

体外消化法评定植物性饲料磷透析率的 适宜酶促反应条件

左建军, 张常明, 王修启, 董泽敏, 叶 慧, 冯定远

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:为建立一个植物性饲料磷透析率的体外测定方法,首先通过一个 $L_{32}(4^9)$ 正交试验分析 8 个因素(4 水平)对酶促反应的影响,然后以第一影响因素为对象进行 8 水平的单因素试验. 结果表明:8 个因素对植物性饲料磷透析率的影响大小及对应适宜的酶促反应条件依次为:胰蛋白酶处理时间为 6 h,透析液体积为 100 mL,胃蛋白酶处理时 pH 值为 2.5,胃蛋白酶浓度 2 000 U/mL,处理时间为 100 min,酶促反应温度为 35 ℃,胰蛋白酶处理时浓度为 1 625 U/mL,pH 值为 6.5. 在此反应条件下测定的豆粕、大麦、高粱、花生粕、菜粕的磷体外透析率分别为:(36.91 ± 0.58)%、(27.28 ± 0.94)%、(26.95 ± 0.58)%、(30.51 ± 0.83)%、(20.82 ± 1.09)%.

关键词:磷; 体外法; 透析率; 酶促反应条件

中图分类号:S816.71

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)03-0085-05

Suitable Condition of Enzymatic Reactivity for Determining the Dialyzability of Feedstuffs Phosphorus *in Vitro* by Dialysis Tube Method

ZUO Jian-jun, ZHANG Chang-ming, WANG Xiu-qi, DONG Ze-min, YE Hui, FENG Ding-yuan

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to set up a new method for determining *in vitro* the phosphorus dialyzability in feedstuffs by dialysis tube, a $L_{32}(4^9)$ orthogonal experiment with eight factors (each factor for 4 levels) and a single factor experiment on the enzymatic reactivity were performed. The sequence of significance for factors on sample-P dialyzability were duration of trypsin digestion, volumes of dialyzing solution, pH of pepsin solution, pepsin concentration, duration of pepsin digestion, temperature, trypsin concentration, pH of trypsin solution; The values of it were 6 h, 100 mL, 2.5, 2 000 U/mL, 100 min, 35 ℃, 1 625 U/mL, 6.5, respectively. And *in vitro* dialyzabilities of phosphorus in soybean meal, barley, sorghum, peanut meal, rapeseed meal were (36.91 ± 0.58)%, (27.28 ± 0.94)%, (26.95 ± 0.58)%, (30.51 ± 0.83)%, (20.82 ± 1.09)%, respectively.

Key words: phosphorus; *in vitro*; dialyzability; the suitable condition of enzymatic reactivity

磷是仅次于蛋白质和能量以外的第三昂贵的饲料原料,且又是目前养殖业对环境污染最为严重的来源之一^[1-2]. 准确测定饲料有效磷可为合理设计动物饲料配方提供依据,减少磷盲目添加造成的浪

费和过量排泄导致的环境污染. 体内法具有客观、可靠等优点,但耗时、费资、繁琐. 为此,寻求一种体外法来评价饲料磷的营养价值显得十分必要. 体外法测定饲料有效磷的关键是确定体外消化过程中适宜

收稿日期:2007-01-18

作者简介:左建军(1976—),男,讲师,博士;通讯作者:冯定远(1961—),男,教授,E-mail:fengdy@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30671529);广东省自然科学基金(06300364)

的酶促反应条件. 以前, 饲料磷体外消化率测定方法主要参考蛋白质体外测定方法, 直到 1997 年, Liu 等^[3]才首次研究了胰蛋白酶浓度和胰蛋白酶处理时间对饲料磷体外消化率的影响, 但一直缺乏系统的研究. 因此, 本研究通过一个 $L_{32}(4^9)$ 正交试验和一个单因素试验确定体外消化过程中适宜的酶促反应条件, 在此基础上建立植物饲料磷体外消化率的测定方法, 并采用该方法测定了豆粕、大麦、高粱、花生粕、菜粕的磷体外透析率.

