

利用纤维素酶酶解粗饲料的研究

第一报 纤维素酶菌种分离筛选

任守让 赵贵彬 张树人 王瑞霞

(吉林省农业科学院土肥所)

纤维素是地球上最多的一种有机物,它是由葡萄糖以 β -1,4连接起来的高分子聚合物。纤维素十分稳定,但微生物产生的纤维素酶对它的水解要比酸水解有效得多,纤维素经纤维素酶水解后可生成葡萄糖和纤维二糖。我国农村产品及其它植物性纤维素物资资源丰富,据统计仅稻草、麦秆、稻壳、棉子壳、玉米芯等五项年产就达8000亿斤(1971年全国纤维素酶座谈会资料),此类农副产品含有大量粗纤维,但很少能被非反刍动物(如猪)消化吸收。因而,研究如何通过纤维素酶的水解作用,使其转化为被猪所能消化吸收的物质,促进养猪生产的发展,具有重大意义。

近一、二十年来,由于工农业生产发展的需要,对于纤维素分解微生物及纤维素酶的理论和应用各方面的研究,国际上已引起重视,并获得了较大进展,提出了纤维素酶作用机理方面的一些理论,应用诱变育种,改善培养条件和加诱导剂等方法,提高了酶的活性。利用高活性菌株,结合予处理酶解底物,可获得较高的糖化率。美国、日本、西德、法国已生产纤维素酶剂,英国、加拿大也在进行纤维素酶理论方面的研究。

近年来,我国有关单位相继开展了纤维素分解微生物及其酶的研究工作,在利用微生物提高粗饲料营养价值方面作了大量工作,在菌种选育,制曲工艺,酶解条件,喂猪等方面都取得了一些进展。

目前,存在的主要问题是:纤维素酶菌种的酶活性不高,又缺乏破坏纤维素分子结构经济有效的处理方法。因之,酶解粗料得糖率低,在生产条件下保糟困难。在农村条件下,广泛应用于养猪生产,还有许多技术关键问题没有突破。

我们于1972~1973年进行了纤维素菌种的分离筛选工作。现将这两年的工作总结报告于后。

材 料 与 方 法

一、菌种分离

1、分离样品。分离样品主要采自我省长白山山脉的原始森林和次生林区的枯枝落叶层、腐木、林地土壤以及我省西部草原的土壤和草层。此外,也采集了耕地土壤、麻厂腐麻、堆肥、牛瘤胃内容物、牛羊粪等总计287份样品(表1)。

表1

菌种分离样品统计

样品种类	数量	采集地
森林枯枝落叶	111	松江河、大石头、通化
森林腐木	17	" " "
森林土壤	17	" " "
草原土壤	37	乌兰毛都、查金台、高林屯、大洼
草原草层	13	" " " "
耕地土壤	25	公主岭
堆肥	25	"
腐麻	5	桦皮厂亚麻厂
牛瘤胃内容物	12	公主岭肉联厂
禽畜粪	11	公主岭
其它*	23	"
总计	287	

* 污水、腐烂玉米秸等

2、分离方法〔1〕

分离所用的培养基。

(1) 纤维素粉琼脂培养基: 纤维素粉20克, 硫酸铵1.4克, 磷酸二氢钾2克, 硫酸镁0.3克, 硫酸铁5毫克, 硫酸锰1.6毫克, 氯化锌1.7毫克, 氯化钴2.0毫克, 琼脂20克, 水1000毫升, pH5.0。

(2) 改良伊氏培养基: 〔3〕纤维素粉15克, 硫酸铵2.5克, 磷酸氢二钾1克, 硫酸镁0.3克, 氯化钠0.1克, 氯化钙0.1克, 琼脂15克, 水1000毫升, pH7.0~7.2。

〔注〕加富培养, 以滤纸条代替纤维素粉并去掉琼脂。

(3) 马铃薯汁葡萄糖琼脂培养基: 马铃薯200克, 葡萄糖10克, 琼脂15克, 水1000毫升, pH6.0。

先以培养基(1)及(2)进行加富培养。即取分离样品约1克, 投入装有滤纸条(0.6~0.7×10厘米)的培养液试管中, 26~28°C定温培养后, 选取滤纸条断裂的试管培养, 再用培养基(1)及(2)进行平板分离。挑选不同类型的菌落移植于马铃薯汁葡萄糖琼脂斜面上, 再以(1)、(2)培养基反复进行纯化, 获得纯培养。

二、菌种筛选〔1〕〔2〕

筛选分初筛和复筛两步, 方法如下:

(1) 初筛。以滤纸为反应底物, 用目测方法观察滤纸条的断裂速度。即将纯化之菌株在马铃薯汁葡萄糖琼脂斜面上培养4天后, 再移植到如前述加富培养用的液体培养基试管中, 26~28°C 静止培养, 选留7天内滤纸条断裂的试管培养, 投入复筛。

