

酶解去除大豆产品抗原蛋白的效果研究

王之盛¹ 况应谷² 周安国¹ 赵 胜¹ 陈 华¹

(1. 四川农业大学 动物营养研究所, 四川雅安 625014; 2. 福建闽科生物技术有限公司, 福建福州 350000)

摘 要 在实验室条件下采用对比实验, 研究外源酶制剂对大豆抗原蛋白降解的效果。结果表明: 大豆抗原蛋白并非抗酶蛋白, 复合外源酶制剂在不同的 pH 值缓冲条件下降解抗原蛋白的效率不同, 对生大豆的酶解效果优于豆粕; 在酸性条件下有利于生大豆 11 S 抗原蛋白的降解, 在碱性条件下有利于豆粕抗原蛋白的降解, 中碱性条件有利于 7 S 和 2 S 小分子质量抗原蛋白的进一步降解。pH 4.0 和 37 ℃是复合酶制剂降解大豆抗原蛋白的适宜环境条件, 并可提高大豆蛋白的真蛋白降解率。

关键词 酶制剂; 抗原蛋白; 降解效率

中图分类号: S816.79 文献标识码: A 文章编号: 1001-0084(2004)11-0001-04

发展养猪生产, 降低仔猪生产成本是关键。目前的研究表明: 仔猪的生长潜力并未得到充分发挥, 其生长潜力远大于摄食能力^[1], 但是仔猪越小, 对饲料质量要求越高。动物性饲料因经济成本高和饲料安全等原因难于在生产中大量使用。植物性饲料经济成本较低且来源广泛, 但即使是目前被认为是单胃杂食动物最好的植物蛋白源——大豆及其副产品, 对仔猪同样存在有抗营养物质。用物理学和免疫学的方法证明: 大豆中存在免疫化学性质不同的 4 种抗原蛋白质: 11 S 大豆球蛋白 (Glycinin) 和两种 7 S 伴球蛋白 (β -Conglycinin、 γ -Conglycinin), 2 S 伴球蛋白 (α -Conglycinin), 分别占大豆总蛋白的 40%, 30%, 3%, 15%^[2], 大豆抗原蛋白由于热稳定性好, 在一般的饲料加工中不易被破坏, 易于引起断奶仔猪和犊牛等家畜的过敏反应, 造成腹泻甚至死亡, 其中 11 S 大豆球蛋白和 7 S 的 β -伴球蛋白是主要抗营养物质。目前的解决方案是: 使抗原蛋白变性或使其蛋白质抗原决定簇多肽末端的氨基酸降解, 达到抗原蛋白失活的目的。具体的方法有热乙醇变性法、热加工法、化学试剂钝化法等, 但这些方法存在着生产成本低、营养物质破坏严

重、药物残留和不利于规模化生产等问题。

随着酶学生物技术的发展, 饲用酶制剂因其具有“绿色”、“环保”、“安全”等特点, 被认为是降解抗原蛋白的最理想方法。本研究通过改善酶的作用条件, 尤其是 pH 条件, 优化单酶制剂的组合, 对大豆抗原蛋白进行酶解研究, 为开发去除抗原蛋白的优质高档仔猪饲料作前期研究准备工作。

1 材料与方法

1.1 酶制剂

复合外源酶制剂的酶来自广东英恒生物饲料有限公司、福建师范大学微生物教研室、台湾环茂国际实业有限公司等提供的酶制剂, 复合酶制剂的组合比例为: 酸性蛋白酶 60%、碱性蛋白酶 20%、纤维素酶 10%、淀粉酶 8%、脂肪酶 2%, 其组合比例是根据实验条件下, 以降解抗原蛋白效果最好为依据, 酶活性的测定参照陈雪秀等^[3]的方法进行, 酶的添加量按底物量的 0.5% 添加。

1.2 实验材料

生大豆, 饲用豆粕, 缓冲液 (主要为磷酸盐类缓冲液)。

1.3 实验方法和设备

采用对比实验方法, 在实验室进行体外消化试验: 在恒温振荡器上进行消化 (37 ℃, 2 h, 80 r/min), 大豆抗原蛋白 11 S、7 S 和 2 S 的分离方法采用离

