

饲料植酸酶制剂储存稳定性的研究*

潘 力 冉宇舟 王亚琴 罗立新 邱天潮

(华南理工大学生物科学与工程学院,广州,510640)

摘 要 酶制剂的储存稳定性问题是酶应用过程中最常遇到的实际问题。该研究的周期长,样品保存困难,研究手段缺乏。文中系统探讨了糖类和金属盐类物质对植酸酶制剂热稳定性的保护作用,添加金属盐离子对植酸酶制剂的热稳定效果明显优于各种糖类物质的保护效果,其中以添加金属盐 MgSO_4 的热稳定效果最佳,糖类物质中淀粉最适合作为固体酶制剂的载体。同时创新性地引入了药物制剂稳定性的恒温加速试验研究方法,用于酶制剂储存稳定性的研究。比较了糖类和金属盐添加剂对植酸酶制剂储存稳定性的影响,为酶制剂储存稳定性的研究提供了新的研究方法。

关键词 储存稳定性,金属盐离子,糖类,恒温加速试验

随着生物技术和酶工程技术在工业上的普遍应用,酶在工农业生产、医药卫生、环境保护等方面的作用越来越重要。而在酶应用过程中最常遇到的问题就是酶的稳定性问题,包括在应用加工过程、储存过程中,直接影响酶的最终应用效果。以植酸酶(Phytase)为例,它作为一种环保和新型的饲料生物酶添加剂,由于其在解除植物性饲料中植酸的抗营养作用和饲料高效利用方面的功用而倍受关注^[1],但植酸酶的活性在制粒的过程中损失较大^[2]。提高饲用酶热稳定性的方法有很多^[3],对于植酸酶,常用的方法有自然选择法、蛋白质工程法、化学修饰法、添加酶稳定性添加剂、制备包被型颗粒酶^[4]等。其中以添加酶稳定性添加剂的手段最为简便和实际。

文中较系统地研究了糖类和金属盐添加剂对植酸酶制剂热稳定性的影响。而目前,对酶制剂储存过程稳定性研究的手段不多,主要是由于研究周期跨越时间长,样品保存困难。文中根据药剂学中对各种药剂储存稳定的研究方法如恒温加速试验等,创新性地引入酶制剂储存稳定性研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

植酸酶液体制剂,购于肇庆市华芬饲料酶有限公司。

CaCl_2 , MgSO_4 , ZnSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 可溶性淀粉、葡萄糖、糊精、蔗糖、麦芽糖、乳糖,均为分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 植酸酶活力单位的定义

37℃, pH5.0 条件下,每分钟从植酸钠中释放出 1 nmol/L 的无机磷所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.2.2 植酸酶酶活测定

植酸酶的酶活检测方法参见文献^[5~7]。对测定方法中三氯乙酸终止反应的时间与显色剂的显色时间进行了改进,以空白样作为对照,比较不同终止反应时间和显色时间对测定的影响。

1.2.3 植酸酶热稳定性测定

1.2.3.1 植酸酶酶活残留率的测定

添加一系列浓度的糖类和金属盐类到植酸酶液体制剂中,在 60℃ 下水浴加热 2 min,冰水冷却后以相应不加热的酶活力作对照(100%),测定植酸酶活残留率。

1.2.3.2 酶制剂的恒温加速试验^[8]

(1)将样品置于不同温度的恒温器(如恒温水浴、恒温箱)中,间隔一定时间取样(如表 1),测定植酸酶的酶活残留率(C)。

表 1 样品加速温度和取样时间

温度/℃		时间/min		
40	30	60	90	120
45	15	30	45	60
50	7.5	15	22.5	30
55	5	10	15	20

(2)根据酶活残留测定结果,作 $\log C - t$ 图,确定反应级数。

(3)求出不同温度下酶制剂失活反应速度常数 K 值。

(4)将 $\log K - 1/T$ 作 Arrhenius 图,从 Arrhenius 图得出直线后,将直线外推到所需温度,求出所需温度下的 K 值。

第一作者:博士,副教授。

* 广东省自然科学基金项目(04020061),广东省科技攻关项目(2004B20201011)

收稿日期:2006-08-16

(5)根据 K 值计算出酶制剂理论保存有效期。

2 结果与讨论

2.1 植酸酶测定方法的校正

目前测定植酸酶的方法有钼蓝法和钼钒法,而国内外各种文献以及市场上各种植酸酶商品所标明的测定条件各不相同,影响了植酸酶的开发研究。文中采用钼蓝法测定植酸酶的活性,37℃,pH 5.5 条件下,每分钟从植酸钠中释放出 1 mmol/L 的无机磷所需的酶量为 1 个酶活单位。但各种文献中三氯乙酸终止反应的时间与显色剂的显色时间各不相同,笔者发现这 2 个因素对测定结果造成较大的误差。文中比较研究了空白样品在终止反应时间为 0 min,5 min,10 min 以及显色时间分别为 30 min,60 min,90 min 时,吸收波长

