

饲用 β -甘露聚糖酶酶活力的测定方法及影响因素

张 玮 强 莉 宫玲玲

农业部饲料质量监督检验测试中心, 济南 250022

摘要 β -甘露聚糖酶属于半纤维素酶类, 在动物生产、饲料行业中应用广泛。本文综述了 β -甘露聚糖酶的酶学性质、酶活力测定方法及影响因素等方面的研究进展, 提出了统一的国家级检测方法和掌握影响酶制剂测定过程中各因素的关键点将成为今后研究的重点, 为 β -甘露聚糖酶的深入研究提供参考。

关键词 β -甘露聚糖酶; 酶学性质; 酶活力; 检测方法; 影响因素

β -甘露聚糖是一类具有特殊结构的半纤维素多糖, 在自然界中广泛存在, 但由于其自身性质很难发生水解。 β -甘露聚糖进入单胃动物体内后, 不利于营养物质的消化和吸收, 影响其生长和饲料的利用率; 而 β -甘露聚糖酶是作用于主链 β -1,4-糖苷键的重要内切酶, 可将 β -甘露聚糖水解为甘露二糖、甘露三糖等。畜禽的消化体系中缺少 β -甘露聚糖酶, 因此需要人为添加 β -甘露聚糖酶来降解玉米-豆粕型日粮中的 β -甘露聚糖^[1], 从而进一步提高日粮的饲用价值。鉴于此, β -甘露聚糖酶的理化性质、酶活检测方法及影响因素等方面的研究仍是当前研究的重点。

1 β -甘露聚糖酶的理化及酶学性质

β -甘露聚糖酶的来源非常广泛, 包括微生物、动植物和基因克隆等。据统计^[2]已发现 100 多种产酶的微生物, 包括细菌、真菌和放线菌等。动物来源的 β -甘露聚糖酶主要是低等动物的肠道分泌液, 许多植物萌发的种子以及番茄果实和种子中也都含有 β -甘露聚糖酶。随着 β -甘露聚糖酶分子生物学研究的开展, 可通过基因克隆的方式, 对天然来源的 β -甘露聚糖酶进行基因表达, 人工合成性能更好的 β -甘露聚糖酶。 β -甘露聚糖酶属于糖苷水解酶(GH)5.26 或 113 家族^[3], 目前已经报道的

β -甘露聚糖酶序列共有 232 个, 其中有 22 个 β -甘露聚糖酶开展了蛋白质晶体结构解析研究。 β -甘露聚糖酶属于典型的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构, 催化残基分别位于第 4 和第 7 折 β 叠片上。不同来源的 β -甘露聚糖酶有不同的构成, 它们的相对分子质量、主侧链的组成、作用方式、酶动力学特性、底物专一性等均有所不同。

2 β -甘露聚糖酶酶活力检测方法的研究进展

目前, β -甘露聚糖酶酶活力的测定方法主要有粘度法、还原糖法、色原底物法等, 这些方法各有其优缺点。还原糖法与粘度法、色原底物法相比, 重复性好、操作简单且灵敏度高, 在饲用 β -甘露聚糖酶的测定中得到了广泛应用。

1) 粘度法。粘度法的原理是利用高分子溶液在毛细管中的泊肃叶方程, β -甘露聚糖酶作用于具有粘性的非淀粉多糖底物, 使底物的粘度下降, 通过粘度计测定流速改变来计算酶活^[4]。粘度法的缺点是操作复杂、所需时间长、重复性差, 不同批号的底物粘度差别较大, 并且酶活单位难以换算成国际单位, 因而该方法并没有得到广泛的应用。

2) 还原糖法。还原糖法主要包括 DNS 法、砷钼酸盐法、铁氰化钾法、酚硫酸法、地衣酚法等^[5]。其中

DNS 法具有方法成熟、操作简单、显色稳定的优点, 尽管也存在一定的干扰和误差, 但目前仍然是饲用 β -甘露聚糖酶应用最多的酶活性测定方法。其原理是 β -甘露聚糖酶将底物降解成还原糖, 与 3,5-二硝基水杨酸在特定条件下发生显色反应, 用比色法测定还原糖含量。杨吉园等^[6]采用甘露聚糖为底物, pH 值为 5.5 的乙酸-乙酸钠为缓冲液, 在 37 °C 水浴中反应 30 min, 测定出 β -甘露聚糖酶的酶活。柴萍萍^[7]则采用槐豆胶为底物, pH 值 6.5 的 0.05 mol/L 的磷酸为缓冲液, 在 60 °C 水浴中准确反应 10 min, 用 DNS 测定出还原糖量。

