

罗 蕾,史玉峰,崔丹丹,等. 4 种含硫化化合物对链霉菌 B221 固体发酵羽毛角蛋白过程的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):310-313.

4 种含硫化化合物对链霉菌 B221 固体发酵羽毛角蛋白过程的影响

罗 蕾,史玉峰,崔丹丹,姜婉婉,王 玲,王睿勇

(南京大学生命科学院,江苏南京 210093)

摘要:利用自行分离得到的链霉菌 B221 固体发酵羽毛角蛋白,设置硫酸钠、亚硫酸钠、硫代硫酸钠和二硫苏糖醇 4 种含硫化化合物添加组,分析发酵后 7 d 的发酵物中角蛋白酶活力、可溶性蛋白含量以及各种含硫化化合物的消长变化规律。结果表明添加的 4 种含硫化化合物对角蛋白酶都具有激活作用,但没有显著增加发酵产物中可溶性蛋白的含量;亚硫酸盐含量、二硫键化合物含量和 S-磺酸半胱氨酸类物质含量之间存在着密切的相关性,B221 固体发酵角蛋白过程中存在着亚硫酸盐解作用;硫代硫酸盐含量、二硫键化合物含量、S-磺酸半胱氨酸类物质含量、巯基化合物含量之间存在着密切的相关性,B221 固体发酵角蛋白过程中存在着另一种降解机制——硫代硫酸盐解作用。

关键词:羽毛角蛋白;降解;含硫化化合物;硫解;亚硫酸盐;硫代硫酸盐

中图分类号: Q935 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0310-04

随着全球家禽养殖业的快速发展,在家禽加工处理过程中产生了大量的羽毛废弃物。据食品与农业政策研究协会(FAPRI)预测:2019 年全世界鸡肉产量预计达到 7 936 万 t,届时将产生近 600 万 t 鸡毛^[1]。这些羽毛中,除了少量用于制备氨基酸、蛋白质饲料以及羽绒制品外,绝大部分都被直接丢弃到环境中,造成了大量的资源浪费,同时造成了严重的环境污染^[2]。

羽毛的主要成分是 β 角蛋白,粗蛋白含量可达 80% 以上,半胱氨酸和胱氨酸含量更是为天然蛋白质饲料之冠。角蛋白化学结构稳定,不溶于水,也不能被胃蛋白酶、胰蛋白酶等水解^[3]。传统处理羽毛角蛋白的方法是利用物理、化学水解法,但存在能耗高、环境污染严重、三废不易处理、某些必需氨基酸破坏严重、生产的羽毛粉消化率低等问题^[4]。因此,利用生物技术途径来解决角蛋白的分解利用近年来越来越受关注。

1963 年,Nickerson 等从弗氏链霉菌中分离到一种酶复合物,并在发酵液中检测到大量巯基化合物,由此推论角蛋白的降解主要是由菌丝表面附着的角蛋白酶直接断裂二硫键进行的,即酶降解途径^[5]。1989 年 Kunert 在真菌石膏样小孢子菌分解角蛋白的试验中,从发酵液中检测到亚硫酸盐、硫酸盐、少量巯基化合物和 S-磺酸半胱氨酸,结合相关试验证据认为该降解过程首先是亚硫酸盐裂解二硫键(即亚硫酸盐分解),然后亚硫酸分解变性的蛋白质进一步被溶液中的蛋白酶降解,亚硫酸盐分解作为微生物降解角蛋白过程中的一种非酶降解机制首次被提出^[6]。Kunert 用弗氏链霉菌降解角蛋

白时,发酵液中未能检测到亚硫酸盐,硫酸盐含量也很低,巯基化合物却大量存在,硫代硫酸根为角蛋白中硫的主要转化形式,由此认为该菌降解角蛋白是由角蛋白酶直接还原二硫键进行的^[6]。2007 年朱晓飞等利用链霉菌 B221 液体发酵进行了羽毛角蛋白降解机制的初探,结果表明硫酸盐是角蛋白降解过程中硫元素的主要转化形式,同时在发酵液中还检测到了亚硫酸盐,其含量变化与角蛋白酶活、降解率、可溶性蛋白、巯基化合物的变化存在很强的相关性,表明亚硫酸盐分解作用在角蛋白降解中可能起到非常关键的作用^[7]。2010 年聂庆霖等利用地衣芽孢杆菌 nju-1411-1 液体发酵羽毛角蛋白,检测到硫元素以硫酸根、亚硫酸根、硫离子、硫代硫酸根、巯基化合物、二硫键化合物、半胱氨酸、胱氨酸以及 S-磺酸半胱氨酸类物质等 9 种形态存在,其中硫酸根、亚硫酸根、硫代硫酸根和 S-磺酸半胱氨酸类物质是主要形态,亚硫酸根和 S-磺酸半胱氨酸类物质出现相互消长的关系,表明亚硫酸盐分解作用的存在^[8]。

