



2006年第27卷第24期  
(总第285期)  
(1980年创刊)

主办单位:  
辽宁省农业机械研究所  
编辑出版:饲料工业杂志社  
地址:沈阳市金沙江街16号6门  
邮编:110036  
电话:总编室(024)86391923  
编辑二室(024)86391926(传真)  
编辑三室(024)86391925(传真)  
网络发行部(024)86391237  
投稿邮箱:tg@feedindustry.com.cn  
网站:www.feedindustry.com.cn

总编辑:裴春青  
副总编辑:沈桂宇  
责任编辑:高雁  
广告经理:沈阳同兴广告有限公司  
总经理:林勇  
副总经理:荣立南 平晓楠  
业务内勤:刘占  
地址:(110036)沈阳市长江街126号中  
B幢4单元16楼

电话:(024)86276137 86276627  
传真:(024)86276127  
邮箱:ggbt@feedindustry.com.cn  
印刷:辽宁省印刷技术研究所  
国内发行:辽宁省报刊发行局  
国外发行:中国国际图书贸易总  
公司(北京399信箱)

出版日期:每月5日、20日出版  
国外代号:M4290  
国内统一连续出版物号:CN21-1169/S  
国际标准连续出版物号:ISSN1001-091X  
邮发代号:8-163  
发行范围:国内外发行  
广告许可证:辽广字(01)42号  
开户行:中信银行沈阳分行阜东支行  
帐号:72214101826000548-49  
每册定价:6.00元

如蒙赠本刊文章及图片,请注明  
摘自《饲料工业》杂志,并寄样刊。

# 饲料

SILIAO GONGYE

# 工业

(半月刊)

## 目次

### 专家论坛

- 1 饲用酶制剂作用的分子营养学机理与加酶日粮 ENZY 系统的分子生物学基础 ..... 冯定远 谭会泽 王修启等

### 试验研究

- 7 响应面分析法优化酸性蛋白酶固态发酵培养基的研究 ..... 刘建峰 葛向阳 梁运祥
- 11 黑曲霉产高酶活性纤维素酶突变株 ZM-8 的筛选 ..... 马旭光 张宗舟 简海明等
- 14 黑曲霉酶解提取葛根黄酮的研究 ..... 汤海鹏 程茂基 石秀侠等
- 18 植酸磷水平对植酸酶使用效果的影响 ..... 宋保强 陈家钊 王银东等

### 饲养试验

- 21 饲粮中添加微生物植酸酶和有机酸对断奶仔猪生产性能的影响 ..... 高俊杰 车向荣
- 24 肉鸡饲粮能量水平对植酸酶作用效果的影响 ..... 李宗付 陈代文 余冰
- 28 酪蛋白酶解物对断奶仔猪免疫功能及生长性能的影响 ..... 田喜山
- 30 黑曲霉固体发酵物对肉仔鸡日粮消化与肠道菌群作用效果的研究 ..... 程文晓 张福元

### 工艺研究

- 34 芽孢杆菌聚糖酶固体发酵工艺研究 ..... 陈雄 王实玉 王金华

### ■ 37

- 一株产耐热纤维素酶放线菌的固体发酵研究 ..... 邵继海 胡俊林 孙毓临等

### ■ 40

- 木聚糖酶两态发酵工艺及酶学特性研究 ..... 刘德海 周伏忠 王红云等

### 检测技术

- 43 里氏木霉重组 L-PA 纯度、分子量及等电点鉴定 ..... 邵金华 江洁
- 46 酶制剂活性的测定及稳定性的研究 ..... 魏有霞 韩增祥
- 49 CMC 催化力法测定纤维素酶活性条件的研究 ..... 李兰晓 杜金华 李军训等

### 综合论述

- 52 植酸酶的生产研究进展 ..... 郭宝林 高志璞
- 55 浅谈几种常见酶制剂的研究及其应用 ..... 王铸群 瞿明仁

### 问题探讨

- 60 植酸酶的应用与注意事项 ..... 谭宝玲 冯建文 陈丽

### 资源开发

- 62 平菇及其在木质素降解中的应用研究 ..... 江蕾 张朝晖 段文凯

### 信息采集

- 36 从多宝鱼事件看食品安全

## 企业标识展示



江苏北方  
(0412)3343018  
(024)88808022



通济集团  
(028)85188888



江苏中创  
(0519)7309988



江苏牧丰  
(0514)7848811



布勒(常州)  
(0519)7966666



江苏良友  
(0519)8309988



和成饲料 引香孜  
上海阳风  
(021)57355544



杭州康德牧  
(0571)86483111



裕达机械  
(0519)7906658



北京委球  
(010)85957542



北京斯大社  
(010)68919590



挑战集团  
(010)62146105



江苏华瑞  
(0510)83797866



无磷子明  
(0510)83791888



广州海大  
(020)84661699



广东科威  
(020)61368868

**【编者按】**

酶制剂是所有活的有机体产生的由氨基酸组成的蛋白质,是借助生物技术手段研发的一种饲料添加剂,它是通过参加生化反应促进动物对蛋白质、脂肪、纤维素、淀粉以及其它营养物质的吸收和利用,补充动物体内某些消化酶的不足,提高饲料的利用率和畜禽的生产性能,减少氮、磷的排泄量,保护生态环境。正是因为酶制剂所具有高效、专一、无毒副作用、无残留的特点,使其成为目前饲料行业研究的热点。

酶制剂从出现、发展至今,经历一个逐步成熟、健全的过程,从单一提高动物生产性能上升到ENIV理论的建立,从单一的添加方式到复合饲喂,潜力得到最大程度的发挥;生产工艺不断改进,固态、液体发酵,菌种多样化;检测手段简便实用,精确度提高。但现阶段我国酶制剂的研发和应用还存在很多不足:①酶制剂的生产属于微生物发酵的范畴,而应用属于畜牧业的范畴,由于国内尚无饲料用酶制剂统一标准,使管理产生一定的困难;②饲用酶制剂的发酵国内大多采用固体发酵,固体发酵生产工艺存在的一些缺陷目前无法克服,造成产品质量不稳定,给应用带来一定的难度;③饲料加工过程(主要是制粒)中的高温、配合饲料中的重金属离子、动物体内环境等因素可导致酶制剂失活,功能下降。

针对酶制剂在饲料生产中的广泛研究、应用以及存在的诸多问题,本刊携众多专家、学者共同推出“酶制剂专刊”,从酶制剂的生产、研发、检测、动物试验、最佳发酵条件的优化及在饲料中的具体应用等进行全方位、深层次的报道,希望能对行业的研究人员、生产企业有所提示和帮助,使酶制剂的应用更合理、更安全。同时也真诚希望酶制剂的科研人员和相关生产企业能多投这方面的稿件,借助《饲料工业》这个平台把你们最新、最先进的技术信息和研究成果呈现给读者,供学习和探讨,共同推进饲料工业向更高的目标迈进。

## 饲用酶制剂作用的分子营养学机理与加酶 日粮ENIV系统的分子生物学基础

冯定远 谭会泽 王修启 左建军

酶制剂在饲料中添加的研究和应用是目前生物技术中在饲料工业中应用最受关注的领域,许多研究者也从不同方面讨论了饲料酶作用的机理(沈水宝,2002;于旭华,2004;黄燕华,2004;左建军,2005;谭会泽,2006)。从全球范围来看,大约65%的含有粘性谷物的家禽饲料中添加了饲料酶制剂(Sheppy,2004)。许多研究表明,饲用酶制剂,特别是非淀粉多糖酶能提高畜禽生产性能。进一步的研究发现,非淀粉多糖酶可以提高营养物质的消化率,例如,提高回肠氨基酸表观消化率,同时肠系膜静脉血清总氨基酸的含量显著上升。但是,非淀粉多糖酶在提高肠道可利用氨基酸的同时,是否能提高氨基酸转运蛋白的基因表达,这是饲用酶制剂发挥作用的分子生物学基础。Kaput等(2004)指出,日粮的化学组成可以直接或间接影响动物的基因表达。动物组织对于饲料成分以及营养水平变化的适应性反应在于其对这些营养物质转运的载体的类型和数量的变化(Humphrey等,2004)。

因此,开展添加饲用酶制剂对营养吸收转运载体的基因表达影响的研究,将开拓酶制剂研究的新领域——酶制剂的分子营养学。

另外,饲用酶制剂的应用,对传统的动物营养学说提出了挑战,如饲料配方、原料选择和营养需要量等方面需要重新研究或修正。为此,冯定远和沈水宝(2005)提出了饲用酶制剂的新理念,即“加酶日粮ENIV系统的建立和应用”。添加酶制剂时,饲料营养成分数据库在原有的营养成分的基础上,增加有效营养改进值,使酶制剂提高有效营养供应可以具体量化,可操作性更强。作为对一种理论与实践的新理念和思路的探讨,在酶制剂的分子营养学这一方面进行了一些初步的研究(王修启等,2004、2005;谭会泽,2006)。本文以饲用非淀粉多糖酶在小麦型日粮中的应用,重点讨论添加酶对氨基酸吸收转运载体mRNA表达的影响,并试图分析加酶日粮ENIV系统的分子生物学基础。

### 1 非淀粉多糖的抗营养作用及饲用非淀粉多糖酶的应用

许多植物性饲料原料,特别是非常规的谷物饲料原料中含有较高水平的非淀粉多糖(Non-starch Polysaccharides, NSP),从而限制了这些饲料原料在畜禽饲料中的应用(冯定远和吴新连,2001)。NSP主要是

冯定远,华南农业大学动物科学学院,教授,博导,510642,广州。

谭会泽、王修启、左建军,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-07

阿拉伯木聚糖,此外, $\beta$ -葡聚糖也是比较重要的NSP,在讨论NSP时,更多是集中在阿拉伯木聚糖上,尤其是小麦型日粮中的阿拉伯木聚糖。NSP的抗营养作用的表现为其溶于水后,能显著增加食糜的黏性,改变食糜的物理特性和肠道的生理活性(Annison, 1991),食糜黏性提高,减少了动物消化酶与饲料中各种营养物质的接触机会(White等, 1983);还造成已经消化了的养分向小肠壁的扩散速度减慢,降低了已被消化养分的吸收(Eward等, 1988; Ikegami等, 1990)。高亲水性的NSP能与肠粘膜表面的脂类微团和多糖蛋白复合物相互作用,导致粘膜表面水层厚度增加,从而降低了营养物质的吸收(Johnson和Gee, 1981);NSP可通过其网状结构吸收超过自身重量数倍的水分,改变其物理特性,可抵制肠道的蠕动,从而降低消化能力。NSP表层带负电荷的表面活性物质,可吸附 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 等离子以及有机质,造成这些物质的利用受阻。饲料中粘性多糖还能直接结合消化道中的多种消化酶,使消化酶不能与底物发生反应(Low, 1989)。肠道中营养物质消化率发生改变,会打破肠道微生物平衡(Vahjen等, 1998)。在动物生产中,NSP主要的抗营养作用就是降低了饲料的表观代谢能(AME),其次就是降低了动物对饲料中各种营养物质的消化率(如降低氨基酸消化率)。

消除饲料中NSP的抗营养作用,最为有效可行的办法是向饲料中添加外源性的非淀粉多糖酶。许多的试验证明,在以麦类为基础的饲料中添加木聚糖酶可提高动物的生产性能(Bedford等, 1992; Classen, 1996; Bedford等, 1996; 王修启, 2003; 于旭华, 2004)。木聚糖酶是以内切1,4- $\beta$ -D木聚糖酶为主,包括外切 $\beta$ -木糖苷酶等组成的复合酶系,能随机裂解木聚糖的骨架,降低了木聚糖的聚合度,从而降低了因木聚糖所导致的食糜高粘性。

Steenfeld等(1998a)的研究表明,小麦型饲料中添加木聚糖酶可以使鸡的日增重提高5%~6%,饲料转化率提高7%~8%,且在雏鸡阶段效果更为明显。王修启(2003)在AA肉鸡的小麦型饲料中添加木聚糖酶,提高了肉鸡日增重,降低了料重比,同时也发现前期添加效果更好。而在华南农业大学的研究中发现,在肉鸡小麦型饲料中添加不同来源的木聚糖酶,对于4~6周龄肉鸡的增重没有显著影响,但显著提高了7~9周龄肉鸡的饲料报酬,降低了采食量,大鸡阶段的添加效果要好于中鸡阶段(于旭华, 2004)。华南农业大学最近的另一研究显示,小麦型饲料中添加木聚糖酶使岭南黄肉鸡56日龄时的平均体重提高了4.4%

(69.8 g)( $P<0.05$ ),平均日增重提高了4.7%,料重比下降了3.2%( $P<0.05$ ),对采食量没有影响。在相同营养水平下,小麦型饲料中添加木聚糖酶,岭南黄肉鸡的生产性能与饲喂玉米型饲料组在采食量、日增重和料重比指标上无差异(谭会泽, 2006),结果更接近国外用快大型肉鸡作试验动物的结果。与于旭华的试验结果有差异的原因可能是试验所用的鸡种不同所致。

## 2 饲用非淀粉多糖酶对提高氨基酸利用率的效果

添加非淀粉多糖酶还可以提高动物对营养物质的利用率。Hew等(1998)的试验中,木聚糖酶可以使肉鸡小麦型饲料中各种氨基酸在粪中的平均消化率由70%提高到78%,使回肠末端氨基酸平均消化率由78%提高到85%。Steenfeld等(1998b)的试验表明,酶制剂使以小麦为基础日粮的鸡回肠蛋白质的表观消化率提高6%。华南农业大学的试验也发现,木聚糖酶可以提高黄羽肉鸡小麦型饲料粗蛋白的真消化率(于旭华, 2004)。王修启(2003)在AA肉鸡的不同小麦品种饲料中添加木聚糖酶,干物质的消化率提高了7.10%~7.67%;有机物的消化率提高了6.07%~7.23%。谭会泽(2006)在肉鸡上的试验表明,16日龄时,在小麦型饲料中添加木聚糖酶后,各种氨基酸的消化率在数值上均有不同程度的提高,16种氨基酸的总氨基酸回肠表观消化率提高了3.5%;30日龄时,在小麦型饲料中添加木聚糖酶后,各种氨基酸的消化率在数值上均有不同程度的提高,16种氨基酸的总氨基酸回肠表观消化率提高了3.0%。小麦型饲料中添加木聚糖酶后,其各种氨基酸的消化率与玉米型饲料无差异。

谭会泽(2006)的试验同时测定了肉鸡肠系膜静脉血清中各种氨基酸的含量。由于肠系膜静脉血是承载了从肠道吸收的营养物质后流经肝脏之前的血液,相对于回肠食糜氨基酸表观消化率,其血液中氨基酸含量能较准确反映氨基酸在肠道中的吸收情况,可能更直接、更灵敏。试验结果表明,在肉鸡16日龄时小麦型饲料中添加木聚糖酶对肠系膜静脉血清中多种氨基酸的含量都有提高的作用,与其对回肠氨基酸消化率的影响结果一致,其中组氨酸、赖氨酸以及17种氨基酸总量达到显著水平( $P<0.05$ );对于30日龄和44日龄肠系膜静脉血清中的氨基酸含量没有影响,这与回肠氨基酸消化率的测定结果不一致,可能是由于后期木聚糖酶的作用效果有所降低所致。

## 3 饲用非淀粉多糖酶对肠道氨基酸转运载体 mRNA 表达的影响

饲料中添加非淀粉多糖酶可以降低水溶性NSP所导致的食糜粘性,从而提高消化酶对底物的作用效

率,还可作用于非可溶性 NSP,破碎植物细胞壁,释放出营养物质。此外,非淀粉多糖酶可以消除由于食糜粘性的增加而造成的肠道粘膜表面水层厚度增加(Johnson 和 Gee, 1981)。木聚糖酶的作用结果表现为提高了小麦型饲料营养物质的消化率,即提高了肠道食糜中可被吸收的营养物质的量。高粘性的 NSP 可以使肠道粘膜细胞的分裂加速(Southon 等, 1985),而木聚糖酶在小麦型肉鸡饲料中添加,可减少肉鸡消化系统的代偿性增生,改善肠道绒毛形态(于旭华, 2004)。底物浓度的提高和消化道形态的改善有可能会影响到肠道上皮细胞营养物质转运蛋白的表达,因为在细胞的生长、发育和分化过程中,遗传信息的表达随着细胞内外环境条件的改变会加以调整,这就是适应性调控(adaptive regulation)。研究发现,木聚糖酶显著提高肉鸡第三周的生产性能,提高了 16 日龄岭南黄肉鸡小麦型饲料的回肠氨基酸表现消化率,且肠系膜静脉血清总氨基酸的含量显著提高,对碱性氨基酸,如赖氨酸、精氨酸和组氨酸的含量都有较大幅度的提高。但是,木聚糖酶在提高肉鸡肠道可利用氨基酸的同时,是否还能上调氨基酸转运蛋白的表达还没有证据证明。在细胞适应性调控的过程中,转录水平的调控是关键,因此 mRNA 的表达丰度决定了动物及细胞对内外环境条件改变的适应能力。特定 mRNA 是细胞在应答它所处的环境中合成的,细胞由此控制它所产生蛋白质的种类和数量。mRNA 的表达水平在一定程度上可以衡量其相关蛋白的表达量。

动物肠道上皮细胞是体内代谢最活跃的器官之一。上皮细胞的发育从未成熟的隐窝细胞(crypt cell)开始,经过内细胞分化,再不断长到隐窝绒毛的顶部,这个过程大概需要 2~4 d,最终通过细胞凋亡而脱落到肠腔中。肠道在逆性条件下,如肠腔粘膜损伤、营养不良等,内皮细胞可以通过复杂的调控过程来加速细胞生长,改变对营养物质的转运活性来适应(Ziegler, 1998)。这种适应表现在肠道吸收面积的增加、单个细胞转运能力的增强以及肠道粘膜细胞生长的变化。Southon 等(1985)报道,用含有 75 g/kg 非纤维素 NSP 加 24 g/kg 纤维素的日粮饲喂大鼠与饲喂只含有纤维素作为唯一 NSP 来源的半纯合日粮的大鼠相比,肠道粘膜细胞分裂加速。在细胞水平上,上皮细胞微绒毛的高度和密度增加,增大了吸收表面积;在分子水平上,刷状缘粘膜(brush-border membrane)上对营养物质转运蛋白的合成增加(Urube, 1997),使其转运能力增强。肠腔中营养物质的吸收主要依赖于上皮细胞刷状缘中不同的转运系统,这些转运系统由不同的转运

蛋白所组成,转运蛋白的活性受到激素、饲料以及神经内分泌的调控(Edward, 2002)。

对于饲料因素影响肠道氨基酸转运载体表达的研究还未见报道。但 Humphrey 等(2004)的试验得出,动物组织对于饲料成分以及营养水平变化的适应性反应主要表现在对于这些营养物质转运的载体的类型和数量的变化。通过体外培养人肠道上皮细胞试验得出:在营养缺乏的情况下,细胞对谷氨酰胺和亮氨酸的转运能力降低,降低了  $V_{max}$ ,但不影响  $K_m$  值,结果说明,营养缺乏降低了细胞膜上活性转运载体的数量,而转运载体对谷氨酰胺和亮氨酸的亲和力没有改变。体外培养肠道上皮细胞(Caco-2 细胞系)在营养缺乏的情况下(用磷酸盐缓冲液培养),细胞  $ATb^0$  mRNA 的表达显著降低(Wasa 等,2004)。

木聚糖酶可以消除木聚糖所造成的高粘性食糜,提高肉鸡对小麦型饲料氨基酸的消化率,对肠道发育也有一定的影响。于旭华(2004)研究表明,在小麦型饲料中添加木聚糖酶,使肉鸡小肠绒毛变短,而且绒毛顶端变细,木聚糖酶降低了小肠绒毛的代偿性增生。由此可以推测木聚糖酶可能影响肠道粘膜细胞氨基酸转运载体的表达量,从而增强粘膜细胞对氨基酸的吸收。由于细胞对于内外环境的变化可以作出适应性调节,表现为相关基因表达的改变,所以研究粘膜细胞上氨基酸转运蛋白基因表达的变化,可以直接研究其在粘膜上的表达量,也可以研究其 mRNA 的表达丰度,一般认为 mRNA 的表达丰度决定了动物及细胞对内外环境条件改变的适应能力。Dave 等(2004)研究发现,小鼠不同肠段  $b^0$ AT 和  $y^1$ LAT1 在 mRNA 水平和蛋白水平上的表达是一致的。

近几年来,关于细胞氨基酸转运载体的研究取得了显著的进展,根据转运载体的底物特异性和动力学特性,目前已经鉴别确定的氨基酸转运系统有 15 种以上,并且编码这些转运系统相关蛋白的部分 cDNA 已被克隆出来。2004 年鸡的基因组测序完成,相关氨基酸转运蛋白的 mRNA 序列被陆续公布,使得可以从基因水平来研究氨基酸转运载体的变化。粘膜细胞刷状缘上的氨基酸转运载体主要负责从肠腔中吸收各种氨基酸,而粘膜细胞基底膜上氨基酸转运载体则用来加速氨基酸在肠细胞和体内循环间的转移。如果肠腔中氨基酸的浓度低于上皮细胞或者相应毛细血管床中氨基酸的浓度,其吸收转运功能必须与其它的能量源(如离子浓度梯度、电势等)相偶联才能发挥(Devés, 1998)。目前,肠道粘膜细胞刷状缘顶端确定存在的转运系统有:  $Na^+$  依赖型中性氨基酸转运系统  $B^0$ (Munck

和 Munck, 1999; Munck 等, 2000)、Na<sup>+</sup>依赖型中性和碱性氨基酸转运系统 B<sup>0+</sup>(Munck, 1995)、Na<sup>+</sup>和 K<sup>+</sup>依赖型酸性氨基酸转运系统 XAG-(Munck 等, 2000)、H<sup>+</sup>驱动脯氨酸和甘氨酸转运系统 IMINO (PAT)(Chen 等, 2003)、Na<sup>+</sup>依赖型中性氨基酸转运系统 ASC(Munck 和 Munck, 1999; Munck 等, 2000; Avisar 等, 2001)、非 Na<sup>+</sup>依赖型中性和碱性氨基酸转运系统 b<sup>0+</sup>(Palacin, 1998; Munck 等, 2000; Torras-Llort 等, 2001)。肠道粘膜细胞基底膜部位确定存在的转运系统有: Na<sup>+</sup>依赖型中性氨基酸转运系统 A 和 N (Wilde 和 Kilberg, 1991)、Na<sup>+</sup>依赖型碱性氨基酸转运系统 y<sup>+</sup>L(Desjeux 等, 1980)、非 Na<sup>+</sup>依赖型中性氨基酸转运系统 asc 和 L (Lash 和 Jones, 1984; Wilde 和 Kilberg, 1991)。

肠道氨基酸转运系统数量多,其转运底物(20种氨基酸)相互重叠。肠道碱性氨基酸的吸收机制如下(Kanai 等, 2000; Danniell, 2002; Verrey 等, 2004): 在肠道粘膜细胞的顶端, 转运系统 b<sup>0+</sup>发挥反向交换转运的功能, 向细胞内转入碱性氨基酸和胱氨酸, 同时交换出中性氨基酸。由于通常细胞内电势较低, 以及在膜内外转运蛋白对底物结合力的不同, 促使碱性氨基酸(带正电荷)向细胞内聚集。转运出的中性氨基酸通过粘膜细胞顶端的 Na<sup>+</sup>氨基酸共转运系统(尤其是系统 b<sup>0+</sup>) 在 Na<sup>+</sup>驱动力作用下逆浓度梯度重吸收进细胞, 中性氨基酸的浓度梯度进一步驱动系统 b<sup>0+</sup>反向转运功能。在上皮细胞的基底部位, 系统 y<sup>+</sup>L 在 Na<sup>+</sup>离子浓度梯度的驱动下, 向细胞内转入中性氨基酸, 同时转出碱性氨基酸进入血液循环。粘膜细胞中的中性氨基酸可通过系统 L 的转运蛋白 LAT1、LAT2 以及其它转运系统完成与血液间的交换。与系统 b<sup>0+</sup>和 y<sup>+</sup>L 不同, 广泛存在的 y<sup>+</sup>系统为反向加速的转运机制, 主要功能是逆碱性氨基酸浓度梯度向细胞内聚集碱性氨基酸(Stein, 1990)。

王修启(2003)的研究表明, 在 AA 肉鸡小麦型饲料中添加木聚糖酶, 可以上调位于刷状缘的钠/葡萄糖共转运载体 1 (SGLT1) mRNA 在十二指肠的表达丰度, 并推测木聚糖酶可能通过影响内分泌的变化来增加小肠上段 SGLT1 的数量。我们推测木聚糖酶对于肠道氨基酸转运载体也有类似的影响。在肠道上皮细胞的碱性氨基酸转运系统中, 系统 b<sup>0+</sup>和系统 y<sup>+</sup>L 分别分布于上皮细胞的刷状缘和基底部位, 负责碱性氨基酸的吸收和转出。系统 y<sup>+</sup>主要功能可能是维持细胞内碱性氨基酸正常代谢的水平, 在肠道碱性氨基酸吸收中不发挥主要的功能。

因为木聚糖酶通过消除木聚糖的粘性, 可以提高

肠道中可被利用氨基酸的浓度, 同时改善肠道绒毛的形态(于旭华, 2004), 但是否还会影响氨基酸转运载体的表达还没有报道。华南农业大学最近研究了日粮中添加木聚糖酶对肉鸡肠道中氨基酸转运载体 mRNA 表达的影响, 根据生产性能、回肠氨基酸消化率和肠系膜静脉血清氨基酸含量, 发现木聚糖酶显著提高了肉鸡第三周的平均日增重(P<0.05), 显著降低了料重比(P<0.05), 同时, 对 16 日龄肉鸡回肠食糜氨基酸表观消化率有提高的趋势, 显著提高了 16 日龄肉鸡肠系膜静脉血清氨基酸的浓度(P<0.05), 对血清碱性氨基酸均有大幅度提高, 因此选取 16 日龄的试验肉鸡采集空肠和回肠组织样, 研究对照组和加酶日粮组碱性氨基酸转运载体 mRNA 表达的差异。研究发现, 小麦型饲料添加木聚糖酶, 可显著提高岭南黄肉鸡空肠 rBAT 和 CAT4 mRNA 的表达丰度, 对空肠 y<sup>+</sup>LAT2 mRNA 和 CAT1 mRNA 的表达也有提高的趋势。对回肠 rBAT mRNA 的表达没有影响, 对回肠 y<sup>+</sup>LAT2、CAT1 和 CAT4 mRNA 的表达有提高的趋势。结果还表明, 在岭南黄肉鸡小麦型饲料中添加木聚糖酶可以上调空肠中部分碱性氨基酸转运载体 mRNA 的表达丰度, 从而提高肠粘膜细胞对氨基酸的吸收转运能力。木聚糖酶显著提高了空肠刷状缘上 b<sup>0+</sup>系统 rBAT mRNA 的表达丰度, 而对于基底部位的 y<sup>+</sup>LAT2 mRNA 的表达没有影响, 说明木聚糖酶对肠腔面生理形态的影响较大(谭会泽, 2006)。

王修启(2003)在研究木聚糖对肉鸡肠道葡萄糖转运载体 mRNA 表达时也发现, 木聚糖酶只上调了位于刷状缘的载体 SGLT1 mRNA 的表达, 而对于基底膜上的 GLUT2 mRNA 的表达没有显著影响。木聚糖酶对于空肠系统 y<sup>+</sup>的 CAT4 mRNA 的表达也显著提高, 可能原因是 CAT4 主要分布在粘膜细胞的刷状缘, 但还没有直接的证据加以证明。木聚糖酶对于小肠远端碱性氨基酸转运系统相关基因表达的影响没有近端显著, 对于回肠 rBAT mRNA 的表达没有影响, 对于回肠 y<sup>+</sup>LAT2、CAT1 和 CAT4 mRNA 的表达有提高的趋势。谭会泽(2006)的研究表明, 木聚糖酶可以上调饲喂小麦型饲料岭南黄肉鸡空肠氨基酸转运载体 rBAT 和 CAT4 mRNA 的表达, 是对木聚糖酶提高氨基酸利用率机理的进一步认识, 但是上调相关基因表达的机理(信号传导通路)还不清楚。

添加木聚糖酶对肠道中氨基酸转运载体 mRNA 表达的影响, 可能是由于细胞本身可以根据内外环境的变化作出适应性的改变, 表现在对于营养物质转运的载体的类型和数量的变化(Humphrey 等, 2004)。王

修启(2003)的研究表明,在AA肉鸡小麦型饲料中添加木聚糖酶,可以上调位于肠道刷状缘的钠/葡萄糖共转运载体1(SGLT1)mRNA在十二指肠的表达丰度,并推测木聚糖酶可能通过影响内分泌的变化来增加小肠上段SGLT1的数量。谭会泽(2006)推测木聚糖酶对于肠道氨基酸转运载体也有类似的影响。

#### 4 加酶日粮 ENIV 系统的分子生物学基础

在常规情况下,任何饲料都不会被完全消化,单胃动物对饲料原料的消化率为75%~85%。在动物饲料中添加酶制剂以提高消化率可以看作是动物消化过程的延伸。麦类是应用酶制剂,特别是非淀粉多糖酶最多的饲料原料,许多研究得出一个所谓“黄金定律”即“大麦+ $\beta$ -葡聚糖酶=小麦”的理论。对小麦的理论假设是:“小麦+阿拉伯木聚糖酶=玉米”。我们在总结不同研究者结果的基础上,提出小麦在添加阿拉伯木聚糖酶时,蛋白质利用的改善程度为9.5%~18%,即蛋白质ENIV值为1.3%~2.5%;鸡代谢能ENIV值为4.0%~6.3%,即代谢能ENIV值为501.6~794.2 kJ/kg(冯定远和沈水宝,2005)。这一估计是否有其分子生物学基础还需进一步证实,因为这一估计是基于营养的消化率,但是,营养的消化不等于营养的吸收和利用,只有吸收才能真正有效。

最近的试验研究中发现,在小麦型饲料中添加木聚糖酶,可显著提高岭南黄肉鸡空肠rBAT和CAT4 mRNA的表达丰度,对空肠y<sup>+</sup>LAT2 mRNA和CAT1 mRNA的表达也有提高的趋势。对回肠y<sup>+</sup>LAT2、CAT1和CAT4 mRNA的表达有提高的趋势。在岭南黄肉鸡小麦型饲料中添加木聚糖酶可以上调空肠中部分碱性氨基酸转运载体 mRNA 的表达丰度,从而提高肠粘膜细胞对氨基酸的吸收转运能力。其中添加木聚糖酶对岭南黄肉鸡空肠和回肠y<sup>+</sup>LAT2 mRNA 表达的影响为加酶组空肠y<sup>+</sup>LAT2 mRNA 的表达丰度比对照组提高了20.77%;加酶组回肠y<sup>+</sup>LAT2 mRNA 的表达丰度比对照组提高了17.6%。添加木聚糖酶对岭南黄肉鸡空肠和十二指肠CAT1 mRNA 表达的影响加酶组空肠CAT1 mRNA 的表达丰度高于对照组12.58%;加酶组回肠CAT1 mRNA 的表达丰度高于对照组17.56%。添加木聚糖酶对岭南黄肉鸡空肠和回肠CAT4 mRNA 表达的影响,添加木聚糖酶组相对于对照组,显著提高了空肠CAT4 mRNA 的表达丰度;回肠CAT4 mRNA 的表达提高了13.35%。在所研究的几种重要氨基酸吸收转运载体 mRNA 的表达中,表达丰度均提高了12.58%~20.77%(谭会泽,2006)。这与我们原来估计的小麦蛋白质利用的改善程度9.5%~18%的范围比较

接近(冯定远和沈水宝,2005)。当然,氨基酸吸收转运载体 mRNA 表达丰度的提高与蛋白质利用的改善程度并不完全是同一概念,但至少说明了添加木聚糖酶提高蛋白质利用是有其分子生物学基础的。应该指出,有关这方面的研究还有很多工作要做,这里的讨论只是提供了一种思路。

#### 参考文献

- 于旭华. 真菌性和细菌性木聚糖酶对肉鸡生长性能的影响及机理研究[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2004
- 王修启. 小麦中的抗营养因子及木聚糖酶提高小麦日粮利用效率的作用机理研究[D]. 南京: 南京农业大学博士论文, 2003
- 王修启, 赵茹茜, 张兆敏, 等. 日粮添加木聚糖酶影响肉鸡十二指肠及空肠SS mRNA 表达的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(3):353-356
- 王修启, 赵茹茜, 张兆敏, 等. 日粮添加木聚糖酶影响肉鸡小肠葡萄糖吸收及其转运载体基因表达. 农业生物技术学报, 2005, 13(4):497-502
- 冯定远, 吴新连. 非淀粉多糖的抗营养作用及非淀粉多糖酶的应用[M]. 生物技术在饲料工业中的应用, 广州: 广东科技出版社, 2001:26-32
- 冯定远, 沈水宝. 饲料酶制剂理论与实践的新理念——加酶日粮ENIV系统的建立和应用[M]. 酶制剂在饲料工业中的应用, 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005:1-13
- 左建军. 非常规植物饲料钙和磷真消化率及预测模型研究[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2005
- 沈水宝. 外源酶对仔猪消化系统发育及内源酶活性的影响[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2002
- 黄燕华. 不同来源纤维素酶的酶学特性及其在马冈鹅中的应用[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2004
- 谭会泽. 肉鸡肠道碱性氨基酸转运载体 mRNA 表达的发育性变化及营养调控[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2006
- Annison G. Relationship between the levels of soluble non starch polysaccharides and the apparent metabolizable energy of wheats assayed in broiler chickens [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1991, 39:1 252-1 256
- Avisar N E, Ziegler T R, Wang H T, et al. Growth factors regulation of rabbit sodium-dependent neutral amino acid transporter ATB0 and oligopeptide transporter 1 mRNAs expression after enterotomy [J]. JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition, 2001, 25:65-72
- Bedford M R, Classen H L. Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks[J]. Journal of Nutrition, 1992, 122:560-569
- Bedford M R, Morgan A J. The use of enzyme in poultry diets[J]. World's Poultry Science Journal, 1996, 52:61-68
- Chen Z, Fei Y J, Anderson C M, et al. Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2 [J]. Journal of Physiology, 2003, 46:349-361
- Classen H L. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets[J]. Animal Feed Science Technology, 1996, 62:21-27
- Daniel H. Molecular physiology of plasma membrane transporters for organic nutrients. In: Janos Zemleni, Hannelore Daniel (eds) [J]. Molecular Nutrition. Cambridge: CABI publishing, 2002:21-43
- Daniel H. Perspective in post-genomic nutrition reaserach. In: Janos Zemleni, Hannelore Daniel (eds) [J]. Molecular Nutrition. Cambridge, MA: CABI publishing, 2002:13-21

- 19 Dave M H, Schulz N, Zecevic M, et al. Expression of heteromeric amino acid transporters along the murine intestine [J]. *Journal of Physiology*, 2004, 558:597-610
- 20 Desjeux J F, Simell R O, Dumontier A M, et al. Lysine fluxes across the jejunal epithelium in lysinuric protein intolerance [J]. *The Journal of clinical investigation*, 1980, 65:1 382-1 387
- 21 Devés R, Boyd C A R. Transporters for Cationic Amino Acids in Animal Cells: Discovery, Structure, and Function [J]. *Physiological Review*, 1998, 78:487-539
- 22 Edward C, Ray M D, Nelly E, et al. Growth factor regulation of enterocyte nutrient transport during intestinal adaptation [J]. *The American Journal of Surgery*, 2002, 183:361-371
- 23 Edwards C A, Johnson I T, Read N W. Do viscous polysaccharides slow absorption by inhibiting diffusion or convection?[J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1988, 42:306-312
- 24 Hew L I, Ravindran V, Mollah Y, et al. Influence of exogenous xylanase supplementation on apparent metabolisable energy and amino acid digestibility in wheat for broiler chickens [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1998, 75:83-92
- 25 Humphrey B D, Stephensen C B, Calvert C C, et al. Glucose and cationic amino acid transporter expression in growing chickens (*Gallus gallus domesticus*) [J]. *Comparative biochemistry and physiology, Part A, Molecular & integrative physiology*, 2004, 138:515-525
- 26 Ikegami S, Tsuchihashi F, Harada H, et al. Effect of viscous indigestible polysaccharides on pancreatic-biliary secretion and digestive organs in rats[J]. *Journal of Nutrition*, 1990, 120:353-360
- 27 Johnson I T, Gee M. Effect of gel-forming gums on the intestinal unstirred layer and sugar transport in vitro[J]. *Gut*, 1981, 22:398-403
- 28 Kanai Y, Segawa H, Chairoungdua A, et al. Amino acid transporters: molecular structure and physiological roles [J]. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association -European Renal Association*, 2000, 15(6):9-10
- 29 Kaput J, Rodriguez R L. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era[J]. *Physiological Genomics*, 2004, 16:166-177
- 30 Lash L H, Jones D P. Characteristics of cysteine uptake in intestinal basolateral membrane vesicles [J]. *The American journal of physiology*, 1984, 247:G394-401
- 31 Low A G. Secretory response of the pig gut to non-starch polysaccharides[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1989, 23:55-65
- 32 Munck B G, Munck L K. Effects of pH changes on systems ASC and B in rabbit ileum [J]. *The American journal of physiology*, 1999, 276:G173-184
- 33 Munck L K, Grondahl M L, Thorboll J E, et al. Transport of neutral, cationic and anionic amino acids by systems B, b(0,+), X(AG), and ASC in swine small intestine[J]. *Comparative biochemistry and physiology, Part A, Molecular & integrative physiology*, 2000, 126:527-537
- 34 Munck L K. Chloride-dependent amino acid transport in the small intestine: occurrence and significance [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 1995, 1 241:195-213
- 35 Palacin M, Estevez R, Bertran J, et al. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters [J]. *Physiology Review*, 1998, 78:969-1 054
- 36 Sheppy C. 饲用酶制剂市场发展现状与趋势 [M]. 酶制剂在动物营养中的应用 (Bedford M.R. 和 Partridge G.G. 主编; 中国饲料工业协会信息中心译, 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.1-6
- 37 Southon S, Livesey G, Gee J M, et al. Differences in intestinal protein synthesis and cellular proliferation in well-nourished rats consuming conventional laboratory diets[J]. *British Journal of Nutrition*, 1985, 53: 87-95
- 38 Steinfeld S, Mullertz A, Jensen J F. Enzyme supplementation of wheat-based diets for broiler. I Effect on growth performance and intestinal viscosity [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1998a, 75:27-43
- 39 Steinfeld S, Hammershj M, Mullertz A, et al. Enzyme supplementation of wheat-based diets for broiler. II Effect on apparent metabolisable energy content and nutrient digestibility [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1998b, 75:45-64
- 40 Stein W D. Channels, Carriers, and Pumps: An Introduction to Membrane Transport[J]. San Diego, CA: Academic Press, 1990
- 41 Torras-Llort M, Torrents D, Soriano-Garcia J F, et al. Sequential amino acid exchange across b (0,+)-like system in chicken brush border jejunum [J]. *The Journal of membrane biology*, 2001, 180: 213-220
- 42 Uribe J M, Barrett K E. Nonmitogenic actions of growth factors-an integrated view of their role in intestinal physiology and pathophysiology[J]. *Gastroenterology*, 1997, 13:255-268
- 43 Vahjen W, Glaser K, Schafer K, et al. Influence of xylanase-supplemented feed on the development of selected bacterial groups in the intestinal tract of broiler chicks[J]. *Journal of Agricultural Science*, 1998, 130:489-500
- 44 Verrey F, Closs E I, Wagner C A, et al. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters [J]. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 2004, 447:532-542
- 45 Wasa M, Wang H S, Shimizu Y, et al. Amino acid transport is down-regulated in ischemic human intestinal epithelial cells[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2004, 1 670:49-55
- 46 White W B, Bird H R, Sunde M L. Viscosity of  $\beta$ -glucan as a factor in the enzymatic improvement of barley for chicks [J]. *Poultry Science*, 1983, 62:853-862
- 47 Wilde S W, Kilberg M S. Glutamine transport by basolateral plasma-membrane vesicles prepared from rabbit intestine [J]. *The Biochemical journal*, 1991, 277 (3):687-691
- 48 Ziegler T R, Mantell M P, Chow J C, et al. Intestinal adaptation after extensive small bowel resection differential changes in growth and insulin-like growth factor system messenger ribonucleic acids in jejunum and ileum[J]. *Endocrinology*, 1998, 139:3 119-3 126

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

## . 作者简介 .

冯定远, 华南农业大学动物科技学院院长, 华南农业大学动物生产研究所所长, 动物营养与饲料科学系教授、博士生导师, 广东省“千百十工程”省级学术带头人, 中国饲料经济专业委员会副理事长, 中国动物营养学会常务理事, 中国动物营养学会饲料安全与饲料生物技术专业委员会主任, 中国饲料工业协会理事, 农业部全国饲料评审委员会委员, 广东省饲料工业协会副会长, 广州市饲料工业协会副会长。近5年来, 共主持科研项目23项, 其中国家重大基础性研究子项目(973)1项、国家“十五”攻关专题2项、国家自然科学基金课题2项、广东省自然科学基金重点课题1项、广东省自然科学基金课题1项、广东省攻关项目6项、广东省教育厅自然科学基金课题1项、广东省“千百十工程”人才基金课题1项、广东省省长基金课题1项等。共有4项成果获奖, 其中广东省科技进步二等奖1项、广东省科技进步三等奖2项。发表论文共78篇; 出版专著、教材共13本, 如《配合饲料学》、《饲料安全管理与应用研究》、《生物技术饲料工业中的应用》和《饲料卫生学》等; 先后培养博士研究生15人、硕士研究生38人。



# 响应面分析法优化酸性蛋白酶固态发酵培养基的研究

刘建峰 葛向阳 梁运祥

**摘要** 用响应面分析法(采用中心组合一致精度的设计)对影响土曲霉产酸性蛋白酶固态发酵培养基的4个主要影响因素(麸皮与豆粕比例、硫酸铵、硝酸钠、磷酸二氢钾)进行了优化,考察了各因素及其交互作用对酸性蛋白酶酶活的影响。用SAS9.1.3软件模拟二次多项式回归预测模型并建立了影响因素与响应值(酸性蛋白酶酶活)之间的函数关系,即回归方程,找到了各因素的最佳水平,即麸皮与豆粕比例为1:0.20、硫酸铵为1.9%、硝酸钠为0.97%、磷酸二氢钾为3.3%,此时酸性蛋白酶酶活为9 326 U/g。通过验证试验,5次重复试验的平均值为9 327 U/g,与模型预测值基本一致。

**关键词** 土曲霉;酸性蛋白酶;响应面分析;培养基优化

**中图分类号** Q815

Study on culture medium optimization of solid fermentation producing acidic proteinase by response surface analysis

Liu Jianfeng, Ge Xiangyang, Liang Yunxiang

**Abstract** Response surface analysis(central composite design of uniform precision) was applied to optimize the significant four factors[the ratio of bran and soybean meal,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_3$ ] for culture medium of *Aspergillus terreus* by researching the contributiveness of factors and their interactions to the enzyme activity of acidic proteinase. The functional connection of the factors and response, that is the equation of polynomial regression was established by using SAS 9.1.3 to simulate the predictive model. Through the equation of polynomial regression, the value of optimization was obtained, namely the ratio of bran and soybean meal is 1 : 0.20; the quantity of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  is 1.9%; the quantity of  $\text{NaNO}_3$  is 0.97%; the quantity of  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  is 3.3%. Under the optimization, the enzyme activity of acidic proteinase is 9 326 U/g. Through validating test, the average value of five tests is 9 327 U/g. It is identical to the value of predictive model.

