

耐酸及耐蛋白酶的木聚糖酶产生菌的筛选

刘新育, 李学琴, 王明道, 姜晨冰, 陈红歌*

(河南农业大学 生命科学学院, 农业部农业微生物酶工程重点实验室, 河南 郑州, 450002)

摘要: 通过模拟畜禽胃肠道环境, 对保藏的 9 株木聚糖酶产生菌的粗酶液分别进行酸处理、胃蛋白酶处理以及胰蛋白酶处理, 测定木聚糖酶的残余活力, 结果发现, 多数菌株所产木聚糖酶对酸和胃蛋白酶的稳定性较差, 残余酶活力分别在 50% 以下和 20% 以下; 而不同木聚糖酶对胰蛋白酶的稳定性差异较大, 残余酶活力在 30%~90%。在所有菌株中, 黑曲霉 3092 和 UV11 所产木聚糖酶对酸和蛋白酶的稳定性都较好, 适合在胃肠道环境中作为饲料添加剂使用。

关键词: 木聚糖酶; 胃蛋白酶; 胰蛋白酶; 胃酸

中图分类号: Q556+.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)06-0152-03

Screening of the Strains of Black Mold Producing Xylanase Stable to Acid and Protease

LIU Xin-yu, LI Xue-qin, WANG Ming-dao, JIANG Chen-bing, CHEN Hong-ge*

(College of Life Science, Henan Agricultural University, Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The residue activities of the crude xylanases of nine mold strains were determined after the enzyme preparation were exposed to acid, pepsin and trypsin, respectively, simulating the fowl gastrointestinal environment. The results show that there are lower stabilities to acid and pepsin, with less than 50% and 20% of residue xylanase activities, respectively. However, the stabilities of these xylanases to trypsinase are evidently different, with a range from 30% to 90% of residue xylanase activities. Amongst all the strains, Xylanases produced by *Aspergillus niger* 3092 and *Aspergillus niger* UV11 were more resistant to both acid and protease, suggesting good performance in the digestive tract as a feed supplement.

Key words: xylanase; pepsin; trypsinase; gastric acid

我国饲料行业的配合饲料中一般是在玉米-豆粕型日粮基础上加入一定量的大麦、小麦和麦麸等谷物原料, 以降低饲料成本。木聚糖约占植物细胞干质量的 35%, 是谷物籽粒中主要的非淀粉多糖^[1]。由于谷物中木聚糖等非淀粉多糖的抗营养作用, 饲料中麦类原料的使用受到一定的限制^[2]。

木聚糖酶是专门水解木聚糖 β -1,4 糖苷键的一种内切酶, 它将大分子木聚糖降解为低聚木糖和少量 D-木糖, 因此, 能够降低动物肠道内食糜的黏度, 提高消化酶的透性, 从而提高饲料养分的利用率^[3]。另

外, 木聚糖酶水解植物细胞壁产生的低聚木糖对畜禽具有良好的生理功能, 如调节肠道菌群、促进矿物质的吸收、免疫调节和抗氧化^[4]等。但由于饲用酶制剂在动物胃中的酸性环境及内源消化酶(胃蛋白酶和胰蛋白酶)环境中存留时间较长, 酶的稳定性受到较大影响^[5-8]。李卫芬等^[9]用胃蛋白酶和胰蛋白酶处理木聚糖酶发现, 随着处理时间延长, 木聚糖酶活力逐渐下降, 处理 4 h 后, 其残余酶活力分别为 24.49% 和 72.86%。本试验通过体外模拟畜禽胃肠道环境, 从现有木聚糖酶产生菌中筛选产酶高且能够较好耐受

收稿日期: 2011-12-09

基金项目: 河南省科技厅重点攻关项目 (0423021600)