2、复筛。以CMC—Na及滤纸为反应底物。采用DNS法及滤纸崩溃法测定各菌株的纤维素酶解活性。

CMC酶活的测定。采用麦麸曲培养法提取酶液。制曲原料为麸皮, 制曲时于125毫升三角瓶内加麸皮1克和自来水10毫升, 15磅30分钟灭菌后, 接种真菌孢子, 28~30°C 培养4天, 取出加蒸馏水10毫升, 搅拌, 于30°C 下浸提30分钟, 过滤得粗酶液。取适当稀释的酶液0.5毫升(我们取稀释100倍的酶液), 0.5% CMC—Na 1毫升, pH4.5醋酸缓冲液0.5毫升, 于50°C 恒温水浴中保温酶解15分钟, 加3.5—二硝基水杨酸显色剂3毫升, 煮沸显色(6分钟), 冷后用72型分光光度计比色(530毫微米), 并以灭活酶液(用DNS显色剂直接杀酶)在相同条件下作空白测定以校正酶活数字。CMC酶活以“毫克(糖)/毫升、小时”表示。

滤纸酶活的测定, 用滤纸崩溃法。制曲方法同前, 取稀释10倍的酶液5毫升和pH4.5醋酸缓冲液2毫升, 加于50毫升三角瓶中, 再加二甲苯两滴防腐, 投入华特曼1号滤纸片一枚(1×1厘米), 在40°C 恒温室中, 于康氏振荡机上振荡6小时(振幅7厘米、频率240次/分)。每隔30分钟检查一次滤纸崩溃情况, 滤纸崩溃以“+”表示, 分为五级, 即+++++为全崩、++++为接近全崩, +++为崩一半、++为三分之一崩溃、+为稍见崩溃。

三、菌种分类〔4〕〔5〕

菌落特征的观察用马铃薯葡萄糖琼脂培养基, 采用表面点植方法(三点培养法), 28°C 培养3—4天观察。形态特征的观察采用“整体观察法”。即将平板培养去皿盖置显微镜下, 用低倍镜(×80或×400)直接观察菌落边缘部分的菌丝及生孢子器官。

四、毒性试验

取一月令小白鼠为试验对象。以烘炒的玉米面(80%)与大豆粉(20%)及少量食盐配成饲料, 每只小白鼠日给食量平均为6克, 分两次喂饲, 自由饮水。试验分三组, 即(I)对照组、(II)EA3—867酶液组、(III)3236酶液组。每组试验动物6—7只。试验组于饲料中加入等量的粗酶液, 对照组拌入制曲培养基的浸液。试验期观察精神状态, 食欲情况, 排粪等表现。试验结束时测定了体重, 并每组随机取样三只进行剖检。

结 果

一、菌种分离与筛选

采用上述方法, 由287份样品中分离出各类微生物1591株(包括真菌、放线菌、细菌), 考虑到真菌的纤维素酶较易提取, 我们则以真菌为对象进行筛选。经初筛选出各类霉菌154株, 再投入复筛, 结果见表2、3。

表 2

复筛菌株的 CMC 酶活性

酶活 (毫克(糖)/毫升、小时)	菌 株 数	菌 株 %
200以下	197	69.5
200~250	20	13.0
250~300	16	10.4
300~350	7	4.5
350以上	4	2.6

表 3

复筛菌株的滤纸酶活性

滤 纸 崩 溃	菌 株 数	菌 株 %
6 小时未全崩	123	79.7
6 ~ 4 小时内全崩	20	13.0
3.5 ~ 2 小时全崩	9	5.8
1.5 小时内全崩	3	1.3

根据表 2 及表 3 所列 CMC 酶活及滤纸酶活测定结果, 我们暂定以 CMC 酶活在 350 毫克(糖)/毫升、小时以上, 滤纸酶活在 3 小时内全崩为标准, 选出较高酶活的菌株共 12 株, 见表 4。

表 4

纤维素酶活较高的菌株

菌 株	CMC 酶活 (毫克(糖)毫升、小时)	滤 纸 酶 活 (小时/全崩)	类 属
392.2	378	4.5 (++++)	曲 霉 属
395.2	368	2.0 (++++)	青 霉 属
3124.5	383	6.0 (+++)	"
3133.4	390	6.6 (++++)	"
390.1	295	2.5 (++++)	曲 霉 属
250.2	76	3.0 (++++)	青 霉 属
323.6	220	1.5 (++++)	木 霉 属
324.1	138	3.0 (++++)	"
327.2	135	3.0 (++++)	"
343.3	173	1.5 (++++)	"
383.1	300	3.0 (++++)	"
383.2	—	3.0 (++++)	"

从表4看到, 我们所分离筛选的纤维素酶菌种, CMC酶活最高的菌株为3133.4(青霉属), 其酶活是390毫克(糖)/毫升、小时; 滤纸酶活最强的是323.6和343.3两个菌株(木霉属), 在1.5小时内使滤纸全部崩溃。两种酶活都高的菌株只有395.2一株(青霉属), 其CMC酶活为368毫克(糖)/毫升、小时, 滤纸在2小时内完全崩溃。