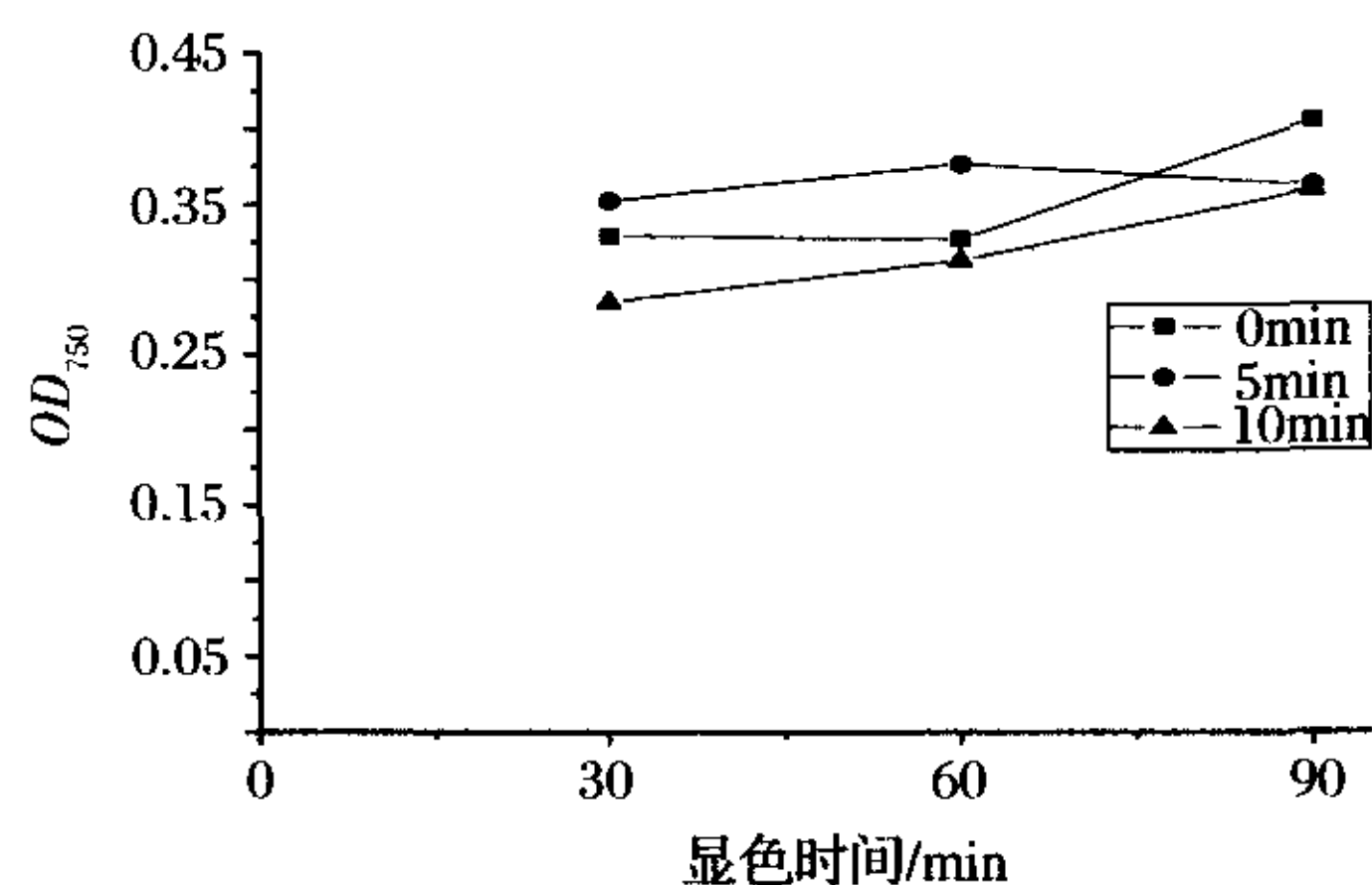


图1 显色时间、终止反应时间对空白样品测定的影响

为 750 nm 下的 OD 值,结果如图 1。

如图 1 所示,随着显色时间的增加,空白样的 OD_{750} 值也增加,终止反应 10 min 后加显色剂空白的 OD 值相对较低。故文选取终止反应 10 min,显色 30 min。

2.2 糖类对植酸酶制剂热稳定性影响

多羟基化合物可以通过氢键与植酸酶的酶蛋白表面分子相联接,也可以通过氢键有效地与外部水分子相连接,使酶蛋白分子稳定^[9]。文中对蔗糖、麦芽糖、乳糖、糊精、葡萄糖、可溶性淀粉等各种糖类进行了植酸酶在 60℃ 下水浴加热 2 min 的热稳定性初筛(在此条件下液体植酸酶制剂的酶活残留为 0),仅有质量分数为 2% 的可溶性淀粉、0.5 mol/L 的葡萄糖具有一定保护作用,酶活残留率分别为 39% 和 10%,其余各种糖对植酸酶没有保护作用,酶活残留均为 0。进一步对不同浓度的葡萄糖和可溶性淀粉对植酸酶的保护作用进行了研究,结果如图 2。

如图 2(A) 所示,当添加葡萄糖浓度达到 0.5 mol/L 时,其植酸酶活残留达到最高,为 44%。而如图 2(B) 所示。随着淀粉浓度的增加,其植酸酶活残留呈上升的趋势,2% 的可溶性淀粉酶活残留可达到 39%。当淀粉浓度大于 2% 时,无法完全溶解而影响进一步研究。