本研究利用笔者所在实验室自行筛选的链霉菌 B221,研究角蛋白固体发酵过程中外源添加不同浓度的硫酸钠、亚硫酸钠、硫代硫酸钠和二硫苏糖醇等四种含硫化化合物对链霉菌 B221 角蛋白固体发酵过程的影响,加深对链霉菌 B221 降解角蛋白机制的认识,旨在为生物技术方法开发利用羽毛角蛋白资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

链霉菌 B221,从畜禽场长年堆积羽毛等废弃物的土壤中经过富集培养和分离筛选获得。

基础培养基和发酵培养基^[9]。

1.2 试验方法

1.2.1 羽毛角蛋白的固体发酵 在 250 mL 锥形瓶中装入 34 mL 基础培养基,加入 10 g 羽毛,121 ℃ 灭菌 20 min。冷却后,加入 1 mL 4 种含硫化化合物溶液,使发酵体系中含硫化合

收稿日期:2013-12-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:30571354);江苏省科技支撑计划(编号:BE2008405)。

作者简介:罗 蕾(1987—),女,湖南邵阳人,硕士研究生,从事应用微生物学研究。Tel:(025) 83592685。

通信作者:王睿勇。Tel:(025) 83592685;Email:wangry@nju.edu.cn。

物的浓度分别达到 $1\ \mu\text{mol/mL}$ 、 $10\ \mu\text{mol/mL}$ 、 $20\ \mu\text{mol/mL}$ ，接种 $2\ \text{mL}$ 孢子悬液， $40\ ^\circ\text{C}$ 下培养。添加的含硫化合物经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。以不添加含硫化合物的发酵组作为对照。B221 固体发酵羽毛角蛋白周期一般为 $7\ \text{d}$ ，在研究中于发酵后 $7\ \text{d}$ 取样，进行含硫化合物含量和角蛋白酶活、可溶性蛋白含量测定。

1.2.2 含硫化合物的提取及测定 取 $2\ \text{g}$ 发酵物，加入 $60\ \text{mL}$ 去离子水， $40\ ^\circ\text{C}$ $150\ \text{r/min}$ 振荡 $1\ \text{h}$ ，中速定性滤纸过滤，用滤液测定各种含硫化合物的含量。硫酸根：铬酸钡分光光度法；亚硫酸根：改进的盐酸副玫瑰苯胺法；硫化物：亚甲基蓝分光光度法；巯基化合物：5,5'-二硫代-2-硝基苯甲酸 (DTNB) 光度法；二硫键：NTSB 显色法；硫代硫酸盐：硫酸铜存在下的硫氰酸冷解法；半胱氨酸：酸性茚三酮显色法；胱氨酸：二硫苏糖醇裂解后，再采用酸性茚三酮显色法；S-磺酸半胱氨酸：碱性条件下与氰化钠反应释放出亚硫酸根离子的间接方法^[7,10]。

1.2.3 角蛋白酶活、可溶性蛋白含量测定 测定方法参照文献[11]。

2 结果与分析

2.1 外源添加含硫化合物对固体发酵过程中角蛋白酶活和可溶性蛋白的影响

从图 1 可以看出，硫酸钠添加组和二硫苏糖醇添加组的角蛋白酶活力比其他 2 个添加组的酶活力要高许多。硫酸钠添加组在添加浓度为 $10\ \mu\text{mol/mL}$ 时酶活力最高，为 $36.11\ \text{U/mL}$ ，比不添加组的酶活力增加了 74.76% ；二硫苏糖醇添加组在添加浓度为 $1\ \mu\text{mol/mL}$ 时酶活力最高，为 $28.39\ \text{U/mL}$ ，比不添加组的酶活力增加了 37.34% ；亚硫酸钠添加组的角蛋白酶活力随着添加浓度的增大而提高，但变化幅度不大；硫代硫酸钠添加组的角蛋白酶活力随着添加浓度的增大而有所下降。