3) 色原底物法。色原底物法的原理是利用人工合成的含有色原基团的底物来检测酶活。底物可在 β -甘露聚糖酶的作用下释放出有色物质, 利用分光光度法进行测定^[8]。色原法的缺点是由于合成底物与酶的天然底物存在一定的差异, 所以酶作用于合成底物与作用于天然底物有区别, 因此色原底物法测定的酶活力大小并不能代表真实的酶活力。

3 β -甘露聚糖酶酶活力测定的影响因素

酶的活力是指酶催化一定化学反应的能力, 测定酶活力实际就是测定在特定的系统和条件下酶促反应的速度^[9]。饲用 β -甘露聚糖酶活性单位定义中对影响酶活力大小的主要条件包括温度、pH 值、底物和时间进行了规定, 从而确保酶活力测定结果的一致性。

1) 温度。温度对酶活力的影响主要表现在 2 个方面^[10]: 一方面, 在反应温度低于最适温度时, 随着温度的上升, 反应物的能量增加, 单位时间内有效碰撞增多, 促使酶反应速度加快; 另一方面, 当温度上升到某一点后高于最适温度时, 温度再升高, 会使酶蛋白变性, 酶反应速度会迅速降低, 酶反应的最适温度就是这 2 种过程平衡的结果。不同来源的 β -甘露聚糖酶的最适反应温度也不相同。有研究^[11]表明, 黑曲霉产生的 β -甘露聚糖酶的最适反应温度为 45 °C, 高于或低于这个温度酶活均下降, 温度在 30 °C 时, 酶活仅为最适温度酶活的 40% 左右, 该酶在 50 °C 和 60 °C 下分别保存 160 min 后, 酶活几乎无变化。枯草芽孢杆菌^[12]产的 β -甘露聚糖酶的最适反应温度为 50 °C, 在 30~60 °C 范围内, 酶活可保持在最适温度酶活的 60% 以上。

2) pH 值。pH 值影响酶催化反应的速度以及酶在水溶液中的解离状态和行为。一方面, pH 值影响底物的带电状态, 进而直接影响酶促反应的进行; 另一方面, 随着 pH 值的变化, 酶的活性部位上的酸性或碱性的氨基酸侧链基团发生解离, 直接影响酶的状态及酶和底物的亲和力^[13]。王珊珊^[14]研究表明, 巨大芽孢杆菌产生的 β -甘露聚糖酶在 pH 值 7.0 时酶活最佳, 可知该酶为中性作用酶, pH 值在 6.5~8.0 之间该酶可保持较高活性, pH 值小于 5.0 时, 酶活会急剧下降。杨伟东^[15]研究发现黑曲霉固态发酵产生的 β -甘露聚糖酶则在 pH 值 4.2 时酶活最佳, 在偏碱性的条件下, β -甘露聚糖酶的酶活随 pH 值增加而迅速降低。

3) 底物。底物的选择对酶活的测定影响很大, 酶反应速度与底物浓度之间的定量关系可以用米氏方程来表达, 底物的浓度影响反应的速度。当底物浓度较低时, 酶活力随着底物浓度的增加而增大; 但当底物浓度增加到一定浓度时, 酶已被底物所饱和, 酶活将趋于一个极限值, 此时, 酶活力与底物的浓度无关而与酶的浓度正相关。短小芽孢杆菌^[16]发酵分离的 β -甘露聚糖酶, 以槐豆胶为底物测定酶活为 100%, 表明该酶对槐豆胶的水解活性最强, 其次为魔芋精粉, 而对椰粉和瓜尔胶的水解特性较低, 当以淀粉、羧甲基纤维素钠和桦木木聚糖为底物时, 几乎检测不到酶活。耐热 β -甘露聚糖酶^[17]对角豆胶的催化活性最高, 而对魔芋粉和瓜尔豆胶的催化活性较低。

4) 反应时间。酶解反应速率是指酶反应的初速率, 即酶促反应过程中底物浓度消耗不超过 5% 时的速率^[18]。酶促反应动力学表明, 酶解反应速率是以单位时间内反应物的减少量或产物的生成量来表示。反应时间过短, 产物的生产量较少, 酶促反应进行不完全; 随着反应时间的延长, 反应物逐渐消耗, 分子碰撞的机率也逐渐降低, 反应速率也随之减慢。所以检测酶活力时需要根据酶的性质来确定最佳反应时间。

5) 金属离子。酶制剂检测时都会使用一定的缓冲液, 使反应体系达到酶活定义所要求的 pH 值。但是缓冲液的离子强度对反应体系中酶蛋白的空间结构有一定的影响, 最终影响其催化活性。董桂清等^[19]研究表明, Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 对 β -甘露聚糖酶有强烈的抑制作用, NH_4^+ 、 Mg^{2+} 有较弱的抑制作用, Na^+ 则

