

文章编号 :1009-038X(2000)04-0340-05

低聚木糖的酶法生产

杨瑞金, 许时婴, 王 璋

(无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘 要 : 确立了玉米芯经稀酸预处理后加水蒸煮提取木聚糖, 然后再加酶水解提取液的生产低聚木糖的工艺路线. 玉米芯在质量分数为 0.1% 的 H_2SO_4 溶液中于 60 °C 下浸泡 12 h 后, 滤去浸泡液并水洗至 pH 6 左右, 然后采用液固比 10:1, 150 °C, 30 min 的蒸煮条件进行蒸煮. 结果表明, 可溶性木聚糖的提取得率达 17% (按玉米芯计), 提取液的 RS/TS 小于 33%. 提取液和渣一起用木聚糖酶进行水解, 可获得阿拉伯糖/葡萄糖/木糖/木二糖/木三糖之比为 7.7:6.8:11.5:54.1:19.8 的高纯度低聚木糖产品. 低聚木糖的质量分数大于 70% (对总糖), 且产品的可溶性总糖得率达 26.4% (对玉米芯).

关键词 : 玉米芯; 木聚糖提取; 酶法水解; 低聚木糖

中图分类号 :TS202.3

文献标识码 :A

Enzymic Production of Xylooligosaccharides

YANG Rui-jin, XU Shi-ying, WANG Zhang

(School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract : The process for production of xylooligosaccharides from corncob was conceived and tested. Corncob was pretreated by 0.1% H_2SO_4 at 60 °C for 12 hours, followed by filtration and washing with tap water to about pH 6, then steaming at 150 °C for 0.5 h (100 g corncob in 1 L water). The yield of xylan was about 17% of corncob. The extract with the residue was hydrolyzed by specific xy-lanases. The cumulative yield of xylooligosaccharides after enzymatic hydrolysis was 26.4% of corncob and the ratio of arabinose/ glucose/xylose/xylobiose/xylotriose was 7.7:6.8:11.5:54.1:19.8.

Key words : corncob ; xylan extraction ; hydrolysis by xylanases ; xylooligosaccharides

近年来, 已有多种低聚糖投入了工业化生产并应用于保健食品中, 低聚木糖就是其中的一种. 与其它低聚糖相比, 低聚木糖具有有效用量少、耐酸、耐热^[1]、能降低水分活度和防止冻结等特点. 低聚木糖除用作食品功能因子外, 还可作为保湿剂或低热量添加剂在食品中使用. 低聚木糖的主要有效成分为木二糖和木三糖, 低聚木糖的生产过程包括木

聚糖的提取和精制、木聚糖的水解和纯化几个步骤. 要获得木二糖和木三糖质量分数高的低聚木糖产品, 木聚糖的提取和水解是关键步骤.

蒸煮法提取的原理是: 木聚糖的乙酰基在高温作用下脱落形成乙酸, 体系的 pH 值下降, 在较高温度下使木聚糖 β -1,4 糖苷键断裂, 发生自水解, 木聚糖相对分子质量降低, 溶解度增大. 要获得木二糖

收稿日期: 1999-11-15; 修订日期: 2000-05-10.

作者简介: 杨瑞金 (1964-) 男, 江西瑞金人, 工学博士, 副教授.

万方数据

和木三糖质量分数高的低聚木糖产品,选用合适的木聚糖酶是关键.目前,有关水解半纤维素材料成木糖,然后进一步加以利用的木聚糖酶和造纸用木聚糖酶的研究较多^[2~4],而对生产低聚木糖的研究国内未见报导.微生物生产的木聚糖酶是一种多酶体系,含有内切木聚糖酶、端切木聚糖酶和木糖苷酶等^[5,6].不同来源的木聚糖酶的酶系有所不同,要生产出木二糖和木三糖质量分数高而木糖质量分数低的高纯度的低聚木糖产品,就必须选用内切木聚糖酶酶活高而木糖苷酶活力低的木聚糖酶.本研究采用从土壤中筛选得到的一株顶青酶产的木聚糖酶(系)来水解木聚糖.该木聚糖酶(系)的内切木聚糖酶酶活高而木糖苷酶活力极低,水解获得的低聚木糖纯度很高.该顶青酶的酶液和由它制得的低聚木糖为实际无毒($LD_{50} > 10\text{ g/kg}$).

