

# MBTH 法测定饲料中木聚糖酶的活性

王冠 徐丽 丁皓 周樱

武汉新华扬生物股份有限公司, 武汉 430074

**摘要** 为建立饲料中木聚糖酶的一整套测定方法, 试验先采用透析或超滤的预处理方法对饲料提取液中的木聚糖酶进行分离和富集, 再用 MBTH 法检测其木聚糖酶的活性。结果表明: 该方法用于饲料中木聚糖酶活性的测定, 具有灵敏度高、准确度高、重复性好且操作便捷的优势, 解决了目前饲料中木聚糖酶活性难以检测的难题。

**关键词** MBTH 法; 木聚糖酶; 活性测定; 透析; 超滤

木聚糖是植物半纤维素的主要成分, 是自然界中含量丰富的可再生资源。木聚糖是饲料中含量较高的抗营养因子, 不能被动物消化道所吸收, 并且阻碍其他营养成分的消化利用, 因此, 饲料中常添加一定量的木聚糖酶来消除木聚糖的抗营养作用, 提高动物对饲料的利用率<sup>[1-2]</sup>。

木聚糖酶是一类降解木聚糖分子中  $\beta$ -1,4 木糖苷键的酶系, 可将木聚糖水解为低聚木糖、木寡糖、木二糖以及少量阿拉伯糖和木糖的一种复合酶系统<sup>[3]</sup>; 不仅应用于饲料中, 还广泛应用于生物能源、食品、制药、制浆、造纸、纺织等行业<sup>[4-7]</sup>。

目前检测木聚糖酶的常用方法为二硝基水杨酸(DNS)法, 此法虽然简便快捷, 但灵敏度较低, 难以满足饲料中微量木聚糖酶的检测需求<sup>[8-9]</sup>。3- 甲基

-2- 苯并噻唑酮脞(MBTH)法常用于检测酚类和醛类化合物<sup>[9-10]</sup>, 还可与含羰基的化合物反应<sup>[11]</sup>。因此, 张永勤等<sup>[12-13]</sup>已将其用于木聚糖酶的检测, 该法灵敏度高, 理论上可用于饲料中微量木聚糖酶活性的测定。但实际应用时发现, 由于饲料中存在多种酚类、醛类等还原性物质, 均会与 MBTH 发生反应, 其反应灵敏度又高, 使得样品空白的本底颜色过深从而影响测定, 最终导致 MBTH 法的测定效果大打折扣, 相对于 DNS 法并没有明显优势<sup>[14]</sup>。

本文采用适当的预处理方法对饲料提取液中的木聚糖酶和小分子还原性物质进行分离, 富集木聚糖酶的同时尽量减少其中还原性物质的量, 避免对检测造成干扰, 再采用 MBTH 法测定其木聚糖酶的活性, 充分发挥 MBTH 法高灵敏度的优势, 达到

收稿日期: 2014-03-19

王冠, 男, 1981 年生, 硕士, 中级工程师。

固醇和高密度脂蛋白显著高于菜粕发酵组和豆粕组, 而不影响甘油三酯的含量, 可以推测生物工程平衡蛋白可能通过提高中猪血清中高密度脂蛋白的含量而使血清中总胆固醇含量升高, 从而防止机体胆固醇的异常, 清除体内多余的甘油三酯, 维护机体的健康, 提高中猪的生长性能和健康水平。

## 参 考 文 献

[1] 贾晓峰. 固态发酵对棉籽粕棉酚脱毒及蛋白质降解的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008

[2] 孙林. 微生物固态发酵菜籽粕的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008.

[3] 聂蓬勃. 发酵法降低棉粕中游离棉酚含量及提高其营养价值的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.

[4] EL-BATAL A I, KAREM H A. Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation[J]. Food Res Int, 2001, 34(8): 715-720.

[5] 刘丁健, 曾其恒, 李秀宝, 等. 复合抗菌肽制剂对保育猪生长性能和健康水平的影响[J]. 养猪, 2011(1): 15-16.

[6] 汪以真, 王中强, 许梓荣. 抗菌肽与抗生素的体外抗菌效果比较[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(3): 270-272.

