

# 兔体内纤维素酶的分离及酶学性质的研究

徐兴军, 张伟伟, 吕建伟, 邵淑丽<sup>\*</sup> (齐齐哈尔大学生命科学与工程学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

**摘要** [目的] 研究兔消化系统中内源性纤维素酶及其酶学性质。[方法] 取兔子消化系统中的胃、十二指肠、小肠和大肠, 用 DNS 法测定纤维素酶活并对其性质进行研究。[结果] 结果表明, 胃、十二指肠、小肠和大肠纤维素酶活性最高的底物浓度均是 0.625%, 最适显色时间 5 min, 最适 pH 值分别是 4、6、7、6, 最适温度是 48 ℃。[结论] 该研究结果为兔饲料及其应用研究提供一定的理论基础。

**关键词** 纤维素酶; 酶活; 酶学性质; 兔

**中图分类号** S829.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)16-07456-02

## Studies on Separation and Enzymatic Character of Cellulase from Rabbit

XU Xing-jun et al (College of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

**Abstract** [Objective] The purpose of this research was to study the endogenous cellulase and its enzymatic character in digestive system of rabbit. [Method] The stomach, the duodenum, the small intestine and the large intestine in digestive system of rabbit were taken to study its zymology activeness. DNS method was used to analyze the effects of determination conditions on results of measurements. [Result] The results indicated that under the different conditions, bodies cellulase activities were different. The stomach, the duodenum, the small intestine, the large intestine most suitable substrate concentration were 0.625%, the most suitable colored time was 5 min, most suitable pH value was 4, 6, 7 and 6, respectively. The stomach, the duodenum intestines, the small intestine and the large intestine optimum temperature was 48 ℃. [Conclusion] This research result will provide the theoretical references for rabbit foodstuff and application of additive.

**Key words** Cellulase; Cellulase activity; Enzymatic character; Rabbit

兔属于草食性动物, 主要以多汁的草本植物和树皮、嫩枝等高纤维素含量的植物性饲料为主, 要从食物中获得更多能量, 就要充分分解利用这些纤维素。兔对粗纤维的消化主要在盲肠中进行, 靠盲肠内的微生物分泌纤维素酶消化粗纤维。盲肠与结肠连接处有一个膨大球囊, 能分泌碱性溶液和微生物产生的酸, 若青贮饲料酸性大则无法综合, 酸度过大则影响盲肠内微生物的生长与繁殖, 导致微生物分泌纤维素酶的数量减少, 造成消化不良, 引起酸中毒。H. P. S. Makkar 等对兔盲肠与牛瘤胃内容物酶变化进行了研究, 发现兔盲肠纤维分解酶的活性比牛瘤胃纤维分解酶活性低得多, 这说明兔对纤维素的消化来源于微生物。笔者初步研究了兔子消化系统中的胃、十二指肠、小肠、大肠内源性纤维素酶及其酶学性质, 为兔饲料及其添加剂的应用研究提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

1.1 材料 家兔(购于齐齐哈尔市崔门种畜场)。

1.2 药品及试剂 DNS 试剂、0.2 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠溶液(pH 值5.0)、羧甲基纤维素钠、葡萄糖, 西安化学试剂厂; 牛白蛋白, 国药集团化学试剂有限公司; 考马斯亮兰 G250, 天津市科密欧化学试剂开发中心; APS, 生工生物工程(上海)有限公司; 丙烯酰胺, 国药集团化学试剂有限公司; SDS, BBI。

1.3 仪器 722 型分光光度计, 山东高密彩虹分析仪器有限公司; 电子数显 pH 计, 深圳市天友利标准光源有限公司 Cyb-arscan 500 型; 电子天平, 德国 Sartorius 公司。

## 1.4 方法

1.4.1 粗酶液的制备。耳缘静脉注射空气使试验用兔致

死, 冰上解剖, 取其胃、十二指肠、小肠、大肠, 并用 ddH<sub>2</sub>O 冲洗干净, 分别称重量和测量长度, 放入研钵中, 加入 pH 值 5.0、0.2 mol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0.1 mol 柠檬酸缓冲液, 冰上研磨, 过滤。然后将收集到的液体全部倒入离心管中, 4 ℃, 10 000 r/min 离心 15 min, 去除沉淀, 收集酶液上清, 再在同样条件下重复离心 1 次, 取上清, 即为粗酶液, 为避免酶失活, 提取的粗酶液均保存于 -80 ℃ 冰箱中, 备用。

