

玉米芯酶法制取低聚木糖的研究

石波 李里特

(中国农业大学食品学院)

摘要 低聚木糖又名木寡糖,是一种具有多种保健功能的食品添加剂,主要以富含半纤维素的原料经一定的加工方式制得。介绍了采用 sp. E-86 菌株制备木聚糖酶的详细过程,探讨了发酵时间与木聚糖酶活性以及木聚糖酶液 pH 值之间的关系,同时提供了一种以玉米芯为原料,采用质量分数为 2% 的 NaOH 溶液预处理,通过 sp. E-86 菌株产木聚糖酶酶解制备低聚木糖的试验方法。考察了不同酶解反应时间条件下低聚木糖产物平均聚合度的变化情况,并用 TLC 法测定出本研究所得的产物是以木糖、木二糖为主的低聚木糖产品。

关键词 玉米芯; 木聚糖酶; 低聚木糖

中图分类号 TS 201.25; TS 261.9

Study on Preparation of Xylooligosacchrides From Corncoobs by Enzyme System

ShiBo LiLite

(College of Food Science and Engineering, CAU)

Abstract The detail processing for preparing the xylanase from sp. E-86 strain is investigated. The relationship among the fermentation time to the xylanase activities, and the pH of the xylanase solutions are discussed. A method of preparing xylooligosacchrides from corncoobs is introduced. The corncob powder was treated with 2% NaOH solution, and then degraded to xylooligosacchrides by the xylanase of sp-E86 strain. The variability of the xylooligosacchrides' degree of polymerization (D. P) under different enzyme reaction times was studied. The TLC results showed that the main components in the products are xylose and xylobiose.

Key words corncob; xylanase; xylooligosacchrides

低聚木糖也称木寡糖,由 2~ 7 个木糖聚合而成^[1],是一种由半纤维素降解而得的低度聚合物。由于人体胃肠道内没有水解低聚木糖的酶系统,因此它不被消化吸收而直接进入大肠,优先为双歧杆菌所利用,是双歧杆菌的增殖因子。另外,低聚木糖在酸性条件(pH= 2.5)下加热,也基本不分解,具有耐酸、耐热、不易分解等特点,较适合用在酸奶、乳酸菌和碳酸饮料等酸性饮料当中^[2]。

低聚木糖主要以富含半纤维素的玉米芯、稻壳、棉籽壳、秸秆和稻草等为原料,经过一定的处理制得。每年我国大约可均产玉米芯 0.4 亿 t^[3],目前仅利用 10%~ 15%,绝大部分被白白燃烧掉,因此如何利用这些废弃物使之造福于人一直是人们关注的课题,为此笔者以玉米芯为

收稿日期: 2000-09-29

石波,北京清华东路 17 号 中国农业大学(东校区)214 信箱, 100083

原料,进行了生物分解制取低聚木糖的试验研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

玉米芯,中国农业科学院北京昌平南口基地当年产;桦木木聚糖,自制;菌种, sp. E-86,日本筑波大学农学系食品生化学实验室提供。

化学试剂:生化试剂有牛肉胨、酵母培养物和琼脂;分析纯有 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , 浓盐酸和 NaOH 。

1.2 仪器与设备

摇床和发酵罐(5 L), WASHIYA B D-SCIENCE CO. LTD 生产;恒温水浴槽(M N F-80),大洋科学工业株式会社生产;pH 计(ϕ 0)和紫外-可见光分光光度计(DU-65),美国 Backman 公司生产;玻璃旋转真空浓缩器(RE121),荷兰BU TCH 公司生产。

1.3 试验方法

1)木聚糖酶的制备。培养基有 2 种:a. 斜面培养基。桦木木聚糖 1.4%(质量分数,下同),牛肉胨 0.1%,酵母培养物 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 琼脂 1.2%; pH 值 5.7。b. 产酶基础培养基。桦木木聚糖 2%,牛肉胨 1%,酵母培养物 0.3%, KH_2PO_4 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%。

产酶培养液。桦木木聚糖 2.4%,牛肉胨 1.4%,酵母培养物 0.3%, KH_2PO_4 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%。

