

福寿螺纤维素酶的开发与应用^{*}

庄总来 周兴旺 唐志军 陈清西

(厦门大学生物系,厦门,361005)

摘 要 以福寿螺内脏为材料,制备纤维素酶粉。测定各组分的酶活力分别为:内切葡聚糖酶 20.65 万 U/g;(-葡萄糖苷酶 4.24 万 U/g;外切葡聚糖酶 0.48 万 U/g;酶粉的蛋白质含量为 37.69%、水分为 7.96%、灰分为 1.78%。以花生壳作为纤维素酶作用对象,测定酶促反应的最适 pH 为 5.26,最适温度为 52℃。在 pH5.2、40℃ 下,纤维素酶作用于花生壳生成葡萄糖,在 2h 内葡萄糖的生成量与反应时间成正比关系,然后逐渐缓慢;随着酶浓度的增大,葡萄糖的量也呈直线上升,说明从福寿螺分离得到的纤维素酶能有效地水解花生壳转化为可被利用的葡萄糖。

关键词 福寿螺 纤维素酶 制备与应用

中国图书分类号 Q556.3

地球上丰富的纤维素资源,每年可生产 100Gt 的纤维素物质。采用纤维素酶来分解纤维素,使之转变成可被利用的 D-葡萄糖,是国际上十分受重视研究课题之一。可是现在所用的纤维素酶活力都很低,必须用大量的酶。目前,寻找高活力、能大量生产的纤维素酶已成为国内外研究的热点^[1~4]。

福寿螺(*Ampullarum Crossean*)又称大瓶螺,在分类学上属于中腹足目瓶螺科瓶螺属。原产于南美洲亚马逊河流域,是当地人们食用的螺类。它具有体大肉厚、味道鲜美、高蛋白、低脂肪等特点。福寿螺以植物为食,生长迅速,体内含有大量消化酶,特别是纤维素酶系,是开发新酶源的好材料。福寿螺的头部(肉质)富含蛋白质,可用于制备营养口服液、复合氨基酸、营养调味品、螺肉罐头、高蛋白饲料添加剂及富钙饲料添加剂等,具有较大的经济意义。但下脚料(螺的内脏)尚未利用,当废物处理,急待充分利用^[5,6]。我们从福寿螺内脏分离制备纤维素酶,测定纤维素酶系中的三种酶组分,即(1)内切葡聚糖酶(Endo-1,4- α -D-Glucanase EC3.2.1.4 简称 EG);(2)外切葡聚糖酶(Exo-1,4- α -D-Glucanase EC3.2.1.91 又称 Cellobiohydrolase,简称 CBH);(3)-葡萄糖苷酶(-1,4-D-Glucosidase EC3.2.1.21,简称 BG);它们分别可以对纤维素链起到打断或松散的作用,再将纤维素水解成纤维素糊精、纤维三糖、纤维二糖,然后再水解成 D-葡萄糖。福寿螺纤维素酶活力高,同时对酵母细胞壁具有消化作用。可见福寿螺内脏是开发纤维素酶系酶源的好材料。目前国内外关于福寿螺纤维素酶的研究尚未有报道。由于福寿螺来源简单,饲养方便繁殖快,很适合于工业化生产制备纤维素酶制品。我们希望能在这方面研究取得进展,为社会提供新的酶制品。

* 福建省自然科学基金资助项目(C97005号)。庄总来,男,1948年12月出生,高级工程师。
本文于1998年12月21日收到。

1 材料与方法

1.1 材料

以福寿螺 (*Amphipallarium crossean*) 内脏为提酶的材料;羧甲基纤维素钠盐 (CMC-Na)、水杨素、D-葡萄糖均为上海试剂厂产品,分析纯;滤纸为新华滤纸;其余产品均为国产 AR 试剂。试剂均用玻璃重蒸水配制。

1.2 方法

1.2.1 酶粉制品的制备 取出福寿螺内脏,加入 1 倍量的体积的 0.1 mol/dm^3 磷酸缓冲液 (pH7.4),于高速组织捣碎机匀浆 1min,放置抽提 4h 后于 4000 r/min 离心 30min,去除渣滓。上清液加入 0.40% 的试剂 A,沉淀 4h 后离心 (4000 r/min) 得上清液,进一步加入沉淀剂 B 沉淀酶蛋白,沉淀物经冷冻干燥后,磨碎,过 80 目筛,得纤维素酶粉。