1 材料与方法

1.1 试验材料

标准样品豆粕及大麦、高粱、花生粕、菜粕由市场购买, 粉碎, 过 60 目标准筛后备用. 试验用透析袋购于 Sigma Chemical, 充圆直径 21 mm, 透析分子相对分子质量 $<12\ 000$; 按需要剪成 15 mm 小段. 胃蛋白酶为 Ameresco 公司产品, 酶活性规格为 3 000 ~ 3 500 U/mg; 胰蛋白酶为 Ameresco 公司产品, 酶活性规格为 ≥ 250 U/mg; 其他试剂均为分析纯的国产试剂.

1.2 试验设计

试验设计为 8 因素 4 水平正交试验, 即胃蛋白酶处理浓度 (1 000、1 500、2 000、2 500 U/mL)、胃蛋白酶处理时间 (50、75、100、125 min)、胃蛋白酶处理时 pH 值 (2.0、2.5、3.0、3.5)、胰蛋白酶处理浓度 (875、1 125、1 375、1 625 U/mL)、胰蛋白酶处理时间 (2、4、6、8 h)、胰蛋白酶处理时 pH 值 (6.0、6.5、7.0、7.5)、透析液体积 (100、200、300、400 mL)、酶促反应温度 (35、37、39、41 $^{\circ}\text{C}$). 用 $L_{32}(4^9)$ 安排试验, 共 32 个试验处理, 每个处理设 4 个重复.

1.3 体外消化试验操作步骤

试验分为胃蛋白酶和胰蛋白酶处理 2 个阶段. 胃蛋白酶处理时, 称取 1 g 待测饲料样品 (精确至 0.000 1 g), 放入 10 mL 玻璃试管中, 加入 2 mL pH 值为 2.0、2.5、3.0 或 3.5 的胃蛋白酶溶液, 混合均匀后, 于 35、37、39 或 41 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴振荡器内消化至设定的时间 (放入 5 min 后开始计时). 胰蛋白酶处理时, 采用半透膜透析法, 将胃蛋白酶消化后的食糜用 1 mol/L NaHCO_3 调节至 pH 值为 6.0、6.5、7.0 或 7.5, 然后与 0.5 mL 浓度为 875、1 125、1 375 或 1 625 U/mL 而 pH 值为 6.0、6.5、7.0 或 7.5 的胰蛋白酶溶液混合均匀, 用 10 mL pH 值为 6.0、6.5、7.0 或 7.5 的巴比妥钠缓冲溶液冲洗试管 5 次, 将冲洗液倒入透析袋, 然后将透析袋放入盛有体积为 100、

200、300 或 400 mL 而 pH 值为 6.0、6.5、7.0 或 7.5 的巴比妥钠缓冲溶液的三角瓶中, 密封后于温度为 35、37、39 或 41 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温振荡器中透析至设定的时间. 同时, 不加样品进行空白测定.

取 10 mL 透析液于 50 mL 容量瓶中, 用分光光度计法测定透析液中无机磷的浓度.

1.4 适宜的胰蛋白酶处理时间的进一步筛选

根据正交试验结果的综合可比性分析, 确定胰蛋白酶处理时间为体外评定有效磷的第一影响因子. 在此基础上, 采用单因素 8 个处理水平试验设计, 每个处理为 4 个重复, 研究透析时间为 2、3、4、5、6、8、10、12 h 时对样品磷体外消化率的影响, 以此确定更具体的适宜透析时间.

1.5 透析率的计算

饲料中磷的透析率 = $[m_1 / (m \times w)] \times 100\%$, 式中, m_1 为透析液中可透析磷质量 (mg), m 为样品的质量 (mg), w 为样品中磷的质量分数 (%).

1.6 指标测定方法

饲料中磷的质量分数和透析液中磷的质量采用钼黄比色法测定^{[4]134-136}, 饲料中钙的质量分数采用 EDTA 络合滴定法测定^{[4]136-138}.

1.7 数据处理

所有数据经 SAS (6.12) 软件处理, 数据按平均数 $\pm$ 标准误表示.

