

# 纤维素酶酶解稻壳的条件试验

王淑军 袁素珍 杨 军 张 晶 施恩初

(淮海工学院食品化工系 连云港 222005)

**摘要** 本文报道康氏木霉 *N<sub>2</sub>-78 (Trichoderma koningi)* 纤维素酶产生和酶解稻壳的适宜条件。实验结果表明,在稻草粉麸皮固体培养基上,纤维素酶产生的适宜条件为稻草粉和麸皮的比例为 7:3,培养基含水量为 250%, pH 为 6.0—6.5,温度为 30℃,时间为 3d。酶解稻壳的最适条件为: pH 为 4.4,温度为 40℃,作用时间为 3d,酶曲量和底物量比例为 1:3。

**关键词** 康氏木霉,纤维素酶,稻壳

纤维素是高等植物细胞壁的主要成份,是地球上最丰富的资源。各种农作物副产品,如秸秆、秕壳等因含有大量动物难以吸收利用的纤维素而大都作为农田肥料和燃料。利用纤维素酶将其转化为糖或蛋白质,对提高其饲用价值,解决蛋白质饲料紧缺的矛盾具有重要意义。

国内外利用纤维素资源的多为糠醛渣、木屑、蔗渣、青干草粉和稻草等<sup>[1-3]</sup>,但以稻壳为酶解底物报道甚少。本试验主要探讨固体发酵法生产纤维素酶和酶解稻壳的最适条件,为进一步提高稻壳的饲用价值提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

康氏木霉 *N<sub>2</sub>-78 (Trichoderma koningi)*, 由上海工业微生物研究所提供。

### 1.2 培养基和培养方法

斜面培养基: 5°Be' 麦芽汁琼脂。

固体曲培养基: 在 250ml 三角瓶中 加入 3.5g 干稻草粉(过 0.35cm 筛)和 1.5g 麸皮,再加入 12.5ml 含 0.125g 的硫酸铵水溶液,拌匀,  $1 \times 10^5$ Pa 灭菌 30min。冷后接入斜面种子,充分摇匀后于 30℃ 培养 3d。

### 1.3 底物及处理方法

**1.3.1 未处理稻壳:** 将稻壳烘干后备用。

**1.3.2 碱处理稻壳<sup>[3]</sup>:** 采用 3% NaOH 溶液在 40℃ 浸泡 24h,然后用水洗或用酸中和脱碱至 pH4.4,烘干后使用。

### 1.4 试剂的配制

**1.4.1 羧甲基纤维素钠盐缓冲液的配制<sup>[4]</sup>.**

1994-11-03 收稿

1.4.2 3,5-二硝基水杨酸试剂的配制<sup>[7]</sup>。

1.4.3 含 0.8% 苯甲酸钠缓冲液的配制<sup>[6]</sup>。

1.5 酶活力测定

1.5.1 酶液的制备<sup>[7]</sup>：培养 3d 的固体曲，加蒸馏水 100ml，40℃ 恒温水浴 1h (每 15min 摇动 1 次)，取出用脱脂棉过滤，滤液即为酶液。

1.5.2 CMC 糖化力 (以还原糖表示)<sup>[4]</sup>：0.5ml 适当稀释的酶液，加入 2ml 羧甲基纤维素钠盐缓冲液，50℃ 水浴中反应 30min，加入 2.5ml 3,5-二硝基水杨酸试剂终止反应，煮沸 5min，于 721 型分光光度计 530nm 波长下比色，由吸光度查葡萄糖标准曲线回归方程求得每克酶曲作用 0.5h 后产生的葡萄糖 mg 数。对照用蒸馏水代替酶液，其余同试验。

1.6 纤维素酶酶解稻壳转化率的测定

将培养 3d 的固体酶曲中加入 15g (干重) 底物，再加入含 0.8% 苯甲酸钠缓冲液至总液量 100ml，密封瓶口于 40℃ 保温 3d，过滤后取一定量适当稀释的滤液于比色管中，并加入 2.5ml 3,5-二硝基水杨酸试剂，加水至 5ml，于沸水浴中显色 5min，迅速冷却，于 721 型分光光度计 530nm 波长下比色，由吸光度查葡萄糖标准曲线回归方程求得糖含量 C(mg)。按下式计算酶解转化率(%)：

转化率(%)

$$= \frac{(C - \text{底物和酶曲对照糖浓度}) \times 100}{\text{底物用量} \times 1000}$$

2 结果

2.1 纤维素酶产生的条件

2.1.1 培养基初始 pH：将固体曲培养基 pH 调至试验所需酸碱度 (pH 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0) 进行制曲试验。结果表明产生纤维素酶的适宜 pH 值为 6.0—6.5。

