

文章编号: 1003-8701(2008)01-0054-02

温度和 pH 对鹅肠道细菌纤维素酶活力的影响

张桂山, 崔秀艳, 徐 晶, 娄玉杰 *

(吉林农业大学动物科技学院, 长春 130118)

摘 要: 试验设计不同温度和 pH, 测定鹅肠道细菌纤维素酶活力。来源于回肠的菌株 H1 在 60 °C、pH 为 6.0 时, 酶活力最大为 41.4U; 来源于盲肠的菌株 M3 在 60 °C、pH 为 4.0 时, 酶活力最大为 51.4U。

关键词: 鹅; 纤维素酶; 温度; pH; 酶活力

中图分类号: S835

文献标识码: A

Effect of Temperature and pH on Activity of Bacterial Cellulose from Geese Intestinal Tract

ZHANG Gui-shan, CUI Xiu-yan, XU Jing, LOU Yu-jie

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Different temperature and pH was adopted to determine activity of bacterial cellulose in geese intestinal tract. The results showed that the strain H1 in ileum reaches best enzyme activity 51.4U at 60 °C, pH6.0; The strain M3 in caecum reaches 41.4U at 60 °C, pH4.0.

Key words: Goose; Cellulose; Temperature; pH; Enzyme activity.

鹅是以放牧为主, 补食为辅的节粮型水禽。鹅的消化道具有强大有力肌胃的机械作用、腺胃的化学作用、大肠中的微生物作用, 三者的协同作用结果, 使牧草纤维素得以消化分解。

纤维素是植物细胞壁主要组成成分, 是绿色植物光合作用的主要产物, 约占植物总量的一半。纤维素分子是由许多吡喃型的 D- 葡萄糖残基以 β -1,4- 苷键连接而成的多糖, 是一种高分子化合物。自然界中, 纤维素能被几百种真菌、细菌和放线菌等微生物降解。

纤维素酶是糖与蛋白质的共价键或可降解的复合物形式存在的糖蛋白。它是降解纤维素生成葡萄糖的一组酶的总称。纤维素酶降解纤维素有多种假说。原初假说认为, 当纤维素酶作用时, 首先对纤维素的 C_1 组分起作用, 继而使 C_x 组分变成纤维低聚糖, 再由 β - 葡萄糖苷酶分解成葡萄糖。

协同假说认为, 内切葡萄糖酶首先进攻纤维素的非结晶区, 形成外切纤维素酶需要的新的游离末端, 然后外切纤维素酶从多糖链的非还原端切下纤维二糖单位, β - 葡萄糖苷酶再水解纤维二糖单位形成葡萄糖。一般来说, 当酶组分的混合比例与纤维素分解细菌发酵滤液各组分相近时, 协同作用最大, 不同菌的内切与外切酶之间也具有协同作用。

通过本试验清楚地看到, 纤维素酶分解纤维素的最适温度和酸碱度, 增加了人们对纤维素酶降解纤维的机理了解, 纤维素酶可应用于畜牧业生产, 增加纤维类饲料的利用及减少纤维类物质对环境的污染。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

本试验的出发菌株是从吉林白鹅回肠、盲肠食糜及内壁刮取物中分离筛选出来的, 分离筛选出 3 株兼性厌氧细菌 M2、M3、H1 和 1 株需氧细菌 M1(H1 来源于回肠、M1、M2、M3 来源于盲肠)。

1.2 培养基

收稿日期: 2007-09-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(C020302)

作者简介: 张桂山(1978-), 男, 硕士, 研究方向: 鹅肠道微生态。

通讯作者: 娄玉杰, 教授, louyujie2003@yahoo.com.cn

种子培养基(g/100 mL): 采用复合蛋白胨 1.0、葡萄糖 1.0、酵母膏 1.0、pH7.0。

发酵产酶培养基(g/100 mL): 羧甲基纤维素钠培养基 0.5、牛肉膏 0.5、蛋白胨 1、麸皮 4、豆秆粉 0.5、麦草粉 0.5、NaCl 0.5、pH7.0。

1.3 主要实验设备

751型紫外可见光光度计(上海光尼柯仪器有

限公司), 冷冻离心机(SIGMA)。

1.4 葡萄糖标准曲线绘制

葡萄糖标准液的配制: 准确称取 100 mg 分析纯的无水葡萄糖, 用少量蒸馏水溶解后, 定量转移到 100 mL 容量瓶中, 再定容到刻度, 摇匀。浓度为 1 mg/mL 取 7 支 25 mm×250 mm 试管, 分别按表 1 加入试剂。

表 1 不同溶液加入量

项目	1	2	3	4	5	6	空白
葡萄糖标准液(mL)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	0
相当于葡萄糖质量(mg)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	0
蒸馏水(mL)	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	2.0
2 mol/L 氢氧化钠(mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
3.5- 二硝基水杨酸	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

将各管溶液混合均匀后, 沸水浴 5 min, 立即冷却定容 20 mL, 摇匀, 490 nm 波长处测定 OD 值, 以葡萄糖质量为横坐标, 光吸收值(OD)为纵坐标, 用软件 excel2000 绘制标准曲线, 结果见图 1。