**Key words** aspergillus terreus;acidic proteinase;response surface analysis;culture medium optimization

酸性蛋白酶是一类在微酸性环境下可分解动物或植物蛋白质为小肽和氨基酸的水解酶类,在饲料工业中广泛应用,它可以补充动物体内同源酶的不足,促进动物的消化吸收和生长发育,增强抗病能力,提高饲料的利用率,降低饲料成本。

本试验以实验室保藏的土曲霉为发酵菌种,对其进行培养基的优化,通过单因素试验发现,麸皮与豆粕的比例( $X_1$ )、硫酸铵( $X_2$ )、硝酸钠( $X_3$ )和磷酸二氢钾( $X_4$ )的添加量对其酸性蛋白酶的酶活影响比较大。因此以  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  和  $X_4$  4 因素为自变量,以酸性蛋白酶酶活为响应值,采用响应面分析法,对培养基进行优

化,以期获得最佳的培养基配比。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

土曲霉(*Aspergillus terreus*)FT04-01 由华中农业大学发酵工程室筛选。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分析方法

酸性蛋白酶酶活力的测定采用 SB/T 10317—1999 蛋白酶活力测定法。

#### 1.2.2 土曲霉固体发酵产酸性蛋白酶的方法

称取适量麸皮和豆粕,加入已经用水溶解的适量的硫酸铵、硝酸钠和磷酸二氢钾,最后加入适量的水,混合均匀,装入罐头瓶中(约 2 cm 厚),用报纸封口,灭菌(121 ℃、30 min),冷却,接种,28 ℃培养 3 d,晒干,待测。

#### 1.2.3 响应面分析设计

采用 SAS9.1.3 软件中的中心组合设计来模拟反

刘建峰,华中农业大学农业微生物国家重点实验室发酵工程室,430070,武汉。

葛向阳(通讯作者)、梁运祥,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-23



应面模型,在中心组合设计中又分为正交的和一致精度的设计,一致精度设计比正交设计更能避免回归系数的偏差,另外,在一致精度设计中,反应变量的预测值在原点处的方差等于它在与原点为1个单位的距离处的方差。因此采用中心组合的一致精度设计,以麸皮与豆粕的比例、硫酸铵、硝酸钠和磷酸二氢钾为自变量,以酸性蛋白酶酶活为响应值,设计4因素5水平试验,共31个试验点( $\alpha$ 取值为2),7个中心点重复试验,各个因素和水平见表1,试验设计及结果见表2。

表1 因素水平表

因素	名称	水平				
		-2	-1	0	+1	+2
X <sub>1</sub>	麸皮:豆粕(1:N)	0	0.1	0.2	0.3	0.4
X <sub>2</sub>	硫酸铵(%)	0	1	2	3	4
X <sub>3</sub>	硝酸钠(%)	0	0.5	1.0	1.5	2.0
X <sub>4</sub>	磷酸二氢钾(%)	1	2	3	4	5

## 2 结果与讨论

### 2.1 方差分析

响应面试验结果的全模型方差分析见表3,精简模型方差分析见表4。

表2 响应面试验设计及结果

试验组	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	酶活(Y <sub>i</sub> )(U/g)	试验组	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	酶活(Y <sub>i</sub> )(U/g)
1	-1	-1	-1	-1	5 043	17	-2	0	0	0	5 636
2	-1	-1	-1	1	6 325	18	2	0	0	0	5 060
3	-1	-1	1	-1	4 882	19	0	-2	0	0	6 453
4	-1	-1	1	1	5 861	20	0	2	0	0	5 462
5	-1	1	-1	-1	4 858	21	0	0	-2	0	5 811
6	-1	1	-1	1	6 228	22	0	0	2	0	6 093
7	-1	1	1	-1	5 384	23	0	0	0	-2	5 335
8	-1	1	1	1	6 386	24	0	0	0	2	7 207
9	1	-1	-1	-1	6 357	25	0	0	0	0	9 354
10	1	-1	-1	1	7 102	26	0	0	0	0	9 206
11	1	-1	1	-1	5 194	27	0	0	0	0	9 154
12	1	-1	1	1	5 837	28	0	0	0	0	9 594
13	1	1	-1	-1	4 204	29	0	0	0	0	9 271
14	1	1	-1	1	5 335	30	0	0	0	0	8 638
15	1	1	1	-1	4 763	31	0	0	0	0	9 410
16	1	1	1	1	5 282						

表3 全模型方差分析

方差来源	全模型				
	自由度	平方和	均方	F值	Pr > F
X <sub>1</sub>	1	174 251	174 251	1.853 906	0.192 196
X <sub>2</sub>	1	1 572 352	1 572 352	16.728 69	0.000 854
X <sub>3</sub>	1	70 308.38	70 308.38	0.748 031	0.399 882
X <sub>4</sub>	1	5 429 259	5 429 259	57.763 41	0.000 1
X <sub>1</sub> ×X <sub>1</sub>	1	2 9981 936	29 981 936	318.986 2	0.000 1
X <sub>1</sub> ×X <sub>2</sub>	1	1 995 863	1 995 863	21.234 54	0.000 291
X <sub>1</sub> ×X <sub>3</sub>	1	245 272.6	245 272.6	2.609 524	0.125 768
X <sub>1</sub> ×X <sub>4</sub>	1	159 001.6	159 001.6	1.691 662	0.211 804
X <sub>2</sub> ×X <sub>2</sub>	1	21 722 601	21 722 601	231.112 8	0.000 1
X <sub>2</sub> ×X <sub>3</sub>	1	1 125 191	1 125 191	11.971 22	0.003 225
X <sub>2</sub> ×X <sub>4</sub>	1	8 695.563	8 695.563	0.092 515	0.764 925
X <sub>3</sub> ×X <sub>3</sub>	1	21 791 195	21 791 195	231.842 6	0.000 1
X <sub>3</sub> ×X <sub>4</sub>	1	119 889.1	119 889.1	1.275 533	0.275 38
X <sub>4</sub> ×X <sub>4</sub>	1	17 991 518	17 991 518	191.416 8	0.000 1
Model(模型)	14	80 541 757	5 752 983	61.207 59	0.000 1
一次项	4	7 246 171	1 811 543	19.273 51	0.000 1
平方项	4	69 641 674	17 410 419	185.234 3	0.000 1
交叉乘积项	6	3 653 912	608 985.3	6.479 165	0.001 292
误差	16	1 503 861	93 991.32		
失拟项	10	965 133.4	96 513.34	1.074 903	0.486 573
纯误差	6	538 727.7	89 787.95		
所有项	30	82 045 618			

表 4 精简模型方差分析

方差来源	精简模型				
	自由度	平方和	均方	F 值	Pr > F
X <sub>1</sub>	1	174 251	174 251	1.711 095	0.205 679
X <sub>2</sub>	1	1 572 352	1 572 352	15.440 04	0.000 83
X <sub>3</sub>	1	70 308.38	70 308.38	0.690 408	0.415 835
X <sub>4</sub>	1	5 429 259	5 429 259	53.313 76	0.000 1
X <sub>1</sub> ×X <sub>1</sub>	1	29 981 936	29 981 936	294.413 9	0.000 1
X <sub>1</sub> ×X <sub>2</sub>	1	1 995 863	1 995 863	19.598 79	0.000 259
X <sub>2</sub> ×X <sub>2</sub>	1	21 722 601	21 722 601	213.309 7	0.000 1
X <sub>2</sub> ×X <sub>3</sub>	1	1 125 191	1 125 191	11.049 05	0.003 385
X <sub>3</sub> ×X <sub>3</sub>	1	21 791 195	21 791 195	213.983 2	0.000 1
X <sub>4</sub> ×X <sub>4</sub>	1	17 991 518	17 991 518	176.671 5	0.000 1
Model(模型)	10	80 008 898	8 000 890	78.566 42	0.000 1
误差	20	2 036 720	101 836		
失拟项	14	1 497 992	106 999.4	1.191 69	0.439 93
纯误差	6	538 727.7	89 787.95		
所有项	30	82 045 618			

由表 3 全模型的方差分析可知, X<sub>2</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>1</sub>×X<sub>1</sub>、X<sub>1</sub>×X<sub>2</sub>、X<sub>2</sub>×X<sub>2</sub>、X<sub>2</sub>×X<sub>3</sub>、X<sub>3</sub>×X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>×X<sub>4</sub> 对响应值的影响显著, 失拟项的 P=0.486 573, 没有显著性意义, 说明模型中不需要引入更高次数的项, 模型适当。

为了得到更精简的模型, 对全模型方差分析中影响不显著的项进行剔除, 然后再进行方差分析, 但是 X<sub>1</sub> 和 X<sub>3</sub> 的一次项不显著, 而交互作用项或二次项显著, 因此不能剔除 X<sub>1</sub> 和 X<sub>3</sub>, 否则模型将失拟。从表 4 精简模型的方差分析中可以看出, 失拟项的 P=0.439 93, 没有显著性意义, 说明精简模型是合适的。

2.2 模型的可信度分析(见表 5)

表 5 模型的可信度分析

项目	全模型	精简模型
均值	6 475	6 475
复相关系数的平方	98.17%	97.52%
校正复相关系数的平方	96.56%	96.28%
模型误差的平方根	306.58	319.117 5
变异系数	4.734 827	4.928 456

从表 5 模型的可信度分析中可以看出, 精简模型的校正复相关系数的平方 R<sup>2</sup>= 96.28%, 说明精简模型能解释响应值变化的 96.28%, 模型拟合程度很好。

2.3 建立二次响应面回归模型

通过对精简模型的分析可得出回归方程如下: 回归方程为: Y<sub>1</sub>=-9 968.58+47 169.7X<sub>1</sub>+3 406.345 X<sub>2</sub>+5 814.607 X<sub>3</sub>+5 234.83 X<sub>4</sub>-102 395.1 X<sub>1</sub>×X<sub>1</sub>-3 531.875 X<sub>1</sub>×X<sub>2</sub>-871.575 9 X<sub>2</sub>×X<sub>2</sub>+530.375 X<sub>2</sub>×X<sub>3</sub>-3 491.804 X<sub>3</sub>×X<sub>3</sub>-793.200 9 X<sub>4</sub>×X<sub>4</sub>。

2.4 精简模型的典型分析

2.4.1 模型的稳定点分析

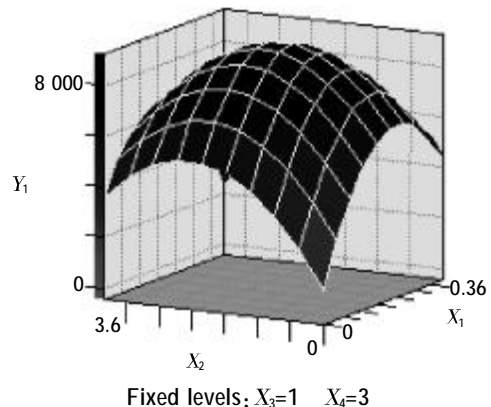
从稳定点分析可知, 反应曲面模型的稳定点类型是最大值, 在稳定点处的预测值为 9 326.295, 预测值的标准误差为 114.637。从图 1 响应面分析的立体图可知, 响应值有最大值, 即 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub> 存在极值点, 且极值落在试验区域之内。

2.4.2 各因素的最佳水平分析(见表 6)

表 6 各因素的最佳水平分析

因素	编码值	非编码值
X <sub>1</sub>	-0.026 90	0.197 31
X <sub>2</sub>	-0.147 45	1.852 55
X <sub>3</sub>	-0.066 51	0.966 74
X <sub>4</sub>	0.302 97	3.302 97

从表 6 各因素的最佳水平分析可知, 通过中心组合一致精度设计的响应面法优化, 获得了响应值最大的各因素的最佳水平, 即 X<sub>1</sub> 为 1 : 0.20、X<sub>2</sub> 为 1.9%、X<sub>3</sub> 为 0.97%、X<sub>4</sub> 为 3.3%, 此时响应值为最大, 即为 9 326。



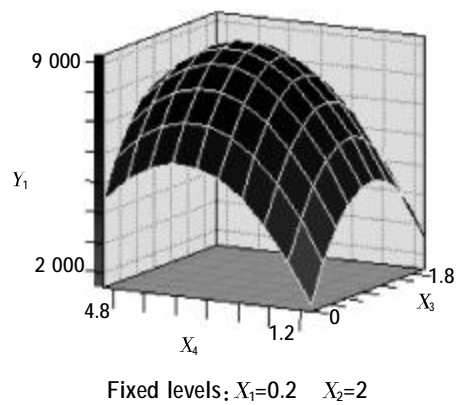
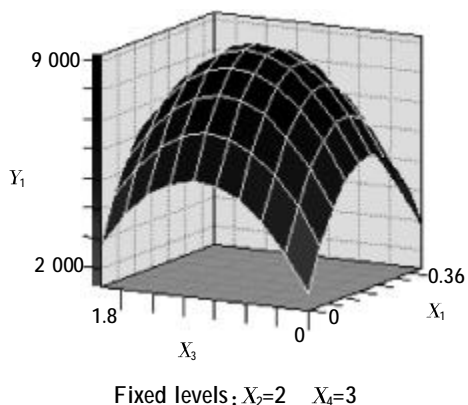
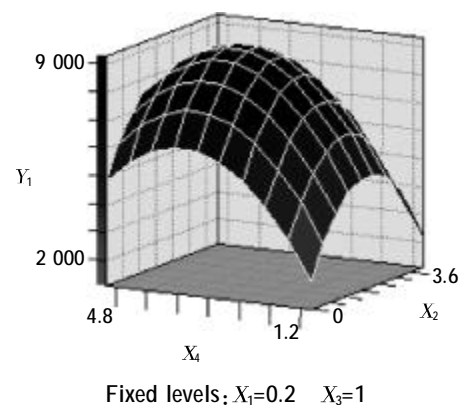
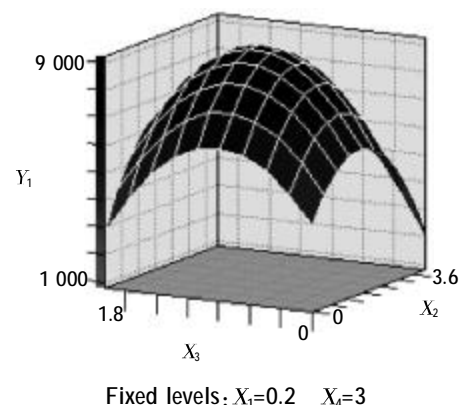
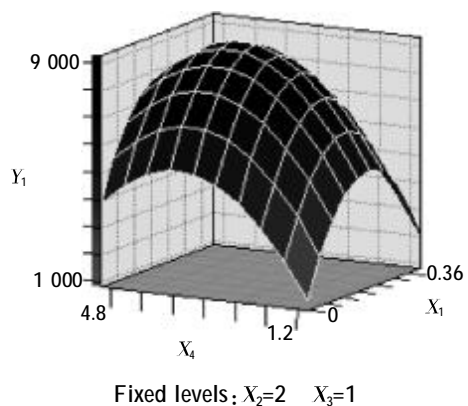


图1 响应面分析的立体图



为了检验模型预测的准确性如何,用上面优化的培养基( $X_1$ 为1:0.20、 $X_2$ 为1.9%、 $X_3$ 为0.97%、 $X_4$ 为3.3%)进行产酸性蛋白酶的发酵试验,5个重复,所测的酸性蛋白酶的酶活分别是9 162、9 231、9 626、9 035和9 582 U/g,5个重复的平均值为9 327 U/g。实际试验值与模型预测值基本一致,可见该模型能较好地预测实际发酵产酸性蛋白酶的情况。

### 3 结论

3.1 通过响应面分析方法中的中心组合精度一致的分析方法,对土曲霉产酸性蛋白酶的固态发酵培养基进行优化,设计了4因素5水平的31次试验,求得其回归方程为: $Y_1 = -9\ 968.58 + 47\ 169.7 X_1 + 3\ 406.345 X_2 + 5\ 814.607 X_3 + 5\ 234.83 X_4 - 102\ 395.1 X_1 \times X_1 - 3\ 531.875 X_1 \times X_2 - 871.575\ 9 X_2 \times X_2 + 530.375 X_2 \times X_3 - 3\ 491.804 X_3 \times X_3 - 793.200\ 9 X_4 \times X_4$ 。其最佳点是 $X_1$ 为1:0.20、 $X_2$ 为1.9%、 $X_3$ 为0.97%、 $X_4$ 为3.3%,在此点响应值为9 326。

3.2 通过对预测模型的验证试验,实际试验值与模型预测值基本一致,说明模型能较好的反应实际情况。

### 参考文献

- 1 王彦荣,孟祥春,任连彬,等.酸性蛋白酶生产与应用的研究[J].酿酒,2003,30(3):16~18
- 2 王莉衡.土曲霉发酵条件对菌体形态与产物产量影响的研究[D].西北大学硕士论文,2004
- 3 周兴挺,徐会根,罗定军.洛伐他汀发酵培养基配方的均匀设计优选[J].中国抗生素杂志,1999,24(1):22~23
- 4 宫衡,李小明,伦世仪.响应面法优化赖氨酸发酵培养基[J].生物技术,1995,5(4):13~15
- 5 胡良平主编.Windows SAS 6.12&8.0 实用统计分析教程[M].北京:军事医学科学出版社,2001
- 6 徐子钧,李剑,梁凤来,等.利用SAS软件优化L-乳酸发酵培养基[J].微生物学通报,2004,31(3):85~87

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

# 黑曲霉产高酶活纤维素酶突变株 ZM-8 的筛选

马旭光 张宗舟 蔺海明 刘星斌 刘小飞

**摘要** 对航空诱变的一株黑曲霉(*Aspergillus niger*)进行筛选,得到纤维素酶高产突变株 ZM-8。以玉米秸秆粉为主要碳源,经固体发酵培养,测得其滤纸酶(FPA)酶活力为 110.2 U/g、纤维二糖水解酶(C<sub>1</sub>)酶活力为 389.9 U/g、葡聚糖内切酶(CMC<sub>Case</sub>)酶活力为 489.3 U/g、β-葡萄糖苷酶(β-Glucase)酶活力为 1 208.1 U/g,比出发菌株各组分的酶活力分别高了 2.1、3.5、1.7、1.8 倍。经过 5 次继代固体发酵试验,证明该菌株具有较好的产酶稳定性,可作为以农作物秸秆为原料生产单细胞蛋白(SCP)饲料的优良菌株。

**关键词** 黑曲霉;纤维素酶;筛选

**中图分类号** Q939.96

纤维素类物质是世界上最丰富的可再生资源,约占生物总量的 50%。我国的纤维素资源仅秸秆和皮壳每年可达  $7 \times 10^8$  t,占世界总产量的 20%~30%,绝大部分作为燃料焚烧掉,用作饲料的却不足 10%(费尚芬,2006)。其主要原因是纤维素类物质的结构极其复杂,蛋白质含量低,木质素和纤维素含量高,适口性差。

近年来,利用微生物所产生的纤维素酶将秸秆转化为营养价值较高的蛋白饲料备受人们的青睐。以往未能大量把纤维素类物质作为饲料的生产原料,主要是因为在生产上缺乏产纤维素酶酶活力高的菌株(徐昶,2005),因此,筛选产纤维素酶酶活力高的菌株就显得尤为重要。本试验对航空诱变的黑曲霉进行了筛选,得到了纤维素酶酶活明显提高的突变株 ZM-8,为降解秸秆生产蛋白饲料提供了优良的目的菌株,这对提高秸秆的利用率和缓解我国高蛋白饲料严重紧缺的局面起到重要的促进作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

航空诱变的黑曲霉(*Aspergillus niger*),保存于 PDA 斜面培养基,由中科院遗传所提供。

### 1.2 原料及仪器

#### 1.2.1 主要试剂

DNS 试剂(粟学俐,1999)、柠檬酸缓冲液、水杨素(Sigma)、羧甲基纤维素钠、新华定性滤纸,其它均为国产的化学纯或分析纯。

#### 1.2.2 发酵原料

玉米秸秆粉(当地农户提供,粉碎至一定粒度)、麸皮(市售)。

#### 1.2.3 主要仪器

CS213 电热恒温培养箱(重庆试验设备厂)、TGL-20M 高速冷冻离心机(湘仪仪器厂)、722 型分光光度计(上海欣茂仪器有限公司)、XSP-18B 双筒显微镜(江南医用光学仪器厂)、PHS-2C 型精密酸度计(上海精科雷磁)、DZKW-4 型电子恒温水浴锅(黄骅市渤海电器厂)、THZ-82A 台式恒温振荡器(上海跃进医疗器械厂)、PHS-2C 型精密酸度计(上海精科雷磁)。

### 1.3 培养基

分离平板培养基(查氏培养基): $\text{NaNO}_3$  0.3%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%、KCl 0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{FeSO}_4$  0.001%、蔗糖 2%、琼脂 2%,自然 pH 值。

滤纸条琼脂培养基:1 cm×7 cm 滤纸条一块,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.025%、琼脂 2%,自然 pH 值。

刚果红-羧甲基纤维素琼脂培养基按叶姜瑜(1997)介绍的方法制作。

种子培养基:玉米秸秆粉 2 g、营养盐溶液[ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01%]5 ml。

基础产酶培养基:玉米秸秆粉 60%、麸皮 40%、营养液[ $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  2.0%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01%] 250%(v/m),自然 pH 值。

马旭光,甘肃农业大学农学院,730070,甘肃省兰州市。

张宗舟(通讯作者)、刘小飞,天水师范学院生命科学与化学学院。

蔺海明、刘星斌,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-09-18

★ 天水市科委项目(X5-03)

上述培养基均需在  $1.0 \times 10^5$  Pa,  $121^\circ\text{C}$  灭菌 30 min。

#### 1.4 试验方法

##### 1.4.1 筛选方法

###### 1.4.1.1 菌种活化

将供试的斜面种子接种于平板分离培养基,  $30^\circ\text{C}$  恒温倒置培养 60 h。

###### 1.4.1.2 菌株初筛

挑取在平板培养基生长旺盛的单菌落分别接种于盛滤纸条培养基的试管中, 于  $30^\circ\text{C}$  恒温培养 72 h。然后将显示有滤纸降解的菌株作系列稀释, 在刚果红-羧甲基纤维素琼脂培养基上作平板分离, 选取有透明圈的单菌落接种于查氏斜面培养基保藏, 以备复筛。

###### 1.4.1.3 菌株复筛

自斜面培养基上选取试验菌株斜面培养物一块(约  $5\text{ mm}^2$ )接种于种子培养基上, 用无菌玻璃棒压碎与培养基搅匀,  $30^\circ\text{C}$  恒温培养 72 h, 按一定的接种比接入基础产酶培养基上进行发酵培养,  $30^\circ\text{C}$  恒温培养 72 h 后测其纤维素酶活力, 重复 3 次取平均值。

##### 1.4.2 分析测定方法

###### 1.4.2.1 粗酶液的制备

取生长良好的固体曲 5 g, 加水 50 ml, 于  $30^\circ\text{C}$  保温 1 h, 用沙芯漏斗过滤, 然后在转速 4 500 r/min 冷冻离心机上离心 10 min, 提取上清液定容至 100 ml, 得 1 : 20 粗酶液。

##### 1.4.2.2 酶活力测定方法

酶活力标准曲线的确定: 分别取 1 mg/ml 葡萄糖标准液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0 ml 于 8 支具塞试管中, 用蒸馏水调至 1 ml, 然后向各试管中加入 1.5 ml DNS 溶液, 摇匀后沸水浴 5min, 取出冷却后用蒸馏水定容至 10 ml, 充分混匀。在 540 nm 波长下测定 OD 值并记录结果, 以葡萄糖含量为横坐标, 以对应的 OD 值为纵坐标, 作标准曲线。

各组分酶活力的测定按郭敏辰 (1997)、Mandels (1976)、张树政(1984)、齐义鹏(1990)的方法测定。

酶活力单位的定义: 在一定的反应条件下 (pH 值、温度), 每小时由底物生成  $1\ \mu\text{mol}$  葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。酶活力计算公式为:

$$\text{酶活力 (U/g)} = [\text{葡萄糖含量 (mg)} \times \text{酶液定容总体积 (ml)} \times 5.56] / [\text{反应液中酶液加入量 (ml)} \times \text{样品重 (g)} \times \text{时间 (h)}]$$

式中: 5.56——1 mg 葡萄糖的微摩尔数 ( $1\ 000/180=5.56$ );

样品重——发酵后的固体干曲重量。

## 2 结果与分析

### 2.1 初筛结果

本试验中共筛选出 32 株能使滤纸崩溃的菌株, 在刚果红-羧甲基纤维素培养基上选取 HC>1 的 5 株菌株, 其编号分别为 ZM-2、ZM-8、ZM-15、ZM-26、ZM-30, 并以原出发菌株作对照, 对它们的单个菌落形态进行比较, 结果见表 1。

表 1 不同菌株的菌落形态比较

菌株	直径 (cm)	HC	表面	背面
ZM-2	5.6	1.6	菌丝白色, 分布平坦, 孢子黑色, 生长较稀疏, 分布呈轮纹状	中央略带黄褐色, 平坦
ZM-8	5.0	2.1	菌丝白色, 厚绒状, 孢子灰黑色, 孢子密集生长, 分布较均匀	白色, 平坦
ZM-15	5.5	1.8	菌丝白色, 厚绒状, 孢子灰色, 菌落中央密集生长, 周边稀疏	白色, 中心凹陷
ZM-26	5.5	1.7	菌丝白色, 分布平坦, 孢子灰黑色, 生长较密集, 分布呈轮纹状	白色, 平坦
ZM-30	6.1	1.4	菌丝白色, 厚绒状, 孢子黑色, 生长较稀疏, 分布均匀	白色, 平坦
CK	6.9	1.2	菌丝白色, 分布平坦, 孢子黑色, 生长稀疏, 分布均匀	白色, 平坦

由表 1 可以看出, 所筛选出的变异菌株的菌落大小在不同程度上较出发菌株的有所缩小, 这与王景林等(2000)所筛选出的黑曲霉变异菌株 X-15 菌落特征有所相似。酶活力的高低和菌落的大小是否存在着某种关系目前还不能定论, 但与透明圈的大小是呈正相关的, 透明圈越大, 说明对纤维素的利用能力越强, 酶活越高。

### 2.2 菌株的镜检特征

在显微镜下观察, 各变异菌株与出发菌株的形态未见显著的改变, 菌丝仍具有隔膜和分支, 分生孢子头呈球形, 直径在  $800\ \mu\text{m}$  左右, 褐黑色。分生孢子梗自基质生出, 长短不一(大多为 1~3 mm), 直径为  $15\ \mu\text{m}$  左右, 壁厚, 有痣点。顶囊球形, 直径为  $45\ \mu\text{m}$  左右。小梗双层, 自顶囊全面着生, 褐色。分生孢子球形, 呈浅褐色, 直径为  $5\ \mu\text{m}$  左右。

### 2.3 酶活力标准曲线方程(见图 1)

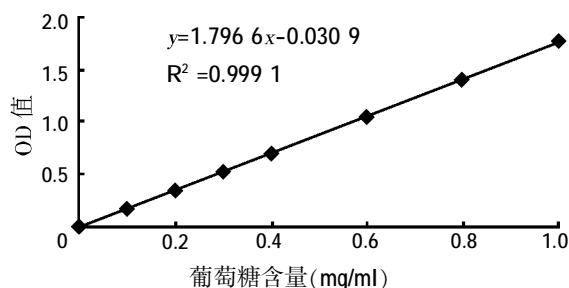


图1 酶活力标准曲线

2.4 复筛结果

将初筛的 5 株菌株与出发菌株在基础固体产酶培养基上发酵培养,培养温度为 30 ℃,初始 pH 值为 6.0,培养 72 h 后测其纤维素酶酶活力,结果见表 2。

表 2 不同菌株产纤维素酶酶活力的比较(U/g)

菌株	FPA	C <sub>1</sub>	CMCase	β-Glase
ZM-2	76.4	268.5	392.5	864.7
ZM-8	110.2	389.9	489.3	1 208.1
ZM-15	98.7	320.5	449.1	1 005.4
ZM-26	87.6	290.4	424.5	913.2
ZM-30	75.4	234.4	354.8	832.9
CK	52.5	110.5	295.4	673.1

由表 2 可见,突变菌株的各组分酶活力与出发菌株相比,都有不同程度的提高。其中 ZM-8 菌株产纤维素酶酶活力的提高幅度最大,滤纸酶(FPA)酶活力、纤维二糖水解酶(C<sub>1</sub>)酶活力、葡聚糖内切酶(CMCase)酶活力和 β-葡萄糖苷酶(β-Glase)酶活力比出发菌株依次提高了 2.1、3.5、1.7、1.8 倍。除表征纤维素酶系总的糖化能力的 FPA 外,在其它 3 类组分酶中,β-Glase 酶活力最高,C<sub>1</sub> 酶活力最低,这与戴四发(2001)研究的由黑曲霉形成的纤维素酶系中,β-Glase 酶活很高,而 C<sub>1</sub> 酶活力极低的结论一致。

FPA 酶活的较大提高,说明纤维素酶系中其它 3 种酶的协同作用增强了,意味着对纤维素的降解能力会有较大程度的提高。

2.5 ZM-8 菌株的遗传稳定性

测定 ZM-8 菌株各类酶活力,取 3 次重复的平均值(见表 3)。

表 3 ZM-8 菌株的产酶稳定性(U/g)

传代次数	1	2	3	4	5
FPA	220.2	216.5	220.8	216.9	219.5
C <sub>1</sub>	389.9	388.5	389.2	390.3	388.4
CMCase	489.3	490.1	488.7	489.8	490.4
β-Glase	1 208.1	1 207.5	1 205.4	1 206.8	1 208.9

对其进行方差分析,结果表明 F<Ferit,说明各重复值之间的差异不显著,因此该菌株具有较好的遗传稳定性。

3 结论

3.1 空间微重力辐射等诸多特殊的条件可使黑曲霉发生正向变异,且变异菌株的优良性状具有较好的遗传稳定性,故今后有必要对黑曲霉作进一步的太空诱变育种研究。

3.2 由于纤维素酶系是一类复杂的复合诱导酶,因此,不同的底物对纤维素酶酶活力会有很大的影响。大量研究证明,不同的碳源、氮源及不同的浓度都会对纤维素酶系中的各组分酶活力有影响;不同的培养条件(pH 值、温度、湿度等)也会对其有较大的影响。ZM-8 菌株最佳产酶的基质组分和培养条件还有待进一步研究,在确定了该菌株最佳的产酶条件后,其纤维素酶活力还有望进一步提高。

参考文献

- 戴四发,金光明,王立克,等. 纤维素酶研究现状及其在畜牧业中的应用[J]. 安徽技术师范学院学报,2001,15(3):32-38
- 费尚芬,鹿宁,刘坤,等. 白腐菌纤维素酶高酶活菌株的筛选[J]. 安徽农业科学,2006,34(1):22-23
- 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组.《常见与常用真菌》[M]. 北京:科学出版社,1973. 172-173
- 蒋芳,增林子,张强,等. 饲用细菌纤维素酶的发酵条件优化与性质研究[J]. 中国饲料,2006,6:6-9
- 林英,吕淑霞,张蓓蓓,等. 绿色木霉原生质诱变筛选纤维素酶高产菌株[J]. 生物技术,2006,16(2):50-51
- 齐义鹏. 纤维素酶及其应用[M]. 长沙:湖南科技出版社,1990
- 王景林,刘晓明,吴东林,等. 纤维素酶产生菌黑曲霉 X-15 的选育及其产酶条件[J]. 中国兽医学报,2000,20(1):97-99
- 郭敏辰,李江华,郭显章. 黑曲霉固态培养生产纤维素酶的研究[J]. 酿酒,1997(6):5-9
- 徐昶,龙敏南,郭小兵,等. 高产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2005,44(1):107-111
- 叶姜瑜. 快速识别纤维素分解菌的新方法 [J]. 生物学通报,1997,32(12):34
- 张树政. 酶制剂工业(下)[M]. 北京:科学出版社,1984.619-623
- Gallo B J, Andreotti R, Roche C, et al. Cellulase production by a new mutant strain of Trichoderma reesei MCG77 [J]. Biotechnol Bioeng. Symp., 1978,8:89-101
- Mandels M, Anereotti R E. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose [J]. Biotech. Bioeng. Symp., 1976(6):17-21
- Montenecourt B S, Eveleigh D E. Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of Trichoderma reesei [J]. Adv. Chem. Ser., 1979, 181:289-301
- Takahashi N. Hydrolytic enzymes from filamentous fungus Aspergillus niger [J]. Biotechnol. Bioeng., 1984, 26:583-589

(编辑:王 芳,xfang2005@163.com)

# 黑曲霉酶解提取葛根黄酮的研究

汤海鸥 程茂基 石秀侠 薛培俭

**摘要** 试验以产高活性纤维素酶、果胶酶、蛋白酶的黑曲霉 ANO2 鲜曲对葛根进行酶解处理,然后对葛根进行常规提取,测定其有效成分黄酮的提取量,并与未加黑曲霉组进行了对比分析。结果表明:葛根黄酮的提取量提高 21.1%,经 t 检验分析,加黑曲霉前后提取量均数差异极显著( $P<0.01$ )。对酶解条件进行了优化,确定黑曲霉酶解法提取葛根的最佳条件为:最佳温度 40 ℃、pH 值 4.0、酶解作用时间 6 h、加黑曲霉量为 6%。研究表明,在最佳酶解条件下,黑曲霉 ANO2 鲜曲能显著提高葛根有效成分的释放提取。

**关键词** 葛根黄酮;黑曲霉;酶解提取

**中图分类号** Q814.1

葛根为豆科植物野葛(*Pueraria lobata* Willd)或甘葛藤(*P.thomsonii* Benth)的干燥根,甘葛藤又习称为粉葛。葛根具有解肌退热、生津、升阳止泻的功效。目前对葛根的研究主要集中在对其提取及其有效成分的应用方面。葛根作为饲料添加剂应用时主要是作为添加剂方剂中的一种,当然也可单独添加,添加量一般为 1%~2%;而使用葛根活性提取物时其用量仅为 0.03%~0.05%。葛根成分复杂多样,除包括葛根黄酮等有效成分外,还含有蛋白质、果胶、淀粉、植物纤维等成分。传统提取葛根的方法普遍存在不安全、提取率低等不利因素。近年来,酶工程技术开始广泛应用于中草药工业,只要选用恰当的酶,不仅可以较温和地分解植物组织,加速释放有效成分,而且能够分解去除影响液体制剂的杂质,如淀粉、蛋白质、果胶等,促进某些极性低的脂溶性成分转化为易溶于水的糖苷类而有利于提取。如果选用一种符合制酶要求的菌种(株),发酵培养后直接对中草药进行酶解提取,这样不仅可省去一套繁琐的制酶工艺步骤,提高了经济效益,而且也中草药的提取提供一条新途径。鉴于此,我们以高产复合酶黑曲霉菌株 ANO2 为应用菌,在发酵培养后直接对葛根进行酶解处理再提取,以研究产酶菌 ANO2 直接酶解时各项试验最优参数,同时比较加黑曲霉前后葛根黄酮提取量之间的差异,从而为霉菌鲜曲直接酶解提取中草药饲料添加剂——葛根提供试验依据。

## 1 材料与方 法

汤海鸥,安徽省蚌埠市丰原集团发酵技术国家工程研究中心,233010,安徽省蚌埠市胜利西路 777 号。

程茂基(通讯作者),安徽农业大学动物科技学院。

石秀侠、薛培俭,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-09-10

## 1.1 试验材料与仪器

### 1.1.1 材料

高产复合酶益生菌种——黑曲霉 ANO2 (包括产纤维素酶、酸性蛋白酶和果胶酶等,本实验室提供)、葛根(合肥为民大药房,试验前烘干粉碎过 35 目筛),试验试剂均为国产分析纯。

### 1.1.2 仪器

电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司)、全温振荡培养箱(哈尔滨东联电子有限公司)、超净工作台(苏州净化设备有限公司)、电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司)、电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)、电子天平(精确到小数点后四位,上海精密科学仪器有限公司)、普通天平(上海精密科学仪器有限公司)、精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)、电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司)、回流蒸馏器一套组合(江苏晶玻实验仪器厂)、万用电炉(通州市光学仪器有限公司)。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 酶活测定

按照《酶法提取银耳多糖的研究》(林宇野等,1995)方法测定。

### 1.2.2 葛根黄酮采用常规回流法提取

按 Zhao 等(2000)的方法提取,并计算提取产物的百分数。

① 提取物的制取:将选购的葛根放入烘干箱,105 ℃ 烘 2~3 h,粉碎,过 35 目筛,备用。称取葛根粉 15 g,加 150 ml 70%的乙醇,在 85 ℃ 的水浴锅中回流 3 h,过滤;滤渣再加 100 ml 70%的乙醇,在 85 ℃ 的水浴锅中回流 2 h,共两次;合并滤液,放入 95 ℃ 的水浴锅中蒸馏回收乙醇,提取物蒸发至少量。

② 标准曲线的绘制:精密称取干燥至恒重的葛



根素对照品 5 mg,于 25 ml 容量瓶中,加 95%乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0 ml 分别置于 10 ml 容量瓶中,加 95%乙醇至 2.0 ml,再加蒸馏水稀释至刻度,摇匀;另取 2.0 ml 95%乙醇,用蒸馏水稀释至 10 ml,作空白对照,于 250 nm 处测定吸收度,标准曲线如图 1,其回归方程为:  $Y=0.3465X-0.1378$ ,  $r=0.9946$ 。

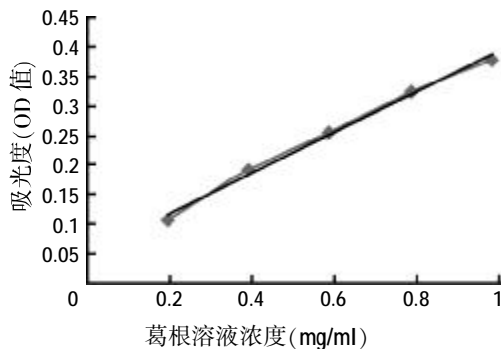


图 1 葛根黄酮标准曲线

③ 提取物的测定:将提取液转移至 50 ml 的容量瓶中,用 95%乙醇定容,摇匀。取 1 ml 于 10 ml 的容量瓶中,用 95%乙醇定容,摇匀。再取 1 ml 于 10 ml 的容量瓶中,用水定容,摇匀。用 10.0 ml 95%乙醇精确加水至 100 ml 的溶液做空白对照,在 250 nm 处测定吸光度,从标准曲线上换算出葛根黄酮的浓度,并计算出葛根黄酮的百分含量。计算公式为:

葛根黄酮的百分含量(%) = [标准浓度(mg/ml) × 稀释总量(l)] / 葛根重(g)。

### 1.2.3 应用黑曲霉 ANO2 提取葛根黄酮

#### 1.2.3.1 提取方法

将圆底烧瓶中的葛根粉按比例添加黑曲霉鲜曲,混匀,加入适量的水,搅匀,调整 pH 值,再将圆底烧瓶放入水浴锅里,在一定的温度下进行酶解预处理,酶解一段时间后再进行常规提取。

#### 1.2.3.2 试验参数优化

##### ① 单因素试验设计

酶促反应温度对酶解的影响:试验研究了在 30、40、50、60、70 °C 5 个不同温度下,温度对葛根黄酮提取量的影响,每个温度因素设 3 个平行试验,其它酶解条件不变,从中确定一个最适的酶解温度。

酶解作用时间对酶解的影响:设定 2、4、6、8、10 h 5 个作用时间进行试验,每个时间因素设 3 个平行试验,其它条件不变,从中确定一个最适的酶解作用时间。

pH 值对酶解作用的影响:将酶解作用的 pH 值

分别设定 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5,50 °C 条件下酶解 6 h,每个 pH 值因素设 3 个平行试验,其它条件不变,从中确定一个最适的酶解作用 pH 值。

加黑曲霉量对酶解作用的影响:在上述最佳条件下,测定加黑曲霉量对葛根黄酮提取量的影响,将加黑曲霉量分别设定为 4%、6%、8%、10%、12% 5 个水平,每个水平设 3 个平行试验,其它条件不变,从中确定一个最适加霉量。

##### ② 正交试验设计

本试验拟采用 4 因素(pH 值、温度、酶解作用时间、加霉量)3 水平的正交试验,从中确定黑曲霉提取葛根黄酮的最佳反应条件。正交试验设计见表 1。

表 1 黑曲霉提取葛根反应条件正交设计

水平	因素			
	时间 (h)	pH 值	温度(°C)	加霉量 (%)
1	6	3.5	30	6
2	8	4.0	40	8
3	10	4.5	50	10

## 2 结果与分析

### 2.1 酶活测定结果

根据酶活测定方法对产复合酶的黑曲霉进行测定,试验分 3 组,分别是纤维素酶组、酸性蛋白酶组、果胶酶组,且每组取 3 个平行样,测定结果见表 2。

表 2 复合酶制剂酶活测定结果(IU/g)

试验组	1	2	3	平均值
纤维素酶	618.1	621.1	622.2	620.5
蛋白酶	435.5	432.3	422.4	430.1
果胶酶	416.5	406.8	412.2	411.8

由表 2 可知,高产复合酶霉菌——黑曲霉 ANO2 的 3 种酶酶活已经非常高,都在 400 IU 以上。在此酶活情况下,黑曲霉 ANO2 鲜曲可以用做酶解提取试验。

2.2 葛根的回流法提取结果 (即未加黑曲霉的常规提取)

按“1.2.2”的提取方法设定 2 组试验,每组设 3 个平行样,并按测定方法测得各组葛根黄酮百分含量见表 3。

表 3 常规回流法提取葛根黄酮的质量百分含量(%)