作者简介: 刘新育 (1976-), 男, 河南延津人, 在读博士研究生, 研究方向: 微生物酶学。E-mail: liuxinyu@henau.edu.cn

* 通讯作者: 陈红歌 (1967-), 女, 河南许昌人, 教授, 博士, 主要从事微生物酶学研究。E-mail: honggeyz@163.com

强胃酸环境和胃肠道蛋白酶的产生菌,所产木聚糖酶用作饲料添加剂,以期为在消化道特定环境中进一步提高麦类饲料的营养价值提供支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 黑曲霉 F817、黑曲霉 F27、黑曲霉 3092、黑曲霉 UV11、黑曲霉 30197、黑曲霉 2107、黑曲霉 A09、黑曲霉 3497、黑曲霉 31130,由河南农业大学酶工程研究室保藏。

1.1.2 试剂 燕麦木聚糖酶(Sigma),胃蛋白酶(3 000 U/mg)、胰蛋白酶(2 500 U/mg)等试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 培养基 产酶培养基:麸皮 20 g,玉米芯 20 g,葡萄糖 1 g,草酸铵 10 g,TW-80 1.5 mL,蒸馏水 1 000 mL,pH 值 6.0。121 °C 灭菌 30 min。

1.2.2 木聚糖酶的发酵 将马铃薯蔗糖培养基斜面上培养 3~4 d 的霉菌孢子,接种到产酶培养基中,220 r/min、30 °C 下振荡培养 72 h。

1.2.3 木聚糖酶活力的测定 将培养好的菌液用 4 层纱布过滤,滤液即为粗酶液。取 0.1 mL 稀释适当倍数的粗酶液,加入 0.1 mL 2% 的燕麦木聚糖溶液(pH 值为 5 的柠檬酸缓冲液),在 50 °C 下保温 15 min 后,加入 0.6 mL 的 DNS 溶液,煮沸 10 min 灭活显色,用蒸馏水定容至 5 mL,在 550 nm 波长下测定还原糖含量(以木糖计);以灭活的酶液作为对照。在上述条件下,以每分钟产生 1 μ mol 木糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(IU)。计算方法如下:

$$E=1.53 D \times Y,$$

其中, E 为木聚糖酶的活力(IU/mL); D 为酶液的稀释度; Y 为吸光值。

1.2.4 木聚糖酶的耐酸性试验 取 0.2 mL 粗酶液加入 1.8 mL pH 值 3.0 的柠檬酸缓冲液中,41 °C 下水浴 1.5 h 后,按上述木聚糖酶活力测定方法测定其残余木聚糖酶活力。

1.2.5 木聚糖酶的耐胃蛋白酶试验 取 0.2 mL 木聚糖酶粗酶液与稀释后的 1.8 mL 胃蛋白酶溶液(pH 值 3.0 的柠檬酸缓冲液)混合,最终缓冲液中胃蛋白酶的活力为 2.7 IU/mL,41 °C 下水浴 1.5 h,稀释适当倍数(测定 OD 值在 0.1~1.0)后测定残余木聚糖酶活力^[10]。

1.2.6 木聚糖酶的耐胰蛋白酶试验 取 0.2 mL 木聚糖酶粗酶液与稀释后的 1.8 mL 胰蛋白酶溶液(pH 值 6.5 柠檬酸缓冲液)混合,最终缓冲液中胰蛋白酶的活力为 6.25 IU/mL,41 °C 下水浴 1.5 h,

稀释适当倍数(测定 OD 值在 0.1~1.0)后测定残余木聚糖酶活力^[10]。

1.2.7 木聚糖酶的理论酶切位点分析 采用 expasy 软件对 UniProt 蛋白质数据库中获得的各种木聚糖酶进行序列分析。根据动物胃肠道的 pH 值范围,在 pH>2 条件下进行胃蛋白酶的理论酶切位点数量分析,在 pH 值 6~7 条件下进行胰蛋白酶的理论酶切位点数量分析。

2 结果与分析

2.1 不同菌株所产木聚糖酶的耐酸性

将不同菌株的木聚糖酶粗酶液的 pH 值调整到 3.0,41 °C 下水浴 1.5 h 后测定残余木聚糖酶活力,以未处理的木聚糖酶溶液为对照,结果如图 1 所示。由图 1 可知,经酸处理后,不同菌种对酸的耐受程度不同,其中 UV11、3493 和 31130 所产木聚糖酶的相对残余活力较高,分别为 40.9%、50.8%和 46.2%,而 30197 所产木聚糖酶对酸最为敏感,相对残余活力只有 12.5%。

