

doi: 10.11830/ISSN.1000-5013.201608020



阿魏酸酯酶在体外模拟猪 胃肠道中的稳定性

梅胜¹, 王镇发², 罗云¹, 陈培钦¹, 李夏兰¹

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;
2. 漳州市龙文区环境保护监测站, 福建 漳州 363005)

摘要: 模拟了胃(肠)液中 pH 值、蛋白酶、进食量和微量金属离子等对阿魏酸酯酶(FAE)酶活稳定性的影响. 结果表明:模拟胃液环境对阿魏酸酯酶酶活影响显著,模拟肠液环境对阿魏酸酯酶稳定性影响较小;蛋白酶酶活的增加不利于阿魏酸酯酶稳定性,但影响不显著;混合金属离子对阿魏酸酯酶稳定性影响不显著;进食量增加可以保护阿魏酸酯酶通过胃液环境,进入小肠发挥作用. 在模拟胃液中,阿魏酸酯酶的酶活迅速降低,1 h 时,酶活为 25% 左右,调整为小肠环境时,对阿魏酸酯酶有瞬时激活作用;5 h 时,酶活为 30% 左右;胃肠道 pH 值是影响阿魏酸酯酶酶活的主要因素,胃蛋白酶、肠道中的金属离子对阿魏酸酯酶酶活影响较小,进食量对肠道中阿魏酸酯酶有保护作用,模拟肠液对经过模拟胃液处理的阿魏酸酯酶有瞬时激活作用.

关键词: 阿魏酸酯酶; 饲用酶; 胃肠道; 酶活

中图分类号: Q 95.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2017)05-0659-05

Stability of Ferulic Acid Esterase in Simulated Gastrointestinal Tract of Pigs

MEI Sheng¹, WANG Zhenfa², LUO Yun¹,
CHEN Peiqin¹, LI Xialan¹

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;
2. Longwen District Environmental Protection Monitoring Station of Zhangzhou, Zhangzhou 363005, China)

Abstract: In this paper, we simulated the influence of pH, protease, food-intake and trace metal ions in the gastrointestinal fluid on the stability of ferulic acid esterase (FAE) activity. The results showed the simulated gastric fluid environment had significant effects on the activity of FAE, whereas the intestinal juice had subtle effects on the stability of FAE. The increasing activity of protease was unfavorable to the stability of FAE, which was not obvious. Similarly, the effect of mixed metal ions on the stability of FAE was not significant. The increasing food-intake could protect FAE from degradation in the gastric environment and make it work in the small intestine. Furthermore, the activity of FAE in the simulated gastric fluid decreased rapidly, which was about 25% of the initial activity in one hour. As for the intestine environment, it had a transient activation to FAE with 30% of the initial activity in five hours. In summary, the pH of the gastrointestinal tract is the key factor that affects the activity of FAE. Both the protease and the metal ions in intestine have a little influence on the activity of FAE. Besides, the food-intake plays a protective role in FAE. And the simulated intes-

收稿日期: 2016-08-19

通信作者: 李夏兰(1965-),女,教授,博士,主要从事生物化工的研究. E-mail: xialan@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省发改委投资项目(2013-886)

tinal juice has instant activation on the FAE treated with the simulated gastric juice.

Keywords: ferulic acid esterase; feed enzyme; gastrointestinal tract; enzyme activity

阿魏酸酯酶(EC 1. 1. 73,feruloyl esterase,FAE)是降解木质纤维的关键酶之一. 研究表明,单一的 FAE 作用木质纤维时,效果并不明显,只有当 FAE 与其他木质纤维降解酶协同作用,才能显著提高细胞壁的降解效率^[1-3]. 在饲料工业中,利用阿魏酸酯酶和半纤维素酶处理植物性的原材料,可以水解木质纤维中半纤维素之间,以及半纤维素与木质素之间的阿魏酸酯键,释放阿魏酸和低聚木糖,同时,提高饲料的利用效率^[4-6]. 作为饲用酶制剂不仅要在饲料加工和发酵过程中保持活性,还需经受肠道环境,才能与内源性消化酶共同作用消化食糜,从而降低肠道粘性,降解抗营养因子,促进营养物质的消化吸收^[7-8]. 目前,尚未见 FAE 在动物胃肠道中的稳定性研究. 本文从 pH 值、金属离子、蛋白酶和进食量等胃肠道环境对 FAE 酶活力的影响,探讨畜禽消化道对 FAE 的影响.