较理想的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

木糖, 木聚糖, 3-甲基-2-苯并噻唑酮脲 (MBTH), 二硫苏糖醇 (DTT), 硫酸铁铵, 氨基磺酸, 乙酸, 乙酸钠, 氢氧化钠等。

木聚糖酶及饲料样品均采购于市场。

透析袋 (截留分子量 8~14 ku), 超滤离心管 (millipore, Amicon Ultra 15, 截留分子量 10 ku), 紫外-可见分光光度计 (Unico UV2800), 水浴振荡器, 漩涡混合器, 电子天平 (万分之一), 恒温水浴锅, 中药粉碎机, 移液器, 秒表等。

### 1.2 试验方法

1) 待测液的提取。饲料样品按 GB/T 14699.1 的规定进行采样后, 取适量以四分法缩分至 200 g 左右, 再粉碎并通过 0.45 mm 标准筛, 混匀后装入密封容器内待用。

取 2 g 待测样品于 150 mL 锥形瓶中, 加入 50 mmol/L 的乙酸缓冲液 100 mL (pH 值 5.5), 在 25 °C 的水浴振荡器上以 150 r/min 提取 30 min, 再取适量溶液以 4 000 r/min 离心 10 min 后取上清液待测。

2) 透析法处理。取 25 mL 待测液于处理好的透析袋内 (截留分子量 8~14 ku), 密封后置于 250 mL 乙酸缓冲液 (pH 值 5.5) 中进行透析, 在 25 °C 的水浴振荡器中透析 2 h 后, 收集透析袋内的待测液并定容至 50 mL, 最后用 MBTH 法对其中的木聚糖酶活性进行分析。

3) 超滤法处理。取 12.5 mL 待测液于处理好的超滤离心管中 (截留分子量 10 ku), 4 000 r/min 离心 20 min 后收集上层浓缩液并定容至 25 mL, 再用 MBTH 法对其中的木聚糖酶活性进行分析。

4) 试剂的配制<sup>[14]</sup>。MBTH 显色液: 3 mg/mL 的 MBTH 溶液和 1 mg/mL 的 DTT 溶液等量混合即得, 现用现配, 1 d 内有效。硫酸铁铵试剂: 准确称量 5.00 g 硫酸铁铵和 5.00 g 氨基磺酸, 溶解, 转移至 1 000 mL 容量瓶中, 加入 36%~38% 的浓盐酸 41.75 mL, 溶解, 定容至刻度, 充分混匀, 转移至棕色瓶中, 于 4 °C 冰箱贮藏待用。木糖标准溶液: 精确称取干燥至恒质量的木糖 0.100 1 g, 用缓冲液定容至 100 mL, 得 1 mg/mL 的木糖溶液。

5) 标准曲线的绘制<sup>[12]</sup>。分别吸取木糖标准溶液 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 和 2.8 mL, 用乙酸缓冲液定容至 100 mL, 配制成浓度为 4、8、12、16、20、24 和 28 μg/mL 的木糖溶液。

分别取上述各浓度木糖溶液 500 μL (设 3 组平行样), 加入到 500 μL 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液中, 再分别加入 MBTH 试剂 500 μL, 充分混匀, 80 °C 水浴加热 15 min 后, 迅速加入硫酸铁铵试剂 1 mL, 室温冷却后在 650 nm 处测定吸光度值。以相应缓冲液代替木糖溶液制成空白样。以木糖浓度为 Y 轴, 吸光度值为 X 轴, 绘制标准曲线。

6) 木聚糖酶活性的测定<sup>[13]</sup>。取预处理后的待测液 0.5 mL, 经 37 °C 预热 5 min 后与 0.5 mL 木聚糖底物溶液 (0.8 mg/mL) 于试管中混匀, 于 37 °C 反应 30 min, 加入 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液 1 mL, 充分混合以终止反应; 再分别加入 MBTH 试剂 1 mL, 充分混匀, 80 °C 水浴加热 15 min 后, 迅速加入硫酸铁铵试剂 2 mL, 室温冷却后在 650 nm 处测定吸光度值, 对照标准曲线计算木糖的生成量。而空白对照则是先在待测液中加入 NaOH 溶液使其中的木聚糖酶变性失活, 再加入木聚糖底物溶液并进行后续的显色反应。