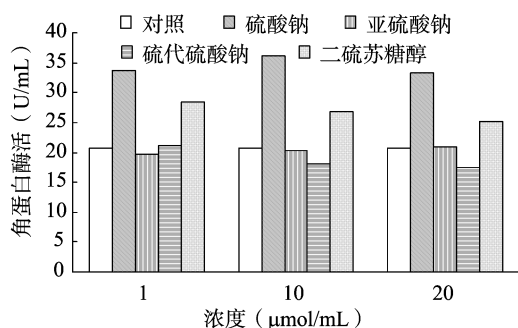


图1 发酵后7 d各发酵组角蛋白酶活性变化

从图 2 可以看出，所有添加组的可溶性蛋白含量均比不添加组降低，其中硫酸钠添加组和亚硫酸钠添加组的可溶性蛋白含量随着添加浓度的增大而减少，在添加浓度为 $20\ \mu\text{mol/mL}$ 时，可溶性蛋白含量分别为不添加组的 62.57% 和 65.16% ；硫代硫酸钠添加组的可溶性蛋白含量随着添加浓度的增大而提高，最高为 $15.5\ \text{mg/mL}$ ，为不添加组的 91.07% ；二硫苏糖醇添加组则随着添加浓度的增大先降后升，但变化幅度不大。

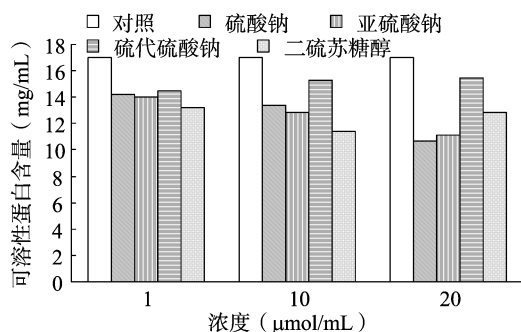


图2 发酵后7 d各发酵组可溶性蛋白含量

2.2 外源添加含硫化合物对固体发酵过程中含硫化合物的影响

从图 3 可以看出，各含硫化合物添加组的亚硫酸盐含量基本上都比不添加组降低，同一含硫化合物不同添加浓度之间相差不大，这可能是由于到了发酵后期，基本上已无羽毛成形结构，亚硫酸盐的生成量与消耗量基本持平，维持在一个稳定水平。硫酸钠添加组在添加浓度为 $20\ \mu\text{mol/mL}$ 时的亚硫酸盐含量比其他 2 个添加浓度的低很多，为什么会产生这样的变化，还需要进一步研究。亚硫酸盐在羽毛角蛋白降解过程中主要起 2 方面的作用，一方面起亚硫酸盐解作用，打开二硫键，破坏羽毛角蛋白结构的稳定性；另一方面被微生物的氧化酶氧化成硫酸盐，为微生物的生长提供快速硫源。

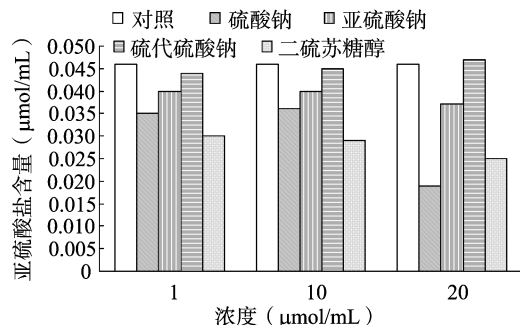


图3 发酵后7 d各发酵组亚硫酸盐含量

从图 4 可以看出，亚硫酸钠和硫代硫酸钠添加组的 S-磺酸半胱氨酸含量随着添加浓度的增大而增加，都比硫酸钠和二硫苏糖醇添加组高很多。亚硫酸钠添加组最高达到了 $0.349\ \mu\text{mol/mL}$ ，这是由于亚硫酸盐解作用将二硫键裂解成了巯基化合物和 S-磺酸半胱氨酸，添加的亚硫酸钠量越多，通过亚硫酸盐解作用产生的 S-磺酸半胱氨酸也就越多。硫代硫酸钠添加组 S-磺酸半胱氨酸含量最高达到了 $0.731\ \mu\text{mol/mL}$ ，这可能是由于存在硫代硫酸盐解作用，使得 S-磺酸半胱氨酸类物质含量增加，反应式为： $\text{R-S-S-R} + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{R-SH} + \text{R-S-SO}_3^{2-} + \text{S}^{2-}$ 。