收稿日期: 2004-04-07

作者简介: 王之盛 (1967-), 男, 四川蓬溪人, 副教授, 在读博士, 主攻动物营养与饲料科学。

心分离法^[2]，其含量的测定采用岛津 UV-120 紫外可见分光光度计进行紫外分析。

1.4 真蛋白的测定

参照杨胜^[4]的真蛋白测定方法。

2 结果与分析

2.1 酶制剂的筛选

实验结果表明 (见表 1)：在适宜的温度和缓冲体系作用条件下，不同的外源酶对大豆抗原蛋白都有明显的降解作用。在 pH 4.0 条件下，复合酶对生大豆 11 S 抗原蛋白降解的效果最好。酸性蛋白酶对豆粕 11 S 抗原蛋白的降解作用最好。不同来源的酶对豆粕抗原蛋白的相对可降解程度低于对生大豆蛋白的降解程度，其原因可能是普通饲用豆粕加工生产中其蛋白质产生严重变性和蛋白质氨基酸发生了交联反应、美拉德反应，掩盖了酶的作用位点，影响了酶解作用^[5]，也可能是由于豆粕在加工中生成了更多的相对分子质量大于 11 S 的交联物质，表现出豆粕对照组 11 S 抗原蛋白的含量比较低，而在酶解后降解成了相对分子质量为 11 S 左右的物质，使得豆粕酶解组和对照组之间 11 S 蛋白的残留量差异不大，甚至有高于对照组的情况，而生大豆中的抗原蛋白呈天然状态反而有利于酶制剂降解 11 S 抗原蛋白。因此可以推断：大豆抗原蛋白并非抗酶蛋白。小猪饲料直接加酶处理降解抗原蛋白，对考虑适宜缓冲体系具有重要意义。由于大豆抗原蛋白中 11 S 抗原蛋白占大豆蛋白的比例最高，因此选择复合酶制剂降解大豆抗原蛋白更有效。

表 1 不同酶制剂降解 11 S 抗原蛋白的残留量

组别	生大豆 mg/mL)	豆粕 mg/mL)
对照组	3.61	0.28
复合酶制剂	0.19	0.22
酸性蛋白酶	0.32	0.18
木瓜蛋白酶	0.22	0.34
进口蛋白酶	0.46	0.22

注：水解条件是 pH 4.0 的磷酸盐缓冲溶液，酶解温度 37 ℃。对照组不加酶，其余条件同于实验组。

2.2 不同条件下去除抗原蛋白效果的比较

结果见表 2。

表 2 不同条件下酶解后抗原蛋白的残留量

pH	实验组别	生大豆 mg/mL)		豆粕 mg/mL)	
		11 S	7 S+2 S	11 S	7 S+2 S
3.0	酶	0.19	306.2	0.25	305.27
	对照	1.27	54.36	0.22	17.51
4.0	酶	0.17	286.8	0.30	297.4314
	对照	1.61	86.66	0.24	70
5.0	酶	0.25	308.4	0.33	313.6
	对照	0.85	65.88	0.26	012.74
6.0	酶	0.13	53.90	0.29	70.36
	对照	1.94	5.78	0.31	10.68
7.0	酶	0.21	22.09	0.32	21.16
	对照	1.46	6.37	0.34	8.94
8.0	酶	0.23	24.2	0.28	19.84
	对照	1.56	52.45	0.40	8.82
盐酸组	6 mol/L 盐酸	0.45	16.37	0.64	16.28
	对照	1.65	24.03	0.26	10.04

注：实验温度均为 37 ℃，酶制剂为复合酶。酸解法是用 6 mol/L 盐酸代替复合酶，其对照组用蒸馏水。

酸解法和不同 pH 缓冲条件下酶解法均对大豆抗原蛋白有明显的降解作用，对生大豆 11 S 抗原蛋白的酶解效果优于豆粕，在 pH 6.0 条件下效果最好，其次为 pH 4.0。复合酶解法效果优于酸解法，在中碱性条件下有利于复合酶制剂酶解豆粕抗原蛋白。在酸性条件下有利于复合酶制剂大幅度酶解生大豆 11 S 抗原蛋白，导致小分子质量蛋白质含量增加，而且中碱性条件下易于进一步降解分子质量在 7 S 和 2 S 的小分子质量抗原蛋白。这可能与复合酶中各单酶制剂的作用条件密切相关，也说明酶制剂在适宜环境条件下，可有效降解大豆抗原蛋白。电泳实验进一步证明：酶解抗原蛋白产物电泳速度明显高于对照组，表明酶解后抗原蛋白从大分子被酶解成了小分子物质 (见图 1, 2)。其原因主要在于利用复合酶制剂中纤维素酶降解细胞壁物质，使淀粉、脂质、蛋白易于被相应的酶制剂降解，从而降低了它们在酶解抗原蛋白过程中的屏蔽或阻挡作用，有利于蛋白酶直接降解抗原蛋白。Hu^[6] (1993) 研究也表明：微生物酶可有效抑制生大豆中的植物凝集素的活性，对大豆蛋白酶抑制因子等抗营养物质的活性可减少 96%。Beal^[6] 电泳实验

