

## 木霉纤维素酶糖化稻草的影响因素试验

张荣生 汤期新 马庆祯 赵力知 林元文 刘鉴培

(浙江省农业科学院畜牧兽医研究所饲料研究组)

粗饲料的来源很广,各种农作物的秸秆、秕壳都可以成为粗饲料,但由于它们含有大量的纤维素(约占干重的1/3),猪很难消化吸收,因此营养价值很低,不能很好地加以利用。纤维素酶的研究成果为粗饲料充分而有效地用于养猪生产提供了可能。国外曾用高活性的木霉纤维素酶在工业加工的条件下可以将纤维素几乎全部转化为葡萄糖及纤维二糖<sup>[1]</sup>。要研究出适合我国农村条件的粗饲料酶解方法,这是我国微生物学科工作者的一项重要任务。上海工业微生物研究所等单位于1969年曾进行过纤维素酶糖化稻草粉用来喂猪的初步试验,此后,我们也做过类似的试验,但酶解饲料的含糖量没有超过1%,试验收效很少。

现在我们又进行试验,这个试验的目的就是从酶解条件和改变底物结构以探讨提高稻草糖化率的可能性,为进一步研究提供依据。

### 一、材料与方法

1. 菌种 供试菌株均系绿色木霉(*Trichoderma viride*)。T. V. 3-2192为中国科学院微生物研究所分离的菌株,由该所供给;T. V. EA3-867为上海植物生理研究所诱变T. V. 1096获得的菌株,由该所供给。

2. 纤维素酶 均以固体曲法制取。用曲为以76×42×6厘米木盘在室温(26—28℃)培养4天的3-2192曲风干物;酶液为用250毫升三角瓶培养(恒温30℃)3天的EA3-867鲜曲浸提液。制曲原料为稻草粉70%,米糠30%(三角瓶制曲时为10%),加硫酸铵1.8%,水2倍。

3. 羧甲基纤维素(CMC)酶活测定 依中国科学院微生物所3,5-二硝基水杨酸(DNS)显色法改进。为便于操作和活性比较,底物为在0—4℃低温贮存的1% CMC-Na液和HAC-NaAC缓冲液(pH 4.6, 0.2M)是8:2的混合液,被测酶液固定稀释倍数为原料干重的200倍。在70毫升试管中加酶液1毫升,底物1毫升,于45℃糖化30分钟,加DNS液3毫升,沸浴显色5分钟,加蒸馏水20毫升,在500毫微米比色,每个样品重复2次,由标准曲线查出每毫升酶液在上述条件下

糖化底物产生的还原糖毫克数表示酶活。

4. 糖化率测定 应用底物为使均匀一致,系由同一批稻草茎秆制备:稻草粉均过20目筛;碱处理稻草粉和稻草(切短至1厘米长)为经7倍3%氢氧化钠常温浸泡24小时后水洗脱碱的风干物。根据试样大小,不经灭菌的原料盛于50毫升、150毫升、250毫升、500毫升烧杯中,用尼龙薄膜密闭杯口,按试验处理的条件酶解。酶解终了吸1毫升适当稀释倍数的酶液以DNS法测定糖,每个样品重复2次,以按酶解前底物干重计算的还原糖含量百分数表示糖化率。

5. 粗纤维测定 为消除酶解失重及取样中可能产生的误差,测定粗纤维应用去除曲渣的酶液;2克小样在酶解终了进行全量测定,方法根据中国农业科学院畜牧研究所全国饲料分析法暂行操作规程(1956)。

### 二、结果与讨论

#### (一)不同贮藏方法对固体曲酶活性保存率的影响

与深层培养木霉生产纤维素酶相比较,固体曲法生产具有体积小、设备简单、成本低的优点,适于农村条件应用。国外生产的商品纤维素酶是经过浓缩的干燥制剂<sup>[1,2]</sup>,这种干品的贮藏不会成为问题。在土法生产中的酶曲品质,除与菌种、培养条件有关外,不同的处理和贮藏方法也有很大影响。我们的试验是在9月份气候条件下进行的,用700克原料在木盘中室温培养4天的T. V. 3-2192鲜曲拌匀后均分为三份,分别进行堆放、晒干和风干处理,结果见表1。