酶液的发酵制取。a. 接种物液体扩大培养。在 500 mL 三角瓶中加入 100 mL 已配好的产酶培养液, 121 条件下灭菌 15 min, 取出冷至室温后接入 1~2 环新鲜试管菌种, 置于恒温摇瓶振荡器上, 35 , 125~130 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养 2 d。b. 木聚糖酶制备。在 5 L 小型发酵罐中加入 3 L 已配好的产酶培养液, 121 条件下灭菌 15 min, 冷至室温后接入 200 mL 液体菌种(已振荡培养 2 d), 发酵控制温度 35 , 空气通入量 2 L $\cdot \text{min}^{-1}$, 搅拌速率 600 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。发酵过程定期取样, 测定发酵液 pH 值、木聚糖酶活性。待发酵液 pH 值接近中性时, 结束发酵, 得木聚糖酶粗酶液。

酶液的精制。将发酵制得的木聚糖酶粗酶液 2.3 L 在 28~30 条件下旋转真空浓缩至约 250 mL, 移入直径为 36 mm 的透析袋中。将袋放入冰水混合物中, 流动水循环, 3 冷房中透析 5 h 得 480 mL 酶液。将该酶液移入同型号透析袋中, 3 蒸馏水中透析 8 h, 得精制酶液 600 mL。测酶活性, 置于 4 冰箱中保存备用。

2)低聚木糖的制取。称取玉米芯粉(过 5.1 mm 筛)110 g, 加入到 450 mL 质量分数为 2% 的 NaOH 溶液中, 50 水浴中保温 1.5~2 h, 离心过滤, 水洗滤饼至 pH=7, 用手挤饼渣不感到滑为止。

取 250 mL 精制木聚糖酶液, 加入 250 mL 蒸馏水, 移入盛有已预处理玉米芯粉的 1500 mL 反应器中。55 水浴中以 200~300 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速搅拌, 用 5 mol/L 的 NaOH 溶液和 HCl 保持反应液 pH 值为 5.6~5.8, 定期取样, 24 h 后停止反应。抽滤, 滤液置于沸水中煮 5 min, 冷却到室温; 薄层层析测定酶解过程生成的产物。

1.4 分析方法

木聚糖酶活性测定方法为日本筑波大学农学系食品生化学实验室提供;总还原糖和直接还原糖的测定采用 Somogyi 试剂法^[4];酶解产物测定采用 TLC 法^[5];展开剂为正丁醇 吡啶 蒸馏水=6 4 3;显色剂为对氨基苯甲酰盐酸盐 1 g, 甲醇 10 mL, 正丁醇 90 mL, 140 显色 10 min;薄层板为纤维素板(德国 Merck 公司生产)。

2 结果与讨论

2.1 发酵时间对木聚糖酶活性的影响

图 1 示出 sp. E-86 菌株在小型发酵罐中发酵产酶时,发酵时间与木聚糖酶活性的关系。可以看出,随着发酵时间的增加,木聚糖酶活性呈上升趋势。前 12 h 酶活性上升缓慢,12 h 后酶活性急剧升高,当发酵时间达到 24 h 时酶活性达到最高,然后随着时间的增长,酶活性略有降低。随着发酵时间的增加,有 NH_3 气体生成,使溶液的 pH 值上升,抑制了木聚糖酶的生成,同时造成酶活性有所下降。

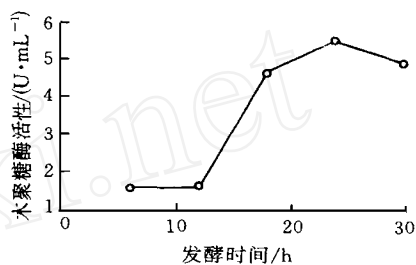


图 1 发酵时间与酶活性的关系

2.2 发酵时间对木聚糖酶液 pH 值的影响

图 2 为发酵时间与木聚糖酶液 pH 值的关系。可以看出,随着发酵时间的增加,木聚糖酶液的 pH 值总体呈上升趋势,但在 12 h 前 pH 值却出现下降之势。其原因是在 12 h 前,木糖的生成量迅速增多并参与发酵,使得 pH 值降低;12 h 后,木糖的累积量趋于平缓,同时有 NH_3 气体生成, pH 值开始出现升高之势;当发酵时间到达 30 h 时, NH_3 气体累积量达到一定的值,木聚糖酶液的 pH 值也达到一个高值——7.04,呈现弱碱性,发酵停止。