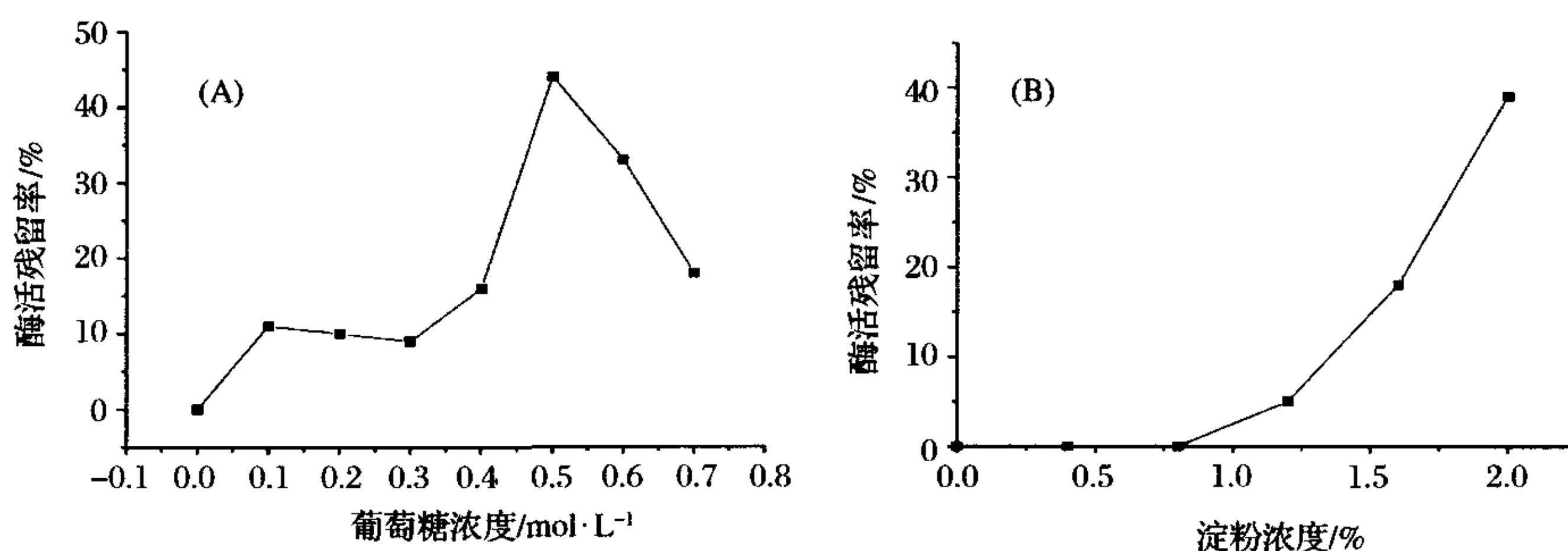


图2 不同糖浓度对植酸酶制剂热稳定性影响

在添加优化的浓度为 0.5 mol/L 葡萄糖的情况下,研究了植酸酶活残留随时间和温度变化的情况,

结果如图 3 所示。

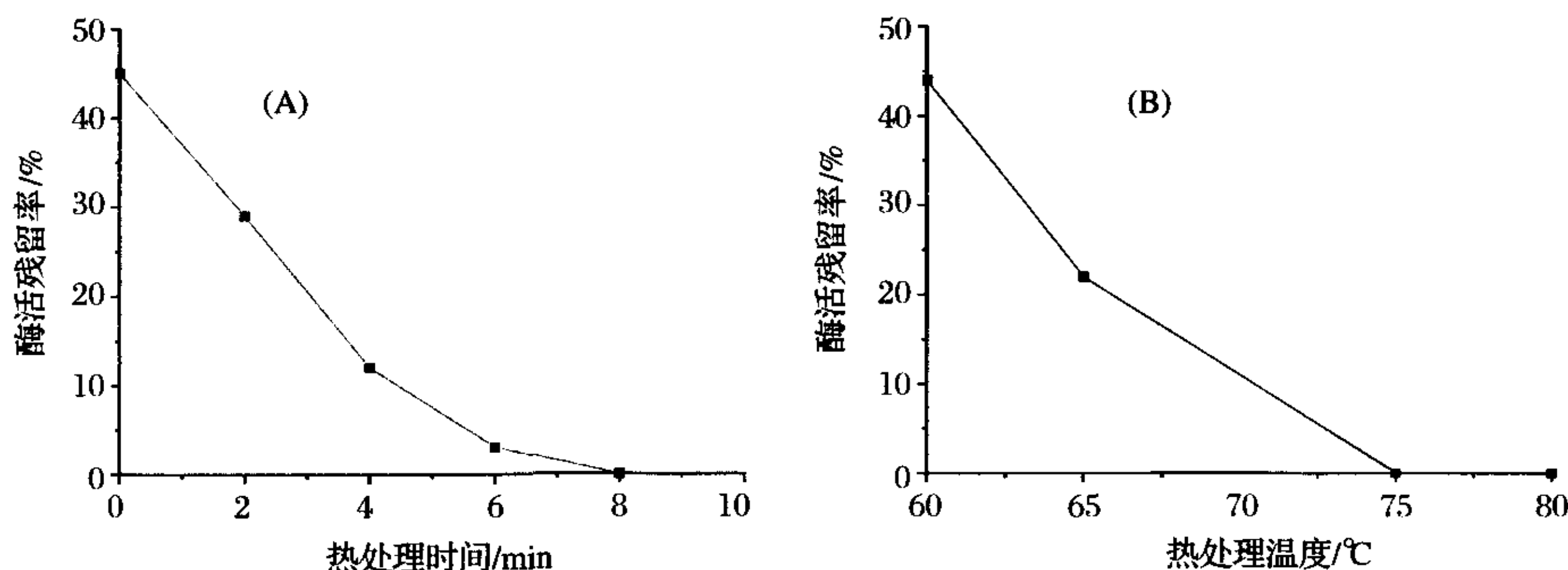


图3 葡萄糖浓度为 0.5 mol/L 时植酸酶活残留随时间和温度的变化

如图 3(A)所示,在处理温度为 60℃ 下,酶活残留随着处理时间的增加而逐渐降低,处理 10min 后酶活残达到 0。而如图 3(B)所示,在处理时间 2min 条件下,酶活残留随着处理温度的增加而逐渐下降,在 75℃ 时,酶活残留达到 0。

在研究糖类对植酸酶热稳定性的影响过程中,固体植酸酶制剂常采用蔗糖载体的热稳定保护作用^[10]未见体现出来,而当葡萄糖浓度达到 0.5mol/L,对植酸酶制剂有明显的热稳定作用。但是从实际效果和成本的角度考虑,淀粉对植酸酶的热稳定性提高有明显的效果,适合作为各种类型植酸酶制剂的载体。

2.3 盐类对植酸酶热稳定性影响

盐类主要存在离子键作用,当酶的活性中心含有离子作为配位体时,盐离子就能稳定酶的构象^[9]。文中考察了不同金属盐对植酸酶热稳定性的影响。分别添加一系列浓度下的不同金属盐,在 60℃ 下水浴加热 2 min 后测定植酸酶酶活残留率,实验结果如图 4 所示。