1 材料与方法

1.1 实验材料

- 1.1.1 桦木木聚糖 Sigma 公司产品.
- 1.1.2 玉米芯木聚糖 按文献 7 的方法提取,此法提取的木聚糖纯度不高,含有木质素等其它成分,多聚木糖的质量分数为 65% 左右,称之为粗木聚糖.
- 1.1.3 木二糖 Sigma 公司产品.
- 1.1.4 CMC Sigma 公司产品.
- 1.1.5 玉米芯 滨海三爱集团提供,粒径为 1 mm 左右.

1.2 分析方法

- 1.2.1 还原糖的测定 采用 DNS 法^[8].
- 1.2.2 总糖的测定 取一定量的提取液,加入硫酸,使 H_2SO_4 质量分数达 6.5%, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水解 2 h,碳酸钡中和后定容,过滤,测定滤液的还原糖质量分数^[9].
- 1.2.3 可溶性总糖的测定 样品于 $3\,000\text{ r/min}$ 离心 20 min,取一定量上清液按 1.2.2 的方法测定总糖,所得结果即为可溶性总糖.
- 1.2.4 糖醛的测定 紫外可见分光光度法测定.
- 1.2.5 样品的糖分组成 离子色谱法测糖分组成.色谱条件为: Dionex 2010-I 离子色谱仪, Car-bopac PA1-PG1 柱,淋洗液为 0.15 mol/L NaOH ,脉冲安培检测器.

2 结果与讨论

2.1 木聚糖的提取

木聚糖的提取过程中不仅要充分提取木聚糖,

同时还要保证其降解生成的木糖量较少.

木聚糖的大规模直接提取或通过控制水解来提高其溶解度的研究报导极少,为此首先进行了几种酸的低浓度直接水解试验.结果表明,当总糖提取率较高时,提取液的还原糖/总糖(RS/TS)的比率较高,即酸法直接水解易引起木聚糖主链的过度水解,这对高纯度低聚木糖的生产是不利的.因此采用酸法直接水解提取木聚糖不合适.

2.1.1 直接高温蒸煮 高温蒸煮提取是利用木聚糖含有的乙酰基侧链在高温蒸煮时脱乙酰,形成乙酸,体系的 pH 值下降,木聚糖分子发生自水解,使溶解度增加的原理进行的.

从表 1 中可以看出,不加酸直接高温蒸煮所得提取液的 RS/TS 都比较低.蒸煮温度为 $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时总糖溶出达 19.3% (按玉米芯计),但 RS/TS 只有 33%,这对低聚木糖的生产有利.糖醛的数据表明,糖类物质在微酸性条件(蒸煮液的 $\text{pH}\ 3.6\sim 4.0$)下的分解反应与温度密切相关.温度每提高 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$,分解反应的速率提高约 2 倍, $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时糖醛的质量浓度达 1.46 mg/mL .

表 1 不加酸直接高温蒸煮提取木聚糖

Tab.1 Xylan extraction by cooking			
蒸煮温度/ $^{\circ}\text{C}$	溶出 TS/ %	(RS/TS)/ %	糖醛质量浓度/ (mg/mL)
170	19.3	33	1.46
160	16.8	31.5	0.83
150	13.1	30.5	0.49
140	5.2	32	0.21

尽管高温蒸煮所得提取液的 RS/TS 都比较低,总糖溶出率也比较低,为了达到相对较高的总糖溶出率,蒸煮温度要比较高,蒸煮液糖醛的质量浓度也较高.酸法蒸煮试验结果表明,提高酸度可显著提高总糖溶出率,但蒸煮液的糖醛的质量浓度不会以同样的速率升高.因此,选用玉米芯先进行酸预处理,然后再加水蒸煮.

2.1.2 酸预处理后湿法蒸煮提取 玉米芯先用质量分数 0.1% 的 H_2SO_4 在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下浸泡 12 h,滤去浸泡液,用自来水洗涤 2 次,然后按固液比为 1:10 加水,调至 $\text{pH}\ 6.0$,再蒸煮 30 min,结果见表 2.

