

# 对里氏木霉 Rut C-30 所产非淀粉多糖酶系的分析

程 池<sup>1</sup> 乐易林<sup>2</sup> 熊 涛<sup>2</sup> 姚 粟<sup>1</sup> 曾哲灵<sup>2</sup>

1( 中国食品发酵工业研究院 北京 100027 ) 2( 南昌大学生命科学学院 南昌 330047 )

**摘 要** 通过里氏木霉 Rut C-30 以稻草和麸皮为基质进行固态发酵 ,对其产生的非淀粉多糖酶 ( NSP 酶 ) 进行分析 ,试验表明里氏木霉 Rut C-30 产生的 NSP 酶系较全 ,分别有纤维素酶、木聚糖酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、 $\beta$ -甘露聚糖酶、果胶酶等 5 种不同的 NSP 酶。并探讨了不同碳源及添加不同底物诱导物对里氏木霉 Rut C-30 产生的 NSP 酶系的影响。

**关键词** 里氏木霉 Rut C-30 非淀粉多糖 ,非淀粉多糖酶

里氏木霉 Rut C-30 是一种腐生丝状真菌 ,能分解不同植物材料产生多种酶类 ,目前已分离纯化到的有纤维素酶<sup>[1]</sup>、木聚糖酶<sup>[2]</sup>等。国内外也对其进行了广泛的研究<sup>[2~5]</sup>。

非淀粉多糖( NSP )是植物组织中除淀粉外所有碳水化合物的总称。NSP 可分为可溶性 NSP( SNSP )和不可溶性 NSP( INSP )。 $\beta$ -葡聚糖和木聚糖是 2 种较为重要的 SNSP。其中影响动物对饲料消化作用的主要是可溶性 SNSP。现在普遍认为 ,SNSP 可使食糜粘度升高 ,影响胃肠道运动对食糜的混合效率 ,从而影响消化酶与底物接触和消化产物向小肠上皮绒毛渗透<sup>[6]</sup>。

非淀粉多糖酶( NSP 酶 )包括纤维素酶、木聚糖酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、 $\beta$ -甘露聚糖酶、果胶酶等。目前人们寻找的能产生各种 NSP 酶的菌株有绿色木霉、红色木霉、黑曲霉和索状青霉等<sup>[7]</sup>。文中利用里氏木霉 Rut C-30 ,以稻草和麸皮作为基质进行固态发酵 ,对其产生的 5 种主要的非淀粉多糖酶( NSP 酶 ) 进行分析。

## 1 材 料

### 1.1 菌 种

里氏木霉( *Trichoderma reesei* )Rut C30 , CICC 13052( 56765 ) ,由中国工业微生物菌种保藏中心( CICC )提供。

### 1.2 底 物

杭州新华一号快速定性滤纸 ,木聚糖 :Sig-

ma 公司产品 ; $\beta$ -葡聚糖 :CICC 自制 ;魔芋精粉 :由武汉东方天琪生物工程有限公司提供 ;果胶 :Sigma 公司产品。

### 1.3 培养基

#### 1.3.1 斜面培养基

麦芽汁培养基 :麦芽汁 琼脂 2%。

#### 1.3.2 固态发酵培养基<sup>[8]</sup>

稻草 ,麸皮 ,无机盐 ,适量水分。

## 2 方 法

### 2.1 斜面培养

菌种于斜面培养基上 30℃ 培养 6 d 后 ,放置冰箱中备用。

### 2.3 固态发酵培养

在 250 mL 三角瓶中装料 35 g ,用接种环挑取 2~3 环孢子与菌丝混合物于 1 mL 无菌水中接种到 35 g 固态培养基中 ,搅拌混匀。固态培养基于 30℃ 培养 5 d。发酵后酶曲风干备用。

### 2.3 粗酶液的制备

称取一定量的固体酶用蒸馏水适当稀释。

### 2.4 酶活测定方法

#### 2.4.1 纤维素酶活测定方法

参见国家轻工行业标准 QB2583—2003 中 滤纸酶活力( FPA )的测定方法。

滤纸酶活力定义 :1 g 固体酶 ,在( 50  $\pm$  0.1 )℃、pH4.8 的柠檬酸钠缓冲液中 ,水解滤纸底物 1 h ,产生出相当于 1 mg 葡萄糖的还原糖量 ,为 1 个酶活力单位 ,以 u/g 表示。