7) 酶活计算公式<sup>[14]</sup>。

$$X = (A_E - A_B) \times K \times n / m / t / M$$

X: 木聚糖酶活性 (U/g);  $A_E$ : 酶反应液吸光度值;  $A_B$ : 空白对照吸光度值; K: 标准曲线的斜率; n: 样品的稀释倍数; m: 样品质量/g; t: 反应时间/min; M: 木糖的摩尔质量, 150.1 g/mol。

### 1.3 方法学的验证

1) 准确度的验证。精确添加一定量的木聚糖酶至空白饲料样品 (未添加木聚糖酶) 中, 检测其木聚糖酶的含量, 通过与理论添加量的比较来考察方法的回收率。

2) 精密度的验证。分别比较 1 d 之内检测 3 次和连续检测 3 d 结果的相对标准偏差 (RSD), 来考察方法的日内精密度和日间精密度。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶活的计算

MBTH 法测木糖的标准曲线为  $y = 55.767 5x + 0.048 1$ ,  $R^2 = 0.999 4$ , 检测样品酶活时将各数据代入酶活的计算公式即可。

## 2.2 预处理方法的比较

取不同公司的饲料样品 A、B、C、D、E 共 5 份, 分别采用透析法和超滤法进行预处理, 对照则不采用任何预处理方法, 提取待测液后直接用 MBTH 法进行检测。结果如表 1 所示。

由表 1 可明显看出, 样品经透析法或超滤法进行预处理后, 空白对照吸光度值会大幅下降, 如: 样品 A 的空白对照吸光度值为 0.779, 经过透析法预处理后降为 0.366, 经过超滤法预处理后降为 0.347; 样品 B 的空白对照吸光度值为 0.865, 经过透析法预处理后降为 0.406, 经过超滤法预处理后降为 0.392... 说明透析法和超滤法都能达到对饲料样品提取液中的木聚糖酶进行分离和富集的目的。透析是通过小分子(关键是对检测造成干扰的还原性物质)会经过半透膜扩散到缓冲液中, 而生物大分子(包括木聚糖酶)则会被保留在透析袋内的原理, 将小分子杂质与木聚糖酶进行分离, 从而降低这些杂质对检测的干扰; 超滤是通过超滤膜截留生物大分子于上层, 而小分子和水则会在离心力的作用下透过膜达到下层, 从而对木聚糖酶和小分子杂质进行分离, 同时兼有浓缩木聚糖酶的效果。这里选用透析袋的截留分子量为 8~14 ku, 超滤离心管的截留分子量为 10 ku, 是因为目前发现的木聚糖

酶的分子量几乎都在 20 ku 以上, 截留分子量 10 ku 左右的半透膜或超滤膜即可达到理想的效果。

由表 1 可知, 透析法和超滤法的效果相差不多, 超滤法要稍好一点。透析法是小分子经过半透膜后在膜两侧达到平衡, 根据膜两侧液体的体积比、透析时间长短等因素, 小分子在膜两侧会有不同的分配比, 通过延长透析时间、提高透析温度等方法可以改善透析效果, 但这些方法在这里并不是很适用, 因为木聚糖酶作为生物催化剂的一大特性就是具易变性, 稳定性较差, 过长的操作时间及过高的透析温度都不利于木聚糖酶的稳定; 其次, 木聚糖酶和饲料成分(包括其中的木聚糖)共处在提取液中, 较长的时间、适宜的温度等条件可能会导致两者在处理过程中即发生反应, 对检测结果造成影响。因此, 快捷简便兼有浓缩作用的超滤法当然更为适宜, 而且必要时可以用冷冻离心机在低温进行超滤预处理, 效果会更好, 但超滤离心管是一次性的, 且价格不菲, 超滤法的成本也比透析法要高出不止。

从表 1 中可发现通过透析法和超滤法处理后的样品测得的酶活比未处理的要低一些, 初步估计是未经预处理的样品由于受到饲料中杂质的干扰导致了检测结果偏高, 但因为并不知晓各饲料样品

表 1 进行不同预处理后的测定结果比较 (n=3)