1 材料与方法

1.1 试验材料

胃蛋白酶(美国 Sigma 试剂公司,优级纯,货号为 P7000,酶活力为 38 841. 1 nkat · mg⁻¹);胰蛋白酶(美国 Sigma 试剂公司,优级纯,货号为 93614,酶活力为 166 866. 7 nkat · mg⁻¹);UV-6100 型紫外可见光分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);透析袋(MWCO 3500,上海通善生物科技有限公司).

1.2 FAE 粗酶液的制备

菌种:黑曲霉,实验室自行筛选并保藏. 种子培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,于 37 ℃,200 r · min⁻¹下培养 2 d. 固态发酵培养基:麸皮与次粉(质量比为 1 : 1)混合物为 39. 30%,硫酸镁为 0. 06%,硫酸铵为 2. 44%,水为 58. 20%. 采用白瓷盘固体发酵,33 ℃培养 6 d. 粗酶液的制备:发酵结束后,在固体发酵料中,加入 8 倍体积的蒸馏水,于 33 ℃,180 r · min⁻¹下抽提 2. 5 h,用 8 层纱布过滤,滤液再经超滤浓缩.

1.3 FAE 酶活的测定方法

FAE 酶活的测定方法参照文献[9-10]建立的分光光度计法.

1.4 模拟胃(肠)液的配制

根据美国药典中模拟胃(肠)液进行配制^[11]. 模拟胃液:NaCl 2. 0 g,胃蛋白酶 3. 2 g,浓盐酸 7 mL,双蒸水定容于 1 000 mL,pH 值约为 3. 0. 模拟肠液:将 6. 8 g 的 KH₂PO₄ 溶于 250 mL 双蒸水,振荡,完全溶解后加 190 mL,0. 2 mol · L⁻¹的 NaOH 和 400 mL 的双蒸水;然后,加入胰蛋白酶 10. 0 g,混匀,用 0. 2 mol · L⁻¹的 NaOH 调节 pH 值到 7. 0.

2 结果与分析

2.1 FAE 在模拟胃(肠)液中的稳定性

在猪肠道中影响饲用酶制剂稳定性的主要因素为胃肠的 pH 值和蛋白酶类. 实验测得酶化发酵饲料中纤维素占干质量的质量分数大于 17%. 因此,选择胃中进食时,pH=3. 0;空腹时,pH=1. 2,排空时间 1 h;小肠 pH=7. 0,排空时间 4 h. 与 FAE 最稳定 pH 值(pH=6. 0)中 FAE 酶活变化做对比,研究 FAE 在胃肠道中稳定性.

2.2 消化时间对 FAE 稳定性的影响

在装有 5 mL 模拟胃(肠)液的透析袋中,加入 5 mL FAE 浓缩液,调整 pH 值为 3. 0(或 7. 0). 然后,将透析袋置于不含蛋白酶的模拟胃(肠)液中,在 37 ℃下,保温 4 h,间隔一定时间取样 0. 1 mL,迅速滴入 0. 9 mL,pH 值为 6. 0 的柠檬酸缓冲溶液中,于 50 ℃水浴锅中保温 5 min. 再次,加入 2 mL,50 ℃保温 5 min 的 200 μmol 阿魏酸甲酯(MFA),于 50 ℃反应 10 min. 最后,加入 3 mL 体积分数为 10%的冰醋酸灭酶,振荡混匀,参照文献[9-10]检测 FAE 酶活,每次取样测 3 次酶活,取平均值,每组重复 3 次.