表 2 的结果表明,玉米芯用 0.1% 的 H_2SO_4 在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下浸泡 12 h 后进行蒸煮提取的木聚糖要比直接蒸煮的多 30% 左右,蒸煮温度为 160, $170\text{ }^{\circ}\text{C}$, RS/TS 有较大的提高,糖醛质量分数也有较大的提高.但在 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的蒸煮温度下,上述三项指标均处于较好的水平,总糖的溶出量达 17.9% (按玉米芯

表 2 玉米芯用质量分数 0.1%的 H₂SO₄ 预处理后
湿法蒸煮提取木聚糖

Tab. 2 Xylan extraction from corncob by pretreatment with 0.1% H ₂ SO ₄ followed by cooking			
蒸煮温度/ ℃	溶出 TS/ %干物料	(RS/TS) %	糖醛质量浓度/ (mg/mL)
170	23.1	54.2	2.05
160	21.6	44.8	1.26
150	17.9	32.3	0.67
140	7.26	32.2	0.34

表 3 玉米芯经 0.1% H₂SO₄ 预处理后蒸煮得到的提取液成分
Tab.3 Composition of extracts obtained by pretreatment with 0.1% H₂SO₄ followed by cooking

试验号	蒸煮温度/ ℃	总糖质量 分数/%	木糖质量 分数/%	木二糖质量 分数/%	木三糖质量 分数/%	木四糖质量 分数/%	木五糖质量 分数/%	糖醛质量 浓度/(mg/mL)
1	170	2.76	7.0	31.9	25.4	18.0	6.8	1.46
2	170	4.45	27.5	35.2	26.0	9.0	2.3	2.05
3	160	3.81	15.0	35.1	29.8	14.7	5.5	1.26
4	150	2.76	7.5	37.7	31.8	13.3	3.8	0.67
140	1.32	12.5	35	36.5	16.1	—	0.34	

注 :1 号为对照样 ,未经硫酸浸泡预处理 ,其它均经 0.1% 硫酸预处理 ,蒸煮时间均为 30 min.

2.1.3 酸预处理后干法蒸煮提取 从上面的实验结果可知 ,酸度和温度是影响木聚糖提取率和提取过程中副反应的重要因素 ,适当提高酸度可降低蒸煮温度和副反应的程度 .为此将玉米芯于 60 ℃ 的 0.1% 的 H₂SO₄ 浸泡 ,洗去表面的酸后进行干法蒸煮 (不加水蒸煮) ,然后按固液比 1:12 加水于干法蒸煮后的玉米芯中 ,用组织捣碎机打浆提取其中的木聚糖 .提取物用滤布过滤 ,滤液即为提取液 .对滤液进行分析 ,结果见表 4.

表 4 酸预处理后干法蒸煮提取木聚糖
Tab.4 Xylan extraction by acidic treatment followed by steaming

蒸煮温度/ ℃	溶出 TS/ %干物料	(RS/TS) %	糖醛质量浓度/ (mg/mL)
150	25.4	53.1	0.35
140	18.4	38.5	0.20
135	13.7	27.4	0.12
130	6.92	27.5	0.08

表 4 的结果表明 ,干法蒸煮比湿法蒸煮更好 ,蒸煮温度可进一步降低 10~15 ℃ .温度降低后 ,副反应程度也大大降低 (糖醛质量浓度大大降低) .干法蒸煮可比湿法蒸煮的温度更低 ,这是因为不加水蒸煮时玉米芯颗粒内部保留了一部分酸 ,浸泡预处

计) ,即木聚糖的提取率为 50% (原料玉米芯的木聚糖质量分数为 35%) ;RS/TS 为 32.3% ,提取液的木糖质量分数只有 7.5% ,糖醛的质量浓度为 0.67 mg/mL ,见表 3.

表 3 的结果表明 ,未加酸预处理的 170 ℃ 蒸煮的提取液的低聚糖的总量仅相当于经酸预处理的 150 ℃ 蒸煮的提取液的含量 ,提取液低聚糖的组成也与经酸预处理的 150 ℃ 蒸煮液的大致相同 ,但后者的糖醛质量分数只有前者的一半左右 .因此 ,加酸预处理后蒸煮的方法优于直接蒸煮.

理时吸入的) ,因而颗粒内部的酸度相对较高 .另外 ,干法蒸煮也有利于糖醛等物质的挥发 .综合考虑蒸煮温度对木聚糖提取率、木聚糖降解程度和副反应程度三方面的影响 ,适宜的干法蒸煮条件为 135~140 ℃ ,蒸煮时间为 30 min.