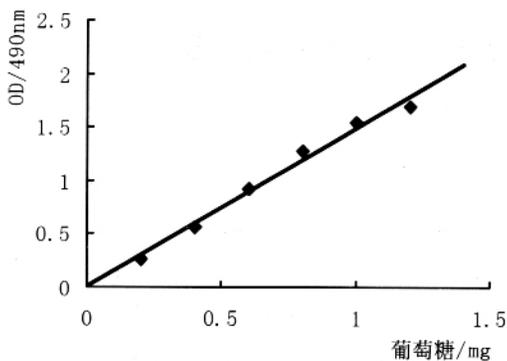


图 1 葡萄糖标准曲线

$$y=1.4933x-0.0018 \quad R^2=0.9878$$

1.5 粗酶制备及测定方法

1.5.1 粗酶制备

250 mL 三角烧瓶中装 50 mL 种子培养基, 接种斜面菌体, 40 旋转摇床振荡培养 24h 作种子液, 按接种量的 2% 转接于 500 mL 三角烧瓶中的 100 mL 发酵培养液中于 40 10 000 r/min 离心 20 min, 除去菌体取上清液, 缓慢加入硫酸二铵至 80% 饱和度, 4 静置过夜, 再离心收集沉淀物, 溶于少量缓冲溶液(0.02 mol/L 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠 pH8.0)中, 用同样缓冲溶液透析, 即得到粗酶液。

1.5.2 酶活力测定

取 4 支带有 20 mL 刻度的试管, 1 支作空白对照样, 另外 3 个试管作平行样品试管, 每支样品试管内加入 1 mL 酶溶液, 然后在 4 个试管中分别加入 4 mL 已预热至 60 的 0.625% 羧甲基纤维

素钠磷酸盐缓冲溶液, 准确计时 10 min 取出, 每支试管立即加入 1 mL 2 mol/L 氢氧化钠溶液和 2 mL DNS 显色液, 摇匀后对照试管加入 1 mL 酶溶液, 将试管放入沸水浴中煮沸 5 min, 立即冷却, 用蒸馏水定容至 20 mL, 于 490 nm 处测定 OD 值, 从标准曲线中计算出产生的葡萄糖量, 以每毫升粗酶溶液反应 1 min 释放 1 μ g 葡萄糖的量为 1 个酶活力单位(U)。

2 结果与讨论

2.1 温度对酶活力的影响

将 42 发酵培养 48 h 菌液产生的纤维素酶在 pH 为 6.0 和温度分别为 36、44、52、60、68 条件下进行酶活力测定, 结果见图 2。

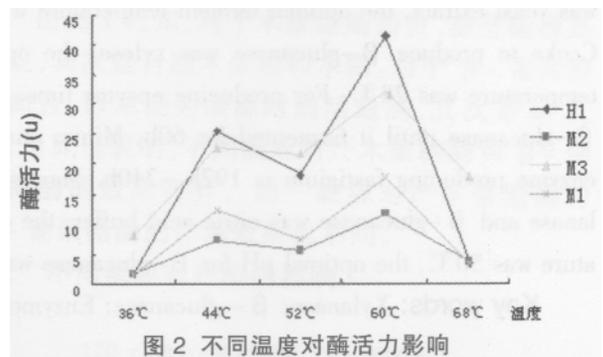


图 2 不同温度对酶活力影响

由图 2 可知, 4 株菌产生的酶在温度为 60 酶活力最高, 来自回肠菌最高酶活力达到了 41.4U, 来自盲肠菌株 M3 最高酶活力达 31.8 U, 随温度升高或降低酶活力则呈下降趋势, 当温度接近鹅体温时酶活力又有所升高。

2.2 pH 对酶活力的影响

将 42 发酵培养 48 h 菌液产生的纤维素酶在 60 和 pH 分别为 3、4、5、6、7、8 条件下进行酶活力测定, 结果见图 3。 (下转第 59 页)

的制备过程中, 充当碳源的物质不但是微生物生长代谢的能量来源, 而且也是酶合成诱导物的重要来源。碳源的类型和性质直接影响酶的活力和产率。同时, 碳源成本也是影响酶生产成本的一个重要因素, 因此, 选择适宜的碳源是决定非淀粉多糖酶生产成败的关键; 今后应从酶的诱导合成和阻遏机制方面加深对碳源的研究。本实验木质层孔菌产木聚糖酶选择的合适碳源为麸皮, 而产 - 葡聚糖酶则选择木糖作为碳源。

木质层孔菌在培养 72 h 时才有微量的酶产生, 到 192 ~ 240 h 两种酶达到产酶高峰, 而黑曲霉、木霉在发酵 24 ~ 36 h 就有微量的酶产生, 在 72 ~ 84 h 就达到产酶高峰, 因此在生产 - 葡聚糖酶、木聚糖酶时, 要综合考虑产酶活力、培养时间及设备利用率等因素, 选择理想的生产菌种。

