

文章编号:1673-1689(2009)06-0828-04

β -葡聚糖酶降解玉米秸秆中 β -葡聚糖的工艺

张强¹, 马齐¹, 徐升运¹, 陈卫峰¹, 韦娟²

(1. 陕西省科学院酶工程研究所, 陕西西安710600; 2. 西安理工大学, 陕西西安710048)

摘要: 利用 β -葡聚糖酶降解玉米秸秆中的 β -葡聚糖, 确定了酶浓度、pH、酶解时间以及温度等因素, 并通过正交实验进行了优化。影响因素为: 酶浓度>pH>反应温度>反应时间。酶解的最适条件: 酶活25.86万U/g, pH值4.5, 反应时间15h, 反应温度45℃。玉米秸秆的 β -葡聚糖的降解率为41.96%。

关键词: β -葡聚糖酶; 葡聚糖; 玉米秸秆; 降解率

中图分类号: Q55

文献标识码: A

Study on the Degradation of β -glucan of Corn Stalk by β -glucanase

ZHANG Qiang¹, MA Qi¹, XU Sheng-yun¹, CHEN Wei-feng¹, WEI Juan²

(1. Enzyme Engineering Institute of Academy, Sciences of Shaanxi, Xi'an 710600, China; 2. Xi'an University of Technology, xi'an 710048, China)

Abstract: In this manuscript, the conditions for corn stalk by β -glucanase were carefully investigated by single factors experiment and orthogonal experiments and described as follows: dosage of enzyme>pH>reaction temperature>reaction time. The best condition of degrading corn stalk with β -glucanase is dosage of enzyme 25.86 \times 10⁴ U/g, pH 4.5, reaction temperature 45℃, reaction time 15 h. With the optimum conditions, the degradation rate was achieved at 41.96%.

Key words: β -glucanase, glucan, corn stalk, degradation rate

β -葡聚糖属于植物细胞壁中的结构性非淀粉多糖, 是以混合的1,3和1,4- β 糖苷键连接形成的D型葡萄糖聚合物, 又分水溶性和非水溶性两种, 以水溶性居多。 β -葡聚糖是一种抗营养因子, 动物本身的消化酶无法消化, 因此限制了秸秆在饲料工业中营养价值的发挥^[1-3]。本文利用 β -葡聚糖酶进行体外降解秸秆中的葡聚糖, 使秸秆质地松软, 提高营养价值, 增强适口性和采食量。

1 材料与方法

1.1 原料

玉米秸秆采自西安孟村。用小型高速粉碎机将自然风干的秸秆粉碎, 过筛; β -葡聚糖酶, 和氏壁生物有限公司提供, 食品级。酶活为250万U/g; β -葡聚糖试剂盒法, 购于北京伊普锐斯科技有限公司。

收稿日期: 2008-10-13

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD89B16); 陕西省科学院青年基金项目(2008K16)。

作者简介: 张强(1975-), 男, 四川遂宁人, 工程师, 主要从事酶工程发酵工程的研究。

Email: zq10231023@163.com

1.2 实验方法

1.2.1 秸秆中的β葡聚糖的提取及测定 秸秆经粉碎过筛网,用体积分数 95%的食用乙醇泡 12 h,按料水比 1:10(w/v)在 65℃水中浸泡 1 h;然后按 400U/mL 的添加量加入 α-淀粉酶,在 95℃下水解 1 h;再用碳酸钠调节 pH 值为 8,在 80℃下提取 3 h,离心去渣,取上清液浓缩,浓缩为原来体积的 1/5;向浓缩液中加入 2 倍体积 95%的食用乙醇,沉淀 30 min,离心取沉淀,经干燥后为 β 葡聚糖粗品。

β 葡聚糖含量测定采用 β 葡聚糖试剂盒法^[4-5]。

1.2.2 β 葡聚糖降解率的测定 过 20 目的秸秆粉中加入 β 葡聚糖酶进行酶解 β 葡聚糖,以葡萄糖的含量作为评价指标,用酶解液中葡萄糖的含量除以秸秆中的葡聚糖含量,可计算出 β 葡聚糖的降解率^[6]。

1.2.3 酶解 基本酶解条件:准确称取 3 组过 20 目筛子的秸秆样品 3 g,用 0.8%NaOH 进行预处理(30 mL 0.8%NaOH 50℃下保温 2 h),加入 50 mL 蒸馏水,20 mL pH 值 4.8 的柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲液和适量的 β 葡聚糖酶,40℃酶解 12 h。