试验组	1	2	3	平均值
1	0.52	0.59	0.58	0.56
2	0.54	0.61	0.57	0.58

由表 3 可知,葛根中总黄酮的质量百分含量在 0.5%~0.6%之间,总黄酮所得量占葛根总量的比重非

常小,必须应用分光光度计精确定量。对表 3 所有数据计算得其平均值为 0.57%,此数值确定为葛根总黄酮常规提取量的标准值。

### 2.3 单因素试验结果

#### 2.3.1 酶促反应温度对酶解的影响

试验探讨了不同酶解温度对酶解效果的影响,酶的活性在不同反应温度下有很大差异。如图 2 所示,在 30~50 ℃时,葛根黄酮的提取量相对较大,其中在 40 ℃时达到最高。温度过高或过低时葛根黄酮的提取量都出现明显的下降趋势。结果表明,40 ℃是酶解葛根的最佳温度,此温度下黑曲霉的酶解效果最好。

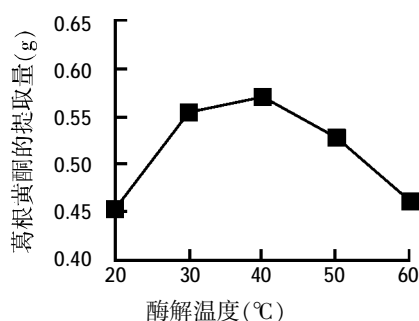


图 2 酶促反应温度对酶解的影响

#### 2.3.2 酶解作用时间对酶解的影响

试验探讨了不同酶解时间对酶解效果的影响,如图 3 所示,随着酶解时间的增加,葛根黄酮提取量也出现增加趋势,但增幅变化不是很明显,尤其在 8 h 的时候葛根黄酮的提取量还出现稍稍变低的情况,这可能是各组平行样提取过程中试验误差造成的,此变化不影响试验结果。根据试验结果再结合经济效率因素考虑,酶解时间确定 6 h 为最佳。

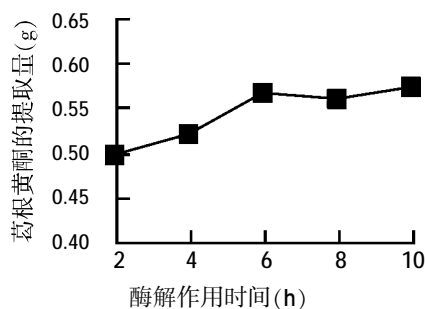


图 3 酶解作用时间对酶解的影响

#### 2.3.3 pH 值对酶解的影响

试验探讨了不同 pH 值对酶解效果的影响,如图 4 所示,当酶解介质 pH 值在 3.5~5.0 的时候,葛根黄酮的提取量变化不大,其中 pH 值为 4.0 的时候葛根黄酮的提取量达到最高。而当 pH 值大于 5.0 时葛根黄酮的提

取量出现明显的下降趋势,影响葛根黄酮的提取效果。结果表明,pH 值为 4.0 时,黑曲霉的酶解活性最高。

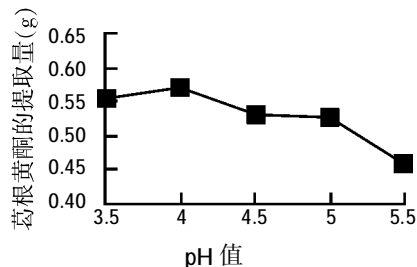


图 4 pH 值对酶解作用的影响

#### 2.3.4 加黑曲霉量对酶解的影响

当其它酶解条件确定之后,试验探讨了不同加霉量对酶解效果的影响,如图 5 所示,由试验测得数据可看出,随着加霉量的增加,葛根黄酮的提取量随之增多,但增幅不是很明显,当加黑曲霉量达到 6%后,葛根的提取量增加幅度趋于平缓,所以从经济和效率因素考虑,加黑曲霉量确定 6%为最佳。

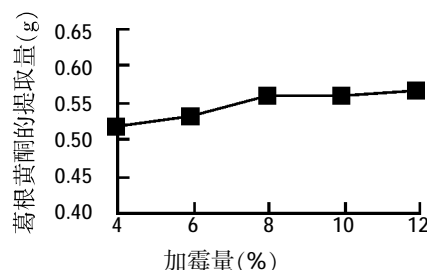


图 5 加黑曲霉量对酶解作用的影响

### 2.4 正交试验结果

试验采用了 4 因素(酶促反应时间、pH 值、酶促反应温度、加霉量)3 水平正交设计,结果计算及分析见表 4。

表 4 黑曲霉 ANO2 提取葛根黄酮正交试验的分析结果

项目	试验因素				平均提取量(%)
	A 时间(h)	B pH 值	C 温度(°C)	D 加霉量(%)	
1	1(6)	1(3.5)	1(30)	1(6)	0.62
2	1	2(4.0)	2(40)	2(8)	0.69
3	1	3(4.5)	3(50)	3(10)	0.61
4	2(8)	1	2	3	0.67
5	2	2	3	1	0.65
6	2	3	1	2	0.60
7	3(10)	1	3	2	0.63
8	3	2	1	3	0.66
9	3	3	2	1	0.67
T1	5.76	5.75	5.65	5.82	17.40
T2	5.77	6.00	6.09	5.76	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub>
T3	5.87	5.65	5.66	5.82	或 A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub>
X1	1.92	1.92	1.88	1.94	
X2	1.92	2.00	2.03	1.92	
X3	1.96	1.88	1.89	1.94	
R	0.04	0.12	0.14	0.02	RC>RB>RA>RD

表 4 可知,酶解温度和pH 值是影响葛根黄酮提取量的最关键因素,在试验范围内,酶解时间和加黑曲霉量的影响很小。试验产生的最优组合是 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub> (或 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>),即温度为 40 ℃、pH 值为 4.0、时间为 10 h、加酶量为 6%(或 10%)。

正交试验结果的方差分析见表 5。

表 5 黑曲霉 ANO2 提取葛根黄酮的方差分析结果

误差来源	平方和	自由度	方差	F	P
A 因素	0.000 8	2	0.000 4	2.50	>0.05
B 因素	0.007 2	2	0.003 6	22.50	<0.01
C 因素	0.014 0	2	0.007 0	43.75	<0.01
D 因素	0.000 3	2	0.000 15	0.938	>0.05
误差	0.002 8	18	0.000 16		
总和	0.025 1	26			

注: F<sub>0.01</sub>(2, 18)=6.01, F<sub>0.05</sub>(2, 18)=3.55。

由表 5 可知,酶解温度和 pH 值的差异极显著,这两个条件对葛根黄酮提取量的影响起主要作用,酶解时间和加酶量在此试验范围内没有显著性差异,对测定结果的影响很小。综合以上正交试验结果分析,因为酶解温度和 pH 值的差异极显著,所以可以确定酶法提取葛根的最佳酶解温度为 40 ℃、pH 值为 4.0,而酶解作用时间和加酶量差异不显著,再结合经济和效率因素考虑,可以确定酶解作用最佳时间为 6 h,最适加酶量为 6%。

### 2.5 加霉与未加霉提取结果比较

从表 4、表 5 中正交方差结果可知,9 组试验中的第“2”组 B、C 两因素满足了黑曲霉提取葛根的最佳酶解条件,而 A、D 两因素差异不显著,因此可以确定该组为最佳试验组。其提取量的平均值为 0.69%。再结合常规提取的结果进行 t 检验比较,结果见表 6。

表 6 加黑曲霉和未加黑曲霉提取葛根黄酮结果比较

加黑曲霉		未加黑曲霉		t 值	P 值
X1	S1	X2	S2		
0.69%	0.014 1	0.57%	0.010 0	6.93	<0.01

注: t<sub>0.01</sub>(4)=4.604。

从以上加黑曲霉组和未加黑曲霉组的比较数据可知,在黑曲霉的作用下,葛根黄酮的提取量提高 21.1%,经 t 检验分析,加黑曲霉前后提取量均数差异极显著(P<0.01)。这表明应用黑曲霉提取与常规方法提取相比,能显著提高葛根有效成分黄酮的释放提取。

### 3 讨论

对于酶解反应来说,最优酶解参数是至关重要的

条件。黑曲霉 ANO2 是一株复合酶高产菌,其纤维素酶、果胶酶和蛋白酶酶活已经高于现在工业生产酶制剂所要求的酶活标准。程茂基等(2005)已对该酶的纯化和酶学性质进行研究,但对该黑曲霉的酶解条件有待进一步探讨。在研究酶解条件时,要考虑至少 4 个独立的变量,即加黑曲霉量(E)(或黑曲霉与底物比 E/S)、反应体系 pH 值、反应温度和反应时间。尽管上述 4 个变量具有独立性,但它们之间又有一定的相互联系。在酶解的过程中,随着酶解的深入,酶活逐渐失去,并且随着产物的积累而形成的抑制作用也不断加强,上述各因素的综合作用最终导致酶促反应速度和酶解产物趋于恒定值。因此,通过对酶解过程的研究可以选择最佳的酶解温度、pH 值、酶解时间、霉用量,从而确定适宜的酶解条件。蒋立文(1999)利用毛霉制剂处理大豆乳,能达到较为理想的酶解条件是:温度在 40~50 ℃之间、pH 值在 7.0 左右、酶解时间为 3 h、黑曲霉用量 3%左右,其中底物浓度和酶解时间相对恒定。

从本试验的结果可以看出,温度和 pH 值是影响酶解效率最重要的两个因素,呈显著性差异。在酶解时间和酶与底物比最佳的情况下,有效成分提取率增加的效果对酶解温度和 pH 值的变化很敏感。温度对酶的作用像一般化学反应一样,随温度升高,活化分子数增加,有利于催化反应进行,同时由于酶是蛋白质,随温度升高,酶蛋白会逐渐变性失活。因此,最适合的温度是这两种影响相互作用的结果。根据单因素试验和多因素试验研究结果可知,黑曲霉 ANO2 的最佳作用温度为 40 ℃左右,此状态下酶能发挥较高的活力,同时又保持良好的热稳定性。酶表现出最大活力的温度范围较窄,低温时,酶的抑活是可逆的,在高温下的失活是不可逆的,所以,酶处理完成后,也可通过升高温度的方法,使酶失去活力终止反应。不同的 pH 值条件下,酶活不同。pH 值变化虽然没有改变酶分子的化学结构,但主要是影响了酶分子的活性中心上有关基团的解离,这样就影响了酶与底物的结合。另外,酶是蛋白质,pH 值变化直接改变了氨基酸的解离状态,从而影响了离子平衡,导致了蛋白质变性。而适当的 pH 值,通过静电作用,维持了酶活性中心的最佳三维构象,促进酶与底物结合。为了使黑曲霉 ANO2 充分发挥其活力,在实际使用中,应控制 pH 值为 4.0 左右,否则,黑曲霉 ANO2 对松针粉和葛根的酶解作用将不能得到充分发挥。

从本试验的结果可以看出,酶解时间和加黑曲霉

# 植酸磷水平对植酸酶使用效果的影响

宋保强 陈家钊 王银东 林俊华 吴世林

**摘要** 选用 135 头体质健康、体重 60 kg 左右的杜×大×长三元杂交猪,随机分为 5 个处理组,研究不同植酸磷水平对植酸酶使用效果的影响。试验结果表明,加植酸酶情况下,有效磷达 0.165%、植酸磷水平为 0.25% 时大猪的生长性能最好。玉米—豆粕型大猪饲料中的植酸磷水平能使 500 IU/kg 的植酸酶发挥正常功效,一般不会出现“底物”不足的情况。

**关键词** 杜×大×长三元杂交猪;植酸酶;植酸磷;生长性能  
**中图分类号** Q814.9

目前,植酸酶在饲料中的作用效果得到充分证实。它不仅可促进植酸磷的消化吸收、减轻养殖业带来的磷污染、保护环境、还可改善蛋白质、氨基酸和能量的利用效果,提高畜禽生产性能。有关植酸酶的应用技术的研究很多,但到目前为止关于饲料中的不同植酸磷水平对植酸酶使用效果的影响尚未见报道。为此,本试验采用杜×大×长猪为试验对象,在添加植酸酶的基础上,探讨了不同植酸磷水平对植酸酶使用效果的影响,旨在观察保证猪健康生产情况下植酸酶

的最低底物(植酸磷)浓度,为实际生产中更好的应用植酸酶提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

采用 2×2 因子设计,植酸磷设 2 个水平(0.250%、0.300%),2 个有效磷水平(0.165%、0.220%),相应调整钙水平使钙与总磷比保持在 1.25:1,均添加植酸酶。另外设 1 个对照组不添加植酸酶,钙、磷为正常水平。试验设计见表 1。

表 1 试验设计

营养成分	A 组(对照)	B 组	C 组	D 组	E 组
植酸磷(%)	0.250	0.250	0.250	0.300	0.300
有效磷(%)	0.220	0.165	0.220	0.165	0.220
总磷(%)	0.470	0.420	0.470	0.470	0.520
钙(%)	0.590	0.530	0.590	0.590	0.650
植酸酶(g/t)	0.000	100.000	100.000	100.000	100.000

宋保强,广州智特奇生物科技有限公司,510507,广州市天河区燕岭路 123 号建设大厦 502。

陈家钊、林俊华,福建丰泽农牧饲料有限公司。

王银东(通讯作者)、吴世林,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-30

量并不影响葛根黄酮提取率,但是在酶解时间和加黑曲霉量没有达到最佳之前,有效成分提取率受时间和加黑曲霉量的变化影响很大,有效成分的得率会随着时间和加黑曲霉量的增加而增加,当酶解时间和加黑曲霉量达到最佳状态后,增加酶解时间和加黑曲霉量对有效成分的提取率影响就不是很明显。由此可见,虽然在一定条件下,延长酶解时间可以增加产物的得率,但从实际生产中对生产周期的考虑,过长的酶解时间是不经济的。本试验研究的结果表明,当酶解时间达到 10 h 的情况下,酶解效果处于最佳时机。但酶解时间在设定的范围内是不显著参数,所以从经济角度考虑选择酶解时间 6 h 为最佳时间。加黑曲霉量与酶解率的增加效果也密切相关。在饱和加黑曲霉量未达到之前,加黑曲霉量对酶解得率的增加效果有显著

性影响,加黑曲霉量越大,酶解得率越大;在加黑曲霉量达到饱和之后,加黑曲霉量对酶解得率的增加效果没有显著性影响,加黑曲霉量只是对达到最高酶解得率的时间有所影响,加黑曲霉量越大,达到最高得率所需要的时间将会有所缩短。王静(2003)在研究加黑曲霉量对 Endo 酶解菊粉的影响结果表明,加黑曲霉量为 5 U/g 时,菊粉的酶解得率较小,达到最大得率的时间为 72 h,当加黑曲霉量达到 20 U/g 时,菊粉的酶解得率达到最大,所需时间为 48 h。从本试验单因素试验研究表明,在饱和加黑曲霉量 6% 之前,随着黑曲霉 ANO2 鲜曲量的增加,酶解得率增加,当达到 6% 之后,酶解得率增加没有显著性效果。

(编辑:高雁, [snowyan78@tom.com](mailto:snowyan78@tom.com))

## 1.2 试验动物

选择出生时期相近、体况相似、健康无病、体重 60 kg 左右的杜×大×长三元杂交猪 135 头。根据窝别、性别和体重因素,随机分配到 5 处理组中,每个处理设 3 个重复,每 1 栏为 1 个重复,每个重复 9 头猪。

## 1.3 饲养管理

试验在福建丰泽农牧饲料有限公司试验猪场进行。试验猪全部饲养在自然通风的生长期圈舍中,每栏内设料槽和乳头式饮水器各一个。试验猪按分组处理分配到各栏舍,任其自由采食和饮水,免疫程序和饲养管理按照工厂化猪场的方法进行。正式试验前预饲 5 d, 然后进行正式试验,整个试验期共 35 d。

## 1.4 试验日粮

基础饲料参照 NRC(1998)猪营养需要配制,制作为粉状饲料。根据组别分别配制相应的有效磷、总磷和钙水平饲料,其它营养水平(粗蛋白、消化能、赖氨酸和蛋氨酸等)相同,具体见表 2。其中高植酸磷组由玉米—豆粕型日粮添加植酸钠(分子式:  $C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$ , 其中 P 元素占 20.1%)组成。上述日粮除对照组外均添加植酸酶智富磷 5 000, 广州市智特奇饲料科技有限公司提供,酶活  $\geq 5\ 000\ U/g$ ,添加量为 100 g/t。

表 2 各组日粮组成及营养水平

原料组成(%)	A 组(对照)	B 组	C 组	D 组	E 组
玉米	68.00	68.00	68.00	68.00	68.00
麦麸	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
豆粕	21.00	21.00	21.00	21.00	21.00
4%预混料	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
合计	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平					
消化能(MJ/kg)	13.27	13.27	13.27	13.27	13.27
粗蛋白(%)	16.400	16.400	16.400	16.400	16.400
钙(%)	0.590	0.530	0.590	0.590	0.650
总磷(%)	0.470	0.420	0.470	0.470	0.520
有效磷(%)	0.220	0.165	0.220	0.165	0.220
植酸磷(%)	0.250	0.250	0.250	0.300	0.300
赖氨酸(%)	0.770	0.770	0.770	0.770	0.770
蛋氨酸(%)	0.270	0.270	0.270	0.270	0.270
蛋+胱(%)	0.570	0.570	0.570	0.570	0.570

## 1.5 测定指标

### 1.5.1 生产性能

试验开始和结束时,试验猪空腹 16 h 后称取每个重复组试验猪体重,并记录试验期间各栏采食量。计算平均日增重(ADG)、平均日采食量(ADFI)和饲料转化率(FCR)。

### 1.5.2 血清指标

试验结束前 1 d,每个处理组随机选 3 头猪,每个重复 1 头猪,前腔静脉采血 10 ml,3 000 r/min 离心,分离出血清,放入 Eppendorf 管中冷冻保存备用。采用生化试剂盒法分析血清钙、血清磷、血清碱性磷酸酶、血清尿素氮水平。

## 1.6 统计分析

所有数据用平均数±标准差( $X \pm SD$ )表示,采用 SPSS11.5 软件进行方差分析和多重比较。

## 2 试验结果

### 2.1 试验猪生长性能及血清生化指标(见表 3)

表 3 试验猪生长性能

组别	平均初重(kg)	平均末重(kg)	平均日增重(kg)	平均日采食量(kg)	料重比
A	61.80±2.38	87.13±5.80	0.817±0.111	2.43±0.03	3.01±0.39
B	61.63±1.76	87.67±1.90	0.837±0.037	2.55±0.01	3.05±0.01
C	61.73±1.66	85.87±1.54	0.779±0.027	2.37±0.02	3.05±0.11
D	62.23±1.14	85.53±3.56	0.752±0.078	2.35±0.03	3.15±0.32
E	60.53±4.01	85.20±5.06	0.796±0.037	2.55±0.04	3.22±0.15

由表 3 可见,经统计分析得出各处理组间初重、末重、日增重、日采食量和料重比差异均不显著( $P > 0.05$ )。将表中各指标与大猪(60~90 kg)的饲养标准(平均日增重 0.8 kg、平均日采食量 2.5 kg、料重比 3.13)(中国,2004)相比,试验期各组猪的几项指标均处在正常范围之内。平均日增重(kg)顺序为  $B > A > E > C > D$ ;料重比顺序为  $E > D > B = C > A$ 。说明不加植酸酶情况下,有效磷达 0.22%、总磷达 0.47%即可;加植酸酶情况下,有效磷达 0.165%、总磷达 0.42%最好。

表 4 血清中碱性磷酸酶、钙、磷、尿素氮含量

组别	碱性磷酸酶(IU/l)	钙(mmol/l)	磷(mmol/l)	尿素氮(mmol/l)
A	188.67±23.71	2.65±0.08	2.69±0.23	4.57±0.36
B	160.67±56.52	2.62±0.09	2.57±0.22	5.03±1.53
C	154.00±24.08	2.69±0.09	2.69±0.11	4.53±1.03
D	140.33±36.07	2.67±0.05	2.56±0.15	5.10±1.30
E	164.00±26.15	2.67±0.02	2.60±0.09	5.40±0.35

由表 4 试验结果可以看出,血清中钙的含量各处理组间数值基本一致;磷的含量稍微有些波动,最高含量与最低含量之间相差 5%;碱性磷酸酶和尿素氮含量各组间有一定的变化,但不明显,各组的几项指标的统计分析结果显示,各处理组间血清中碱性磷酸酶、钙、磷、尿素氮含量均无显著差异( $P > 0.05$ )。

### 2.2 经济效益分析

本试验结果表明,低有效磷添加植酸酶组(B组)

与对照组(A组)相比每吨全价饲料中,节省磷酸氢钙 3.3 kg,节省成本为 3.28 元,则 4%的预混料中每吨成本节省 82 元。C组是在对照组的基础上每吨料添加 100 g 智富磷,但生长性能与 A 组相比无显著差异,说明试验猪在有效磷达 0.22%、总磷 0.47%时,已满足生长需求,添加植酸酶只是增加了成本。D组和 E 组的料肉比同前三组相比稍高,而饲料成本同 B 组相比却不低。因此 B 组是试验猪生长的最佳选择。

### 3 讨论

#### 3.1 对大猪生长性能的影响

有关植酸酶在猪饲料中的应用已有较多的研究,并均取得良好的效果。它不仅可提高磷的利用率,减轻养殖业带来的磷污染,保护环境,还可改善蛋白质、氨基酸和能量的利用效果,提高畜禽生产性能。本试验中添加植酸酶的各组与正常对照组相比生产性能没有差异,说明低有效磷添加植酸酶组中植酸酶发挥了作用,满足了猪对磷的正常需求,说明在降低有效磷的同时添加植酸酶可以维持猪正常的生产性能。

在正常有效磷水平的基础上再添加植酸酶对猪的生产性能影响不显著。因此,在应用植酸酶和评价植酸酶的能效时,要充分注意猪对磷的实际需要量和饲料中有效磷以及植酸磷的含量。

#### 3.2 对大猪血清指标的影响

饲料中钙、磷比例会影响猪对钙、磷的吸收,也会影响植酸酶的使用效果。据 Komegay(1996)报道,钙、磷比例从 2.0:1 降至 1.1:1 时,可使酶的催化效率提高 5%~12%。胡晓飞(2005)在生长猪上的试验结果表明,添加植酸酶的日粮,其最适宜的钙磷比在 1.4~1.0:1 之间效果较好。陈文(2002)在仔猪上的试验表明,添加植酸酶的日粮降低钙磷比例使仔猪血清钙含量下降,但血清磷基本不变。Adeola(1998)在育肥猪上的试验证明,当只降低日粮磷水平添加植酸酶会使猪的血磷水平含量比对照组升高,血钙降低。

本试验结果表明,日粮的钙磷比保持在 1.25:1 时,各处理组间的血清钙含量很稳定,不随日粮中的钙含量的变化而变化,原因可能是在满足猪日粮中钙需求的情况下,血清钙只与钙磷比有关。添加植酸酶的各组与正常对照组相比血清磷含量也没有差异。说明低有效磷添加植酸酶组中植酸酶发挥作用把部分植酸磷释放出来;在有效磷水平已满足猪的需要时,添加植酸酶对血清磷含量影响不显著。

刘燕强(1994)认为,成骨细胞增殖在骨骼生长亢进时,出现血清碱性磷酸酶活性升高,故未成年动物

的血清碱性磷酸酶活性较成年动物高,而且当动物缺钙、磷时,碱性磷酸酶活性会异常升高。本试验中试验组与对照组相比,各组血清碱性磷酸酶活性无显著差异( $P>0.05$ ),说明各处理组中钙、磷水平都能满足试验猪的需要。

#### 3.3 植酸磷水平对植酸酶作用效果的影响

作为植酸酶作用的底物,植酸磷的浓度影响植酸酶的活性及作用效果。一般而言,饲料中植酸磷含量越高,植酸酶的能效越大。试验证明,日粮中植酸磷含量在 0.2%以上时,使用植酸酶才有效,但也不是植酸磷的含量越高,植酸酶的作用效果越好。

有试验证明,植酸酶的添加量与磷的表观消化率之间为二次曲线关系。本试验中不同的植酸磷各组之间植酸酶效果没有差异,可能是两个植酸磷水平(0.25%、0.30%)均能使饲料中 100 g/t 水平的植酸酶发挥最佳效果。本试验设计的两个植酸磷水平没能得出植酸磷水平与植酸酶作用效果之间的关系,只能说明大猪饲料中在添加 100 g/t 植酸酶的情况下植酸磷水平达到 0.25%已经足够。鉴于在实际生产中大猪饲料中植酸磷水平一般能达到 0.25%甚至高于 0.25%,所以饲料中添加 100 g/t 的植酸酶一般不会出现“底物”不足的情况,是安全的。

### 4 结论

本试验结果表明:在大猪玉米—豆粕型日粮中,不加植酸酶情况下,有效磷达 0.22%,总磷达 0.47%即可;加植酸酶情况下,有效磷达 0.165%,总磷达 0.42%最好。实际生产中饲料中添加 100 g/t 的植酸酶一般不会出现“底物”不足的情况。

#### 参考文献

- 1 陈文. 植酸酶对仔猪饲料能量和养分利用率影响的研究[D]. 四川农业大学硕士学位论文, 2002
- 2 胡晓飞. 低磷日粮添加植酸酶对生长猪生产性能和血液指标的影响[M]. 酶制剂在饲料工业中的应用, 2005. 328-322
- 3 刘燕强. 碱性磷酸酶及其在兽医诊断中的价值. 内蒙古畜牧科学, 1994, 2:23-26
- 4 Adeola O, Cline T R, Orban J I, et al. Supplementation of low-calcium and low-phosphorus diets with phytase and cholecalciferol. Purdue Swine Research Reports, 1998, 105-112
- 5 Komegay E T, Denbow D M, Yi Z. Response of broilers to graded levels of microbial phytase added to maize-soyabean-meal-based diets containing three levels of non-phytate phosphorus. British Journal of Nutrition, 1996, 75(6): 839-852

(编辑:高雁, [snowyan78@tom.com](mailto:snowyan78@tom.com))

# 饲料中添加微生物植酸酶和有机酸对断奶仔猪生产性能的影响

高俊杰 车向荣

**摘要** 试验通过测定断奶仔猪的生长性能,研究断奶仔猪日粮中添加微生物植酸酶和有机酸的效果。试验采用完全随机设计,将72头体重相近、遗传基础相似的35日龄断奶的杜×长×大三元杂交仔猪分为4组,每组3个重复,每个重复6头猪。试验日粮在相同钙水平基础上,分别设为:玉米—豆粕型基础日粮(正对照组)、基础日粮-50%磷酸氢钙(负对照组)、基础日粮+植酸酶(500 U/kg)-50%磷酸氢钙(处理1组)、基础日粮+植酸酶(500 U/kg)+有机酸(0.35%柠檬酸)-50%磷酸氢钙(处理2组)。试验结果表明:①与负对照组相比,处理1组和处理2组平均日增重(ADG)和增重与饲料比(G/F)显著提高( $P<0.05$ ),处理1组和处理2组之间无显著差异( $P>0.05$ ),但ADG和G/F均以处理2组较高;各处理组间仔猪的平均日采食量(ADFI)无显著差异( $P>0.05$ )。②添加植酸酶或植酸酶和有机酸不影响粗蛋白(CP)的表观消化率和血清尿素氮(SUN)浓度( $P>0.05$ )。总之,仔猪断奶阶段,在玉米—豆粕型基础日粮中添加植酸酶或植酸酶和有机酸代替部分磷酸氢钙,仔猪的生长性能与含正常无机磷水平的正对照组相比无显著差异,500 U/kg植酸酶或500 U/kg植酸酶和0.35%柠檬酸足以代替仔猪日粮中50%磷酸氢钙,但植酸酶和有机酸对于提高仔猪生长性能不存在显著的协同效应。

**关键词** 植酸酶;有机酸;仔猪;生长性能

**中图分类号** S816.3

在猪日粮中使用的植物籽实及谷物中,大约60%~70%的磷以植酸磷的形式存在,由于猪消化道没有足够的植酸酶来充分水解植酸磷,所以植酸磷只有部分被猪利用(Cromwell,1993),因此,在猪日粮中添加微生物植酸酶来释放被束缚的磷已成为人们关注的研究课题(Lei等,1993a、b;Kornegay和Qian,1996)。具有生物活性的植酸酶通过分解植酸,解除了其对钙、磷、蛋白质、微量元素、维生素等营养物质的络合作用,提高了饲料潜在的营养价值,降低饲料中无机磷的添加量,相对降低了饲料成本,提高生长性能。

由于大多数微生物植酸酶在pH值为2.5、5.5时活性最高,添加有机酸可提供一个有利于植酸酶水解植酸的胃肠pH值,同时还可降低胃排空速度,延长植

酸酶对底物的作用时间。因此,理论上添加有机酸可以提高植酸酶的活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验动物

试验选用35日龄断奶的杜×长×大三元杂交仔猪72头,平均初始体重(8.76±0.28)kg。采用单因子完全随机区组设计,按体重相近、遗传基础相似的原则随机分为4组,每组以圈为单位设3个重复,每个重复6头猪(阉公猪3头、母猪3头)。正式试验开始前,所有猪饲喂同一低磷饲料(不加磷酸氢钙的对照组饲料)7d,以耗竭猪体内的磷贮存。试验期28d。

### 1.2 植酸酶的来源及特性

由德国巴斯夫公司提供,植酸酶酶活为5000 U/g。

### 1.3 试验日粮

试验基础日粮为玉米—豆粕型日粮,其组成和营养水平按林映才等(2002)建议的瘦肉型猪8~20kg的营养需要模式配制。基础日粮配方及营养水平见表1。

高俊杰,山西农业大学园艺学院,讲师,030801,山西太谷。

车向荣,山西农业大学动物科技学院。

收稿日期:2006-10-04



表 1 基础日粮配方及营养水平

原料	含量(%)
玉米	66.35
豆粕	30.41
石粉	1.00
赖氨酸	0.30
蛋氨酸	0.03
磷酸氢钙	1.43
食盐	0.31
预混料	0.20
营养水平	
DE(MJ/kg)	13.80
CP(%)	18.02
Ca(%)	0.80
非植酸磷(%)	0.36
Lys(%)	1.15
Met(%)	0.29
食盐(%)	0.30
总磷(%)	0.59

注:1.营养成分中 CP、Ca、总磷为实测值,其它为计算值;  
2.预混料为全价料,提供所规定的微量元素和维生素的需要量。

### 1.4 试验设计

试验在饲料钙水平相同基础上共设 4 个组,即正对照组,添加磷酸氢钙满足有效磷需要;负对照组,减少正对照组磷酸氢钙添加量的 50%;处理 1 组添加植酸酶,替代正对照组磷酸氢钙添加量的 50%;处理 2 组添加植酸酶和有机酸,替代正对照组磷酸氢钙添加量的 50%。植酸酶添加水平为 500 U/kg。用石粉补足钙,剩余的空间由沸石粉补足。有机酸为柠檬酸,添加水平为 0.35%。

### 1.5 饲养方法与管理

预试期和正试期每天定时饲喂,各组供试猪自由采食、饮水。随时观察供试猪的食欲、精神状况、粪便等情况。试验期间,按常规免疫程序进行免疫,并采用多种方式进行消毒。

### 1.6 测定项目与方法

试验期间每周清晨空腹称体重一次。称重前 1 d 晚上 8:00 停食,次日清晨 8:00 逐个称重。并以圈为单位结算相应试验期猪的耗料情况,计算平均日增重、日采食量和料重比。

在试验结束称重前每圈固定 2 头猪(1 头公猪、1 头母猪),分别从前腔静脉采血 10 ml 于离心管中,倾斜放置 4 h 后,离心 10 min(约 3 000 r/min),分离血清,分装 3 份于 -20 °C 下保存备用,用以测定血清尿素氮(BUN)含量。

### 1.7 数据分析处理

利用 Excel 对原始数据初步分析,再用 SAS 软件对试验结果进行方差分析和邓肯氏多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 植酸酶和有机酸对仔猪生长性能的影响(见表 2)

表 2 植酸酶和有机酸对猪生长性能的影响

项目	正对照组	负对照组	处理 1 组	处理 2 组
ADG(kg/d)	0.398±0.051 <sup>a</sup>	0.372±0.030 <sup>a</sup>	0.416±0.047 <sup>b</sup>	0.423±0.045 <sup>b</sup>
ADFI(kg/d)	0.717±0.061 <sup>a</sup>	0.719±0.048 <sup>a</sup>	0.730±0.077 <sup>a</sup>	0.731±0.052 <sup>a</sup>
G/F	0.555±0.020 <sup>ab</sup>	0.517±0.017 <sup>a</sup>	0.570±0.031 <sup>b</sup>	0.579±0.013 <sup>b</sup>

注:同行数据中,肩标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。

由表 2 可知,仔猪的 ADG 和 G/F 均以处理 2 组最高,负对照组最低。各项指标处理 2 组和处理 1 组均显著高于负对照组(P<0.05),但与正对照组相比差异不显著(P>0.05)。对于 ADFI 而言,正、负对照组与各处理组之间差异不显著(P>0.05)。所测 3 项指标,处理 1 组和处理 2 组之间均无显著差异。

### 2.2 植酸酶和有机酸对仔猪粗蛋白表观消化率及血清尿素氮浓度的影响

表 3 植酸酶和有机酸对粗蛋白表观消化率和血清尿素氮浓度的影响

项目	正对照组	负对照组	处理 1 组	处理 2 组
粗蛋白(%)	75.67±4.33 <sup>a</sup>	74.28±5.15 <sup>a</sup>	76.57±3.93 <sup>a</sup>	77.38±6.07 <sup>a</sup>
血清尿素氮(mmol/l)	3.28±0.56 <sup>a</sup>	3.35±1.03 <sup>a</sup>	3.49±1.54 <sup>a</sup>	3.38±0.83 <sup>a</sup>

由表 3 可见,仔猪断奶阶段日粮中添加植酸酶和有机酸代替无机磷(处理 2 组)对仔猪粗蛋白的表观消化率的影响与其它各组相比无显著差异(P>0.05)。处理 2 组和处理 1 组血液尿素氮浓度高于正对照组,而正对照组略低于负对照组,但差异均不显著(P>0.05)。

## 3 讨论

有很多学者进行了植酸酶和有机酸对猪生产性能影响的研究,但试验结果存在分歧。本研究发现,添加植酸酶组或添加植酸酶和有机酸组的仔猪平均日增重与含正常无机磷水平的正对照组相比无显著差异,显著高于低磷的负对照组,说明在低磷日粮中添加植酸酶有助于提高仔猪的生长性能。Sefer 等在断奶仔猪可利用磷含量为 0.36%和 0.24%的日粮中添加 1 000 U/kg 植酸酶,仔猪平均日增重比对照组(含可利用磷 0.36%) 分别提高了 11%和 12%,料肉比降低了 8%~9%。Adeols 等曾对断奶仔猪进行过添加植酸酶的试验,结果表明,添加植酸酶组猪的增重效果显著提高,且饲料效率也提高。但这一结果与 Radcliffe 等(1998)在仔猪玉米—豆粕型基础日粮中添加微生物植酸酶和柠檬酸对仔猪的生长性能无显著改善作用的结果相反。与之相似,Han 等(1998)也发现,植物植酸

酶、微生物植酸酶以及柠檬酸对小猪平均日增重和平均日采食量无促进作用。Omogbenigun 等的研究也表明,在可利用磷降低 0.1% 的负对照日粮中添加植酸酶和有机酸对仔猪生长性能无改善作用,可能是因为负对照组日粮中除磷水平低外,其它营养物质都能充分满足仔猪的生长需要。在这种情况下,添加微生物植酸酶和有机酸,可能只提高植酸磷的利用率,不能提高其它营养物质的利用率,因而对生长无改善作用。

本试验还表明,同时添加植酸酶和有机酸比单独添加植酸酶对于提高增重和饲料转化率效果略好,但二者不存在显著的协同效应。Grela 等报道,在妊娠母猪日粮中同时添加植酸酶(500 PU/kg)和甲酸(10 g/kg)对于乳品质以及仔猪初生和断奶重效果略好于单独添加植酸酶(500 PU/kg)的。Jongbloed 等(1996)的试验也表明,植酸酶和有机酸(甲酸和乳酸)在提高生长猪日增重和饲料转化率上不存在协同效应,在提高磷和镁的消化率上有协同效应。但陈冬梅对肉鸡的试验则表明,植酸酶与柠檬酸合用能进一步提高生产性能,二者存在协同效应。

粗蛋白消化率和血液尿素氮浓度是衡量蛋白质和氨基酸消化、代谢状况的一个指标。本试验表明,在仔猪断奶阶段,与对照组相比,添加植酸酶或植酸酶和有机酸代替基础日粮中部分磷酸氢钙的两个处理组粗蛋白消化率有升高的趋势,但差异不显著。关于植酸酶对氮消化代谢的影响,许多报道存在很大分歧。Gagne 等报道,在生长—肥育猪日粮中添加 584 U/kg 微生物植酸酶不影响猪对能量和蛋白质的利用率( $P > 0.05$ ),可能会促进生长肥育猪对  $\alpha$ -AA( $\alpha$ -氨基酸)的吸收,但降低蛋白质沉淀( $P < 0.05$ )。Paditz 等的试验也表明,添加植酸酶不会影响粗蛋白的消化率,但是,许多研究表明,日粮添加 500 FTU/kg 微生物植酸酶提高了蛋白质的生物可利用性。

关于植酸酶或植酸酶和有机酸对猪血液尿素氮浓度的影响也存在分歧。Johnston 等报道,添加植酸酶的同时降低日粮中钙、磷含量,提高了猪血清尿素氮和  $\alpha$ -AA 氮的浓度。但本试验与 Shelton 等的研究结果均表明,添加植酸酶或植酸酶和有机酸对血液尿素氮浓度的影响无显著差异。

本试验表明,微生物植酸酶和有机酸可以减缓断奶仔猪对无机磷的需要,添加 500 U/kg 植酸酶和 0.35% 柠檬酸可以完全代替仔猪日粮中 50% 的无机磷。然而,植酸酶和有机酸是否能进一步提高日粮中其它营养物质的利用率以及在提高日粮其它营养物

质的利用率方面有无协同效应还有待于进一步研究。

#### 参考文献

- 1 陈冬梅. 植酸酶和柠檬酸对肉鸡生产性能及钙、磷利用率的影响[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(4): 9-12
- 2 Adeola O. B V Lawrance, A. L. Suttisn, T. R. Cline. Phytase-induced changes in mineral utilization in zinc-supplemented diets for pigs. J Anim. Sci., 1995, 73: 384-391
- 3 Cromwell G L. Efficacy of phytase in improving the bioavailability of phosphorus in soybean meal and corn-soybean meal diets for pigs. J. Anim. Sci., 1993, 71: 1 831-1 840
- 4 Gagne F. The effect of microbial phytase and feed restriction on protein, fat and ash deposition in growing-finishing pigs. Canadian Journal of Animal Science, 2002, 82(4): 551-558
- 5 Grela E R. Effect of feed supplementation with phytase and formic acid on piglet performance and the composition of sow colostrums and milk. Medycyna Weterynaryjna, 2002, 58(5): 375-377
- 6 Han Y M, et al. Adding wheat middlings, microbial phytase, and citric acid to corn-soybean meal diets for growing pigs may replace inorganic phosphorus supplementation. J. Anim. Sci., 1998, 76: 2 649-2 656
- 7 Jongbloed A W. The effects of organic acids in diets for growing pigs on the efficacy of microbial phytase. In: Phytase in Animal Nutrition and Waste Management (ED. M. B. Coelho and E. T. Kornegay). BASF Corp, Mount Olive, NJ. PP., 1996, 515-524
- 8 Kornegay E T, H. Qian. Replacement of inorganic phosphorus by microbial phytase for young pigs fed on a maize soybean meal diet. Br. J. Nutri., 1996, 76: 563-578
- 9 Kornegay E T. Influence of phytase and diet composition on phosphorus and amino acid digestibility and phosphorus and nitrogen excretion in swine. In: BASF Tech. Symp, Carolina Awine Nutr. Conf., Durham, NC. PP., 1998, 125-155
- 10 Lei X G. Supplementing corn-soybean diets with microbial phytase linearly improves phytate phosphorus utilization by weaning pigs. J. Anim. Sci., 1993a, 71: 3 359-3 367
- 11 Lei X G. Supplementing corn-soybean diets with microbial phytase linearly improves phytate phosphorus utilization by weaning pigs. J. Anim. Sci., 1993b, 71: 3 368-3 375
- 12 Omogbenigun F O, C. M. Nyachoti, B. A. Sloominski. The effect of supplementing microbial phytase and organic acids to a corn-soybean based diet fed to early-weaned pigs, J. Anim. Sci., 2003, 81: 1 806-1 813
- 13 paditz K, H. Kluth, M. Rodehutschord. Relationship between graded doses of three graded doses of three microbial phytases and digestible phosphorus in pigs. Animal Science, 2004, 78: 429-438
- 14 Raddiffe J S, et al. the effect of microbial phytase, citric acid and their interaction in a corn-soybean meal-based diet for weanling pigs. J. Anim. Sci., 1998, 76: 1 880-1 886
- 15 Sefer, D. Performances of piglets supplemented with phytase enzyme. Biotechnology in Animal Husbandry, 2000, 16(5/6): 25-30
- 16 Shelton J. L. L., Southern T D, Bidner M A, et al. Effect of microbial phytase on energy availability, and lipid and protein deposition in growing swine. J. Anim. Sci., 2003, 81: 2 053-2 062
- 17 S. L. Johnston, S. B. Williams, L. L. Southern, et al. Effect of phytase addition and dietary calcium and phosphorus levels on plasma metabolites and ileal and total-tract nutrient digestibility in pigs, J. Anim. Sci., 2004, 82: 705-714
- 18 Yi Z. Supplemental microbial phytase improves zinc utilization in broilers. Poultry Sci., 1996, 75: 540-546

