

# 发酵条件对纤维素分解菌酶活性的影响研究\*

庞金梅<sup>1</sup> 李丽君<sup>1</sup> 郭 君<sup>1</sup> 梁改梅<sup>2</sup> 焦晓燕<sup>1</sup>

(山西省农业科学院土壤肥料研究所 太原 030031)<sup>1</sup>(山西农业大学 太谷 030801)<sup>2</sup>

**摘要:**研究了4株可用作饲料添加剂的纤维素分解菌,在不同发酵时间、发酵温度和厌氧发酵条件下,菌体蛋白含量、纤维素酶和半纤维素酶活性等的变化。结果表明:发酵20h酶活性最高;供试菌都适宜在28℃恒温发酵;在厌氧条件下,39℃±2℃发酵12h、24h、36h,供试菌均可在PDA平板上正常生长,发酵48h供试菌生长和酶活均受不同程度的影响。研究为菌株的生产、保存和应用提供了重要依据。

**关键词:**发酵条件,纤维素分解菌,酶活性

**中图分类号:**TQ920.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0030-04

## THE EFFECT OF FERMENTATION ON CELLULOLYTIC ENZYME ACTIVITY

PANG Jing-Mei<sup>1</sup> LI Li-Jun<sup>1</sup> GUO Jun<sup>1</sup> LIANG Gai-Mei<sup>2</sup> JIAO Xiao-Yan<sup>1</sup>

(*Institute of Soils and Fertilizers, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031*)<sup>1</sup>

(*Shanxi Agriculture University, Taigu 030801*)<sup>2</sup>

**Abstract:** Four cellulolytic strains, which can be used as feed additive, were studied under the conditions of various temperature, incubation time, and anaerobic process, and examined the changes of their cell protein content, cellulase and hemi-cellulase activity. The results show: 1) The maximum cellulolytic enzyme activities were observed incubation 20h; 2) Constant medium temperature 28°C was adequate to the growth of the 4 strains; 3) anaerobic condition, 39°C±2°C and fermentation 12h, 24h, 36h, the tested strains can growth well in PDA plate, however, the cellulolytic enzyme activities and growth of the tested strains were influenced adversely when fermentation 48h. The experiment provide many important basis for the strains production, storage and utilization.

**Key words:** Fermentation, Cellulolytic fungi, Enzyme, Activity

通过添加微生物制剂和应用营养调控技术,最大限度地发挥反刍动物胃肠道微生物降解粗纤维的能力,提高秸秆资源和农副产品粗纤维利用率,已成为近年来研究的热点<sup>[1~4]</sup>。本文针对影响供试菌株生长、代谢的几个主要环境因素,即发酵温度、发酵时间、厌氧发酵时间对酶活性和蛋白含量的影响进行了研究。

\* 山西省自然科学基金资助项目(No. 971079)

收稿日期:2000-01-28,修回日期:2000-11-10

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种: J *Candida* Berkh (自分离初定为假丝酵母属), W *Geotrichum candidum* Link AS2.361 白地霉, H *Asperillus oryzae* (自分离初定为曲霉属), M *Trichoderma Konigii* IF-F113031 康宁木霉。