1.2.4 玉米秸秆粗的测定 见参考文献[7]。

1.2.5 葡萄糖含量的测定 采用 DNS 法^[8]。

2 结果与分析

2.1 秸秆中葡聚糖的含量

称取 1 g 秸秆进行 3 组平行提取实验,试剂盒法测得葡聚糖的平均质量分数为 2.86%。

2.2 秸秆中纤维素、半纤维素和木质素的质量

采用差重法^[9]测得秸秆的主要成分见表 1、表 2。其中纤维素质量=酸性洗涤纤维(ADF)-酸不容木质素(ADL)-灰分,半纤维素质量=中性洗涤纤维(NDF)-ADF。

2.3 酶解条件的确定

2.3.1 秸秆粒径对降解率的影响 分别取过 20、40、60、80 目的秸秆粉进行酶解。测定酶解液中葡萄糖含量,计算葡聚糖降解率,结果如图 1 所示。

表 1 玉米秸秆粗纤维组分质量

Tab. 1 The contents of raw cellulose of corn stalk

组分	质量/g	占总质量质量分数/%
NDF	2.984 7	96.49
ADF	2.043 6	68.12
ADL	0.685 5	22.85
灰分	0.042 3	1.41

表 2 秸秆纤维素、半纤维素、木质素质量

Tab. 2 The contents of cellulose, hemicelluloses and lignin of corn stalk

组分	质量/g	占总质量质量分数/%
纤维素	1.315 8	43.86
半纤维素	0.851 0	28.37
木质素	0.685 5	22.85
灰分	0.042 3	1.41

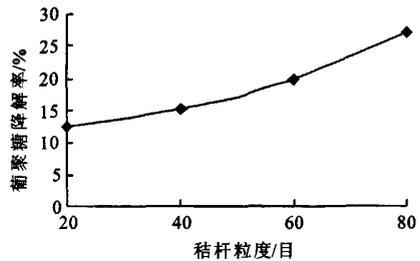


图 1 秸秆粒度对β葡聚糖降解率的影响

Fig. 1 Effect of particle size on degradation of β-glucan

由图 1 可知,秸秆粒径大小对葡聚糖的降解率影响较大。在本实验中,秸秆颗粒越小,单位质量的比表面积较大,酶的活性中心与秸秆表面的接触几率相对较高,水解越充分,所得还原糖的量就越大。

2.3.2 酶量对降解率的影响 分别准确加入 0.100 8、0.204 4、0.302 7、0.401 3、0.503 7、0.603 2 g 葡聚糖酶,即每克秸秆样品中加入 13.75 × 10⁴ U、25.86 × 10⁴ U、38.29 × 10⁴ U、50.76 × 10⁴ U、63.72 × 10⁴ U、76.30 × 10⁴ U 酶解,结果见图 2。

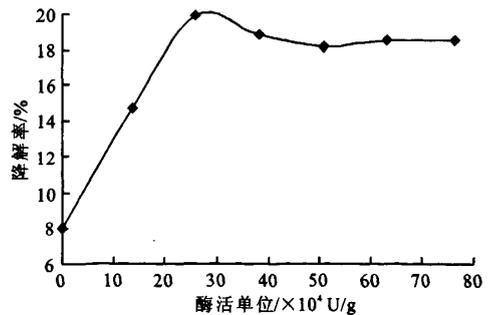


图 2 葡聚糖酶量对β葡聚糖降解率的影响

Fig. 2 Effect of the β-glucanase on the degradation of β-glucan

图 2 可知,随着酶量的增加,降解率增大,当酶量加大到一定量时,降解率趋于平缓。可能是因为一定量的半纤维素分子,能与 β 葡聚糖酶分子的结合点数量是有限的,当这些结合点全部被 β 葡聚糖

酶分子占据后,再增加 β 葡聚糖酶的用量,过多的酶用量反而增加了酶与底物的无效吸附,阻碍了酶分子活性中心与底物产生有效吸附从而降低了酶解效率。最适酶量选择 25.86 万 u/g,降解率为 19.93%。

2.3.3 pH 对 β 葡聚糖降解率的影响 调节 pH 分别为 3.0、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5,其他条件不变。测定酶解液中葡萄糖含量,计算葡聚糖降解率,如图 3 所示。