也表明：外源酶能有效地使抗原蛋白的连接键断裂。虽然酸解法也能水解抗原蛋白，但化学水解蛋白质容易产生变构的毒性肽和毒性氨基酸，不利于产品的后续处理，并容易造成二次污染等问题。

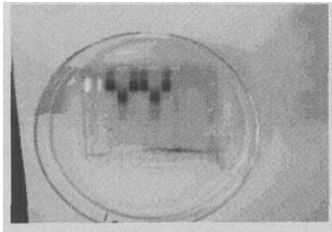


图1 酶解 11 S 抗原蛋白电泳比较图

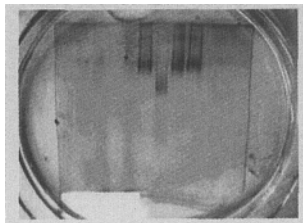


图2 酶解 7 S+2 S 抗原蛋白电泳比较图

外源酶降解后出现 7 S+2 S 的含量高于对照组的情况，用 6 mol/L 的盐酸代替酶水解后也出现实验组 7 S+2 S 的含量高于对照组的情况（见表 2）。主要是由于 11 S 蛋白以及分子质量更大的蛋白被酶解后降解为沉降系数为 7 S、2 S 和 3 S 的小分子蛋白、小肽类等物质^[2-7]，但他们只是在分子质量的大小上相似，与生大豆或豆粕中本身的 7 S 和 2 S 蛋白在高级结构和生物活性上是不同的。Thorpe (2001) 通过凝胶电泳、Western 杂交分析表明：用外源酶处理含抗原蛋白的大豆日粮后，虽然发现大豆蛋白中仍含有少量的抗原决定簇，但动物血清酶联免疫分析并没有表现出抗体水平明显升高，动物试验也表明：加酶处理大豆产品能显著提高断奶仔猪和生长猪生产性能 ($P < 0.05$)。

2.3 酶解对大豆产品真蛋白质降解效率的影响

11 S、7 S 和 2 S 抗原蛋白占大豆总蛋白的 85% 以上，它们属于真蛋白，采用酶解后对真蛋白的降解率分析可以进一步评价复合酶制剂降解抗原蛋白的作用效果，通过对加酶组与对照组生大豆和豆粕酶解作用 2 h 后真蛋白分析表明：pH 值 3~5 的条件下生大豆的真蛋白质降解率可达到 82%~93%，对豆粕真蛋白的降解效率也很高（见表 3），再次表明复合酶制剂在适宜的 pH 缓冲条件和温度条件下，可以有效降解抗原蛋白等抗营养物质，提

高仔猪饲粮蛋白质消化利用效率。本实验中豆粕真蛋白的降解效率低于生大豆的降解效率，也再次证明豆粕在生产加工过程中发生了交联、美拉德反应等变化，生成了大分子物质，阻碍了酶解效果。在本实验中考虑到产品生产方法在今后实际生产中应用的可行性，结合酶的作用特点和仔猪的营养生理特点，对复合酶对豆粕降解作用的条件选择可能并非最佳。Caine^[8]用蛋白质溶解度作为衡量指标研究外源酶对豆粕的作用表明：在温度 50 °C 孵育 16 h，pH 4.5 为最适条件。仔猪的营养生理研究表明：pH 值 5.0 以下接近于仔猪的胃内环境，pH 4.0 左右是仔猪胃内最可能存在的酸性环境^[9]，而 pH 7.0~8.0 接近于仔猪十二指肠的环境。本研究表明：pH 值 4.0 时，复合酶制剂不但能有效降解生大豆中的 11 S 抗原蛋白，而且对大豆和豆粕的真蛋白降解效率也很高，针对仔猪的营养生理特点和酶制剂的作用条件，进一步说明该酶制剂的优化组合符合仔猪的营养消化生理条件，也是体外实验利用复合外源酶制剂降解大豆或豆粕抗原蛋白的理想条件，由于在传统生产中单纯使用酶制剂，没有充分考虑酶的作用环境条件，同时仔猪自身的消化酶分泌不足，因此没有达到显著降低抗原蛋白对仔猪的不良影响作用。在生产实践中，优化复合酶制剂的组合比例，考虑适宜的缓冲体系有利于在仔猪消化道中最大限度地降解大豆产品中的抗原蛋白。