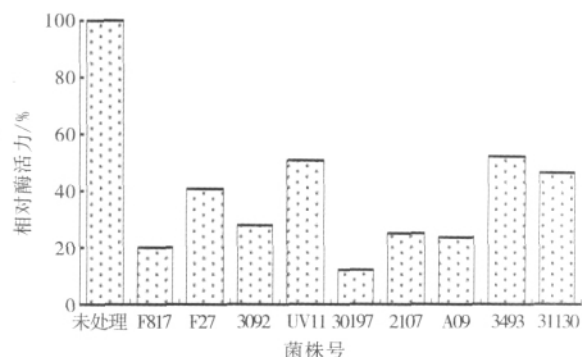


图1 不同菌株木聚糖酶的耐酸性

2.2 不同菌株所产木聚糖酶的胃蛋白酶耐受性

将不同菌株的木聚糖酶粗酶液经适当活力的胃蛋白酶处理后,测定其相对残余活力,以未处理的木聚糖酶溶液为对照,结果如图 2 所示。由图 2 可知,和耐酸性相比,不同菌株所产木聚糖酶对胃蛋白酶的耐受性普遍较差,只有 3092 所产木聚糖酶的相对残余活力达到了 20%,而 F817 菌株所产酶的相对残余活力只有 2%左右。

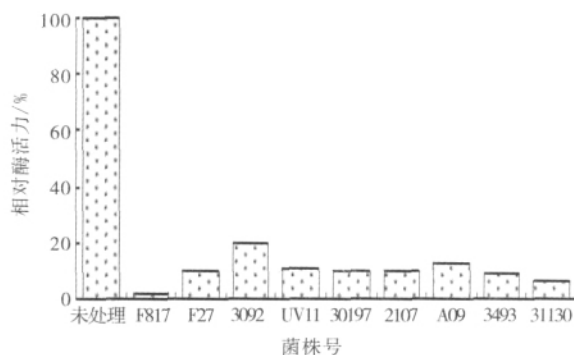


图2 不同菌株木聚糖酶的胃蛋白酶耐受性

2.3 不同菌株所产木聚糖酶的胰蛋白酶耐受性

将不同菌株的木聚糖酶粗酶液经适当活力的胰蛋白酶处理后,测定其相对残余活力,以未处理的木聚糖酶溶液为对照,结果如图 3 所示。由图 3 可知,不同菌株所产木聚糖酶对胰胃蛋白酶的耐受性普遍高于胃蛋白酶处理,其中 3092 和 UV11 所产木聚糖酶的相对残余活力分别高达 89.7% 和 82.2%。

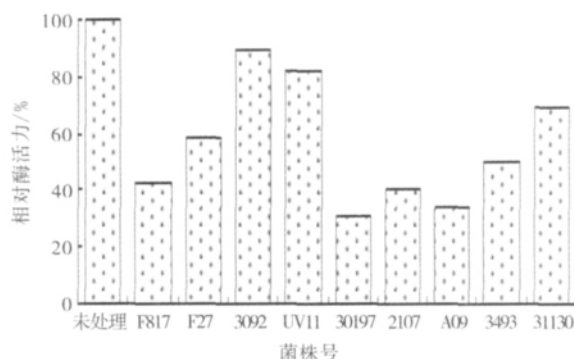


图 3 不同菌株木聚糖酶的胰蛋白酶耐受性

2.4 木聚糖酶的氨基酸序列对其消化酶稳定性的影响

采用 expasy 软件对 UniProt 蛋白质数据库中多种木聚糖酶进行序列分析可知,胃蛋白酶以及胰蛋白酶对不同菌株来源木聚糖酶的理论酶切位点数量差异很大,同时所有木聚糖酶中胃蛋白酶的酶切位点数目都远高于胰蛋白酶的酶切位点数目(表 1)。由此可见,不同木聚糖酶对胃肠道消化酶的稳定性不同,与木聚糖酶的氨基酸序列有很大关系。

