

利用纤维素酶酶解粗饲料的研究

第二报：纤维素酶曲制备、粗酶液抽提 及酶解条件的研究

任守让 赵贵彬 王瑞霞

(吉林省农业科学院土壤肥料研究所)

在前报〔1〕分离筛选菌种的基础上，以木霉323.6菌株为主要对象研究了制曲、粗酶液抽提及其对玉米秸粉酶解的适宜条件，同时对提高酶解得糖率的途径进行了初步探讨。兹将初步研究结果报告于后。

纤维素酶曲的制备及粗酶液的抽提

1、纤维素酶曲制备试验

选用EA₃-867及323.6、390.1(本组分离筛选)三株菌进行了有关纤曲制备及粗酶液浸提条件的试验。培养四天，测滤纸糖。初步结果表明以玉米秸粉(<2毫米)为基础的曲料添加20%麦麸制备的纤曲其酶活较纯玉米秸粉为高，但与添加0.5%硫铵比较除323.6菌株略高外，其它二株低于硫铵处理，见表1。

表1、不同配料纤维素酶曲的酶活性

曲料	滤纸糖(毫克/毫升)*		
	EA ₃ -867	323.6	390.1
玉米秸粉	1.708	0.783	0.716
玉米秸粉+麦麸(4:1)	1.961	0.975	0.900
玉米秸粉+硫铵(0.5%)	2.125	0.935	1.033

*还原糖测定采用DNS法。三次平均值。

以EA₃-867、323.6二菌株用麸皮玉米秸粉为曲料进行培养时间试验，从试验数据看，323.6滤纸得糖量以三天为高。EA₃-867以四天为高，见表2。

表 2、 不同培养时间纤曲的酶活性

培养时间 (天)	滤 纸 糖 (毫克/毫升)*	
	EA ₃ -867	323.6
2	1.616	0.965
3	1.633	1.625
4	1.961	0.975
5	1.758	0.925

* 三次平均值。

表 3、 纤曲粗酶液浸提不同用水量的酶活性

用水量(倍)	滤 纸 糖 (毫克/毫升)*	
	EA ₃ -867	323.6
3	13.60	5.45
5	19.24	6.02
10	21.98	10.22
20	22.98	13.16
30	21.78	11.80

* 三次平均值。

表 4、 不同浸提温度与时间对纤维素酶曲活性的影响*

菌 种	浸 提 时 间 (分)	浸 提 温 度 (°C)											
		23~25				30				40			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
EA ₃ -867	30	3.70	4.55	4.55	4.40	3.80	4.55	3.90	4.20	3.20	2.60	3.95	4.35
	60	3.45	—	0.41	3.95	3.60	3.03	3.85	4.90	3.50	4.25	2.95	3.30
	90	4.05	6.51	4.23	4.65	3.89	4.55	3.86	3.45	3.89	3.95	4.25	3.95
323.6	30	1.95	4.95	2.15	1.90	1.75	2.60	0.90	1.50	1.90	1.15	1.95	1.00
	60	1.90	—	1.75	1.85	1.75	2.70	1.09	2.10	2.00	2.10	0.95	1.60
	90	2.30	1.75	1.85	2.10	1.80	1.50	2.70	2.95	1.35	1.35	1.75	1.80

* 纤维素酶活性、系滤纸糖。单位：毫克/毫升。

2、粗酶液制备试验

(1)、浸提用水量试验：用EA₃-867和323.6两株培养于添加20%麸皮的玉米粘粉曲中，28±1°C培养4天后分别加3、5、10、20及30倍于曲料重量的水，搅拌后置于40°C下浸提30分钟，过滤得粗酶液，采用DNS法测定滤纸糖，初步结果见表3。

(2)、浸提温度与时间试验：以同试验(1)的固体曲进行了浸提温度与时间对纤维素酶活性影响的试验。从四次试验所得数据(表4)来看，各次试验高酶活出现的浸提温度，EA₃-867在23~25°C，323.6在23~25°C和30°C条件下，总的来看两株菌高酶活的浸提温度是在30°C以内。关于浸提时间在本试验中表现不规律，有待进一步试验。

