

烟梗有机肥发酵过程中酶活性的变化

赵高岭¹, 杜雷¹, 高明¹, 席宇¹, 李永宽², 朱大恒^{1*}

(1. 郑州大学生物工程系, 郑州 450001; 2. 河南中烟工业有限责任公司郑州卷烟厂, 郑州 450004)

摘要: 为了进一步揭示生物发酵机理, 并为发酵有机肥腐熟标准体系的建立提供理论参考依据, 以烟梗为原料进行了高温好氧堆肥试验, 对发酵过程中物料的温度以及主要水解酶和氧化还原酶活性进行了测定。结果表明, 烟梗有机肥发酵过程中, 主要水解酶类和氧化还原酶类的活性均呈现出前期逐渐上升, 后期趋于平稳或下降的变化趋势。添加发酵菌剂的烟梗堆料中水解酶类和氧化还原酶类的活性在发酵中期普遍较高, 且出现峰值时间普遍较早, 发酵结束时加菌剂处理和对照水解酶类酶活性相差不大, 而氧化还原酶类活性相差较大。酶活性的提高促进了发酵代谢活性, 提高了堆料发酵温度, 加速了堆肥的腐熟。烟梗发酵有机肥后期果胶酶和碱性磷酸酶活性较为稳定, 可作为烟梗有机肥腐熟的参考指标。

关键词: 烤烟; 烟梗; 有机肥; 发酵菌剂; 腐熟; 酶活性

中图分类号: S572.01

文章编号: 1007-5119(2012)01-0043-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2012.01.009

Enzyme Activity Change during Fermentation Using Tobacco Stalk as Compost

ZHAO Gaoling¹, DU Lei¹, GAO Ming¹, XI Yu¹, LI Yongkuan², ZHU Daheng^{1*}

(1. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Zhengzhou Cigarette Factory, China Tobacco Henan Industrial Corporation, Zhengzhou 450004, China)

Abstract: In order to reveal the mechanism of biological fermentation further and provide theoretical references for the establishment of the standard system of organic compost maturity, a high temperature and aerobic composting experiment was conducted by using tobacco stalk as raw materials. The temperature of materials and the activities of main hydrolases and oxidases during fermentation were measured. The results showed that the activities of main hydrolases and oxidases increased gradually during pre-fermentation, but became stable or decreased thereafter. In treatment with microbial agents added, the activities of hydrolases and oxidases were generally higher in the medium of the fermentation and the peak time appeared earlier. But the activities of hydrolases showed little difference while the activities of oxidase were much different in the end of the fermentation. The increase in activity of enzymes promoted the metabolic activity of the fermentation, increased the temperature of the pill and speed up the maturity of compost. The activities of pectinases and alkaline phosphatases were more stable in the late period of the fermentation, which could be used as index of compost maturity.

Keywords: flue-cured tobacco; tobacco stalk; organic fertilizer; microbial agent; maturity; enzyme activity

烟梗废料是卷烟工业的副产物, 约占烟叶总重的 22% ~ 30%^[1-2]。将烟梗废料进行堆肥无害化处理, 不仅可以减少废弃烟梗对环境的污染, 缓解烟梗库存压力, 而且还可以提供一种价廉质优的肥料。烟梗的生物堆肥过程是微生物及其分泌的胞外酶的共同活动和作用的过程, 先经矿化作用把复杂的有机物质转化成简单的有机物质和无机物质等中间产物, 然后进一步将矿化的中间产物合成为复

杂的腐殖质。因此, 研究烟梗发酵过程中酶活性的变化有助于了解堆料的腐殖化进程和强度。

高温好氧堆肥的发酵产物对环境无害, 农田施用后不影响作物的生长和土壤的耕作能力, 初产品温度低, 不再进行激烈分解, 呈褐色或黑色, 无恶臭^[3-4]。目前, 堆肥腐熟度的评价方法主要有物理法(如颜色、气味)、化学法(C/N、氮化合物含量和腐殖质含量)和生物法(如蚯蚓判别法、种子发芽