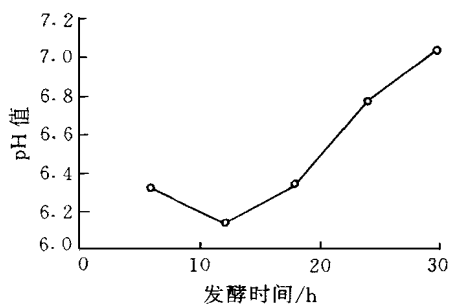


图 2 发酵时间与木聚糖酶液 pH 值的关系

2.3 木聚糖酶酶解产物分析

表 1 示出木聚糖酶酶解产物的试验结果。可以看出,酶解反应时间增加,低聚木糖生成量也随之增加,其平均聚合度则逐渐降低。这表明在木聚糖酶酶解玉米芯的过程中,首先降解下

表 1 木聚糖酶酶解产物试验结果

酶解产物	反应时间/h				
	1	3	5	8	24
总还原糖/(mg·mL ⁻¹)	12.339	21.814	27.102	29.746	31.729
直接还原糖/(mg·mL ⁻¹)	4.518	8.823	12.003	14.449	14.422
平均聚合度	2.73	2.47	2.26	2.06	2.20

注:木聚糖酶活性 22.56 U·mL⁻¹。

来的是聚合度较高的木聚糖, 随着酶解反应的深入, 木聚糖酶又将聚合度较高的木聚糖降解为聚合度较低的木聚糖, 充分体现了该木聚糖酶的内切特性。

图 3 为采用 TLC 法对 *sp.* E-86 菌株产木聚糖酶酶解玉米芯产物的测定结果。图的左端为质量分数为 1% 的标准低聚木糖溶液的 TLC 测定结果, 右侧为试验结果。

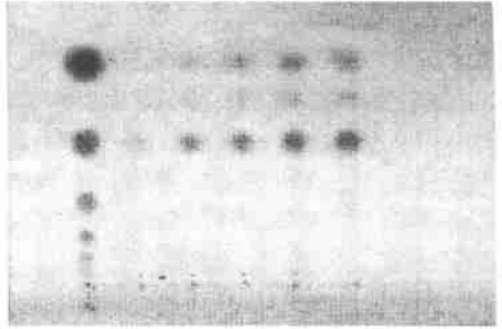


图 3 *sp.* E-86 产木聚糖酶酶解玉米芯产物的 TLC 测定结果

可以看出, *sp.* E-86 菌株产木聚糖酶酶解产物主要以木糖、木二糖为主, 另外还产生少量的木三糖和阿拉伯糖。酶解产物中没有测到葡萄糖成分, 因此可以说明 *sp.* E-86 菌株产木聚糖酶组分较纯, 纤维素酶的含量较低。

3 结 论

1) *sp.* E-86 菌株产木聚糖酶活性随着发酵时间的增加而增高, 但到 24 h 后, 酶活性略有下降, 其原因是发酵过程中产生 NH_3 气, 造成溶液的 pH 上升, 抑制了木聚糖酶的生成, 造成酶活性有所下降。

2) 随着发酵时间的增加, *sp.* E-86 菌株产木聚糖酶液的 pH 值总体呈现上升趋势, 但在前 12 h pH 值出现下降的现象, 其原因是此时间内, 木糖的生成量大量增加并参与发酵, 使得 pH 值降低。

3) 酶解反应产物低聚木糖的平均聚合度随酶解反应时间的增加呈降低趋势。TLC 测定结果表明, *sp.* E-86 产木聚糖酶酶解玉米芯产物主要是木糖、木二糖, 另有少量的木三糖和阿拉伯糖; 没有测到葡萄糖的存在。表明本试验所用的 *sp.* E-86 菌株产木聚糖酶液中主要为木聚糖酶, 纤维素酶的含量较少。

4) 以玉米芯为原料, 经稀碱液预处理后, 用 *sp.* E-86 菌株产木聚糖酶进行酶解, 可得到以木糖、木二糖为主的低聚木糖产品。

参 考 文 献

- 1 陈瑞娟 新型低聚糖的介绍 食品与发酵工业, 1993, 19(2): 82~ 90
- 2 郑建仙, 耿立萍 功能性低聚糖析论 食品与发酵工业, 1997, 23(1): 39~ 46
- 3 李相安 玉米芯特殊用途的介绍 淀粉与淀粉糖, 1995, 32(3): 17
- 4 日下部功 Studies on xylanase system of streptomycetes 农化, 1969, 43(3): 145~ 153
- 5 Yoshida Shigeki Studies on substrate specificity of b-xylanase from streptomycetes olivaceoviridis E-86: [Doctor paper] Tsukuba City: Tsukuba University, 1995