纤维素酶对玉米秸粉的酶解条件〔2〕

方法：以玉米秸粉（<1毫米）为底物，其浓度为10%，用酶量100%（由粗酶液体积换算值），酶解液反应为pH5.0，加醋酸缓冲液与苯甲酸钠（0.2%），在40°C下静置酶解48小时后，用DNS法测定还原糖。

1、温度与时间试验：在温度为30°C及40°C和时间为12、24及48小时条件下进行酶解试验，结果见表5。

表5、 温度与时间对纤维素酶酶解玉米秸粉得糖影响*

时间 温度(°C)	菌种		EA ₃ -867			323.6		
	(小时)		12	24	48	12	24	48
30			1.58	0.80	2.40	1.39	1.28	1.80
40			3.10	2.90	4.14	2.68	2.10	2.62

*表内数字系得糖率（二次平均值）。

由上表看出，在上述试验温度与时间范围内，两菌株的得糖率，在40°C时高于30°C，在时间上以48小时为高。

2、PH试验：进行了pH4.0、5.0、6.0及7.0的酶解试验，结果（表6）表明：菌株EA₃-867制备的粗酶液酶解玉米秸粉在pH5.0时得糖率最高（7.5%），pH4.0得糖率（6.3%）稍低于pH5.0，当pH6.0及7.0时得糖率显著降低。而菌株323.6的试验数据不规律，有待进一步试验确定。

表6、 不同PH对酶解得糖效果的影响

pH	得糖率 (%)	
	EA ₃ -867	323.6
4.0	6.3	5.7
5.0	7.5	4.2
6.0	2.4	5.7
7.0	0.9	0

3、原料细度试验：取<1毫米、<2毫米及<3毫米三种不同细度的玉米秸粉进行了酶解试验。结果（表7）表明：菌种323.6的酶液酶解玉米秸粉时，原料越细得糖率越高。但菌株EA₃-867的酶液则得相反结果，有待进一步试验。

表7、 原料不同细度对酶解得糖效果的影响

粗细度*	得糖率 (%)	
	EA ₃ -867	323.6
<1毫米	2.78	6.45
<2毫米	4.05	2.90
<3毫米	4.43	2.70

*原料经机械粉碎后，全部通过相应筛孔。

4、原料碱处理试验：以0.5%、1%及3%三种不同浓度的石灰乳分别处理玉米秸粉后（时间24小时，温度10°C±），进行了酶解试验。结果见表8。

表 8、

原料碱处理对得糖效果的影响

处理与碱浓度 (%)	EA ₃ -867		323.6	
	得糖率 (%)	与对照比	得糖率 (%)	与对照比
0 (对照)*	4.40	100	2.30	100
0.5	—	—	4.10	182.6
1.0	6.30	140.6	4.64	202.2
3.0	6.34	144.1	6.44	279.1

* 用清水浸泡。

从上表结果表明, 原料经碱处理后, 提高了底物对纤维素酶的敏感度, 从而也提高了酶解得糖效果。菌株EA₃-867与未经碱处理的比较, 提高了40.6~44.1%, 菌株323.6提高了82.6~179.1%。试验结果也表明, 得糖率提高的程度随碱浓度增加而增加, 以菌株323.6酶解为例, 经0.5%、1%及3%不同浓度的石灰乳分别处理玉米秸粉后, 得糖率比对照分别提高82.6%、101.2%、179.1%。

为了便于农村条件下应用, 就地取材, 在上述试验的基础上, 研究了草木灰及碱土等碱性物质的浸液对酶解底物的予处理, 结果列于表9。

表 9、

几种不同碱性物质予处理底物得糖效果

处 理	得 糖 *			比 较
	毫克/毫升	毫克/克底物	%	
水 浸	1.90	76.0	7.6	100
草木灰水浸(1:4)	3.11	125.0	12.5	144.4
碱土水浸(1:1)	2.22	89.0	8.9	117.1