由图 4 可见,加入金属盐之后能明显提高植酸酶

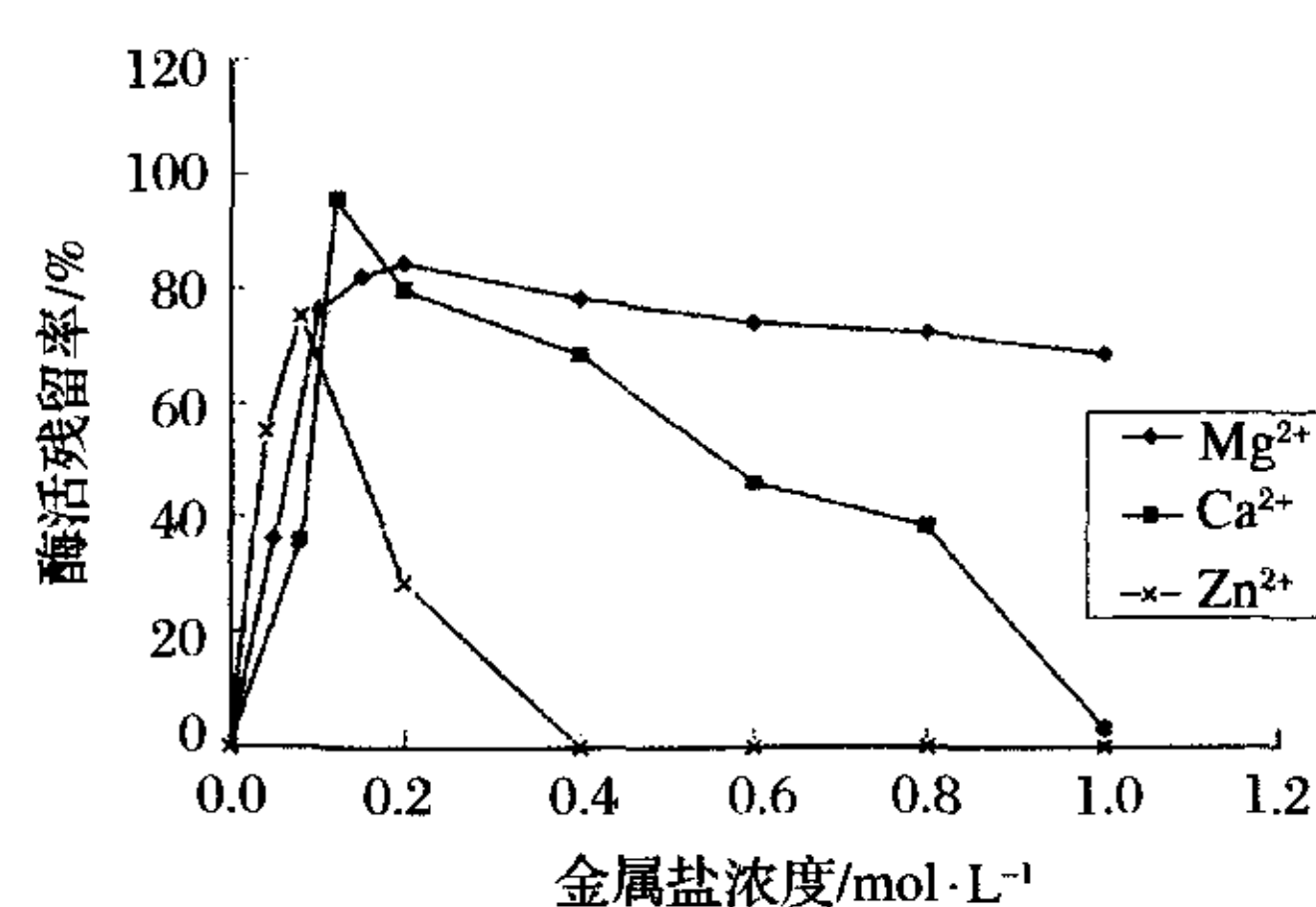


图 4 不同金属盐对植酸酶热稳定性的影响

活残留,各种金属离子添加的最佳浓度分别为 0.12 mol/L CaCl_2 ,酶活残留能达到 96%;0.2 mol/L MgSO_4 ,酶活残留可以达到 85%;0.08 mol/L ZnSO_4 ,酶活活残能够达到 75%。其中以 MgSO_4 的热稳定效果最强,而 CaCl_2 、 ZnSO_4 的操作浓度范围较小。总体而言,金属盐离子对植酸酶的热稳定效果明显优于各种糖类物质的保护效果。

实验中进一步考察了 CaCl_2 和 ZnSO_4 在最适浓度下,植酸酶活残留随时间和温度变化的情况,结果如图 5 所示。

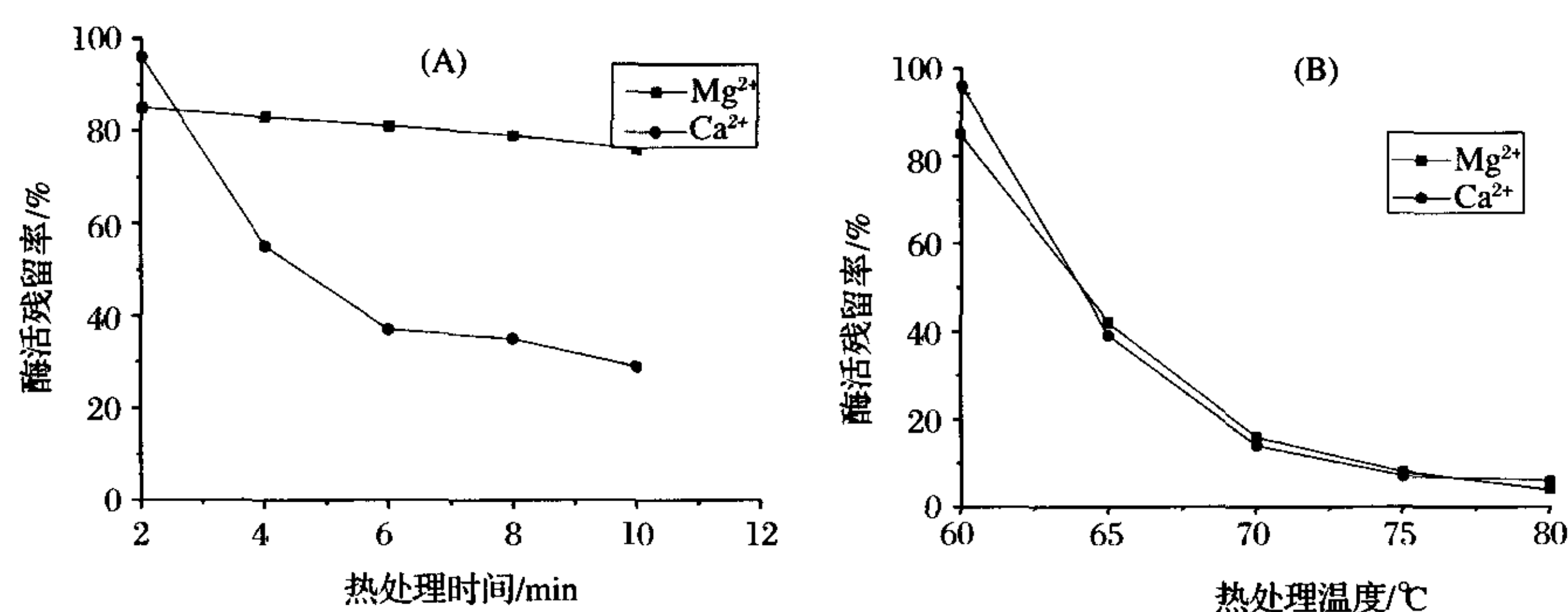


图 5 加 CaCl_2 和 MgSO_4 后植酸酶酶活残留随时间和温度的变化

如图 5(A)所示,在处理温度为 60℃ 时,添加 0.12 mol/L CaCl_2 的酶液经过 10 min 后,酶活残留 29%。而 0.2 mol/L 的 MgSO_4 酶活残留则能达到 76%。由此可知, MgSO_4 对植酸酶的热稳定性作用更持久。如图 5(B)所示,在热处理时间为 2 min 时,植酸酶酶活残留随着温度的升高而降低,加 0.12 mol/L CaCl_2 和加 0.2 mol/L MgSO_4 变化趋势相当。