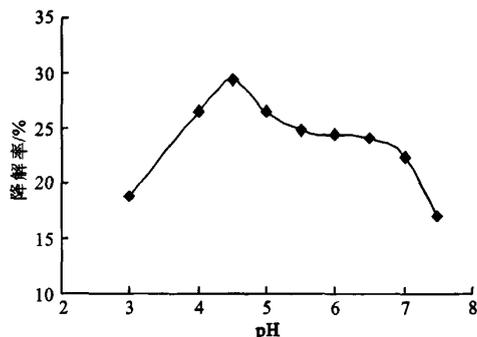


图 3 pH 对 β 葡聚糖降解率的影响

Fig. 3 Effect of pH on degradation of β -glucan

图 3 可知,葡聚糖酶对 pH 很敏感,pH 值的最适范围在 4~5 之间;pH 4.5 时,降解率为 29.37%。pH 值对酶及其反应系统可能产生两种影响,一是破坏酶的空间构象,使酶变性失活。二是改变了反应系统的组成成分,从而影响酶催化反应的速度。不同的 pH 值将改变和影响酶的解离状态、底物的解离状态及酶-底物络合物的解离等。从不同 pH 值条件下的得糖量可以推断:在该酶解体系中,pH 值影响了葡聚糖酶活性中心的解离状态,直接影响了葡聚糖酶的活性和酶与底物的结合状态,从而表现为降解率的差异。故反应 pH 值确定为 4.5。

2.3.4 反应温度对降解率的影响 分别于 30、35、40、45、50、55、60、70 °C 下酶解 20 h,其他条件不变。结果见图 4。

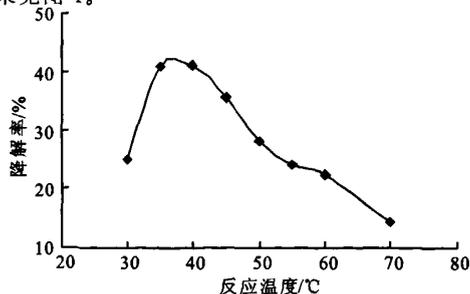


图 4 反应温度对 β 葡聚糖降解率的影响

Fig. 4 Effect of reaction temperature on degradation of β -glucan

图 4 可知,温度对酶活性的影响较大,温度过高或过低都不利于酶解反应的进行,高温尤其如此。40 °C 时降解率最高,为 41.25%,40 °C 左右是该酶解的最适宜反应温度,即葡聚糖酶达到了最大活力,反应速度也最大。当温度高于 40 °C 时,尽管反应速率大大提高,但同时酶活损失显著增大,降解率降低。故反应温度值确定为 40 °C。

2.3.5 反应时间对降解率的影响 其他处理条件不变,分别进行 5、10、15、20、25、40 h 的酶解实验。结果见图 5。

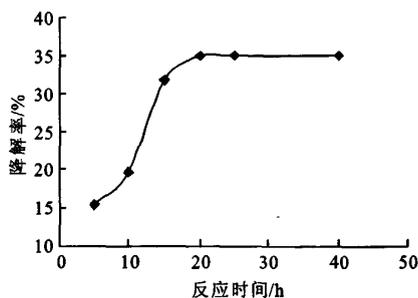


图 5 反应时间对 β 葡聚糖降解率的影响

Fig. 5 Effect of reaction time on degradation of β -glucan

图 5 可知,随着酶解时间的延长,酶解率增大,但反应超过 25 h 后,随着时间的延长,酶解率变化不大,即增加时间已不能显著地增加酶解率。其原因可能是:反应初期,由于底物浓度较大且游离酶较多,所以反应速度较快,还原糖单位时间得率较大,降解率较高;随着反应的进行,秸秆纤维中的非结晶区和无定形区逐渐被酶水解,在底物中所占的比率越来越小,导致可被降解的底物浓度逐渐减小,而且部分酶开始失活或发生无效吸附作用,同时酶解产物的抑制效应也逐渐显现,故反应速度逐渐减小并趋于平稳,降解率增加不大。故反应时间确定为 20 h。

2.4 葡聚糖酶降解工艺的优化

影响酶解反应的主要因素是加酶量、pH、温度和降解时间,根据以上的单因素实验,设计了四因素三水平正交实验,对葡聚糖酶降解秸秆的条件进行优化,(见表 3~5)。

表 3 正交实验因素水平表

Tab. 3 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	酶活力 单位/(u/g)	pH 值	反应 温度/°C	反应 时间/h
1	13.75	4.0	35	15
2	25.86	4.5	40	20
3	38.29	5.0	45	25