硫酸钠添加组和二硫苏糖醇添加组的 S-磺酸半胱氨酸含量均比不添加组的低很多，可能是由于二者的添加对角蛋白酶的强烈激活，使得酶解作用成为羽毛角蛋白降解的主要机制，竞争性地消耗了二硫键化合物，因而导致由亚硫酸盐解作用和硫代硫酸盐解作用产生的 S-磺酸半胱氨酸量减少。

从图 5 可以看出，不添加组的二硫键化合物含量为 $0.518\ \mu\text{mol/mL}$ ，4 种含硫化合物添加组的二硫键化合物含量

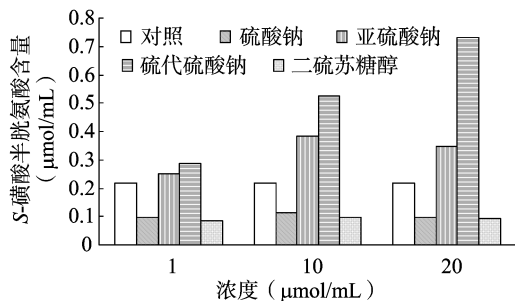


图4 发酵后 7 d 各发酵组 S-磺酸半胱氨酸含量

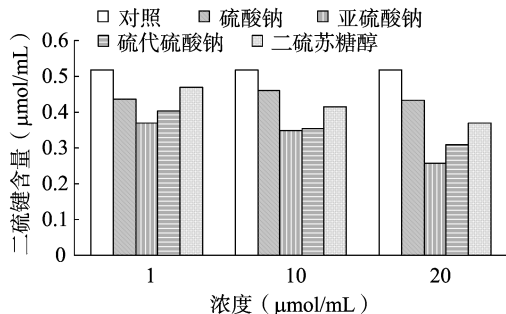


图5 发酵后 7 d 各发酵组二硫键含量

均比不添加组的低。其中亚硫酸钠添加组的二硫键含量最低,且随着添加浓度的增大而降低,这是由于亚硫酸钠与二硫键发生亚硫酸盐解作用,消耗了二硫键所致,这也可以从亚硫酸钠添加组的 S-磺酸半胱氨酸含量很高看出。硫代硫酸钠添加组的二硫键含量也随着添加浓度的增大而降低,推测可能也是由于硫代硫酸钠与二硫键发生反应,消耗了二硫键所致。

从图 6 可以看出,除了亚硫酸钠添加组在添加浓度为 10 $\mu\text{mol/mL}$ 和 20 $\mu\text{mol/mL}$ 时的巯基化合物含量比不添加高外,其他各添加组的巯基化合物含量均比不添加组低,这可能是由于亚硫酸钠添加组添加的亚硫酸钠进行了亚硫酸盐解作用,产生了巯基化合物所致。其他含硫化化合物添加组尤其是硫酸钠添加组和二巯苏糖醇添加组,由于对角蛋白酶的强烈激活作用,使得巯基化合物的消耗加快,因而导致巯基化合物含量比不添加组的低。

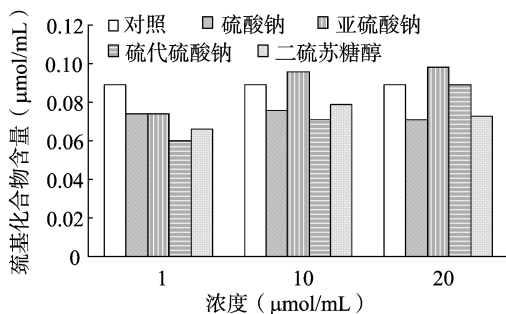


图6 发酵后 7 d 各发酵组巯基化合物含量

从图 7 可以看出,硫酸钠添加组和二巯苏糖醇添加组的半胱氨酸含量均比不添加组低,这可能是由于它们的添加激活了角蛋白酶,导致微生物对半胱氨酸的利用加剧所致。硫代硫酸钠添加组的半胱氨酸含量仍然随着添加浓度的增大而