1.1.2 试剂: 葡萄糖、D-木糖、木聚糖、羧甲基纤维素钠、NaOH、醋酸钠、浓醋酸、碳酸钠、酒石酸甲钠、钼酸钠、磷酸氢钠、纤维素酶、半纤维素酶等。

### 1.2 方法

1.2.1 试验设置: 瘤胃中适宜微生物生长的 pH 为 5.0 ~ 7.7, 温度为  $39^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 饲料在瘤胃中厌氧滞留时间一般为 12 ~ 36h。为了解分离筛选的菌株及其酶活性在反刍动物瘤胃中的有效生存, 试验设置以下处理。发酵时间: 10h、20h、30h、40h。发酵温度:  $18^{\circ}\text{C}$ 、 $28^{\circ}\text{C}$ 、 $38^{\circ}\text{C}$ 。厌氧发酵: 将厌氧试管塞棉塞, 灭菌后接种,  $39^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  恒温好氧静置培养 12h。留下对照管继续好氧发酵, 其它按 1L/min 流量分别注入  $\text{CO}_2$  和  $\text{N}_2$  ( $\text{CO}_2$ : $\text{N}_2$  为 4:2) 1min 塞紧橡皮塞, 厌氧静置培养 12h、24h、36h、48h 分别取样, 在 PDA (马铃薯) 平板上划线观察菌株生长状况, 并测定 24h 和 48h 酶活变化。以上处理除厌氧发酵外, 均用 PDA 液体培养基摇瓶发酵。

1.2.2 发酵和样品制备: 采用摇瓶发酵法。在 150mL 三角瓶中装入 20mL 液体培养基, 灭菌后接种, 根据处理要求摇瓶发酵, 转速 160r/min。发酵完毕 3000r/min 离心, 取上清液, 测定纤维素酶、半纤维素酶活 (u/mg) 和最终 pH 值, 离心沉淀物用蒸馏水冲洗 3 次,  $80^{\circ}\text{C}$  烘至恒重, 称干重为菌体蛋白含量 (g/L)<sup>[5]</sup>。

1.2.3 纤维素酶、半纤维素酶活测定: 见参考文献[6]。

酶活单位定义: 100 个纤维素(半纤维素)酶单位相当于在规定条件下, 每分钟从羧甲基纤维素(木聚糖)中, 释放出相当于 1mg 葡萄糖(木糖)时所需的酶量。

1.2.4 pH 值测定: 用 25 型-酸度计测定菌液离心上清液。

## 2 结果与讨论

### 2.1 发酵时间对酶活性的影响

试验发现, 供试菌株纤维素酶和半纤维素酶活的高峰时间, 除 H 菌株半纤维素酶活性高峰在 30h, 其余都在 20h (见图 1、图 2)。但由于发酵 30h 蛋白含量比 20h 高 6~7 倍, 故总酶活  $30\text{h} > 20\text{h}$ 。为此, 发酵时间可选在 20~30h 之间。

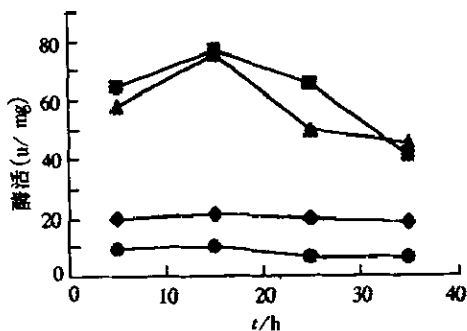


图 1 发酵时间对纤维素酶活的影响

◆ J, ● W, ▲ H, ■ M

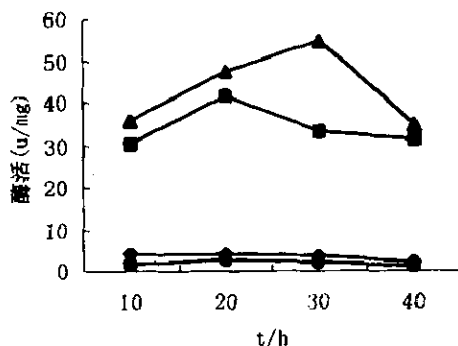


图 2 发酵时间对半纤维素酶活的影响

◆ J, ● W, ▲ H, ■ M

## 2.2 发酵温度对酶活性的影响

温度是影响微生物生长和物质代谢诸多环境因素中最重要的因素之一。发酵温度对不同菌株酶活性的影响见表1。从表1看到,供试菌株在28℃条件下发酵,蛋白含量和酶活性都较高;38℃发酵,供试菌株蛋白含量虽未减少,但酶活性较28℃发酵均略有下降。

