

发酵液中 植酸酶活力测定方法的改进

张娜^{1,2}, 郭庆启³, 赵新淮^{1*}

(1.东北农业大学, 黑龙江哈尔滨 150030; 2.哈尔滨商业大学, 黑龙江哈尔滨 150076;

3.东北林业大学, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 采用钼蓝- V_c 显色法对产植酸酶菌株发酵液的植酸酶活性进行测定, 并同 AOAC 无机磷分析方法进行比较。针对可能存在的植酸钠水解问题, 空白样测定仍然采用三氯乙酸 (TCA) 为植酸酶灭活剂, 改进了分析程序, 减少了 TCA 在高温下对植酸钠的水解作用, 分析结果更为准确。

关键词 植酸酶, 酶活力, 分析

Abstract Molybdate and ascorbic acid reaction system was applied to determine phytase activity in our study, and method of AOAC was also applied for comparison. As phytate can be hydrolyzed during determination when trichloroacetic acid is used as denaturing agent, we modified the analysis procedures. Trichloroacetic acid was also used as denaturing agent, but added in a different step. The final result showed that hydrolysis of phytate was decreased. More accurate analysis result was obtained.

Key words phytase; phytase activity; analysis

中图分类号: TS201.2+5 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2006)12-0173-02

我们在研究工作中发现, 在分析发酵液中的植酸酶活力时, 若以蒸馏水做空白对照, 往往植酸酶的活力很高。造成这种现象的原因主要有两方面, 一是分析所用试剂中含有一部分无机磷; 二是菌株生长过程中代谢合成的植酸酶不断降解麸皮中的植酸盐, 释放无机磷, 而且这一过程延续的时间较长, 造成培养基中的无机磷大量积累。因此, 在分析发酵液中植酸酶活力时, 造成所谓的“假酶活”^[5]。由于发酵液制得的粗酶液中无机磷含量往往较高, 在短时间内植酸酶分解植酸钠释放出的无机磷, 要比粗酶中

原先含有的无机磷低得多, 因此在较短的反应时间内是很难准确测出实际酶活的。由于在相关研究中, 酶活力的测定非常重要, 所以, 要求测定方法具有准确、稳定、灵敏度高、操作方便等优点。为此, 我们对植酸酶活力的具体测定方法和程序进行了一些改进。

1 材料与方法

1.1 实验材料

植酸酶发酵液 为实验室发酵制得; 植酸钠购于 Sigma 公司, 其它所用药品 均为分析纯试剂。

1.2 无机磷分析与空白样处理比较^[1,4]

1.2.1 改进的无机磷测定方法原理 植酸酶作用于植酸及其盐类释放出无机磷, 采用钼蓝- V_c 显色法, 反应以酒石酸锑氧钾作催化剂, 使无机磷在酸性条件下与钼酸铵发生反应, 生成淡黄色磷钼杂多酸, 再用抗坏血酸将其还原为磷钼蓝, 最大吸收波长在 720nm。当无机磷含量在一定范围内时, 与磷钼蓝颜色的深浅成正比。通过测定显色后溶液的吸光度 (A), 定量的测定发酵液中植酸酶作用底物植酸钠释放的无机磷的量, 进而计算出植酸酶的活力。

1.2.2 无机磷测定方法比较 利用 AOAC 无机磷分析方法制作标准曲线, 并同上法一起对同一粗酶液中植酸酶活力进行测定, 比较两种方法在植酸酶测定上的不同。

1.2.3 空白样灭活方式比较 采用先加 TCA 后加底物、直接热灭活 (100℃, 10min) 和 10% TCA 先灭活酶液的方法, 对同一植酸酶溶液的空白样中所含无机磷的量进行测定, 对这三种酶灭活方法进行比较分析。

1.3 改进的酶活力测定

1.3.1 发酵液中植酸酶活力的测定 取 0.1mL 粗酶液 (必要时适当稀释), 加入到 0.7mL 乙酸缓冲液 (0.2mol·L⁻¹ pH5.5) 中, 37℃ 保温 5min 后加入

收稿日期: 2006-03-17 *通讯联系人

作者简介: 张娜 (1979-), 女, 助教, 在读博士研究生, 研究方向: 食品安全检测、食品品质控制。

基金项目: 黑龙江省教育厅重大科研项目。

0.0051mol·L⁻¹ 植酸钠 0.2mL,振荡均匀,于 37℃条件下反应,精确计时 30min 后取出具塞试管,并向其中加入等体积 10%TCA,振荡后静止 10min,使植酸酶在 TCA 的作用下完全失去活性,然后加蒸馏水至 9mL,加入 0.5mL10%抗坏血酸溶液,振荡均匀后加入 0.5mL 显色剂溶液,充分振荡,精确计时,15min 后在无机磷最大吸收波长下测定吸光值,通过标准曲线换算出无机磷的含量,除去空白即为粗酶液与底物植酸钠相互作用释放出的无机磷的量(ΔP)。

1.3.2 空白样测定方法 在测定空白样时,直接将含有植酸酶的发酵液同缓冲溶液在 37℃条件下保温 35min,取出后加入等体积 TCA 将酶灭活,然后加入底物植酸钠,其它操作步骤和样品的测定相同。

