

利用纤维素酶酶解粗饲料的研究

第五报：不同农副产品天然纤维素酶解、 还原糖组分及生产饲料蛋白试验

任守让 赵贵彬 王瑞霞

(吉林省农业科学院土肥所)

提 要

利用木霉菌株323.6的纤维素酶水解五种副产品的天然纤维素得糖效果的顺序是：稻草>玉米秸>玉米芯>高粱穗轴>小麦秸，得糖率分别为20、18.4、11.8、10.8及5.6%。玉米秸酶解产物中的还原糖，用纸层析法测定，其组分为葡萄糖、阿拉伯糖、木糖和纤维二糖。玉米秸酶水解液添加一定量的氮源和磷酸盐可培养白地霉，培养24小时可得干菌体1.023克/100毫升，可为农村动物饲养提供单细胞蛋白饲料。

前已报道^[1,2]，木霉323.6是纤维素酶活性较强的野生型菌株。本研究的目的是：
(1) 检定323.6菌株对不同副产品的天然纤维素酶水解得糖效果；(2) 检定玉米秸酶水解产物中还原糖的组分；(3) 探讨玉米秸酶水解产物生产单细胞蛋白的可能性。

材 料 与 方 法

菌株：木霉323.6。保存于马铃薯葡萄糖琼脂斜面。

制曲：以玉米秸粉和麦麸(1:1重量)为制曲原料，加水三倍，于三角瓶中高压灭菌后接种马铃薯琼脂斜面培养的木霉孢子，28℃培养4天成曲后于50℃下迅速烘干备用。

酶解：取底物和纤曲各1克，置于三角瓶中，加入醋酸—醋酸钠缓冲液(pH4.8)20毫升，蒸馏水20毫升，并加防腐剂(0.1%十二烷基硫酸钠和0.01%土霉素)，40℃保温酶解48小时，过滤得酶解液，供还原糖测定或培养微生物之用。

测糖：采用DNS法，设灭活酶为对照。

还原糖组分测定：采用纸层析技术^[3,4]。

滤纸—东洋滤纸No50，2×25厘米。

展开剂—n.丁醇：乙酸：水=4：1：5(v/v)

显色剂—苯胺—二苯胺。

标准糖溶液—以分析纯级葡萄糖、木糖、阿拉伯糖及纤维二糖分别配制成浓度为100毫克/100毫升的水溶液。加防腐剂硫柳汞10毫克。

脱蛋白—加苦味酸(Picric acid)微量。滤纸的水蒸汽饱和(16小时)和糖的展开(上行，10小时)在层析器(日本产C号器)内进行。显色在95℃恒温箱中保持5分钟；

Rf值用伸缩尺直接测量。

结果与讨论

一、几种农副产品天然纤维素酶解得糖率

选用北方农村普遍分布的玉米秸、玉米芯、高粱穗轴、稻草及小麦秆等五种副产物的粉体为底物。酶解得糖率列于表1。

表1 几种农副产品酶解得糖率

底物	酶解			得糖*	
	pH	温度(°C)	时间(小时)	毫克/毫升	%
玉米秸	4.8	40	48	9.2	18.4
玉米芯	4.8	40	48	5.9	11.8
稻草	4.8	40	48	10.0	20.0
小麦秆	4.8	40	48	2.8	5.6
高粱穗轴	4.8	40	48	5.4	10.8

* 三次重复平均值。

从表1资料可见,木霉323.6纤维素酶曲酶解几种农副产品皆可获得一定的还原糖,但不同材料得糖率不同。在本试验条件下,得糖最高的是稻草(20%),而小麦秆最低(5.6%)。五种底物的酶解得糖效果顺序为稻草>玉米秸>玉米芯>高粱穗轴>小麦秆。多数研究者提出,含碳水化合物的降解速率与木质素含量有关,本研究出现的不同底物酶解得糖效果不同,

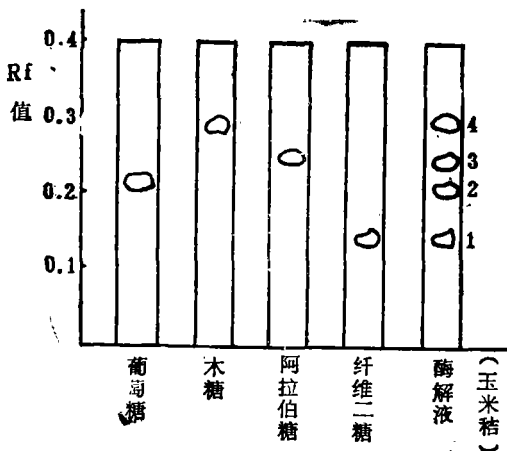
是否因木质素含量多少有关,有待进一步研究证实。

二、玉米秸天然纤维酶水解产物中的还原糖组分

木霉323.6产生的纤维素酶水解玉米秸粉可获得一定水平的还原糖,但酶解液中还原糖组分尚不清楚。经用纸层析技术分离测定,其酶解液中含有葡萄糖、阿拉伯糖、木糖和纤维二糖等(见图1)。与Surinder等⁽⁶⁾(1977)研究结果一致。

