

## 植酸酶活性的表达需要正确理解

Phytase activity expression requires understanding

作者: Nelson E. Ward 和 Donnie R. Campbell

译自: Feedstuffs, May 8, 2007

译者: 赵克斌 罗兰

以化学的方法分析植酸酶的活性存在着许多变异因素,这些变异因素对不同的植酸酶的影响不是平行和同步的。我们需要对植酸酶活性的分析方法和分析过程有一个正确的理解。

碳水化合物酶已在饲料业普遍使用多年,而植酸酶在不同类型的家禽和猪饲料中普遍和迅速地推广使用则是史无前例的。植酸酶在饲料业大规模地使用也带来了许多新的挑战: 如何正确地检测分析和表达植酸酶的活性。

已建立的植酸酶分析方法正在修订,新的分析方法也在不断地推出。很显然,不同分析方法所测得的植酸酶活性彼此不能互换。这一问题与碳水化合物酶、生长促进剂、抗球虫药及其他添加剂所经历的情况类似。这些产品通常由它们生产厂家进行分析检测,没有共同的活性单位。

考虑到磷这一矿物元素对动物生化功能和骨骼生长发育的重要性,用植酸酶替代日粮中的无机磷是很必要的。因此,正确理解植酸酶的化学分析过程和活性单位的表达是非常必要的。本文综述了植酸酶的检测分析方法,表达了我们对植酸酶不同分析方法的关注。

### 植酸酶特点

植酸酶是纯化的、专一的催化剂。一旦植酸酶的天然结构改变,其催化活性将遭到破坏。植酸酶空间结构的轻微改变可导致其结合底物(植酸)的能力发生显著的变化。由于植酸酶蛋白对环境因素,如温度和pH非常敏感,而这一环境对植酸酶功能的正常发挥是至关重要的。此外,在相同的环境下不同的植酸酶的反应是不同的。

不同的表达或发酵条件可修改植酸酶,如通过糖化作用或将糖附着到植酸酶分子上(Wyss等,1999a)。这一修改可影响植酸酶的结构、稳定性和特定的活性(Wang等,1996),并转变植酸酶的基本动力学。源自黑曲酶(*Aspergillus niger*)的植酸酶经糖化作用后可导致植酸酶活性9%的差异,导致植酸酶耐热性发生40%的差异(Han等1999),但对其他的植酸酶则没有影响(Wyss等,1999a)。

矿物元素对植酸酶特性和活性产生重要的影响。某些植酸酶的活性可被乙二胺四乙酸(EDTA,一种强螯合剂)灭活,因为EDTA可结合环境中的钙离子。研究显示,在没有钙离子存在的情况下,圆二色谱分析结果显示,植酸酶的空间结构发生了很大的改变(Kerovuo等,2000),这表明植酸酶需要钙离子的存在。EDTA对于其他种类的植酸酶可能存在相反的影响(Wyss等,1999b)。

植酸酶对环境的pH非常敏感,这是因为植酸酶蛋白的氨基酸残基的离子状

态影响植酸酶的催化能力。工业化生产的植酸酶有着各自独特的最适宜的pH环境。因此，在植酸酶活性的化学检测分析时，在独特的pH环境下可能对某一种植酸酶活性的表达是适宜的，而对另一种植酸酶的活性则有抑制的作用。小肠肠道的pH环境使各种植酸酶活性的发挥成为可能。

不同的植酸酶有其各自发挥功能最适宜的温度范围，这一适宜的温度范围可能与其使用环境的温度是不一致的。因此，在分析植酸酶的活性时，必须在两个温度之间选择一个“最佳温度”，一个温度是对该植酸酶最适宜的酶反应温度，以获得高的酶活力；另一个温度是植酸酶在靶动物体内起作用的环境温度，这个温度可能对植酸酶最适宜的酶反应温度是不太适宜的。

植酸酶作为一类酶具有许多共同特性，而每一个植酸酶都有其各自独特的特性。植酸酶的体外特性，如pH值、胃蛋白酶的稳定性等，限制了其在体内可预见活性的表达（Simon和Igbasan, 2002），因为植酸酶的最终使用效果是所有影响酶活性因素的共同作用的结果。最后，消化道的环境对植酸酶的这些特性进行调整。

#### 植酸酶活性单位混乱

由于不同的植酸酶在化学特性上的巨大差异，目前还没有一个植酸酶活性检测分析国际统一的标准方法（Selle和Ravindran, 2006）。因此导致在分析不同来源的植酸酶产品时产生许多混乱，特别是将同一酶活单位（FTU）使用在不同的分析方法中（表1）。与试验室间的差异不同，分析方法上的差异可能会导致最终测得植酸酶活性单位3~4倍的差异。