2 结果与分析

2.1 饲料中的磷和钙

经测定豆粕、大麦、高粱、花生粕、菜粕中磷的质量分数分别为 0.69%、0.28%、0.21%、0.83%、1.19%, 钙的质量分数分别为 0.23%、0.04%、0.01%、0.20%、0.75%.

2.2 酶促反应条件对饲料样品磷透析率的影响

根据正交试验结果的综合可比性, 从正交试验结果极差 R 值的分析可以看出, 8 个因素对样品磷透析率的影响大小依次为: 胰蛋白酶处理时间 > 透析液体积 > 胃蛋白酶处理时的 pH 值 > 胃蛋白酶浓度 > 胃蛋白酶处理时间 > 酶促反应温度 > 胰蛋白酶浓度 > 胰蛋白酶处理时 pH 值 (表 1).

由表 1 可知: (1) 胰蛋白酶处理时间对磷体外透析率的影响最大, 由 2 ~ 8 h, 磷的体外透析率线性增加 ($y = 3.3x + 3.08$, $R^2 = 0.99$); 以最大可透析磷为标准来判断, 以 8 h 为最适宜. (2) 透析液体积由 100 mL 增加至 400 mL, 磷体外透析率呈二次项关系降低 ($y = 0.0002x^2 - 0.1611x + 40.723$, $R^2 =$

表 1 正交试验的结果
Tab. 1 Results of orthogonal experiment

试验号 no.	因素 factors ¹⁾								磷透析率 dial- yzabilities of P/%
	I/(U·mL ⁻¹)	II/min	III	IV/(U·mL ⁻¹)	V/h	VI	VII/mL	VIII/℃	
1	1 000	50	2.0	875	2	6.0	100	35	11.59 ± 0.20
2	1 000	75	2.5	1 125	4	6.5	200	37	16.28 ± 0.44
3	1 000	100	3.0	1 375	6	7.0	300	39	13.31 ± 0.33
4	1 000	125	3.5	1 625	8	7.5	400	41	11.56 ± 0.62
5	1 500	50	2.0	1 125	4	7.0	300	41	8.26 ± 0.73
6	1 500	75	2.5	875	2	7.5	400	39	9.08 ± 0.28
7	1 500	100	3.0	1 625	8	6.0	100	37	58.69 ± 1.02
8	1 500	125	3.5	1 375	6	6.5	200	35	15.59 ± 0.33
9	2 000	50	2.5	1 375	8	6.0	200	39	18.60 ± 0.56
10	2 000	75	2.0	1 625	6	6.5	100	41	49.75 ± 2.07
11	2 000	100	3.5	875	4	7.0	400	35	12.27 ± 0.33
12	2 000	125	3.0	1 125	2	7.5	300	37	9.66 ± 0.27
13	2 500	50	2.5	1 625	6	7.0	400	37	16.82 ± 0.50
14	2 500	75	2.0	1 375	8	7.5	300	35	29.25 ± 1.15
15	2 500	100	3.5	1 125	2	6.0	200	41	5.67 ± 0.36
16	2 500	125	3.0	875	4	6.5	100	39	24.52 ± 0.41
17	1 000	50	3.5	875	8	6.5	300	37	15.29 ± 0.35
18	1 000	75	3.0	1 125	6	6.0	400	35	16.52 ± 0.60
19	1 000	100	2.5	1 375	4	7.5	100	41	34.61 ± 0.93
20	1 000	125	2.0	1 625	2	7.0	200	39	9.39 ± 0.08
21	1 500	50	3.5	1 125	6	7.5	100	39	14.24 ± 0.39
22	1 500	75	3.0	875	8	7.0	200	41	27.99 ± 0.47
23	1 500	100	2.5	1 625	2	6.5	300	35	10.92 ± 0.25
24	1 500	125	2.0	1 375	4	6.0	400	37	15.41 ± 0.58
25	2 000	50	3.0	1 375	2	6.5	400	41	10.85 ± 0.32
26	2 000	75	3.5	1 625	4	6.0	300	39	11.71 ± 0.18
27	2 000	100	2.0	875	6	7.5	200	37	32.42 ± 1.51
28	2 000	125	2.5	1 125	8	7.0	100	35	61.70 ± 1.11
29	2 500	50	3.0	1 625	4	7.5	200	35	12.76 ± 0.30
30	2 500	75	3.5	1 375	2	7.0	100	37	10.44 ± 0.33
31	2 500	100	2.0	1 125	8	6.5	400	39	17.22 ± 0.60
32	2 500	125	2.5	875	6	6.0	300	41	13.57 ± 0.44
K ₁	127.55	108.42	173.34	146.84	77.61	152.25	217.03	169.61	
K ₂	161.66	170.02	181.58	148.55	135.82	160.42	138.80	169.01	
K ₃	207.06	180.39	174.78	148.06	171.32	160.18	111.97	118.07	
K ₄	130.25	161.40	96.71	183.08	241.78	153.68	108.23	162.26	
K ₁ /4	15.94	13.55	21.68	18.36	9.70	19.03	27.13	21.20	
K ₂ /4	20.21	21.25	22.70	18.57	16.98	20.05	17.35	21.13	
K ₃ /4	25.88	22.55	21.85	18.51	21.42	20.02	14.00	14.76	
K ₄ /4	16.28	20.18	12.09	22.89	30.22	19.21	13.59	20.28	
R	9.94	9.00	10.61	4.53	20.52	1.02	13.54	6.37	

