ab	79.94 b
SEM	2.74	1.42	1.30	0.68
P值	0.31	0.36	0.05	0.00

注:SEM表示平均值标准误( $n=3$ );同列数值无相同字母者表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同。

2.2.4 磷酸缓冲溶液适宜pH值的选择 在与2.2.1相同的反应条件下,研究磷酸缓冲溶液适宜pH值。结果为,不同酸度的磷酸缓冲溶液(pH7.0、7.5、8.0)对菜粕干物质和粗蛋白体外消化率均无显著影响( $P > 0.05$ )。本试验确定7.5为最适pH值,该值最接近猪小肠pH环境。

2.2.5 反应适宜温度的选择 在反应条件与2.2.1相同情况下,研究适宜反应温度。结果为,37和40反应组菜粕粗蛋白体外消化率显著高于35反应组( $P < 0.05$ ),但二者间无显著差异( $P > 0.05$ ),因此确定37为适宜反应温度。

2.3 菜粕干物质和粗蛋白体内、外消化率及二者间的关系

由表2可知,菜粕干物质体外消化率比其全消化道消化率低24个百分点,比回肠表观消化率高3个百分点;菜粕粗蛋白体外消化率分别比其全消化道消化率低6个百分点,比回肠表观(真)消化率分别高18和11个百分点。经皮尔逊偏相关分析可得,菜粕干物质体外消化率与其回肠表观消化率显著相关( $r = 0.86, P = 0.00$ );粗蛋白体外消化率与其回肠表观(真)消化率显著相关( $r = 0.98$ 或 $0.99, P = 0.00$ ),与赖氨酸和苏氨酸回肠表观(真)消化率显著相关(赖氨酸 $r = 0.80$ 或 $0.82, P = 0.03$ ;苏氨酸 $r = 0.87, P = 0.01$ ),与蛋氨酸回肠表观消化率显著相关( $r = 0.82, P = 0.03$ )。经线性回归分析可建立回归方程[1]~[8]。

表2 7种菜粕的干物质和粗蛋白的体内消化率和体外消化率测定

Table 2 *in vitro* and *in vivo* digestibility values of DM and CP in seven rapeseed meal samples

项 目	赣油16号	宁杂1号	两优586	华杂3号	油研7号	青油2号	杂油59	SEM	P值
干物质消化率									
回肠表观消化率	60.66 c	46.66 a	52.99 ab	53.58 b	57.45 bc	56.52 bc	60.10 c	2.09	0.00
全消化道消化率	83.86 c	80.99 a	82.52 b	82.09 b	82.84 b	84.89 d	87.22 e	0.32	0.00
体外消化率	59.63 c	56.67 a	57.14 a	58.02 ab	60.24 bc	60.76 c	60.52 bc	0.70	0.00
粗蛋白消化率									
回肠表观消化率	61.70 bc	51.19 a	53.40 ab	54.60 ab	58.07 ab	59.48 ab	67.92 c	2.52	0.00
回肠真消化率	67.84 cd	57.52 a	59.71 ab	61.05 abc	63.86 abc	65.56 bc	73.87 d	2.52	0.00
全消化道消化率	80.81 b	79.85 b	77.88 a	80.69 b	82.78 c	84.66 d	87.92 e	0.64	0.00
体外消化率	78.41 de	71.67 a	74.00 ab	73.47 ab	75.73 bc	77.48 cd	81.20 e	0.78	0.00

方程[1]	干物质回肠表观消化率 = 2.35 × 干物质体外消化率 - 0.83	( $r^2 = 0.70$ , $P = 0.01$ )
方程[2]	粗蛋白回肠表观消化率 = 1.80 × 粗蛋白体外消化率 - 0.79	( $r^2 = 0.95$ , $P = 0.00$ )
方程[3]	粗蛋白回肠真消化率 = 1.72 × 粗蛋白体外消化率 - 0.66	( $r^2 = 0.97$ , $P = 0.00$ )
方程[4]	赖氨酸回肠表观消化率 = 166.2 × 粗蛋白体外消化率 - 57.8	( $r^2 = 0.64$ , $P = 0.032$ )
方程[5]	蛋氨酸回肠表观消化率 = 206.5 × 粗蛋白体外消化率 - 100.8	( $r^2 = 0.60$ , $P = 0.03$ )
方程[6]	苏氨酸回肠表观消化率 = 216.8 × 粗蛋白体外消化率 - 111.0	( $r^2 = 0.71$ , $P = 0.01$ )
方程[7]	赖氨酸回肠真消化率 = 202.2 × 粗蛋白体外消化率 - 94.2	( $r^2 = 0.67$ , $P = 0.02$ )
方程[8]	苏氨酸回肠真消化率 = 211.8 × 粗蛋白体外消化率 - 102.1	( $r^2 = 0.76$ , $P = 0.01$ )