增加,最高为 0.141 $\mu\text{mol/mL}$,是发酵后 5 d 的 1.58 倍,是不添加组的 2.56 倍。

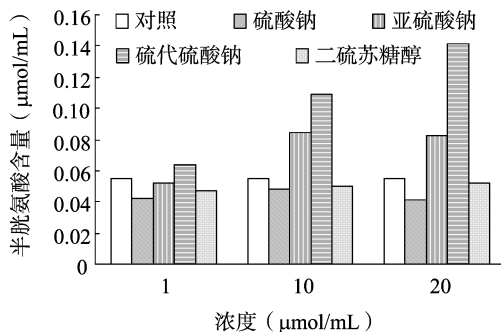


图7 发酵后 7 d 各发酵组半胱氨酸含量

从图 8 可以看出,硫酸钠添加组和亚硫酸钠添加组的胱氨酸含量随着添加浓度的增大而先增后降,其中硫酸钠添加组的胱氨酸含量均比不添加组的低,亚硫酸钠添加组在添加浓度为 1 $\mu\text{mol/mL}$ 和 10 $\mu\text{mol/mL}$ 时的胱氨酸含量比不添加组高,在添加浓度为 10 $\mu\text{mol/mL}$ 时最高。硫代硫酸钠添加组和二巯苏糖醇添加组的胱氨酸含量随着添加浓度的增大而降低。

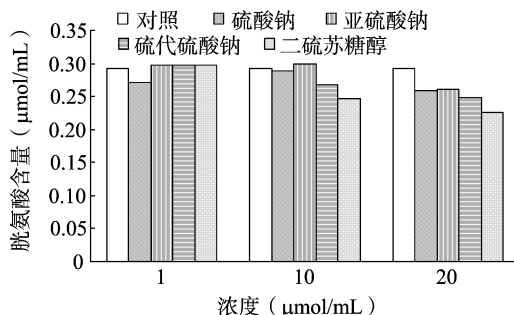


图8 发酵后 7 d 各发酵组胱氨酸含量

从图 9 可以看出,除了硫代硫酸钠添加组 3 个添加浓度和亚硫酸钠添加组在添加浓度为 10 $\mu\text{mol/mL}$ 和 20 $\mu\text{mol/mL}$ 时的硫代硫酸钠含量比不添加组的高外,其他含硫化化合物添加组的硫代硫酸钠含量均比不添加组低。其中亚硫酸钠添加组的硫代硫酸钠含量随着亚硫酸钠添加浓度的增大而增加,在添加浓度为 20 $\mu\text{mol/mL}$ 时的硫代硫酸钠含量最高,为 0.411 $\mu\text{mol/mL}$,推测是由于还原性的亚硫酸钠的存在,降低了硫代硫酸钠的氧化速率。硫代硫酸钠添加组的硫代硫酸钠含量随着添加浓度的增大而增加,在添加浓度为 20 $\mu\text{mol/mL}$ 时的硫代硫酸钠含量最高,为 0.491 $\mu\text{mol/mL}$,推测是由于添加了过量的硫代硫酸钠,超过了利用限度所致。

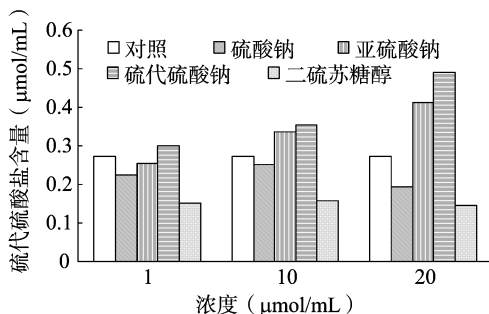


图9 发酵后 7 d 各发酵组硫代硫酸盐含量

从图 10 可以看出,硫酸钠添加组的硫酸盐含量随着添加浓度的增大而增加,在添加 $1\ \mu\text{mol/mL}$ 时,硫酸盐浓度比不添加组的硫酸盐浓度低;而在添加 $10\ \mu\text{mol/10 mL}$ 和 $20\ \mu\text{mol/10 mL}$ 时,硫酸盐浓度均比不添加组的硫酸盐浓度要高。这可能是由于添加较低浓度硫酸钠时,硫酸钠被链霉菌 B221 作为无机硫源而优先利用掉,随着添加浓度的增大,超过了链霉菌 B221 的利用速率,因而残留的硫酸盐浓度也逐渐增大。硫酸盐作为角蛋白中硫元素的最终氧化产物,性质比较稳定,通常情况下,硫酸盐的生成速率应大于利用速率,在发酵产物中是逐步积累的。