基金项目: 河南省烟草专卖局科技攻关项目“烟梗废料发酵生产草炭的技术研究与应用”(HYKJ200908)

作者简介: 赵高岭, 男, 硕士, 研究方向为烟草生物技术。E-mail: pynlg1230@163.com。*通信作者, E-mail: zhudaheng2000@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-12-13

修回日期: 2011-08-11

率)等^[5]。近年来,在禽畜粪便、固体垃圾、秸秆等堆肥发酵评价中,采用不同发酵时期特征性酶的种类及其活性变化趋势来反映有机肥发酵演进过程和腐熟度的研究已有较多报道^[6-11],但有关烟梗发酵有机肥过程中酶活性的变化尚无研究报道。本研究从酶学角度研究比较烟梗添加发酵菌剂堆肥和烟梗自然堆肥过程中几种常见水解酶类和氧化还原酶类酶活性的动态变化,旨在进一步揭示烟梗发酵的生物机理,并为烟梗发酵有机肥腐熟标准体系的建立提供理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验处理和方法

试验设对照和处理 2 个水平。对照和处理均按 40 kg 烟梗和 70 kg 水混合。处理另按 0.5% 的比例加 0.2 kg 菌剂,重复 3 次。发酵采用高温好氧堆肥法。烟梗由天昌国际烟草有限公司提供,烟梗物料含水率为 65%;发酵菌剂由烟草生物技术实验室自主研制,为微生物复合菌剂,颗粒状,主要包括细菌、放线菌和真菌,该菌剂含有较多嗜热微生物,能促进有机质的分解,缩短肥料腐熟时间。

发酵前称取堆料成分,洒水搅拌,混合均匀,使烟梗均匀吸水泡软。12 h 后将堆料装入堆肥发酵罐中。发酵罐为烟草生物技术实验室自主研制,长方体(长×宽×高约为 0.8 m×0.6 m×0.6 m)有效容积约为 280 L。堆制后通过监测温度变化来控制通风、翻堆和补水时间,一般 3~5 d 通风一次,10~15 d 翻堆和补水一次,发酵周期为 35 d,粗略分为发酵前期(第 1 天至第 10 天),发酵中期(第 11 天至第 20 天),发酵后期(第 21 天至第 30 天),发酵末期(第 31 天至第 35 天)。

1.2 采样和分析方法

采用不同层面 5 点以上方法对堆料样品进行取样混合,每 5 天取样 1 次,每次取样 500 g,置于-20℃冰箱冷藏备用。在堆体中部设置温度计,早晚各测 1 次,取均值为当日堆体温度。纤维素酶测定采用 3,5-二硝基水杨酸法^[12];果胶酶测定采用 3,

5-二硝基水杨酸法^[13];酸(碱)性磷酸酶测定采用苯磷酸二钠法^[14-15];脲酶测定采用靛酚比色法^[16];过氧化氢酶测定采用钼酸铵显色法^[17];多酚氧化酶测定采用邻苯二酚法^[18]。

1.3 数据处理与分析方法

数据分析采用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 统计软件进行。

2 结果

2.1 温度变化

烟梗有机肥发酵过程中物料温度整体经历了升温、高温和降温 3 个阶段(图 1)。添加发酵菌剂的处理在发酵第 2 天就进入快速升温阶段,高温($\geq 50^\circ\text{C}$)时间持续达 20 d,最高温度达 67℃。发酵 23 d 后,温度趋于回落,微生物活性也随之减弱,最后罐体温度接近环境温度(20°C)并趋于稳定。对照则升温较慢,高温时间较短,最高温度较低,且温度回落明显慢于处理。这表明添加发酵菌剂有利于物料快速升温,高温持续时间长,而发酵周期明显缩短。