FAE 在模拟胃(肠)液中酶活(A_t)随时间的变化,如图 1 所示. 由图 1 可知:反应之初,酶活下降迅

速;反应 1 h 后,模拟胃液中的酶活余 20%左右;反应 4 h 时后,FAE 几乎全部失活;而模拟肠液反应 4 h 后,FAE 仍具有 70%左右的酶活.由此可知,模拟胃液对 FAE 酶活影响显著,模拟肠液对 FAE 稳定性影响较小.

2.3 pH 值对 FAE 稳定性的影响

猪肠胃中的 pH 值在不同的进食量和进食的不同阶段会发生规律性波动.进食时,pH=3.0;从进食到胃排空期间,pH>3;当胃中食糜排空后,pH 值降到 3 以下^[12].因为胃的排空时间随食糜中纤维素和水的质量分数的不同而发生变化^[12].配制不加蛋白酶的模拟胃(肠)液,分别用盐酸或氢氧化钠调节 pH 值为 1.2,3.0,6.0,7.0,取 5 mL 于透析袋中,将透析袋置于不含蛋白酶的模拟胃(肠)液中,再加入 5 mL FAE 浓缩液,于 37 ℃下保温 4 h.间隔一定时间取样,参照文献[9-10]检测 FAE 酶活,每次取样测 3 次酶活,取平均值,每组重复 3 次.

不加胃蛋白酶的模拟胃(肠)液时,pH 值对 FAE 稳定性的影响,如图 2 所示.由图 2 可知:在 4 h 时,FAE 在 pH 值为 6.0,7.0 的环境中,能维持 80%以上的活性;在 pH 值为 1.2,3.0 的环境中,前 30 min,酶活分别降到 5%,30%,之后下降缓慢;在 pH 值为 1.2 的环境中,保持 1 h,FAE 全部失活;在 pH 值为 3.0 的环境中,还有 25%的活性.由此可知,小肠的 pH 值为 7.0 时,对 FAE 的稳定性影响较小,而胃的酸性 pH 值对酶活的影响剧烈.

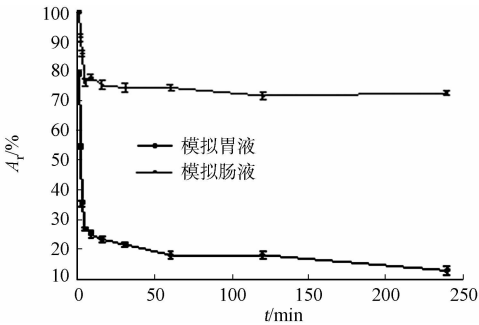


图 1 消化时间对 FAE 稳定性的影响

Fig. 1 Effect of digestion time on stability of FAE

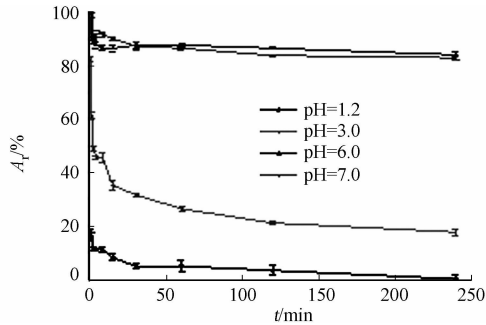


图 2 pH 值对 FAE 稳定性的影响

Fig. 2 Effect of pH on stability of FAE

2.4 蛋白酶量对 FAE 稳定性的影响

分别取 5 mL 含 0.5,1.0 和 2.0 倍胃蛋白酶量(或胰蛋白酶量)的模拟胃(肠)液于透析袋中,分别加入 5 mL FAE 浓缩液,调整 pH 值为 3.0(或 7.0).将透析袋置于不含蛋白酶的模拟胃(肠)液中,于 37 ℃下保温 4 h.间隔一定时间取样,参照文献[9-10]检测 FAE 酶活,每次取样测 3 次酶活,取平均值,每组重复 3 次.