有较小的激活作用。李文革等^[20]研究表明,低浓度下大多数金属离子对 β -甘露聚糖酶影响不大,但在高浓度下除 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶具有促进作用,其他离子对酶均有一定的抑制作用。

β -甘露聚糖酶活力的检测过程中除定义中规定的因素对酶活检测结果影响较大外,其他非定义因素也在一定程度上影响酶活检测结果,如缓冲溶液配制、显示剂的配制、稀释倍数、标准曲线等。

4 展 望

β -甘露聚糖酶作为一种重要的半纤维素酶,是微生物生长代谢过程中的合成产物,对降解半纤维素具有重要意义,能明显提高饲料利用率,但其活力与稳定性受温度、pH 值、反应时间、底物等因素影响较为明显。目前,饲用 β -甘露聚糖酶并没有统一规定的酶活测定方法和标准,酶活测定的条件不同,不同微生物来源的酶活测定方法在整个反应体系及底物的选择上存在众多差异,直接导致具有相同酶活的酶制剂产品无法进行比较。因此,饲用 β -甘露聚糖酶今后研究的重点应尽快制定统一的质量及检测标准,使 β -甘露聚糖酶的生产和质量评定更加规范和科学。在饲用 β -甘露聚糖酶活检测过程中多关注酶制剂活力测定的影响因素,正确掌握各影响因素的关键点,进一步加快 β -甘露聚糖酶在饲料工业中的应用。

参 考 文 献

- [1] 章飘海,王璋. β -甘露聚糖酶在畜禽中的应用[J]. 饲料与畜牧, 2015(2): 52-53.
- [2] MA Y, XUE Y, DOU Y, et al. Characterization and gene cloning of a novel β -mannanase from alkalophilic *Bacillus* sp. N16-5. *Extremophiles* 8: 447-454[J]. *Extremophiles*, 2005, 8(6): 447-454.
- [3] 赵月菊,薛燕芬,马延和. β -甘露聚糖酶的结构生物学研究现状和展望[J]. 微生物学报, 2009, 49(9): 1131-1137.
- [4] BATHGATE G N. The Institute of Brewing Analysis Committee: the determination of endo- β glucanase activity in malt. [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2013, 85(2): 92-94.
- [5] 张坚,陈铁桥,肖兵南. 饲用 NSP 酶制剂的研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2006(8): 52-54.
- [6] 杨吉园,高立云,薛秀梅. β -甘露聚糖酶的酶学性质研究[J]. 广东饲料, 2011, 20(8): 17-19.
- [7] 柴萍萍. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) WY45 产 β -甘露聚糖酶的纯化与性质研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [8] 堵苑苑. 饲用非淀粉多糖酶活性分析方法的研究进展[J]. 动物营养学报, 1998(4): 11-17.
- [9] 汤海鹏,汪勇,李富伟. 关于饲用酶制剂活性测定影响因素的分析[J]. 饲料工业, 2007(24): 11-13.
- [10] ADEMARK P, VARGA A, MEDVE J, et al. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: Purification and properties of a β -mannanase [J]. *J Biotechnol*, 1998, 63(3): 199-210.
- [11] 皮雄娥,费笛波,王龙英,等. 黑曲霉 AS6034 酸性 β -甘露聚糖酶的性质研究[J]. 饲料研究, 2006(2): 50-52.
- [12] 张文会,孙同韦,张会图,等. 饲用耐酸抗蛋白酶 β -甘露聚糖酶的筛选分离及酶学性质 [J]. 天津科技大学学报, 2015, 30(6): 7-11.
- [13] 李小明. β -甘露聚糖酶产生菌的筛选及酶学性质研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2010.
- [14] 王珊珊. 巨大芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶生产工艺和酶学性质的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [15] 杨伟东. 黑曲霉产 β -甘露聚糖酶的纯化及酶学性质研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(20): 9366-9368+9374.
- [16] 高兆建,唐仕荣,孙会刚,等. 短小芽孢杆菌 XZG33 耐高温酸性 β -甘露聚糖酶酶学性质研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(18): 9396-9399.
- [17] 赵梅,魏喜换,王春娟,等. 耐热 β -甘露聚糖酶基因的克隆与表达及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(6): 590-596.
- [18] 姜黎黎. 饲料酶制剂检测的影响因素[C]//2011 饲料酶制剂应用技术国际研讨会暨饲料酶制剂大会. 2011.
- [19] 董桂清,余钧池,罗永侦,等. β -甘露聚糖酶产生菌的筛选和酶学性质研究[J]. 轻工科技, 2007, 23(4): 20-21.
- [20] 李文革,石鹏君,卢海强,等. *Achaetomium* sp. Xz8 甘露聚糖酶在毕赤酵母中的表达及其酶学性质分析 [J]. 核农学报, 2015, 29(1): 87-94.