第一作者 学士 高级工程师。

收稿时间 2004-05-27

DNS 试剂 :称取  $10 \pm 0.1$  g 3,5-二硝基水杨酸,置于 600 mL 水中,逐渐加入 10 g NaOH,在 50℃ 水浴中搅拌溶解,再依次加入 200 g 酒石酸钠、2 g 重蒸苯酚和 5g 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,待全部溶解后冷却至室温,用水定容至 1 000 mL。贮存于棕色瓶中,于暗处放置 7 d 后使用。

测定方法 :取 25 mL 具塞试管准确加入 1.5 mL 0.05 mol/L, pH4.8 的柠檬酸钠缓冲液。分别准确加入稀释好的待测酶液 0.5 mL (其中对照管不加酶样)。将折成 M 型的滤纸 (杭州新华一号快速定性滤纸制成宽 1 cm,长 6 cm,质量为  $50 \pm 0.5$  mg) 加入到试管中。(  $50 \pm 1$  )℃ 水浴中准确反应 60 min。立即加入 3.0 mL DNS 试剂。于对照管中加入 0.5 mL 酶样,摇匀。同时放入沸水浴中煮沸 10 min。取出迅速冷却至室温,加水定容至 25 mL,摇匀。在 540 nm 处测吸光值。

#### 2.4.2 木聚糖酶活测定方法

1% 的木聚糖溶液 :准确称取 1.000 g 木聚糖溶解后用蒸馏水定容到 100 mL。

DNS 试剂 0.05 mol/L pH4.8 的柠檬酸钠缓冲液的配制同 2.4.1 节。

酶活定义 :1 g 固体酶,在(  $50 \pm 0.1$  )℃、pH4.8 水解木聚糖底物 1 h,产生出相当于 1 mg 木糖的还原糖量,为 1 个酶活力单位,以 u/g 表示。

测定方法 :取 25 mL 刻度具塞试管,准确加入 0.5 mL 0.05 mol/L, pH4.8 的柠檬酸钠缓冲液。加入 1 mL 1% 的木聚糖溶液,预热 5 min 后加入 0.5 mL 酶液在(  $50 \pm 1$  )℃ 水浴中准确反应 30 min。立即加入 3 mL DNS 试剂,于对照管中加入 0.5 mL 酶样,摇匀。同时放入沸水浴中煮沸 10 min。取出迅速冷却至室温,加水定容至 25 mL,摇匀。在 540 nm 处测吸光值。

#### 2.4.3 $\beta$ -葡聚糖酶活测定方法

参照 DNS 法测定饲用  $\beta$ -葡聚糖酶活力的方法<sup>[9]</sup>,只改变以下情况 :

定义 :每小时产生 1 mg 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位。

底物为 1%  $\beta$ -葡聚糖溶液。准确称取 1.000 g 木聚糖溶解后用蒸馏水定容到 100 mL。

缓冲液 :0.05 mol/L, pH 4.8 柠檬酸钠缓冲液。

DNS 试剂的配制同 2.4.1 节。

#### 2.4.4 $\beta$ -甘露聚糖酶活测定

定义 :每小时产生 1 mg 还原糖的酶量为 1 个酶活力单位。

底物为 1% 魔芋精粉溶液。准确称取 1.000 g 魔芋精粉,溶解后用蒸馏水定容到 100 mL。

缓冲液和 DNS 试剂的配制同 2.4.1 节。

测定方法 :取 25 mL 刻度具塞试管准确加入 0.5 mL 0.05 mol/L, pH4.8 的柠檬酸钠缓冲液。加入 1 mL 1% 的魔芋精粉溶液,预热 5 min 后加入 0.5 mL 适当稀释好的酶液在(  $50 \pm 1$  )℃ 水浴中准确反应 30 min。立即加入 3 mL DNS 试剂,于对照管中加入 0.5 mL 酶样,摇匀。同时放入沸水浴中煮沸 10 min。取出迅速冷却至室温,加水定容至 25 mL,摇匀。在 540 nm 处测吸光值。

#### 2.5.5 果胶酶的测定方法

参照 QB 1502—1992。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 里氏木霉 Rut C-30 在不同碳源中的产酶情况

以稻草、麸皮、稻草( 70% )+ 麸皮( 30% )3 种不同的碳源为基料进行固态发酵,对里氏木霉 Rut C-30 产生的 NSP 降解酶系进行分析。对 5 种主要的 NSP 降解酶活力测定结果见表 1。

从表 1 可看出,里氏木霉 Rut C-30 在固态发酵过程中产生的 NSP 酶系较全。以 3 种不同碳源为培养基时,NSP 酶系的组成有所变化。当以稻草为唯一碳源时,除果胶酶以外,木聚糖酶、纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶和  $\beta$ -甘露聚糖酶的活性普遍偏低;以麸皮为唯一碳源时,木聚糖酶和纤维素酶的活性最高;以稻草( 70% )+ 麸