1.4.2 酶活的测定——DNS 法<sup>[1-2]</sup>。

1.4.2.1 标准曲线的绘制。先准确称取经 70 ℃ 烘干过夜的葡萄糖 100 mg, 溶解于 ddH<sub>2</sub>O 中, 并定容至 100 ml 得到 1 mg/ml 的葡萄糖标准储备液。然后取 6 个管, 按表 1 配制一系列不同浓度的葡萄糖标准溶液。各标准溶液中加入 2 ml DNS, 沸水浴 5 min, 冷却后 550 nm 测量吸光度 A。

表 1 标准葡萄糖溶液的配制

Table 1 Standard glucose solution preparation

| 编号<br>Number | 葡萄糖浓度<br>mg/ml<br>Glucose<br>concentration | 1 mg/ml 葡萄糖标准<br>储备液体积//ml<br>1 mg/ml glucose standard<br>reserving solution volume | ddH <sub>2</sub> O<br>ml |
|--------------|--|---|--------------------------|
| 1            | 0  | 0   | 2.0                      |
| 2            | 0.1  | 0.2   | 1.8                      |
| 3            | 0.3  | 0.6   | 1.4                      |
| 4            | 0.7  | 1.4   | 0.6                      |
| 5            | 0.9  | 1.8   | 0.2                      |
| 6            | 1.0  | 2.0   | 0                        |

1.4.2.2 酶活测定。按文献[3-4]的方法略做修改。以 0.625% (w/v) 羧甲基纤维素钠 (Carboxymethylcellulose, CMC-Na) 为底物。取底物 1.6 ml 于试管中, 再加入粗酶液 0.4 ml, 38 ℃ 恒温水浴反应 120 min 后, 加 2 ml DNS, 沸水浴 5 min 显色, 于 550 nm 处测定光吸收值。以灭活组为对照。酶活力单位定义 (U): 在上述条件下, 每分钟底物被酶解产生 1 μmol 还原糖 (以葡萄糖计) 所需酶量定义为 1 个酶活力单位。

1.4.3 最适底物浓度的测定 取不同浓度 (0.210%, 0.420%, 0.625%, 0.938%, 1.250%) 的 CMC-Na 溶液 1.4

**基金项目** 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (11541387, 11511447, 11531425); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (C200624)。

**作者简介** 徐兴军 (1969 - ), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 副教授, 从事动物生理与生态学的教学与研究。\*通讯作者, E-mail: shsh132@163.com。

**收稿日期** 2009-03-05

ml, 与 0.6 ml 的粗酶液混匀, 在 38 °C 恒温水浴箱内糖化 2 h, 以蒸馏水作对照, 分别加入 DNS 试剂 2 ml, 于沸水浴中显色 5 min 后取出, 冷水中冷却至室温, 于 550 nm 处测定吸光度。

**1.4.4 粗酶最适 pH 值的确定。** 将粗酶与不同 pH 值 (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0) 的 0.2 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0.1 mol 柠檬酸溶液配置的底物混合, 按上述方法测定各组织酶活。