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

# 肉鸡饲料能量水平对植酸酶作用效果的影响

李宗付 陈代文 余冰

**摘要** 试验选用324只1日龄AA肉鸡(公鸡),采用3×2因子设计,研究在不同能量水平的饲料中添加植酸酶对肉鸡生长性能和养分利用率的影响。试验设3个能量水平(12.33、12.13、12.03 MJ/kg)和2个酶水平(0、500 FTU/kg),共计6个处理组,每个处理组6个重复,每个重复9只鸡,试验期42 d。结果表明:饲料添加植酸酶显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )提高了肉鸡日增重、采食量,改善了饲料利用率,提高了干物质、粗蛋白、钙、磷的利用率,但对能量利用率没有明显影响( $P>0.05$ );降低饲料能量水平极显著降低了肉鸡对干物质、能量、钙的利用率( $P<0.01$ ),显著降低了其对磷的利用率( $P<0.05$ ),但对生产性能和粗蛋白利用率没有显著影响( $P>0.05$ );植酸酶和能量对肉鸡饲料利用率、干物质和钙的利用率存在显著的交互作用( $P<0.05$ ),表现为处理2组能量水平条件下添加植酸酶在生长性能和养分利用率上改善幅度最大,表明植酸酶在适宜降低能量水平的饲料中的作用效果更好。试验中,以能量水平为12.13 MJ/kg的肉公鸡饲料中添加500 FTU/kg植酸酶(处理5组)为最佳组合。

**关键词** 植酸酶;能量;生长性能;养分利用率;肉鸡

**中图分类号** S816.32

植酸能与植物饲料原料中60%~75%的磷之间形成螯合物,能与Ca、Mg、Fe、Mn、Zn、淀粉、蛋白质等形成螯合物,甚至还与胃肠道的蛋白酶、淀粉酶等消化酶结合成复合物,降低其活性和饲料的养分利用率(Singh, 1982)。开发利用植酸酶以减少无机磷的添加量,提高饲料中植酸磷的利用率和减少环境污染,是当前动物营养学中的研究热点之一。植酸酶在畜禽饲料中的应用效果受很多因素影响,大量试验都表明,日粮组成及营养水平对植酸酶作用效果有一定的影响,但当前关于日粮能量水平对植酸酶作用效果的影响研究报道很少,因此本试验拟通过在不同能量水平的玉米—豆粕型肉鸡饲料中添加植酸酶,来考察饲料添加植酸酶对肉鸡生产性能及养分利用率的影响,这对于积累营养与植酸酶之间互作规律的有关参数、开发植酸酶潜在营养价值、植酸酶在肉鸡饲料中的合理应用具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

本试验采用3×2设计,在3种能量水平(12.33、12.13、12.03 MJ/kg)的基础日粮中分别添加植酸酶0、500 FTU/kg,来考察植酸酶对肉鸡生产性能及养分利用率的影响。试验共6个处理组,每个处理组6个重复,每个重复9只鸡,试验从肉鸡1日龄时开始,共进行6周。试验设计见表1。

表1 试验设计

处理组	1组(对照)	2组	3组	4组	5组	6组
植酸酶水平(FTU/kg)	0	0	0	500	500	500
能量水平(MJ/kg)	12.33	12.13	12.03	12.33	12.13	12.03

植酸酶由四川禾本生物工程有限公司提供,酶活为5 000 U/g。酶活单位(Fytase unit)的定义:在37℃、pH值5.5的条件下,每分钟从0.005 1 mol/l的植酸钠溶液中释放出1 μmol无机磷所需要的植酸酶的量为一个酶活单位。

### 1.2 基础日粮

试验日粮选用玉米、豆粕为主要原料,营养标准参考我国肉鸡饲养标准(1986)和NRC(1994),通过调整豆油和米糠的比例来配制饲料不同的能量水平,同时保证不同处理间其它营养成分一致。在处理1组、处理2组、处理3组试验日粮基础上分别添加500 FTU/kg植酸酶即为处理4组、处理5组、处理6组的试验日粮。植酸酶的添加方法:按照试验设计称取不同剂量

李宗付,四川农业大学动物营养研究所,625014,四川雅安。

陈代文、余冰,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-19

的植酸酶,分别加入少量试验日粮作为稀释剂混匀后,再逐级放大混匀于试验日粮中。所有饲料于饲养

前一次配齐,密封包装,于干燥凉爽地方保存。试验日粮组成及营养水平见表2。

表2 试验基础日粮组成及营养水平

饲料原料(%)	前期(周)			后期(周)		
	1	2	3	1	2	3
玉米	54.95	54.95	54.95	62.30	62.30	62.30
豆粕	37.97	37.97	37.97	32.05	32.05	32.05
鱼粉	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
米糠	0.00	0.60	0.84	0.00	0.60	0.84
胆碱	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
食盐	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
大豆油	2.93	2.33	2.09	1.80	1.20	0.96
碳酸钙	0.30	0.30	0.30	0.50	0.50	0.50
磷酸氢钙	1.25	1.25	1.25	0.85	0.85	0.85
蛋氨酸	0.20	0.20	0.20	0.10	0.10	0.10
预混料添加剂	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
合计	100	100	100	100	100	100
营养水平						
ME(MJ/kg)	12.33	12.13	12.03	12.33	12.13	12.03
CP(%)	21.00	21.00	21.00	19.00	19.00	19.00
Ca(%)	1.00	1.00	1.00	0.90	0.90	0.90
TP(%)	0.70	0.70	0.70	0.59	0.59	0.59
AP(%)	0.45	0.45	0.45	0.35	0.35	0.35
Lys(%)	1.20	1.20	1.20	1.00	1.00	1.00
Met(%)	0.52	0.52	0.52	0.39	0.39	0.39
M+C(%)	0.85	0.85	0.85	0.70	0.70	0.70

注:预混料添加剂提供肉鸡所需的全部微量元素和维生素,向每千克饲料提供微量元素为:Fe 80 mg、Cu 8 mg、Mn 80 mg、Zn 80 mg、I 0.35 mg、Se 0.15 mg。向每千克饲料提供多维 500 mg,多维组成(每千克):VA 50 000 000 IU、VD<sub>3</sub> 10 000 000 IU、VE 25 000 IU、VK<sub>3</sub> 5 000 mg、VB<sub>1</sub> 2 000 mg、VB<sub>2</sub> 16 000 mg、VB<sub>6</sub> 6 000 mg、VB<sub>12</sub> 30 mg、烟酸 35 000 mg、泛酸钙 25 000 mg、叶酸 500 mg、抗氧化剂 500 mg。

### 1.3 试验动物及饲养管理

324 只 1 日龄 AA 肉鸡(公鸡)按体重相近的原则随机分成 6 组,每组 6 个重复,每个重复 9 只鸡,按照常规方法进行饲养及免疫。

### 1.4 代谢试验

采用 Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 法,试验第 14 d 称完体重后,让所有试鸡采食含指示剂的饲料(加入 0.4%的 Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>),预试期 3 d,正式收粪期 4 d(第 17、18、19、20 d)。每日收集集粪盘上的排泄物 4 次,按重复混合均匀。按 5%的比例加入 5%的硫酸,并滴加甲苯防腐,混匀并置于 -20 ℃ 冰箱保存。分析前,先将粪样解冻,充分混匀后,在 (60±5) ℃ 烘箱中烘干,粉碎过 40 目筛,于 -20 ℃ 冰箱保存供分析使用。

### 1.5 考察指标

#### 1.5.1 生产性能

分别于每周早晨 8:00,以每个重复为单位空腹称重;计算各生长阶段的平均日增重(ADG)。在称重前,

以重复为单位结算采食量,计算每个重复的平均采食量(ADFI)。根据 ADG 和 ADFI 计算饲料转化率。

#### 1.5.2 养分利用率

测定饲料及粪样品中的 DM、CP、GE、Ca、P 的含量。DM 用 (105±20) ℃ 的恒温箱恒重测定;CP 用半微量凯氏定氮法测定;GE 采用氧弹测热法测定;Ca 采用 KMnO<sub>4</sub> 滴定法测定;P 采用钼黄法测定 [测定方法详见杨胜主编《饲料分析及饲料质量检测》(1993)];饲料及粪样品中 Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 含量采用分光光度法测定。

养分表观利用率(%)=100-[(日粮中 Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 含量 × 粪中营养物质含量)/(粪中 Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 含量 × 日粮中营养物质含量)]。

#### 1.6 数据处理

计算平均数±标准差(X±SD)表示试验结果,采用 SPSS12.0 统计软件对数据进行方差分析和多重比较。

## 2 试验结果与分析

### 2.1 植酸酶和能量对肉鸡生长性能的影响(见表 3)

表3 植酸酶和能量对肉鸡生长性能的影响

项目	处理1组	处理2组	处理3组	处理4组	处理5组	处理6组	植酸酶	能量	交互	
平均始重(g)	34.80±0.23	34.70±0.45	34.80±0.42	34.70±0.45	34.70±0.29	34.80±0.55				
ADG(g/d)	1-3W	16.07±0.80 <sup>ab</sup>	14.94±1.13 <sup>bc</sup>	14.73±1.30 <sup>c</sup>	16.29±0.49 <sup>a</sup>	15.92±0.46 <sup>abc</sup>	15.89±0.95 <sup>abc</sup>	P<0.05	NS	NS
	4-6W	57.02±1.82 <sup>ABb</sup>	52.75±3.54 <sup>Bb</sup>	57.50±4.05 <sup>ABb</sup>	63.77±5.27 <sup>Aa</sup>	64.53±4.36 <sup>Aa</sup>	63.06±6.50 <sup>Aa</sup>	P<0.01	NS	NS
	1-6W	36.55±1.06 <sup>ABbc</sup>	33.91±1.74 <sup>Bc</sup>	36.12±2.64 <sup>ABbc</sup>	40.03±2.86 <sup>Aa</sup>	40.23±2.22 <sup>Aa</sup>	39.47±3.28 <sup>Ab</sup>	P<0.01	NS	NS
ADFI(g/d)	1-3W	28.18±1.37	26.51±1.95	27.77±3.61	28.74±1.60	28.25±1.34	26.14±2.67	NS	NS	NS
	4-6W	112.12±4.34 <sup>ABbc</sup>	107.84±3.22 <sup>Bc</sup>	114.22±6.04 <sup>ABbc</sup>	122.80±8.40 <sup>Aa</sup>	118.22±9.22 <sup>ABab</sup>	120.08±11.09 <sup>ABab</sup>	P<0.01	NS	NS
	1-6W	70.15±2.08 <sup>ABab</sup>	67.18±0.98 <sup>Bb</sup>	71.00±4.71 <sup>ABab</sup>	75.77±4.97 <sup>Aa</sup>	73.23±4.52 <sup>ABa</sup>	73.11±6.23 <sup>ABa</sup>	P<0.01	NS	NS
F/G	1-3W	1.76±0.09 <sup>b</sup>	1.78±0.02 <sup>ab</sup>	1.88±0.11 <sup>a</sup>	1.76±0.06 <sup>b</sup>	1.78±0.07 <sup>ab</sup>	1.64±0.12 <sup>c</sup>	P<0.05	NS	P<0.01
	4-6W	1.97±0.05 <sup>ab</sup>	2.05±0.10 <sup>a</sup>	1.99±0.04 <sup>ab</sup>	1.93±0.03 <sup>bc</sup>	1.84±0.11 <sup>c</sup>	1.91±0.07 <sup>bc</sup>	P<0.01	NS	P<0.05
	1-6W	1.92±0.05 <sup>abc</sup>	1.98±0.08 <sup>a</sup>	1.97±0.03 <sup>ab</sup>	1.89±0.02 <sup>bcd</sup>	1.82±0.09 <sup>d</sup>	1.91±0.08 <sup>cd</sup>	P<0.01	NS	P<0.05

注:同行肩标不同小写字母者表示差异显著(P<0.05),肩标不同大写字母者表示差异极显著(P<0.01),重复 n=6。

表3显示,处理4组与对照组相比,全期ADG、后期ADG和ADFI显著提高(P<0.05),其它阶段ADG、ADFI及各阶段F/G差异不显著(P>0.05);处理5组与处理2组相比,前期生产性能各项指标差异不显著(P>0.05),后期和全期ADG(P<0.01)、ADFI(P<0.05)分别极显著和显著提高,F/G显著下降(P<0.05);处理6组与处理3组相比,后期ADG显著提高(P<0.05),前期和全期F/G显著下降(P<0.05),其它各阶段生产性能各项指标差异不显著(P<0.05)。从全期各项指标提高的幅度来看,饲粮添加植酸酶后,处理4组与对照组相比,全期ADG、ADFI分别提高了9.52%、8.01%,F/G降低了1.56%;处理5组与处理2组相比,全期ADG、ADFI分别提高了18.64%、9.01%,F/G降低了8.08%;处理6组

与处理3组相比,全期ADG、ADFI分别提高了9.27%、2.97%,F/G降低了3.05%。从试验总体来看,其中以处理5组肉公鸡生产性能各项指标提高的幅度最大。

因素分析表明,饲粮添加植酸酶除了对肉鸡前期ADFI没有显著影响外,显著(P<0.05)或极显著(P<0.01)提高了各阶段ADG、ADFI(除肉鸡前期),降低了F/G;能量对肉鸡各阶段生产性能均无显著性影响(P>0.05),但与对照组相比,处理3组前期ADG显著下降(P<0.05)、F/G显著增加(P<0.05)。能量和植酸酶对各阶段F/G存在交互作用,表现为在处理2组能量水平条件下添加植酸酶(处理5组)在生长性能上改善幅度最大,但对其它指标交互作用影响不显著(P>0.05)。

## 2.2 植酸酶和能量对肉鸡养分消化率的影响(见表4)

表4 植酸酶和能量对肉鸡养分消化率的影响

项目	处理1组	处理2组	处理3组	处理4组	处理5组	处理6组	植酸酶	能量	交互
DM(%)	67.46±1.13 <sup>ABa</sup>	65.83±1.53 <sup>BCb</sup>	65.04±0.96 <sup>Cb</sup>	67.99±0.48 <sup>Aa</sup>	68.40±1.76 <sup>Aa</sup>	65.17±0.52 <sup>Cb</sup>	P<0.01	P<0.01	P<0.05
GE(%)	73.69±0.58 <sup>Aa</sup>	71.43±1.11 <sup>ABbcd</sup>	70.84±0.71 <sup>Bcd</sup>	72.62±1.13 <sup>ABabc</sup>	72.92±2.28 <sup>ABab</sup>	70.57±0.66 <sup>Bd</sup>	NS	P<0.01	NS
CP(%)	55.20±1.67 <sup>Bc</sup>	54.76±2.80 <sup>Bc</sup>	54.90±1.56 <sup>Bc</sup>	59.91±1.71 <sup>Ab</sup>	60.75±2.45 <sup>Aa</sup>	57.68±3.44 <sup>ABbc</sup>	P<0.01	NS	NS
Ca(%)	52.11±3.64 <sup>A</sup>	44.68±3.95 <sup>B</sup>	46.70±3.51 <sup>B</sup>	53.96±2.67 <sup>A</sup>	52.60±3.23 <sup>A</sup>	53.19±2.66 <sup>A</sup>	P<0.01	P<0.01	P<0.05
P(%)	52.66±1.13 <sup>B</sup>	51.88±1.68 <sup>B</sup>	51.36±1.14 <sup>B</sup>	56.10±2.76 <sup>A</sup>	56.62±3.20 <sup>A</sup>	52.56±1.84 <sup>B</sup>	P<0.01	P<0.05	NS

注:同行肩标不同小写字母者表示差异显著(P<0.05),肩标不同大写字母者表示差异极显著(P<0.01),重复 n=6。

由表4可知,与对照组相比,处理2组的DM、GE和Ca的消化率显著或极显著下降(P<0.05、P<0.01),CP和P的消化率在表观值上有下降趋势,但差异不显著(P>0.05);处理3组的DM、GE、Ca、CP和P的消化率变化规律和处理2组基本一致;处理4组与对照组相比,CP和P的消化率极显著提高(P<0.01);处理5组与处理2组相比,除GE消化率无显著差异外,其余指标均极显著提高(P<0.01);处理6组与处理3组相比,Ca消化率极显著提高(P<0.01),其余各项指标处理间差异不显著。从提高的幅度来看,处理4组与对照组相比,DM、CP、Ca、P的消化率分别提高了0.79%、8.53%、3.55%、6.53%;处理5组与处理2组相

比,上述指标分别提高了3.90%、10.94%、17.73%、9.14%;处理6组与处理3组相比,上述指标分别提高了0.20%、5.06%、13.90%、2.34%;其中以处理5组肉鸡养分消化率提高的幅度最大。

因素分析表明,饲粮添加植酸酶极显著提高了DM、CP、Ca和P的消化率(P<0.01);降低饲粮能量水平,显著(P<0.05)或极显著(P<0.01)降低了DM、GE、Ca和P的消化率。在对DM和Ca消化率的影响上,能量和植酸酶之间存在显著的交互作用(P<0.05),表现为处理5组肉鸡在养分利用率上改善幅度最大。

## 3 讨论

### 3.1 植酸酶和能量对肉鸡生长性能的影响

本试验表明,植酸酶极显著提高了肉鸡全期的日增重、采食量,改善了饲料利用率,这与前人研究结果基本一致(Qian,1996;Yi等,1996;Simons,1990;Nelson,1968,1971;Zhu,1990)。肉鸡生产性能的提高主要是由于饲料中添加植酸酶后提高了养分消化率,而采食量的增加也提高了肉鸡生长速度。本试验证明,饲料添加植酸酶后,肉鸡全期平均日采食量有所增加(处理4组较处理1组、处理5组较处理2组、处理6组较处理3组分别提高了8.01%、9.01%、2.97%),其机制可能是磷消化率的改善提高了肉鸡的采食量,因为磷不足明显影响动物食欲(杨凤,1993)。就全期来看,处理5组生产性能各项指标提高的幅度最大,处理6组生产性能各项指标改善幅度不如处理5组,这说明,一定的能量供给是植酸酶发挥最佳作用效果所必需的,而在适当降低能量的饲料中添加植酸酶作用效果更好,这是因为在适当降低能量水平条件下,植酸酶对饲料养分利用率的改善幅度更大。张克英(2003)在仔猪上的试验也证实了这一点。值得一提的是,本试验饲料能量水平对生产性能和粗蛋白的消化率没有显著影响( $P>0.05$ ),这可能是因为本次试验中降低的能量水平不足以显著改变粗蛋白利用率,进而影响生产性能。

### 3.2 植酸酶和能量对肉鸡养分消化率的影响

植酸结合了饲料中60%~80%的磷和部分金属元素(Kies,2001),使钙、磷形成不溶性螯合物而不能被单胃动物利用,降低钙、磷的吸收(杨凤,1993);植酸酶的显著特性就是能够降解植物性饲料中的植酸盐,解除植酸盐对钙、磷的螯合作用,促进动物机体对钙、磷的协同吸收,提高钙、磷的利用率(Kies,2001)。植酸酶水解植酸释放出磷的同时,还可将与植酸络合的蛋白释放出来,便于消化道分泌的各种蛋白酶作用,提高氨基酸或多肽的吸收率和利用率(John,1997),从而提高蛋白质消化率。本试验结果表明,肉鸡饲料中添加植酸酶极显著提高了DM、CP、Ca和P的消化率,这与前人的研究结论相符(Yi等,1996;Simons,1990;Kies,2001;Ravindran,2001)。DM、CP、Ca和P的消化率均以处理5组提高的幅度最大,这与处理5组生产性能各项指标提高的幅度最大是一致的。

植酸酶对饲料能量消化率的研究报道较少,理论上添加植酸酶可以提高饲料的消化率和代谢率(Kies,2001)。这是因为植酸盐能够与胃肠道中蛋白分解酶(如胃蛋白酶、胰蛋白酶)结合形成复合物(Singh,1982),还可络合淀粉酶、脂肪酶,从而降低消化酶的活性,添加植酸酶可提高消化酶的活性,改善有机物

及能量消化率。同时,磷和蛋白质利用率的改善相应会提高能量代谢率,因为磷是能量代谢的参与者,是ATP、磷酸肌酸的组成成分,而蛋白质利用率的提高将减少氨基酸分解代谢和尿素形成与排泄的能量消耗量(Brody,1994)。饲料添加植酸酶提高能量利用率在家禽上的研究已得到了证实(Ravindran等,2000;Kies,2001;袁中彪,2001)。本试验没有发现植酸酶对能量消化率的改善作用,原因可能是植酸酶对能量利用率的影响比较小。Kies(2001)报道的估测数据表明,添加500 FTU/kg植酸酶使家禽AME值大约提高1.5%,这一微小作用容易在试验中被试验误差掩盖,还可能与能量因素有关。本试验表明,降低能量水平极显著降低能量的利用率,因此植酸酶对能量消化率的改善作用很有可能不足以抵消降低能量水平带来的负效应,使得植酸酶的改善效应未能显著体现出来,至于确切原因,尚需进一步研究。

### 参考文献

- 1 A. K. Kies, K. H. F. VAN HEMERT, W. C. SAUER. Effect of phytase on protein and amino acid digestibility and energy utilization. *World's Poultry Science Journal*, 2001(7):57
- 2 Brody T. *Nutrition Biochemistry*. Academic Press. Inc., 1994
- 3 Nelson T S, Schieh T R, Wodzinski R J, et al. The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poul. Sci.*, 1968, 47: 1 842-1 848
- 4 Qian H.E. T. Kornegay, D. M. Denbow. Phosphorus equivalence of microbial phytase in turkey diets as influenced by calcium to phosphorus ratios and phosphorus levels. *Poul. Sci.*, 1996, 75 :69-81
- 5 Ravindran V, Selle PH Ravindran G. microbial phytase Improve performance, AME, and ideal amine acid digestibility of broiler fed a lysine deficient diet. *Poultry Science*, 2001, 80(3) :338-344
- 6 Simons P C M, Versteegh H A S. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Bri. J. Nutri.*, 1990, 64:525-540
- 7 Singh M, A. D. Krikorian. Inhibition of trypsin activity in vitro by phytase. *J. Agric. Food Chem.*, 1982, 30:799
- 8 Yi Z, Kornegay E T, Ravindran V, et al. Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broiler using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency values for phytase. *Poultry Science*, 1996, 75(2):240-249
- 9 Zhu X S, P. A. Seib, G. Allee. Preparation of a low-phytate feed mixture and bioavailability of its phosphorus to chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1990, 27:341-351
- 10 杨凤. 动物营养学[M]. 北京:中国农业出版社, 1993
- 11 杨胜. 饲料分析及饲料质量检测[M]. 北京:农业大学出版社, 1993
- 12 袁中彪. 纤维素复合酶、植酸酶和小麦酶对肉鸡生产性能和养分利用率的影响[D]. 四川农业大学硕士学位论文, 2001
- 13 张克英, 陈代文, 吴秀群. 仔猪饲料添加植酸酶对养分利用率的影响[J]. 四川畜牧兽医, 2003, 30(Z1):39-42

(编辑:高雁, [snowyan78@tom.com](mailto:snowyan78@tom.com))

# 酪蛋白酶解物对断奶仔猪免疫功能 及生长性能的影响

田喜山

**摘要** 试验选取 21 日龄杜×大×长断奶仔猪 30 头,分为对照组和试验组,对照组饲喂基础日粮,试验组仔猪每头每天在基础日粮的基础上添加 2 g 酪蛋白酶解物,研究酪蛋白酶解物对断奶仔猪免疫功能和生长性能的影响。试验结果表明,试验组仔猪血清中 IgA、IgG 和 IgM 的水平分别比对照组提高 15.85%( $P<0.01$ )、2.04%( $P>0.05$ )、7.89%( $P<0.05$ );试验组与对照组仔猪相比,血清补体 C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 水平差异不显著;对照组和试验组仔猪外周血淋巴细胞增殖率分别为 14.19%、22.52%,差异极显著 ( $P<0.01$ );试验组仔猪的日增重较对照组有明显的提高。

**关键词** 酪蛋白酶解物;仔猪;生产性能;免疫

**中图分类号** S816.32

仔猪从出生到哺乳阶段的前 21 d,机体主要靠由母乳获得的被动免疫来保护,随着母猪泌乳高峰期(3~4 周龄)的到来,仔猪由母乳获得的被动免疫力逐渐减弱,而此时仔猪的主动免疫功能还尚未完善,早期断奶会引起仔猪消化吸收受抑和机体免疫力显著降低。因此,改善和提高断奶仔猪的免疫功能就显得尤为重要。

酪蛋白是乳中含量最丰富的蛋白质,其一级结构中隐藏着多种生物活性肽序列,这些肽在体内或体外消化酶的作用下可被释放出来,表现其独特的生理功能。目前,人们已经从乳源酪蛋白中发现了阿片肽、抗菌肽、降血压肽、免疫调节肽等多种具有重要生理功能的活性肽。本研究通过体外酶解的方法,将水解得到的酪蛋白酶解物作为仔猪肠道营养剂,研究其对早期断奶仔猪生长性能及免疫功能的影响,以期仔猪培育提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

酪蛋白钠由上海工合食疗研究所分装,其中含蛋白质 88%、脂肪 1.5%、钠 1.2%;胰蛋白酶(PNT6.0S)由 Novo Nordisk 公司(北京分公司)提供。

### 1.2 酪蛋白酶解物的制备

在酪蛋白浓度 8%、胰蛋白酶与酪蛋白比为 0.02 (质量比)、pH 值 8、40 °C 的条件下,水解反应 2 h,反应过程中保持恒温并不断加入 1 mol/l NaOH 维持 pH 值恒定,水解反应结束后,水解液在沸水浴中灭酶

15 min,冷却后,回调 pH 值至 7.0,4 000 r/min 离心 30 min,将上清液经过真空浓缩后,冷冻干燥备用。

### 1.3 试验动物及分组

选取个体重约 5 kg 的 21 日龄杜×大×长断奶仔猪 30 头,按试验要求随机分成 2 组,对照组和试验组,每组设 3 个重复,每个重复 5 头(公母各半),自由饮水,对照组饲喂基础饲料,试验组每头仔猪每天另外添喂 2 g 酪蛋白酶解物,试验期 21 d。

### 1.4 试验饲料

基础饲料配方见表 1。

表 1 基础饲料组成

组成	含量(%)
玉米	55.7
膨化大豆	12.0
豆油	2.0
豆粕	18.3
鱼粉	4.0
乳清粉	4.0
预混料	4.0

### 1.5 样品的采集与检测

#### 1.5.1 耗料、仔猪体重的记录

试验期间,第 7、14、21 d 各组仔猪逐头称重与结料,以组为单位计算日增重(ADG)、日采食量(ADFI)和饲料增重比(F/G)。

#### 1.5.2 血样的制备

每组抽取一头仔猪前腔静脉采血约 10 ml,分两份作血样分析,一份按常规离心制备血清,将血清于 -20 °C 保存,另一份加肝素钠制全血。

#### 1.5.3 检测项目及方法

血清 IgA、IgG、IgM、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 水平采用试剂盒测定,

田喜山,吉林省伊通县职业教育中心,130700,吉林。

收稿日期:2006-06-19



试剂盒由宁波慈城生化试剂厂提供;T淋巴细胞增殖,采用E玫瑰花环形成法测定。

### 1.6 数据处理及结果判断

所得数据均以  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示,用 t 检验进行显著性检验。

## 2 结果

### 2.1 酪蛋白酶解物对ADG、ADFI和F/G的影响(见表2)

表2 酪蛋白酶解物对ADG、ADFI和F/G的影响

组别	ADG(g)	ADFI(g)	F/G
对照组	192±46.3	501±97.4	2.62±0.22
试验组	206±54.7*	524±63.1	2.57±0.16

注:\*,\*\* 分别表示与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )、极显著 ( $P < 0.01$ )。下表同。

由表2可见,试验组与对照组相比,断奶仔猪日增重提高7.29%,差异达到显著水平( $P < 0.05$ );试验组的日采食量高于对照组,而饲料增重比低于对照组,但差异均不显著( $P > 0.05$ )。

### 2.2 酪蛋白酶解物对血清抗体水平的影响(见表3)

表3 酪蛋白酶解物对血清抗体水平的影响(g/l)

抗体	对照组	试验组
IgA	0.82±0.04	0.95±0.07**
IgG	7.83±0.32	7.99±0.48
IgM	1.14±0.12	1.23±0.06*

由表3可见,酪蛋白酶解物对仔猪血清抗体水平具有一定的影响。试验组和对照组相比,试验组血清IgA和IgM水平分别比对照组提高15.85%( $P < 0.01$ )和7.89%( $P < 0.05$ );试验组比对照组血清IgG水平高2.04%,但差异不显著( $P > 0.05$ )。

### 2.3 酪蛋白酶解物对血清补体C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>的影响(见表4)

表4 酪蛋白酶解物对血清C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>的影响(g/l)

组别	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
对照组	0.224±0.025	0.422±0.033
试验组	0.231±0.016	0.439±0.018

由表4可见,酪蛋白酶解物能够提高仔猪血清的C<sub>3</sub>和C<sub>4</sub>水平,试验组比对照组分别提高了3.13%和4.03%,但差异不显著。

### 2.4 酪蛋白酶解物对淋巴细胞增殖的影响(见表5)

表5 酪蛋白酶解物对淋巴细胞增殖的影响

组别	增殖率(%)
对照组	14.19±2.76
试验组	22.52±4.08**

由表5可见,比较仔猪血液淋巴细胞增殖率,对

对照组和试验组分别为14.19%、22.52%,试验组比对照组提高58.70%( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

### 3.1 酪蛋白酶解物对仔猪生长性能的影响

酪蛋白经酶水解后能够释放出具有生物活性的小肽序列。这些生物活性肽能够有效地提高大鼠的体重,对仔猪的断奶应激具有缓解作用以及促进肠道益生菌——乳酸球菌的生长。另外,酪蛋白经过酶水解,除了释放出特定的生物活性肽以外,还伴有游离氨基酸的释放,其中含量较高的游离氨基酸,如精氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸等是动物的必需氨基酸,它们对促进动物机体的生长也具有良好的促进作用。本试验研究结果表明,酪蛋白酶解物对提高仔猪的平均日增重有明显效果,但哪些成分在促进仔猪生长方面起主要的作用,还有待进一步的研究。

### 3.2 酪蛋白酶解物对仔猪免疫功能的影响

免疫球蛋白的分泌和淋巴细胞活化是一个复杂的代谢过程,也是免疫系统抵御外来抗原的重要过程之一。酪蛋白的酶解产物中有多种生物活性肽,其中包括酪蛋白磷酸肽(Cpps)、酪啡肽等。Otani等在小鼠饲料中添加酪蛋白磷酸肽,试验组小鼠血清中的IgA水平明显高于对照组,认为口服酪蛋白磷酸肽能增强动物的黏膜免疫功能。Kitamura等给怀孕母猪饲喂酪蛋白磷酸肽后发现,试验组母猪血清和粪便的IgA含量都有明显提高趋势,并且仔猪血清中IgG含量也明显高于对照组,说明酪蛋白磷酸肽能够促进动物的免疫功能。酪啡肽能够促进大鼠淋巴细胞转化功能和红细胞免疫功能,并能够调整和改善仔猪早期断奶应激引起的内分泌水平的改变和免疫器官的发育。本试验中,试验组仔猪抗体水平的提高可能与这两种免疫调节活性肽的作用有关。

体外淋巴细胞转化水平反映了在刺激因子作用下淋巴细胞的分裂增殖能力,是机体细胞免疫功能的重要指标。本试验结果表明,酪蛋白酶解物可以提高断奶仔猪的外周血T淋巴细胞的增殖,这与潘翠玲等报道的结果一致。酪蛋白酶解物在体外能够促进ConA诱导的T淋巴细胞增殖,其作用机制可能是增殖因子与其受体结合后,活化细胞内存在的蛋白酪氨酸激酶通过G蛋白的介导活化第二信使,进而活化一系列信号转导系统,最终传递至细胞核内,启动DNA的复制,促进细胞增殖。

(参考文献13篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

# 黑曲霉固体发酵物对肉仔鸡日粮消化与直肠菌群作用效果的研究

程文晓 张福元

**摘要** 为评价黑曲霉固体发酵物(*Aspergillus niger solid culture*)的使用效果,试验采用单因子完全随机试验,设0.1%、0.2%、0.3%3个添加水平,并设抗生素组(硫酸粘杆菌素+黄霉素)。选用1日龄健康艾维茵肉仔鸡600只,分成5组,每组3个重复,每重复40只鸡,试验期49 d。试验结果表明:①对直肠微生物菌群的研究表明,0.1%和0.3%A.nigerSC显著降低了14日龄和35日龄肉仔鸡大肠杆菌的cfu数,与其它各处理组相比差异极显著(P<0.01)。各A.nigerSC添加水平极显著增加了肠道内黑曲霉菌的cfu值(P<0.01)。②0.1%A.niger SC显著提高了脂肪消化率,0.1%和0.2%A.niger提高了表观代谢率,0.3%提高了35日龄肉仔鸡氮沉积。

**关键词** 黑曲霉固体发酵物;肉仔鸡;消化率;直肠菌群

**中图分类号** Q814.9

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

黑曲霉固态发酵物由山西农大畜牧微生物实验室提供,其是利用产纤维素酶酶活高的黑曲霉 A.niger 3.3148 菌株发酵红三叶草 2 周后,低温干燥制得。黑曲霉 A.niger 3.3148 菌株最大特点是酶的活性高,其总酶活为 8 737 U/g,其中纤维素酶 2 000 U/g、果胶酶 1 560 U/g、糖化酶 396 U/g、酸性蛋白酶 196 U/g,其黑曲霉活菌数为  $4.6 \times 10^7$  cfu/g。

硫酸粘杆菌素和黄霉素,由中国农科院畜牧所挑战集团提供。

1 日龄健康艾维茵肉公雏 600 只,平均体重为  $(40.39 \pm 1.48)$  g,统计分析差异不显著,随机分为 5 个处理组,每个处理组 3 个重复,每个重复 40 只鸡。

试验日粮以玉米、豆粕为主要原料,按生长前期(1~21 d)和后期(22~49 d)两阶段配制试验日粮,各处理组除添加物及剂量不同外,其它各营养水平相同。各处理组基础日粮配方及营养水平见表 1。

表 1 肉仔鸡基础日粮配方及营养水平

原料(%)	1~21 d	22~49 d	营养水平	1~21 d	22~49 d
玉米	58.2	59.8	ME(MJ/kg)	13.17	13.38
豆粕	36	34	CP(%)	20.2	19.5
玉米油	2.1	2.4	钙(%)	1.24	1.26
磷酸氢钙	1.8	1.9	有效磷(%)	0.6	0.64
石粉	1.3	1.3	赖氨酸(%)	1.01	0.97
蛋氨酸	0.15	0.15	蛋氨酸(%)	0.57	0.57
食盐	0.3	0.3	蛋+胱(%)	0.82	0.82
微量元素	0.2	0.23			
多维	0.1	0.1			
合计	100	100			

注:1.每千克日粮中提供微量元素:Zn 37 mg、Fe 86 mg、Mn 100 mg、I 0.38 mg、Cu 8 mg、Co 0.18 mg、Se 0.3 mg。复合多维:VA 20 000 IU、VD 34 000 IU、VE 20 mg/kg、VB<sub>1</sub> 1.8 mg/kg、VK<sub>3</sub> 0.5 mg/kg、VB<sub>2</sub> 4 mg/kg、VB<sub>6</sub> 3.5 mg/kg、VB<sub>12</sub> 1.5 mg/kg、泛酸钙 10.99 mg/kg; 2.代谢能和粗蛋白为实测值,其余为计算值。

### 1.2 试验设计

试验以黑曲霉固体发酵物(A.niger SC)的添加水平为影响因素的单因子试验,采用完全随机设计。5 个处理组日粮分别为基础日粮(I)、基础日粮+0.1%A.niger SC(II)、基础日粮+0.2%A.niger SC(III)、基础日粮+0.3%A.niger SC(IV)、基础日粮+10%硫酸粘杆菌素 10 mg/kg+4%黄霉素 4 mg/kg(V)。试验期 49 d。

### 1.3 饲养管理

试验鸡饲养在同一栋鸡舍内,分 3 层笼养,鸡舍暖气供热,进鸡前 5 d 鸡舍用福尔马林进行熏蒸消毒。第 1 周室温为 33~35 ℃,第 2 周为 30 ℃,3 周后室温保持在 22 ℃。试鸡自由采食、饮水,7 日龄进行新城疫弱毒苗首疫,14 日龄进行法氏囊疫苗饮水免疫,21

程文晓,山西农业大学研究生学院动物营养与饲料科学实验室,030801,山西太谷。

张福元(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-27

★ 基金项目:应用生物技术的发展农林生态菌业研究(山西省科技攻关项目,031013)。

日龄进行新城疫弱毒苗二次饮水免疫,疫苗用量为首免的2倍。后期为自然环境条件饲养,24 h光照。试验期间经常观察鸡群精神和健康状况,做好称料和死亡等各项记录。

#### 1.4 测定指标及方法

##### 1.4.1 肠道微生物菌群数量的测定

分别在14、35、49日龄,每个重复取1只鸡,用来苏尔浸泡,实施急宰,迅速剖开腹腔,在无菌条件下,从直肠中取靠近粘膜部位的内容物,称重。然后用稀释液逐级稀释,使大肠埃希氏菌浓度分别为 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 和 $10^{-7}$ ,黑曲霉菌浓度分别为 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ ,每一平板作3个重复。大肠埃希氏菌用麦康凯培养基在37℃恒温箱中培养,黑曲霉菌用马丁培养基在27℃恒温箱中培养,稀释液为盐溶液+吐温80。细菌数量采用平板计数法进行统计,计算其cfu数,大肠杆菌数用cfu的对数表示,黑曲霉菌数用cfu/g表示。

##### 1.4.2 消化率的测定

分别在13~15、20~22、34~36日龄,以重复组为单位采集粪样,各期每天在下午17:00收粪1次,连续收集3 d,将采集的粪样立即存于-20℃冰箱中保存。将3 d收集的各重复组的粪样按比例混合,共15份样品。将15份样品置于瓷盘内,放于70℃烘箱内烘干48 h,取出后,冷却30 min,称重,继续烘干2 h,直至恒重为止。粪样烘干后,用粉碎机粉碎,过40目筛(圆孔筛孔径0.45 mm),充分混匀后放入有磨口的广口瓶中,贴上标签,供分析各项指标(表观代谢能、氮沉积、粗脂肪)用。取样后,将剩余粪样置于105℃烘箱内,达到恒重后测定其总能。日粮各种养分消化率和日粮代谢能测定和计算采用2 N酸不溶灰分内源指示剂法(杨诗兴,1982)。计算公式为:

$$\text{某养分消化率}(\%)=100-100\times b\times c/d\times a\times d$$

式中: $a$ ——饲料样品中某养分的百分含量;

$b$ ——粪样品中某养分的百分含量;

$c$ ——饲料样品指示剂占该组肉仔鸡采食量中指示剂的百分含量;

$d$ ——粪样品中指示剂占该组肉仔鸡采食量中指示剂的百分含量。

#### 1.5 数据处理

应用SPSS统计软件,对试验数据进行单因素方差分析和邓肯氏多重比较。

## 2 结果与讨论

2.1 A.niger SC对肉仔鸡各生长期直肠内大肠杆菌数的影响(见表2)

表2 各处理组肉仔鸡直肠内大肠杆菌数(cfu/g)

组别	14 d	35 d	49 d
I	7.86±0.25 <sup>b</sup>	8.11±0.09 <sup>a</sup>	8.18±0.01 <sup>a</sup>
II	7.38±0.15 <sup>a</sup>	8.00±0.06 <sup>a</sup>	7.51±0.16 <sup>b</sup>
III	7.85±0.13 <sup>b</sup>	7.93±0.14 <sup>a</sup>	8.17±0.03 <sup>a</sup>
IV	7.83±0.08 <sup>b</sup>	7.65±0.08 <sup>b</sup>	7.32±0.16 <sup>b</sup>
V	7.41±0.18 <sup>a</sup>	7.5±0.06 <sup>b</sup>	7.56±0.10 <sup>b</sup>

注:1.同一纵列肩标字母不同者表示差异显著( $P<0.05$ );

2.以每克内容物所含菌数的对数均值计,所用稀释倍数为 $10^{-4}$ 。

由表2可以看出,与I组相比,II组显著降低了肉仔鸡14日龄时直肠内大肠杆菌数( $P<0.05$ ),与V组相比差异不显著( $P>0.05$ ),与III、IV组相比差异显著( $P<0.05$ )。这说明0.1% A.niger SC有抑制肠道有害菌繁殖的作用,与V组效果相同,随着添加水平的提高并没有进一步降低大肠杆菌数。III、IV组与I组相比差异不显著( $P>0.05$ )。对35日龄数据统计分析表明,IV组显著降低了直肠大肠杆菌数,与I、II、III组相比差异显著( $P<0.05$ ),与V组相比差异不显著( $P>0.05$ ) (见图1)。49 d时,II、IV组及V组显著降低了直肠内大肠杆菌数,与I组和III组相比差异显著( $P<0.05$ ),但它们之间差异不显著( $P>0.05$ ); III组与I组相比差异不显著( $P>0.05$ )。总的来看,0.1%和0.3% A.niger SC降低了全期直肠大肠杆菌数,0.2% A.niger SC无显著效果。究其原因可能是在生长前期,发挥作用的主要是A.niger SC的酶成分,酶添加水平的提高可能对动物不利或产生了毒素,从而没有进一步降低大肠杆菌数。而在后期,由于A.niger SC中所含的A.niger在肠道内逐渐定植,使肠道微生物区系发生变化,所以综合全期情况,0.1%和0.3%的A.niger SC的添加量效果好。A.niger是需氧菌,生长环境要求不严格,虽不属于单胃动物正常菌群,但日粮中出现A.niger时,其能在肠道内定植,从而与大肠杆菌的生长发生竞争,达到抑菌效果。

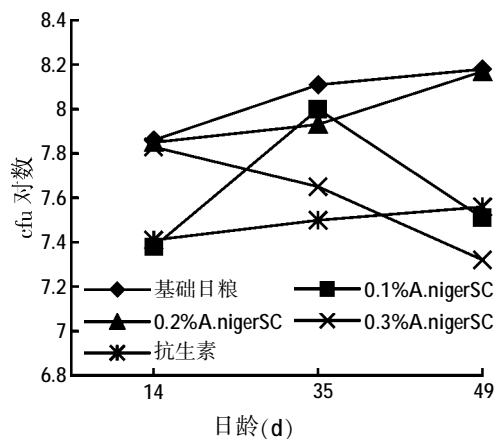


图1 各日龄肉鸡直肠大肠杆菌数

表3 黑曲霉菌 *A.niger* 在肠道内的定植情况(cfu/g)

组别	14 d	35 d	49 d
I	1.5±0.4 <sup>c</sup>	0±0 <sup>c</sup>	0.33±0.47 <sup>c</sup>
II	6.67±0.94 <sup>b</sup>	7.33±1.25 <sup>b</sup>	1.33±0.47 <sup>bc</sup>
III	8.67±0.41 <sup>a</sup>	9.67±0.47 <sup>b</sup>	2±0.81 <sup>b</sup>
IV	16±2.45 <sup>a</sup>	13±0.82 <sup>a</sup>	3.7±1.25 <sup>a</sup>
V	0±0 <sup>c</sup>	0±0 <sup>c</sup>	0±0 <sup>c</sup>