2.1.2 培养基含水量：改变培养基含水量分别为原料量的 150%，200%，220%，250% 以及 300% 进行试验，结果表明最适合含水量为 250%。

2.1.3 麸皮添加量：变化培养基中稻草粉和麸皮的比例进行制曲试验，结果见表 1。稻草粉和麸皮的比例在 3.5:1.5 时酶活最高，而 4.5:

0.5, 4:1 和 2.5:2.5 时酶活也较高。

表 1 麸皮添加量对产酶的影响

稻草粉和麸皮比例	5:0	4.5:0.5	4:1	3.5:1.5	3:2	2.5:2.5
CMC 糖化力	4974	5877	5877	6620	5114	5876

2.1.4 培养温度：在不同温度下 (25、30、35、40、45、50℃) 进行固体曲培养试验，结果表明产酶最适温度为 30℃。

2.1.5 培养时间：于不同培养时间取样测酶活力，结果表明最适培养时间为 3d (图 1)。

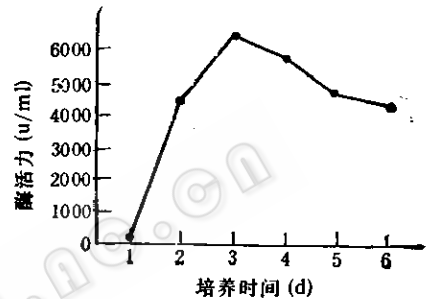


图 1 培养时间和酶活力的关系

2.2 纤维素酶酶解作用的条件

2.2.1 底物预处理：将经过不同预处理的稻壳进行酶解试验，从表 2 可知，底物经过预处理可提高酶解转化率。以下底物均采用酸中和脱碱的碱处理稻壳。

表 2 底物预处理对酶作用影响

底物	未处理稻壳	碱处理稻壳	
		酸中和脱碱	水洗脱碱
转化率(%)	15.3—16.4	59.5	33.7

2.2.2 温度：于不同温度下酶解，结果见图 2，酶解最适温度为 40℃。

2.2.3 pH：用不同 pH 缓冲液使酶作用在相应的 pH 下 (pH 3、4、4.4、5、5.4、6、7) 进行，结果表明酶作用最适 pH 为 4.4。

2.2.4 酶解时间：于不同酶解时间取样测定，结果表明酶作用最适时间为 3d (图 3)。

2.2.5 酶曲量和底物量：固定底物量 (15g 酸中和和碱处理稻壳)，变化酶曲量作酶解试验，结

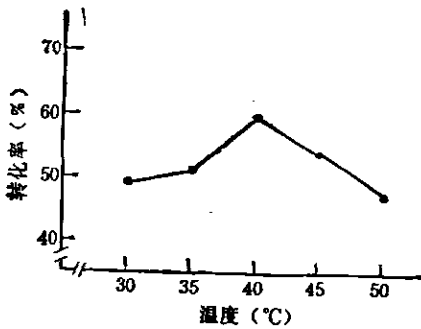


图2 酶解温度与转化率关系

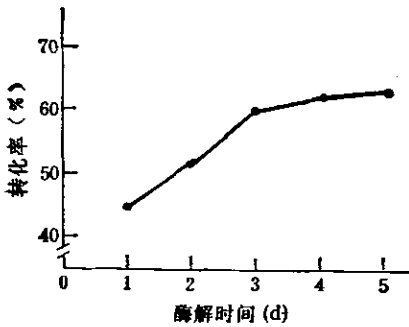


图3 酶解时间与转化率关系

果见表3。固定酶曲量(5g)变化底物用量作酶解试验,结果见表4。从表中可知,在本试验条件下,酶曲量与底物量的比例以1:3为宜。

表3 酶曲量与转化率的关系

酶曲量 (g)	酶曲量:底物量	转化率 (%)
1	1:15	34.0
3	1:5	41.1
5	1:3	60.4
7	1:2.1	65.4
9	1:1.7	73.9

表4 底物量与转化率的关系

底物量 (g)	酶曲量:底物量	转化率 (%)
5	1:1	79.7
10	1:2	69.7
15	1:3	59.5
20	1:4	51.0
25	1:5	40.7