**1.4.5 粗酶反应的最适温度。** 将粗酶与底物混合, 在 28、38、48、58 和 68 °C 下分别水浴, 然后按上述方法测定各组织酶活。

**1.4.6 不同组织中纤维素酶活性的比较。** 取胃、十二指肠、小肠、大肠粗酶液, 按上述最适反应条件使酶与底物反应, 并测定酶活, 比较不同组织内纤维素酶活性的大小。

**1.4.7 统计分析。** 使用 SPSS13.0 统计软件包进行数据分析, 用 Origin6.0 做图。

**2 结果及分析**

**2.1 标准曲线** 标准曲线如图 1。

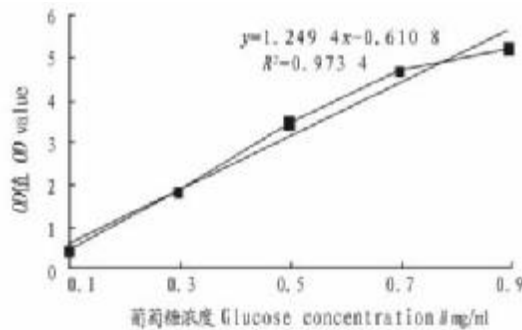


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Glucose standard curve

**2.2 最适底物浓度的确定** 由图 2 可见, 底物浓度从 0.210% ~ 0.625%, 随着底物浓度的增加, 各组织酶活力增加, 当大于 0.625% 时, 酶活力下降。因此, 采用 0.625% 作为酶的最适底物浓度。

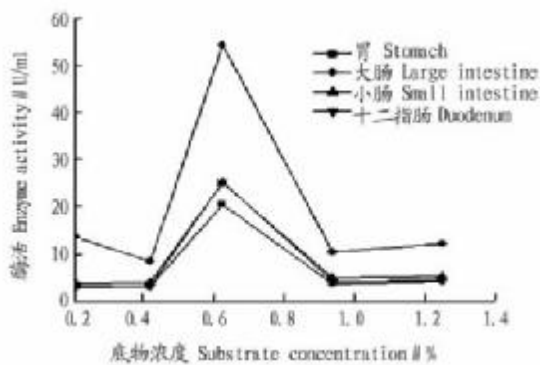


图 2 不同底物浓度下各组织酶活

Fig.2 Enzyme activity of each organ under different substrate concentrations

**2.3 最适温度的确定** 由图 3 可见, 兔消化道各组织粗酶液在 28 ~ 48 °C 范围内酶活变化不大, 当温度超过 48 °C 时, 大肠纤维素酶活性降低, 其他组织不变。

**2.4 最适 pH 值的确定** 由图 4 可见, 兔消化道不同部位的纤维素酶最适 pH 值不同, 胃的最适 pH 值为 4, 十二指肠的最适 pH 值为 6, 小肠的最适 pH 值为 7, 大肠的最适 pH 值为 6。

**2.5 不同组织内纤维素酶的活性** 兔整个消化道组织中,

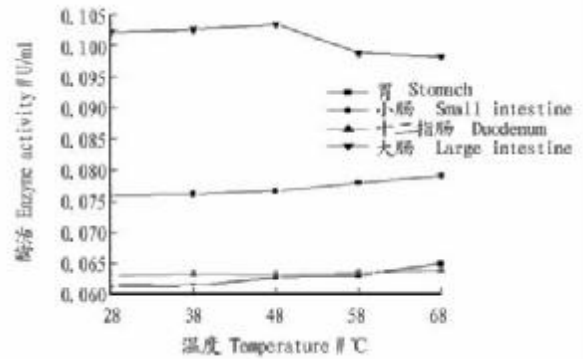


图 3 不同温度下各组织酶活

Fig.3 Enzyme activity of each organ under different temperatures

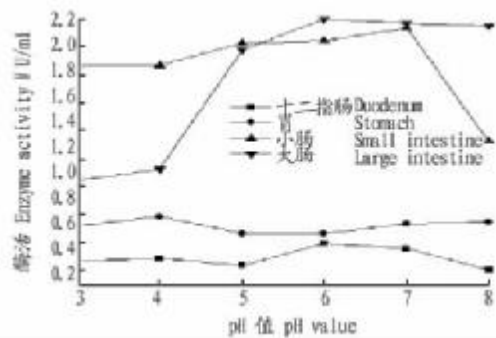


图 4 不同 pH 值对各组织酶活的影响

Fig.4 Effect of different pH values on enzyme activities of stomach, duodenum, small intestine and large intestine

胃、大肠、小肠和十二指肠的纤维素酶活分别为 (0.055 7 ± 0.001)、(0.216 8 ± 0.021)、(0.067 1 ± 0.005) 和 (0.054 0 ± 0.008) U。由此可知, 大肠纤维素酶活最高, 其次是小肠、胃和十二指肠, 说明兔对纤维素类物质的消化与吸收主要在大肠进行, 该部位酶活占整个消化道组织总酶活的 55.1%; 小肠次之, 为 17.0%。这种酶活的分布差异可能与纤维素类食物在肠道中的消化与吸收不同有关。

