

文章编号:1009-038X(2003)06-0085-04

# 半纤维素制备方法的改进及其应用

王雪鹏, 管斌, 汤海青, 郭姗姗

(中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 对玉米芯中半纤维素的提取方法及条件进行改进, 将蒸煮法与碱法提取相结合有效提高了半纤维素的提取率和提取纯度. 以提取的半纤维素作为选择性碳源, 可用来制备分离筛选木聚糖酶产生菌的分离培养基; 探讨了半纤维素添加方式及添加量对培养基产透明圈效果的影响.

**关键词:** 木聚糖酶; 半纤维素; 分离培养基

中图分类号: Q 539

文献标识码: A

## Improved Extraction Method for Hemicellulose and Its Application

WANG Xue-peng, GUAN Bin, TANG Hai-qing, GUO Shan-na

(College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** In this paper, the extracting methods and conditions of hemicellulose from corncob were improved, the ratio and purity of extraction were effectively raised by integration of cooking with alkali treatment. The extracted hemicellulose were used as selective carbon source for selective medium to separate and screen xylanase-producing strains. The addition manner and dose of hemicellulose which influenced transparent zones caused by the strains on the plate were studied. This selective medium could produce obvious transparent zones and the xylanase activity could be identified by these transparent zones elementarily. In this way, the efficiency of primary screening were effectively improved.

**Key words:** xylanase; hemicellulose; selective medium

低聚木糖可有效促进体内双歧杆菌增殖, 改善肠道微生态环境, 增强机体免疫力, 并且与其它功能性低聚糖相比具有有效剂量低、酸热稳定性好、选择性高等优点<sup>[1]</sup>, 低聚木糖的生产已成为目前食品工业研究开发的热点.

高产木聚糖酶菌种的分离筛选是低聚木糖酶法生产上游工程中的关键步骤之一, 透明圈法又是菌种初筛的重要方法之一. 从自然界筛选和诱变后筛选优良产酶菌都要用到大量的分离培养基, 分离

培养基成分的质量直接关系到筛选效果. 由于纯木聚糖产品价格较高, 以自制半纤维素作为选择性碳源制备透明圈明显的分离培养基一直是菌种初筛的难点. 许多文章中报道的制备方法由于其半纤维素提取纯度不高及培养基配制方法等原因, 其分离培养基分离效果不明显<sup>[2~6]</sup>.

作者从优化半纤维素提取方法及培养基配制方式入手, 探讨了一种可产生明显透明圈的分离培养基的制备方法, 所产生透明圈的大小可基本反映

收稿日期: 2003-06-05; 修回日期: 2003-08-25.

作者简介: 王雪鹏(1980-), 男, 山东惠民人, 食品科学与工程硕士研究生.  
万方数据

出酶活高低,从而可快速、实用、有效的初步筛选出优良的产木聚糖酶菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种、培养基测定方法

1.1.1 菌种 芽孢杆菌 AS-56:作者所在实验室保藏菌种。

#### 1.1.2 培养基

1) 种子培养基:组分(g/L):葡萄糖 8.0,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  3.0,  $\text{NaCl}$  5.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2, 琼脂 15. pH 7.5.

2) 选择培养基:组分(g/L): $\text{NH}_4\text{NO}_3$  3.0,  $\text{NaCl}$  5.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2, 酵母浸出汁 4.5, 半纤维素 10.0, 琼脂 15. pH 7.5.

3) 摇瓶培养基:组分(g/L):麸皮 30,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  3.0,  $\text{NaCl}$  5.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2, 半纤维素 10.0. pH 7.5.

#### 1.1.3 测定方法

1) 半纤维素提取率及纯度的测定:

$$\text{提取率} = \frac{\text{产品质量(g)}}{\text{原料质量(g)}}$$

半纤维素纯度以提取产品中的多聚糖质量分数计,多聚糖质量分数(%) = 总糖质量分数(%) - 还原糖质量分数(%).

总糖的测定:按文献[7]方法.

还原糖的测定:按文献[8]方法.

2) 酶活的测定:取 0.1 mL 适当稀释的酶液,加 1 mL 用 0.2 mol/L pH 4.8 醋酸缓冲液配制的木聚糖溶液,50 °C 酶解 30 min,用 DNS 法测定还原糖(以木糖计)<sup>[9]</sup>.