1.2.2 内切 -1,4-葡聚糖酶 (EG) 活力的测定 取 $0.5 \text{ cm}^3 1\%$ 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 为底物,加入 $0.4 \text{ cm}^3 0.1 \text{ mol/dm}^3$ NaAc-HAc 缓冲液 (pH5.1),于 45°C 下预热 5min,加入 0.2 cm^3 酶液 (每 cm^3 含 1mg 酶粉的醋酸缓冲液) 反应 10min 后,加入 DNS 溶液 1 cm^3 进行显色反应,测定产物葡萄糖的含量,测定方法为沸水浴加热 5min 后加入 10 cm^3 蒸馏水,冷却后在 722 分光光度计上测定波长为 540nm 的光密度值。以分析纯葡萄糖为参比,计算葡萄糖的形成量。

1.2.3 外切 -1,4-葡聚糖纤维二糖水解酶 (CBH) 活力的测定 在 1 cm^3 的反应体系中 (含 0.1 mol/dm^3 NaAc-HAc 缓冲液),加入 2 条 $3 \times 1 \text{ cm}$ 定量滤纸, 0.2 cm^3 酶液 (每 cm^3 含 1mg 酶粉的醋酸缓冲液),于 45°C 下反应 10min 后,按 1.2.2 方法测得产生的葡萄糖含量。

1.2.4 -葡萄糖苷酶 (BG) 活力的测定 以水杨素为底物,将 $0.8 \text{ cm}^3 0.5\%$ 水杨素配于 0.1 mol/dm^3 NaAc-HAc (pH5.1) 缓冲液,加入 0.2 cm^3 酶液,在 45°C 下反应 10min,终止反应,测定产生的还原糖含量。

酶活力单位定义 (U) 为在上述测活条件下每分钟催化生成 $1 \mu\text{g}$ 还原糖的酶量。比活力定义为克酶粉所具有的酶活力单位数。

1.2.5 以常压干燥法测定酶粉的水分含量;以高温灼烧法测定酶粉的灰分含量;以凯氏定氮法测定酶粉的总氮含量;酶粉的蛋白含量测定先将酶粉溶解后,用 10% 三氯醋酸 (TCA) 沉淀蛋白质,并用 10% TCA 洗涤沉淀物充分以去除可溶性的物质,然后再用凯氏定氮法测定蛋白氮的含量;用 Folin-酚法测定酶粉可溶性蛋白的含量。

1.2.6 纤维素酶粉的应用 以花生壳作为纤维素酶粉的作用对象,探讨纤维素酶催化花生壳水解产生葡萄糖的最适条件,水解效率;研究纤维素酶粉在作为动物饲料添加剂上的作用。

2 结果与讨论

2.1 福寿螺纤维素酶粉制备及效价的测定

从福寿螺内脏分离制备纤维素酶粉,几批实验结果制备的酶粉得率平均为 4.23%。分析酶活效价,结果每克酶粉含酶活力分别为 20.65 万 U EG;含 4.24 万 U BG 和 0.48 万 U CBH。表明制得的酶粉 EG 活力最高,其次是 BG, CBH 活力最低。三种酶的协同作用可将大分子纤维素水解成可被人体利用的葡萄糖。

2.2 酶粉部分成分分析

在常压干燥下测定酶粉的水分含量,结果酶粉的水分含量为 7.96%。测定酶粉的灰分含

量为 1.78 %。凯氏定氮法测定酶粉的总氮量为 15.01 % ,其中蛋白氮含量为 6.03 %。酶粉含蛋白质大约为 37.7 %。Folin-酚法测定酶粉的可溶性蛋白含量为 29.5 %。

2.3 酶粉催化花生壳的条件探索

取已煮熟晒干的花生壳在 100 干燥箱烘干 5h 后 ,粉碎、过筛、备用。研究测活环境缓冲液的 pH 对酶催化花生壳水解活力的影响 ,在 0.1mol/ dm³ 醋酸缓冲液中 ,加入 1 %花生壳干粉作为酶作用对象 ,改变 pH 值 ,测定酶活力 ,结果见图 1。表明酶在一定 pH 范围下活力较高 ,催化花生壳水解的最适 pH 为 5.25 ;温度对酶活力的影响研究表明 ,酶催化花生壳水解的最适温度区域在 50 ~ 55 之间(图 2)。