2.4 添加剂对植酸酶的激活作用的影响

实验中比较研究了糖类和金属盐类添加剂对植酸酶制剂的激活作用。将植酸酶原酶液稀释 100 倍,分别加入等量保护剂,测量其酶活,与未加添加剂的原酶液进行比较研究,结果如图 6 所示。

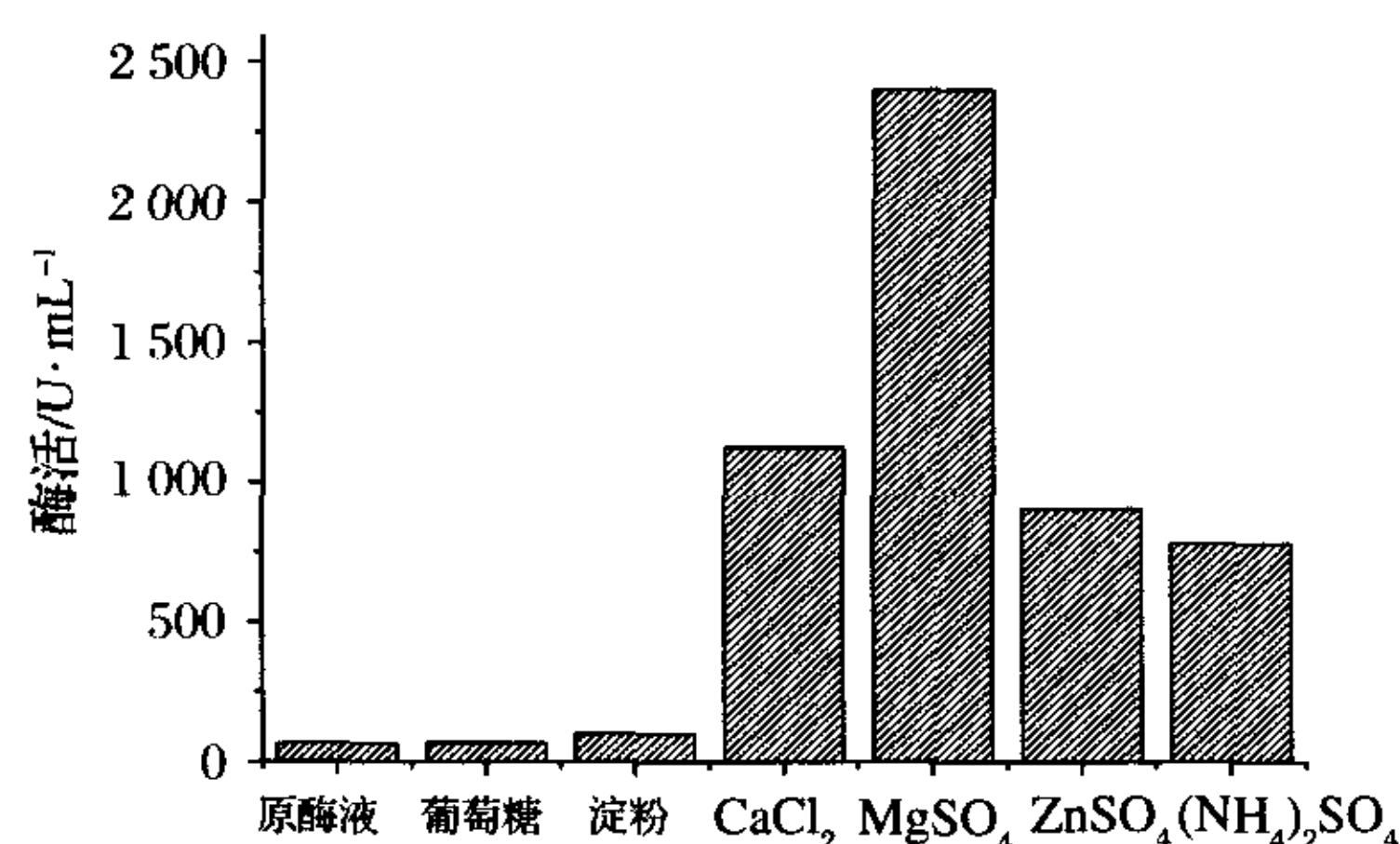


图 6 保护剂对植酸酶的激活作用

由图 6 可知,糖类对植酸酶活性没有较明显的激活作用,相比较而言,金属盐类保护剂(尤其是 MgSO_4)可大大激发植酸酶制剂的酶活。其激活程度依

次为 $\text{MgSO}_4 > \text{CaCl}_2 > (\text{ZnSO}_4 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。这也许是降低目前市场植酸酶高酶活成本的手段之一。

2.5 采用恒温加速试验研究植酸酶的储存稳定性

目前研究酶制剂储存稳定性的方法不多,研究周期长,样品保存困难。本研究根据药剂学中对各种药剂有效期的研究方法如恒温加速试验等,设计了用于研究酶制剂储存稳定性的方法。植酸酶制剂中,酶活损失如蛋白变性等可能是酶蛋白质化学本性的反映,这些失活反应取决于温度、pH 值、湿度等条件对酶活的影响,运用化学动力学的原理对这些反应进行定的研究,预测其在正常条件下的贮存有效期以及加入保护剂后对植酸酶热稳定性的影响。

2.6 植酸酶失活反应级数及反应速度常数的确定

分别将植酸酶制剂放置于 40°C 、 45°C 、 50°C 、 55°C 的恒温条件下,分别间隔一定时间段取样,测定植酸酶制剂的酶活残留(C),并绘制酶活残留对数($\log C$)与时间(t)关系图,如图 7 所示。