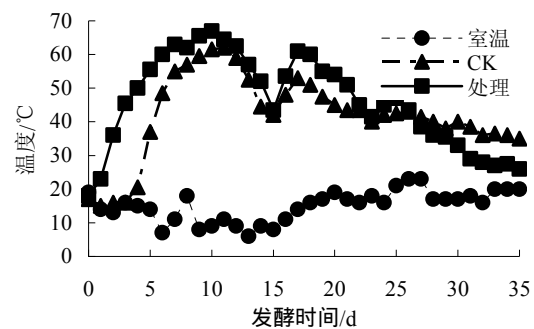


图 1 发酵过程中温度变化

Fig. 1 Temperature change during the fermentation

2.2 水解酶类的酶活性变化

2.2.1 纤维素酶 烟梗发酵过程中纤维素酶活性变化如图 2 所示,整体呈现出先上升后下降的趋势,这与顾文杰等^[7]研究的结果较为一致。发酵前期和中期,处理纤维素酶活性较对照强,两者峰值出现的时间分别为第 15 天和第 20 天,峰值分别为

2590.23 $\mu\text{g/g}$ 和 2 173.29 $\mu\text{g/g}$ ；发酵后期，处理纤维素酶活性较对照弱，发酵结束时处理纤维素酶活性略低于对照，但差异未达到 5% 显著水准。

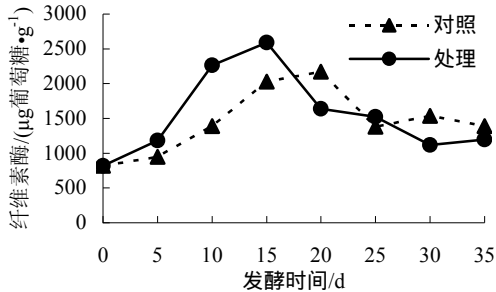


图 2 发酵过程中的纤维素酶活性变化

Fig. 2 Cellulase activity change during the fermentation

2.2.2 果胶酶 堆肥前期果胶酶活性较低，堆肥中期果胶酶活性达到最高值，之后迅速下降，并稳定在一个较低水平（图 3）。其中，加菌剂处理果胶酶活性在发酵前期比对照略高，但在发酵第 10 天其活性略有下降，低于对照果胶酶活性，发酵中期果胶酶活性又高于对照，并达到峰值；在发酵结束时处理和对照果胶酶活性基本处于相同水平。