**3 结论与讨论**

对动物内源性纤维素酶的研究主要集中在蜗牛、白蚁和食木蟑螂<sup>[5]</sup>等动物体内。1998 年, Smant 等用分子生物学的方法, 从 2 种不同种属的植物寄生的线虫中得到了 4 个内切-b-1,4-葡聚糖酶 (EG) 的 cDNA<sup>[6]</sup>; 同年, Watanabe 等利用白蚁 (*R. spertaus*) 的内切-b-1,4-葡聚糖酶的抗血清对其 cDNA 文库进行免疫筛选, 并采用 cDNA 末端快速扩增法 (Rapid amplification of cDNA ends, RACE) 得到白蚁内切-b-1,4-葡聚糖酶 cDNA<sup>[7]</sup>。该试验研究结果表明, 兔子消化道的各组织都含有内源性纤维素酶, 其酶学性质在各组织间存在一定的差异; 各组织内源性纤维素酶的最适底物浓度均为 0.625%, 最适显色时间均为 5 min; 最适温度, 最适 pH 值和酶活性大小表现出明显的组织差异; 兔消化道各组织粗酶液在 28 ~ 48 °C 范围内酶活变化不大, 胃的最适 pH 值偏酸, 十二指肠和大肠的最适 pH 值中性偏酸, 小肠的最适 pH 值为中性。在最适条件下, 兔整个消化道组织中, 大肠纤维素酶活最高, 其次是小肠、胃和十二指肠。

(下转第 7528 页)

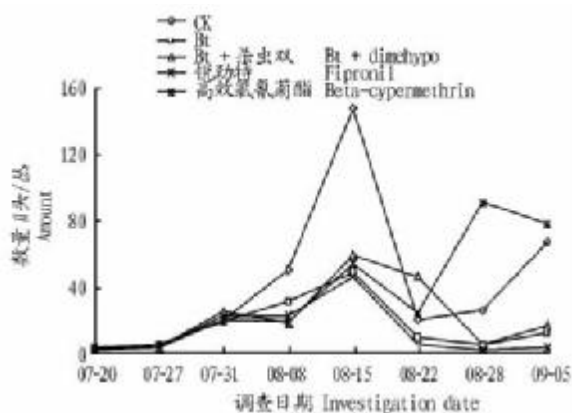


图2 不同处理区稻飞虱的种群动态

Fig.2 Population dynamics of rice hopper with different treatment areas

量杀伤天敌密切相关。

2.3 不同处理对稻田天敌的影响 试验结果见图3。由图3可见,对照区以稻田蜘蛛为主的捕食性天敌数量随时间进程呈稳定上升趋势,数量十分丰富。Bt、Bt + 杀虫双对天敌影响较小,其次是锐劲特处理,而高效氯氰菊酯对稻田天敌有毁灭性杀伤作用。

3 讨论

在水稻害虫综合治理中,适时调节害虫密度,同时保护和加强天敌的自然控制作用,是实现水稻害虫有效和可持续控制的重要途径。该试验结果表明,锐劲特处理对稻纵卷叶螟有很好的防治效果,对稻飞虱有一定防效,对天敌影响较

小。Bt、Bt + 杀虫双处理对稻纵卷叶螟有较好的防治效果,对天敌安全,有利于保护和加强天敌对害虫的自然控制作用。高效氯氰菊酯对稻纵卷叶螟和稻飞虱只有短期防效,而且大量杀伤天敌,不宜在稻田继续使用。