饲料样品	预处理方法	取样量/g	稀释倍数	空白对照吸光度值	样品吸光度值	酶活/(U/g)	国标法酶活/(U/g)
样品 A	无			0.779	0.276	0.336	3.02
	透析法	2.032 5	200	0.366	0.213	0.260	2.34
	超滤法			0.347	0.205	0.250	2.25
样品 A	无			0.865	0.174	0.214	1.93
	透析法	2.071 3	200	0.406	0.118	0.145	1.31
	超滤法			0.392	0.112	0.138	1.24
样品 A	无			0.667	0.247	0.293	2.64
	透析法	2.085 2	200	0.332	0.209	0.248	2.23
	超滤法			0.320	0.201	0.239	2.15
样品 A	无			0.974	0.243	0.299	2.69
	透析法	2.014 1	200	0.496	0.209	0.257	2.31
	超滤法			0.483	0.206	0.253	2.28
样品 A	无			0.712	0.156	0.190	1.71
	透析法	2.034 6	200	0.325	0.115	0.140	1.26
	超滤法			0.321	0.109	0.133	1.20

注: 国标法酶活是根据国标法(DNS 法)与 MBTH 法检测木聚糖酶活性的转换系数约为 9 倍计算所得<sup>[4]</sup>。

表 2 准确度验证的结果( $n=3$ )

饲料样品	预处理方法	检测酶活/(U/g)	理论酶活/(U/g)	回收率/%
样品 1	无	0.228	0.15	152.0
	透析法	0.166		110.7
	超滤法	0.159		106.0
样品 2	无	0.365	0.25	146.0
	透析法	0.272		108.8
	超滤法	0.261		104.4
样品 3	无	0.426	0.35	121.7
	透析法	0.371		106.0
	超滤法	0.358		102.3

表 3 日内精密度验证的结果( $n=3$ )

预处理方法	饲料样品	第 1 次	第 2 次	第 3 次	RSD/%
透析法	样品 1	0.225	0.238	0.247	4.67
	样品 2	0.129	0.148	0.135	7.07
	样品 3	0.256	0.265	0.269	2.53
超滤法	样品 1	0.212	0.219	0.203	3.80
	样品 2	0.125	0.117	0.131	5.65
	样品 3	0.245	0.255	0.259	2.85

表 4 日间精密度验证的结果( $n=3$ )

预处理方法	饲料样品	第 1 天	第 2 天	第 3 天	RSD/%
透析法	样品 1	0.236	0.219	0.249	6.41
	样品 2	0.135	0.142	0.117	9.82
	样品 3	0.248	0.263	0.273	4.81
超滤法	样品 1	0.202	0.221	0.210	4.52
	样品 2	0.129	0.136	0.115	8.44
	样品 3	0.238	0.254	0.261	4.70

中的木聚糖酶实际添加量,所以后面的回收率试验也专门加入了未经预处理直接检测的方法的回收率考察以便于分析。

### 2.3 方法学的验证

1)准确度。配制了 3 组不同配方的空白饲料样品,分别添加至 0.15、0.25、0.35 U/g 即国标法约 1.35、2.25、3.15 U/g 的木聚糖酶含量,分别采用透析法、超滤法和直接检测的方法对其中的木聚糖酶活性进行检测,通过计算木聚糖酶的检测方法与添加量之比得到方法的回收率。结果如表 2 所示。

如表 2 所示,不采用预处理方法直接进行检测,测得的木聚糖酶结果会偏高;采用透析法或超滤法进行预处理后再检测,测得的结果较准确,回收率在 102%~111%。说明饲料中的小分子杂质会严重干扰检测过程,造成木聚糖酶的测定结果偏

高,通过透析、超滤等合适的预处理方法去除小分子杂质后才能获得较准确的结果。此外,通过表 2 还可以发现,随着添加量的增大,测定结果的准确度也在提高,特别是无预处理样品的表现更是明显。这应该是由标准曲线的线性范围有限导致的,通常普通的分光光度计在样品吸光度值超过 1.0 后便会由于线性变差的原因导致测得结果偏低,当木聚糖酶添加量增大时,样品吸光度值也随之升高,但由于未处理样品的空白对照吸光度值很高,使得“空白对照+样品”的吸光度值超过 1.0,从而导致测得的结果偏低,而另一方面因为小分子杂质干扰的缘故,未处理样品测得的结果又是偏高的,所以,最终造成了随着添加量的增大,测得结果的准确度也在提高的现象。