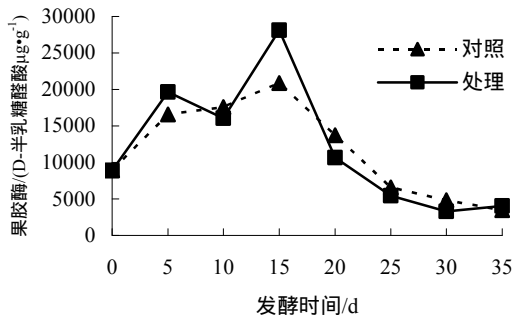


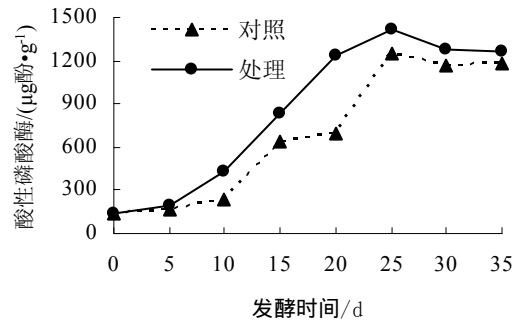
图 3 发酵过程中的果胶酶活性变化

Fig. 3 Pectase activity change during the fermentation

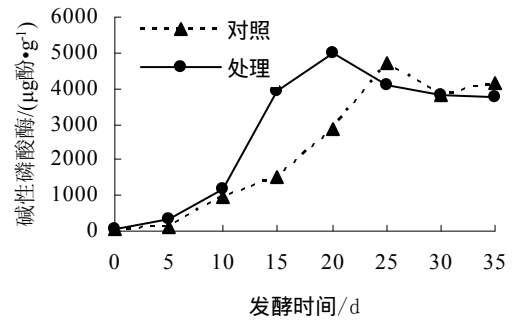
2.2.3 磷酸酶 由图 4a 可以看出，酸性磷酸酶活性在发酵前、中期缓慢增强，第 25 d 出现峰值，发酵后期稳定在较高活性水平，在整个发酵过程中，处理酸性磷酸酶活性均高于对照。两组之间差异达极显著差异水平 ($p < 0.01$)。由图 4b 可以看出，堆制过程中碱性磷酸酶整体活性远高于酸性磷酸酶。

处理碱性磷酸酶峰值的出现比对照早 5 d 左右。处理与对照之间差异未达到显著水准。

2.2.4 脲酶 由图 5 可以看出，发酵前期，脲酶活性略有下降，然后迅速上升；发酵后期逐渐下降。处理脲酶活性与对照变化趋势相似，但处理脲酶活性峰值比对照提前 5 d，且峰值也略高于对照。



4a 酸性磷酸酶 Acidic phosphatase



4b 碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase

图 4 发酵过程中磷酸酶活性变化

Fig. 4 Phosphatase activity change during the fermentation

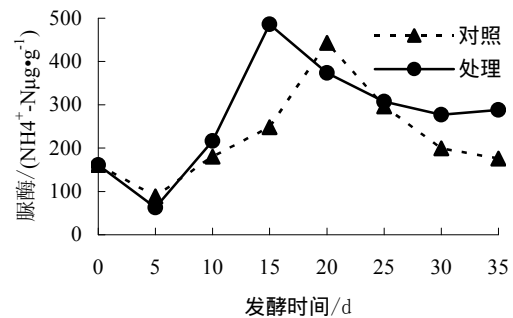


图 5 发酵过程中的脲酶活性变化

Fig. 5 Chang of urease activity during the fermentation

2.3 氧化还原酶类的酶活性变化

2.3.1 过氧化氢酶 由图6可以看出,过氧化氢酶活性在前期活性较低,中后期呈增加的趋势,此表明物质氧化主要发生在中后期。堆肥前期处理过氧化氢酶活性略低于对照;但中期处理过氧化氢酶活性迅速上升,显著高于对照,并在发酵末期维持在较高水平。处理和对照间差异达到显著水准。

2.3.2 多酚氧化酶 由图7可以看出,与对照相比,处理多酚氧化酶的活性在发酵前期上升较快,并在发酵第20天出现峰值,较对照提前10d达到峰值;发酵后期,处理多酚氧化酶活性逐渐下降,并弱于对照。发酵结束时处理多酚氧化酶的活性低于对照680个活力单位,表明处理堆料的腐殖化程度比对照高。