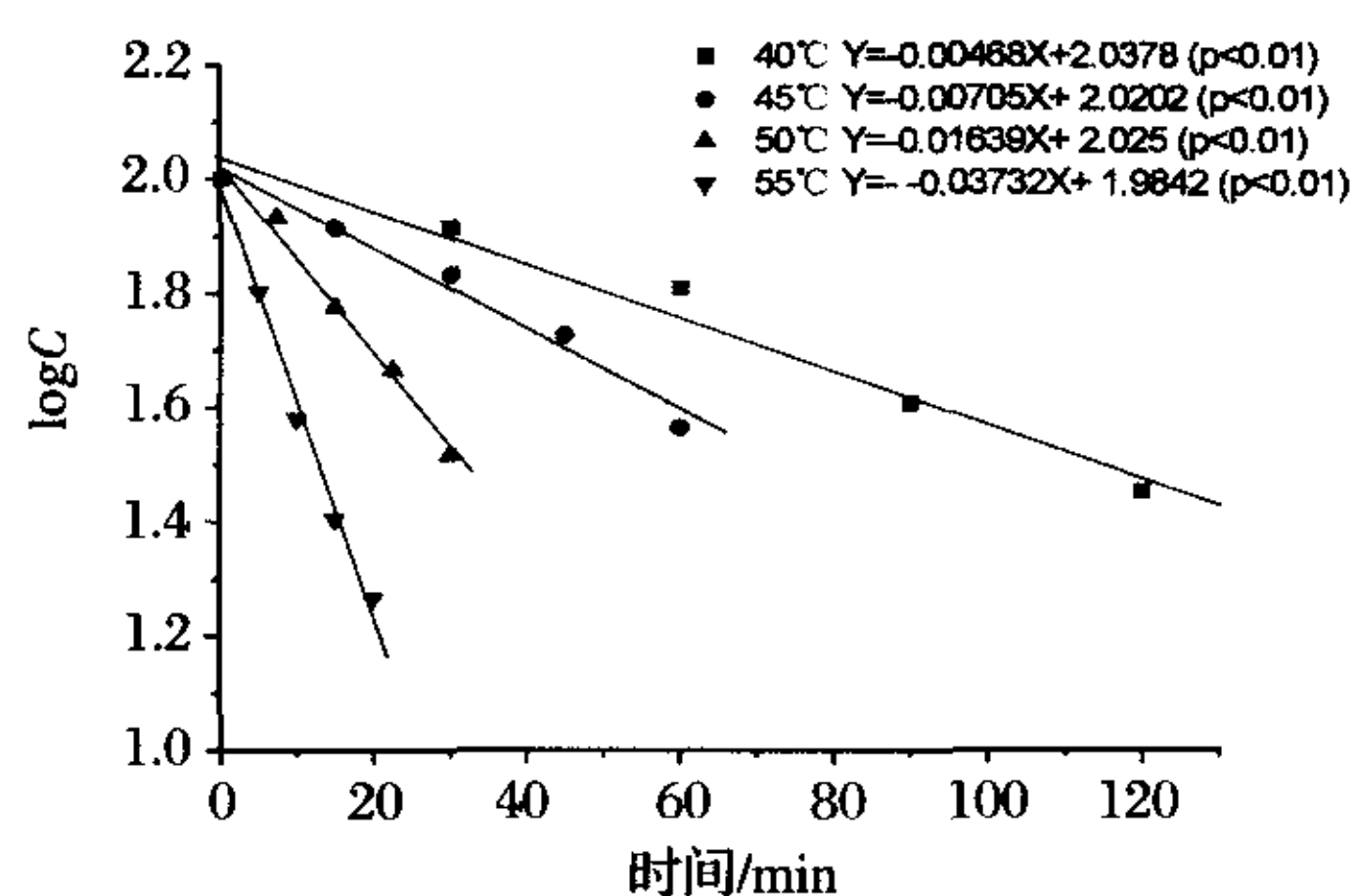


图 7 植酸酶制剂热处理后的酶活残留对数($\log C$)与时间(t)关系

如图 7 所示,以 $\log C - t$ 作图得一直线,故植酸酶失活属于一级反应。由图中直线的斜率,可计算得到 40°C 、 45°C 、 50°C 、 55°C 的恒温条件下的植酸酶制剂失活反应速率常数(min^{-1})分别为 9.900×10^{-3} , 1.520×10^{-2} , 3.524×10^{-2} , 8.844×10^{-2} 。以 $\log K - 1/T$ 作图,如图 8。