1) I:胃蛋白酶浓度,II:胃蛋白酶处理时间,III:胃蛋白酶处理时的 pH 值,IV:胰蛋白酶浓度,V:胰蛋白酶处理时间,VI:胰蛋白酶处理时的 pH 值,VII:透析液体积,VIII:酶促反应温度

0.99);以磷透析率最高为标准来判断,最佳透析液体积为100 mL。(3)胃蛋白酶处理时的pH值由2.0增至3.5,磷体外透析率呈二次项式关系变化($y = -10.78x^2 + 53.366x - 42.284, R^2 = 0.97$);以磷透析率最高为标准来判断,最佳胃蛋白酶处理时pH值为2.5。(4)胃蛋白酶浓度由1 000 U/mL增加至2 500 U/mL时,磷体外透析率先呈增加趋势,后又呈下降的趋势;其中,胃蛋白酶处理浓度由1 000 U/mL增加至2 000 U/mL时,磷的透析率呈线性增加($y = 0.0099x + 5.7667, R^2 = 0.99$);以磷透析率最高为标准来判断,最佳胃蛋白酶浓度为2 000 U/mL。(5)胃蛋白酶处理时间由50 min增加至125 min时,磷体外透析率呈二次项式关系变化($y = -0.004x^2 + 7.897x - 15.726, R^2 = 0.99$);以磷透析率最高为标准来判断,最佳胃蛋白酶处理时间为100 min。(6)酶促反应温度由35℃增加至41℃时,磷体外透析率先呈增加趋势,后又呈下降的趋势;其中,酶促反应温度由35℃增加至39℃时,磷的透析率呈二次项关系线性降低($y = -0.7875x^2 + 56.665x - 997.39, R^2 = 1$);以磷透析率最高为标准来判断,最佳的反应温度为35℃。(7)胰蛋白酶浓度由875 U/mL增加至6.5 mg/mL时,磷体外透析率呈二次项式线性关系变化($y = 0.00001x^2 - 0.0363x + 37.577, R^2 = 0.92$);以磷透析率最高为标准来判断,最佳的胰蛋白酶浓度为1 625 U/mL。(8)胰蛋白酶处理,pH值由6.0增加至7.5时,磷体外透析率几乎没有变化;以磷透析率最高为标准来判断,最佳胃蛋白酶处理时的pH值为6.5。