**2.2.6 酶解作用系统的液量:** 在酶解系统(15g底物和5g酶曲)中添加不同的水量进行酶解,

表5 酶作用系统液量对酶作用影响

液量 (ml)	50	100	150	200
转化率 (%)	58.8	59.7	60.6	61.8

结果见表5。综合考虑防腐和物料的流动性,酶解系统的液量为100ml为宜。

### 3 讨论

要提高纤维素酶酶解作用的效率关键有两方面因素,一是提高酶的活力,二是提高底物对酶作用的敏感性<sup>[8]</sup>。本试验采用国内产纤维素酶活力较高的菌种康氏木霉 N<sub>2</sub>-78 作为产酶菌种<sup>[4,7]</sup>,试验结果表明,该菌种在以稻草为基质的固体培养基上产酶酶活较高,其 CMC 酶活最高可达 6856mg 葡萄糖/g 曲·30 min。

制备纤维素酶曲的培养基中添加麸皮对酶活力影响较大<sup>[5,7]</sup>。本试验结果表明,添加适量麸皮可提高酶活力,稻草与麸皮的最适用量比例为7:3,但用于生产从成本考虑也可采用9:1。

关于纤维素酶活力测定方法较多且没有统一,无法彼此比较酶活力<sup>[4,5,7,9]</sup>我们采用上海植物生理研究所介绍的 CMC 糖化力测定方法作为酶活力测定方法。据资料报道,酶活力的测定受酶液稀释度影响较大<sup>[4,9]</sup>。本试验结果与之一致,在酶活力测定中,必须反复调整酶液稀释度,使每个测定中反应产物量(即还原糖量)相近(本试验控制在0.36—0.39)才能进行酶活力之间的比较。此外为使结果更准确,我们制作了葡萄糖标准曲线回归方程。关于纤维素酶活力测定中所采用的波长各资料报道不一<sup>[4,5,7]</sup>,通过最佳波长下的选择试验,结果发现在530nm波长下有最大吸收峰,故本试验的比色波长均采用530nm。

天然纤维素一般结晶程度高并且与木质素等混在一起,因而对纤维素酶的水解表现很强的抗性。对含纤维素底物进行化学或物理的预处理可提高底物对酶的敏感性,减少底物的抗性,提高纤维素的糖化率<sup>[8]</sup>。在本试验中经酸中和脱碱的碱处理稻壳的酶解转化率比未处理

稻壳提高约 3—4 倍。

在试验中我们发现底物在不加防腐剂或不灭菌条件下其转化率较低。这可能由于酶解后生成的糖被微生物利用消耗所致。根据试验并结合农村生产实际选用 0.8% 苯甲酸钠作为酶解作用系统中的防腐剂为宜。

### 参 考 文 献

- [1] 任玉岭. 应用微生物, 1983, 74(3): 1—10.  
[2] 尹光琳, 战立克, 赵根楠. 发酵工业全书, 北京: 中国

- 医药科技出版社, 1992, 318—322.  
[3] 外山信男. 纤维工业, 1970, 3: 493—501.  
[4] 上海植物生理研究所. 微生物学报, 1978, 18(1): 27—38.  
[5] 中国科学院微生物研究所, 北京日用化学二厂. 微生物学报, 1977, 17(2): 137—142.  
[6] 北京大学生物化学教研室. 生物化学实验指导, 北京: 高等教育出版社, 1979, 277.  
[7] 张发群, 郝军, 刘淑华, 等. 调味品副食品科技, 1981, 3: 9—12.  
[8] 张启先. 微生物学通报, 1976, 3(2): 31—34.  
[9] Ghose T K. Pure and Appl Chem, 1987, 59(2): 257—268.

## STUDIES ON THE OPTIMUM CONDITIONS OF PRODUCING CELLULOSE AND HYDROLYZING RICE HUSK

Wang shujun Yuan Shuzhen Yang Jun Zhang Jing Shi Enchu

(Department of Food and Chemical Engineering Huaihai institute, LianYunGang 222005)

**Abstract** The optimum conditions of cellulase produced by *Trichoderma koningi* N<sub>2</sub>-78 and hydrolysis of rice husk by the cellulase were studied. The results showed that the optimum conditions of producing cellulase were: the proportion of straw to wheat bran was 7:3, the water amount of medium was 250%, PH was at 6.0—6.5, the temperature was 30℃ and the time were 3 days, in the solid-state medium of straw powder and wheat bran. The optimum conditions of hydrolyzing rice husk were: PH was 4.4, the temperature was 40℃ and the time were 3 days, the proportion of leaven to rice husk was 1:3.

**Key words** *Trichoderma koningi*, cellulase, Ri. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>