### 3 讨论

#### 3.1 标准测定步骤及适宜酶促反应条件

自从 Sheffer 等<sup>[5]</sup>采用体外胃蛋白酶消化法测定饲料粗蛋白消化率以来,许多研究曾成功地采用胰蛋白酶<sup>[6]</sup>、木瓜蛋白酶<sup>[7]</sup>、链霉菌蛋白酶<sup>[8]</sup>、凝乳酶<sup>[9]</sup>等简单蛋白酶测定饲料蛋白质消化率。与动物消化道内复杂多变的多酶系统和精密的消化吸收过程相比,采用单一酶消化体系模拟动物体内的消化过程过于简单。Marable 和 Sanzone<sup>[10]</sup>指出在体外蛋白质水解过程中应该选用与动物消化道内相应的多种蛋白质水解酶的混合酶制剂代替单一的蛋白质水解酶;此外饲料中的蛋白质通常与碳水化合物和脂肪紧密结合,在混合酶制剂中加入脂肪酶和麦芽糖酶可能更理想,因为脂肪酶和麦芽糖酶可通过改变相应水解底物来影响蛋白质水解酶的作用。Gauthier 等<sup>[11]</sup>指出在体外消化测定技术中酶水解过程的选择至关重要,从生理生化角度来讲,蛋白质须被不同种类的蛋白酶水解,因每种蛋白酶具有不同特性,且作用于蛋白质的不同部位,最终产生的消化产物也不相同。为更准确模拟蛋白质在猪消化道内的消化过程,本试验选用胃蛋白酶-胰酶制剂两步酶解法测定菜粕粗蛋白体外消化率。所用胰酶制剂含有淀粉酶、胰蛋白酶、脂酶、核糖核酸酶和蛋白酶多种消化酶,更接近猪小肠酶的组成。结果表明,用胰酶制剂代替胃蛋白酶-胰蛋白酶两步酶解过程中的胰蛋白酶可使菜粕干物质和粗蛋白质消化率分别提高 5.2 和 11 个百分点。

动物体内消化是一个动态过程,消化产物不断被消化道吸收或进入下段消化道。在密闭容器内进行的体外消化反应,随时间延长,消化产物不断积累会抑制消化酶的作用<sup>[12]</sup>。Mauron 等<sup>[13]</sup>、Steinhart 和 Kirchgessner<sup>[14]</sup>、Gauthier 等<sup>[2,11]</sup>提出并发展了透析体外消化测定技术,将酶解过程放在透析袋内进行,并

通过替换缓冲液连续或间断地将消化产物排出,以消除消化产物对反应液中消化酶的抑制作用,且随缓冲液更换频率增加,蛋白质体外消化率显著提高;此外采用透析技术在消化过程中可将水解产物与反应混合物分离。因此本试验采用体外透析技术结合胃蛋白酶-胰酶制剂两步酶解法测定菜粕粗蛋白消化率,在试验中还发现间断地更换磷酸缓冲液可降低菜粕平行样品间消化率测定值的变异,提高重复性(表 1)。

本试验以体外酶促反应为基础,为避免各种影响酶促反应速度因素的影响,首先确定了胃蛋白酶和胰酶制剂的适宜浓度以及作用的最佳环境。

#### 3.2 菜粕干物质和粗蛋白体内体外消化率间的关系

本试验中,菜粕干物质或粗蛋白的体外消化率与其回肠消化率显著相关( $r = 0.86$  或  $0.99$ ,  $P = 0.00$ ),而与全消化道消化率相关性不显著( $r = 0.68$  或  $0.75$ ,  $P > 0.05$ )。因此可认为两步酶解法测得菜粕干物质和粗蛋白消化率更接近回肠表观(真)消化率,且通过建立回归方程可利用体外消化率间接估测回肠消化率,避免费用较高、时间较长、操作繁琐的动物消化试验。此外菜粕粗蛋白体外消化率与赖氨酸、蛋氨酸和苏氨酸回肠表观消化率( $r = 0.80$ 、 $0.82$  和  $0.87$ )或赖氨酸和苏氨酸回肠真消化率之间存在显著相关关系( $r = 0.82$  和  $0.87$ ),也可通过建立回归方程利用粗蛋白体外消化率间接估测赖氨酸、苏氨酸回肠表观(真)消化率以及蛋氨酸回肠表观消化率。