2.3 胰蛋白酶处理时间单因素试验筛选适宜胰蛋白酶处理时间

当透析时间为2、3、4、5、6、8、10、12时,豆粕中磷的透析率分别为 $(9.24 \pm 0.34)\%$ 、 $(13.25 \pm 0.68)\%$ 、 $(15.93 \pm 0.73)\%$ 、 $(24.78 \pm 0.45)\%$ 、 $(35.65 \pm 0.98)\%$ 、 $(41.40 \pm 0.45)\%$ 、 $(52.17 \pm 1.55)\%$ 、 $(61.46 \pm 1.48)\%$ 。随着胰蛋白酶消化处理时间的延长,磷的体外透析率以 $y = 5.44x - 2.315 (R^2 = 0.98)$ 线性增加;且在透析时间为6 h时形成一个分界点。分界点之前,磷体外透析率以 $y = 7.5852x + 0.3618 (R^2 = 0.97)$ 线性增加;分界点之后,磷体外透析率以 $y = 4.0913x + 22.732 (R^2 = 0.99)$ 线性增加;从2~6 h,磷体外透析率增加的速度显然高于6~12 h之间的速度。

在此基础上,可确定饲料磷透析率测定的适宜

酶促反应条件为:胰蛋白酶处理时间为6 h,透析液体积为100 mL,胃蛋白酶处理时的pH值为2.5,胃蛋白酶浓度为2 000 U/mL,胃蛋白酶处理时间为100 min,酶促反应温度为35℃,胰蛋白酶浓度为1 625 U/mL,胰蛋白酶处理时pH值为6.5。

2.4 饲料原料中磷透析率

采用“2.3”中建立的测定方法,测定豆粕、大麦、高粱、花生粕、菜粕磷体外透析率(每个样品设4个重复),结果分别为: $(36.91 \pm 0.5)\%$ 、 $(27.28 \pm 0.94)\%$ 、 $(26.95 \pm 0.58)\%$ 、 $(30.51 \pm 0.83)\%$ 、 $(20.82 \pm 1.09)\%$ 。

3 讨论

建立体外透析法的关键是确定体外消化过程中的适宜酶促反应条件,主要包括酶的浓度、酶促反应时温度、pH值、透析液体积、消化时间等,其次还有样品量和粒度、分离技术等。其中,以消化酶为最主要的影响因素。理论上,所用的酶应当具有与消化道中酶相似的特征^[5],因此,体外透析试验中通常采用胃蛋白酶和胰蛋白酶作为消化酶。而且,单胃动物体外透析模拟技术研究中,各项消化参数确定大多是以养分体外透析率最大时的参数为最适参数^[6-7]。

本研究发现,适宜胃蛋白酶浓度为4 000 U/g(每g饲料加2 mL浓度为2 000 U/mL的胃蛋白溶液),这与Liu等^[3]筛选的胃蛋白酶浓度(3 000 U/g)比较接近。胃蛋白酶处理时pH值为2.0、2.5、3.0、3.5时,磷体外透析率随pH值增加而逐渐降低,这与计成等^[5]的结果一致;这可能是pH值的增加降低了胃蛋白酶活性的缘故;本研究中胃蛋白酶处理时适宜的pH值为2.5,这与Liu等^[3]推荐的2.5和Zyla等^[8]推荐的2.75较吻合。从本研究和计成等^[5]的结果来看,不管是磷还是粗蛋白体外透析率都有随胃蛋白酶消化时间增加而增加的趋势,但本研究在处理时间增加至100 min后有趋于恒定的趋势,这比Liu等^[3]选择的75 min略有延长。早期研究饲料磷体外透析率主要是参考蛋白质的体外测定方法。直到1997年,Liu等^[3]研究了胰蛋白酶浓度和胰蛋白酶处理时间对磷体外透析率的影响,发现胰蛋白酶浓度对饲料磷体外透析率没有显著影响,但随胰蛋白酶处理时间(1~5 h)的延长,磷体外透析率呈线性增加;本研究与Liu等^[3]结果一致。理论上,能使胰蛋白酶发挥最大酶活性的pH值就是最适宜胰蛋白酶作用的pH值;本研究确定的胰蛋白酶处