蛋白酶浓度为模拟胃(肠)液中蛋白浓度的 0.5,1.0,2.0 倍,FAE 的稳定性,如图 3 所示.由图 3 可知:随着蛋白酶浓度的增加,FAE 酶活的降低速度和残余酶活力随胃蛋白酶浓度的增加而缓慢降低.由此可知,胃蛋白酶酶量和胰蛋白酶酶量增加不利于 FAE 的稳定性.

2.5 胃肠中混合金属离子对 FAE 稳定性的影响

参照文献[13]模拟胃肠中的金属离子浓度.取 5 mL 含混合金属离子(2 mmol · L⁻¹的 Ca²⁺,0.01 mmol · L⁻¹的 Cu²⁺,Zn²⁺,Mn²⁺,Fe²⁺)的模拟胃(肠)液于透析袋中,分别加入 5 mL FAE 浓缩液,调整 pH 值为 3.0(或 7.0).将透析袋置于含混合金属离子,不含蛋白酶的模拟胃(肠)液中,37 ℃下保温 4 h.间隔一定时间取样,参照文献[9-10]检测 FAE 酶活,每次取样测 3 次酶活,取平均值,每组重复 3 次.

杨道秀^[14]报导 Fe²⁺,Cu²⁺,Zn²⁺,Ca²⁺,Mn²⁺等金属离子对 FAE 酶活有抑制作用.根据肠胃中存在的金属离子种类和浓度,检测模拟胃(肠)液中 Ca²⁺,Cu²⁺,Zn²⁺,Mn²⁺和 Fe²⁺对 FAE 酶活的影响^[13],如图 4 所示.由图 4 可知:添加了金属离子的模拟胃(肠)液中 FAE 的残余酶活力和无添加金属离子的胃(肠)液的残余酶活力相似.这可能是 FAE 浓缩液中含有其他的蛋白质或酶,减弱了金属离子对 FAE 酶活的影响.

2.6 进食量对 FAE 稳定性的影响

分别将 20 g 质量比分别为 2 : 4 : 4,4 : 3 : 3,5.0 : 2.5 : 2.5,6 : 2 : 2,8 : 1 : 1 的酶化发酵饲料、

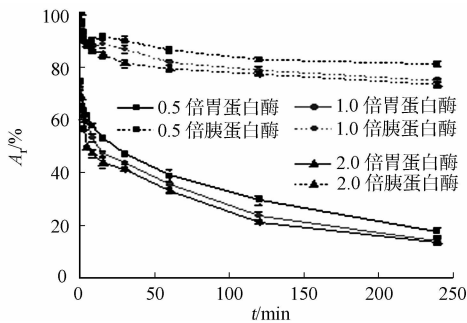


图 3 胃蛋白酶和胰蛋白酶对 FAE 稳定性影响
Fig. 3 Effect of pepsin and trypsin on stability of FAE

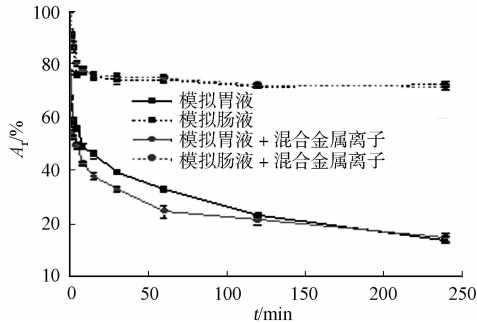


图 4 金属离子对 FAE 稳定性的影响
Fig. 4 Effect of metal ions on stability of FAE

模拟胃(肠)液和 FAE 浓缩液混合物放置于锥形瓶之中,在 37 ℃,50 r · min⁻¹下振荡 4 h. 间隔一定时间取样,参照文献[9-10]检测 FAE 酶活,每次取样测 3 次酶活,取平均值,每组重复 3 次.