2.2 木聚糖的水解

2.2.1 碱法提取木聚糖的酶法水解 将碱法提取的粗木聚糖 (木聚糖质量分数为 65%) 用 pH 4.0 , 0.2 mol/L HAc/NaAc 缓冲液配成固形物质量浓度为 2.356.58 g/dL 的玉米芯木聚糖悬浮液 (木聚糖的实际质量浓度分别为 1.3,1.95,3.25,4.2,5.2 g/dL) ,按 20 U/g 的加酶量在 40 ℃ 下进行水解 .图 1~3 分别为还原糖、可溶性总糖和底物质量浓度为 5 g/dL 时水解液糖分组成随水解时间的变化情况 .

实验结果表明 ,还原糖和总糖在水解开始阶段增加较快 ,5 h 后增加速度开始减慢 ,24 h 后仍有增加的趋势 .为获得更高的水解率 ,可以进一步延长水解时间 .底物质量分数为 2% 时 ,水解率可达 80% .随着底物质量分数的提高 ,水解率会有所下降 .当底物质量分数为 6.5% 时 ,24 h 的水解率为 60% .因此实际应用时底物质量分数为 5%~6% .

酶水解玉米芯木聚糖的糖分组成随时间的变化规律为 :在水解开始阶段形成的产物中 ,木三糖的比例大于木二糖的比例 .随着水解时间的进一步

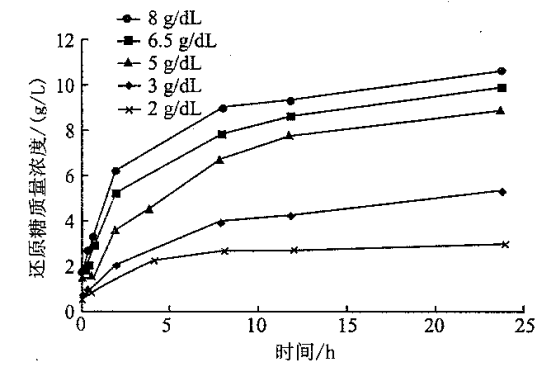


图 1 还原糖随水解时间的变化

Fig.1 Changes in reducing sugar during the enzymatic hydrolysis of xylan extracted by alkline treatment

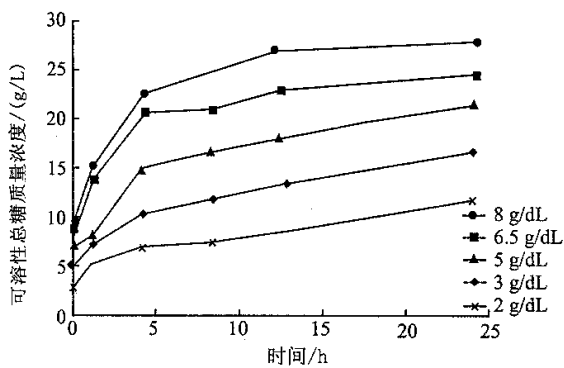


图 2 可溶性总糖随水解时间的变化

Fig.2 Changes in soluble sugar during the enzymatic hydrolysis of xylan extracted by alkline treatment

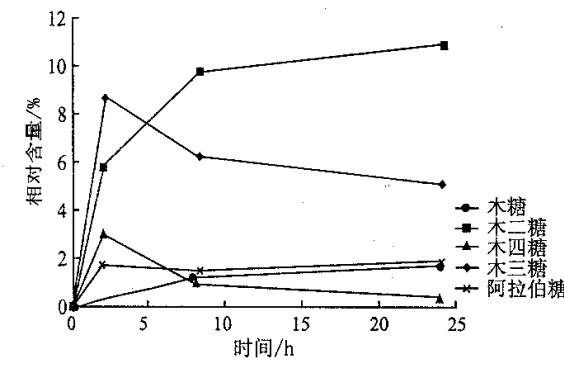


图 3 糖分组成随水解时间的变化

Fig.3 Concentration profiles of xylose, xylobiose, xylotriose, and xylotetraose produced by enzymatic hydrolysis of extract

延长,木二糖的比例升高而木三糖的比例下降,同时木糖的比例也有所上升.木四糖在开始阶段有一定比例,但随着水解过程的继续,木四糖的比例逐步降低并趋于零,木糖的比例随水解时间的延长逐步升高,但 48 h 后仍达不到 10%,而水解产物中木二糖和木三糖的比例相当高,见表 5.