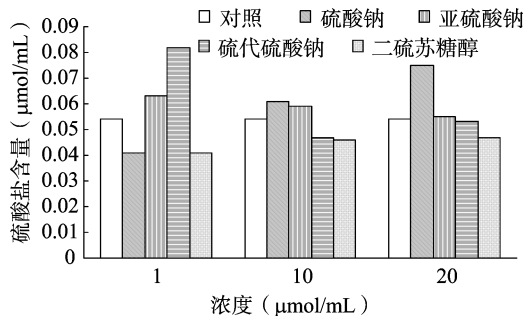


图 10 发酵后 7 d 各发酵组硫酸盐含量

3 结论

到目前为止,已知能分解利用角蛋白的微生物有 30 余种,但针对含硫化物添加对羽毛角蛋白降解过程,特别是固体发酵的影响所进行的研究几乎没有。本研究以笔者所在实验室自行筛选到的链霉菌 B221 为材料,系统研究了羽毛角蛋白固体发酵过程中 4 种外源含硫化物的添加对羽毛角蛋白固体降解过程的影响,发现:(1)添加的 4 种含硫化物对角蛋白酶都具有激活作用,但没有显著增加发酵产物中可溶性蛋白的含量;(2)亚硫酸盐含量、二硫键化合物含量和 S-磺酸半胱氨酸类物质含量之间存在着密切的相关性,再次证明了在 B221 固体发酵角蛋白过程中确实存在着亚硫酸

盐解作用;(3)硫代硫酸盐含量、二硫键化合物含量、S-磺酸半胱氨酸类物质含量、巯基化合物含量之间存在着密切的相关性,表明在 B221 固体发酵角蛋白过程中确实存在着另一种降解机制——硫代硫酸盐解作用。

参考文献:

- [1] 贺军,姜东风. 全球肉鸡产业步入十年增长期[J]. 中国畜牧杂志,2010,46(14):62-63.
- [2] Divakala K C, Chiba L I, Kamalakar R B, et al. Amino acid supplementation of hydrolyzed feather meal diets for finisher pigs[J]. Journal of Animal Science, 2009, 87(4):1270-1281.
- [3] Anbu P, Hilda A. Purification of keratinase from poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity[J]. Enzyme and Microbiological Technology, 2005, 36:639-647.
- [4] Marshall R C, Orwin D F, Gillespie J M. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin[J]. Electron Microscopy Reviews, 1991, 4(1):47-83.
- [5] Nickerson W J. Keratinase[J]. Biochem Biophys Acta, 1963, 77:87-99.
- [6] Kunert J. Biochemical mechanisms of keratin degradation by actinomycete *Streptomyces fradiae* and fungus *Microsporium gypseum*, a comparison[J]. Journal of Basic Microbiology, 1989, 27:597-604.
- [7] 朱晓飞,张玲,赵平芝,等. 链霉菌 B221 的角蛋白降解机制初探[J]. 中国农学通报, 2007, 23(6):18-22.
- [8] 聂庆霖,史玉峰,王玲,等. 地衣芽孢杆菌 nju-1411-1 降解羽毛角蛋白过程中含硫化物的变化[J]. 江苏农业科学, 2010(4):258-261.
- [9] 董荣斌,张玲,朱晓飞,等. 耐热链霉菌 B221 降解羽毛角蛋白的固体发酵条件研究[J]. 江苏农业科学, 2007(6):249-251.
- [10] 魏复盛, 国家环境保护总局,水和废水监测分析方法委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京:中国环境科学出版社, 2002.
- [11] 朱小飞. 微生物降解角蛋白的机制研究——含硫化物的转化及其作用[D]. 南京:南京大学, 2007.

欢迎订阅 2014 年《杂草科学》

《杂草科学》创刊于 1983 年,是国内唯一的有关杂草研究与防除的技术类期刊,是中国科技核心期刊、江苏省一级期刊。主要报道国内外杂草科学研究的最新动态、国内主要研究成果、农田果园等杂草防除技术、化学除草剂新品种及其使用技术等。辟有论坛与综述、研究报告、调查研究简报、除草技术应用与推广、信息荟萃等栏目。

《杂草科学》为季刊,大 16 开,72 页,每期定价 10.00 元,全年 40.00 元。中国标准连续出版物号:CN32-1217/S; ISSN1003-935X。邮发代号:28-147,全国各地邮局均可订阅。错过订阅时间者可以直接汇款至本刊编辑部订阅。

地址:南京市孝陵卫钟灵街 50 号《杂草科学》编辑部

邮编:210014

电话:025-84390048 E-mail:zckx@jaas.ac.cn

网址:http://zckx.jaas.ac.cn