### 4 小结

1) 在本试验条件下,体外透析胃蛋白酶-胰酶制剂两步酶解法测定菜粕粗蛋白消化率的适宜酶促反应条件为:1 g 菜粕样品在  $100 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  胃蛋白酶、 $\text{pH}2.0/37$  条件下水解 1 h,将反应液调至中性,转入透析袋内,再加入 40 mg 胰酶制剂,然后在

0.01 mol L<sup>-1</sup>、pH 7.5、37 磷酸缓冲溶液中水解 24 h,期间更换 5 次缓冲液;

2) 通过建立有意义的回归方程,可利用体外消化率间接估测相应养分的回肠消化率。

### 参 考 文 献

- [1] Eggum B O, Boisen S. *In vitro* techniques of measuring digestion [A]. In: Verstegen M W A, Huisman J, Den Hartog L A, eds. Digestive Physiology in Pigs [C], Wageningen: The Netherlands, 1991. 213 ~ 225
- [2] Gauthier S F, Vachon C, Savoie L. Enzymatic conditions of an *in vitro* method to study protein digestion [J]. *J Food Sci*, 1986, 51(4): 960 ~ 964
- [3] 黄瑞林, 李铁军, 谭支良, 等. 透析管体外消化法测定饲料蛋白质消失率的适宜反应条件研究 [J]. *动物营养学报*, 1999, 11(4): 51 ~ 58
- [4] 席鹏彬, 李德发, 龚利敏, 等. 中国不同品种菜粕猪回肠氨基酸消化率研究 [J]. *中国畜牧杂志*, 2002, 38(4): 5 ~ 7
- [5] Sheffer A L, Eckfeldt G A, Spector H. The pepsin digest-residue (PDR) amino acid index of net protein utilization [J]. *J Nutr*, 1956, 60: 105 ~ 120
- [6] Maga J A, Lorenz K, Onayemi O. A research note. Digestive acceptability of proteins as measured by the intestinal rate of *in vitro* proteolysis [J]. *J Food Sci*, 1973, 38: 173 ~ 174
- [7] Buchanan R A. *In vivo* and *in vitro* methods of measuring nutritive value of leaf-protein preparations [J]. *Br J Nutri*, 1969, 23: 141 ~ 167
- [8] Taverner M R, Farrell D J. Availability to pigs of amino acids in cereal grains. 3. A comparison of ileal availability values with faecal, chemical and enzymatic estimates [J]. *Br J Nutr*, 1981, 46: 173 ~ 180
- [9] Batty R S. *In vitro* hydrolysis of skim milk and pea proteins by pepsin and rennin [J]. *Can Ins Food Sc Techno J*, 1982, 15: 101 ~ 108
- [10] Marable N L, Sanzone G. *In vitro* assays of protein quality assays utilizing enzymatic hydrolyses [A]. In: Bodwell C E, Adkins J S, Hopkin D T, eds. Protein Quality in Human: Assessment and *in vitro* Estimation [C]. Westport, CT: AVI publishing Co, 1981. 275
- [11] Gauthier S F, Vachon C, Jones J D, et al. Assessment of protein digestibility by *in vitro* enzymatic hydrolysis with simultaneous dialysis [J]. *J Nutr*, 1982, 112: 1718 ~ 1725
- [12] Robbin R C. Effect of ratio of enzymes to substrate on amino acid patterns released from protein *in vitro* [J]. *Int J Vit Nutri Res*, 1978, 48: 44 ~ 53
- [13] Mauron J, Mottu F, Bujard E, et al. The availability of lysine, methionine and tryptophan in condensed milk and milk powder. *In vitro* digestion studies [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1955, 59: 433 ~ 451
- [14] Steinhart H, Kirchgessner H. *In vitro* verdaungsapparatur zur enzymatischen hydrolyse von proteinen [J]. *Arch Tierernahr (Abstract)*, 1973, 23: 449 ~ 461