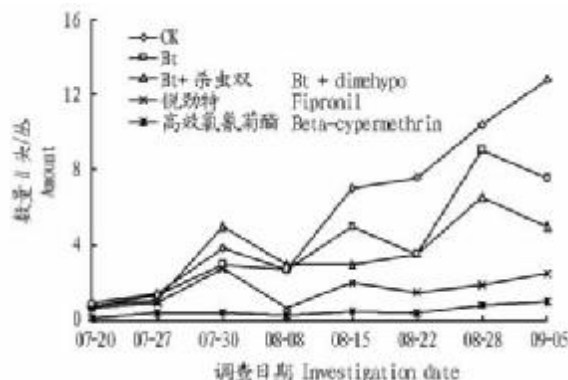


图3 不同处理区稻田天敌的数量动态

Fig.3 Population dynamics of natural enemies in different treatment areas

参考文献

- [1] 陈志兴. 农业科研创新体系的构架及其对策研究[J]. 农业科研经济管理, 2004 (3): 17-18.
- [2] INGER GENETIC CENTER. Standard evaluation system for rice [R]. Manila: IRRI, 1996: 31-33.
- [3] 景德道, 盛生兰, 林添资, 等. 水稻抗螟虫种质资源的特性及育种利用初探[J]. 江苏农业科学, 2005 (4): 18-19.
- [4] 刘向东, 张孝义, 郭慧芳, 等. 稻田蜘蛛群落对稻飞虱的控制功能作用研究[J]. 生态学报, 2001 (1): 100-105.
- [5] 侯婷婷, 霍洁国, 李世奎, 等. 影响稻飞虱迁飞规律的气象环境成因[J]. 自然灾害学报, 2003, 12 (3): 142-148.

(上接第 7457 页)

兔是单胃草食动物,具有利用低能饲料的能力。在消化道进化过程中形成了需要适量粗纤维的生理特点。食物经口腔切、磨碎后形成食糜,经过食道再进入胃部。兔子的胃部很大,形状呈红腰豆形。下接十二指肠。胃部可分为2个部分,包括胃底和幽门。胃底并没有分泌腺,而幽门会分泌胃液、消化酶和黏液。酸碱度为1.5~2.0,即偏酸性。胃部的的主要作用是贮存食糜,引导食糜进入十二指肠和小肠被进一步的消化和吸收。十二指肠内有从胰脏分泌的消化酶和胆汁,这种胰脏分泌的消化酶有助消化碳水化合物、蛋白质和脂肪;而胆汁对维生素和脂肪的吸收很重要。经过十二指肠,食糜会进入小肠,小肠酸碱度为7.2,即偏碱性,可以中和从胃部进入的酸性食糜。易消化的碳水化合物、蛋白质和脂肪被消化吸收后,不易消化的纤维就会直接被推进结肠再进入直肠,即在大肠部位进行消化和吸收。这与试验中大肠内源性纤维素酶活性最高相一致。最后拥有厚细胞壁的植物细胞会进入盲肠,依靠微生物和益生菌把未完全消化的食糜发酵,转化成可以吸收的养分。

对于不同的物种来说,食性、食物来源、生活史特征和能

量消耗水平等因素是影响消化和吸收的重要因素,食高纤维食物的兔子为了满足机体生命及生产活动需要大量的能量,在消化道各部分对纤维素都进行一定程度的消化吸收,这种食物资源的利用模式是对外界环境变化及进化压力下充分利用食物资源的一种良好适应。

参考文献

- [1] 张瑞萍. 纤维素酶的滤纸酶活和 CMC 酶活的测定[J]. 印染助剂, 2002, 19 (5): 45-48.
- [2] 刘国生, 王琳, 李学梅, 等. 纤维素酶 CMC 糖化力测定方法的改进[J]. 饲料研究, 1999 (1): 70-73.
- [3] CHOSE T K. Measurement of cellulose activity[J]. Pure and Appl Chem, 1987, 59 (2): 257.
- [4] 傅力, 丁友方, 张尧. 纤维素酶测定方法的研究[J]. 新疆农业大学学报, 2000, 23 (2): 45-48.
- [5] WATANABE H, TOKUDA G. Animal cellulases[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58 (9): 1167-1178.
- [6] SMANT G, STOKKEMANS J P, YAN Y T, et al. Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (9): 4906-4911.
- [7] WATANABE H, NODA H, TOKUDA G, et al. A cellulase gene of termite origin[J]. Nature, 1998, 394 (6691): 330-331.