### 1.2 实验流程

培养基制备的基本过程为:

选取合适的半纤维素提取原料 → 优化半纤维素提取方法 → 改进分离培养基的制备方式 → 对照值(透明圈直径(D)/菌苔直径(d))与酶活力的关系.

### 1.3 半纤维素提取原料的选取

选择木聚糖质量分数较高的原料是有效提取木聚糖的前提,表 1 列出了部分原料纤维素、半纤维素、木质素的质量分数.从表中可以看出:玉米芯中半纤维素质量分数最高,纤维素质量分数最低,木质素质量分数居中,适合半纤维素的提取.我国玉米种植面积广、产量大,玉米芯资源相当丰富,并且利用玉米芯作为半纤维素提取原料还可有效利用这一存在广泛的可再生资源,因此选用玉米芯作

为提取原料.

表 1 部分原料中纤维素、半纤维素和木质素质量分数<sup>[10]</sup>

Tab. 1 The content of cellulose, hemicellulose and lignin in materials

原料	纤维素 质量分数/ %	半纤维素 质量分数/ %	木质素 质量分数/ %
玉米芯	32~36	35~40	23
棉子壳	44	25~28	28
桦木	45	27	20
杨木	47	24	18
稻草杆	37~39	20~22	8~11
稻穗部	41	24	33
稻叶	38	24	30
芦竹(安徽)	52	28	19
慈竹(四川)	44	25	31
淡竹	46	22	33
黄竹(四川)	57	19	23
西风竹(四川)	57	18	22
玉米杆	37	21	18
高粱杆	39	44	22
芨芨草(内蒙)	49	25	16
蔗髓	38	25	20
龙须草	55	21	13
芦苇	56	21	21
毛竹	45	21	30

### 1.4 半纤维素提取方法的优化

从玉米芯中提取半纤维素的方法主要有碱法、蒸煮法<sup>[11]</sup>和沉淀法,其中以碱法最好<sup>[12]</sup>.玉米芯中木聚糖与木质素结合在一起以木聚糖-木质素复合物的形式存在,破坏半纤维素与木质素的结合,使半纤维素与木质素分离是提高碱溶率的前提.135 °C 蒸煮 30 min 可破坏半纤维素与木质素的复合结构,使木聚糖与木质素分离<sup>[13]</sup>,但常规的碱法提取通常对原料不经预处理或预蒸煮温度不够,因此起不到破坏复合物结构的作用,从而影响提取率.

作者将此处处理条件与常规碱提取法结合起来提取半纤维素并测定提取率及提取纯度.

半纤维素提取方法:将玉米芯洗净后粉碎,135 °C 蒸煮 30 min,过滤,滤渣用 10 g/dL NaOH 80 °C 浸提 2 h (固液比为 1 g : 15 mL),过滤取滤液,用 6 mol/L HCl 中和,3 500 r/min 离心 20 min,

沉淀用体积分数 95%乙醇浸泡过夜,离心得泥状沉淀物备用。

### 1.5 分离培养基配制方法的改进

取 200 g 泥状半纤维素加入水中加热,搅拌均匀,加入其它培养基成分,定容于 1 000 mL,调 pH 至 7.5,灭菌后倒 5 mm 厚单层平板。

### 1.6 透明圈直径( $D$ )/菌苔直径( $d$ )与酶活关系

$D/d$  值是衡量透明圈产生效果的重要指标.将菌种在分离培养基上划线分离,30 ℃培养 2 d 后挑取透明圈明显、 $D/d$  值较高的菌落进行酶活测定并比较二者的关系。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蒸煮条件对半纤维素提取率及提取纯度的影响

实验表明,135 ℃蒸煮 30 min 可明显提高半纤维素提取效果,而较低温度则不能起到较大程度破坏半纤维素与木质素复合物分离半纤维素的作用(见表 2)。

表 2 蒸煮条件对提取率及提取纯度的影响

Tab. 2 Effects of digesting condition on extracting ratio and purity

处理条件	提取率/%	纯度/%
未蒸煮	25.2	58.2
100 ℃ 1 h	29.3	62.8
135 ℃ 30 min	40.7	72.6

### 2.2 碱处理条件的影响

采用不同质量浓度的碱溶液及处理时间提取半纤维素,结果表明,用 10 g/dL 的 NaOH 按固液比 1 g : 15 mL 于 80 ℃浸提 2 h 效果最好。