表1 不同生产厂家植酸酶分析方法的差异

分析方法	酶活单位 <sup>1</sup>	样品	提取	培 养		辅助因子	标准	吸光率
		g	分钟	缓冲液	分钟			
A	FTU	5	60	酸	60	是	酶(A. niger)	415
B	FYT	80	45	乙酸	30	不	磷酸	415
C	FTU	10	10	乙酸	30	是	磷酸	415
D	FTU	5	60	柠檬酸	15	是	磷酸	820

<sup>1</sup>是指在分析条件下（pH5.5, 37°C），每分钟从5.1 mM 的植酸钠溶液中释放出1微摩尔无机磷所需要酶的量。

资料来源: Yoon, S.J., Y.J. Choi, H.K. Min, K.K. Cho, J.W. Kim, S.C. Lee and Y.H. Jung. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, Enterobacter sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. Enzyme Microb. Tech. 18:449-454.

对已经建立的植酸酶分析方法进行改进已越来越普遍。这无疑是正确的，但是，所有的分析方法都用FTU单位来表示植酸酶的活性是不合适的，这将导致对不同植酸酶产品质量错误地评估。早在2002年，FEFANA就意识到了这个问题，并设法在14个商业和政府的试验室之间对植酸酶分析方法进行协调统一（FEFANA, 2005）。他们最终协调达成了一个植酸酶的分析方法，即DSM（设计

标准手册) 营养产品方法。

### 分析原理

该分析方法与AOAC方法存在一些相似的地方(Engelen等,2001),主要由3个主要步骤组成:提取,培养和光谱仪定量(见图1)。这一改良的分析方法是由Gist-brocades/DSM的研究人员开发出来的,用于他们的黑曲霉植酸酶产品的检测分析。

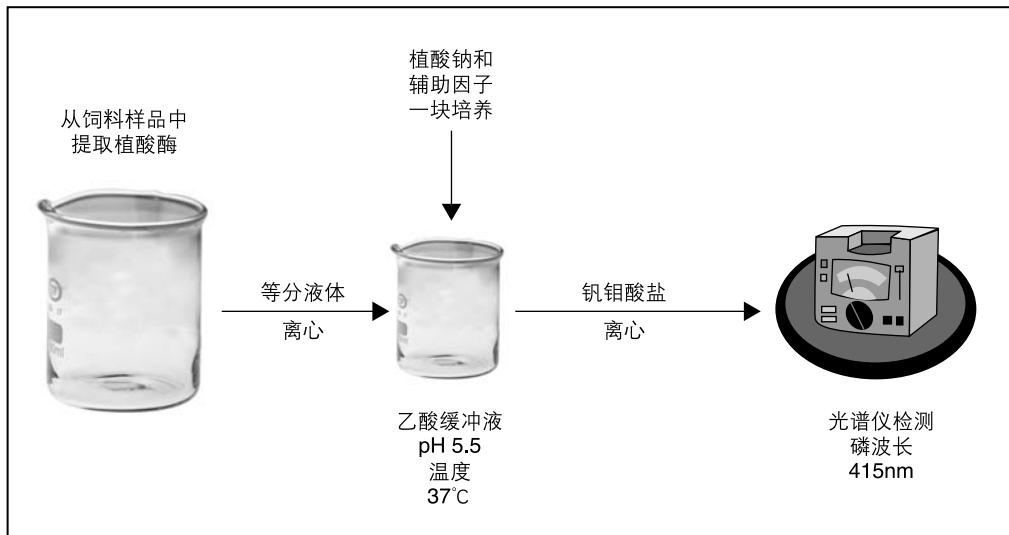


图1 植酸酶检测分析流程

简短地说, AOAC植酸酶的分析方法主要是根据由饲料样品中提取的植酸酶释放底物(植酸钠)中磷酸盐的量来确定植酸酶的活性单位。选择pH值为5.5是因为这是植酸酶(源自黑曲霉A. niger phytase)最适宜的pH值环境(Engelen等, 1994), 温度选择37°C, 因为这与消化道的温度环境最相近。

采用乙酸缓冲液和氯化钙溶液(钙离子作为辅助因子)提取和培养饲料样品中的植酸酶和植酸钠, 经60分钟的培养后, 采用酸性的钒钼酸盐试剂以终止反应, 并产生一释放无机磷酸盐而形成的黄色复合物。