理时适宜的 pH 值为 6.5,这与 Liu 等^[3]选择的 6.0 和 Zyla 等^[8]推荐的 6.10 差异不大. 黄瑞林等^[7]确定饲料蛋白质体外透析率最大时适宜的酶促反应温度为 35 ℃,且 30~35 ℃范围内,粗蛋白体外透析率随温度升高而增加,但高于 35 ℃时,酶活性下降,酶促反应速度减慢,粗蛋白透析率也下降;这与本研究结果完全一致,但与 Liu 等^[3]推荐的 39 ℃、Zyla 等^[8]选择的 40 ℃有较大差异;可能的原因是体外透析率的测定是诸多参数共同作用的结果,其他参数的变化导致了酶促反应温度的不同要求. 动物体内消化是一个动态过程,消化产物不断被消化道吸收或进入下段消化道. 在密闭容器内进行的体外消化反应,随时间延长,消化产物不断积累会抑制消化酶的作用,前人^[9-11]提出并发展了体外透析消化测定技术. 透析技术在消化过程中可将水解产物与反应混合物分离,但透析液体积的确定是关键. 饲料粗蛋白体外透析率有随着透析液体积的增加而增加的趋势^[3,12];但本研究发现饲料磷体外透析率与透析液体积的关系刚好与其相反,且以透析液为 100 mL 时饲料磷体外透析率最大,这一条件与 Liu 等^[3]和 Zyla 等^[8]推荐的参数完全吻合.

此外,比较本研究 5 种原料磷透析率与 Liu 等^[3]和方热军^[13]的结果发现,与 Liu 等^[3]的结果相关性较差,但与方热军^[13]的结果具有中等程度的相关性($r=0.47$). 相对方热军^[13]的结果来说,本研究建立的体外透析法具有较好的可靠性和重演性.

参考文献:

- [1] FAN M Z, ARCHBOLD T, SAUER W C, et al. Novel methodology allows simultaneous measurement of true phosphorus digestibility and the gastrointestinal endogenous phosphorus outputs in studies with pigs [J]. J Nutri, 2001, 131: 2388-2396.
- [2] 霍启光. 动物磷营养与磷源[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2002: 114-115.
- [3] LIU Jia-zhong, LEDOUX D R, VEUM T L. *In vitro* procedure for predicting the enzymatic dephosphorylation of phytate in corn-soybean meal diets for growing swine [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45(7): 2612-2617.
- [4] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京:中国农业大学出版社,2003.
- [5] 计成,戎易, SCHENERMANN S E, 等. 应用体外胃蛋白酶法测定饲料可利用氨基酸的研究[J]. 农业生物技术学报,1994,2(2): 103-109.
- [6] SAVIOE L, GAUTHIER S F. Dialysis cell for the *in vitro* measurement of protein digestibility [J]. J Food Sci, 1986, 51: 494-498.
- [7] 黄瑞林,李铁军,谭支良,等. 透析管体外消化法测定饲料蛋白质消化率的适宜酶促反应条件研究[J]. 动物营养学报,1999,11(4): 51-58.
- [8] ZYLA K, GOGOL D, KORELESKI J, et al. Simultaneous application of phytase and xylanase to broiler feeds based on wheat: *in vitro* measurements of phosphorus and pentose release from wheats and wheat-based feeds [J]. J Sci Food Agric, 1999, 79(13): 1832-1840.
- [9] MAURON J, MOTTU F, BUJARD E, et al. The availability of lysine, methionine and tryptophan in condensed milk and milk powder: *In vitro* digestion studies[J]. Arch Biochem Biophys, 1955, 59: 433-451.
- [10] STEINHART H, KIRCHGESSNER H. *In vitro* verdauungsapparatur zur enzymatischen hydrolyse von proteinen [J]. Arch Tierernahr (Abstract), 1973, 23: 449-461.
- [11] GAUTHIER S F, VACHON C, JONES J D, et al. Assessment of protein digestibility by *in vitro* enzymatic hydrolysis with simultaneous dialysis [J]. J Nutri, 1982, 112: 1718-1725.
- [12] 席鹏彬,李德发,郑春田. 体外透析两步酶解法测定菜粕粗蛋白消化适宜酶促反应条件的建立[J]. 北京:中国农业大学学报,2003, 8(5): 88-92.
- [13] 方热军. 植物性饲料磷真消化率及其真可消化磷预测模型的研究[D]. 雅安:四川农业大学动物科技学院,2003: 60-65.

【责任编辑 柴 焰】