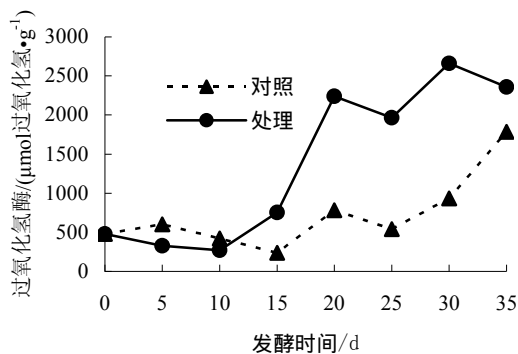


图6 发酵过程中过氧化氢酶活性变化

Fig. 6 Catalase activity change during the fermentation

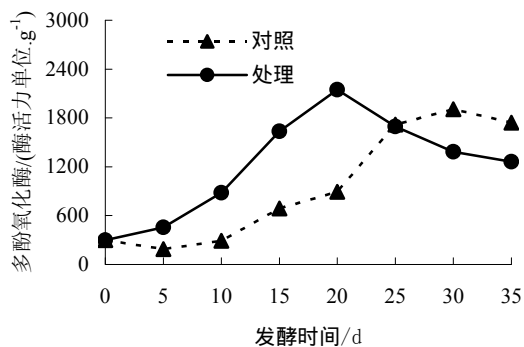


图7 发酵过程中的多酚氧化酶活性变化

Fig. 7 Polyphenoloxidase activity change during the fermentation

3 讨论

微生物酶的活性反映了微生物的代谢强度,不但与微生物本身(如微生物多样性)有关,还与微生物所处的堆体环境(如温度)有关。烟梗发酵有机肥过程中,温度影响着微生物的活动强度和酶的活性,进而影响堆料的腐殖化进度和程度;同时,温度等堆体环境因素又最终受微生物的多样性影响。研究表明,处理由于接种了发酵菌剂,改变了自然堆肥中土著微生物的结构,其堆体温度与对照相比表现为发酵前期温度上升较快,升温阶段短,高温持续时间长,堆料腐殖化进程快,腐熟程度深,整个发酵周期变短。

水解酶类大都属于细胞外酶,在烟梗发酵过程中,水解酶类是一类重要的胞外酶,通过水分子作用催化分解底物。氧化还原酶类参与堆肥腐殖质的合成,在堆料物质和能量的转化中起着重要作用。接种发酵菌剂的处理酶活性出现峰值的时间普遍早于自然发酵的对照;处理和对照在发酵结束时水解酶类酶活性未达到5%显著水准,而氧化还原酶类酶活性达到了5%显著水准;接种发酵菌剂大大提高了发酵初期微生物的代谢活性,堆料中水解酶和氧化还原酶的活性在发酵中期普遍高于对照。表明处理堆料发生激烈反应的时间主要集中在发酵中期,可能原因是处理接种了发酵菌剂,微生物结构复杂,大大提高了发酵初期微生物总的代谢活性,产生大量胞外酶,但此时由于温度较高(>60℃),酶活性受到抑制,发酵中期由于温度下降,酶活性普遍增强;而对照由于没有接种发酵菌剂,微生物结构简单,土著微生物发酵前期活动较弱,释放出的胞外酶较少,且释放时间较处理晚,导致堆料发酵平缓,腐殖化进程缓慢。

有机肥发酵过程是微生物产生酶对有机物进行分解转化的生物化学过程,研究酶活性变化有助于了解有机物质分解转化强度的大小及发酵产品的稳定情况^[21]。烟梗发酵有机肥后期,果胶酶和碱性磷酸酶活性较为稳定,可作为烟梗有机肥腐熟的参考指标。但是胞外酶的产生不仅受微生物自身

的影响,还受环境中底物的影响,发酵底物不同或量不一样,其产生的胞外酶也不同或量不一样。因此,对于不同堆肥原料或不同的发酵菌剂,从酶学的角度来说,对堆料腐熟度的评价指标也不同。徐大勇等^[22]的研究表明堆肥腐熟后期碱性磷酸酶、多酚氧化酶酶活性较为稳定,可以作为奶牛粪便堆肥腐熟度的参考指标,其中碱性磷酸酶的研究结果与本研究较为一致。当然,对有机肥发酵腐熟度的评价,应从多角度多方法加于综合考虑评价。

4 结 论

在烟梗发酵有机肥过程中,添加发酵菌剂的处理比不加菌剂的对照堆体温度在发酵前期上升较快,升温阶段短,高温持续时间长,堆料腐殖化进程快,腐熟程度深,整个发酵周期变短。主要水解酶类和氧化还原酶类的活性均呈现出前期逐渐上升,后期趋于平稳或下降的变化趋势。在添加发酵菌剂的烟梗堆料中,水解酶类和氧化还原酶类的活性在发酵中期普遍较高,且出现峰值时间普遍较早,发酵结束时处理和对照水解酶类酶活性相差不大,而氧化还原酶类酶活性相差较大。酶活性的提高促进了发酵代谢活性,提高了堆料发酵温度,加速了堆肥的腐熟。烟梗发酵有机肥后期果胶酶和碱性磷酸酶酶活性较为稳定,可作为烟梗有机肥腐熟的参考指标。