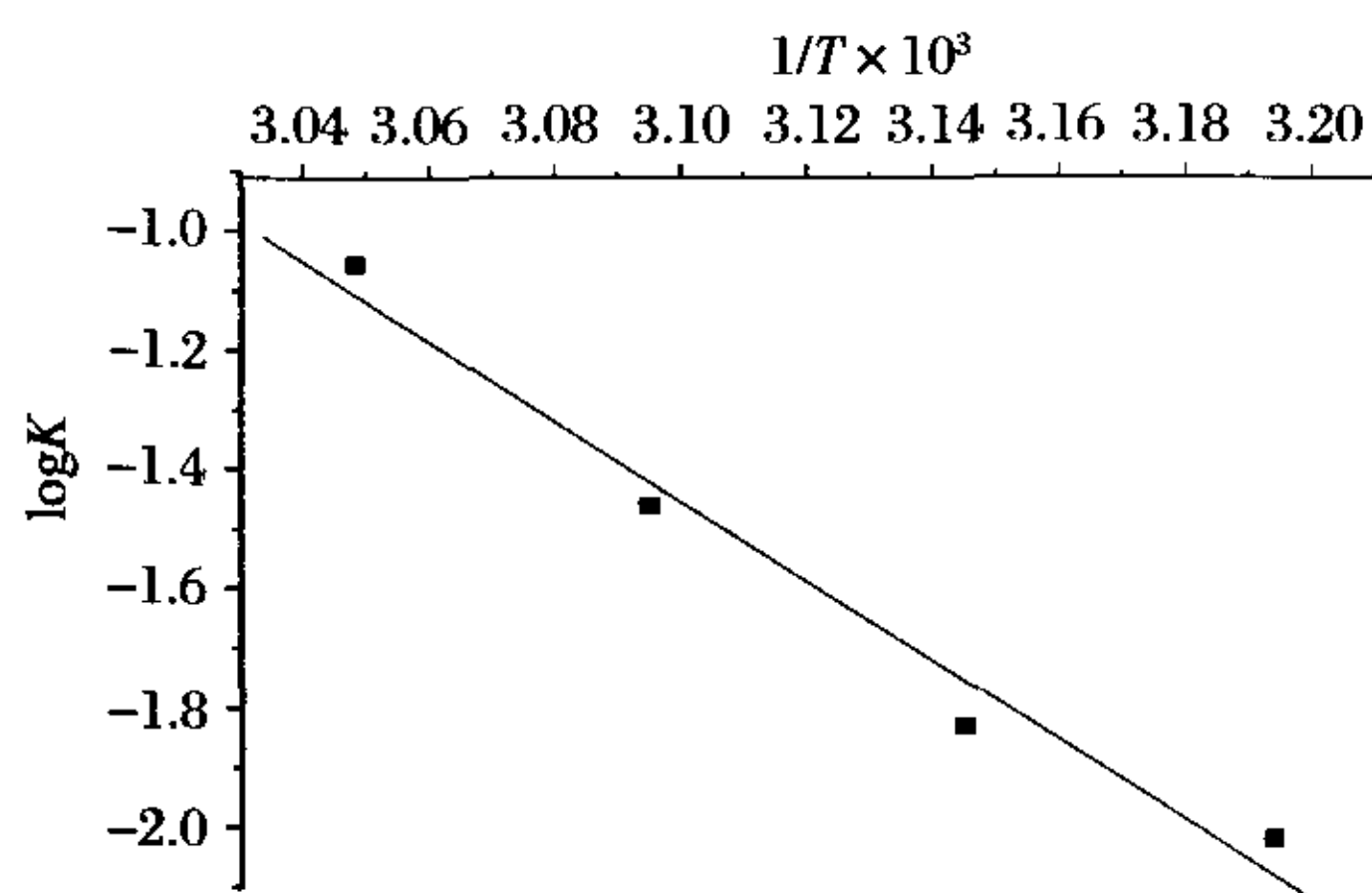


图 8 原植酸酶制剂的 $\log K \sim 1/T$ 图

根据 Arrhenius 的指数定律的对数形式: $\log K = -(E/2.303RT) + \log A$, 由图 8 可得一元线性回归方程: $\log K = -6587.24/T + 18.97$ ($P < 0.05$), 植酸酶制剂失活反应的活化能 $E = 126.20 \text{ kJ/mol}$ 。以 Arrhenius 的指数定律为基础的加速试验法,一般反应活化能在 $41.8 \sim 125.4 \text{ kJ/mol}$ 时才合适,与植酸酶制剂失活反应的活化能近似,故该加速试验方法具有应用于酶制剂储存稳定性研究的理论基础支持。

由植酸酶制剂失活的活化能 E 可计算在储存温度在 25°C 条件下失活反应速度常数 $K_{25^\circ\text{C}} = 7.331 \times 10^{-4}$, 以植酸酶制剂的残留酶活 10% 计,其理论保存有效期 $t = [2.303/K_{30^\circ\text{C}} \log(100/10)] \div (60 \times 24) = 21.82(\text{d})$ 。