* 四次平均值。

试验结果表明, 用几种不同的碱性物质对底物进行予处理均可提高酶糖效果, 草木灰浸液可提高44.4%, 碱土浸液可提高17.1%。

5、防腐剂效应试验: 采用固体曲与粗酶液两种类型的酶剂, 进行了苯甲酸钠(NaC₇H₅O₂)防腐对酶解得糖效果的试验。从结果(表10)可以看到, 不论固体曲或粗酶液在加防腐剂条件下, 酶解玉米秸粉后的得糖率与不加防腐剂比较, 提高50%~1倍。同时试验结果也表明, 直接应用固体曲的酶解得糖效果加防腐剂与不加防腐剂高于由固体曲浸提的粗酶液。在加防腐剂条件下, 菌种EA₃-867和323.6得糖率分别为粗酶液的7倍和8倍。直接应用固体曲解的比用粗酶液酶解提高得糖率的原因, 主要是前者酶浓度较高, 因所采用的提酶浸泡的方法, 并不能将酶曲中酶全部提取出来。

表10、

酶解加防腐剂对得糖效果的影响 *

酶剂型	处 理	EA ₃ -867		323.6	
		得糖 (%)	比 较	得糖 (%)	比 较
固 体 曲	对 照	10.2	100	11.8	100
	苯甲酸钠	21.6	211.7	17.2	145.8
粗 酶 液	对 照	1.8	100	1.6	100
	苯甲酸钠	3.6	200	2.6	162.5

* 加防腐剂为0.2%苯甲酸钠。

6、固体曲酶解用量试验：在防腐剂效应试验中发现固体纤曲的酶解得糖率较粗酶液明显提高，同时考虑到实际应用，仍以固体曲为方便，为此进行了固体曲的用量试验，结果列于表11。

表11、

木霉323.6固体曲酶解用曲量与得糖效果 *

用 量		3 %	5 %	7 %	10%	20%	30%	40%	50%	
干* 曲	得* 糖	毫克/毫升	0.93	0.62	0.93	0.75	1.18	1.55	1.83	2.25
		%	1.98	1.32	2.00	1.92	2.94	4.43	5.85	7.55
鲜* 曲	得* 糖	毫克/毫升	0.65	0.58	0.55	0.49	0.90	1.51	1.49	1.78
		%	1.44	1.13	1.75	2.07	2.98	3.60	6.61	7.09

* 四次平均值。 ** 干曲：培养四天后，在50°C中烘干。 *** 鲜曲：培养四天的培养物。

从表11可见，用曲量在10%以下时，酶解得糖率不显著，20%以上则得糖率显著提高，并随用量的增加而增加。鲜曲与干曲之间差异不大。

纤维素酶与木质素酶联合酶解玉米秸粉的效果

纤维素与木质素在植物体中呈镶嵌形式存在，因此木质素的存在妨碍纤维素酶与纤维素的接触，影响纤维素酶的酶促反应，所以除去木质素是提高纤维素酶解得糖效果的必要途径。去除木质素的方法多采用化学方法，我们试图采用生物去除木质素，以提高纤维素酶酶解得糖效果。

1、纤维素酶与木质素酶的联合酶解。采用木霉323.6和担子菌目中的环锈菌114（吉林师大生物系筛选）制备的粗酶液，混合酶解玉米秸粉。从所得初步资料看，纤维素酶与木质素酶联合应用可提高还原糖得率，见表12。

表12、

纤维素酶与木质素酶联合酶解玉米秸粉的得糖效果

处 理	酶解液还原糖* (毫克/毫升)	得糖率(%)
纤维素酶(323.6)	3.49	8.73
纤维素酶+木质素酶(1:1)	6.06	15.16
“ ” (7:3)	5.09	12.77
木质素酶(114)	1.36	3.36