注:1.同一纵列肩标字母不同者表示差异显著(P<0.05);  
2.由于黑曲霉菌仅零星存在于鸡肠道内,故以 10<sup>-1</sup> 稀释倍数的 cfu/g 表示。

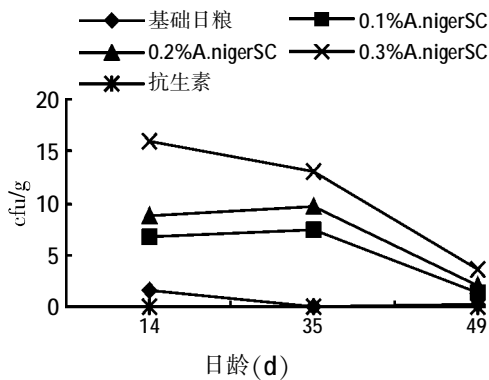


图2 各日龄肉鸡直肠黑曲霉菌数

由表3可以看出,肉仔鸡0~35日龄,所有 *A.niger* SC 添加组其直肠黑曲霉菌数与 I 照组相比均差异显著,35日龄后,II组与I组相比差异不显著(P>0.05),III组与I组相比差异显著(P<0.05),此阶段黑曲霉增殖情况明显减弱。在I组和V组中几乎没有 *A.niger* 菌存在。由图2可以看出,黑曲霉定植趋势随着日龄的增加逐渐减弱。

肉仔鸡日粮中的粘稠性 NSP,会增加微生物的活性,并改变微生物菌群的组成,表现在小肠中大肠杆菌、梭菌、肠球菌的数量的增加(Smits等,1998),高粘性的纤维化合物添加在肉仔鸡日粮中,降低了小肠胆汁酸盐的浓度,导致脂肪消化降低,其中原因之一是由于高粘性食糜在小肠内滞留引起微生物的异常繁殖,微生物的活动使胆汁酸盐到达肝脏的量减少,从而造成了脂肪的吸收障碍。此外,粘稠性 NSP 延迟消化食糜通过小肠的速度,增加了发酵时间。酶制剂的添加可以降低食糜粘度(White等,1983),降低营养物质在肠道的蓄积,减少了菌群可利用的发酵底物,从而使肠道细菌群落减少,这种变化可使肠道变薄,改善营养吸收,同时肠道中沙门氏菌的减少,可以降低胆汁盐的早期解离,有助于脂肪的消化。

2.2 *A.niger* SC 对肉仔鸡日粮表观代谢能及养分消化率的影响(见表4、表5、表6)

表4 *A.niger* SC 对肉仔鸡各生长阶段脂肪消化率的影响(%)

组别	日龄		
	13~15	20~22	34~36
I	68.95±3.75 <sup>b</sup>	61.8±8.92 <sup>b</sup>	48.02±8.08 <sup>b</sup>
II	76.7±2.65 <sup>a</sup>	68±2.7 <sup>ab</sup>	66.68±4.09 <sup>a</sup>
III	72.17±2.74 <sup>ab</sup>	65.9±5.42 <sup>ab</sup>	60.6±9.62 <sup>ab</sup>
IV	73.49±3.94 <sup>ab</sup>	72.1±7.48 <sup>ab</sup>	52.41±8.03 <sup>ab</sup>
V	74.91±4.08 <sup>a</sup>	77.8±0.51 <sup>a</sup>	65.38±5.23 <sup>a</sup>

注:同一纵列肩标字母不同者表示差异显著(P<0.05)。

表5 *A.niger* SC 对肉仔鸡各生长阶段表观代谢能的影响(%)

组别	日龄		
	13~15	20~22	34~36
I	66.4±4.0 <sup>b</sup>	55.58±9.42 <sup>b</sup>	27.4±0.9 <sup>b</sup>
II	75.9±1.6 <sup>a</sup>	58.58±4.75 <sup>ab</sup>	34.49±8.75 <sup>ab</sup>
III	69.54±1.17 <sup>ab</sup>	57.82±6.56 <sup>ab</sup>	41.63±5.27 <sup>a</sup>
IV	64.4±4.0 <sup>b</sup>	67.27±7.39 <sup>ab</sup>	25.52±3.78 <sup>b</sup>
V	74.77±5.13 <sup>a</sup>	72.67±1.8 <sup>a</sup>	37.98±5.5 <sup>ab</sup>

注:同一纵列肩标字母不同者表示差异显著(P<0.05)。

表6 *A.niger* SC 对肉仔鸡各日龄阶段氮沉积的影响(%)

组别	日龄		
	13~15	20~22	34~36
I	52.4±2.53	46.5±1.75	38.5±2.11 <sup>b</sup>
II	56.1±2.31	50.5±0.52	42.5±2.1 <sup>b</sup>
III	54.32±1.5	56.2±2.31	40.3±1.81 <sup>b</sup>
IV	59.2±0.89	58.3±2.8	56.2±1.56 <sup>a</sup>
V	60.2±1.3	59.2±2.1	54.1±3.25 <sup>a</sup>

注:同一纵列肩标字母不同者表示差异显著(P<0.05)。

由表4可以看出,II组和V组提高了肉仔鸡13~15日龄脂肪的消化率,与I组相比差异显著(P<0.05),与III、IV组相比差异不显著(P>0.05)。20~22日龄,*A.niger* SC 处理组有提高脂肪消化率的趋势,但与I组相比差异不显著(P>0.05)。V组显著提高了脂肪消化率,与I组相比差异显著(P<0.05),但与 *A.niger* SC 3水平添加组相比差异不显著(P>0.05)。II组显著提高了肉仔鸡34~36日龄时肉仔鸡脂肪的消化率,与I组相比差异显著(P<0.05),与其它各组相比差异不显著(P>0.05)。在此阶段V组提高脂肪消化率的作用仍较明显(P<0.05)。总的来看,*A.niger* SC 的添加提高了肉仔鸡脂肪的消化率。

由表5可以看出,II组显著提高肉仔鸡13~15日龄代谢能,与I组和IV组相比差异显著(P<0.05),与III组和V组相比差异不显著(P>0.05)。各 *A.niger* SC 对20~22日龄无显著影响。V组与I组相比差异显著(P<0.05),但两组与 *A.niger* SC 3水平组相比差异均不显著(P>0.05)。III组显著提高了34~36日龄表观代谢能,与I组及IV组相比差异显著(P<0.05),与II组和V组相比差异不显著(P<0.05)。

由表 6 可以看出, 各组对 13~15 日龄肉仔鸡氮沉积无显著影响( $P>0.05$ ), 在 20~22 日龄阶段, V 组氮沉积有增加的趋势, 但与各组相比无显著差异( $P>0.05$ )。IV 组提高了 34~36 日龄肉仔鸡氮沉积, 与 V 组相比无显著差异( $P>0.05$ ), 与 I、II、III 组相比差异显著( $P<0.05$ )。但总的来看, A.niger SC 提高了氮沉积, 但不明显。

大量研究表明, 在肉仔鸡非常规日粮(如大麦, 燕麦等日粮)中添加非消化酶, 即纤维素酶、葡聚糖酶、木聚糖酶等, 可以提高肉仔鸡日粮养分消化率(荣俊等, 2004), 在玉米—豆粕型日粮中添加酶提高了营养物质消化率(王清吉, 2004)。安永义等(2003)在玉米—豆粕型日粮中添加酶, 没有发现对营养物质的消化率产生显著影响。酶的添加可以降低抗营养物质水平, 降低肠道食糜粘性, 从而提高营养物质的消化吸收。另外, 肠道食糜粘度的降低减少了有害微生物的孳生, 而有害菌的存在与宿主在营养吸收上存在竞争, 尤其是脂肪的利用。本试验为含黑曲霉菌的复合酶, 主要以产纤维素酶为主, 其提高某些营养的利用率原理可能是纤维素酶降低了抗营养因子的作用。另外, 黑曲霉菌在肠道中也可发挥作用。

### 3 结论

#### 3.1 A.niger SC 对直肠大肠杆菌的影响

A.niger SC 的添加显著降低了直肠大肠杆菌数, 尤其在 0.1% 添加水平, 随着剂量的增加, 0.2% A.niger SC 没有进一步降低大肠杆菌数, 推测可能是外源酶的添加抑制了内源酶的分泌或过量的酶制剂产生的毒素作用。在后期 0.3% A.niger SC 却降低了直肠内杆菌数可能是黑曲霉在肠道内的定植抵制了高剂量酶的毒性作用。0.1% A.niger 对直肠大肠杆菌的抑制作用是其提高生产性能的作用机理之一。

#### 3.2 A.niger SC 对各生长期营养消化率的影响

0.1% A.niger SC 处理组显著提高了脂肪的消化率, 可能是由于 0.1% A.niger SC 降低了肠道内有害菌的作用, 使肠道变薄以及维持了肠道胆汁酸盐的浓度, 从而便于营养物质的消化吸收。对氮沉积的作用不如脂肪明显。0.1% A.niger SC 提高了生长前期表观代谢能, 在生长后期 0.2% A.niger SC 提高效果显著。

(参考文献 12 篇, 刊略, 需者可函索)

(编辑: 高雁, [snowyan78@tom.com](mailto:snowyan78@tom.com))

## · 书 讯 ·

书 名	作 者	定价(元)	书 名	作 者	定价(元)
畜禽十大高效饲料添加剂	李尚波等	22	蛋鸡饲养技术	白修明等	8
饲料非营养调控物质的研究与应用	单安山	41	肥牛饲养技术	雷云国	16
饲料安全与动物营养调控技术研究	单安山	41	肉牛饲养技术大全	韩荣生	15
饲料添加剂	王安	29	实用犬病诊疗图册	赵玉军	29
毛皮动物饲养技术	杨福合等	14	实用猪病防治图册	陈国庆	13
猪鸡常用饲料配方	张洪翔等	11	饲料添加剂安全使用规范	杨振海等	100
养猪技术大全	王彪等	19	全国规模化养猪场大全		120
养猪问答	李树德等	14	默克兽医手册		123
经济动物疾病诊疗新技术	程世鹏等	11	实用养鸭技术	杨桂芹	13
珍禽饲养技术	王峰等	16	肉鸡生产新技术精选		14
新编畜禽用药手册	葛宝伟等	17	实用鸡病防治图册	张爱民等	13
农家养兔技术	韩俊彦等	10	鸡主要传染病防治技术	贺伟等	7
禽病诊疗新技术	张英	13	养鸡技术大全	韩俊彦	25
观赏犬饲养调教服饰	郑雅文	51	饲料配制金点子	邵彩梅等	11
饲料工业标准汇编(1996~1999)		42	养鸡饲料手册	袁纛等	12
饲料工业标准汇编(1996)下		55	养鸡问答	孙长湖等	14
养鸡十大疫病防治		17	家禽孵化手册	王晓霞	17
百项养鸡新技术	卫广森等	21	家禽产蛋与综合效益	刘文奎	17
养猪十大疾病防治		24	养禽常用数据手册		35
1999 饲料添加剂要览		228	波尔山羊高效养殖	吴宓等	31
2000 饲料添加剂要览		26	新编鸡病诊断与防治		17
鲍鱼	高绪生等	18	实用禽蛋孵化新法		38

邮局汇款地址: (110036) 沈阳市金沙江街 16 号 6 门(本社发行部收)

联系电话: (024) 86391273

银行汇款单位: 辽宁省农牧业机械研究所有限公司

开户行: 中信银行沈阳分行皇姑支行

帐号: 72214101826000548-49

# 芽孢杆菌木聚糖酶固体发酵工艺研究

陈 雄 王实玉 王金华

**摘 要** 利用固体发酵对实验室筛选的芽孢杆菌 021 产木聚糖酶的培养基和发酵工艺进行研究。结果表明,以麸皮和黄豆饼粉(9:1)为主要基质,4%麦芽糖、4%硝酸铵有助于产酶。最佳发酵条件为:含水量 65%、起始 pH 值 8.0、发酵温度为 37 ℃、接种量 8%、250 ml 三角瓶装料 20 g、培养 36 h。在最佳发酵条件下,木聚糖酶酶活可达 3.25 U/g。

**关键词** 芽孢杆菌 021;培养基;发酵工艺;木聚糖酶

**中图分类号** Q815

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

芽孢杆菌 021(Bacillus sp. 021),本实验室从土壤中筛选保藏。

### 1.2 培养基组成和培养方法

#### 1.2.1 斜面培养基

蛋白胨 5.0 g/l、酵母膏 5.0 g/l、半纤维素 5.0 g/l、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0 g/l、琼脂 18.0 g/l,pH 值为 6。

#### 1.2.2 种子培养基

蛋白胨 5.0 g/l、酵母膏 5.0 g/l、半纤维素 5.0 g/l、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0 g/l,pH 值为 6。

#### 1.2.3 基础营养盐液

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0 g/l、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 g/l、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/l、NaNO<sub>3</sub> 4.0 g/l、CaCl<sub>2</sub> 0.5 g/l。

#### 1.2.4 产酶基础培养基

麸皮 18.0 g/l、黄豆饼粉 2.0 g/l,将 25 ml 营养液于 250 ml 三角瓶中与麸皮、黄豆饼粉混合,搅匀,起始 pH 值 7.0。

#### 1.2.5 种子活化

将菌种从斜面接种到 50 ml 种子培养基(250 ml 三角瓶装),置于 37 ℃恒温摇床上,150 r/min 振荡培养 12 h。

#### 1.2.6 发酵培养

250 ml 三角瓶装发酵产酶培养基 20 g (干重),按 5%接种量接种种子液,充分混匀,于 37 ℃恒温培养箱中培养 48 h。

### 1.3 酶液的提取

向装有发酵培养基的三角瓶中装入一定量蒸馏

水,置入摇床上振荡 30 min,然后于 5 000 r/min 离心 15 min,收集上清液得到酶液。

### 1.4 酶活的测定

取 3 支带有 50 ml 刻度的试管,1 支作空白对照,2 支作平行样品管。每支样品管加入 1.1 ml 适当稀释的酶液,对照管加 1.1 ml 蒸馏水,置于 50 ℃水浴锅中预热 2 min,然后在 3 支试管中分别加入 0.9 ml 已预热至 50 ℃的 1%木聚糖溶液(pH 值 9.0,0.05 mol/l 的 Gly-NaOH 缓冲溶液配制),准确计时 10 min,立即加入 DNS 试剂 2 ml。将 3 支试管放入沸水浴中反应 15 min 后立即取出,流水冷却,用蒸馏水定容至 50 ml,于 540 nm 处测定吸光度。酶活定义为:在上述条件下,每分钟产生 1 mol 还原糖(木糖)所需酶量定义为 1 个酶活单位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养基质的选择

培养基是提供微生物生长、繁殖和代谢以及合成酶所需要的营养物质。在固体发酵中,固体基质的选择是提高酶产量的关键因素。一般选择廉价的农副产品作为固体基质,如麦麸、米糠和玉米粉等。表 1 试验结果显示,麦麸为较好的固体基质,当麦麸与黄豆饼粉按 9:1 比例混合时,木聚糖酶的产量最高。

表 1 固体发酵基质的选择

固体基质	含量或比值	酶活(U/g)
麦麸	100%	0.546
黄豆饼粉	100%	0.459
玉米粉	100%	0.368
麦麸:黄豆饼粉	8:2	0.602
麦麸:黄豆饼粉	9:1	0.648
麦麸:玉米粉	8:2	0.562
麦麸:玉米粉	9:1	0.571

### 2.2 碳源对产酶的影响

碳源是微生物生长过程中为微生物提供碳素来源的物质。微生物利用碳素物质具有选择性,糖类是微生物容易利用的碳源和能源物质,但微生物对不同的糖类物质的利用也有差别。在产酶基本培养基的基础上,分别添加各种碳源(蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、淀

陈雄,湖北工业大学生物工程学院,博士,副教授,430068,湖北武汉武昌南湖。

王实玉、王金华,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-09-04

★ 本项目受湖北省工业微生物重点实验室资助。

粉)对供试菌株进行发酵产酶试验,结果见表2。根据表2的结果,麦芽糖更有利于木聚糖酶合成,因此选择麦芽糖作为碳源。

表2 碳源对产酶的影响

碳源	蔗糖	麦芽糖	葡萄糖	乳糖	淀粉
酶活(U/g)	0.778	1.157	0.874	0.620	1.041

注:碳源添加量为4%。

### 2.3 氮源对产酶的影响

能够被微生物利用的氮源物质包括蛋白质及其不同程度的降解物、铵盐、硝酸盐、分子氮、胺、酰胺等。微生物对氮源的利用具有选择性,根据文献报道, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 作为无机氮源对酶合成具有促进作用,蛋白胨作为有机氮源比较理想,故选用 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、尿素、蛋白胨作为氮源,在产酶基础培养基的基础上,以不同的有机氮源和无机氮源作为固体基质的添加氮源,发酵产酶试验结果见表3,无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 更有利于木聚糖酶的合成,其中 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 是实验菌株最合适的氮源。

表3 氮源对产酶的影响

氮源	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$\text{NH}_4\text{Cl}$	尿素	蛋白胨
酶活(U/g)	1.656	1.764	1.421	0.891	1.243

注:氮源添加量为4%。

### 2.4 含水量对产酶的影响

固体发酵培养基的含水量在整个发酵工程中起关键作用。一方面,含水量影响微生物生长所需要的渗透压。另一方面,含水量对微生物生长和产酶的影响还由于它可改变固体颗粒的物理性质,过高的含水量改变了麸皮颗粒之间的松散性,使麸皮成团,影响到氧的传递和发酵热的散失,导致酶活下降;而含水量过低会影响到营养物质的溶解、传递以及颗粒的润胀,限制了微生物对营养物质的利用,芽孢杆菌的生长将受到抑制。实验设计5个不同含水量,结果如图1所示,当含水量为65%时,酶活力最高。

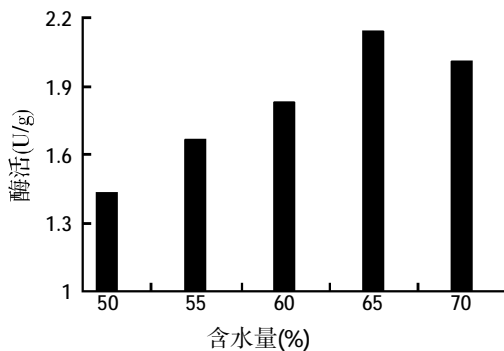


图1 含水量对产酶的影响

### 2.5 pH值对产酶的影响

微生物生长过程中机体内发生的绝大多数的反应是酶促反应,而酶促反应有一个较适宜pH值范围,在此范围内,微生物生长速度快;同时酶作为微生物的代谢产物,在不同的pH值下,微生物产酶量及产酶种类也可能不同,微生物也有其最适的产酶pH值。因此,培养基起始pH值不仅影响细胞的生长繁殖,而且对产酶量及产酶种类也有显著的影响。pH值对产木聚糖酶酶活的影响见图2,实验菌株最适产木聚糖酶pH值为8。

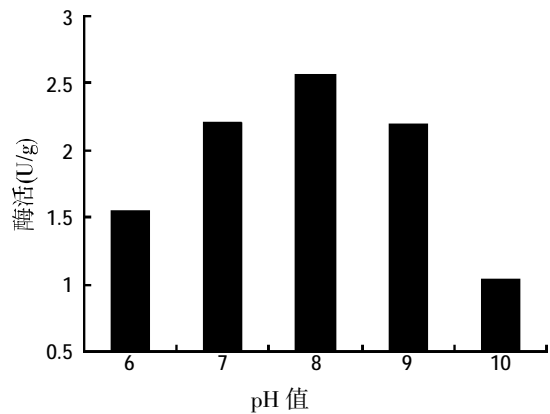


图2 pH值对产酶的影响

### 2.6 接种量对产酶的影响

在一定的培养基中,接种量过低时,菌体生长缓慢,发酵周期长,影响产酶;接种量过高时,缩短发酵周期,但易受到分解代谢物阻遏作用,同时由于接种量过大,氧气可能供应不足,影响酶的合成。实验分别采用2%、4%、6%、8%、10%的接种量进行培养。结果如图3所示,8%的接种量最适宜。

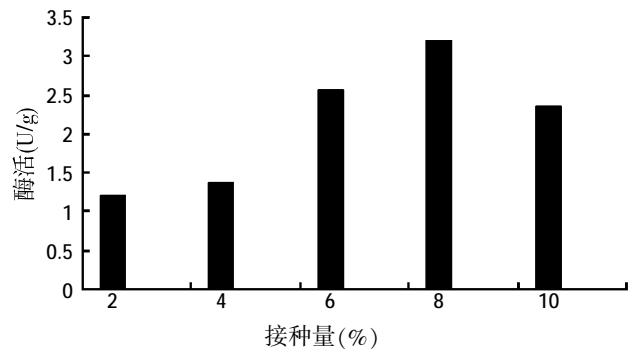


图3 接种量对产酶的影响

### 2.7 装料量对产酶的影响

装料量对产酶的影响主要表现在:装料量过多,通风不畅,供氧不足,微生物生长不好而影响产酶;装料量过少,则基质表面水分蒸发过快,影响微生物的代谢,产酶量仍然不高。采用250 ml三角瓶装料10、



15、20、25、30 g 培养基,进行发酵培养。结果如图 4 所示,装料量为 20 g 时,单位质量培养基产酶量最高。

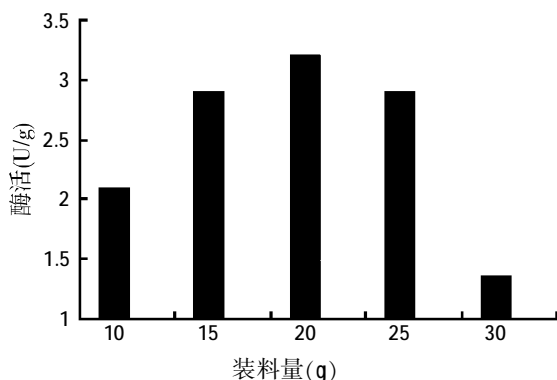


图 4 装料量对产酶的影响

### 2.8 温度对产酶的影响

温度过低,微生物生长缓慢、发酵周期延长。温度过高,一方面使细胞中的生化反应速率和生长速率加快;另一方面,机体的重要组分如蛋白质、核酸等对温度较敏感,若温度升高,它们可能遭受不可逆的破坏。固体发酵单位体积的高基质浓度和高菌体浓度,使单位体积微生物产热要比液体高得多,而且由于固体发酵含水量低,传热和传质比较困难,温度过高培养基失水比较严重,因此理论上固体发酵温度要比液体发酵温度低。试验选择不同的发酵温度,实验结果由图 5 可知,在 37 °C 条件下,木聚糖酶产量最大。

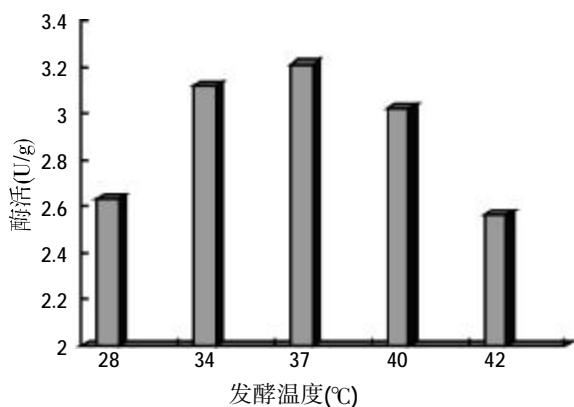


图 5 发酵温度对产酶的影响

### 2.9 酶产量与发酵时间关系曲线

发酵时间长,合成的酶量多。但时间越长,营养物质的消耗就越多,同时由于营养的不足,单位质量的酶活增加缓慢或缓慢下降。由图 6 可知,随着时间的增加,酶活增加,但 36 h 后,酶活不再增加,所以实验选择 36 h 为最佳发酵时间。在最佳发酵条件下,发酵 36 h 后,木聚糖酶酶活可达 3.25 U/g。

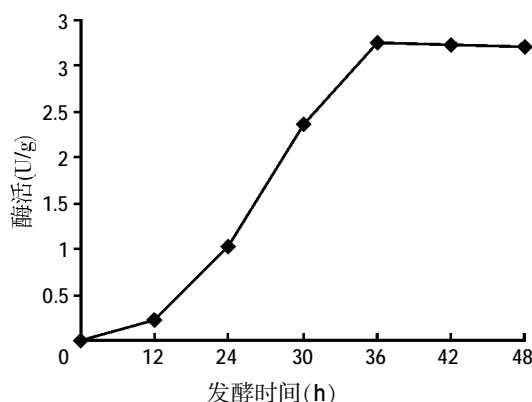


图 6 酶产量与发酵时间关系曲线

### 3 结论

通过实验室筛选得到一株高产木聚糖酶的芽孢杆菌菌株,利用固体发酵生产木聚糖酶。实验通过发酵培养基的选择和发酵工艺的优化研究,得到了优化的固体发酵培养基和发酵工艺。以麸皮和黄豆饼粉(9:1)为主要基质,4%麦芽糖、4%硝酸铵有助于产酶。最佳发酵条件为:含水量 65%、起始 pH 值 8.0、发酵温度 37 °C、接种量 8%、250 ml 三角瓶装料 20 g,培养 36 h。在最佳发酵条件下,木聚糖酶酶活可达 3.25 U/g。

芽孢杆菌能适应极端的生长环境,芽孢杆菌木聚糖酶具有热稳定性高、发挥最佳活性的 pH 值范围广等特点,芽孢杆菌木聚糖酶的研究较具潜力,固体发酵生产木聚糖酶可直接用于饲料,应大力推广。

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

#### ·信息采撷·

## 从多宝鱼事件看食品安全

多宝鱼,学名大菱鲆,主产于大西洋东部沿海,1992 年从欧洲引进我国,是名贵的低温经济鱼类。由于“多宝鱼”本身抗病能力较差、养殖技术要求较高,一些养殖者为降低养殖成本大量使用违禁药物,用来预防和治疗鱼病,导致“多宝鱼”体内药物残留严重超标。

食品安全问题由来已久。在水产养殖中滥用抗生素甚至使用违禁药品的行为早已屡见不鲜,并曾使一些地方的水产品在国际贸易中蒙受了损失。四年前就已明文禁止使用的硝基呋喃类化合物药物,为什么一些养殖户还在使用?是因为养殖户法规意识淡薄,绿色养殖观念不强还是有关部门监督力度不够。

多宝鱼事件警示我们,解决食品安全问题,必须努力形成一套系统的事前管理和防范机制。要从推行养殖业标准化,强化技术服务入手,加强监督、检验检测体系的建立,实行严格市场准入制度,落实行政执法责任制等方面,把工作做在平时、做在前面,变被动的“事后救火”为主动的事前防范。这样,才能把好食品安全的每一道关口,真正让老百姓吃得安全、吃得放心。

# 一株产耐热纤维素酶放线菌的固体发酵研究

邵继海 胡俊林 孙毓临 何绍江 冯新梅

**摘要** 以一株产耐热纤维素酶放线菌为材料,研究了该菌固体发酵培养基组分的改良及固体发酵工艺的优化,同时探讨了该菌与酵母混菌发酵时的产酶情况。实验结果表明,该菌株的最适培养基成分为:稻草粉与麸皮比为1、豆粕30%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2%。最佳的发酵工艺条件为:培养基的初始pH值为7、发酵温度为35℃、培养基固与水体积比为0.8、菌株接种量为5%。该菌固体产酶发酵过程中第72h接入酵母菌的效果较好,酵母菌最佳接种量为1%,浓度为 $4.6 \times 10^5$  cfu/ml。

**关键词** 纤维素放线菌;固体发酵;酵母菌

中图分类号 Q815

Study of solid-state fermentation of an actinomycete producing thermophilic cellulase

Shao Jihai, Hu Junlin, Sun Yulin, He Shaojiang, Feng Xinmei

**Abstract** We studied the optimum cultural medium to solid-state fermentation of an actinomycete producing thermophilic cellulose and the optimum cultural conditions for producing cellulase. The result of our experiments showed that the optimum culture medium for solid-state fermentation as follows: ratio of straw to bran is 1, bean cake 30%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2%. The optimum cultural conditions for producing cellulase were as follows: the initial pH of the culture medium is 6, the fermentation temperature is 35℃, the ratio of dry weigh of culture medium to water is 0.8, the inoculation quantity is 5%. The best time for inoculating *saccharomyces cerevisiae* was the 72 h after the beginning of fermentation, and the optimum quantity for inoculating was 1% with the concentration of  $4.6 \times 10^5$  cfu/ml.

**Key words** cellulose-decomposing strain; solid-state fermentation; *saccharomyces cerevisiae*

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌种

纤维素分解菌为诺卡氏放线菌 SCD2(*Nocardia* SCD2),由本研究室筛选于好氧堆肥环境,其最适酶解温度为60℃,所产纤维素酶于90℃水浴20min后CMCase活性损失率仅为13.6%。酵母菌由湖南农业大学生命科学技术学院发酵工程研究室提供。

### 1.2 固体发酵培养基优化

保证培养基中固与水比(质量比)为1、接种量为5%、发酵温度为35℃、pH值自然的前提下,从稻草粉与麸皮的比例、豆粕及 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的含量4

个因素出发设计 $L_9(4^3)$ 正交实验,具体实验设计见表1。

### 1.3 固体发酵工艺优化

在获得最优化的培养基配方前提下,从发酵的温度、培养基的初始pH值、培养基固与水比、接种量4个因素出发设计固体发酵工艺 $L_9(4^3)$ 正交实验,具体实验设计见表2。

### 1.4 固体发酵培养基初酶液的制备及CMCase的测定(DNS法)

#### 1.4.1 初酶液的制备

取风干发酵曲2g加2ml蒸馏水,于40℃、150 r/min振荡浸提30min后,再3000 r/min离心15min,取上清液为初酶液。

#### 1.4.2 酶活性的测定——DNS法

取CMC-Na底物1.5ml,加入0.5ml待测酶液,40℃恒温精确反应20min,立即加入DNS试剂3ml,然后置于沸水中加热7min终止反应,然后加入10ml蒸馏水,冷却后于可见分光光度计550nm处比色,测定生成的葡萄糖的量。

### 1.5 纤维素分解菌SCD2固体发酵过程中接入酵母

邵继海,湖南农业大学资源环境学院,讲师,410128,湖南长沙。

胡俊林、孙毓临,单位及通讯地址同第一作者。

何绍江、冯新梅,华中农业大学农业微生物国家重点实验室。

收稿日期:2006-10-19

★ 国家自然科学基金项目(30070027)资助

表 1 固体发酵培养基的优化

项目	A 稻草粉:麸皮	B 豆粕(%)	C $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (%)	D $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (%)	CMC 酶活[ $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ ]
1	0.8	10	1	0.05	17.63
2	0.8	20	2	0.1	22.75
3	0.8	30	3	0.2	25.19
4	1	10	2	0.2	20.08
5	1	20	3	0.05	23.36
6	1	30	1	0.1	27.49
7	1.2	10	3	0.1	14.37
8	1.2	20	1	0.2	22.01
9	1.2	30	2	0.05	23.76
$K_1$	65.57	52.08	67.14	65.04	
$K_2$	70.93	68.12	66.58	64.61	
$K_3$	60.12	76.44	62.92	67.27	
R	3.60	8.12	1.41	0.89	
优方案	$A_2$	$B_3$	$C_1$	$D_3$	

表 2 固体发酵工艺优化

项目	A 初始 pH 值	B 温度( $^{\circ}\text{C}$ )	C 培养基固与水比	D 接种量(%)	CMC 酶活[ $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ ]
1	6	30	1.0	3	20.89
2	6	35	0.8	5	28.43
3	6	40	0.7	7	18.95
4	7	30	0.8	7	25.52
5	7	35	0.7	3	22.85
6	7	40	1.0	5	20.65
7	8	30	0.7	5	24.03
8	8	35	1.0	7	20.19
9	8	40	0.8	3	20.33
$K_1$	68.26	70.43	61.73	64.06	
$K_2$	69.02	71.47	74.27	73.11	
$K_3$	64.55	59.93	65.83	64.67	
R	1.49	3.85	4.18	3.02	
优方案	$A_2$	$B_2$	$C_2$	$D_2$	

菌的最适时间确定

将酵母菌用 PAD 培养基扩大培养后置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中, 分别在 SCD2 固体发酵的 0、24、48、72 h 按 1% 的量接入酵母, 对照接入等量的无菌水, 发酵 96 h, 然后测定各处理的 CMC<sub>Case</sub> 酶活。

1.6 纤维素分解菌 SCD2 固体发酵过程中酵母菌在最适接入时间的最适接入量确定

将酵母菌菌液做系列稀释, 稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  3 个梯度, 并于实验 1.5 节得出的固体发酵最佳接种时间按 1% 的量接入酵母菌, 发酵 96 h, 然后测定各处理 CMC<sub>Case</sub> 酶活。

2 结果与分析

2.1 固体发酵培养基的优化

保证各培养基中固与水比为 1, 接种量均为 5%, 发酵温度均为 35  $^{\circ}\text{C}$ , pH 值自然的前提下, 发酵 96 h 后测定酶活, 结果见表 1。

由表 1 可看出, 在稻草粉与麸皮比为 1、豆粕含量为 30%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  含量为 1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  含量为 0.2%

的培养基中, 该菌株产纤维素酶的能力最强。比较各因素的变化对该菌固体发酵的影响, 可以发现豆粕含量的变化对发酵的影响最为显著, 其次是稻草粉与麸皮比,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  在含量为 0.05%~0.2% 范围内对其产酶的影响不大。

2.2 固体发酵工艺优化

根据 2.1 的试验结果, 选择最优化的培养基配方, 采用不同的发酵工艺条件对该菌株进行固体发酵, 在发酵 96 h 后测定酶活, 结果见表 2。

由表 2 可看出, 在培养基初始 pH 值为 7, 发酵温度为 35  $^{\circ}\text{C}$ , 培养基固与水比为 0.8, 菌株接种量为 5% 时菌株产酶能力最强。比较各发酵条件的变化对该菌固体发酵的影响, 可以发现固体发酵培养基的含水量(培养基固水比)对该菌产酶发酵的影响最大, 其次是发酵的温度, pH 值在 6~8 范围内变化对其产酶量的影响不大。

2.3 纤维素分解菌 SCD2 固体发酵过程中接入酵母菌的最适时间确定

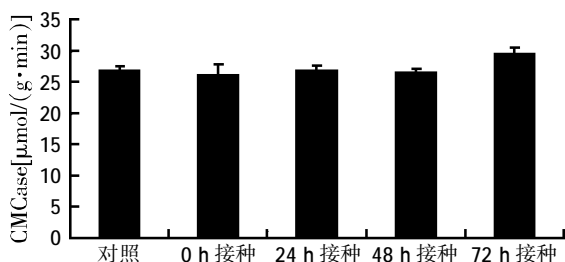


图 1 不同时间接入酵母对 SCD2 产酶发酵的影响

从图 1 可知,在 SCD2 固体发酵过程的 0~48 h 内按 1% 的量接入酵母菌,固体发酵 96 h 后对该菌的产酶量影响不大,在 SCD2 固体发酵的 72 h 时按 1% 的量接入酵母菌,其产酶量比对照高 9.38%。

#### 2.4 纤维素分解菌 SCD2 固体发酵过程中酵母菌在最适接入时间的最适接入量确定

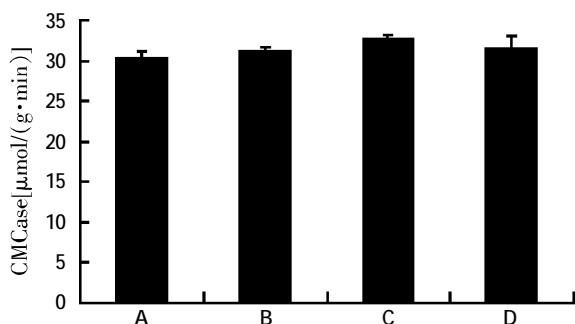


图 2 接种不同浓度酵母菌液对 SCD2 产酶发酵的影响

在 2.3 实验结果的基础上,于 SCD2 固体发酵的 72 h 时接入不同稀释梯度的酵母菌液,其结果如图 2 所示。由图 2 可知,在 SCD2 固体发酵过程中接入酵母的最佳浓度为稀释了 10<sup>-2</sup> 的酵母菌液,接种其它梯度的酵母菌液的产酶量较接近,通过平板稀释测数的方法测得 10<sup>-2</sup> 的酵母菌液的浓度为 4.6×10<sup>5</sup> cfu/ml。

### 3 讨论

通过对 SCD2 固体发酵培养基组分的改良、发酵工艺的优化及其与酵母菌混菌发酵的研究,使其固体发酵的 CMCase 酶活达到 32.65 μmol/(g·min),与国内公开发表的资料中的研究结果比较来看,其酶活相对较高。

在纤维素分解菌的产酶发酵过程中,培养基中较高浓度的葡萄糖会抑制纤维素酶的活性。因此,从理论上讲,在发酵过程中接入酵母菌,通过酵母菌消耗培养基中葡萄糖,从而解除葡萄糖对微生物产纤维素

酶的反馈抑制,就可以提高纤维素酶的活性。司美茹、郝月等研究结果表明,在纤维素酶发酵开始时接入酵母菌可以提高纤维素酶酶活,但本实验结果显示,在 SCD2 固体发酵的 48 h 内接种酵母菌并不能提高发酵的纤维素酶的酶活,只有在 72 h 时接入酵母,发酵后纤维素酶活性才略有提高。这可能是在纤维素分解菌与酵母混菌发酵的二元体系中,不同微生物间的竞争能力不同,最终导致不同的二元发酵结果。

#### 参考文献

- 1 张建新,刘起丽,李学梅.康氏木霉固态发酵生产纤维素酶条件的研究[J].西北农林科技大学学报,2005,23(11):99-102
- 2 郭爱莲,朗惠云.产黄纤维单孢菌纤维素酶的培养条件[J].西北大学学报,1999,29(6):575-577
- 3 司美茹,薛泉宏,蔡艳.混合发酵对纤维素酶和淀粉酶活性的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(5):69-73
- 4 郝月,杨翔华,郝传德,等.秸秆纤维素分解菌的选育及发酵工艺研究[J].粮食与饲料工业,2006(3):33-34

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

#### · 会 讯 ·

[本刊讯]11月30日由李德发教授亲手创建的农业部饲料工业中心迎来了她10岁的生日,同时由农业部饲料工业中心主办,北京德宝群兴科贸有限公司承办的顶级技术盛会——猪营养国际学术研讨会在北京友谊宾馆隆重开幕,本次盛会吸引了国内外专家、学者、企业界及相关媒体代表近千。

大会开幕式由农业部饲料工业中心副主任谁仕彦教授主持,于上午8点40分准时开始。中国农业大学党委书记甄振元教授、农业部张玉香总经济师、农业部畜牧业司王宗礼副司长、科学技术部发展计划司申茂向巡视员、加拿大中国大使馆农业参赞 Kent Smith 先生、南京农业大学动物科技学院院长王恬教授、正大集团技术总监 Gary Stoner 博士和美国密苏里大学教授 Gary Allee 教授分别致辞,对农业部饲料工业中心过去10年所取得的成绩及始终以科技创新为主体,引领饲料行业科技进步给予高度赞赏和肯定。

开幕式结束后,农业部饲料工业中心副主任谁仕彦博士做了精彩的十周年回顾的演讲,展示了中心十年来的风风雨雨和所取得的教育、科研等成就,同时也介绍了当前中心的科研能力及重点方向。两天的研讨会分别由中国工程院院士张子仪、李德发教授、美国肯塔基大学动物与食品科学系 Gary L. Gromwell 教授、美国科学院院士 David H. Baker 教授、美国依利诺大学动物科学系 James Pettigrew 教授、美国俄亥俄州立大学动物科学系 Don Mahan 教授、美国密苏里—哥伦比亚大学畜牧系 Gary Allee 教授、加拿大萨斯卡切温大学畜牧系 P.A.Thacker 教授就“中国养猪业的今昔与展望”、“猪用抗生素饲料添加剂的替代”、“乳糖和奶制品对新生仔猪的作用效果”、“猪的氨基酸营养:概念、问题、难点和潜力”、“日粮对猪健康的影响”、“高产猪矿物质营养需要的变化”、“高产瘦肉猪的氨基酸需要”、“高产母猪饲养策略”。闭幕式前,几位国外专家就与会代表提出的一些问题给予了解答,大会在热烈的掌声中胜利闭幕。

# 木聚糖酶固态发酵工艺及酶学特性研究

刘德海 周伏忠 王红云 安明理 陈小鸽

**摘要** 筛选出一株高产木聚糖酶的菌株 U<sub>6-5</sub>, 菌体固态发酵产酶条件的研究表明, 最佳发酵培养基配方为: 麸皮 50 g、花生壳粉 30 g、玉米芯粉 20 g、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.5 g、水 110 ml, 每克原料接种量为 3.05×10<sup>5</sup> 个孢子, 最适发酵温度 28~30 ℃, 在此培养条件下发酵 26~28 h, 木聚糖酶酶活达到 6 105 U/g。该木聚糖酶具有较高的耐热、耐储藏性能。

**关键词** 木聚糖酶; 固态发酵; 发酵培养基  
中图分类号 TS201.25

木聚糖酶(Xylanase)是最主要的一种木聚糖降解酶类, 它主要通过内切方式降解木聚糖中的 β-1, 4 木糖苷键, 水解产物以低聚木糖为主, 并伴有少量的木糖和阿拉伯糖。木聚糖酶作为一类饲料添加酶, 可有效降解木聚糖抗营养因子, 提高饲料营养。木聚糖酶已经成为酶制剂生产行业中的一个重要产品, 具有广阔的应用前景。

本研究筛选出一株木聚糖酶高产菌株 U<sub>6-5</sub>, 对该菌株固态发酵培养基、培养条件进行了优化, 对酶学特性进行了研究, 优化条件下, 木聚糖酶酶活达到 6 105 U/g。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

木聚糖酶菌种 U<sub>6-5</sub>, 由河南省科学院生物研究所筛选保存。

### 1.2 木聚糖酶菌种培养基

察氏培养基: NaNO<sub>3</sub> 3.0 g、KCl 0.5 g、FeSO<sub>4</sub> 0.01 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、蔗糖 20.0 g、琼脂 20.0 g、蒸馏水 1 000 ml, pH 值 6.7。

豆汁培养基: 5°Be' 豆汁 1 000 ml、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、可溶性淀粉 2.0 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g、琼脂 20 g, pH 值 6.0。

孢子增殖培养基: 葡萄糖 50 g、蛋白胨 0.20 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.56 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.144 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.12 g、琼脂 20 g、啤酒 45 ml、蒸馏水 1 000 ml, 自然 pH 值。