在光谱仪415 nm波长条件下, 将测得的读数与黑曲霉植酸酶标准曲线进行对照, 以估测饲料样品中植酸酶的活性(Engelen等, 2001)。在此, 使用黑曲霉来源的植酸酶为标准参照物来分析检测其他来源的植酸酶是值得怀疑的, 因为不同的植酸酶在相同条件下反应是不同步的。

最后, 一个单位的植酸酶(FTU)被定义为:每分钟催化5.1mM植酸钠释放一微摩尔无机磷所需植酸酶的量, 试验条件为pH5.5, 温度37°C。

### 分析方法的改进

植酸酶单位(FTU)的定义并没有对缓冲液、缓冲强度、酶辅助因子和完成

培养的时间做出规定。FTU主要关注于分析的条件，而没有涉及可能导致植酸酶分析结果存在差异的关键“幕后因素”。

**缓冲液：**这是一个在该定义中未确定的又是一个很重要的因子。乙酸缓冲液是植酸酶分析检测中最常使用的缓冲液，其他缓冲液，如柠檬酸缓冲液（Rodriquez 等，2000）和硼酸缓冲液（Basu 等，2006）也有使用。

我们发现，如果使用柠檬酸缓冲液，商业植酸酶活性（真菌植酸酶和细菌植酸酶）的表达仅相当于使用乙酸缓冲液的 65-70%（表 2）。

**表2 不同分析方法而测得的商业植酸酶产品的活性**

分析方法	缓冲液0.25M pH 5.5	商业植酸酶产品				
		黑曲霉	大肠杆菌	大肠杆菌	大肠杆菌	P. lycii
DSM <sup>1</sup>	乙酸	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
AOAC	乙酸	1.08	1.19	1.11	1.14	1.10
C <sup>2</sup>	柠檬酸	0.53	0.31	0.34	0.31	0.32
D <sup>2</sup>	乙酸	1.04	1.25	1.20	1.23	1.11

<sup>1</sup>以DSM分析方法测得的植酸酶活性为1.00；其他与此相比。

<sup>2</sup>方法C和D为已建立的方法。

这相当于同一种植酸酶用柠檬酸缓冲液分析其活性单位为 250，而用乙酸缓冲液分析其活性单位则为 750。然而，在缓冲液使用上的差异并不对所有植酸酶都产生影响，这就使得在解读两种缓冲液给植酸酶分析结果造成差异时显得更为复杂。

此外，乙酸缓冲液和柠檬酸缓冲液在不同的摩尔浓度下对不同温度范围内的植酸酶的稳定性有显著地影响（Rodriguez 等，2000）。Dalsgaard 等（2007）发现，乙酸缓冲液和柠檬酸缓冲液对两种大肠杆菌植酸酶的相对活性有很大的影响，用柠檬酸缓冲液分析得到的植酸酶活性只相当于用乙酸缓冲液而得到活性的 1/3。

Basu 等人注意到（2006），从颗粒饲料中提取和分析植酸酶其结果会受到缓冲液的 pH、化学性质和缓冲液强度的影响。他们采用硼酸缓冲液（pH10）提取大肠杆菌植酸酶获得了更满意的结果。同时他们还讨论了用调整因子将植酸酶单位 QPU 转换为 QPU 单位。

很明显，螯合剂（如柠檬酸和 EDTA）可提高植酸酶的活性，这可能是因为植酸-钙复合物的形成而减少了钙离子的可利用性（Maenz 等，1999）。采用不同的缓冲液和不同的螯合剂导致植酸酶的分析结果不一致（Greiner 等，1997；Shimizu，1992；Yoon 等，1996；Wyss 等，1999b），这可能是因为并不是所有的植酸酶都是金属酶，或者需要不同的辅助因子，或者矿物元素与植酸复合物的形成被阻止了。

**缓冲液的 pH：**虽然大多数种类植酸酶的最适 pH 值范围在 4.5-6.0 之间，分析时通常设定 pH 为 5.5。在 pH5.5 条件下，某些植酸酶活性的表达只是它们在最适

宜 pH 时最高活力的 70% (Rodriquez 等, 1999), 或更低 (Rodriquez 等, 2000), 而另一些植酸酶在此 pH 条件下可能表现出最高的活力 (Engelen 等, 1994)。

通过比较两个植酸酶分析方法的 pH 条件我们发现 (图 2), 几种商业植酸酶产品的酶活结果明显地受到 pH 环境的影响。一种植酸酶在低 pH 值环境下酶活提高了 170%, 而另一种植酸酶的酶活则降低到 5%。而另一些植酸酶则未受 pH 环境的影响。