2)精密度。取不同公司的 3 个饲料样品,分别

对透析法和超滤法的日内精密度和日间精密度的进行了考察。结果分别如表 3、表 4 所示。

由表 3 和表 4 可知,无论是透析法还是超滤法用于测定饲料中木聚糖酶的活性,其精密度都是符合要求的。

### 3 讨 论

本文采用了透析和超滤的预处理方法对饲料提取液中的木聚糖酶和小分子杂质进行分离,以减少这些小分子杂质特别是还原性物质对 MBTH 法检测木聚糖酶活性造成的干扰。通过对比分析,发现透析和超滤均能起到较好的分离作用,大幅降低空白对照的吸光度值,从而减少杂质对检测的干扰。其中,超滤法相对于透析法更快捷简便,但成本却要高出不少,具体选择何种预处理方法,应根据自身的经济情况及使用需要来综合考虑。之后,通过对透析法和超滤法的一系列方法学验证,发现无论是透析法还是超滤法,其准确度和精密度都是符合要求的,说明了该方法用于测定饲料中木聚糖酶的活性是准确可靠的。

本文通过透析和超滤的预处理方法去除了饲料提取液中的小分子杂质,富集其中的木聚糖酶,使得 MBTH 法的高灵敏度优势得以发挥。实际上,目前大部分饲料中酶制剂活性的测定难点并不仅仅在于检测方法的灵敏度不够,还由于饲料成分复杂,其中的小分子杂质往往会严重干扰检测过程,致使实际的检测限与理论检测限相差甚远,而饲料中酶制剂的添加量又很低,一般仅有 1~3 U/g,从而导致了饲料中酶制剂活性的测定成为困扰已久的难题,适宜的预处理手段加上足够灵敏的检测方法是解决这个难题的关键。

### 参 考 文 献

- [1] WONG K K, MARINGER U. Substrate hydrolysis by combinations of *Trichoderma xylanases* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1999(15): 22-26.
- [2] 丁强. 饲用木聚糖酶的研究进展及应用[J]. *中国饲料*, 2010(3): 22-25.
- [3] 杨浩萌, 姚斌, 范云六. 木聚糖酶分子结构与重要酶学性质关系的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2005, 21(1): 7-10.
- [4] 汤斌, 陈中碧, 张庆庆, 等. 玉米秸秆发酵燃料乙醇预处理条件的优化[J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(6): 65-67.
- [5] 聂国兴, 华雪铭, 王俊丽, 等. 小麦基础饲料添加木聚糖酶对尼罗罗非鱼肠道菌群的影响[J]. *水产学报*, 2009, 33(5): 805-812.
- [6] 李武光, 李新平, 杜敏. 木聚糖酶对漂白针叶木浆改性的研究[J]. *造纸科学与技术*, 2009, 28(4): 20-22.
- [7] 任延刚, 朱启忠, 刘新颖. 木聚糖酶的制备及应用研究[J]. *饲料研究*, 2009(9): 18-20.
- [8] 冯培勇, 左言美, 袁腾飞, 等. 木聚糖酶活性测定方法的研究[J]. *生命科学仪器*, 2009, 7(4): 40-42.
- [9] MARIE P, MIROSLAV P, DRAHOMIRA S. Spectrophotometric study of reactions of substituted phenols with MBTH in alkaline medium: the effect of phenol structure on the formation of analytically useful coloured products [J]. *Mikrochim Acta*, 1998(129): 201-208.
- [10] TODA K, YOSHIOKA K I, MORI K, et al. Portable system for near-real time measurement of gaseous formaldehyde by means of parallel scrubber stopped-flow absorptiometry [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 531(1): 41-49.
- [11] ANTHON G E, BARRETT D M. Determination of reducing sugars with 3-methyl-2-benzothiazohnonehydrazone [J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 305(2): 287-289.
- [12] 张永勤, 王哲平, 徐杰, 等. MBTH 法测木糖含量的研究[J]. *食品科技*, 2010, 35(4): 247-250.
- [13] 张永勤, 王斐, 曾凡伟, 等. 微量测定木聚糖酶活力的新方法-MBTH 法[J]. *食品科学*, 2012, 33(3): 44-47.
- [14] 徐丽, 王冠, 丁皓, 等. MBTH 法检测木聚糖酶活性[J]. *饲料工业*, 2013, 34(2): 38-40.