表 5 蒸煮法提取液加酶水解得到的水解产物的还原糖和可溶性总糖质量分数

Tab.5 The concentration of reducing sugar and total soluble sugar of hydrolysate %		
分析项目	水解前	加酶水解后
还原糖质量分数	0.671	1.65
可溶性总糖质量分数	1.94	2.86

从还原糖的生成量和水解液糖分组成随时间的变化规律看,酶水解长链木聚糖时,从非还原端水解得到木三糖和木二糖的速度大于从中间裂解长链木聚糖产生四糖以上糖的速度.

2.2.2. 蒸煮法提取液加酶水解 玉米芯经 0.1% H_2SO_4 于 60℃ 浸泡 12 h 后,滤去浸泡液,经上述预处理的玉米芯用固液比 10:1,150℃,30 min 的蒸煮条件蒸煮,木聚糖的提取率可达到 17%(按玉米芯计).将提取液和渣一起添加木聚糖酶进行水解,水解产物的可溶性总糖的得率达 26.4%(按木聚糖含量为 35% 的玉米芯计),水解产物中木二糖和木三糖等低聚糖的质量分数达到很高的水平,见表 6.

表 6 低聚木糖产品的组成(对总糖含量)

Tab.6 Composition of product (based on total sugar) %		
成分	碱法提取木聚糖酶解产品	蒸煮法提取木聚糖酶解产品
阿拉伯糖	9.5	7.7
木糖+葡萄糖	11.4	18.3
木二糖	53.8	54.2
木三糖	25.3	19.8
总低聚木糖	79.1	74.0

从酶解产物的组成看,采用碱法提取木聚糖和蒸煮法提取木聚糖得到的产品极为相似,木二糖和木三糖质量分数均较高.它们之间的差异在于,蒸煮法提取木聚糖的酶解产物中有少量的葡萄糖,而碱法提取木聚糖的酶解产物中则没有.这主要是由于蒸煮法提取木聚糖时有少量的葡萄糖溶出.在工业化生产时,采用蒸煮法提取木聚糖再加酶水解的生产低聚木糖的工艺路线.

3 结 论

玉米芯经 0.1% H_2SO_4 于 60℃ 浸泡 12 h 后,采用固液比为 10:1,150℃,30 min 的蒸煮条件蒸煮,木聚糖的提取率可达到 17%(按玉米芯计),提取液的 RS/TS 小于 33%. 该法得到的提取液和渣一起用自制的木聚糖酶水解,可获得阿拉伯糖/葡萄糖/木糖/木二糖/木三糖之比为 7.7:6.8:11.5:

54.1:19.8 的高纯度低聚木糖产品(低聚木糖的质量分数大于 70%) ,且产品总糖的得率达到 26.4%

参考文献

- [1] 食品与开发编辑部. 机能性甘味料的市场动向[J]. 食品与开发, 1996, 31(11): 26~33.
- [2] 陈惠忠, 高培基, 王祖农. 产木聚糖酶菌株的选育与其液体发酵条件[J]. 微生物学报, 1990, 30(5): 351~357.
- [3] SRIDEVI RAJARAM, AJIT VARMA. Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoakalophilus* grown on agricultural wastes[J]. **Applied Microbiology Biotechnology**, 1990, 34: 141~144.
- [4] D J SENIOR, P R MAYERS, J N SADDLER. Xylanase production by *Trichoderma harzianum* E 58[J]. **Applied Microbiology Biotechnology**, 1989, 32: 137~142.
- [5] KEN K Y WONG, LARRY U L, TAN, JOHN N SADDLER. Multiplicity of β -1, 4-xylanase in microorganism. functions and application[J]. **Microbiological Review**, 1988, 9: 305~317.
- [6] PETER BIELY. Microbial xylanolytic systems[J]. **Trends in Biotechnology**, 1985, 3(11): 286~290.
- [7] WHISTLER R L. Methods in carbohydrate chemistry[M]. New York: Academic Press, 1965. 114~115.
- [8] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 人民教育出版社, 1981. 9~11.
- [9] ISAO KUSAKABE, TSUNEO YASUI, TATSUYOSHI KOBAYASHI. Studies on xylanase system of *Streptomyces*. Part 1. Some properties of extracellular xylanase from *Streptomyces*[J]. 农化, 1969, 43(3): 145~153.

(责任编辑: 李春丽)