进食量与液体(或肠液)的质量比分别为 2 : 8,4 : 6,5 : 5,6 : 4,8 : 2 时,FAE 在模拟胃(肠)液中残余酶活力随时间的变化,如图 5 所示. 胃肠中食糜的质量分数对食糜的排空时间、胃肠 pH 值的下降速率,以及胃液、肠液与食糜中外源性酶的接触有一定影响. 由图 5 可知:随着进食量的增加,在模拟胃环境中反应 0,2,4 h 后,FAE 的相对酶活力也明显提高;在进食量与胃液的质量比为 8 : 2 时,2 h 后,FAE 相对酶活力为 70%,4 h 后,仍有 60%左右. 由图 5 还可知:随着进食量的增加,在模拟小肠环境中反应 0,2,4 h 后,FAE 的相对酶活力相应地提高,但相对酶活力在 70%以上;当进食量与胃液质量比为 8 : 2 时,4 h 后,FAE 相对酶活力为 85%以上.

2.7 模拟胃(肠)液连续作用对 FAE 的影响

取 5 mL 模拟胃液于透析袋中,加入 5 mL FAE 浓缩液,调整 pH 值为 3.0,37 ℃下,保温 1 h,然后将模拟反应液调节 pH 值至 7.0,加入 10 mL 模拟肠液,37 ℃再保温 4 h. 间隔一定时间取样,参照文献[9-10]检测 FAE 酶活,每次取样测 3 次酶活,取平均值,每组重复 3 次.

胃和肠是串联系统,部分蛋白酶从胃的酸性环境转入小肠的中性环境中,酶活有一定的恢复^[13]. 将 FAE 在模拟胃液中保温 1 h,再加入模拟肠液,保温 4 h,检测 FAE 酶活变化,如图 6 所示. 由图 6 可知:在模拟胃液中,FAE 的酶活随时间而减少,在 1 h 时,酶活为 25%左右;加入模拟肠液,并调节 pH 值至 7.0,FAE 的酶活有一定恢复;随着在模拟肠液中的反应,FAE 的酶活继续降低,5 h 时,酶活约为 30%.

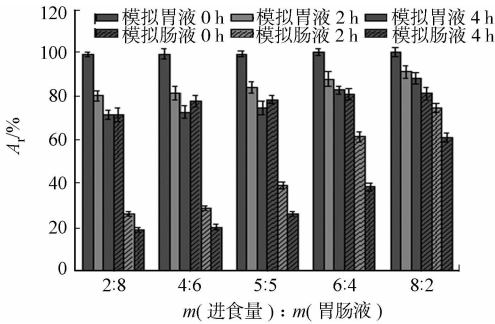


图 5 进食量对 FAE 稳定性的影响
Fig. 5 Effect of food intake on stability of FAE

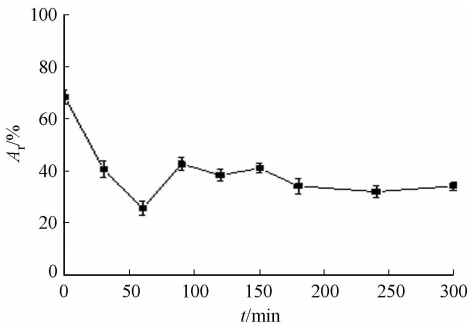


图 6 模拟胃(肠)液连续作用对 FAE 的影响
Fig. 6 Effect of simulated intestinal and gastric fluids continuous action on FAE

3 讨论

孙建义等^[13]通过研究在体外模拟动物肠胃条件下 β -葡聚糖酶稳定性发现,酶活的降低主要是由低 pH 值引起的,胃蛋白酶对酶活性无显著影响,且 β -葡聚糖酶在胃内的活性较低,但能在小肠中恢复部分酶活,这与文中的研究结果相似. 但孙建义等^[13]发现在模拟胃条件下,金属离子混合液对酶活有促进