表 1 不同木聚糖酶分子中蛋白酶的理論酶切位点数目

木聚糖酶	木聚糖酶产生菌	胃蛋白酶 (pH>2)酶 切位点数目	胰蛋白酶 (pH 6~7)酶 切位点数目
A2Q7I0	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	30	11
A2QFV7	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	54	28
Q12550	<i>Aspergillus niger</i>	34	5
Q4JHP5	<i>Aspergillus terreus</i>	55	30
Q9RI72	<i>Streptomyces coelicolor</i>	25	15
O94163	<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 42149	62	23
P07528	<i>Bacillus halodurans</i>	77	35
P18429	<i>Bacillus subtilis</i>	25	13

3 结论与讨论

本试验通过体外模拟畜禽胃肠道环境,研究了胃酸及内源蛋白酶(胃蛋白酶和胰蛋白酶)对不同菌株来源的木聚糖酶活性的影响,其中胃蛋白酶对于

木聚糖酶的稳定性影响最大,胰蛋白酶的影响较小。本试验中,黑曲霉 3092 和黑曲霉 UV11 对畜禽胃肠道酸性环境和消化酶耐受性较好。研究结果还表明,黑曲霉 3092 所产木聚糖酶最适作用 pH 值为 5.0,在酸性条件下可以较好地发挥其催化活性,比较适合用于饲用酶制剂的开发。但由于这 2 株菌所产木聚糖酶活力仍不是很高,因此,下一步的工作将对其产酶条件进行优化,或构建工程菌对其木聚糖酶基因进行异源高效表达。

不同品种的畜禽及在不同生长阶段,其消化道 pH 值、消化道中消化酶的构成及含量均不同,因此,具有相同酶活力的不同酶制剂也可能在不同动物的消化道内表现出酶活力的差异。饲料在动物体内的消化是一个动态的、完整的过程,离体并不可能完全模拟这个复杂的过程,由于外部环境始终与动物体消化环境存在一定差异,通过体外消化试验筛选的酶配方还需进一步通过饲养试验来验证。

参考文献:

- [1] 方洛云,邹晓庭,许梓荣. 木聚糖酶基因的分子生物学与基因工程[J]. 中国饲料,2002(7):11-14.
- [2] 谭权,张克英,丁雪梅,等. 木聚糖酶对不同能量饲料的体外酶解效果研究[J]. 动物营养学报,2007,19(5):593-599.
- [3] 李卫芬,余东游. 大麦型饲料中添加 NSP 酶促仔猪生长的内分泌作用机制[J]. 中国兽医学报,2004,24(6):622-624.
- [4] 彭伟,黄兴国. 低聚寡糖的生理功能及在动物生产中的应用[J]. 饲料研究,2008(7):8-10.
- [5] 王在贵,张宏福,张永跃. 体外模拟猪胃条件下木聚糖酶活力稳定性研究[J]. 激光生物学报,2009,18(1):87-90.
- [6] 杨会涛. 酵母木聚糖酶的酶学性质研究[D]. 雅安:四川农业大学,2006.
- [7] Luo Hui-ying, Wang Ya-ru, Li Jiang, et al. Cloning, expression and characterization of a novel acidic xylanase, XYL11B, from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 45(2):126-133.
- [8] Cai Hong-ying, Shi Peng-jun, Bai Ying-guo, et al. A novel thermoacidophilic family 10 xylanase from *Penicillium pinophilum* C1[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(12):2341-2346.
- [9] 李卫芬,孙建义,许梓荣,等. 木聚糖酶的稳定性研究[J]. 云南农业大学学报,1999,14(3):250-253.
- [10] 张铁鹰,刘志伟,孙杰,等. 植酸酶在肉仔鸡消化道内环境下活性变化的体外研究[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(9):1212-1216.