表1说明了三种处理方法的不同影响,在堆放的情况下水份很难散失,酶活耗损也最快,堆放6天酶活已损失了一半多,而其他二种处理使含水量迅速下降,在达到接近原料自然含水量时仍有很高的活性保存率(90%以上),可见迅速去除水份是鲜曲酶活保存的重要条件。在日晒的情况下虽然水份蒸发最快,但酶活耗损随处理时间延长而增加,即使含水量已经很低继续日晒仍有较大的活性损失,相同天数处理的晒曲比

表 1 不同处理方法对鲜曲酶活性的影响

处理时间 (天)	鲜 曲 堆 放				鲜 曲 晒 干				鲜 曲 风 干			
	含水量 (%)	CMC 酶活		糖化试验 (%)	含水量 (%)	CMC 酶活		糖化试验 (%)	含水量 (%)	CMC 酶活		糖化试验 (%)
		毫克/ 毫升	(%)			毫克/ 毫升	(%)			毫克/ 毫升	(%)	
处理前	63	0.58	100	2.76	63	0.58	100	2.76	63	0.58	100	2.76
1/2	—	—	—	—	15	0.54	93	—	—	—	—	—
1	62	0.48	83	2.39	9	0.51	88	2.54	43	0.55	95	2.64
2	62	0.46	79	2.34	6	0.48	82	2.41	22	0.53	91	2.44
3	—	—	—	—	6	0.45	78	2.30	—	—	—	—
4	60	0.34	59	1.98					15	0.53	91	—
6	59	0.23	40	1.52					15	0.53	91	—
10	57	0.15	26	—								
30	53	0.07	12	—								

注：① 表内含水量是根据鲜曲干物质重量测定值和处理后曲样的重量比计算的。

② CMC 酶活测定均折原料干重稀释 200 倍。

③ 糖化试验系用曲量(折干)4%在 30℃ 酶解 2 克稻草粉小样的 3 天糖化率。

风干的多损失酶活 7—9%，说明日光和较高气温对纤维素酶有一定的破坏作用。风干处理不存在直射日光的影响，酶活下降速度最小，并在含水量降至 22% 以下时趋于稳定，这时曲的酶活保存了 91%。另外，糖化试验的结果也反映了酶曲品质的变化，酶解小样的糖化率与曲的 CMC 活性下降相一致。因此认为，贮藏鲜曲以风干处理最好，这种方法较为简便，容易取得较好保存酶活的效果；日晒的方法必要时也可采用，但须掌握适宜的处理时间；堆放不利于鲜曲酶活的保存，应予避免。我们用处理 6 天的风干曲放在以薄膜密闭的 250 毫升烧杯中进行了贮藏试验，结果表明这种干曲可以在 9 月至 2 月的室温条件下长期贮藏，以开始贮藏时的 CMC 酶活 0.53 毫克/毫升为 100%，一个月后损耗率为 3.8%，4 个月为 20.8%，贮藏 6 个月仍能保存 73.6% 的酶活性。

## (二) 灭菌防腐条件对外观糖化率的影响

纤维素在酶解后生成的还原糖可以被很多种异养型微生物作为碳源利用而消耗，Mandels 等 (1971) 研究过酵母对酶解产物的利用能力，多数酵母菌株能大量消耗酶解物中的还原糖<sup>[3]</sup>，我们从另一种角度探讨了同一个问题。

在未经灭菌和不加防腐剂的条件下酶解稻草粉的糖化率是很低的，即使增加用曲量或调节 pH 也不能取得良好的糖化效果，这种情况在水缸或小样酶解中都一样。在直径 50 厘米的水缸中加稻草粉 25 斤/缸，酶解 3 天的结果，用曲量 4% 的糖化率为 0.28%，曲量加倍时为 0.29%。在小样试验中用曲 5%，在 30℃ 酶解 3 天，在自然 pH 时的糖化率为 0.40%，调 pH 至 5 时为 0.80% (本节糖化率系指外观糖化率)。