1.3.3 植酸酶活力计算 参照文献[2]。

2 结果与讨论

利用标准溶液,采用两种不同的分析方法对无机磷进行分析,发现用钼蓝-Vc 显色法测定时得到的回归方程为 $A=1.59x(\mu\text{mol})+0.00509$,回归系数为 0.9999,用 AOAC 测定法得到回归方程为 $A=1.23x(\mu\text{mol})+0.0118$,回归系数为 0.9989 (x 代表无机磷的浓度)。所以,本研究所采用的无机磷分析法的灵敏度高于 AOAC 方法,可以检测出更低浓度的无机磷,测定也就更为准确。

利用钼蓝-Vc 显色法和 AOAC 法在对同一发酵液样品进行酶活力分析时,最终的测定结果存在明显的差异。

表 1 两种方法对同一粗酶液中植酸酶活力(F_{TU}·mL⁻¹)测定结果

方法	1	2
钼蓝-Vc 显色法	0.0774	0.0776
AOAC 方法	0.0250	0.0250

AOAC 法测定出现酶活力结果偏小的原因可能是由于显色反应需要在沸水浴中进行,溶液中已经存在的 TCA 可在高温下水解底物植酸钠,因此造成误差。所以,用 TCA 做酶的灭活剂时,不能采用 AOAC 无机磷分析方法进行植酸酶的测定。相反,钼蓝-Vc 显色法是在室温下进行的,可减少 TCA 对植酸的水解作用,分析结果相对准确。

文献报道,在测定植酸酶的酶活力时,对于空白样的处理可以采用直接热灭活(100℃,10min)^[6]或 TCA 灭活酶液的方法^[7]。对这两种灭活方式进行比较后发现,采用直接热灭活方式进行植酸酶空白样活力测定,空白样的测定值和本研究采用的测定方法得到的测定值相同,而采用 TCA 灭活方式测得的空白样的值稍高于本研究(见表 2),这进一步说明 TCA 在 37℃加热的条件下对植酸钠有一些水解作用^[5]。

所以,在反应初始立即用 TCA 作为空白样测定时的灭活处理,并不是十分适合。底物植酸钠在强酸及热处理的条件下可发生水解,干扰了测定结果的

表 2 灭活方式对测定结果的影响

结果	改进的灭活处理	直接热灭活	TCA 灭活
空白的吸光度	0.24	0.24	0.28
样品的吸光度	0.44	0.44	0.44
无机磷释放量	0.13	0.13	0.10

准确性。在空白样的测定中采用加热的方式对植酸酶进行灭活是较准确的,但是实验过程耗时长,操作不方便。如果对空白样进行改进处理,采用先不灭活植酸酶、也不加入底物,而是直接将含有植酸酶的发酵液同缓冲溶液在 37℃条件下保温 30min,取出后再加入等体积 TCA 将酶灭活,再加入底物进行处理,从而防止了植酸酶对底物的水解作用,也避免了 TCA 在热环境中对底物的水解。比热灭活的操作更简单方便,快速,同时比过去的其他人采用的 TCA 直接灭活植酸酶的方法更准确。

3 结论

经比较发现,对植酸酶活力进行评价时,若采用 AOAC 中无机磷的测定方法的话,则不能用 TCA 作植酸酶酶的灭活剂,并且分析方法的灵敏度不是十分理想。应用钼蓝-Vc 显色法,则可以解决灵敏度和植酸钠的酸水解问题。空白样测定时,当采用 TCA 为灭活剂时,可能产生假酶活问题。如果改进程序,先不加入底物植酸钠,而是将酶液与缓冲液保温,反应完成后用 TCA 将酶灭活,然后加入底物,这样操作避免了 TCA 在热环境下对植酸钠的水解作用,能够较准确的测定植酸酶水解底物后释放的无机磷的量,酶活力分析结果更为准确。

参考文献:

- [1] 陈录华. 循环水中总磷酸盐测定方法的改进[J]. 大氮肥, 1999,22(4): 283~286.
- [2] 张若寒. 植酸酶含量测定的必要性与两步测定方法的评价[J]. 饲料工业, 2001,22(9): 1~5.
- [3] AOAC Official Method 995.11. Phosphorus (total) in Foods. AOAC Official Methods of Analysis Vitamins and other nutrients [M]. 2000.42~45.
- [4] Klaus. Grasshoff verlag, weinheim, Methods of sea water analysis (II) [M]. 1983.125~131.
- [5] 黄遵锡, 章克昌, 徐柔. 植酸酶活力测定不同方法的比较[J]. 饲料工业, 1999,20(12): 20~22.
- [6] Seong Jun Yoon et al. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, Enterobacter sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996,18(1): 449~453.
- [7] 马艳, 洪葵, 李枚秋, 等. 木薯渣固态发酵植酸酶的条件研究[J]. 热带作物学报, 2000,21(2): 58~64.
- [8] 黄遵锡, 慕跃林, 张克昌. 植酸酶固体发酵条件的研究[J]. 菌物系统, 2000,19(1): 102~106.