筛选培养基: 木聚糖 10 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.3 g、NaCl 0.2 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.5 g、FeSO<sub>4</sub> 0.1 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 ml, 自然 pH 值。

发酵培养基: 麸皮 50 g、花生壳粉 30 g、玉米芯粉 20 g、营养液 10 ml、水适量, 自然 pH 值。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 粗酶液制备

发酵结束后, 将湿酶曲于 40 ℃下低温烘干后粉碎, 混合均匀后待用, 称取干酶曲 1.000 g, 加入 90 ml 蒸馏水, 10 ml 缓冲溶液, 40 ℃浸提 1 h, 过滤得粗酶液。

#### 1.3.2 木聚糖酶酶活的测定

以 1.0 ml 2.0%(m/v)木聚糖溶液为底物(用 pH 值 5.0 柠檬酸缓冲液配制), 加 0.5 ml 稀释酶液, 于 50 ℃保温 30 min 后加入 1.0 ml DNS 溶液, 沸水浴煮沸 5 min, 然后放入冷水中冷却至室温。用 721 分光光度计在 530 nm 处测定光密度(OD)值, 同时在相同条件下作空白样调零。酶活定义: 在 pH 值 5.0、50 ℃条件下, 1 g 固体酶粉每分钟水解木聚糖生成 1 μg 还原糖(木糖)的酶量为 1 个酶活单位。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基的优化研究

#### 2.1.1 不同碳源的影响(见图 1)

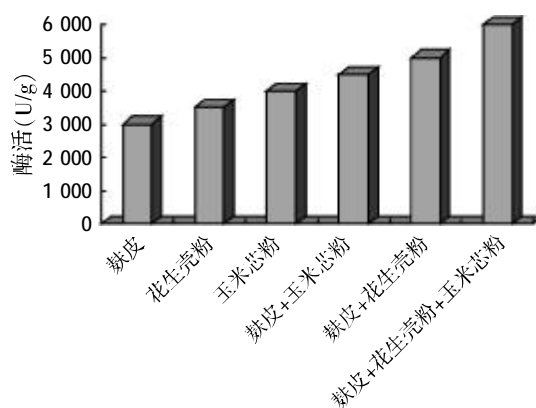


图 1 不同碳源对酶活的影响

刘德海, 河南省科学院生物研究所, 副研究员, 450008, 郑州市花园路 28 号。

周伏忠、王红云、安明理, 单位及通讯地址同第一作者。

陈小鸽, 河南省饲料产品质量监督检验站

收稿日期: 2006-10-07

木聚糖酶是一种诱导酶,木聚糖对其有很大的诱导作用,在自然界中的许多半纤维素中都含有木聚糖,如麸皮、玉米芯、稻草等。在固态发酵工业生产中,成本较低的麸皮被作为最常用的主要碳源。用麸皮、玉米芯、花生壳粉做碳源进行产酶试验。结果如图1所示,复合碳源产酶活性显著高于单一碳源,其中麸皮+花生壳粉+玉米芯粉做碳源产酶活性最高,麸皮+花生壳粉、麸皮+玉米芯粉做碳源产酶活性次之。

调整培养基中不同麸皮、花生壳粉、玉米粉的比例,形成3者的不同比例,试验结果见表1。

表1 麸皮、花生壳粉与玉米芯粉的比例对酶活影响

项目	m 麸皮 : m 花生壳粉 : m 玉米芯粉			
	5 : 5 : 0	5 : 3 : 2	5 : 2 : 3	5 : 0 : 5
相对酶活(%)	91.1	100	89.2	88.7

由表1可见,当麸皮、花生壳粉与玉米芯粉比例为5 : 3 : 2时,产酶活性最高。在发酵试验中,可观察到培养基组成中随着麸皮含量的增加,菌丝生长快且健壮,结块早,而纯玉米芯粉结块及菌丝生长情况最差。

2.1.2 不同氮源对产酶的影响

以麸皮、花生壳粉、玉米芯粉配比为5 : 3 : 2复合碳源做培养基,分别添加(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、NaNO<sub>3</sub>、尿素、豆粕粉、蛋白胨、牛肉膏等8种氮源,添加量占固形物干重的0.5%,进行固态发酵产酶试验,结果见图2。

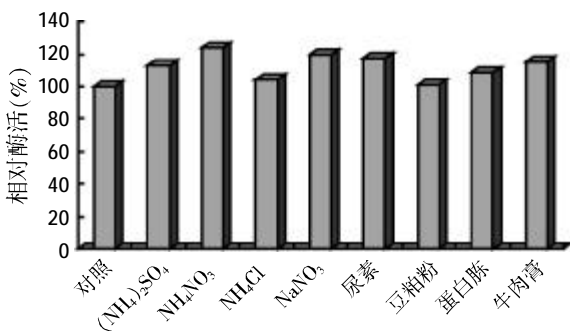


图2 不同氮源对酶活的影响(不加氮源的对照组酶活设为100)

由图2可见,以无机氮源NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>做氮源,菌株的产酶活性明显高于其它氮源的,对产木聚糖酶具有明显的促进作用。

2.1.3 培养基加水量对产酶的影响

在固态发酵培养基中,加水量过大会造成培养基黏度增加,透气性差,培养基中易造成细菌的污染,加水量过小则不能满足菌株生长对水分的需求。加水量对产酶的影响见图3。由图3可知,培养基与水比例为

1 : 1.1时产酶活性最高。

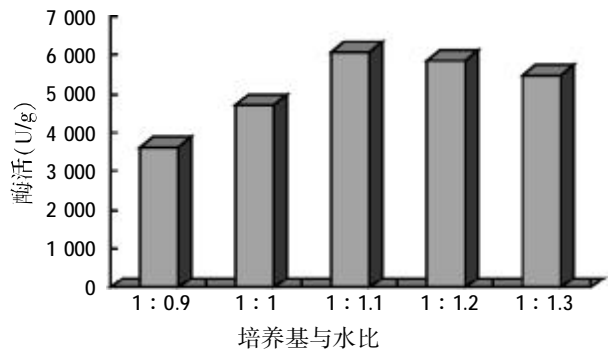


图3 加水量对产酶的影响

2.2 培养条件的优化

2.2.1 菌种接种量对产酶的影响

适当的接种量有利于孢子的萌发、菌丝体的生长、培养基营养物质的合理利用以及酶的形成。较低的接种量形成的菌丝体粗壮,由于菌丝体密度不够,不利于酶的形成;较高的接种量由于营养物质过度吸收,菌丝体细小,散热慢,不易排出废气,一般产酶能力也较低。只有当接种量合适时,形成的生物量才能达到最大值,产酶酶活也最高,经多次试验得出,当接种量为每克原料含3.05×10<sup>5</sup>个孢子时,菌体产酶酶活基本可达到最大值。

2.2.2 培养温度对产酶的影响(见图4)

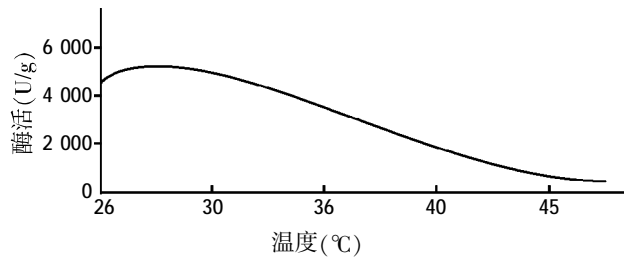


图4 温度对酶活力的影响

微生物的生命活动是由一系列生化反应组成的,而这些反应受温度影响极为明显,温度是微生物生长的重要因素之一。最适生长产酶温度一般不超过30℃;当温度超过35℃时,曲霉生长受到明显的抑制,产酶率下降;温度达到40℃,几乎不能生长。我们经过初筛、诱变、复筛优化后的菌株,其耐高温性能明显提高,可耐受35℃的生长温度,热稳定性提高。但超过35℃,酶活下降较快。

2.2.3 培养时间对产酶的影响

在基础培养基上定量接入菌种,置30℃下恒温培养,培养15h开始测定酶活,间隔5h测定一次酶活,结果见图5。

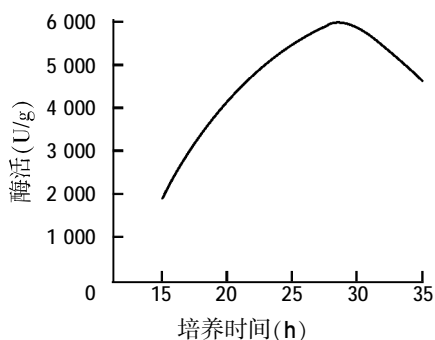


图5 培养时间对产酶的影响

由图5可见,随培养时间的延长,产酶活性呈上升趋势,但到30h后开始下降,由此确定30h是产酶的最适培养时间。

### 2.3 木聚糖酶的稳定化处理

为了使木聚糖酶具有更好的耐热性能,除选择耐高温的生产菌种外,还要对木聚糖酶进行稳定化的处理,以保证酶的活性,本研究经过反复探索,选择一种羧甲基衍生物作为该木聚糖酶的稳定剂,取得了较为理想的应用效果。

### 2.4 木聚糖酶酶学特性的研究

#### 2.4.1 热处理条件下的酶活

固体木聚糖酶制剂在85℃干热条件下保温处理0(对照)、15、30、45、60 min后,其残余酶活情况见表2,木聚糖酶在固体条件下耐热性较好,85℃处理60 min后仍存有89.1%的相对酶活。

表2 固体状态下木聚糖酶的热稳定性(85℃)

时间(min)	0	15	30	45	60
相对酶活(%)	100	98.1	96.5	93.6	89.1

#### 2.4.2 木聚糖酶的pH值稳定性

木聚糖酶在不同的pH值柠檬酸缓冲液中处理,然后在不同反应pH值条件下,测定其酶活,结果见图6。结果可以发现,该木聚糖酶在pH值5.0的条件下,酶活最高。由此可见,该木聚糖酶的最适pH值为5.0。

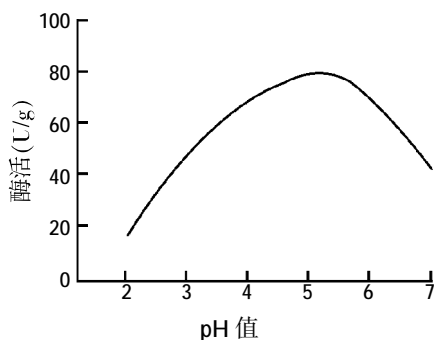


图6 pH值对酶活力的影响

#### 2.4.3 木聚糖酶最适反应温度

在最适pH值条件下,分别设置不同反应温度,并测定该条件下的木聚糖酶酶活,结果见图7。可以发现,反应温度对木聚糖酶酶活的影响很大,在50℃时测定的酶活达到最大值。由此可见,该木聚糖酶最适反应温度为50℃。

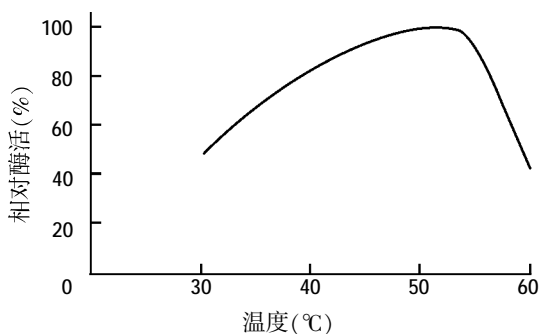


图7 最适反应温度的选择

#### 2.4.4 木聚糖酶的贮藏性能

将生产并已干燥的木聚糖酶粗酶制剂在室温下存放一定时间,分别测定存放0、30、60、90、120 d后的酶活。结果显示,存放120 d后的残存相对酶活仍达92%,酶活损失较小,说明该木聚糖酶酶活贮存性能较好。

### 3 结论

该菌株固态发酵优化培养基为:麸皮、花生壳粉、玉米芯粉配比为5:3:2,加入占固形物干重的0.5%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,加水量110%。优化的培养条件:接种量每克原料中含  $3.05 \times 10^5$  个孢子,培养温度28~30℃,培养时间25~30 h。最佳培养下,木聚糖酶活力6 105 U/g。

该菌株生产的木聚糖酶具有较高的耐热性、耐储存性能,最适反应温度50℃,最适pH值5.0。

#### 参考文献

- 1 吴克,刘斌,张洁,等.绿色木霉木聚糖酶的纯化和性质[J].生物学杂志,2001(6):15
- 2 禹慧明,林勇,徐有良,等.木聚糖酶高产菌株选育[J].工业微生物,2002(1):43-44
- 3 程伟,刘太宇,王彩玲.小麦型日粮添加木聚糖酶对生长育肥猪生产性能的影响[J].河南农业科学,1998(11):40-41
- 4 Bailey M J, Biely P, Poutanen K J. Znterlatory Testing of methods for assay of xylamase. Biotechnol., 1992,23:257-270

(编辑:高雁, [snowyan78@tom.com](mailto:snowyan78@tom.com))

# 里氏木霉重组 t-PA 纯度、分子量及等电点鉴定

邵金华 江 洁

**摘 要** 基因工程菌株里氏木霉(*Trichoderma reesei*)生物合成的组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, t-PA)经分离纯化后,采用还原 SDS-PAGE 和非还原 PAGE 分析达到了电泳纯,采用 Superdex 75 Prep Grade 凝胶过滤色谱分析达到了色谱纯;采用还原 SDS-PAGE 分析其相对分子质量为  $6.6 \times 10^4$ , SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳纤维蛋白自显影法检测其相对分子质量为  $6.6 \times 10^4$ , 与相关文献报道的一致。等电聚焦电泳测定其等电点为 4.24。

**关键词** 里氏木霉;组织型纤溶酶原激活剂;纯度;分子量;等电点

中图分类号 Q814

组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, t-PA)能将纤溶酶原转化成纤溶酶,继而水解纤维蛋白,是一种高效的溶栓剂。它进入血液系统后有 3 种情况:一是执行纤溶系统激活功能;二是它的活性迅速被血浆中的纤溶酶原激活剂的抑制剂(PAI-1)抑制;三是被肝细胞受体识别而被快速清除。t-PA 是体内各种组织中都含有的一种酶,它能选择地将血栓中的纤溶酶原变成纤溶酶使血栓溶解,其在没有血栓时几乎无此作用。与尿激酶不同,t-PA 引起的血栓溶解一般不伴有全身出血的倾向,因而成为新一代血栓溶解剂。我们对基因工程菌株里氏木霉生物合成的 t-PA 进行了分离纯化,为了使其在临床上得到应用,对其纯度、分子量和等电点进行了鉴定。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

血纤维蛋白原(购于 Sigma 公司)、凝血酶(购于中国医学科学院血研所)、Superdex 75 Prep Grade (购于 Pharmacia Biotech 公司)、Q-Sepharose High Performance (购于 Pharmacia Biotech 公司)、AKTA™pilot 蛋白质色谱(购于 Amersham Biosciences 公司)、载体两性电解质(pH 值 3~10)、(购于中国军事医学科学院)、等电点标准蛋白质(pI 值为 3.5~9.3)(购于 Pharmacia Biotech 公司)、标准蛋白分子质量为上海生物化学研究所生产,其它常用试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 SDS-PAGE 和 PAGE 电泳(参照萨姆布鲁克·J 等<sup>[1]</sup>

介绍的方法)

分离胶为 12%,浓缩胶为 5%,胶联度 2.6%,电泳时恒流电流为 10 mA,到分离胶的界面改为 30 mA,用考马斯亮蓝染色。

#### 1.2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳纤维蛋白自显影操作(参照刘士辉等<sup>[2]</sup>介绍的方法)

分离胶为 12%,浓缩胶为 5%,适当稀释的样品与等体积的 2 倍样品缓冲液(4%SDS、20%甘油和 0.2%溴酚蓝)混合均匀,置 30℃环境下 2 h,先恒流 10 mA,到分离胶的界面改为 30 mA;电泳完毕取下凝胶在 2.5%的 Triton-100 中轻轻荡洗 1 h,以洗去结合在蛋白质上的 SDS,使之恢复活性;将用 Triton-100 荡洗过后的凝胶放到预先配好的血纤维平板上,放入保温箱中 37℃保温数小时,随时观察溶带出现的情况。

#### 1.2.3 Superdex 75 Prep Grade 凝胶过滤色谱(参照 Amersham Pharmacia Biotech<sup>[3]</sup>的方法)

用 AKTA 和 Superdex 75 Prep Grade 凝胶过滤层析色谱对离子交换层析后的活性组分进行分析,柱型:Φ1.0 cm×60 cm,上样 2 ml,流速 1.0 ml/min,0.2 mol/l 的 PBS 的 NaCl,pH 值为 7.4,蛋白浓度是 0.001 8 g/ml。

#### 1.2.4 等电聚焦电泳(参照萨姆布鲁克·J 等<sup>[1]</sup>的方法)

单体贮液 3.75 ml、40%载体两性电解质 0.9 ml 与双蒸水 10.25 ml 混合后,真空抽气 10 min,加 10%过硫酸铵 75 μl 和 TEMED 8 μl,混匀后立即灌胶。将 8 cm×12 cm×0.6 cm 的模具组装并用夹子夹好,小心迅速地将胶灌入模具内,1 h 后凝胶完全聚合。先 60 V 预电泳 15 min 后,直接将标准等电点蛋白质和样品(10 μl)加于凝胶表面,恒流 8 mA,当电压升至 550 V,停止电泳,调节电源恒压 580 V,继续电泳至电流为零,结束电泳后固定,在 60℃染色 5 min;用凝胶成像系统分析结果。

邵金华,齐齐哈尔大学生命科学与工程学院研究生信箱,161006,黑龙江省齐齐哈尔市中华西路 35 号。

江洁,单位及通讯地址同第一作者。

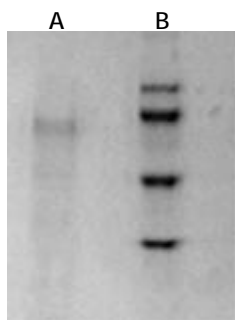
收稿日期:2006-06-19



## 2 结果

### 2.1 SDS-PAGE 电泳分析结果

将分离纯化后的里氏木霉重组 t-PA 采用 SDS-PAGE 电泳分析其纯度,结果如图 1 所示。



A: 样品 B: 标准分子量

图 1 里氏木霉重组 t-PA 的 SDS-PAGE 电泳结果

从图 1 中可见,分离纯化的里氏木霉重组 t-PA 经 SDS-PAGE 电泳为一条单带,因此达到了电泳纯。

### 2.2 PAGE 电泳分析的结果

采用 PAGE 电泳分析里氏木霉重组 t-PA,结果如图 2 所示,里氏木霉重组 t-PA 达到电泳纯。

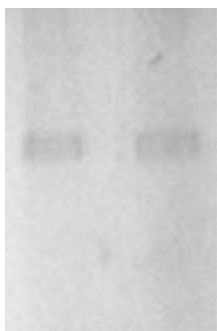


图 2 里氏木霉重组 t-PA 的 PAGE 结果

### 2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳纤维蛋白自显影的分析结果

SDS-PAGE 纤维蛋白自显影方法是先通过 SDS-PAGE 电泳将不同相对分子质量的蛋白质分开,然后用 2.5% 的 Triton-100 荡洗,以洗去 SDS 使蛋白质类物质恢复活性,最后转置血纤维蛋白平板上使之产生溶带,以检测蛋白质生物活性及其相对分子质量大小的方法。此法与 Western 印迹方法相比具有检测更简便、灵敏、快速的特点,且是活性检测<sup>[4]</sup>。对里氏木霉重组 t-PA 进行了 SDS-PAGE 纤维蛋白自显影,37 °C 保温 16 h,溶斑出现的情况如图 3 所示。

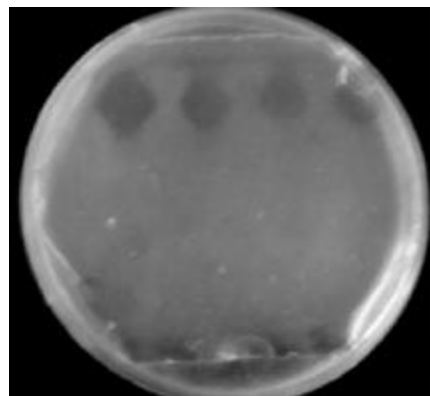


图 3 SDS-PAGE 血纤维蛋白自显影 16 h 的结果

样品的泳带上出现了溶斑,说明它们泳带中的蛋白具有溶解血纤维蛋白的能力,其中溶斑相对分子质量大约在  $6.6 \times 10^4$ 。

### 2.4 Superdex 75 Prep Grade 凝胶过滤色谱的分析结果

Superdex 75 Prep Grade 凝胶过滤色谱的分析结果如图 4 所示,酶的峰型对称,呈单一的峰,所分离的目的蛋白达到了色谱纯,进一步验证了电泳的结果。

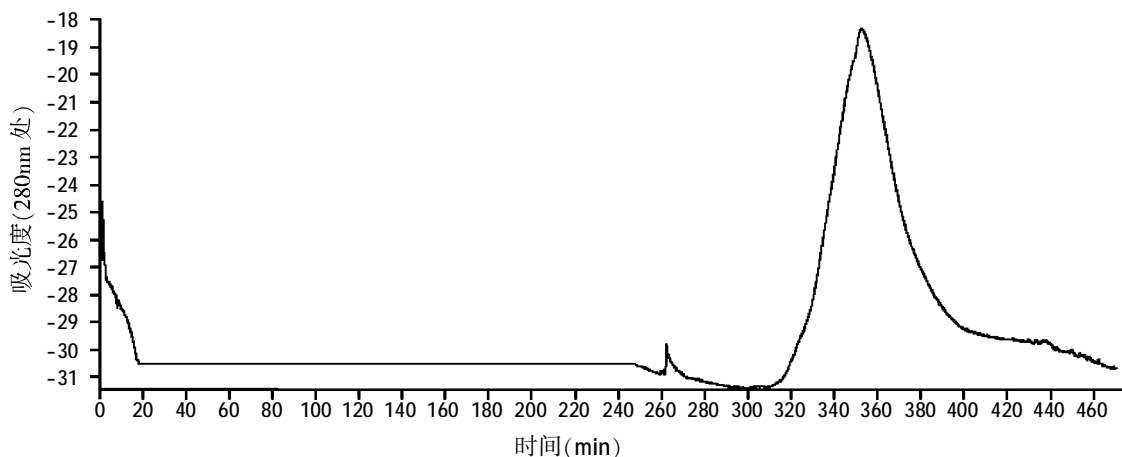


图 4 Superdex 75 凝胶过滤层析洗脱曲线

## 2.5 等电聚焦电泳结果分析

采用等电聚焦(isoelectrofocusing, IEF)电泳测定里氏木霉重组 t-PA 的等电点 (pI), 测定结果如图 5 所示, 可以看出里氏木霉重组 t-PA 的等电点 4.24。

蛋白质的等电点和它所含的酸性氨基酸和碱性氨基酸的数目比例有关。天然 t-PA 的等电点在 7.8~8.6, 最大组分等电点在 8.2。测定的里氏木霉重组 t-PA 的等电点是 4.24。根据 t-PA 序列计算 t-PA 这部分碱性氨基酸残基数和酸性氨基酸残基数的比值是 1.16, 因此其等电点下降为 4.24。

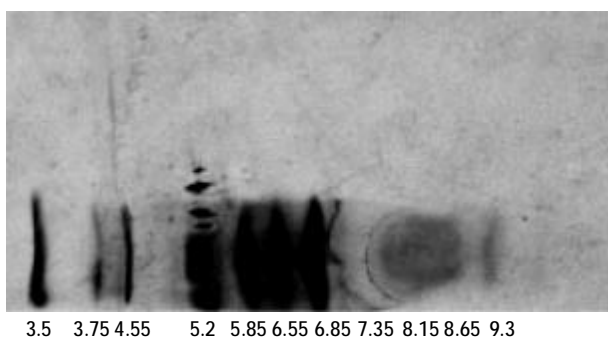


图 5 里氏木霉重组 t-PA 等电聚焦 (IEF) 图谱

## 3 讨论

丝状真菌是一类重要的工业微生物。丝状真菌作为宿主菌具有极为重要的特性优势, 其中包括能分泌大量的蛋白, 长期安全的应用于工业用酶、和其它生化产品的生产, 发酵过程成本低廉且可操作性强, 表达的异源蛋白分泌到胞外, 不改变天然蛋白的结构和性质等。基于以上的优点, t-PA 在丝状真菌里氏木霉中成功的获得表达, 已成功地构建了基因工程菌株, 并通过表达条件的优化, t-PA 表达量为 3 000 IU/ml 发酵液, 对该表达系统表达的 t-PA 的分离纯化及其生物学特性分析工作也完成。

我们用 SDS-PAGE、PAGE 电泳和 Superdex 75 Prep Grade 凝胶过滤色谱的分析该表达系统表达的 t-PA 即达到电泳纯也达到了色谱纯; 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳纤维蛋白自显影分析该表达系统表达的 t-PA 相对分子质量为  $6.6 \times 10^4$ , 具有溶血栓的特性, 说明所分离纯化的物质就是我们要的目的蛋白酶, 也说明了该表达系统表达的 t-PA 是一种单链多肽, 没被纤溶酶在 Arg<sup>275</sup>-Ile<sup>276</sup> 之间切开, 产生双链结构; SDS-PAGE 和 Superdex 75 Prep Grade 凝胶过滤色谱测得的相对分子质量大约在  $6.6 \times 10^4$ , 与文献报道的一致。蛋白质的等电点和它所含的酸性氨基酸和碱

性氨基酸的数目比例有关。血清清蛋白的碱性残基数和酸性残基数的比值为 1.2, 其等电点是 4.7; 血红蛋白的碱性残基数和酸性残基数的比值为 1.7, 其等电点是 6.7。天然 t-PA 的等电点在 7.8~8.6, 最大组分等电点在 8.2。测定的里氏木霉重组 t-PA 的等电点是 4.24。分离得到的里氏木霉重组 t-PA 主要是相对分子质量大约在  $6.6 \times 10^4$  的产物, 是单链天然 t-PA, 根据 t-PA 序列计算 t-PA 这部分碱性氨基酸残基数和酸性氨基酸残基数的比值是 1.16, 因此其等电点下降为 4.24。本研究为以基因工程菌里氏木霉生产 t-PA 的工业化提供了依据。

### 参考文献

- 1 萨姆布鲁克·J, 弗里奇·EF, 曼尼阿蒂斯·T 等著. 金东雁等译. 分子克隆实验指南(第 2 版). 北京: 科学出版社, 1996. 880-885
- 2 刘士辉, 朱恒奇, 徐秀英, 等. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳纤维蛋白自显影法检测不同分子量的纤溶酶原激活剂. 中国应用生理学杂志, 1994, 10(4): 367-369
- 3 Amersham Pharmacia Biotech. Gel filtration principles and methods. 2002. 9-29
- 4 Garnick RL, Ross MJ, du Mess CP. Analysis of recombinant biologicals in Encyclopedia of pharmaceutical technology, New York: Marcel Dekker, 1998(1): 253

(编辑: 孙崎峰, sqf0452@126.com)

### · 广 告 ·

争做稳定性 VC 系列优秀供应商——

**富阳市优派特  
生物技术有限公司**

**L-抗坏血酸-2-磷酸酯 35% (2000 吨/年)  
包衣 VC、VC 钙、VC 钠**

农业部生产许可证号: 饲添(2003)1542  
公司地址: 杭州富阳市凤浦路 86 号(311400)  
生产基地: 富阳市灵桥镇工业小区 2 号  
电话: 0571-63349309  
传真: 0571-63340623  
http://www.fyupdate.com  
E-mail: sale@fyupdate.com  
联系人: 陈先生(13806517850)

# 酶制剂活性的测定及稳定性的研究

魏有霞 韩增祥

**摘要** 试验在测定饲用纤维素复合酶活性的基础上,研究了不同的温度、金属离子和 pH 值对饲用纤维素复合酶稳定性的影响。从而得出,不同的温度、金属离子和 pH 值对饲用纤维素复合酶组分中的纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶和木聚糖酶的活性有着不同程度的影响。

**关键词** 酶制剂;纤维素酶; $\beta$ -葡聚糖酶;木聚糖酶

**中图分类号** Q814.4

衡量酶制剂质量的重要指标为酶活性,即用每克(或每毫升)酶制剂含有多少酶活单位来表示其效力大小<sup>[1]</sup>。因此饲用纤维素复合酶活性的测定以及酶稳定性研究具有重要的意义。

饲用纤维素复合酶制剂受多种因素的影响。研究表明,影响酶在预混料、制粒加工和贮藏运输过程中的稳定性的主要因素<sup>[2]</sup>有温度、酸、碱、重金属、氧化剂、挤压磨损和紫外线等。即使采取稳定化措施,酶在贮存、颗粒化饲料加工和动物消化道等条件下仍有失活。因此必须针对不同的酶制剂产品、饲料加工方式和饲养管理等采取相应的措施,才能尽量发挥其使用效率<sup>[3]</sup>。

试验探讨了不同因子对饲用纤维素复合酶活性的影响作用,为饲用酶制剂的贮藏以及生产中应注意的问题和如何比较理想的利用,使饲用纤维素类酶产品达到理想效果提供参考依据。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 材料

饲用纤维素复合酶包括纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶和木聚糖酶,由北京谱拉斯公司提供。

### 1.2 试剂的配制

#### 1.2.1 缓冲溶液的配制

称取 7.40 g  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  溶解在盛有 1 000 ml 蒸馏水的烧瓶中,吸取 2.65 ml 冰醋酸放在 1 000 ml 蒸馏水的烧瓶中,用冰醋酸溶液调节  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  溶液的 pH 值,分别配制 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0 的缓冲液[用 PHs-3c 型(上海产)酸度计测定其 pH 值]。

#### 1.2.2 酶活测定试剂的配制

1.2.2.1 准确称取 91.0 g 酒石酸钾钠溶解于 500 ml 水中,依次加入 3,5-二硝基水杨酸 3.15 g,氢氧化钠 20.0 g,不断搅拌,并小心加热,溶液最高温度不超过 45 ℃,再加入 2.5 g 苯酚和 2.5 g 亚硫酸钠搅拌均匀,冷却至室温后定容至 1 000 ml,贮存在棕色瓶子中,于冰箱中保存 2 周后供测定纤维素酶和  $\beta$ -葡聚糖酶活性用。

1.2.2.2 50 ℃下,在 800 ml 水中溶解 20.0 g 3,5-二硝基水杨酸,不断搅拌,缓缓加入 300 ml 氢氧化钠,使之完全溶解,再继续搅拌,分数次少量加入 300.0 g 酒石酸钾钠,5 g 重蒸酚和 5 g 亚硫酸钠,并小心加热,溶液最高温度不超过 45 ℃,不断搅拌,直到溶液清澈,加蒸馏水定容至 2 000 ml,用烧结玻璃过滤器过滤,清液储存于棕色瓶中,并置于冰箱保存 2 周以备测定木聚糖酶活性用。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 饲用纤维素复合酶酶活的测定<sup>[4-6]</sup>

酶活测定采用 DNS 法。

标准曲线的制作:准确称取 100 mg 无水葡萄糖分析纯(预先在 105 ℃干燥至恒重),用少量蒸馏水溶解后,转移到 100 ml 容量瓶中,再定容到刻度,摇匀,浓度为 1 mg/ml。取 10 支 25 ml 的刻度试管,分别按表 1 的设计加入试剂。

表 1 不同组溶液的添加量(ml)

项目	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
葡萄糖标准溶液	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8
相当于葡萄糖量	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8
蒸馏水	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2
3,5-二硝基水杨酸	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

将各管溶液混合均匀,在沸水中加热 5 min,取出后立即冷却到室温,再向每管中加入 21.5 ml 蒸馏水,摇匀,于 520 nm 波长处比色,以所得的光密度值(OD 值)为纵坐标,以对应的标准葡萄糖溶液的浓度为横

魏有霞,青海大学农牧学院草业科学系,810016,青海。

韩增祥,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-08-14

坐标,每管重复3次,取平均值,绘制标准曲线。

1.3.2 饲用纤维素复合酶中各组分稳定性的研究

1.3.2.1 不同处理温度对饲用纤维素复合酶中各组分酶活的影响

准确称取 1.000 0 g 饲用纤维素复合酶,分别在 65、75、85、95 °C 恒温干燥箱中处理 10 min,立即用 pH 值为 5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液提取,测定酶活<sup>[7]</sup>。

相对酶活(%)=经处理后的酶活/在最适宜的条件下测得的酶活。

1.3.2.2 不同金属化合物的处理对饲用纤维素复合酶中各组分酶活的影响

用 pH 值为 5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液配制 10 mg/ml 的木聚糖 (Singmax 燕麦型)、10 mg/ml 的 β-葡聚糖 (Sigma 公司)、10 mg/ml 的羧甲基纤维素钠溶液(由上海化学试剂厂提供)。分别加入金属化合物(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、NaCl、FeSO<sub>4</sub>、FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、KCl、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O,并使各金属化合物浓度分别为 5 mmol/l。分别加入 1.000 0 g 饲用纤维素复合酶定容到 500 ml,浸提 24 h,过滤。测定酶活。

1.3.2.3 不同 pH 值对饲用纤维素复合酶中各组分酶活的影响

用醋酸-醋酸钠溶液配制 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0 的缓冲液,测定饲用纤维素复合酶中纤维素酶、β-葡聚糖酶和木聚糖酶的相对酶活。

2 结果与讨论

2.1 饲用纤维素复合酶中各组分的活性

表 2 饲用纤维素复合酶中各组分的活性(U/g)

项目	纤维素酶	β-葡聚糖酶	木聚糖酶
酶活	190	555	1 340

从表 2 可知,饲用纤维素复合酶中纤维素酶,β-葡聚糖酶和木聚糖酶的酶活分别为 190、555、1 340 U/g。

2.2 温度对饲用纤维素复合酶稳定性的影响

从图 1 可知,随着干热处理温度的升高,饲用纤维素复合酶中纤维素酶的活性随着温度的升高而降低。尤其是从 65~75 °C 和 85~95 °C 时酶活的损失较大。因此在以后的饲料工业加工处理以及贮藏中,尽量避免在此范围保存此酶,以免损失较大。β-葡聚糖酶在 75~85 °C 之间时,酶的活力损失最大,此范围是 β-葡聚糖酶的温度敏感区,其次是 85~95 °C,对温度不敏感区域是 65~75 °C。木聚糖酶对温度不象纤维素酶和 β-葡聚糖酶那样对温度有较为明显的区域。在 65~95 °C 中损失最大的是 β-葡聚糖酶,其次是木聚糖酶,最后

是纤维素酶。木聚糖酶在 75 °C 以后,随着温度的增加相对酶活的损失增加,这比李莲<sup>[8]</sup>等的研究温度低 10 °C,这可能是由于木聚糖酶的来源不同所致。汪傲<sup>[9]</sup>等研究认为,不同型号的木聚糖酶在相同的干热处理下,酶活损失不一致。

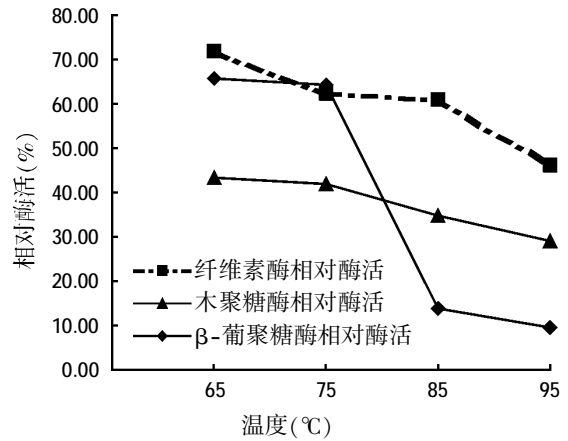


图 1 不同温度处理对饲用纤维素复合酶中各组分活性的影响

从图 1 可以得出,不同的酶组分对温度的敏感性不一样,损失不一致。这在生产中不可能一一控制,它们能承受的损失最小的共同温度应在 65~75 °C 的范围内。因此在以后的饲料加工处理以及贮藏中,尽量在此温度范围内保存饲用纤维素复合酶,以防酶活损失较大。

2.3 不同金属离子对饲用纤维素复合酶中纤维素酶相对酶活性的影响(见表 3)

表 3 不同离子对饲用纤维素复合酶中各组分相对酶活的影响(%)

金属离子	纤维素酶相对酶活(%)	木聚糖酶相对酶活(%)	β-葡聚糖酶相对酶活(%)
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	80.34	68.38	58.38
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	22.37	15.39	43.02
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	88.77	80.77	45.21
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	68.34	121.80	65.67
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	77.40	92.31	20.37
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	50.48	140.54	93.43
KCl	47.30	136.75	42.43
NaCl	74.16	135.04	21.83
FeSO <sub>4</sub>	72.41	95.73	137.26

从表 3 看出,不同金属离子对饲用纤维素复合酶中各组分酶活的影响不同。不同金属离子对纤维素酶相对酶活的影响规律为:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O<MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O<NaCl<FeSO<sub>4</sub><FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O<Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub><KCl<CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O。

不同金属离子对饲用纤维素复合酶中的 β-葡聚糖酶相对酶活抑制作用的影响由小到大为:Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub><

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} < \text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} < (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 < \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} < \text{KCl} < \text{NaCl} < \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

不同金属离子对纤维素复合酶中木聚糖酶相对酶活的影响有如下规律:

① 对木聚糖酶有激活作用的离子的激活能力由小到大为: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} < \text{NaCl} < \text{KCl} < \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 。

② 对木聚糖酶有抑制作用的离子的抑制能力由小到大为: $\text{FeSO}_4 < \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} < (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 < \text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} < \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 。

从表 3 可知,不同的金属离子对同一种酶的激活或抑制作用不同。 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 对木聚糖酶相对酶活有抑制作用,  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 对木聚糖酶相对酶活有激活作用,  $\text{Fe}^{2+}$ 对木聚糖酶相对酶活影响不大,但是  $\text{Fe}^{3+}$ 对木聚糖酶相对酶活有激活作用,这与李莲等<sup>[7]</sup>的结论一致。3 种铁离子的化合物对纤维素酶和  $\beta$ -葡聚糖酶酶活的影响中,  $\text{Fe}^{2+}$ 的生物学效价高于  $\text{Fe}^{3+}$ 。同是  $\text{Fe}^{3+}$ 的  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  的生物学效价高于  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 这可能是阴离子也影响着酶活, 这一点还需进一步研究。

由于饲用纤维素酶是复合酶, 因此, 不能笼统地说哪一种金属离子对饲用纤维素酶有激活或抑制作用, 应综合考虑各组分的影响, 一些对别的酶有作用的结论, 不能随便引用, 需要试验验证。

#### 2.4 不同 pH 值对饲用纤维素复合酶中各组分相对酶活的影响(见表 4、图 2)

表 4 不同 pH 值对饲用纤维素复合酶中各组分相对酶活的影响

酸度 (pH 值)	木聚糖酶 相对酶活 (%)	纤维素酶 相对酶活 (%)	$\beta$ -葡聚糖酶 相对酶活 (%)
3.0	26.71	32.42	34.98
4.0	52.14	38.23	41.35
5.0	100	100	100
6.0	82.62	72.22	78.82
7.0	79.92	73.05	58.36

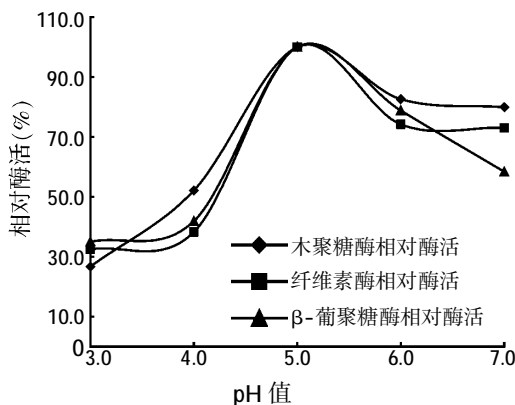


图 2 不同 pH 值对饲用纤维素复合酶中各组分酶活的影响

从图 2 可知, pH 值对饲用纤维素复合酶中各组分的影响呈“钟状”, 但并不是一个对称的钟。在 pH 值为 5 时, 饲用纤维素复合酶有最佳酶活。无论是该酶中哪一组分在最佳活性 pH 值略偏低的酸度下, 酶活力损失较大。由此可以推测分泌此酶系的微生物菌中有可能生活在略偏碱性的环境中。pH 值 4.0~5.0 是木聚糖酶、纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶相对酶活最敏感区, 敏感性顺序为: 木聚糖酶 <  $\beta$ -葡聚糖酶 < 纤维素酶; 其次敏感区为 pH 值 5.0~6.0, 敏感性大小顺序仍然为: 木聚糖酶 <  $\beta$ -葡聚糖酶 < 纤维素酶。

### 3 结语

3.1 饲用纤维素复合酶中的纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶和木聚糖酶的相对酶活对温度的敏感性不同。它们能承受的损失最小的共同温度应在 65~75 °C 的范围内。

3.2 无机金属化合物  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KCl}$  和  $\text{NaCl}$  对饲用纤维素复合酶活的影响因不同的酶组分而有不同的差异。

3.3 饲用纤维素复合酶中的纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶和木聚酶对 pH 值的敏感性不同。在 pH 值为 5 时饲用纤维素复合酶有最佳活性。在最佳活性 pH 值偏高的酸度下, 酶活损失较大, 敏感性顺序为木聚酶 <  $\beta$ -葡聚糖酶 < 纤维素酶。

### 参考文献

- 1 赵德英, 崔德英, 张景宏. 酶活性检测存在的问题[J]. 中国饲料, 1996(14): 38~40
- 2 刘德芳. 配合饲料科学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993. 171
- 3 程志斌, 葛长荣, 李剑奇. 饲用酶制剂生产应用中一些问题的探讨[J]. 饲料工业, 2001, 21(12): 44~45
- 4 陆问清, 刘伟, 刘兴海, 等. 饲用复合酶热稳定性试验分析[J]. 饲料工业, 1998, 19(8): 17~18
- 5 汪傲, 雷祖玉, 冯玉琴.  $\beta$ -葡聚糖酶活力的测定[J]. 饲料研究, 2000(5): 5~7
- 6 汪傲, 韩卫涛, 雷祖玉, 等. 不同酶促反应对木聚糖酶活性的影响. 饲料研究, 2000(3): 1~5
- 7 李莲, 罗长才. 饲用酶制剂中木聚糖酶酶学性质的研究[J]. 饲料工业, 2003, 24(3): 19~22

(编辑: 高 雁, [snowyan78@tom.com](mailto:snowyan78@tom.com))