表 1 里氏木霉 Rut C-30 在不同碳源中的酶系情况

碳源	纤维素酶 /u·g <sup>-1</sup>	木聚糖酶 /u·g <sup>-1</sup>	β-葡聚糖酶 /u·g <sup>-1</sup>	β-甘露聚糖酶 /u·g <sup>-1</sup>	果胶酶 /u·g <sup>-1</sup>
稻草( 70 % )+ 麸皮( 30 % )	226.74	9 003.29	13 835.99	888.69	640.20
稻草	165.29	5 405.98	9 694.73	586.35	629.19
麸皮	251.22	12 596.14	13 444.36	793.67	663.24

皮( 30 % )为碳源时 ,β-葡聚糖酶和 β-甘露聚糖酶的活性最高。

此外 ,由表 1 可以看出 ,在这 3 种不同碳源培养基中 ,木聚糖酶活力差别最大 ,其次是 β-甘露聚糖酶、纤维素酶与 β-甘露聚糖酶 ,而果胶酶活力在 3 种培养基中差别不大。

表 2 添加不同底物诱导物对里氏木霉 Rut-30 所酶系的影响

底物	纤维素酶 /u·g <sup>-1</sup>	木聚糖酶 /u·g <sup>-1</sup>	β-葡聚糖酶 /u·g <sup>-1</sup>	β-甘露聚糖酶 /u·g <sup>-1</sup>	果胶酶 /u·g <sup>-1</sup>
5 % 纤维素粉	272.47	9 296.42	12 905.21	1 067.93	468.21
5 % 魔芋精粉	261.96	9 773.16	13 246.48	1 642.24	458.76
5 % 果胶	229.08	7 905.17	11 685.61	926.20	604.30

从表 2 可看出 ,在里氏木霉 Rut C-30 发酵过程中加入 5 % 纤维素粉有利于纤维素酶活的提高 ,加入 5 % 魔芋精粉时 ,β-甘露聚糖酶酶活有显著提高 ,加入 5 % 果胶时 ,果胶酶酶活也有所提高。然而添加果胶时 ,产生的其他 4 种 NSP 降解酶活比添加了纤维素粉和魔芋精粉的都要低。此外 ,添加不同底物诱导物对里氏木霉 Rut C-30 在发酵过程中产生的 β-葡聚糖酶和木聚糖酶影响不大。

4 结 论

里氏木霉 Rut C-30 在以稻草、麸皮为基质进行固态发酵过程中产生的 NSP 降解酶系较全 ,有 :纤维素酶、木聚糖酶、β-葡聚糖酶、β-甘露聚糖酶、果胶酶。其中木聚糖酶和 β-葡聚糖酶活性较高。

里氏木霉 Rut C-30 以不同的碳源为基料 ,进行固态发酵 ,产生的各种 NSP 降解酶的比例存在差异。并且在培养基中加入不同的底物诱导物可以改变发酵过程中产生的 NSP 降解酶系的比例。因此在饲料工业生产中可以根据需要 ,考虑在发酵过程中通过添加不同的底物来提高某种 NSP 酶活。

致谢 :感谢中国食品发酵工业研究院刘妙

3.2 添加不同底物诱导物对其酶系的影响

在稻草( 70 % )+ 麸皮( 30 % )培养基中分别添加 5 % 纤维素粉、5 % 魔芋精粉、5 % 果胶进行固态发酵 ,对 5 种主要的 NSP 降解酶活力的测定结果见表 2。

莲高级工程师对实验的指导 ,以及中国工业微生物菌种保藏中心工作人员的帮助。

参 考 文 献

1 Kiran L Kadam ,William J Keutzer. Enhancement in cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C-30 due to citric aci[ J ]. Biotechnol Lett ,1995 ,17( 10 ) :111~1114

2 Michael J Bailey ,Johanna Buchert ,Liisa Viikari. Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan- and cellulose-based media[ J ]. Appl Microbiol Biotechnol ,1993 ,40 :224~229

3 余晓斌 ,具润谟. 里氏木霉 Rut C-30 液态发酵法生产纤维素酶[ J ]. 无锡轻工大学学报 ,1998 ,17( 2 ) :6~10

4 刘超纲 ,勇 强 ,余世袁. 里氏木霉诱导合成木聚糖酶的调控[ J ]. 南京林业大学学报 ,1999 ,23( 3 ) :29~32

5 洪 枫 ,陈 牧 ,勇 强. 里氏木霉制备木聚糖酶的产酶历程[ J ]. 南京林业大学学报 ,1998 ,22( 1 ) :31~36

6 杨 英 ,陈仲达. β-葡聚糖酶和木聚糖酶在畜禽营养中的研究及应用进展[ J ]. 饲料研究 ,2002( 7 ) :7~8

7 刘 强 ,冯学琴. 非淀粉多糖酶制剂的研究与应用进展[ J ]. 动物营养学报 ,1999 ,11( 2 ) :6~11

8 夏黎明. 纤维废料固态发酵产纤维素酶的研究[ J ].