参考文献

- [1] 周国华,万端极,张艳. 废烟梗制备纤维素黄原酸酯及其吸附 Cu^{2+} 研究[J]. 化学工程师, 2007, 146(11): 54-58.
- [2] 罗鹏涛,李佛琳. 烤烟栽培与烘烤[M]. 成都:西南财经大学出版社, 2007.
- [3] 杨国清. 固体废物处理工程[M]. 北京:科学出版社, 2000.
- [4] Emeterio I J. Evaluation of city refuses compost maturity: A review[J]. Biological Waster, 1989, 27: 115-141.
- [5] 顾卫兵,乔启成,杨春和,等. 有机固体废弃物堆肥腐熟度的简易评价方法[J]. 江苏农业科学, 2008(6): 258-294.
- [6] 梁东丽,谷洁,高华,等. 不同禽畜粪便静态高温堆肥过程中蔗糖酶活性的变化[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(7): 1535-1540.
- [7] 顾文杰,张发宝,徐培智,等. 接种菌剂对堆肥微生物数量和酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(8): 1718-1722.
- [8] 孙利宁,谷洁,高华,等. 氧化还原类酶活性在小麦秸秆静态高温堆肥过程中的变化[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(5): 1042-1047.
- [9] 吴艳萍,王国栋,赵明德. 链霉素对小麦秸秆堆肥中微生物群落和酶活性的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2009, 37(9): 135-138.
- [10] 徐智,张陇利,张发宝,等. 接种内外源微生物菌剂对堆肥效果的影响[J]. 中国环境科学, 2009, 29(8): 856-860.
- [11] 戴芳,曾光明,牛承岗,等. 堆肥化过程中生物酶活性的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2005(4): 148-151.
- [12] 杨洁,阿力木,李福成,等. 饲用纤维素酶活力测定方法的改进[J]. 新疆大学学报:自然科学版, 2005, 22(3): 322-324.
- [13] 王小敏,吴文龙,闫连飞,等. 分光光度计法测定果胶酶活力的方法研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(5): 227-229.
- [14] 赵兰坡,姜岩. 土壤磷酸酶活性测定方法的探讨[J]. 土壤通报, 1986(3): 138-141.
- [15] 沈桂琴. 土壤中磷酸酶活性的测定方法[J]. 土壤肥料, 1987(1): 41-42.
- [16] 丰桡,段建平,蒲小鹏,等. 土壤脲酶活性两种测定方法的比较[J]. 草原与草坪, 2008(2): 70-72.
- [17] 程鲁京,孟泽. 钼酸铵显色法测定血清过氧化氢酶[J]. 临床检验杂志, 1994, 12(1): 6-8.
- [18] 李忠光,龚明. 植物多酚氧化酶活性测定方法的改进[J]. 云南师范大学学报, 2005, 25(1): 44-49.
- [19] Haug R T. The practical handbook of compost engineering[M]. Lewis Publishers, Boca Raton: CRC Press, 1993.
- [20] 何惠霞,徐凤花,赵晓峰,等. 低温下牛粪接种发酵剂对堆肥温度与微生物的影响[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(1): 54-58.
- [21] Bernal M P, Paredes C, Cegarra J, et al. Maturity and stability Parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes[J]. Bioresource Technology, 1998, 63: 91-99.
- [22] 徐大勇,黄为一. 人工接种和自然堆肥酶活性变化及其与堆肥腐熟程度的关系[J]. 淮北煤炭师范学院学报:自然科学版, 2008, 29(3): 22-27.