从这一测定结果看出, 各被测菌株的CMC酶活与滤纸酶活强弱并非平行关系。这与微生物的种类有关, 木霉的滤纸酶活较高, 而青霉的CMC酶活较高, 各有其特点。

为了评定我们所分离筛选菌种的酶活水平, 收集并测定了一批目前国内生产和科研上应用的纤维酶菌种的酶活, 结果列于表5。

表5 国内某些纤维素酶菌种的CMC酶活性

菌 株	酶活(毫克(糖) /毫升、小时)	来 源
G I	81	天津市工微所
1323	136	西北水保所
119	670	"
龙轻52	140	黑龙江轻工所
E A 3—867	690	上海植生所
木3	100	上海农科院
3,2192	74	北京微生物所
3,2774	100	"
3,3032	135	"
456—2	88	沈阳林土所
糖研35	275	广州糖研所
3,2879	305	济南轻工所
161	73	济南前进厂

从上表所列测定结果看到, 在13株被测菌株中, CMC酶活在200毫克(糖)/毫升、小时以下的9株, 200毫克(糖)/毫升、小时以上的4株, 300毫克(糖)/毫升、小时以上的3株。其中以上海植生所诱变选育的E A 3—867酶活最高为690毫克(糖)/毫升、小时, 其次为西北水保所的黑曲霉119(670毫克(糖)/毫升、小时), 除此二菌株之外, 其余菌株与我们所筛选之菌株比较, 酶活水平大致相仿。

二、分离菌株的微生物学分类

根据我们对部分菌株的菌落特征和形态特征观察结果, 初步确定被观察菌株在分类学上的位置大部属于木霉属与青霉属, 各占被鉴定菌株数的39.7%和31.5%, 该二属共计71.2%(见表6)。

从表4亦可看出, 我们所筛选的纤维素酶活较高的12个菌株亦多属于木霉属(6株)和青霉属(4株), 少数为曲霉(2株)。目前国内外常用的纤维素酶产生菌种主要为绿色木霉(*Trichoderma auride*), 其次有变异青霉(*Penicillium Variable*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

表 6

部分菌种的分类

类 属	菌 株 数	菌 株 %
总 数	73	100.0
木 霉 属	29	39.7
青 霉 属	23	31.5
曲 霉 属	8	11.4
交链孢霉属	1	1.1
未 定	11	15.1

三、两株木霉的毒性观察

用小白鼠试验观察了两株木霉的毒性，结果见表 7。

表 7

两株木霉的毒性试验结果

处 理	体 重 (克/只)		血 液 检 查		内 脏 重 量 (克/3只)				
	饲 喂 35 天	饲 喂 72 天	白 血 球 数 (个/毫升)	红 血 球 数 (个/毫升)	心	肝	肺	脾	肾
对 照 组	39.9	36.4	6400~7950	454~567	0.7	4.0	0.8	0.4	1.2
EA3—867组	35.0	37.0	5950~6350	520~606	0.5	4.7	0.7	0.4	1.2
323.6组	32.5	32.5	5200~6650	545~612	0.7	4.7	0.9	0.5	1.4

注：小白鼠剖检承本院畜牧所兽医组同志协助。

根据试验期的观察和试验终了的剖检，EA3—867和323.6两株木霉对小白鼠未表现出不良影响，精神状态、食欲情况及排粪均表现正常。血检指标及内脏器经肉眼观察无特殊现象，均属正常。唯323.6酶液组的肝、肺、脾、肾等脏器较对照组为重。在观察期间各组均出现雌鼠产仔现象，可见对小白鼠雌雄交配与生育无不良影响。

摘 要

两年来，由287份样品分离获得纤维素酶菌种1591株，筛出纤维素酶活较高的12个。CMC酶活在350毫克(糖)/毫升、小时以上的4株，最高为390毫克(糖)/毫升、小

时, (青霉3133.4), 滤纸酶活在3小时内滤纸全崩的9株, 最快为1.5小时(木霉323.6及343.3)。酶活较高的菌株, 在微生物学分类上主要属于木霉属与青霉属。木霉EA3—867和323.6两菌株的纤维素酶液对小白鼠未发现毒性反应。

参 考 文 献

[1] 中国科学院微生物研究所纤维素酶组: 纤维素酶及有关酶的菌种筛选方法和酶活测定法(内部资料)1972。

[2] 林业土壤研究所纤维素酶组: 纤维素酶的CMC活性测定方法, 应用微生物, 18~23, 3, 1972。

[3] Имшенецкий, А. А. Микробиология Целлюлозы, Изд-во . АН СС СР, 1953。

[4] 斯密士·G著 徐浩译: 工业真菌学纲要, 科学出版社, 1964。

[5] Barnett, H. L. Illustrated Genera Imperfect Of fungi 1955。