表4 正交试验设计和结果

Tab. 4 Results and analysis of orthogonal experiment

因素	A	B	C	D	降解率(%)
1	1	1	1	1	28.67
2	1	2	2	2	26.92
3	1	3	3	3	26.57
4	2	1	2	3	34.96
5	2	2	3	1	41.96
6	2	3	1	2	26.57
7	3	1	3	2	41.26
8	3	2	1	3	39.51
9	3	3	2	1	32.52
k1	27.387	34.963	31.583	34.383	
k2	34.497	36.130	31.467	31.583	
k3	37.763	28.553	36.597	33.680	
R	10.376	7.557	5.130	2.800	

由表3~5可见,酶量是影响秸秆中的葡聚糖降解率降解率的显著因素,pH和反应时间也有影响,反应温度影响最小。β-葡聚糖酶降解秸秆的最佳条件为:A₂B₂C₃D₁,即酶浓度>pH>反应温度>反应时间。最佳酶解条件为:酶浓度25.86万u/

参考文献(References):

- [1] 唐胜球,董小英.β-葡聚糖酶在动物营养中的应用研究进展[J].广东饲料,2006,15(1):20-22.
TANG Sheng-qiu, DONG Xiao-ying et al. Research advance on the application of β glucanase in animal nutrition[J]. *Guangdong Feed*, 2006, 15(1):20-22. (in Chinese)
- [2] 郭小权,胡国良,刘妹.β-葡聚糖的抗营养作用及β-葡聚糖酶在饲料中的应用[J].江西饲料,2001,2:11-13.
GUO Xiao-quan, HU Guo-liang, LIU Mei. The anti-nutritional effects of β glucan and the application of β glucanase in feed[J]. *Jiang xi Feed*, 2001, 2:11-13. (in Chinese)
- [3] 高鹏飞,赵彩艳,程茂基.β-葡聚糖酶在麦类饲料中的应用与前景[J].饲料博览,2006,4:7-9.
GAO Peng-fei, ZHAO Cai-yan, CHENG Mao-ji. Advances and prospects of research on β glucanase in wheat feed[J]. *Feed Review*, 2006, 4:7-9. (in Chinese)
- [4] 连喜军,张平平,罗庆丰.西藏青稞β-葡聚糖提取研究[J].粮食与油脂,2006,1:27-28.
LIAN Xi-jan, ZHANG Ping-ping, LUO Qing-feng. Study on extraction of β Glucan from barley in tibet[J]. *Cereals & Oils*, 2006, 1:27-28. (in Chinese)
- [5] 吕秀阳,夏文莉,刘天春.稻壳资源化新工艺的研究[J].农业工程学报,2001,2(10):114-120.
LU xiu-yang, Xia Wen-li, Liu Tian-chun. A new press to resource rice hull[J]. *Transactions of the CSAE*, 2001, 2(10):114-120. (in Chinese)
- [6] 李华,孔新刚,王俊.秸秆饲料中纤维素、半纤维素和葡聚糖的定量分析研究[J].新疆农业大学学报,2007,30(3):65-68.
LI Hua, KONG Xin-gang, WANG Ju. Study on quantitative analysis of hemicellulose and cellulose and lignin in roughage of cereal straw[J]. *Journal of Xingjian Agricultural University*, 2007, 30(3):65-68. (in Chinese)
- [7] 陈合,张强,赵燕.复合酶降解玉米秸秆工艺条件的研究[J].安徽农业科学,2006,35(29):9136-9139.
CHEN He, ZHANG Qiang, ZHAO yan. Study on the degradation of corn stalk by compound enzymes[J]. *Journal of Anhui Agri SCI*, 2006, 35(29):9136-9139. (in Chinese)
- [8] 杜甫佑,张晓昱,王宏勋.木质纤维素的定量测定及降解规律的初步研究[J].生物技术,2004,4:46-48.
DU Fu-you, ZHANG Xiao-yu, WANG Hong-xun. Studies on quantitative assay and degradation law of lignocellulose[J]. *Biotechnology*, 2004, 4:46-48. (in Chinese)

g,pH 4.5,反应时间15 h,反应温度45℃。玉米秸秆的β-葡聚糖的降解率为41.96%。

表5 方差分析表

Tab. 5 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
酶活/u/g	168.898	2	2.029	4.460	显著
pH	99.855	2	1.200	4.460	较显著
反应温度/℃	12.731	2	0.153	4.460	不显著
反应时间/h	51.464	2	0.618	4.460	不显著
误差	332.95	8			

3 结 语

秸秆粒度对葡聚糖降解率有明显的影响,在20-80目间,秸秆颗粒越小,降解率越大。

该葡聚糖酶降解玉米秸秆的最佳工艺条件:酶浓度25.86万u/g,pH值4.5,反应时间15 h,反应温度45℃。玉米秸秆的β-葡聚糖的降解率为41.96%。