# CMC糖化力法测定纤维素酶活性条件的研究

李兰晓 杜金华 李军训 徐海燕 张志焱

**摘要** 对影响 CMC(羧甲基纤维素钠)糖化力法测定纤维素酶活性的主要因素进行了研究。研究表明,纤维素酶活性适宜的测定波长为 540 nm, DNS 的添加量为 1.5 ml,沸水浴显色时间为 5 min,显色后,吸光值在 15~90 min 内保持稳定。适宜的底物(CMC)浓度为 10 g/l,适宜的酶促反应时间为 5 min。

**关键词** CMC 糖化力法;纤维素酶;酶活;测定  
**中图分类号** Q814

纤维素是植物纤维的主要成分,自身难以被单胃动物消化利用,并且对饲料中各种养分的消化利用具有明显的干扰和抑制作用。纤维素酶是降解纤维素生成葡萄糖的一组酶的总称<sup>[1]</sup>。研究表明,向饲料中添加纤维素酶,不仅能有效地消除纤维素的抗营养作用,而且能促进饲料中各种养分的消化和吸收利用,提高饲料代谢能值和动物的生产性能,增进畜禽健康,减少畜禽排泄物对环境的污染及拓宽饲料原料的范围<sup>[2]</sup>。因此,纤维素酶在饲料工业中具有广阔的应用前景。

但长期以来,纤维素酶酶活的分析测定一直是困扰纤维素酶生产和应用的主要难题之一。这是因为纤维素酶是一种多组分的复合酶,不同来源的纤维素酶的组成及各组分的比例有较大差异;同时,纤维素酶作用的底物也比较复杂,致使纤维素酶酶活的测定方法很多,且复杂而不统一。常用的测定方法有:CMC糖化力法、CMC液化力法、滤纸糖化力法、滤纸崩溃法和棉花糖化力法等<sup>[3]</sup>。国内许多单位分别采用了上述各种方法并进行了种种修改使测定方法更加多样化。在上述测定方法中,CMC糖化力主要代表内切 $\beta$ -1,4葡聚糖酶酶活<sup>[4]</sup>,在研究和实际生产中应用比较普遍,但具体的测定条件也有较大差异。例如,测定波长从 490~570 nm<sup>[5-9]</sup>、底物浓度从 5~20 g/l<sup>[10-13]</sup>、酶促反应

时间从 5~30 min<sup>[14-17]</sup>都有研究者选用,这就造成了不同产品、不同结果之间无法相互比较。因此,研究和建立合理统一的纤维素酶酶活测定标准很有必要。针对上述问题,本文对影响 CMC糖化力法测定纤维素酶酶活的主要因素进行了研究,以期制定统一的纤维素酶的酶活测定方法提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

氢氧化钠、酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸、苯酚、无水亚硫酸钠、葡萄糖、醋酸、醋酸钠、羧甲基纤维素钠、纤维素酶。上述试剂中,除纤维素酶为黑曲霉发酵产品外,其余均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

UV-2450型紫外分光光度计、UV-2000型分光光度计、恒温水浴锅、电子分析天平、PHS-3C数字式酸度计、电子调温电炉。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 待测酶液的制备

准确称取纤维素酶 1.00 g,用 pH 值为 4.6 的 0.2 mol/l HAc-NaAc 适当稀释后,做为待测酶液。

#### 1.3.2 葡萄糖标准曲线的绘制

取 7 支 25 ml 比色管,分别加入 1.0 mg/ml 的葡萄糖标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 ml,补加蒸馏水至 2 ml,加入一定量的 DNS 试剂,沸水浴显色后定容,在适宜的波长条件下测吸光值 A,以 A 为横坐标,葡萄糖含量为纵坐标绘制葡萄糖标准曲线。

#### 1.3.3 纤维素酶的酶活测定

25 ml 具塞试管中加入 1.5 ml 以 0.2 mol/l pH 值为 4.6 HAc-NaAc 缓冲液配制的 1% CMC 溶液,置于 40 °C 水浴中热 5 min,加 0.5 ml 适当稀释的酶液,40 °C 准确反应 30 min,加入 DNS 试剂,沸水浴显色后定容

李兰晓,山东农业大学食品科学与工程学院,271018,山东省泰安市岱宗大街 61 号。

杜金华,单位及通讯地址同第一作者。

李军训、徐海燕、张志焱,山东宝来利来生物工程有限公司。

收稿日期:2006-08-7

至 25 ml, 摇匀。以相同条件下沸水浴灭活 5 min 的酶液为空白, 在适宜的波长条件下测定吸光值。然后在相应的葡萄糖标准曲线上求得生成的葡萄糖的量。

酶活单位的定义: 上述反应条件下, 1 min 水解 CMC 产生 1  $\mu\text{g}$  葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活单位, 以 U 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 测定波长的选择

在 400~600 nm 波长范围内, 分别对酶解产物与 DNS 显色反应后的生成物及空白显色剂的吸光特性进行了扫描分析(见图 1)。

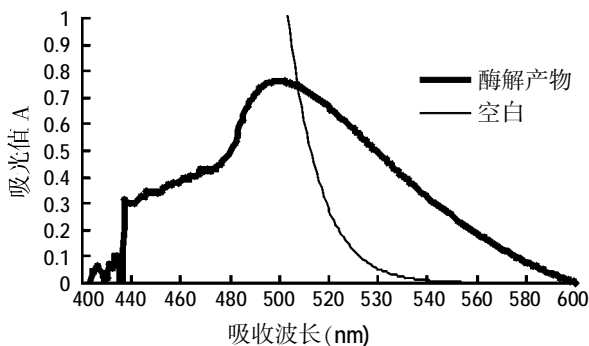


图 1 酶解产物与 DNS 反应后生成物及空白显色剂的吸收曲线

从图 1 中可以看出, 显色后的生成物在波长 410~600 nm 均有吸收值, 其最大吸收峰在 483 nm 处; 但显色剂在 480~530 nm 波长范围内有较明显的光吸收。比色分析中, 显色剂是过量的, 因此, 测定波长的选择应避开此范围以消除显色剂对分析的干扰。在 540 nm 处, DNS 本身的吸光值显著降低, 接近它的最低值, 且酶解产物与 DNS 的反应产物仍有较强的光吸收, 在此波长下测定的结果受 DNS 的干扰小, 符合“吸收最大, 干扰最小”的原则。因此, 选择 540 nm 作为测定波长, 这样在测定时, 既可保证测定的灵敏度, 又能避免显色剂的干扰, 提高了测定的准确度。

### 2.2 DNS 试剂添加量的确定

分别取 DNS 试剂 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml, 在相应的标准曲线下测定同一酶, 测定结果见图 2。图 2 表明, 当 DNS 添加量为 0.5 ml 时, 测定结果明显低于其它添加量的结果; 而当 DNS 添加量在 1~3 ml 范围内时, 测定结果没有显著差异。图 2 结果说明 DNS 用量为 0.5 ml 时, DNS 添加量不足, 显色反应不完全; 添加量在 1~3 ml 范围内, 显色剂都是过量的。显色剂添加量大, 会使空白偏大, 且测定的吸光值偏大, 测定

范围变窄; 显色剂添加量少, 则试验误差相对较大。为确保显色反应进行完全、减少试验误差, 本实验选择 DNS 试剂添加量为 1.5 ml。

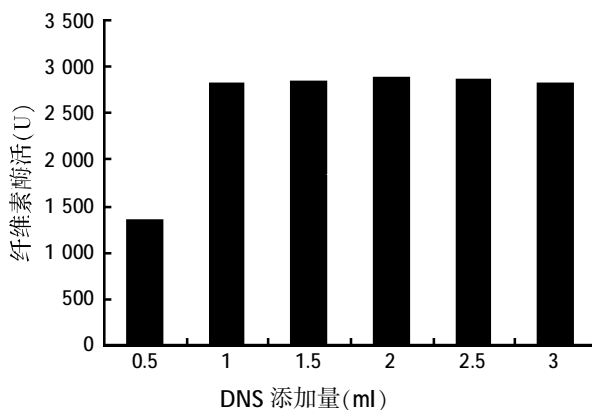


图 2 DNS 添加量对测定结果的影响

### 2.3 沸水浴显色时间的选择

由于不同来源的纤维素酶酶活不同, 产生的还原糖量也不同, 因此, 直接以纤维素酶来确定显色时间的方法不可靠。考虑到煮沸主要是使还原糖与 DNS 反应完全, 而在比色分析过程中, 吸光值一般要求控制在 0.2~0.8 范围内, 以保证测定数据的准确性, 因此, 采用最高测量值的还原糖标准液来确定显色反应的时间, 结果见图 3。从图 3 可以看出, 当显色时间超过 5 min, 吸光值已基本趋于稳定。因此, 显色反应的时间确定为 5 min。

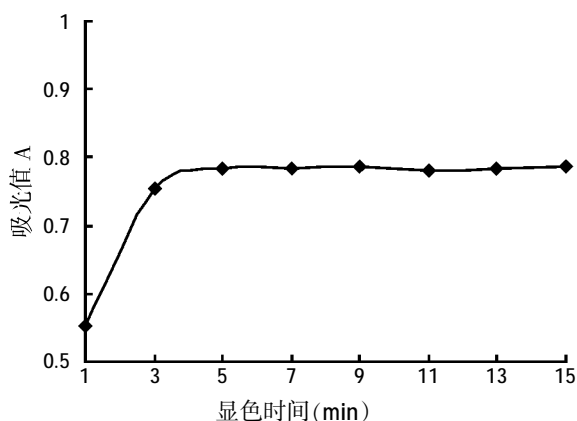


图 3 显色时间对吸光值的影响

### 2.4 显色后吸光值稳定性的研究

显色反应结束后, 在 15~90 min 范围内, 每间隔 15 min 测定吸光值, 结果见图 4。图 4 表明, 在显色后的 15~90 min 范围内, 吸光值相对稳定。

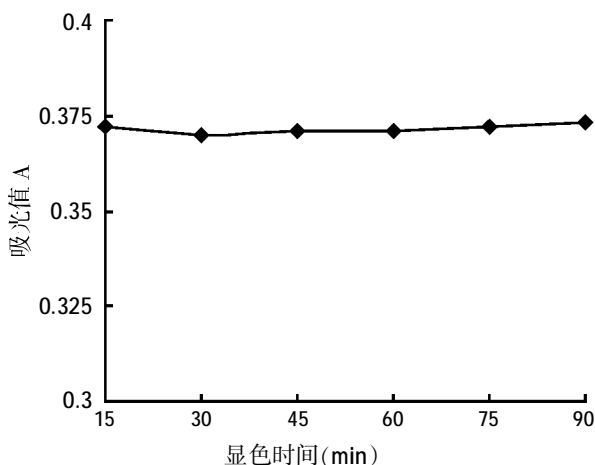


图4 显色后显色的稳定性

### 2.5 底物浓度对酶活测定的影响

同一种酶在不同底物浓度下的测定结果见图5。图5表明,底物浓度从2.5 g/l增大至7.5 g/l过程中,酶活与底物浓度成正比;当底物浓度超过7.5 g/l后,酶活趋于稳定,此时,再继续增加底物浓度也不能使酶活增大。原因是CMC浓度较低时,反应速度与底物浓度成正比,表现为一级反应;CMC超过一定浓度后,酶被底物所饱和,反应速度达到最大,表现为零级反应,酶活趋于极限值。测定酶活时,应选择底物尽量饱和的,以消除底物浓度对分析结果的影响,并延长线性反应时间。但CMC在高浓度条件下,溶解性较差,且粘度较大,使试验结果准确性和重复性较差。因此,本实验确定反应体系的底物浓度为10 g/l。

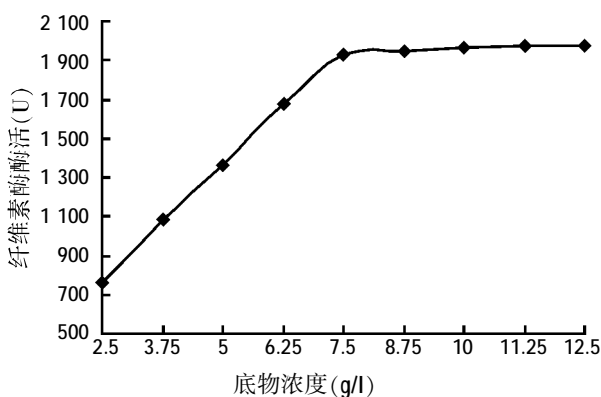


图5 底物浓度对纤维素酶活测定的影响

### 2.6 酶促反应时间的选择

酶活大小与酶促反应时间的关系如图6所示。图6表明,随着反应时间的延长,酶活逐渐降低。这主要是因为随着反应进行,底物浓度降低,产物浓度增加,逆反应从无到有逐渐变得显著;同时,酸、热等因素也

慢慢地使酶丧失部分活性。为减少实验误差,本实验选择5 min作为最适反应时间。

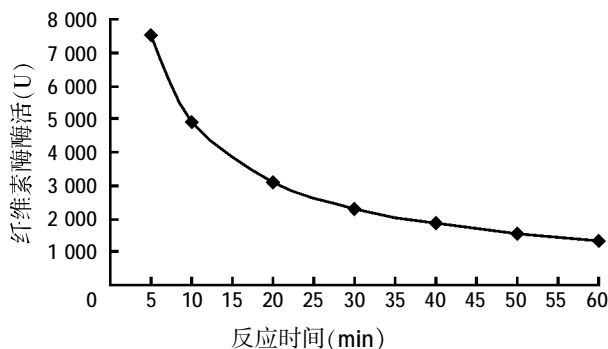


图6 酶促反应时间对酶活测定结果的影响

### 3 讨论

对于测定体系的pH值和温度,不同来源的纤维素酶其最适反应温度和pH值是有差别的,因此测定的温度和pH值不能完全统一。建议根据酶的用途灵活掌握,不能一味追求酶活的测定数值而刻意使其在最适条件下测定。本研究使用的酶为饲用酶,进行催化反应的场所是在动物消化道内(通常温度是40℃、pH值4.6),因此,试验确定的测定体系的反应温度为40℃、pH值为4.6,测定条件相对接近动物体内消化道生理环境,而不一定是该酶的最适作用条件。

### 4 结论

CMC糖化力法测定纤维素酶,适宜的测定波长为540 nm,DNS的添加量为1.5 ml,沸水浴显色5 min,显色后15~90 min吸光值保持稳定,适宜的CMC浓度为10 g/l,适宜的酶促反应时间为5 min。

### 参考文献

- 1 Chahal D S. Solid-State Fermentation with *Trichoderma reesei* for Cellulase Production[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1985, 49(1): 205~210
- 2 Ohmiya K, Sakka K, Karita S, et al. Structure of cellulases and their applications [J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1997, 4:365~414
- 3 Bhat M K, Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications[J]. *Biotechnology Advances*, 1997, 15:583~620
- 4 Xiaohong Zhou, Hongzhang Chen, Zuohu Li. CMCase activity assay as a method for cellulase adsorption analysis [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35:455~459
- 5 B.施特马赫著.钱嘉渊译.酶的测定方法[M].北京:中国轻工业出版社,1992. 103~177
- 6 中山大学生物系生化微生物教研室编.生化技术导论[M].北京:人民教育出版社,1979. 61~63
- 7 北京大学生物系生化教研室编.生物化学实验指导[M].北京:人民教育出版社,1988. 22~24



# 植酸酶的生产研究进展

郭宝林 高志璞

植酸是谷物、豆类、油籽和坚果中磷的主要贮存形式,其含量为 1%~5%。饲料中总磷的 1/3 是可消化的无机磷,其余的 2/3 则以有机磷即菲丁的形式存在,菲丁是肌醇六磷酸钙镁盐的复合物,肌醇六磷酸又称植酸。植酸磷对于单胃动物来说是非常难以利用的,因为这些动物的胃肠道内不分泌或只分泌很少量的降解植酸的酶——植酸酶。由于植酸不能被消化利用,通常在猪及家禽饲料中添加无机磷以满足动物对磷的需要。但是,未被利用的无机磷和饲料中的植酸磷被动物排出体外后,容易造成环境生态问题(富营养化作用)。所以,应用植酸酶不仅可以提高磷的生物利用率,也可以降低磷的排放,保护环境。

## 1 植酸酶的分类

植酸酶的来源非常广泛,包括动物、植物和微生物。国际生物化学与分子生物学协会(IUBMB)会同国际理论应用化学联合会与国际生物化学联合会(IUPAC-IUB)、生物化学命名联合会(JCBN)把植酸酶分为 2 类:① EC 3.1.3.8,称为 3-植酸酶,即肌醇六磷酸-3-磷酸水解酶。水解肌醇六磷酸盐 3 位上的酯键,生成 D-肌醇-1,2,4,5,6-五磷酸盐和正磷酸盐。② EC 3.1.3.26,称为 6-植酸酶,即肌醇六磷酸-6-磷酸水解

酶;水解肌醇六磷酸盐 6 位上的酯键,生成 D-肌醇-1,2,3,4,5-五磷酸盐和正磷酸盐。底物中的其余酯键以不同的速率被水解。

Mullaney 和 Ullah 按照结构和催化特性把植酸酶分为 3 类,包括组氨酸酸性磷酸酶(HAPs)、 $\beta$ -螺旋植酸酶(BPP)和紫色酸性磷酸酶(PAP)。

在目前报道的所有 HAPs 中,植酸酶 phyA 和 phyB 是最具代表性的 2 种。此类酶拥有保守活性位点模体 RHGXRXP,这对高分子量的酸性磷酸酶是唯一的,并以两步方式水解磷酸单酯。有些植酸酶不具有 HAPs 活性位点所拥有的 RHGXRXP 和 HD 模体,所以这些酶发挥作用的条件是不同的。

## 2 植酸酶的生产工艺

植酸酶的生产工艺有固体发酵(sSF)和液体发酵(sMF)两种。选择某一特定生产工艺时应考虑培养条件、菌株类型、底物特性以及营养素的利用率等因素,因为这些都是影响产量的关键因素。Stockmann 等报道了由多形汉逊酵母在限制氧气的条件下液体发酵生产植酸酶,他们发现,在限制氧气的条件下以葡萄糖为培养基预先培养菌株,使产量提高了 25%,并且消除了 20 h 的延滞期,在没有该限制条件的情况下延滞期通常是存在的。利用无花果曲霉(AF)NRRL 3135 生产植酸酶已有 3 种不同的方法,即固体发酵、半固体发酵和液体发酵。曾有用黑曲霉 NRRL 3135 进行固体发酵可完全降解双低油菜粕中的植酸成分的报道。Ebune 等也进行了利用无花果曲霉发酵双低

郭宝林,北京昕大洋科技发展有限公司,博士,100081,北京市海淀区中关村南大街 12 号。

高志璞,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-25

- 8 沈雪亮,夏黎明. 芽孢杆菌产纤维素酶的研究 [J]. 林产化学与工业, 2002,22(3):54~58
- 9 Miller G L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar[J]. Analytical Chemistry,1959,31:426~428
- 10 刘德海,杨玉华,安明理,等. 纤维素酶酶活的测定方法[J]. 中国饲料,2002(17):27~28
- 11 王淑军,杨从发,陈静. 用于降解秸秆的纤维素酶产生菌的筛选研究[J]. 粮食与饲料工业,2001(12):21~23
- 12 崔宗均,李美丹,朴哲,等. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能[J]. 环境科学,2002,23(3):36~39
- 13 Steven Criquet. Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter [J]. Journal of Microbiological Methods,2002,50:165~173
- 14 王琳,刘国生,王林高,等. DNS 法测定纤维素酶活力最适条件研究[J]. 河南师范大学学报,1998,26(3):66~69
- 15 朴哲,崔宗均,苏宝琳,等. 高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的酶活特性[J]. 中国农业大学学报,2003,8(1):59~61
- 16 陆文清,刘伟,刘兴海,等. 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
- 17 王晓芳,徐旭士,吴敏,等. 一株纤维素分解菌的分离与筛选[J]. 生物技术,2001,11(2):27~30
- 18 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册 [M]. 北京:中国轻工业出版社,1994. 684~685

(编辑:高雁, [snowyan78@tom.com](mailto:snowyan78@tom.com))

油菜粕生产植酸酶的研究,发现菌株种龄对酶的合成有很大的影响。Krishna 和 Nokes 研究了黑曲霉固体发酵生产植酸酶时发酵条件的影响,试验发现,是种龄、培养基组成(小麦麸和全脂大豆粉)和发酵时间对发酵影响很大。Bogar 等开展了无花果曲霉 NRRL 3135、总状毛霉 NRRL 1994 和少孢根霉 NRRL 5905 利用双低油菜粕、破碎玉米、豆粕和小麦麸固体发酵生产植酸酶的研究。应用 Plackett-Burman 中心组成设计进行优化研究表明,在小麦麸中添加淀粉和硫酸铵可提高酶产量。另外还有文献报道了由少孢根霉在不添加任何其它营养元素的双低油菜饼培养基上进行固体发酵生产植酸酶的发酵条件(pH 值 5.3、30 ℃、水分 54.5%)。Kleist 等研究了低氧培养基中保持葡萄糖浓度恒定(分批补料发酵)时大肠杆菌产胞外植酸酶的情况,发现在恒定的低氧水平(5%~10%)下葡萄糖的摄取速度很快,在较短的发酵时间(14 h)内可获得较高的植酸酶活性(120 U/ml)。Bacillus sp. DS11(一种杆菌)在小麦麸和酪蛋白水解产物组成的培养基中 37 ℃进行液体发酵(sMF)可生产出具有热稳定性的胞外植酸酶,将该基因在枯草芽孢杆菌中克隆,在改进的 Luria 肉汤培养基中的植酸酶产量提高 100 倍。Mayer 等研发了一种植酸酶低成本生产工艺(中试规模),其将烟曲霉和土曲霉的野生型基因转化到多形汉逊酵母中。

Kim 等对 *Aspergillus* sp. 5990(一种曲霉)在 37 ℃、pH 值 7.0 条件下液体发酵生产植酸酶(生产出的酶与来自无花果曲霉 NRRL 3135 的商品化植酸酶 Natuphos 相比,最适温度更高)的研究发现,发酵液的酶活提高了 5 倍。Papagianni 等用黑曲霉研究了培养基组成、形态和植酸酶生产之间的定性关系。最近用 *Mitsukella jalaludinii*(一种来自牛瘤胃的新菌种)分批发酵生产植酸酶发现,在米糠—豆浆(质量比 2:1)培养基中存在葡萄糖抑制现象,在不使用任何表面活性剂的情况下,最适生产参数为 39 ℃和 pH 值 7.0。

Martin 等在泡盛曲霉 *glaA* 启动子转录控制下,克隆并表达了泡盛曲霉和烟曲霉的 *phyA* 基因。在天然葡萄糖糖化酶和异源蛋白间插入 1 个 *Kex-2* 蛋白酶切割位点,以便内源性的 *Kex-2* 蛋白酶可以对嵌合蛋白进行有效加工。在 41 批的液体发酵中,获得了植酸酶的最大量表达(200 U/ml)。

### 3 磷浓度对植酸酶的影响

众所周知,高浓度的磷酸盐会抑制酸性磷酸酶和植酸酶的合成,因而要在它们的表达过程中控制磷酸

盐的浓度。研究发现,当无机磷含量为 0.000 1%~0.005%时(玉米淀粉为 8%时的磷最适浓度为 0.4 mg/dl),无花果曲霉的植酸酶产量可达最高(在摇瓶中培养 5 d 可达 113 nkat/ml)。Han 和 Gallagher 也肯定了高浓度的磷会抑制黑曲霉 NRRL 3135 合成植酸酶。他们认为植酸酶产量最高需要的磷浓度为 1~5 mg Pi/dl,而满足细胞最快生长所需的磷浓度为 8 mg Pi/dl。Gibson 也证实了培养基中磷水平生产对植酸酶的影响,并比较了几种不同来源植酸酶的生产情况,推断在淀粉中的磷酸键比其它来源的更具裂解抗性,因而可以低水平稳定、持久地供磷。Vats 和 Banerjee 也报道,即使培养基中的磷水平为 0.05%,黑曲霉的产酶量也急剧下降,而当磷水平达到 0.1%以上时,根本就不产酶,即产生终止性生产抑制。在磷耗竭的培养基中菌种可产生 184 nkat/ml 的植酸酶活性,比活为每毫克蛋白 21 367 nkat。Han 等利用无花果曲霉在半固体底物上发酵生产植酸酶也发现了相似的趋势,其用豆粕作为生长培养基,每 100 g 底物磷含量为 10 mg,与不加磷酸盐的对照组相比(发酵酶活每克底物 8.0 U),发酵酶活较高(每克底物 82.5 U),然而当磷酸盐添加水平提高时,反而抑制了植酸酶的生产。Chelius 和 Wodzinski 在通过紫外光(UV)放射对黑曲霉 NRRL 3135 进行改进的研究中发现,当磷浓度为 0.006%(m/v)时突变菌种 *phyA* 的产量被抑制(60%),而野生型菌种则受磷浓度(0.006%~0.15%,m/v)的影响不大。Gargova 等证明来自 *Aspergillus* sp. 307 的双峰 pH 值(pH 值 5.0 和 2.5)的胞外植酸酶其分泌高峰发生在磷含量为 20 mg/dm<sup>3</sup> 的培养基中,随着磷含量的升高酶产量开始下降。Kim 等认为,*Aspergillus* sp. 5990 在低磷(50 mg/l)时胞外植酸酶的产量最高,高磷(100 mg/l)时,产量显著下降。但是,Lan 等向生产培养基中添加磷酸盐(0.05%~0.5%),培养基由米糠、豆浆组成,发酵菌种为 *M. jalaludinii*(一种来自牛瘤胃的新菌种),发现植酸酶的生产既没受到抑制也没得以促进。然而,Fredrikson 等证明,无机磷对植酸酶合成的抑制在组分比较复杂的培养基中是不明显的。

### 4 培养基的组成和接种体对植酸酶的影响

Al-Asheh 和 Duvnjak 研究了表面活性剂,如吐温-80、Triton-X-100、油酸钠对植酸酶产生的影响以及用炭黑曲霉固体发酵双低油菜粕(37%~40%的蛋白和 4%~6%的植酸)时植酸的降低程度。在油酸钠(1%)和吐温-80 存在的情况下,植酸酶产量增加,这表明细胞的通透性发生改变从而使酶的释放增强。Han 和

Gallagher 用无花果曲霉在液体培养基上做了同样的试验,结果发现,当向培养基中分别添加 0.5%的 Triton-X-100、吐温-80 和油酸钠时,除了菌丝分散生长之外,还使植酸酶的水平分别提高了 1.3、1.7 和 4.8 倍。相似地, Mandviwala 和 Khire 证实当向生产培养基中添加 0.5%的 Triton-X-100 后黑曲霉 NCIM 563 的植酸酶活性提高了 30%。

Sano 等发现,当用半乳糖替代葡萄糖时, *A. adenivorans*(近年来新发现的一种酵母)能在培养基中分泌高水平的植酸酶,所分泌酶的最适温度为 75 °C,最适 pH 值范围为 4.5~5.0。卡斯许旺酵母 CBS 2863 可分泌高水平的植酸酶,并且发现其分泌水平依赖于培养基的组成。

接种体的大小和质量也是影响植酸酶产量的重要因子。如果接种体太小或者应用缺乏玉米淀粉的低粘度培养基,微生物会形成菌丝球,导致植酸酶产量的降低。Krishna 和 Nokes 在黑曲霉的固体发酵过程中应用表面反应法验证了接种体的培养情况对植酸酶产量及对整个发酵过程总体效果的影响。他们报道,在固体发酵过程中植酸酶产量与种子生长密切相关,种龄较小的真菌接种体(处于活跃生长期)有助于底物的主动利用和植酸酶合成。

## 5 突变菌株的研究

相比之下涉及到通过诱变提高植酸酶产量的报道不多。Chelius 和 Wodzinske 在利用紫外光(UV)辐照改良黑曲霉 NRRL 3135 的研究期间,分离得到 1 个植酸酶催化突变体,其植酸酶(phyA)的产量是野生型的 3.3 倍。突变体 phyA 的产量可被无机磷(0.006%,m/v)抑制 60%,然而他们的方法由于在初级筛选阶段缺乏区分植酸酶和酸性磷酸酶活性的特异性和敏感性而受到限制。这样,若能找到一种从酸性水解过程中区分植酸酶活性的选择方法,无疑将提高植酸酶菌株改良的工作效率。Rodriguez 等通过位点直接诱变的方法提高了在 *P. pastoris* 中表达的大肠杆菌 pH 值 2.5 酸性磷酸酶或植酸酶的催化效率和耐热性。Tomschy 等从黑曲霉 T213 中分离出一种糖基化的单体野生型植酸酶,其活力比黑曲霉 NRRL 3135 产生的植酸酶酶活低 3 倍。通过序列的比较研究和候选氨基酸的识别,使烟曲霉植酸酶的酶活提高了 7 倍。Mullaney 等通过在第 300 个氨基酸残基对应的基因位点处直接诱变,使黑曲霉 NRRL 3135 phyA 在中等 pH 值水平(3.0~3.5)的活性得到提高。单突变体 K300E 在 37°C、pH 值为 4.0 和 5.0 时植酸的水解率分别提高

了 56%和 19%。

## 6 转基因研究

有关培育高效利用磷酸盐的转基因动植物的报道很多。由于在植物中磷主要以植酸的形式存在,所以可产生异源植酸酶的基因工程作物不仅可以提高磷的生物利用率,而且还可以降低农业生态系统的磷负荷。Pen 等在经过改进的花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 启动子的转录控制下,利用烟草 PR-S 蛋白的信号肽使黑曲霉的 phyA 基因在烟草种子中得以表达,这样可为植酸酶在动物饲料中使用提供稳定方便的酶源。Verwoerd 等在烟草细胞组成型中表达了 phyA cDNA,在叶子中可分泌具有生物活性的植酸酶,在植物成熟期间的分泌量可达总可溶性蛋白的 14.4%。Li 等在大豆中表达了黑曲霉 NRRL 3135 phyA 基因,并发现除了分子量外,重组植酸酶与原酶具有相似的最适温度和最适 pH 值。Gutknecht 等在苜蓿中克隆和表达了真菌植酸酶,由此可看到未来利用生物农业生产商品化植酸酶的可能性。最近, Yip 等把枯草芽孢杆菌的植酸酶基因导入到烟草细胞的细胞质中,结果导致肌醇生物合成途径平衡的转移,所以可为初级代谢提供更多的可利用磷。转基因系的表型发生改变,如花期延长、种子中 IP6 与 IP5 的比率降低,与野生型相比在磷缺乏情况下的生长能力得到增强。同时, Ullah 等通过例子说明了“生物农业”的概念,将克隆的黑曲霉 phyA 基因在土豆叶中表达生产商品化植酸酶,表达的蛋白很稳定且具有催化活性,保留了无花果曲霉植酸酶的大部分物理和生化特性。

Golovan 等培育出了转基因老鼠,大肠杆菌 appA 植酸酶基因在其唾液腺中进行表达,分泌的唾液中含有分子量为 55 kDa 的活性糖基化蛋白。转基因的表达可被诱导的小鼠 R 51 富脯氨酸蛋白(PRP)启动子调节,也可被组成型鼠腮腺分泌蛋白(PSP)启动子调节。唾液腺表达的植酸酶可使粪便排出的磷显著降低,预示着这将是一种减少日粮磷酸盐添加量的很有前景的方法,来自畜牧业的磷污染也将因此而降低。

## 7 小结

近些年来,无论植酸酶的生产工艺,还是菌种的发酵水平都有了很大提高,植酸酶在饲料工业中的使用也越来越广泛。尽管如此,植酸酶产品在许多方面仍有待提高,如热稳定性、酸稳定性等,有理由相信随着生物技术的不断发展,这些问题都将得到解决。

(参考文献 52 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

# 浅谈几种常见酶制剂的研究及其应用

王琤犇 瞿明仁

酶是具有催化活性的蛋白质,它具有高效性、专一性、无毒副作用、不产生残留等特点。酶广泛的存在于动物、植物以及微生物体内,是生物体维持正常的生理生化功能必不可少的成分。家禽、家畜对饲料中营养物质的利用也是在消化道中各种酶的作用下将各种大分子的物质降解为易被吸收利用的小分子物质的。

酶制剂通常可粗略分成2大类:一类是内源性酶,与消化道分泌的消化酶相似,如淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶等,直接消化水解饲料中的营养成分;另一类是外源性酶,它是消化道不能分泌的酶,如纤维素酶、果胶酶、半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、戊聚糖酶(阿拉伯

木聚糖酶)和植酸酶。外源性酶不能直接消化水解大分子营养物质,而是水解饲料中的抗营养因子,间接促进营养物质的消化利用。

大量的试验研究表明,酶制剂主要参与机体内的以下活动:①参与细胞的降解,使酶与底物充分接触,促进营养成分的消化;②去除抗营养因子,改善消化机能;③补充(或激活)内源酶的不足,改进动物自身肠道酶的作用效果;④参与动物内分泌调节,影响血液中某些成分的变化;⑤水解非淀粉多糖(NSP),降解消化道内容物的黏度;⑥改变消化道内菌群分布;⑦加强动物保健;⑧减少环境污染。

几种常见酶制剂的作用见表1。

表1 常见饲用酶制剂的作用

酶类	作用对象	功能	效果和应用
蛋白酶	蛋白质	水解蛋白质	补充内源性蛋白酶,提高蛋白质消化率
淀粉酶	淀粉	水解淀粉	补充内源性淀粉酶,适应幼龄动物
脂肪酶	脂肪	水解脂肪	适应幼龄动物
纤维素酶	植物性饲料	水解纤维素	纤维素降解,养分充分释放
半纤维素酶	小麦、黑麦和米糠	降解非淀粉多糖	降低肠道内容物的粘性,促进营养物质的吸收
果胶酶	植物性饲料	分解果胶质	提高能量利用率
植酸酶	植物性饲料	水解植酸磷	提高磷、矿物元素等的利用率,消除植酸磷的抗营养作用
木聚糖酶	小麦、黑麦和米糠	水解阿拉伯木聚糖	降低黏度,使养分充分利用

## 1 蛋白酶

蛋白酶是工业酶制剂中最重要的一类酶,约占全世界酶销售量的60%。根据其作用机制和作用最适pH值,蛋白酶可分为酸性蛋白酶(pH值为2.5~3)、中性蛋白酶(pH值在7左右)、碱性蛋白酶(pH值在8左右)。

酸性蛋白酶用途十分广泛。食品工业上用于啤酒、白葡萄酒的澄清和酱油的酿造;制革工业用于脱毛和皮革软化;医药工业用作消炎和助消化剂;饲料工业中多采用酸性和中性蛋白酶,以提高动物对蛋白质的水解效率,促进动物对饲料蛋白质的吸收效率。

### 1.1 酸性蛋白酶

酸性蛋白酶分子量在35 000道尔顿左右。酶分子活性中心有2个天冬酰胺残基,在已经进行过氨基

酸序列分析的酸性蛋白酶分子中约有30%的区域是同系的。由于酸性蛋白酶活性中心具有-COOH,大多数抑制剂都是通过与其发生酯化反应而迅速使之钝化,如重氮基乙酰-DL-正亮氨酸甲脂等重氮化合物可以与活性基团-COOH发生酯化反应。酸性蛋白酶最适作用条件为pH值2.5~3.0、温度55℃。

尽管所有的脊椎动物胃液都有酸性蛋白酶,但从动物体内提取酸性蛋白酶生产成本太高。微生物具有种类多、繁殖快、培养简单、诱变容易和不受季节影响等优点,所以,酸性蛋白酶主要通过微生物发酵来生产。目前,生产酸性蛋白酶的微生物主要有黑曲霉、米曲霉、斋藤曲霉、宇佐美曲霉、根霉、微小毛霉、杜邦青霉、泡盛曲霉以及它们的变异株、突变株。

酸性蛋白酶包括胃蛋白酶、凝乳酶和一些微生物蛋白酶,适宜在酸性条件下水解蛋白质。由于饲用酶进行催化反应是在畜禽消化道内进行的,故其作用条件必须与动物消化道生理条件相适应。而通常猪和家禽消化道内温度为40℃左右,胃pH值为1.5~3.5,小

王琤犇,江西兽药饲料监察所,330029,南昌市南京东路181-1号。

瞿明仁,江西农业大学动物科技学院。

收稿日期:2006-10-16

肠 pH 值为 5~7, 与酸性蛋白酶作用的一些基本参数相吻合。在仔猪日粮中添加酸性蛋白酶可降低饲料对断奶仔猪消化道的刺激, 提高饲料利用率和日增重。酸化剂可降低饲料和胃肠道 pH 值, 增进胃肠内多种消化酶的活性, 延长饲料在胃肠道内的消化时间, 促进营养物质的消化与吸收, 调节微生物区系, 抑制和杀灭有害菌, 增进矿物质的吸收, 从而在一定程度上促进仔猪的生长, 降低仔猪腹泻率。Iemura Yoshitsugu 等(1999)研究发现, 酸性蛋白酶的酶解产物主要是分子量在 300~600 之间的小肽。吴天星等(1999)发现, 酸性蛋白酶能提高蛋白表观消化率, 提高小肠绒毛表面短肽和氨基酸的浓度, 促进短肽、氨基酸的吸收。

### 1.2 中性蛋白酶

中性蛋白酶是最早被发现并广泛应用于工业化生产的蛋白酶制剂, 可用于皮革脱毛、软化, 畜禽血液蛋白质水解, 果酒、啤酒和饮料的澄清以及医学治疗等应用领域中。目前, 国内外关于中性蛋白酶的研究也相当的多。中性蛋白酶产生菌主要是枯草杆菌、巨大芽孢杆菌、米曲菌、栖土曲菌、灰色链霉菌、微白色链霉菌、耐热性解蛋白质杆菌等。它属蛋白内切酶, 作用于肽键, 产物为肽类及少量氨基酸。最适 pH 值为 7.0~8.0, 37 °C 以下比较稳定, 超过 45 °C 酶活不稳定, 60 °C 以上失活较快。

奚刚、许梓荣研究发现, 外加中性蛋白酶制剂可显著提高前期、后期丝毛乌骨鸡对粗蛋白的表观消化率, 不同程度地提高了胃蛋白酶、胰蛋白酶和总蛋白水解酶的活性, 特别是 37 日龄与 67 日龄时的胰蛋白酶活性以及 67 日龄时的总蛋白水解酶活性得到显著提高, 这与 Dovgan N Y 等和 M yashkan skene 等的报道相一致。可见添加外源性酶制剂的确能提高动物机体内源性消化酶的活性。这可归因于两个方面: 一方面是外加的中性蛋白酶对饲料蛋白的降解作用; 另一方面是机体内源性蛋白分解酶活性的增强。

### 1.3 碱性蛋白酶

碱性蛋白酶是指在碱性条件下水解蛋白质肽键的酶类, 最早发现于猪胰脏中。1945 年瑞士 Dr. Jaag 等人在地衣芽孢杆菌中发现了这类酶。碱性蛋白酶是一类非常重要的工业用酶。微生物来源的蛋白酶都是胞外酶, 适于工业化生产, 由于具有培养简便, 产量丰富等特点而得以广泛应用。碱性蛋白酶主要来源于枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、小芽孢杆菌, 另外某些链霉菌和霉菌也能产生碱性蛋白酶。近二十年来, 研究人员对低温碱性蛋白酶的研究取得较大进展, 研究发

现, 产低温碱性蛋白酶的微生物主要有假单胞菌属、芽孢杆菌属、黄杆菌属、异单孢菌属、耶尔森氏菌属、希瓦氏菌属等。碱性蛋白酶最适作用 pH 值为 9~11, 大多数微生物碱性蛋白酶的活性中心含有丝氨酸, 属于丝氨酸蛋白酶, 当遇到作用于丝氨酸的试剂二异丙基氟磷酸(DFP)便失活, 这是碱性蛋白酶的一个重要特征。每当发挥作用时需要金属离子激活, 必需的金属离子有  $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  等,  $Ca^{2+}$  对此酶有稳定作用。碱性蛋白酶最适反应温度通常在 40 °C 以下, 碱性蛋白酶有较大耐热性, 55 °C 放置 30 min 能保留大部分活性, 其作用位点要求在水解点羧基侧具有芳香族或疏水性氨基酸, 它比中性蛋白酶水解能力更大, 而且还有酯酶活性。

血液中含有丰富的营养物质, 尤其是蛋白质, 含量在 18% 左右, 但是由于血液中 2/3 的蛋白质存在于红细胞中, 是血红蛋白(属色蛋白类), 它的消化吸收利用率很低, 所以在食品中的利用较少, 废弃较多, 同时也污染环境。近年来, 由于酶解技术的迅速发展, 用酶水解血红蛋白以提高其利用率的研究也越来越多, 可供选择水解血红蛋白的酶也有多种。孟翔晨、杨同舟等研究发现, 碱性蛋白酶能水解血红细胞, 提高蛋白质利用率, 其水解的最适 pH 值为 8.21, 最适温度为 65 °C。

## 2 淀粉酶

淀粉酶包括  $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、糖化酶和异淀粉酶。

### 2.1 $\alpha$ -淀粉酶

$\alpha$ -淀粉酶又称淀粉 1,4-糊精酶, 能够切开淀粉内部的  $\alpha$ -1,4-糖苷键, 将淀粉水解为麦芽糖、含有 6 个葡萄糖单位的寡糖和带支链的寡糖。生产此酶的微生物主要有枯草杆菌、黑曲霉、米曲霉和根霉。

### 2.2 $\beta$ -淀粉酶

$\beta$ -淀粉酶又称淀粉 1,4-麦芽糖苷酶, 能够从淀粉分子非还原性末端切开 1,4-糖苷键, 生成麦芽糖。此酶作用于淀粉的产物是麦芽糖和极限糊精, 遇到 1,6 键的分支点则停止不前。因此, 当以  $\beta$ -淀粉酶分解支链淀粉时, 直链部分生成麦芽糖, 而解点附近及内侧则不能被分解而残留下来, 其分解产物为麦芽糖和大分子  $\beta$ -界限糊精。在该酶作用于底物时, 同时发生沃尔登转位反应, 使产物由  $\alpha$  型变为  $\beta$  型麦芽糖。此酶主要由曲霉、根霉和内胞酶产生。

### 2.3 糖化酶

糖化酶又称淀粉  $\alpha$ -1,4-麦芽糖苷酶, 此酶作用于淀粉分子的非还原性末端, 以葡萄糖为单位, 依次

作用于淀粉分子中的 $\alpha$ -1,4-糖苷键,生成葡萄糖。此酶作用于支链淀粉后的产物有葡萄糖和带有 $\alpha$ -1,6-糖苷键的寡糖,作用于直链淀粉后的产物几乎全部是葡萄糖。此酶产生菌主要是黑曲霉(左美曲霉、泡盛曲霉)、根霉(雪白根霉、德氏根霉)、拟内孢霉、红曲霉。