木质层孔菌所产非淀粉多糖酶最适 pH 都在酸性范围, 并且在 50 ~ 60 范围内具有较高酶活力。加工饲料都需要一个制粒工艺, 在制粒过程中有一个短暂的高温过程, 一般为 75 ~ 93 , 在此温度下, 酶活性大幅度丧失。因此, 要在饲料中真正推广利用非淀粉多糖酶必须具有良好的热稳定性。另一方面酶的最终作用场所是在动物正常体温(37 ~ 39)的胃肠道中, 非淀粉多糖酶必须在常温下具有较高活性。因此如何解决在制粒高温

和动物正常体温下同时具有较高酶活性是饲用酶制剂应用的关键性技术环节。因此, 酶制剂在生产和处理过程中稳定化技术研究是今后的一个重要研究方向。

参考文献:

[1] 王修启, 张兆敏, 李春群. 加酶小麦日粮对猪生产性能的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2002(2): 12- 14 .
 [2] 韩正康, Marquardt R R. 畜禽营养中的酶制剂[A]. 饲料酶制剂国际学术研讨会论文集 [C]. 南京: 南京农业大学出版社, 1996 .
 [3] GruppenK, KormelinkPJM, AGJVoragen. Differences in efficiency of Xylanases in the breakdown of wheat flour arabinoxylans due to their mode of action. Enzymes in Animal Nutrition. Proc 1st Symposium. Karlsruhe, 1993, 276- 280
 [4] 刘永举, 王清吉, 王江青, 等. DNS法测定饲用 - 葡聚糖酶活力[J]. 中国饲料, 1999(18): 6 .
 [5] 徐抗震, 宋纪蓉, 黄 洁, 等. 激光选育混合菌发酵苹果渣生产饲料蛋白[J]. 粮食与饲料工业, 2002(12): 17- 19 .
 [6] Joachim, k et al . Determination of xylanase, - glucanase, and cellulose activity[J]2002 Anal Bioanal., Chem 374: 80- 87 .
 [7] BAILEY MJ, et al . Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase of activity [J]. Biotechnol, 1992, 23: 257- 270 .
 [8] Erfle I D, Teather R M, Wood R M. Purification and properties of a 1, 3- 1, 4- -D- glucanase (lichenase, 1, 3- 1, 4- -D- glucanohydrolase, EC3.2.1.73) from bacteroides saccharovorans cloned in E. coli [J]Biochem, 1998, 255(3): 833- 841 .



(上接第 55 页)

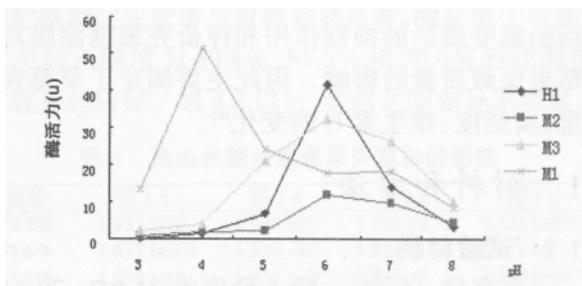


图 3 不同 pH 对酶活力影响

由图 3 可知, 来自盲肠菌株 M3 产生的酶在 pH 值为 4 时酶活力最高, 最高酶活力达到了 51.4U, 随着 pH 值升高或降低酶活力呈下降趋势, 另外 3 株菌产生的酶在 pH 为 6 时酶活力较高, 其中来自回肠菌株 H1 最高酶活力达到了 41.4U, 随着 pH 值升高或降低酶活力呈下降趋势。

3 结 论

鹅肠道纤维分解菌在发酵培养时产生了胞外

纤维素酶, 从而可以利用饲料中的粗纤维类物质, 提高粗饲料的利用率。

鹅肠道细菌纤维素酶活力受温度和 pH 影响, 温度为 60 时, 该组酶的活力最高。

参考文献:

[1] Heorissat B et al. BioTech [M]. 1985(3):722- 726.
 [2] Wood T M, et al. Biochemistry and genetics of activities of cellulose Degredation. FE Ms symp, 43. London [J]. Academic. 1988:21.
 [3] Moloney A P, et al. Biochem [J]. 1985, 225(3):365- 373.
 [4] Reese E T. Biotechnol Bioeng Symposium [J]. 1981(523):147- 161.
 [5] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986 .
 [6] 王晓芳, 徐旭士, 吴 敏, 王 冠, 刘清梅. 一株纤维分解菌的分离与筛选[J]. 生物技术, 2001, 11(2): 27- 30 .
 [7] 张龙翔. 生化实验方法和技术第二版[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997.1- 3.
 [8] 曲音波, 搞配给, 王祖农. 青霉的纤维素酶降解物阻遏突变株的选育[J]. 真菌学报, 1984, 3(4): 238- 243 .
 [9] 刘东波, 张 影, 陈 珊, 等. 生孢纤维细菌对滤纸纤维素降解过程的研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(6)776- 780 .