林产化学与工业,1999,19(1):6~10

糖酶活力[J].中国饲料,1999,18:26

9 刘永举,王清吉,王江青等.DNS法测定饲用 $\beta$ -葡聚

## Study of NSP Enzymes Produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30

Cheng Chi<sup>1</sup> Le Yilin<sup>2</sup> Xiong Tao<sup>2</sup> Yao Su<sup>1</sup> Zeng Zheling<sup>2</sup><sup>1</sup> China National Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing, 100027)<sup>2</sup> College of Life Science of Nanchang University, Nanchang, 330047)

**ABSTRACT** NSP enzymes production was carried out by solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* Rut C-30 in straw and bran culture medium. There were five NSP enzymes, namely cellulase, xylanase,  $\beta$ -glucanase,  $\beta$ -mannase and pentinase. NSP enzymes produced in different carbon source and in different substrates were discussed.

**Key words** *Trichoderma reesei* Rut C-30, NSP, NSP enzyme

### 绿色市场认证出新规

政策、法规、标准

据悉,国家认监委与商务部联合制定的《绿色市场认证实施规则》将于6月30日起正式实施。《规则》对从事绿色市场认证的认证机构、认证人员等均提出明确要求。

据介绍,制定《绿色市场认证实施规则》是为了推进全国“三绿工程”建设,促进我国农副产品、食品流通环节的标准化建设和认证,建立确保食品安全的流通网络体系,确保农副产品、食品的流通安全,维护消费者权益。

绿色市场指的是经认证的蔬菜批发市场、水果批发市场、肉禽蛋批发市场、水产品批发市场、粮油批发市场、调味品批发市场等专营批发市场和农副产品综合批发市场,食品生鲜超市等专营农副产品的零售市场以及大型综合超市大卖场、仓储式商场、便利店等兼营农副产品的零售场所。

设立从事绿色市场认证的认证机构应符合《认证认可条例》、《绿色市场认证管理办法》等相关条款的要求。申请设立认证机构的单位应熟悉农副产品流通行业组织的管理结构、经营环境、设施设备、商品准入过程和信用管理等状况,熟悉食品安全、环境安全管理,熟悉该行业的有关法律、法规、技术标准及其他要求。

认证机构中从事与绿色市场认证相关活动的人员应具备必要的教育、工作经历,具备农副产品批发或零售市场相关工作经验或接受相关内容的培训,并具有与市场所经销产品的生产、储存、运输和销售相应的质量、卫生、安全和环境保护等方面的专业知识。

### 国际市场流行的酸乳

市场动态

海藻酸乳,是目前日本市场上出售的一种很受消费者欢迎的酸乳。它是在酸乳中添加一定比例的海藻提取浓缩物。这种酸乳富含多种维生素、矿物质微量元素及核酸等,具有防病健身及美容等作用,并且口味颇佳。

老年酸乳,是由英国的一家大型乳品企业的科研人员根据老年人的自身特点所设计开发的一种酸乳,其中添加了镁、钙、锗、纤维素、 $\beta$ -葡萄糖等多种保健营养因子。实践证明,这种酸乳具有利大便、降血脂、增进食欲、激活免疫细胞和延缓衰老等作用。

珍珠酸乳,由新西兰的乳品专家们在酸乳中添加了一定量的五颜六色的人造彩球,这种酸乳因含有的彩球形似珍珠而得名。其中不同的彩球分别呈现出不同的风味,所以使得食用者在饮用酸乳的时候可以品出多种风味,颇具趣味性。因而该产品一经推出即受到消费者的青睐。

酸乳冰淇淋,进几年来,冰淇淋已不再限于夏季食用,而成为四季畅销的消闲食品之一,还是西餐中常备的甜食点心。酸乳冰淇淋是按冰淇淋的配方要求,先将适量的稀奶油、乳粉、稳定剂、蔗糖、香精调配均匀,并经过巴氏杀菌和冷却,然后配入酸乳,按冰淇淋的生产工艺进行凝冻、硬化,制成酸乳冰淇淋。其特点是风味独特,而且乳酸菌在低温条件下存活期较长,有益于人体健康。