表1 发酵温度对蛋白含量和酶活的影响

菌株	18℃			28℃			38℃		
	蛋白 g/L	纤维酶 u/mg	半纤维酶 u/mg	蛋白 g/L	纤维酶 u/mg	半纤维酶 u/mg	蛋白 g/L	纤维酶 u/mg	半纤维酶 u/mg
J	2.0	11.8	3.7	3.5	17.6	3.9	4.0	17.3	2.0
W	3.0	2.0	1.7	5.5	8.3	1.5	5.5	7.0	1.4
H	1.0	39.3	14.9	3.0	50.0	47.5	3.0	43.1	46.3
M	1.0	35.6	14.4	3.0	46.2	44.2	3.0	39.8	38.8

## 2.3 厌氧发酵对菌体生长及酶活性的影响

供试菌株在模拟反刍动物瘤胃的pH值、温度和厌氧条件下有效生存,并合成相应的酶,试验结果见表2。从表2中看到,由于采用试管静置培养,与38℃摇瓶发酵相比,即使是好氧发酵,酶活性也有明显下降。但从菌体蛋白含量看,发酵24h无明显变化。在厌氧环境中发酵12h、24h、36h供试菌株在PDA平板上均能正常生长,48h生长较差。这说明,当长势旺盛的好氧菌进入厌氧环境后,不会很快死亡,而是休眠或缓慢生长。随着发酵时间延长,其菌体在进行生物氧化过程中消耗了培养基中微量的氧或其它氧化型的受氢体,使氧化还原电位(Eh)下降<sup>[7]</sup>,菌体蛋白逐渐减少,单位酶活不同程度地受到影响。特别是H和M菌株,厌氧发酵24h和48h与38℃摇瓶发酵的纤维素酶活性相比(表1),H菌分别降低了69.6%和71.7%;M菌为64.3%和70.6%。但研究认为,供试菌株都能在厌氧环境中有效生存24~36h。用作反刍动物饲料添加剂,将发挥其降解饲料粗纤维,促进瘤胃微生物生态循环的预期目的。

表2 厌氧发酵对蛋白含量、酶活性的影响

处理	J			W			H			M		
	蛋白 g/L	纤维酶 u/mg	半纤维酶 u/mg	蛋白 g/L	纤维酶 u/mg	半纤维酶 u/mg	蛋白 g/L	纤维酶 u/mg	半纤维酶 u/mg	蛋白 g/L	纤维酶 u/mg	半纤维酶 u/mg
24h(O <sub>2</sub> )	4.0	14.1	3.9	6.0	3.7	1.8	3.5	20.7	15.4	3.5	21.2	13.0
24h	4.5	11.1	3.7	6.5	3.1	2.1	3.5	13.1	10.6	3.5	14.2	10.9
48h(O <sub>2</sub> )	4.5	9.9	3.6	4.5	9.9	3.6	2.5	11.0	9.2	2.5	11.9	9.6
48h	2.5	10.2	4.5	3.5	1.8	2.0	2.0	12.2	10.2	2.0	11.7	10.7

注:在试管中,39℃±2℃恒温静置培养

综上所述,供试菌株都能在设定的发酵条件下生长,并进行纤维素酶和半纤维素酶的合成与代谢。但由于供试菌的种间差异,各菌株有其特殊的选择与适应。本试验为供试菌株的生产、应用和保存提供了一定的依据。

## 参 考 文 献

- [1] 谭支良. 自然资源学报, 1995, 10(1): 73~78.
- [2] Annick B, Gerard F, Frederique, *et al.* Current Microbiology. 1992, 25: 143~148.
- [3] 孙 迅, 王宜磊, 邓振旭. 微生物学杂志, 1997, 17(1): 50~54.
- [4] 张博润, 刘玉方, 陈玉梅. 微生物学通报, 1996, 23(3): 133~135.
- [5] Roger V, Bernalier A, Grenet E, *et al.* Animal Feed science and Technology. 1993, 42: 69~82.
- [6] 钱嘉渊译. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1992, 107~110, 173~177.
- [7] 李季伦, 张伟心, 杨启瑞, 等编. 微生物生理学. 北京: 北京农业大学出版社, 1993, 458~471.