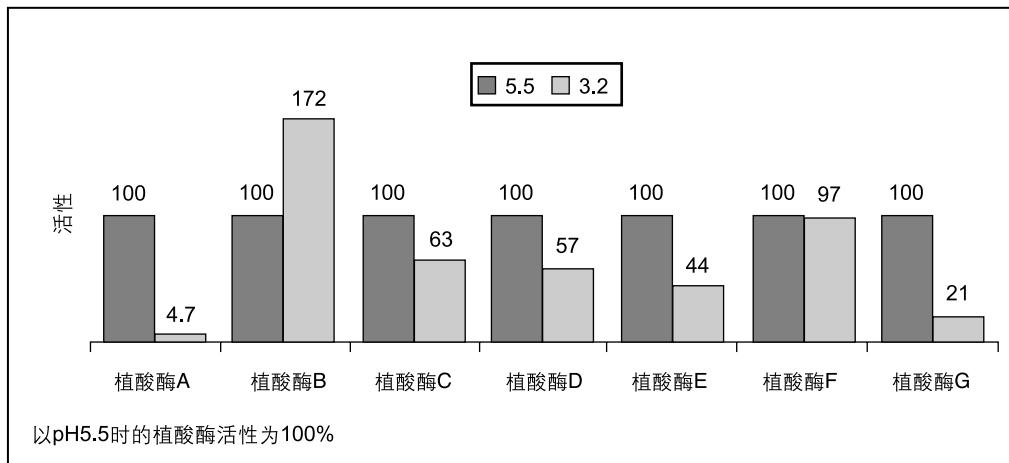


图2 pH环境对植酸酶酶活表达的影响(0.25M乙酸缓冲液)

此外, 我们也发现, 同一种植酸酶产品的两种不同形式在上述 pH 环境下其酶活也表现出 20% 的差异。随着商业化产品形式的增加, 这将可能成为一个大问题。根据我们的经验, 对不同的产品形式可能需要额外的提取步骤以完全提取。

在某一特定的 pH 环境下未能检测出植酸酶的活性并不能反映该植酸酶的真实酶活水平, 因为根据酶的变性程度, 植酸酶可能折叠, 也可能复原。植酸酶在肠道内随肠道运动的动态使得植酸酶经历不同的 pH 和其他环境。

可以肯定, 在通常情况下, 植酸酶在动物体内的实际作用环境比在实验室分析时或在体外测定时所设定的独特不变的 pH 条件要复杂的多。由图 2 所示, 植酸酶 A 就是一个典型的例子, 根据动物研究, 植酸酶 A 可提供 0.1% 的可利用磷源。

**缓冲液添加剂:** 某些植酸酶的发现过程需要钙离子作为辅助因子 (Kerovuo 等, 2000), 通常在缓冲液中加入氯化钙, 虽然所需要钙的量并不总是相同的, 也可能完全不需要钙。根据所要分析检测的植酸酶种类, 没有钙离子可能会降低植酸酶活性的检测结果 (Sequeilha 等, 1992)。

另一方面, 过量的钙可能会形成难以降解的不可溶的植酸-钙复合物。在大多数植酸酶检测分析中, 这可能不是个问题, 因为钙与植酸的结合受到 pH 值的影响。当 pH 5.0 时, 钙对黑曲霉植酸酶降解植酸的效率几乎没有影响 (Maenz 等, 1999)。植酸酶的分析通常在 pH 5.5 条件下进行。

比较4个商业植酸酶产品，DSM的分析结果表明（Vogel, 2005），AOAC方法使用的氯化钙水平对其中一个植酸酶的酶活提高了40%，但降低了其他植酸酶的活性。因此，依据不同的植酸酶，缓冲液中所添加的辅助因子可能会对植酸酶的活性产生明显地影响。

**温度：**植酸酶的最适宜环境温度一般是37°C以上（Lei和Porres, 2003），在这个温度下，植酸酶只表现其最大酶活的40—60%。尽管Basu等人推出了一种大肠杆菌植酸酶的方法是在60°C条件下培养样品（Basu等, 2006），但一般来说，植酸酶的分析方法是将样品在37°C条件下培养，这个温度超过了猪和家禽的体温。改变样品的培养温度无疑会影响植酸酶的活性。

**样品提取和培养的时间：**不同的分析方法从饲料样品中提取植酸酶的时间和培养样品的时间是存在明显差别的，但有关样品培养时间的研究报道非常少。很显然，提取和培养时间的不同必然会导致植酸酶活性最终分析结果的差异。此外，从颗粒饲料样品中提取某些植酸酶可能需要一个特殊的提取过程（Basu等, 2006）。