国内该产品于1979年开始采用黑曲霉液体深层发酵法生产。产品有固体和液体两种剂型,酶活为每克10万单位,最适作用温度50~60℃,最适作用pH值4.0~5.0。该产品有国家标准,其酶活定义为:在40℃,pH值4.6条件下,1h分解可溶性淀粉产生1mg葡萄糖所需酶量为1个酶活单位。

#### 2.4 异淀粉酶

异淀粉酶又称 $\alpha$ -1,6-麦芽糖苷酶、分支酶,此酶作用于支链淀粉分子分支点处的 $\alpha$ -1,6-糖苷键,将支链淀粉的整个侧链切下变成直链淀粉。异淀粉酶对底物的作用特点,可以从其对糯米淀粉作用后产物的特性得到证实。当异淀粉酶作用于糯米淀粉时,随着解支作用的进行,碘色反应由红变兰,还原力增加,在丁醇中发生沉淀,淀粉溶液变为易于老化,出现了直链淀粉的特征。异淀粉酶与其它淀粉酶配合使用时,可使淀粉糖化完全。此酶产生菌主要是嫌气杆菌、芽孢杆菌及某些假单胞杆菌等细菌。

#### 2.5 淀粉酶在饲料中的应用

在饲料中起作用的淀粉酶主要为 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶。 $\alpha$ -淀粉酶为内切酶,将淀粉大分子水解成易溶解的中等和低分子物质,有利于糖化酶的水解。糖化酶是将 $\alpha$ -淀粉酶水解的一些低分子物质进一步水解成葡萄糖,才能被动物利用。异淀粉酶和糖化酶协同作用时,可以加速糖化过程,提高糖化率。异淀粉酶和 $\alpha$ -淀粉酶联合作用时则可大大提高麦芽糖的得率。糖化酶为内切酶,其活性的高低直接影响到动物的生长。在仔猪体内,由于自身酶系不全,活力不足,而仔猪又是处于生长速度相当快的阶段,其对能量的需求也较大,如果糖化酶不足,难以供给动物生长所需的足够能量,这样便影响到猪的生长,甚至会产生疾病,导致死亡。因此在仔猪生长时,糖化酶(另外还有蛋白酶)将起主导作用。

#### 3 脂肪酶

脂肪酶广泛存在于动物、植物和微生物中,不仅能催化油脂水解,也能在非水相中催化酯合成反应、转酯化反应、酸解反应等。脂肪酶在常温、常压下反应,反应条件温和、转化率高和特异性强,不易产生副产物,避免因化学催化法而带来的有害物质,因而越

来越多的用于有机合成,特别是光学活性化合物及天然产物的合成。

微生物脂肪酶种类多,具有比动植物脂肪酶更广的作用pH值、作用温度,并适合于工业化生产,所以微生物是脂肪酶的一个重要来源。生产脂肪酶的微生物主要有假丝酵母、园酵母、黑曲霉、根霉、白腐核菌、白地霉、青霉、毛霉、镰刀霉及假单胞菌、无色杆菌、葡萄球菌等,其中根霉属微生物是脂肪酶的重要生产菌。在过去的十多年里,从根霉菌中分离到超过30种脂肪酶,多种根霉脂肪酶已被制成商品化酶制剂。不同根霉所产的脂肪酶具有不同的性质。日本根霉NR400脂肪酶具有金属不敏感特性,1mmol/l的金属离子或胆酸盐浓度对酶活影响不大。华根霉脂肪酶的最适作用温度为37℃,最适作用pH值为5.5,对脂肪酸甲酯有高的水解活力,如辛酸甲酯、月桂酸甲酯和棕榈酸甲酯。米根霉脂肪酶具有1,3位置专一性,优先水解饱和脂肪酸链(C8-C18),最适作用温度和pH值分别为35℃和7.5,受Triton X100、SDS和金属离子的抑制,如 $Fe^{3+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 等。

Khare和Nakajima用固定在硅藻土中的日本根霉脂肪酶对豆油进行改性,通过酯交换反应,使豆油含有25%二十二碳六烯酸(DHA),提高了豆油的营养。近年来,脂肪酶用于壳聚糖的降解引起了研究者的关注。Shin等用日本根霉在400℃下降解壳聚糖获得30~50kDa的可溶性壳聚糖水合物,其中30~41kDa的低分子壳聚糖十分适用于食品添加剂和功能性试剂。

#### 4 纤维素酶

纤维素酶是降解纤维素 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键的一类酶的总称,因此纤维素酶又有纤维素复合酶的总称。习惯上将纤维素酶分为3类:C1酶、Cx酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶。C1酶主要作用天然纤维素,破坏纤维素链的结晶结构,使结晶纤维素链开裂、长链纤维素分子末端部分游离和暴露,从而使纤维素链易于水解。Cx酶又可分为Cx1酶和Cx2酶,Cx1酶是内断型纤维素酶,它从水合非结晶纤维素分子内部作用于 $\beta$ -1,4-糖苷键,生成纤维糊精和纤维二糖;Cx2酶为外断型纤维素酶,它从水合非结晶纤维素分子的非还原性末端作用于 $\beta$ -葡萄糖苷键,又称为纤维二糖酶,降解纤维二糖,生成葡萄糖。 $\beta$ -葡萄糖苷酶可将纤维二糖、纤维三糖及其它低分子纤维糊精分解为葡萄糖。这些酶协同作用可将纤维素彻底降解为还原糖——葡萄糖。纤维素酶可破解富含纤维的细胞壁,使其包含的蛋白质、淀粉等营养物质释放出来并加以利用,同时又可

将纤维降解为可被畜禽机体消化吸收的还原糖,从而提高饲料利用率。

产生纤维素酶的微生物研究较多的是真菌,对细菌和放线菌研究很少。当前用来生产纤维素酶的微生物主要是木菌、黑曲霉、青霉和根霉。此外,漆斑酶、反刍动物瘤胃菌、嗜纤维菌、产黄纤维单孢菌、粘细菌、梭状芽孢杆菌也能产生纤维素酶。

纤维素酶是一种糖蛋白,其分子量为46-57万道尔顿之间。其最适pH值在4.6-5.0之间,通常为4.8。该酶的最适温度随着反应时间的不同而有差异,反应时间为10 min时,最适温度为50-55℃;反应时间为30 min时,最适温度为40-45℃;反应时间超过60 min时,最适温度为40℃。NaF、CoCl<sub>2</sub>、Cd<sup>2+</sup>、Ca(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、Mg<sup>2+</sup>等是纤维素酶的激活剂,纤维二糖、葡萄糖和甲基纤维素等是纤维素酶的竞争抑制剂。

## 5 半纤维素酶

半纤维素酶是分解半纤维素的一类酶的总称,主要包括β-葡聚糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶和甘露聚糖酶。这些酶的主要作用就是降解畜禽消化道内的非淀粉多糖,降低肠道内容物的粘性,促进营养物质的吸收,减少畜禽下痢,从而促进畜禽生长和提高饲料利用率。半纤维素酶主要由各种曲霉、根霉、木霉发酵产生。在饲料工业中应用较多的是β-葡聚糖酶,它主要由曲霉、木霉和杆菌属类微生物产生。许梓荣等(2002)以“长×嘉”二元生长猪为试验对象的研究发现,在基础饲料中添加0.2%半纤维素酶对其有促生长作用及影响内分泌机制。结果表明,饲料中添加半纤维素酶,可使生长猪日增重提高8.78%(P<0.05),饲料转化率提高9.42%(P<0.05),血清尿素氮水平降低15.05%(P<0.05),血清中胃泌素、胰岛素、T<sub>3</sub>、TSH(促甲状腺激素)水平分别升高44.27%(P<0.01)、85.48%(P<0.05)、47.06%(P<0.01)和114.75%(P<0.05)。

## 6 果胶酶

果胶酶是分解果胶的酶的通称,也是一个多酶复合物,它通常包括原果胶酶、果胶甲酯水解酶、果胶酸酶3种酶。这3种酶的联合作用使果胶质得以完全分解。天然的果胶质在原果胶酶的作用下,被转化为水可溶性的果胶,果胶被果胶甲酯水解酶催化去掉甲酯基团,生成果胶酸酶,果胶酸酶切断果胶酸中的2-1,4糖苷键,生成半乳糖醛酸,半乳糖醛酸进入糖代谢途径被分解放出能量。工业生产果胶酶的菌种主要是霉菌,常用菌种有文氏曲霉、苹果青霉、黑曲霉、白腐核菌、米曲菌、酵母等,此外,木制壳霉、芽孢杆菌、

梭状芽孢杆菌、葡萄孢霉、镰刀霉也能产生果胶酶。饲料工业中果胶酶多用于提高青贮饲料的品质。在畜禽生产上也有广泛的用途。王春林等在1日龄商品艾维茵肉仔鸡日粮中添加果胶酶的试验结果表明,果胶酶在肉仔鸡饲养前21日龄的促生长效果显著,平均日增重(ADG)和平均日采食量(ADFI)均比对照组显著增加(P<0.05),饲料转化率显著提高(P<0.05),与抗生素效果相当。饲养全期,果胶酶组ADG与对照组相比差异显著(P<0.05),ADFI与对照组相比有极显著差异(P<0.01)。

## 7 植酸酶

植酸酶属于磷酸单脂水解酶,是一类能有效水解植酸及其盐类的酶,又称肌醇六磷酸酶,能催化植酸及植酸盐为肌醇与磷酸(磷酸盐)。按其结构不同可将酸性植酸酶划分为有代表性的组氨酸酸性磷酸酶(HAP)、β-螺旋植酸酶(BPP)和紫色酸性磷酸酶(PAP)。在很多动植物及微生物体内都含有植酸酶。植酸酶存在于各种脊椎动物的红细胞和血浆中,也存在于哺乳动物小肠中,植酸酶还存在于小麦和大豆等植物体中,但含量少。微生物植酸酶的产量高、活性高、成本低,适宜大规模工业化生产。目前市场所售植酸酶制剂绝大多数来源于微生物。产植酸酶的微生物种类很多,其中最主要的是真菌曲霉属微生物,如米曲霉、土曲霉、黑曲霉和无花果曲霉,它们都能分泌具有高活性的植酸酶。

研究表明,日粮中添加植酸酶可提高日粮中矿物质和蛋白质的利用率,改善畜禽的生产性能。大多数试验结果表明,畜禽日粮中添加植酸酶,其日增重和日耗料均显著增加,饲料转化效率不变或变化不大,因而认为日粮添加酶后促进体增重的增加,主要是由于采食量增加的结果。Xingen等(1993)报道,在断奶仔猪玉米—大豆型日粮中添加1350 U/g植酸酶,可显著提高植酸磷和锌的利用率。

## 8 木聚糖酶

木聚糖是植物半纤维素的重要组分,约占植物总糖量的三分之一,是自然界中除纤维素以外含量最丰富的再生生物资源。木聚糖酶是指能专一降解半纤维素木聚糖为低聚木糖和木糖的一组酶的总称,主要包括3类:①β-1,4-D-内切木聚糖酶(EC 3.2.1.8),从木聚糖主链的内部切割β-1,4糖苷键,使木聚糖溶液的粘度迅速降低;②β-1,4-D-外切木聚糖酶(EC 3.2.1.92),以单个木糖为切割单位作用于木聚糖的非还原性末端,使反应体系的还原性不断增加;③β-木



糖苷酶(EC 3.2.1.37)切割低聚木糖和木二糖,有助于木聚糖彻底降解为木糖。由于多数木聚糖是高度分支的异聚多糖,因此有些酶,如 $\beta$ -L-阿拉伯糖苷酶、 $\beta$ -D-葡萄糖醛酸酶、乙酰木聚糖酶和酚酸酯酶等也是必不可少的。木聚糖酶在饲料、食品、造纸、纺织和能源等工业中显示出广阔的应用前景,其中一个较重要的用途是作为饲料添加剂应用于饲料行业。由于我国耕地面积日益减少以及畜禽养殖业的快速发展,加剧了人畜争粮的矛盾,因此,提高饲料的利用率就显得尤其重要。大量试验证明,饲料中含有的木聚糖等非淀粉多糖,不能被单胃动物消化,并增加了食物的粘稠度,阻碍营养物质(脂肪和蛋白质等)的消化,故木聚糖被称为“抗营养因子”之一。木聚糖酶能有效降解木聚糖,使肠内食物的粘度降低;能破坏植物细胞壁,有利于其它营养成分的释放;能提高内源性消化酶的活性,促进养分的消化,从而减少排泄物和环境的污染;酶水解产物——低聚木糖和木糖能增加肠道内有益菌的数量,降低畜禽的腹泻率等。

许梓荣(1998)在对AA肉鸡进行了为期49d的饲养试验,研究 $\beta$ -葡聚糖酶、木聚糖酶和纤维素酶组成的复合酶制剂(GXC)对肉鸡生长和消化的影响。试验表明,添加GXC使肉鸡采食量和日增重分别提高了4.7%( $P<0.05$ )和9.8%( $P<0.01$ ),料重比降低了4.8%( $P<0.05$ ),干物质、粗纤维和粗脂肪表观消化率分别提高了10.6%( $P<0.05$ )、25.99%( $P<0.05$ )和21.8%( $P<0.05$ )。此外,添加GXC使空肠内容物粘度下降17.1%( $P<0.01$ ),粪中大肠杆菌数下降61.2%( $P<0.01$ ),十二指肠内容物中总蛋白水解酶、胰蛋白酶和淀粉酶活性分别提高了17.0%( $P<0.05$ )、46.6%( $P<0.05$ )和80.2%( $P<0.05$ ),并使肝重率提高了24.8%( $P<0.01$ )。冯定远(1997)报道,在20~60kg生长育肥猪的次粉或小麦日粮中添加5%木聚糖酶制剂可提高日增重和饲料转化率,降低腹泻频率,健康状况明显改善。

(参考文献41篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

## 上海邦成生物科技有限公司与《饲料工业》杂志社共同举办的

### “肽营养”有奖征文

### 评比结果

为进一步促进肽营养方面的理论研究和应用实践,报道肽类产品的研究与应用,推动肽类产品向更高层次发展。2006年上海邦成生物科技有限公司与饲料工业杂志社共同举办了“肽营养”有奖征文活动。

活动自开展以来,得到了行业各界仁士的大力支持和热情参与,共收到征集论文百余篇,刊发24篇。这些论文分别从国内外肽营养的最新研究进展、肽类产品的实际应用试验及生产工艺等方面进行论述。虽然一些报告谈不上具备前瞻和开创性,但对行业的实际应用起到了指导和借鉴作用,也加深了行业对肽营养的认识,为肽营养的理性研究起到了推动作用。正因为合作双方求真、务实的态度,使“肽营养”栏目引起了读者广泛的关注、反馈良好,达到了栏目设立的初衷。

本着公平、公正、公开的原则,举办双方组织了相关人员对所征集论文进行了细致地讨论和评比,从中评选出获奖稿件6篇,名单如下:

**一等奖:** 乔伟 周安国 王之盛 酶水解制备小肽的初步研究

**二等奖:** 李胜路 冯定远 小肽的吸收机制与营养研究进展

谷伟 王淑梅 徐奇友 小肽营养及其在水产养殖中的应用进展

王燕 汪以真 抗菌肽PR-39的研究进展

乐国伟 活性肽的营养作用与应用

李梦云 陈代文 张克英 Hcpidin 对机体铁稳态的平衡调节作用

本活动的获奖证书由举办单位联合颁发,奖金由上海邦成生物科技有限公司负责发放,其余未获奖的投稿者均能得到纪念品一份。

获奖人员如有不详请咨询:上海邦成生物科技科技有限公司(021-64766200-816)或 饲料工业杂志社(024-86391926)



# 植酸酶的应用与注意事项

谭宝玲 冯建文 陈丽

## 1 植酸与植酸酶

### 1.1 植酸

植酸广泛地存在于植物性饲料中,油料籽实和谷物副产品中植酸盐含量高,谷物和豆类籽实中含量相对较低。常用植物性饲料中以芝麻饼(粕)和米糠中植酸盐含量为最高,可达10%左右。植酸(亦称环己六磷酸酯或肌醇六磷酸)是由6个分子的磷酸与环己六醇形成的磷酸酯,其分子中所含的6个分子磷酸可以解离出12个氢离子。在通常条件下,植酸带有很强的负电荷,因而具有很强的络合或连接阳极复合体(如阳离子或蛋白质)的能力,可与多种矿物质离子,如镁、钾、钙、锰、铁、锌等螯合,形成稳定的畜禽(猪、鸡等)难以消化利用的复合物。植酸的这一特性使它具有很强的抗营养作用,因此被视为饲料中的有害成分。

### 1.2 植酸酶

植酸酶属于磷酸单酯水解酶,是磷酸酶的一种类型,能将肌醇六磷酸(植酸)分解成为肌醇和磷酸。植酸酶可以专一性地水解植酸中的磷酸酯键,将磷酸基团从植酸分子上逐个切下,形成中间产物,最终转化为无机磷酸。不同来源的植酸酶的作用机理不同。有报道认为,单纯的植酸酶只能将植酸分解为肌醇磷酸酯,不能彻底的分解成肌醇和磷酸,要彻底分解肌醇磷酸酯,需要酸性磷酸酶的帮助,酸性磷酸酶可以将单磷酸酯、二磷酸酯彻底分解成肌醇和无机磷酸。无机磷酸从植酸中被植酸酶水解后释放出来,易于被畜禽消化道吸收,解除植酸对一些矿物元素,如钙、锌、铜等的抗营养效应,从而提高畜禽对植物性饲料中磷的利用率,降低饲料中钙、磷水平,减少外源矿物性钙、磷在饲料中的添加。植酸酶替代矿物性磷在饲料中的运用,需要降低饲料中钙和磷水平,考虑维生素D与植酸酶之间可能存在的协同效应。这不仅对动物体具有良好的促生长效果,同时可降低有机磷从动物体中的排泄量,有利于环境保护,减少饲料成本。

植酸酶主要来源于植物和微生物,动物血液中也

有少量存在,许多植物,特别是麦类籽实中含有天然植酸酶,如小麦、大麦、黑麦、玉米、水稻、高粱、油菜籽、豆类等,籽实中的植酸酶已被分离、鉴定。能产生植酸酶的微生物有细菌、部分真菌,如工程菌(工程细菌、工程酵母菌)、黑曲霉,无花果曲霉、啤酒酵母以及少数根霉。目前研究的或生产中应用的植酸酶主要经微生物发酵提纯而获得。

在自然界中植酸酶有两种形式:6-植酸酶和3-植酸酶,它们是两种完全不同的植酸酶。6-植酸酶主要存在于植物籽实的胚中,在干燥后籽实冬眠状态下没有活性,只有在种子萌发时被激活,并水解种子中的植酸。6-植酸酶的水解反应首先是从肌醇的6碳位上催化无机磷盐,最终脂解整个植酸,它的稳定性很差,在干燥、高温、pH值较低的情况下无活性,且易于因过多的植酸盐底物和产物而受到强烈的抑制,难以在动物胃内pH值较低的情况下起作用。3-植酸酶由霉菌、酵母和细菌产生,它的性质稳定,耐酸、耐高温,真正具有开发利用价值,在饲料工业中已被广泛使用。3-植酸酶的水解反应首先从肌醇的3碳位上开始,逐步催化释放无机磷,其作用机理为:植酸→D-1,2,4,5,6-五磷酸肌醇+D-1,2,3,4,5-五磷酸肌醇→1,2,5,6-四磷酸肌醇→1,2,5-三磷酸肌醇或1,2,6-三磷酸肌醇→1,2-二磷酸肌醇→2-磷酸肌醇。目前研究较多的是无花果曲霉菌和黑曲霉产生的植酸酶。

## 2 影响植酸酶应用的因素

植酸酶是一种结合蛋白,除含有蛋白质外,还含有约27.3%的寡糖,其糖链主要由半乳糖和甘露糖组成,通过天冬酰胺以N-糖苷键型与肽链相连接。研究表明,植酸酶的活性与糖链无关,糖链对于酶的分子量和热稳定性有显著影响,对于酶的等电点也有影响,酶的专一性酶活主要由其肽链结构决定。影响植酸酶使用效果的因素包括酶的种源、含量、温度稳定性、pH值特性及动物体内水解效率等。

### 2.1 来源与生产加工工艺

植酸酶经由分离培育微生物菌种,再经微生物发酵生产提纯。不同菌种来源的植酸酶其酶的分子量及耐酸、耐热性能差异较大。B.subtills菌种中植酸酶的分子量在36~38 kD,最适pH值和最适温度分别为6.0~7.0和55~60℃;A.niger菌种中植酸酶的分子量

谭宝玲,广东温氏食品集团公司,527439,广东省云浮市新兴县勤竹镇。

冯建文、陈丽,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-03

在 60~100 kD, 最适 pH 值和最适温度分别为 5.0~7.0 和 55~60 °C。Segueiha 等在 *Schwanniomyces castellii* 菌种中分离得到的分子量达到 490 kD 的大分子植酸酶, 该酶有很好的耐高温能力, 其最适反应温度为 77 °C。近年来, 由于分离技术的提高, 发现不同来源的植酸酶作用机理存在一定差异。

植酸酶经微生物发酵提取得到粗酶液, 粗酶液再经后处理制得酶产品。后处理技术是提高酶稳定性(包括贮存稳定性、耐高温稳定性等)及定点释放能力的关键, 这要考虑的是酶的剂型, 固体或液体。为提高酶的稳定性, 对固体酶进行包被处理是减少加工过程中酶活损失的一种非常有效的方法。固体酶产品经使用载体进行包被处理, 其稳定性相对比液体酶产品好, 外界空气中水分及温度对其影响较小, 并易于存储, 但固体酶产品比液体酶产品增加了工艺程序和生产成本。

## 2.2 饲料加工

植酸酶应用于饲料中的添加途径有 2 种: 一种是在动物饲喂时直接添加到日粮中, 这一途径方便易行, 能够明显提高日粮的饲用效果, 但易造成浪费, 成本增加; 二是在动物全价配合饲料配方中添加, 这种途径能够根据动物的营养需求合理添加酶制剂, 并能够改善全价料的原料搭配, 减少成本。

饲料配方中原料种类的选用可影响植酸酶的效果。饲料中添加植酸酶, 饲料的总磷水平必须高于动物有效磷的需要量, 按饲料中磷的消化利用率来制定饲料总磷水平。饲料中钙、磷的比例会影响植酸酶的活性, 高钙低磷使动物消化道 pH 值升高, 抑制植酸酶的活性。一些矿物元素的添加, 使某些金属离子如 Ca、Fe、Mn、Zn 等, 与植酸产生络合作用, 导致酶活降低, 而维生素 D 对植酸酶有一定协同作用。

饲料的加工过程对酶有重要影响。一般植酸酶的最适温度为 30~60 °C, 但饲料的制粒温度在 75~90 °C 之间, 膨化温度通常为 120~150 °C, 这样高的温度会使酶的蛋白变性, 酶活性会降低甚至完全失活。同时饲料制粒过程中的调质、挤压均可使酶蛋白变性失活。酶失活的程度也与在饲料中使用的酶的剂型和使用方法有关, 固体酶是在制粒膨化前添加, 会受制粒膨化温度影响; 液体酶是在制粒后喷涂, 虽不受制粒温度影响, 但易受到空气中水分及温度的影响。

## 2.3 动物方面

动物的种类和年龄制约着酶的使用效果。单胃动物应用酶相对反刍动物要好, 幼龄动物的消化道没有

完全健全, 添加酶的效果优于成年动物。

微生物来源的植酸酶的最适酸度一般分为 pH 值 2.5 和 pH 值 5.5 两种, pH 值 2.5 的植酸酶主要在动物胃腔内起作用, 而 pH 值 5.5 的植酸酶主要在动物的肠道内起作用。植酸酶主要应用于单胃动物, 常见单胃动物有猪和鸡。对于猪来说, 植酸酶对植酸水解作用发生在胃中, 其胃中食糜 pH 值在 2~4 之间; 而对于鸡来说, 植酸水解是在嗉囊、肌胃和腺胃中进行的, 嗉囊和肌胃的 pH 值在 5~6 之间。因此确定植酸酶在动物消化道内的适宜 pH 值对植酸酶的应用具有指导意义。

## 2.4 存储条件

植酸酶及加酶饲料成品在储存过程中易受到外界环境(如光、湿度、温度、虫害等)的影响, 酶的活性会随着储存时间的延长而逐渐降低。一般来说, 水分对酶的影响比高温更为严重, 饲料发霉会使酶受到很大威胁, 在使用酶时应尽量缩短储存时间, 并保存在通风干燥、阴凉、避光处。

## 3 植酸酶酶活性的检测

植酸酶展现出的经济效益得到了广泛的认可, 其在饲料行业中将会有较大规模的应用, 商品植酸酶的自身质量是加酶饲料和其在动物性能方面应用的首要保障。在众多影响植酸酶应用效果的因素中, 含量测定是最重要的质量指标, 是植酸酶与其它酶制剂一样面临的特殊问题。植酸酶的含量以酶活单位来表示。目前对植酸酶酶活的定义尚未完全统一, 沿用最多的是由 BASF-GB 公司提出的酶活定义, 该定义被包括我国在内的国际质量认证机构、权威检测机构、仲裁机构接受和采用。

普遍采用的植酸酶检测方法有丙酮-磷钼酸铵法、钒-钼酸铵法、维生素 C-钼蓝法和 FeSO<sub>4</sub>-钼蓝法 4 种。黄遵锡等的研究表明, 丙酮-磷钼酸铵法较其它 3 种方法在灵敏度、精确度、稳定性、抗干扰能力等方面均有明显优势。目前植酸酶生产厂家和饲料厂应用最多的检测方法是钒-钼酸铵法, 检测方法相对简便, 易于操作。

无论采用哪种方法测定植酸酶酶活, 不同生产厂商的植酸酶产品之间有不同的质量差异, 这是使用厂家值得注意的。

总的说来, 植酸酶在饲料工业及养殖业上的作用已得到肯定, 对其在工业生产、饲料养殖的应用仍具有极大的研发空间, 植酸酶的菌种来源、理化及生物性质和酶的基因工程是目前研究的主要方向, 其在动物体内的生理生化作用仍有待进一步研究。

(编辑: 高雁, [snowyan78@tom.com](mailto:snowyan78@tom.com))

# 平菇及其在木质素降解中的应用研究

江蕾 张朝晖 段文凯

平菇 (*Pleurotus Ostreatus*) 又名糙皮侧耳, 是一类与木质素降解酶有关的担子菌。因其适应性强, 易于栽培, 广泛分布于全球各地, 是目前世界上栽培面积大, 产量高的食用菌之一。平菇富含蛋白质、膳食纤维、多糖、凝集素、维生素和矿物质等多种营养成分, 具有热量低、脂肪少、钠离子少等优点, 被认为是首选的食用佳品。平菇也是一类颇具开发前景的药用真菌, 具有抗凝血、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、降解胆固醇和调节免疫等多种功效。

平菇还具有很强的木质素降解能力, 能弥补木质素降解模式菌——黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 只降解木材中木质纤维素的不足<sup>[1]</sup>, 可广泛应用于作物秸秆等木质纤维素降解系统中, 如利用生物转化可将稻草、麦秆等多种难以降解利用的农业废弃物转变为有价值的产品, 用作动物饲料或其它食品; 也可利用其木质素酶系统对有机金属污染物、生物异源物质和工业废弃物等行之有效的降解作用。因此, 平菇在生物工艺学应用方面有着极为广阔的发展前景。

## 1 生产概况

平菇的栽培已有悠久的历史, 早在 2 500 年前在中国和远东地区就有种植。目前, 中国、美国和荷兰等也是平菇的主要生产国<sup>[2]</sup>, 年生产总量均在 100 万吨以上。

适合栽培平菇的原料非常广泛, 如棉籽壳、稻草、麦秆、木屑、玉米芯等均可。而棉籽壳是理想的栽培原料, 因其营养丰富, 碳氮比合适, 透气性好, 使用方便, 所以应用更为普遍。平菇的显著优势在于能有效利用木质纤维素而无需堆肥或盖层。因此, 大批农业废料也可作为底物循环使用, 如咖啡汁、亚麻、玉米芯、甘蔗渣、香茅渣和大米壳等。

另外, 平菇也能在液体培养基中培植, 可获得菌类蛋白、菌丝体、调味剂等产物。研究表明, 从液态发酵得

到的平菇菌丝体与固体栽培得到的子实体在化学组成上基本相似, 均含有蛋白质、氨基酸和脂肪酸等<sup>[3]</sup>。

## 2 药用特性

平菇中富含多种生物活性分子, 具有很高的药用价值, 其胞内组分和次级代谢物对宿主的免疫系统均能发挥作用, 可用于治疗各种疾病。研究表明, 从平菇中提取得到的多糖、糖蛋白、血凝素、纤维、萜类化合物、类固醇和核酸等, 具有显著的抗肿瘤活性<sup>[4]</sup>。Zusman 等<sup>[5]</sup>发现, 在玉米芯中培养的平菇, 对小鼠结肠癌的生长具有明显的抑制作用, 这也有望应用于人类自身。

从平菇子实体中提取得到的  $\beta$ -D-葡聚糖, 能大大提高受细菌感染小鼠的存活率<sup>[6]</sup>。平菇中可能含有一种还原酶抑制因子——洛伐他汀, 在临床上作为抗高胆固醇类药物使用; 平菇中还含有壳质、胶质等多种膳食纤维, 对降低血压, 抗肝损伤, 抗衰老和促进免疫方面等均能发挥一定作用。由上述可知, 平菇各部分均有很高的药用价值, 因而, 将其整体研制成药可能比单个组分更具疗效。

## 3 分子遗传学研究

Larraya 等<sup>[7]</sup>(2000)对平菇的染色体结构进行分析, 通过染色体分离显示其分子染色体组型。随后, 又构建出有关平菇的基因连锁图, 该图几乎涵盖了平菇的整个染色体组。Honda 等<sup>[8]</sup>(2000)通过对平菇细胞的转化作用, 首次报道了有关抗药标记基因的获得, 这一研究发为优良菌株的构建提供了强有力的工具。

平菇的分子遗传特性与其生产也有密切关系, 但目前研究仍不透彻。在平菇基因构建中, 通过限制性酶介导的整合作用, 可将转化效率提高 10 倍左右。在含有原生质体和 *Cbx R* 质粒载体的转化物中, 若加入  $\lambda$  噬菌体 DNA, 从筛选平板中可以观察到抗药性转化株明显增多; 若加入热变性的  $\lambda$  DNA, 其转化率甚至能达到最高值(每微克质粒载体约为 200 转化株), 这与无载体 DNA 的实验结果相比, 产量提高 50 多倍<sup>[9]</sup>。

## 4 平菇降解酶系统

在自然界中, 能攻击、降解木质素的微生物主要是真菌, 而不同种类的真菌对木质素降解的能力也各不相同。研究发现, 平菇对木质素具有优先降解的能力<sup>[10]</sup>。木质素降解是一个氧化过程, 主要涉及木素过氧化物酶(LiP)、锰过氧化物酶(MnP)、漆酶(Lac)和藜芦醇氧化酶(VAO)的参与。平菇主要产生 Lac、MnP和

江蕾, 浙江工业大学生物与环境工程学院, 310014, 浙江工业大学(朝晖校区)研 541 信箱。

张朝晖、段文凯, 单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期: 2006-08-14

★ 浙江省教育厅重点项目(20040559)和浙江省自然科学基金(Y404107)

VAO,但不能产生 LiP。事实证明,平菇是最强大的漆酶生产者之一<sup>[10]</sup>,具有很高的活性,在降解酶系中起到关键性作用,目前平菇漆酶正在被广泛研究。

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,大多含有 4 个铜离子,均位于酶的活性部位。通过从底物转移一个电子形成自由基、氧化酚类或芳胺类化合物<sup>[12]</sup>,同时将氧还原成水。如果添加适当的介导物质,该体系还能氧化具有更高氧化还原电势能的非酚类化合物<sup>[11]</sup>。此外,在麦秆、香兰素和藜芦酸的诱导下,平菇可产生若干胞外漆酶同工酶,主要有 POXA1b、POXA1w、POXA2 和 POXC,其中 POXC 的产量最大<sup>[13]</sup>。

不同的培养条件(如碳源、氮源、温度、酸碱度、金属离子、去垢剂和通气量等)会影响木质素降解酶的产生。在平菇栽培中,棉籽壳是当前发现的最佳培养基,不管在固体还是液体培养中均能诱导胞外漆酶的产生,促进菌体生长。同时添加一些芳香族化合物(如甲苯胺、香兰酸、 $\beta$ -羟基安息酸和苯胺等),可增加漆酶的活性。培养基中某些金属离子的存在对木质素的降解也有重要影响,这是由于金属离子可有效调节木质素降解酶的活性。Baldrian 等<sup>[14]</sup>(2005)发现,在平菇的液体培养基中,加入  $Cd^{2+}$  和  $Cu^{2+}$ ,可显著提高漆酶活性,从而加速木质素的降解;Baldrian 等<sup>[15]</sup>(2003)在以麦秆为基质的平菇固体发酵中发现, $Cd^{2+}$  对 MnP、漆酶和内切葡聚糖酶均有显著影响。此外, $Mn^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  的存在也可促进木质素的降解,但其催化程度有所不同,这主要取决于金属本身对酶调节的有效性,而与其在培养基中的含量并无直接关系。

## 5 平菇降解酶系的应用

### 5.1 对农业废弃物的降解

起初,人们直接利用反刍动物消化农作物中的木质纤维残留物质。后来发现,通过生物去木质素作用可以有效提高反刍动物的消化性能。近年来,利用不同真菌对农业废弃物进行转化的报道也屡见不鲜。Hadar 等<sup>[16]</sup>(1992)研究了平菇对农业木质纤维废料的利用情况,选用不能自动降解的棉籽壳为底物,经过 4 周时间的发酵,发现木质素在体外的降解速率逐渐加快,含量明显降低,其发酵产物可占反刍动物采食总量的 40%之多。通过扫描电子显微镜还可观察到木质素的降解特征:发酵 1 周后,平菇菌丝转移进入棉籽壳细胞中,开始发挥木质素降解作用;3 周时,去木质素作用继续深入到密集组织中;随后,植物的木髓部分逐渐被分离出来,导管处的细胞也开始被降解。另外,在中间薄层中可观察到类似的现象。

利用真菌降解秸秆获得草料存在的主要问题是获得廉价的真菌栽培基质。Hüttermann 等<sup>[17]</sup>(2000)提出了利用平菇对农业废料再次利用的新方法:先用太阳光对湿秸秆进行加热杀菌,再用适当的清洁剂处理,最后在秸秆上补充一些食品工业废弃物,如土豆泥、西红柿渣等。此法耗能少,适合在农场应用。该研究小组还用平菇处理后的秸秆为饲料喂养山羊,发现其体重增加非常迅速。

平菇对木质素降解作用非常明显,可通过对木质素的选择性降解,使纤维素部分暴露出来以被反刍动物使用。实验研究表明,通过平菇等真菌的降解作用,可显著提高农业废弃物(如稻草、棉籽壳等)的营养价值,有效改善动物粗饲料的贫乏状况。

### 5.2 生物修复技术

生物修复技术(bioremediation)是在生物降解的基础上发展起来的一种新兴的清洁技术。具体是指运用生物技术,将有毒害废物转变为无害化合物或低于某一限制浓度的过程。而平菇恰具此特性,可以降解和矿化生物异源物质,较常见的有工业染料多环芳烃(PAHs)、土壤污染物,如莠去津(atrazine)等。PAHs 是一类由两个或两个以上苯环构成的稠环化合物,广泛存在于土壤、水体和空气中,具有诱导机体突变和致癌特性,已被许多国家列为优先控制的环境污染物<sup>[18]</sup>。

平菇是至今发现的 PHAs 有效降解者。Bogan 等<sup>[19]</sup>(1999)报道,35 d 内,平菇可降解土壤中 80% 的 PHAs。Novotny 等<sup>[20]</sup>(1999)将黄孢原毛平革菌、平菇和变色云芝(*Trametes versicolor*)3 者对 PHAs 降解能力作了对照,结果发现平菇的降解活性最高。

平菇对 PAHs 的降解过程主要依靠其内部的氧化酶系统。在初始阶段,平菇胞外物细胞色素 P-450 发挥独特作用,其内含的单氧酶和环氧化物水解酶通过矿化作用攻击苯环,再在胞质中的 3,4-双加氧酶的作用下进行开环。随后,平菇内含的漆酶和 MnP 对 PAHs 进一步氧化。可见,平菇对 PAHs 的降解作用是一系列酶联合作用的结果。

此外,平菇还能降解其它一些生物异源物质。Masaphy 等<sup>[21]</sup>(1996)发现,当 Mn 存在时,培养液中氧化酶和过氧化物酶活性以及细胞色素 P-450 的浓度明显增加,从而提高了平菇对莠去津的转化作用。Shin 等<sup>[22]</sup>(1997)研究了平菇分泌的过氧化物酶对染料的脱色作用,发现这些酶对 RBBR 等蒽醌染料呈现出更高的亲和力。

### 5.3 其它方面的应用

平菇中的漆酶或漆酶介导的系统可有效应用于神经毒素降解和废水解毒等中。Amitai<sup>[23]</sup>(1998)对平菇漆酶的研究结果显示,该漆酶可分解3种有机磷杀虫剂:O,O-二乙基-S-(N,N-二异丙胺乙基)磷酸硫醇(DiPr-Amtion)、O-乙基-S-(N,N-二异丙胺乙基)甲基磷酸硫醇(VX)和O-异丁基-S-(N,N-二乙基胺乙基)甲基磷酸硫醇(RVX),这可能是彻底氧化降解此类神经毒素的有效方法。Aggelis等<sup>[24]</sup>(2003)的研究表明,平菇漆酶可以去除橄榄油工厂废水(OMW)中的酚类物质,从而降低OMW毒性,解除其对环境中微生物的抑制作用。

另外,平菇产生的降解酶系统还可用于纸浆漂白、织品染料脱色、抗生素和甾类化合物的改造以及制造生物电极等,因此具有很大的市场开发潜能。

## 6 展望

作为一种多功能的食、药用真菌,平菇在生物和环境领域均有广泛运用。随着科技日新月异的发展,部分技术已日见成熟,但仍有些方面需要进一步的探索和发展。研究表明,木质素降解酶的产生与生产菌的遗传特性密切相关,因而制约平菇运用的主要因素在于其分子遗传方面信息的相对缺乏。Varela等<sup>[25]</sup>(2001)通过研究平菇在异种系统中的基因表达,提出真菌体系在异种中的表达,可能会产生活性更高的木质素酶系统,能更有效地运用于各个领域。

基于平菇独特的药理功能,并具有有效的木质素降解酶系统,因而可以采用有效措施进行大规模栽培,更大发挥其商业潜能。可见,真菌平菇的应用已扩展到医药、污水处理、染料降解、饲料工业等各个领域,其前景广阔,值得深入研究。

### 参考文献

- 刘尚旭,董佳里,张义正. 糙皮侧耳菌木质素降解酶的比较研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),2000,37(4): 594-598
- E. Kothe. Mating-type genes for basidiomycete strain improvement in mushroom farming [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 56 (5/6): 589-601
- Cohen R, Persky L, Hadar Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, 58: 582-594
- Wasser S P, Weis A L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective [J]. Crit. Rev. Immunol., 1999, 19: 65-96
- Zusman I, Reifen R, Livni O, et al. Role of apoptosis, proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in chemically induced colon cancer in rats fed corn cob fiber treated with the fungus *Pleurotus ostreatus*[J]. Anticancer Res., 1997, 17: 2 105-2 113
- Karacsonyi S, Kuniak L. Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble beta-D-glucan[J]. Carbohydr Polym, 1994, 24: 107-111
- Larraya L M, Perez G, Ritter E, et al. Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66: 5 290-5 300
- Honda Y, Matsuyama T, Irie T, et al. Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*[J]. Curr. Genet., 2000, 37: 209-212
- Irie T, Honda Y, Watanabe T, et al. Efficient transformation of filamentous fungus *Pleurotus ostreatus* using single strand carrier DNA[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 55: 563-565
- Kerem Z, Hadar Y. Effect of manganese on preferential lignin degradation by *Pleurotus ostreatus* during solid-state fermentation[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61: 3 057-3 062
- Pozdnyakova N N, Nowak J R, Turkovskaya O V, et al. Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons catalyzed by blue laccase from *Pleurotus ostreatus* D1 in the presence of synthetic mediators Enzyme[J]. Microb. Technol., 2006, 3: 1-8
- 董佳里,黄维藻,张义正. 木质素降解真菌糙皮侧耳菌(*rametes gallica*)蓝色漆酶的分离纯化及性质研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),2004,41(2): 431-435
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, et al. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*[J]. J. Biol. Chem., 1997, 272: 31 301-31 307
- Baldrian P, Valášková V, Merhautová V, et al. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc[J]. Res. Microbiol., 2005, 156: 670-676
- Baldrian B, Gabriel J. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium[J]. FEMS Microbiol. Lett, 2003, 200: 235-240
- Hadar Y, Kerem Z, Gorodecki B, et al. Utilization of lignocellulosic waste by the edible mushroom *Pleurotus* [J]. Biodegradation, 1992, 3: 189-205
- Hüttermann A, Hamza A S, Chet I, et al. Recycling of agricultural wastes by white-rot fungi for the production of fodder for ruminants[J]. Agro-Food And Hi-Tech., 2000(11/12): 29-32
- 马沛,钟建江. 微生物降解多环芳烃(PAHs)的研究进展[J]. 生物加工过程,2003,1(1): 42-46
- Bogan B W, Lamar RT, Burgos W D, et al. Extent of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo (alpha) pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils [J]. Lett Appl. Microbiol., 1999, 28: 250-254
- Novotny C, Erbanova P, Sasek V, et al. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi[J]. Biodegradation, 1999, 10: 159-168
- Masaphy S, Henis Y, Levanon D. Manganese-enhanced biotransformation of atrazine by the white rot fungus *Pleurotus pulmonarius* and its correlation with oxidation activity [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 3 587-3 593
- Shin K S, Oh I K, Kim C J. Production and purification of Remazol brilliant blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63: 1 744-1 748
- Amitai G, Adani R, Sod-Moriah G, et al. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase[J]. FEBS Letter, 1998, 438: 195-200
- Aggelis G, Iconomou D, Christou M, et al. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process [J]. Water Res., 2003, 37(16): 3 897-3 904
- Varela E, Guillen A, Martinez A T, et al. Expression of *Pleurotus eryngii* aryl alcohol oxidase in *Aspergillus nidulans*: purification and characterization of the recombinant enzyme [J]. Biochem Biophys Acta, 2001(1 546): 107-113

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)