作用,而在模拟小肠条件下,金属离子混合液对酶活有抑制作用,这与文中的研究结果有差别。

文中研究表明:随着进食量的增加,FAE 的相对酶活力也相应提高.其原因可能是加大进食量有利于保护 FAE 通过胃液的酸性环境.此外,肠液中的中性环境,对经过胃液的 FAE 有短暂的激活作用.与 Morgavi 等^[15]研究发现糖苷酶、纤维素酶和木聚糖酶在胃蛋白酶和酸性(pH=3.0)条件下会部分失活,在胰蛋白酶溶液和中性(pH=7.0)条件下,呈现瞬时增加的现象相吻合。

胃肠道 pH 值是影响 FAE 酶活的主要因素,胃蛋白酶、肠道中的金属离子对 FAE 酶活影响较小,进食量增加对肠道中 FAE 有保护作用,模拟肠液对经过模拟胃液处理的 FAE 有一定激活作用.因此,FAE 作为饲用酶制剂在饲料中应用时,一方面,可以考虑加大三元猪的采食量,减少 FAE 酶活在胃液低 pH 中的损失;另一方面,将 FAE 应用于胃酸分泌量不多(pH 为 4.0 左右)的断奶仔猪的饲喂,推断 FAE 在断奶仔猪肠胃中的酶活稳定性应更好。

参考文献:

[1] BRAGA C M, DELABONA P S, LIMA D J, *et al.* Addition of feruloyl esterase and xylanase produced on-site improves sugarcane bagasse hydrolysis[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 170(5): 316-324.

[2] BARTOLOME B, GOMEZ C C, SANCHO A I, *et al.* Growth and release of hydroxycinnamic acids from Brewer's spent grain by streptomyces avermitilis CECT 3339[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 32(1): 140-144.

[3] SELIG M J, KNOSHAUG E P, ADNEY W S, *et al.* Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 4997-5005.

[4] 杨道秀, 李夏兰, 陈培钦, 等. 新型复合酶在肉鸡饲料中的应用[J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(4): 410-416.

[5] MATHEW S, ABRAHAM T E. Studies on the production of feruloyl esterase from cereal brans and sugar cane bagasse by microbial fermentation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36(4): 565-570.

[6] 杨红建, 黎大洪, 谢春元, 等. 阿魏酸酯酶处理对草、玉米秸、稻秸及麦秸瘤胃体外发酵特性的影响[J]. *动物营养学报*, 2010, 22(1): 207-211.

[7] 郝志敏. 饲用酶制剂的开发应用及存在的问题[J]. *饲料与畜牧*, 2010(11): 25-27.

[8] 张伟, 詹志春. 饲用酶制剂研究进展与发展趋势[J]. *饲料工业*, 2011(增刊 1): 11-19.

[9] YUE Q, YANG H J, LI D H, *et al.* A comparison of HPLC and spectrophotometrical methods to determine the activity of ferulic acid esterase in commercial enzyme products and rumen contents of steers[J]. *Anim Feed Sci Tech*, 2009, 153(3/4): 169-177.

[10] MATHEW S, ABRAHAM T E. Studies on the production of feruloyl esterase from cereal brans and sugar cane bagasse by microbial fermentation[J]. *Enzyme Microb Tech*, 2005, 36(4): 565-570.

[11] MILLER L C. The United States pharmacopeia[M]. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1983: 510-530.

[12] STRUBE M L, MEYER A S, BOYE M. Minireview: Basic physiology and factors influencing exogenous enzymes activity in the porcine gastrointestinal tract[J]. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 2013(13): 441-459.

[13] 孙建义, 李卫芬, 顾赛红. 体外模拟动物肠胃条件下 β -葡聚糖酶稳定性的研究[J]. *中国畜牧志*, 2002, 38(1): 18-19.

[14] 杨道秀. 阿魏酸酯酶在麦糟酶化饲料中的应用[D]. 厦门: 华侨大学, 2013: 20-23.

[15] MORGAVI D P, BEAUCHEMIN K A, NSEREKO V L, *et al.* Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases[J]. *Journal of Animal Science*, 2001, 79(6): 1621-1630.

(责任编辑: 钱筠

英文审校: 刘源岗)