表 3 复合外源酶对真蛋白质的降解率 %

pH	生大豆	豆粕
3	82.54	76.52
4	93.13	83.62
5	88.25	84.37

3 结 论

不同外源酶对生大豆和豆粕抗原蛋白均有不同程度的降解作用，酶解法是去除抗原蛋白的有效方法，复合酶制剂对生大豆的抗原蛋白降解效果优于豆粕，豆粕的加工处理会影响复合酶制剂对其抗原蛋白的降解效果；pH 值不同，酶解抗原蛋白的效果不同，适宜的缓冲体系是影响抗原蛋白酶解效果的重要因素，酸性条件下有利于复合酶制剂降解 11 S 抗原蛋白，中性和偏碱性条件下有利于豆粕抗原蛋白降解，以及 7 S 和 2 S 小分子质量抗原蛋

不同处理的玉米秸秆离体消化对比研究

祁宏伟¹ 于秀芳¹ 张学峰² 甘利雅扩³ 王大广¹ 苏秀侠¹

(1.吉林省农业科学院 畜牧科学分院, 吉林公主岭 136100; 2. 吉林农业大学 动物科技学院, 吉林长春 130118; 3.日本农业技术研究机构 畜产草地研究所, 日本 305-0901)

摘要 研究采用中国草原红牛瘤胃液, 应用 In vitro 试验方法测试了 5 种不同处理方式的玉米秸秆干物质消化情况。结果表明: 干物质消失率的高低顺序依次为: 玉米秸秆青贮>玉米秸糠饲料块>全玉米秸饲料块>粉碎玉米秸>玉米秸硬皮。

关键词 不同处理玉米秸秆; 离体消化法; 消化率

中图分类号: S816.32 文献标识码: A 文章编号: 1001-0084(2004)11-0004-03

由于玉米秸秆具有十分丰富的粗纤维和能量的特点, 使其成为我国反刍动物巨大的饲料资源。不同的处理及加工方法可以在不同方面改变玉米秸秆的物理及化学特性, 其饲用价值亦有所区别。体外消化率是评定饲料品质的重要指标, 它可以大致表明饲料在瘤胃内的干物质降解消失规律, 其消失率的高低说明该饲料的可利用价值。本文应用 In vitro 试验方法, 对 5 种不同处理的玉米秸 粉碎玉米秸、

全玉米秸饲料块、玉米秸糠饲料块、玉米秸秆青贮、玉米秸硬皮) 进行不同时间段上 pH 值变化和干物质消失率进行分析和比较, 从而论证瘤胃微生物对几种处理方式的玉米秸秆干物质的消化和利用效果。

本试验的研究目的在于评价不同处理的玉米秸秆的营养价值, 探讨玉米秸秆的不同处理被反刍动物的消化利用情况, 为我国北方反刍动物科学应用玉米秸秆提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物与日粮组成

中国草原红牛公牛(体重 350 kg 左右), 参照

收稿日期: 2004-07-07

作者简介: 祁宏伟 (1970-), 男, 硕士, 主要从事动物营养与饲料科学的的教学与研究。

白的进一步降解, 复合酶制剂降解抗原蛋白的效果优于酸解法。pH 4.0 的磷酸盐缓冲体系和 37 ℃ 是复合酶制剂降解大豆抗原蛋白质的适宜环境条件, 使用外源酶制剂可显著提高生大豆和豆粕的真蛋白质消化利用效率。

[参 考 文 献]

- [1] 苏宁. 新生仔猪整体蛋白质周转的营养生理效应研究[D]. 雅安: 四川农业大学动物营养研究所, 2001.
- [2] 王尔惠. 大豆蛋白质生产新技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 36-46, 96-115.
- [3] 陈雪秀, 李文英, 郭增魁, 等. 猪的离体消化试验方法的研究[C]. 北京: 中国农科院畜牧研究所, 1984.

- [4] 杨胜. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993.
- [5] 王之盛. 加工对配合饲料蛋白质营养价值的影响[J]. 四川农业大学学报, 2000, (1): 57-61.
- [6] Beal J D, Brooks P H, Schulze H. The hydrolyzation of protein in raw and autoclaved soybean meals by a microbial protease[A]. British Society of Animal Science Winter Meeting[C]. Scarborough U K: 1998.
- [7] 李荣和. 大豆新加工技术原理与应用[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1999.98-119.
- [8] Caine W R, Sauer W C. Apparent ideal digestibilities of amino acids in newly weaned pigs fed diets with protease-treated soybean meal[J]. J Anim Sci, 1997, (75): 2962-2969.
- [9] 张宏福, 卢庆萍, 杨富林. 断奶仔猪消化道酸度及其调控[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2002.