上述改善了酶解条件后仍不能获得良好糖化效果

的原因，在观察不同酶解时间的糖量变化中可以得到很好说明。试验在不灭菌防腐的条件下进行，每天测定的各个小样均为 5 克稻草粉，加液量 20 倍，为利于同对照比较，试验组加 T. V. 3-2192 曲制备的 1% 酶液，对照组用水代替。恒温 30℃ 酶解的结果，24 小时糖化率达到 4.74%，48 小时降至 1.52%，72 小时为 0.95%，以后不再有明显变化，10 天后为 1.04%。对照组 10 天中稳定在 0.49—0.79% 的范围内。按扣除对照含糖量计算的酶解增加糖量 24 小时为 4.25%，48 小时下降到 0.90%，3 天后只有 0.16%。由此可见，在不灭菌防腐的条件下酶解，还原糖的生成量并不少，而表现为 3 天的糖化率不高是由于受到了损耗，某些微生物的生长增殖显然与此有关，24 小时内糖量的增加可以解释为微生物在得到适宜条件后有一个生长延缓期，3 天后趋于平衡则是由于不存在良好条件，这时酶解液的糖浓度已不超过 0.05%。

在底物经过灭菌处理或添加防腐剂的情况下，糖化率随酶解条件而变化。试验均用带纱布棉塞和油纸封口的 50 毫升三角瓶进行，底物为 2 克稻草粉，水 10 倍，曲量 5%，防腐剂为苯甲酸钠 (用量按底物重加 0.8%)，1 公斤/厘米<sup>2</sup> 灭菌 30 分钟，糖化率在 30℃ 酶解 3 天后测定。试验结果，在自然 pH 情况下，原料灭菌或添加防腐剂均无明显影响而与对照近似 (在 0.40—0.66% 之间)。在 pH 5 条件下酶解则差异十分显著，灭菌处理的糖化率为 5.2%，添加防腐剂为 4.31%，灭菌并加防腐剂为 6.35%，比不经灭菌防腐的对照增加 4.4—6.5 倍；在添加防腐剂的情况下用曲量 10%，糖化率还可提高，随酶解时间延长而增加，3 天为 6.79%，5 天为 9.00%，7 天为 9.24%。由以上看出在 1 公斤/厘米<sup>2</sup> 灭菌 30 分钟或用 0.8% 苯甲酸钠处理均能有效地抑制微生物对还原糖的消耗而大幅度提

高糖化率,这种影响依赖于酶解条件的改善而愈益显示出来。当然,在生产中对大量粗饲料应用灭菌或防腐剂是不切合农村条件的,本试验只是指出了防止酶解生成物的消耗是提高粗饲料糖化率的必要条件,如何防止消耗的有效易行方法尚有待进一步研究。为利于对影响糖化率诸因素的观察,以下的各试验中酶解底物均不灭菌,只添加苯甲酸钠 0.8%。

(三)不同氢离子浓度(pH)对糖化的影响

酶解小样为稻草粉 2 克,加曲 4% 和调不同 pH (用 HAC-NaAC 缓冲液)的水 10 倍,对照不调(水的自然 pH 为 6.8)。测定曲酶在不同 pH 条件下糖化 CMC-Na 的活性和酶解小样在 30℃ 3 天的糖化率,结果见表 2。

表 2 不同 pH 值下的 CMC 酶活和糖化率

测定项目 \ pH		对照	3	4	5	6	7	9
CMC 酶活	毫克/毫升	0.25	0.43	—	0.65	—	0.23	0.12
	%	100	172	—	260	—	92	48
糖化率	%	0.32	1.83	2.24	2.74	1.49	0.32	0.31
	比较(%)	±0	+472	+600	+755	+365	±0	-3

表 2 说明, pH 对糖化率的影响同 CMC 酶活相一致,糖化率较 CMC 酶活更显著,在不同 pH 条件下的糖化率差异悬殊,用 T. V. 3-2192 曲对稻草粉酶解的适宜 pH 为 5,这时糖化率可比自然 pH 时增加 7.5 倍。以后的酶解试验均在 pH 5 条件下进行。