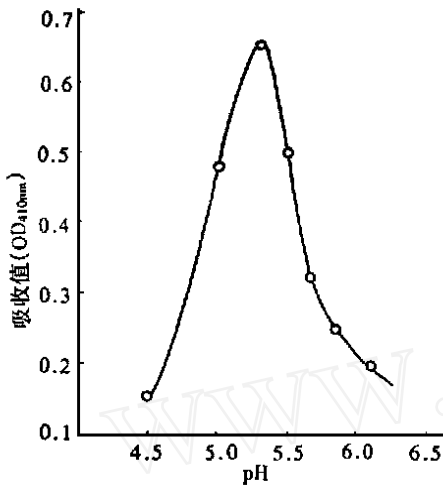


图 1 pH 对福寿螺纤维素酶催化花生壳水解酶活力的影响

Fig. 1 Effect of pH on cellulase activity for hydrolysis of peanut shell

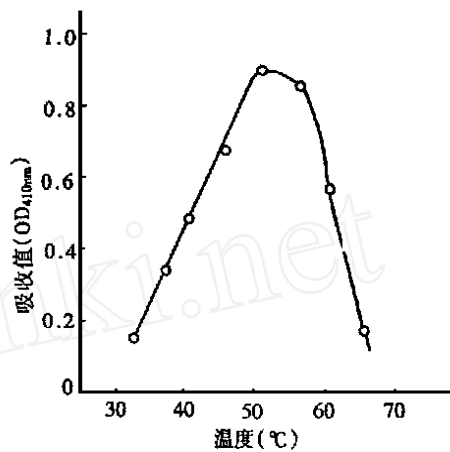


图 2 温度对福寿螺纤维素酶催化花生壳水解酶活力的影响

Fig. 2 Effect of temperature on cellulase activity for hydrolysis of peanut shell

2.3.1 反应时间与酶活力的关系 在 pH5.2 的醋酸缓冲液中 ,固定纤维素酶粉的含量 (1.0mg/ cm³) 及花生壳的含量 (1.0 %) ,45 下监测产物葡萄糖的生成量与反应时间的关系。结果(图 3)表明 ,在开始 60min 内 ,随着反应时间的增大 ,产物的生成量呈直线增大 ,随后增长的速度较为缓慢。

2.3.2 酶浓度与活力的关系 在 pH5.2 醋酸缓冲液的测活体系中 ,固定花生壳的含量 (1.0 %) ,加入不同量的纤维素酶粉 (0.5 ~ 2.5mg/ cm³) ,45 下反应 10min 后测定产物量的酶量的关系 ,结果(图 4)表明 ,随着酶量的增大酶活力成直线上升 ,酶促反应的速度与酶浓度呈正比关系。

2.4 花生壳浓度与酶活力的关系

在 pH5.2 的醋酸缓冲液中 ,固定纤维素酶粉的含量 (1.0mg/ cm³) ,改变花生壳的含量 ,45 下监测产物葡萄糖的生成量与酶活力的关系。结果(图 5)表明 ,在花生壳含量较低情况下 ,随着底物浓度的增大 ,酶活力迅速地增大。当花生壳含量较高时酶活力增大较不明显 ,增长的速度较为缓慢。

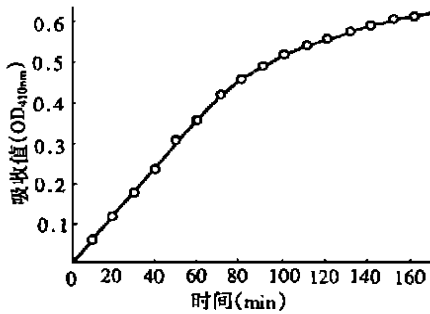


图3 纤维素酶催化花生壳时间的进行曲线

Fig. 3 Course of cellulase for hydrolysis of peanut shell

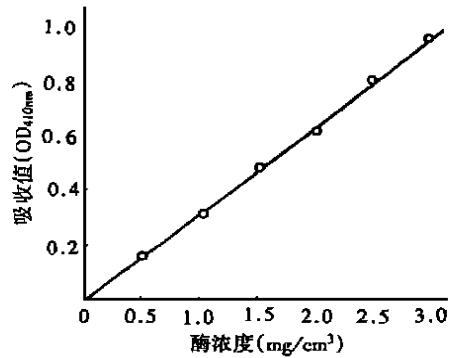


图4 酶浓度对纤维素酶催化花生壳活力的影响

Fig. 4 Effect of enzyme concentration on cellulase activity for hydrolysis of peanut shell