文中考察了添加 0.5 mol/L 的葡萄糖和 0.2 mol/L 的 MgSO_4 溶液对植酸酶制剂稳定性的影响,如图 9。

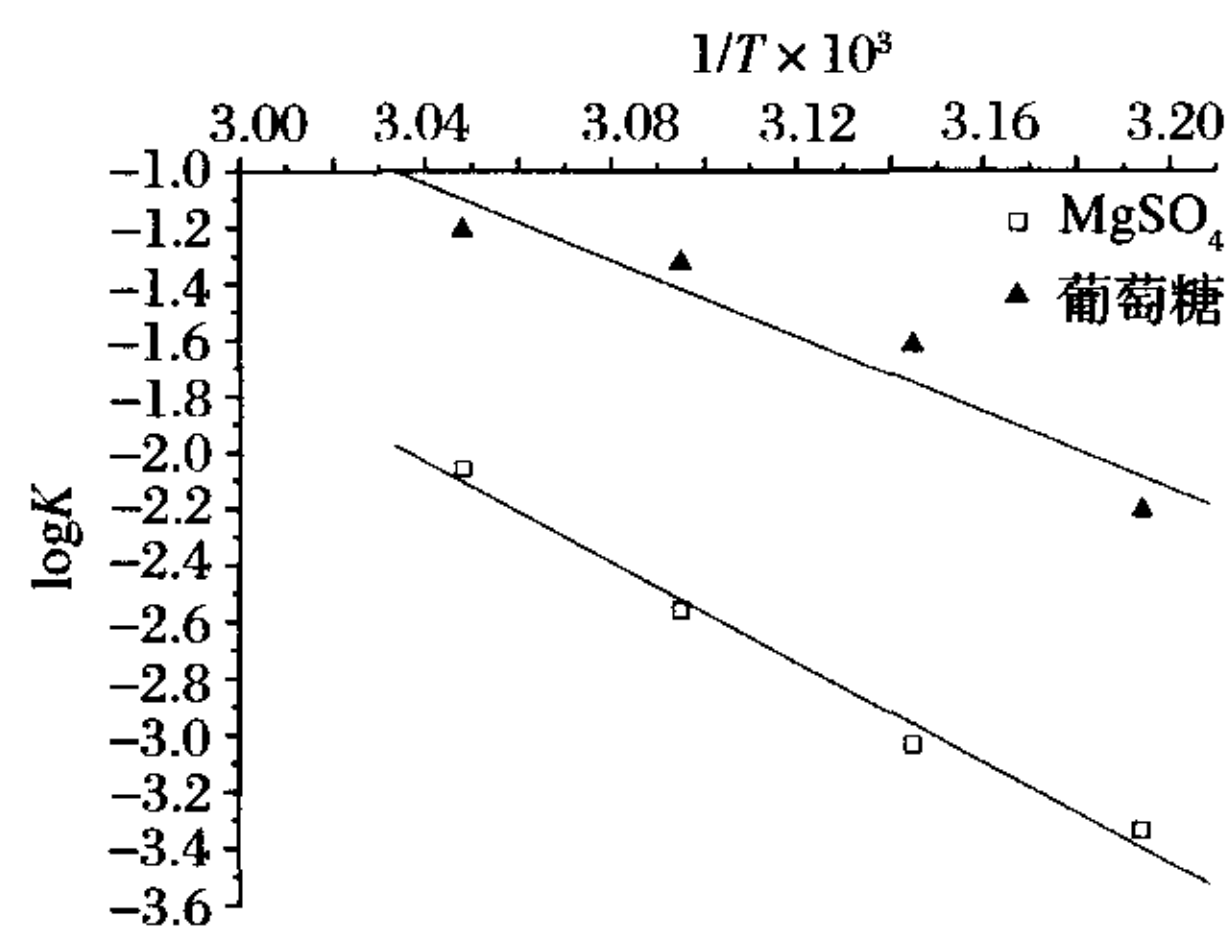


图 9 添加葡萄糖和硫酸镁作保护剂的植酸酶的 $\log K - 1/T$ 图

由图 9 所示,可计算植酸酶制剂添加葡萄糖和 MgSO_4 后储存温度 25°C 条件下,其根据 Arrhenius 的指数定律的对数形式回归方程分别为 $\log K = -6743.31/T + 19.45$ ($P < 0.05$) 和 $\log K = -8829.32/T + 24.80$ ($P < 0.01$), 其失活反应速度常数 K 分别为 6.629×10^{-4} 和 1.484×10^{-5} , 如以植酸酶制剂的残留酶活 10% 计,理论保存有效期分别为 24.13 d 和 1 077.70 d。

添加葡萄糖的植酸酶制剂的有效期与原酶液相比仅轻微增加,而添加 MgSO_4 对植酸酶热稳定性有较好的保护作用,并且能够更持久的进行保护。添加 MgSO_4 后植酸酶制剂的理论保存有效期偏大,这主要是由于 MgSO_4 除了具有对植酸酶制剂的热稳定性有保护作用外,它对植酸酶有很大的激活作用,这也从另一个侧面反映了 MgSO_4 是液体植酸酶优良的添加剂。

3 结 论

(1)文中采用钼钒法测定植酸酶活性,对各类文献中报道的测定方法中较为混乱的三氯乙酸终止反应的时间与显色时间进行了研究,确定了最适的终止反应为 10 min,显色 30 min。

(2)探讨了糖类物质对植酸酶制剂热稳定性的保护作用,添加 0.5 mol/L 葡萄糖和 2% 淀粉对植酸酶制剂有明显的热稳定作用,其中淀粉对植酸酶的热稳定性提高有明显的效果而且一直呈上升趋势,适合作为各种类型植酸酶制剂的载体。

(3)探讨了金属盐类对植酸酶制剂热稳定性的保护作用,钙盐、锌盐、镁盐对植酸酶制剂有明显的热稳定作用,其中以 MgSO_4 对植酸酶制剂的保护性能最优,更持久。添加金属盐离子对植酸酶制剂的热稳定效果明显优于各种糖类物质的保护效果。

(4)文中比较研究了糖类和金属盐类添加剂对植酸酶制剂的激活作用。糖类对植酸酶活性没有较明显激活作用,相比较而言,金属盐类保护剂(尤其是 MgSO_4)可大大激发植酸酶制剂的酶活。其激活程度依次为 $\text{MgSO}_4 > \text{CaCl}_2 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{ZnSO}_4$ 。

(5)创新性地引入了药物制剂稳定性的研究方法用于酶制剂储存稳定性的研究,比较糖类和金属盐添

加剂对植酸酶制剂储存稳定性的影响,为酶制剂储存稳定性的研究提供新的研究方法。

参 考 文 献

- 1 赵海霞,王红宁,陈 惠. 饲用植酸酶热稳定性的研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31 (1): 105~109
- 2 Ir Mia Eeckhout. Phytase quality suffers from steam pelleting and storage temperature [J]. Feed Technology, 1999, 4(2): 1 821
- 3 史 风,王 璋,许时婴. 用流化床干燥法改善颗粒酶的热稳定性[J]. 食品与生物技术, 2002, 21(1): 27~32
- 4 邢自力,陈华友,谢 芳,等. 植酸酶及其热稳定性研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(5): 31~35
- 5 Wolfgang Haug, Hans-Joachim Lantzs. Sensitive method for rapid determination of phytase in cereals and cereal products[J]. J Sci Food Agric, 1983, 34: 1 423~1 426
- 6 陆文清,刘 伟,刘兴海. 几种常见饲用酶制剂的酶活测定与分析[J]. 饲料工业, 2000, 21(2): 17~20
- 7 张若寒. 植酸酶活性的检测方法[J]. 中国饲料, 1997(5): 30 232
- 8 奚念珠. 药剂学(第三版) [M]. 北京:人民卫生出版社, 1994. 140~144
- 9 陈 惠,王红宁. 糖及硫酸按对植酸酶热稳定性的影响[J]. 中国饲料, 2004, 18: 22~23
- 10 苏东海,刘 萍,郑亚安等. 包被工艺条件对植酸酶热稳定性的影响[J]. 生物加工过程, 2004, 2(3): 40~45

Studies on the Storage Stability of Phytase Preparation for Feedstuff

Pan Li Ran Yuzhou Wang Yaqin Luo Lixin Qiu Tianchao

(College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

ABSTRACT Due to the long research period, the difficulty in sample deposit and the lack of study methods, the storage stability of enzyme preparation was an important issue. In this study, the effect of various sugars and salts on the thermal stability of phytase preparation was investigated. Results indicated that the protecting effect on the thermal stability of phytase preparation was much better by adding salt than by adding sugars. And the best protecting effect was caused by adding Mg^{2+} . The starch was testified to be the best carrier of solid phytase preparation. Furthermore, the thermostatic accelerated experiment, which was usually applied to investigate the stability of medicament, was originally introduced to investigate the conserved stability of phytase preparation and the effect of sugars and salts on the storage stability of phytase preparation was investigated using this method. It provided a novel assay to investigate the conserved stability of enzyme.

Key words storage stability, ion salts, sugars, thermostatic accelerated experiment

行业动态

科诺华与麦修斯强强合作发展再次提速

2006年12月18日,科诺华成立10周年庆典暨中国科诺华-美国麦修斯合资签约仪式新闻发布会在北京举行。科诺华在成立10周年之际,与美国麦修斯公司签定战略合作协议。作为国产喷码机的标杆企业,科诺华将凭借与麦修斯的合作,在产品研发、客户服务以及走向国际市场等方面取得新的发展。