(四)温度对糖化率的影响

以稻草粉和碱处理稻草为底物,6 克小样加水 10 倍,曲 10%,在不同温度条件下酶解的结果如表 3。

表 3 不同温度对糖化率的影响

糖化率 \ 时间 \ 温度		稻草粉			碱处稻草		
		3	4	6	3	4	6
10—15	(%)	1.74	2.10	2.52	5.60	6.64	9.45
	(天)						
30	(%)	6.20	7.43	8.80	17.84	19.88	24.00
	(天)	(357)	(354)	(346)	(319)	(299)	(254)
45	(%)	7.21	8.31	9.32	20.07	23.27	27.57
	(天)	(415)	(396)	(369)	(358)	(350)	(292)

表中( )内的数字系以 10—15℃ 为 100% 的比值。

由表 3 清楚说明,一定的温度是酶解的重要条件。在 45℃ 范围内糖化率随温度上升而明显提高,提高的幅度在 30℃ 内更为显著,以 3 天的结果为例,温度从 10—15℃ 上升到 30℃,糖化率提高 2.2—2.6 倍,继

续上升则提高有限,45℃ 糖化率比 30℃ 只增加 12—16%,这种影响在不同敏感度的底物间没有重要差异。但是,随着酶解时间的延长,糖化率因温度而提高的幅度趋于减小,这种趋势在 45℃ 比 30℃ 明显,在碱处理稻草比稻草粉明显,可能同酶解液中糖浓度升高抑制酶活性、底物浓度降低及酶活性在较高温度下损耗增加有关。

(五)酶解时间对糖化率的影响

底物为 100 克碱处理稻草粉,曲量 10%,水 10 倍,在 30℃ 酶解 12 天的结果表明,适当增加酶解时间有利于糖化率的提高,在 11 天内糖化率随酶解时间而增加。糖化速度以 0—48 小时最高,这个期间每天增加的糖量在 4% 以上,2 天后到第 8 天保持每天增加糖 1.1—1.7%,8 天后下降到 1% 以下。糖化率在 11 天后不再提高,这时为 20.16%,比 2 天的提高 1.4 倍。

(六)加水量对糖化率的影响

水分在粗饲料酶解过程中有着复杂的影响,加水的倍数关系到酶、底物和酶解产物的稀释程度,而三者对糖化作用的影响是不同的,张文雄等(日本,1969)曾报道纤维二糖、葡萄糖对纤维素酶活的抑制作用<sup>[4]</sup>。另外,一定的水量可构成厌氧条件而有利于减少酶解产物的被消耗。一些试验说明,稻草粉在用少于 2—2.5 倍水进行酶解时,极少得糖,因此,一定的水量是酶解的必要条件。我们的试验是比较加水 4—15 倍时对糖化率的影响。

酶解小样为 10 克稻草粉,分为两种处理,一组用曲量固定为底物重的 4%,另一组用曲量为加水量的 1%。表 4 为在 30℃ 酶解 3 天测定的糖化率。

表 4 不同加水量对糖化率的影响

项 目		加水量 (倍)					
		4	5	6	8	10	15
曲占底物 4%	糖化率(%)	2.42	2.43	2.40	2.46	2.49	2.43
	糖 浓 度 (毫克/毫升)	6.1	4.9	4.0	3.1	2.5	1.6
	每克曲产糖 (毫克/克底物)	5.33	5.35	5.28	5.43	5.50	5.35
曲占水 1%	糖化率(%)	2.42	3.07	3.49	3.68	3.89	4.55
	糖 浓 度 (毫克/毫升)	6.1	6.1	5.8	4.9	3.9	3.0
	每克曲产糖 (毫克/克底物)	5.33	5.56	5.33	4.84	3.60	2.84

表内“每克曲产糖量毫克/克底物”系扣除稻草粉含糖量 0.29% 计算的。

如表 4 所示,在加水量 4—15 倍范围内,用曲量固定时,酶浓度虽随水量的增加而下降,但糖化率在各倍用水量之间并无明显差异,说明酶浓度降低的影响

获得了补偿,而在酶浓度固定不变的情况下,糖化率随水量增加而提高,可见适当增加水量对糖化作用有良好影响。每克曲产糖的转化效率,在加水 4—6 倍间二种处理几乎一样,高于 6 倍则第二种处理明显下降,在 15 倍水时每克曲产糖比第一种处理减少将近一半,说明加水过多不利于提高酶的转化效率。但是,我们的试验还只能反映在糖化率不很高时的情况,加水量的影响在不同底物、酶解时间和用曲量的情况下可能不一样,如果糖化水平较高时,适当增加用水量以相对降低糖浓度或许有利于酶解。由此认为,较适的用水量在 5—10 倍。