* 还原糖测定采用DNS法；还原糖系酶解处理减灭活酶平行对照。

在上述试验基础上，为了选出适宜的木质素酶生产菌株，引进一批担子菌，进行了比较，从中选出五株生长较快(5~7天)的菌株进行了单独及联合酶解试验。结果表明菌种55号(猴头, *Herichium erinaceus* (Bull.exFr) Pers syn. *Hydnum erinaceus* Bull.) 得糖率较高，该菌株单独酶解玉米秸粉得糖率为4.16%(见表13)。纤维素酶与木质素酶联合酶解得糖率为13.94%，可提高得糖率128.1%(见表14)。

表13、

担子菌酶解玉米秸粉得糖效果

菌 种 编 号		33	55	56	67	114
得* 糖	毫克/毫升	0.52	1.38	0.85	1.10	0.8
	毫克/克底物	17.8	41.6	27.2	36.2	16.7
	%	18.7	4.16	2.72	3.62	1.67

* 六次重复平均值。

表14、

木霉323.6与担子菌联合酶解玉米秸粉得糖效果

菌 种		323.6 +	323.6 +	323.6 +	323.6 +	323.6 +	323.6
		33	55	56	57	114	
得* 糖	毫克/毫升	2.51	3.95	2.48	2.87	1.95	1.25
	毫克/克底物	87.0	139.4	79.3	88.2	67.1	61.1
	%	8.7	13.94	7.93	8.82	6.71	6.11
比 较		142.3	228.1	129.8	144.3	109.8	100

* 六次重复平均值。

2、纤维素酶与木质素酶联合酶解配比试验。为了明确两种酶在联合酶解中的适宜比例，我们进行了酶的用量配比试验。所用菌种为木霉323.6,担子菌55号，木霉酶曲与担子

菌酶曲比例为 1 : 1、1 : 0.5、1 : 0.3、1 : 0.1 四种处理，以单用 323.6 为对照。试验结果如表 15。

表 15、木霉 323.6 与担子菌 55 号酶解配比得糖比较

配 比		1 : 1	1 : 0.5	1 : 0.3	1 : 0.1	323.6
得 * 糖	毫克 / 毫升	0.95	0.58	0.49	0.50	0.49
	毫克 / 克底物	38.0	23.0	19.6	20.2	19.6
	%	3.8	2.3	1.96	2.02	1.96
比 较		193.8	117.0	100	103	100

* 四次平均值。

从试验结果看出，1 : 0.1 及 1 : 0.3 两种配比其得糖率与单用 323.6 比较没有提高，当比例增加到 1 : 0.5 时，得糖率显著提高，1 : 1 时得糖率比单用木霉 323.6 提高将近一倍。

摘 要

1、玉米秸粉添加 20% 麦麸，可以做木霉 323.6 制曲培养基。制曲培养时间以 3 ~ 4 天纤维素酶活较高。

2、纤曲抽提酶液用水量以曲料的 10 倍为宜，抽提温度 25 ~ 30°C 为宜。

3、纤维素酶酶解玉米秸粉的适宜条件为 40°C，pH 4 ~ 5，48 小时。

4、原料经碱处理后，可显著提高酶解得糖效果，3% 石灰乳处理玉米秸粉后，得糖率比对照高 179%。

5、防腐剂在纤维素酶酶解玉米秸粉的得糖保糖效果上有显著作用。

6、应用固体曲酶解玉米秸粉得糖效果比粗酶液提高 7 ~ 8 倍，固体曲用量应不少于 20%。

7、纤维素酶与木质素酶联合酶解玉米秸粉可提高得糖率。纤维素酶与木质素酶联合配比为 1 : 1 得糖率提高将近一倍。

参 考 文 献

[1] 任守让等：1979 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，《吉林农业科学》1979—1。

[2] 浙江省农业科学院畜牧兽医研究所 1974 木霉纤维素酶糖化稻草的影响因素试验，《利用微生物提高粗饲料营养价值》，全国微生物饲料科研协作会议资料选编。