以上的实验结果说明从福寿螺内脏分离制备的纤维素酶系能够有效地水解纤维素,产生能被动物利用的葡萄糖。该酶可以作为动物饲料添加物,大大提高饲料的利用率,同时可以降低饲料的成本。我国从70年代就开始研究纤维素酶,并应用到饲料中,取得了一定的效果。在饲料中应用的纤维素酶可以补充动物内源酶,通过降低饲料的粘度,促进营养的吸收,也可以通过破坏植物的细胞壁促使细胞内容物得以释放、溶解,提高原料的利用率。目前,得到开发应用的纤维素酶主要来源于木霉和青霉,且酶活力不高。因此,从福寿螺的下脚料分离制备具有较高酶活力的纤维素酶粉在饲料工业上有现实的应用意义。

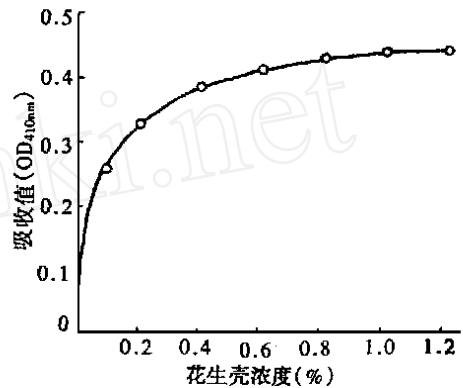


图5 花生壳浓度对酶活力的影响

Fig. 5 Effect of peanut shell concentration on cellulase activity

参考文献

- 1 Kumakura M. Preparation of Immobilized cellulase beads and their application to hydrolysis of cellulosic materials. *Process Biochem.*, 1997, **32**(7):555~559
- 2 Vanwyk J P H, Botha A C. Hydrolysis of cellulose materials during successive treatment with cellulase from penicillium-funiculosum. *Biotechnol. Lett.*, 1997, **19**(7):687~689
- 3 吴显荣,穆小民. 纤维素酶分子生物学研究进展及趋向. *生物工程进展*, 1994, **14**(4):25~27
- 4 刘家建,陆怡. 纤维素酶的研究及应用综述. *林产化工通讯*, 1995, **29**(1):6~10
- 5 邢湘臣. 新的蛋白饲料——福寿螺开拓及其养殖. *生物与特产*, 1990, **34**(1):35~38
- 6 邱烈军,曾德明. 福寿螺罐头开发前景加工技术. *四川食品工业科技*, 1994, **13**(2):37~39

Studies on exploitation and application of cellulase from *Ampullarium crossean*

Zhuang Zonglai ,Zhou Xingwang ,Tang Zhijun and Chen Qingxi

(*Department of Biology, Xiamen University, Xiamen, 361005*)

Abstract

The enzyme powder of cellulase had been prepared from *Ampullarium crossean* viscera. It is made up of three kinds of enzyme , which are Endo-1,4- β -D-Glucanase , Exo-1,4- β -D-Glucanase , and -1,4-D-Glucosidase. Their specific activities were determined to be 206.5 , 4.8 , and 42.4 thousand unit per gram , respectively. The protein content of the enzyme powder was determined to be 37.69 % , the water content , 7.96 % and the ash content ,1.78 % . The optimum pH of the enzyme powder for the hydrolysis of peanut shell is 5.26 , the optimum temperature is 52 . At pH5.2 , 40 , the cellulase powder can act on peanut shell and produce glucose , and the product quantity increases with prolonging the reaction time and enlarging the amount of cellulase powder.

KEYWORDS *Ampullarium crossean* ,cellulase ,exploitation and application