(七)底物预处理对酶解效果的影响

纤维素、半纤维素、木质素和果胶质是构成植物纤维细胞壁的主要成份,这些物质相互紧密结合在一起<sup>[4]</sup>。由于酶的特异性,木质素的存在成为影响粗饲料酶解的重要障碍,预处理的目的在于去除木质素、提高底物对纤维素酶的敏感度。外山信男(1970)曾用 3% 氢氧化钠溶液处理稻草后酶解,分解率(重量减少)达 80%<sup>[6]</sup>。我们在下述试验中也取得了良好的酶解糖化效果。

1.不同碱浓度处理的效果 试验小样为稻草 5 克,分别加入 0.5%、1%、2%、3% 的氢氧化钠溶液 35 毫升,在 30℃ 浸泡 24 小时后水洗至中性,加 HAC-NaAC 缓冲液 (pH 5) 使总液量达 50 毫升,用曲量 15%,对照小样不作碱处理,相同条件进行酶解。结果见表 5。

表 5 不同碱浓度处理底物的糖化率

酶解时间 (天)	处理方法	对 照 (未处理)	NaOH 浓度			
			0.5%	1%	2%	3%
3	糖化率(%)	2.25	2.70	5.70	11.55	12.60
	比 较(%)	100	120	254	513	560
5	糖化率(%)	3.06	4.86	8.30	14.08	15.06
	比 较(%)	100	159	272	460	492

以上结果说明,经过碱溶液预处理后可明显提高稻草对纤维素酶的敏感度,提高的程度随碱浓度而增加。以本试验条件处理,0.5% 的氢氧化钠溶液即能反映出微弱的效果,1—2% 的浓度效果已很显著,再增加碱浓度则糖化率提高有限;用 3% 氢氧化钠液处理的稻草,酶解糖化率可比不处理的提高约 4 倍。

2.两种不同脱碱方法的效果比较 试样为稻草粉各 100 克,加 7 倍量(重量/容积)的 3% 氢氧化钠液,在室温(20—30℃)浸泡 24 小时后,分别进行两种不同的脱碱处理:加盐酸中和或反复水洗至接近中性。然后加入 pH 5 的 HAC-NaAC 缓冲液使总液量为底物的 10 倍(重量/重量,此处底物重不估计流失减少的部分

在内,仍按 100 克计算,即每个试样加成总重 1100 克),用曲量 15%,在 30℃ 酶解 4 天测定糖化率。结果用盐酸中和脱碱的效果显然优于水洗处理的,前者糖化率为 17.12%,后者只有 10.44%,分别比对照(相同条件酶解未作碱处理的稻草粉)提高 3.8 倍和 1.9 倍。这里糖化率是按照碱处理前的底物重量计算的,水洗处理使底物重量有所减少,根据小样(10 克)测定水洗稻草粉干物质溶失率为 27.3%,按此计算的糖化率也只有 12.48%,比盐酸中和处理的还少很多。由此可见,水洗处理不仅干物质有所溶失,还将部分较易酶解转化为糖的物质也随滤液而流失掉,用酸中和脱碱的方法则避免了这种损失,同样 100 克稻草粉碱处理酶解,酸中和脱碱可比水洗脱碱多得 6.7 克还原糖。

3.稻草与稻草粉的碱处理效果比较 通常认为细碎度高的底物增加了与酶接触的表面积,有利于提高酶解效果,但是,这样处理必须有一定的机械和动力设备条件,而且费用也比较大。为探讨用碱处理能否省略磨粉的工序,我们比较了未经粉碎的稻草与稻草粉在碱处理后酶解的效果。每个试样用 100 克底物,经 3% 氢氧化钠液常温浸泡 24 小时后加盐酸中和,用曲量 15%,在 30℃ 酶解。试验结果(表 6)说明,用 3% 的碱液预处理稻草,底物对纤维素酶的敏感度提高与细碎程度无明显关系,两种碱处理的底物糖化率均比对照显著提高(6 倍左右)。同时,酶解后的底物残渣,对样品与酶解前相似,改变不大,碱处理稻草则细胞壁已受到破坏,纤维强度明显降低,搅拌后即可成糊状而与碱处理稻草粉一样。可见用强碱处理的作用可深入到未经粉碎的秸秆纤维的内部而不受底物细碎程度的限制,在机械动力条件较差的地区应用酶解饲料时,碱处理有更高的实用价值。