**底物：**植酸酶的分析方法采用植酸钠作为底物。植酸钠比饲料中的植酸更容易降解（Selle和Ravindran, 2006）。植酸可与不同的饲料成分结合，尤其是与二价阳离子（如该离子）结合（Pallauf和Rimbach, 1997）。植酸—钙的复合物不像植酸钠那样容易水解（Pallauf和Rimbach, 1997）。

此外，根据底物的专一性，Wyss等人（1999b）将植酸酶分成两大类。一类为范围窄的、作用专一的水解植酸的植酸酶，另一类是可水解一系列含磷化合物的植酸酶。在体外评估试验中（Wyss等, 1999b），大量的磷酸盐被广谱的植酸酶从混合饲料中释放出来，这说明在饲料中存在一系列含磷化合物作为酶的底物。

底物的选择必然会影响到植酸酶活性的表达。不同的植酸酶分析方法所选用的底物也有所不同，必然会产生不同的植酸酶活性分析结果。

此外，植酸酶分析中所使用的植酸钠产品的货源供应会对分析结果产生很大的影响。目前植酸的主要供应商所提供的是一种高含量的、不同水平的无机磷产品。这可导致植酸酶分析结果的不准确。DSM目前正从其他的供货商中筛选合适的植酸钠产品。

**实际分析中的差异：**长期以来，在植酸酶活性的分析工作中我们已经历了太多的差异，这已引起我们的关注。如图3所示，采用两目前正在使用的植酸酶分析方法来分析检测不同商品饲料样品中的植酸酶活性，两种分析方法分别在不同的试验室进行。虽然试验室与试验室之间的差异可能导致植酸酶分析结果的差异，但分析结果出现不一致的，不同的分析方法导致植酸酶分析结果相差25—60%。

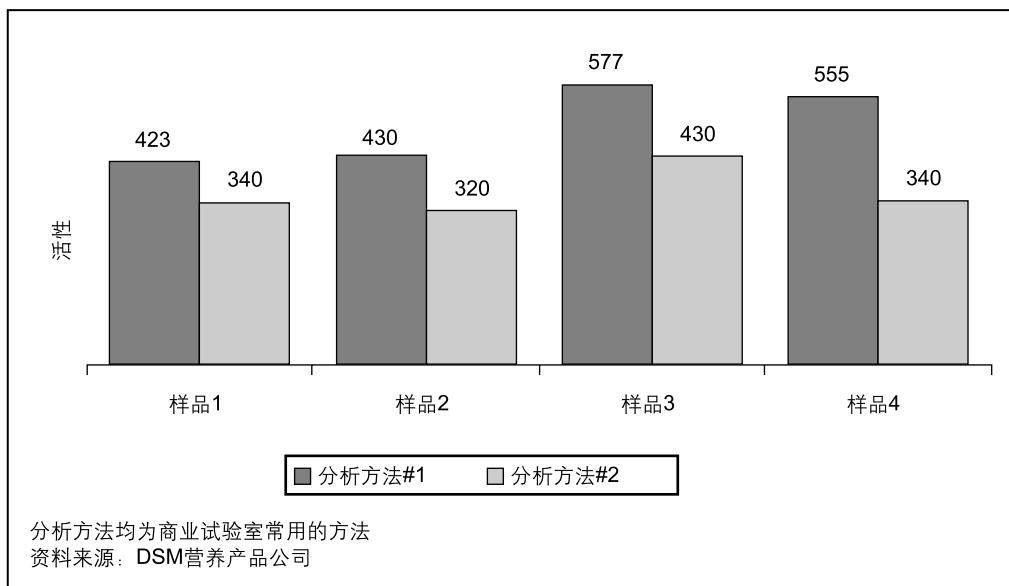


图3 两种不同的植物酶分析方法所检测出的商品饲料样品的植物酶活性结果(单位/kg)

### 结论

植酸酶的化学分析在植酸酶产品的质量检验、产品标签和酶活保证方面是必不可少的。经化学分析测得的植酸酶活性单位与动物生产性能效果试验之间的关系必须是以动物试验能替代的磷为基础，因此，动物试验在植酸酶的化学分析与产品的预期效果之间架起了一座桥梁。

然而，在植酸酶的化学分析过程中充满了许多变异因素，这些变异因素对于不同植酸酶的影响又是不同的。因此，在评估植酸酶的活性时，必须对化学分析方法的分析过程有一个正确的理解。