三、玉米秸酶水解液对某些微生物的生长效应

异养微生物的生长,需要有适当有机碳素营养。通常微生物的碳素营养多为单糖或双糖,既然纤维素被酶水解可还原为几种单糖和双糖,那么玉米秸酶解液中的还原糖可为某些微生物提供碳素营养源,从而培养富集蛋白的微生物,以生产单细胞蛋白。Surinder等(1977)用纤维素酶水解蔗渣液培养啤酒酵母、白地霉、根瘤菌等七种微生物,其中根瘤菌和醋酸菌在酶水解液中的生长优于合成培养基;中国科学院微生物所报道了利用糖醛渣纤维素酶水解液培养酵母的研究⁽⁶⁾。我们利用木霉323.6纤维酶解玉米秸液培养六种微生物,其中白地霉生长良好,其他未见生长(表2)。



Rf: 纤维二糖 0.14, 点1、0.14
 葡萄糖 0.21, 点2、0.21
 阿拉伯糖 0.25, 点3、0.25
 木糖 0.29, 点4、0.29

图1 玉米秸粉酶解液中还原糖组分层析图

表 2 玉米秸酶水解液对某些微生物的生长效应

微生物	固氮菌	根瘤菌	磷细菌	五四〇六	白僵菌	白地霉
培养时间(天)	7	7	7	7	7	7
生长	-	-	-	-	-	+

生长, 含糖量测定, 其浓度仅为0.88%, 不可能因糖浓度过高而对白地霉产生生长抑制作用。据国外研究报道⁽⁷⁾⁽⁸⁾, 绿色木霉产生毒素(Trichodermin, Viridin, Gliotoxin)对某些微生物具有抗菌作用, EA3-867菌株的产酶力高, 是否其抗菌作用亦强, 因而致使某些微生物如白地霉在其酶解液中不能生长, 尚待证实。

表 3 白地霉不同菌株及酵母的菌体得率

菌株	白地霉					酵母3637
	2035	2361	2488	奇1	田村	
菌体干重* (克/100毫升)	0.67	0.67	0.70	0.80	0.73	0.48

*70小时培养, 三次重复平均值。

同时以拟康氏木霉菌株EA3-867制成的纤曲酶解玉米秸粉液培养该六种微生物, 包括白地霉在内的所有供试微生物皆未见生长。考虑到EA3-867是一高酶活菌株, 可能由于糖浓度较高抑制了白地霉的生长, 但经一倍水稀释后培养仅见痕迹

在上述试验基础上, 进一步观察了白地霉不同菌株及酵母的菌体得率(表3)。

从试验资料可以看到, 用玉米秸酶解液培养的白地霉菌体得率较酵母为高, 白地霉不同菌株间得率亦有差异, 其中以菌株奇1的菌体得率为高(0.8克/100毫升/70小时)。

为明确培养时间与菌体得率的关系, 以白地霉奇1为试验菌株, 试验结果表明(图2)白地霉菌株奇1在玉米秸粉酶解液中, 28℃培养24小时菌体得率即达最高水平(1.023克/100毫升), 继续培养菌体得率虽有所增加, 但不明显, 收益不大。我们初步认为24小时为经济采收时间。

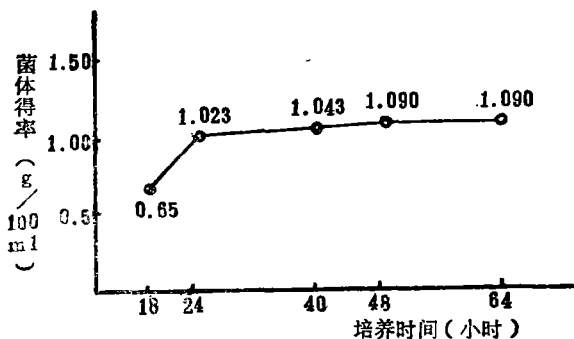


图 2 不同培养时间白地霉(奇)1菌体得率动态

参 考 文 献

(1) 任守让等: 1979. 利用纤维素酶解粗饲料的研究(第1报)吉林农业科学, 第1期, 65~71。
 (2) 任守让等: 1979. 同上(第2报)同上第2期 61~67。
 (3) 中国科学院微生物研究所等: 1977. 纤维素酶水解糖醛渣生产酵母 I 微生物学报17(3): 231-238
 (4) 四川农学院: 1978. 木霉培养物中的毒素. 科技资料4: 57-65(内部资料)。
 (5) 中国科学院微生物研究所: 1973. 常见与常用真菌. 317页, 科学出版社, 北京。
 (6) Surinder DHowan et al 1977 Enzymic hydrolysis of Common cellulosic wastes by Cellalase. J. Gen. Appl. Microbiol. 23(4). 155-161。
 (7) Smith, Ivar et al 1976 Chromatographic and Elecrophoretic techniques Vol. I Paper and thin Layer chromatography pp.465 Williomn Heinemann Med. Books Ltd.
 (8) 桑田 智: クロマトグラフィー, 230页, 广川书店, 东京。