表 6 稻草与稻草粉的碱处理效果比较

酶解时间 (天)	糖化率 (%)	底物 (%)	对 照 (未处理稻草)*	碱 处 理	
				稻草*	稻草粉**
3	2.25		2.25	16.66	14.70
5	3.06		3.06	21.80	20.60

\* 切短至 1 厘米长。

\*\* 过 20 目筛。

4.碱处理稻草粉的粗纤维分解率测定 用水洗脱碱后在 105℃ 干燥的稻草粉为测定底物,粗纤维含量 54.08%。纤维素酶用鲜曲的 50 倍稀释酶液(CMC 活性 0.59 毫克/毫升)在 50 毫升烧杯中称取底物 2 克,加 pH 5 的酶液 20 毫升,苯甲酸钠 0.02 克,以薄膜密封杯口,于 40℃ 酶解 7 天后进行全量测定。结果,粗纤维含量从 54.08% 下降至 25.94%,降解率达 52.03%;酶解液糖浓度 41.5 毫克/毫升,糖化率为 41.5%,比我们在农村基点应用时的糖化率水平(不超

过 0.5%) 提高了近百倍。由此说明, 经过碱处理的底物在较适宜的酶解条件下糖化, 可以大量分解纤维素转化为糖并能在酶解液中获得积累。难以解释的是酶解后还原糖的生成量远高于粗纤维分解量(绝对量), 每个小样中至少有 0.26 克糖显然不是来自粗纤维的分解, 这一问题涉及酶解产物营养价值的评定, 有待研究解决。此外, 取得上述结果的试验条件, 与实际生产应用之间还有很大距离, 不少问题需进一步研究, 重要的可能在于探讨适于农村条件的防腐、预处理方法。

### 三、结 论

1. 鲜曲贮藏必须迅速去除水分, 风干最好, 短时间晒干必要时也可采用, 应避免堆放; 含水量 15% 以下的风干曲可室温长期贮存 4—6 个月, 失活不超过 30%。

2. 防止微生物的消耗是酶解得糖的必要条件, 未采取防止措施不能提高得糖率, 采取措施后糖化率随酶解条件而变化。

3. pH 值对糖化率的影响同 CMC 酶活相一致, T. V. 3-2192 曲的最适 pH 为 5, 这时糖化率比自然 pH 增加 7.5 倍。

4. 在 45℃ 内糖化率随温度而提高, 30℃ 以内影

响显著, 30℃ 以上提高糖化率不多。

5. 适当延长酶解时间可提高糖化率, 11 天比 2 天可提高 1.4 倍。

6. 一定的用水量是酶解的必要条件, 较适范围在 5—10 倍。

7. 底物用碱预处理可明显提高糖化率, 用氢氧化钠处理浓度 2—3% 已足够; 水洗脱碱干物质损失过多, 酸中和脱碱可避免损失, 提高糖化率; 强碱处理稻草, 效果与稻草粉一样。

8. 利用木霉纤维素酶糖化粗饲料有很大的提高潜力, 较适酶解条件结合底物预处理, 粗纤维分解率可达 52.03%, 糖化率可达 41.5%。

### 参 考 资 料

- [1] Mandels, M., Weber, J. and Parizew, R., *Appl. Microbiology.*, 21(1):152—154, 1971.
- [2] Joyama, N., *Adv. Chem. Ser.* 95:359—389, 1969.
- [3] Mandels, M. and Weber, J., *Adv. Chem. Ser.* 95:391—413, 1969.
- [4] 张文雄, 宇佐美昭次: *发酵工学雜誌* 47: 447—456, 1969.
- [5] Cowling, E. B. and Brown, W., *Adv. Chem. Ser.* 95:152—186, 1969.
- [6] 外山信男: *纤维と工业*. 3: 493—501, 1970.