### 2.3 半纤维素添加方式及添加量的影响

自制半纤维素的添加方式及添加量是决定分离培养基产生透明圈效果的关键因素.许多报道中将半纤维素以固体颗粒状态添加<sup>[2~6]</sup>,此状态下半纤维素分子之间及半纤维素与木质素等大分子之间可能会重新形成部分网络结合,经蒸煮后仍不能完全分离在培养基中,从而影响菌株的利用效果,并且半纤维素颗粒分散不均匀对透明圈的观察也会造成影响.若半纤维素提取后不经干燥直接以泥状样品按比例添加至培养基中,并加热搅拌使半纤维素充分均匀的分散于培养基中则可避免上述缺点(见表 3)。

半纤维素作为选择性碳源,添加量对形成透明

圈的大小也有较大影响,培养基中过高或过低的半纤维素含量都不利于菌体的生长.实验证明 10 g/L 的添加量产生透明圈的效果最好(见表 4)。

表 3 半纤维素添加方式的影响

Tab. 3 Effects of hemicellulose addition ways on medium and transparent zones

添加方式	透明圈 $D/d$ 值/mm	培养基底色	菌落大小
固体颗粒	2.0~3.0	不均匀,分散有部分颗粒影响观察	长出菌落少且不均匀
泥状物	4.0~8.0	均匀柔和	大小均匀

表 4 半纤维素添加量对  $D/d$  值的影响

Tab. 4 Effects of hemicellulose addition on  $D/d$

添加量/(g/L)	透明圈 $D/d$ 值
5	2~3
10	4~8
15	3~5
20	2~4

注:半纤维素的添加量以纯半纤维素含量计。

### 2.4 $D/d$ 值与木聚糖酶活的关系

实验证明,在分离平板上多数产生较大水解圈的菌株其产木聚糖酶活力也较高,部分实验结果见表 5。

表 5 透明圈大小与木聚糖酶活力的关系

Tab. 5 The relationship between  $D/d$  and xylanase activity

菌株号	菌苔直径 $d$ /mm	透明圈直径 $D$ /mm	$D/d$	酶活力(U/mL)
1	2.0	9.0	4.5	98.72
2	2.0	12.0	6.0	134.76
3	1.5	8.0	5.3	148.30
4	2.0	8.0	4.0	80.03
5	1.0	8.0	8.0	179.24
6	2.0	10.0	5.0	115.25
7	1.5	9.0	6.0	151.71
8	1.0	8.0	8.0	226.38

## 3 结论

本方法制备的单层分离平板不需添加显色剂或诸如乙醇、溴化十六烷三甲基胺(CTAB)之类的多糖沉淀剂,可直接观察到明显的透明圈(见图 1)。透明圈的产生效果关键在于选择性碳源的纯度、添加量、在培养基中的分散程度以及其他成分配比是否合理。

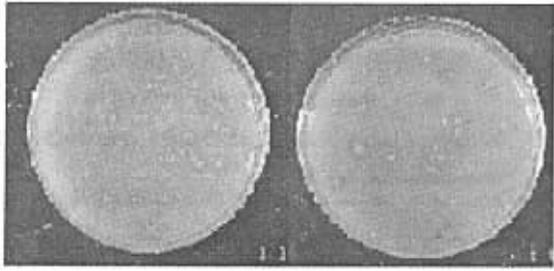


图1 分离培养基上涂布产生透明圈的菌落

Fig. 1 Transparent zones on the selective medium of hemicellulose

观察透明圈时,若菌苔直径过大则菌落间  $D/d$  值的差距不大,不利于筛选;菌苔直径过小时,由于部分菌株尚未达到产酶高峰期且不易准确测量菌苔直径,因此会增大筛选误差.所以观察透明圈和挑取菌株应选在菌种的产酶高峰期或对数生长期.筛选本菌种时菌苔直径以 2 mm 为宜.

作者与国内其他以半纤维素为选择性碳源制

## 参考文献:

- [1] 袁其朋,张怀.絮凝脱色在低聚木糖分离纯化中的应用[J].食品与发酵工业,2002,28(2):58-61.
- [2] 关宏,翟丽萍,何士敏,等.低聚木糖生产用木聚糖酶的制备和测定[J].齐齐哈尔大学学报,2001,17(2):9-11.
- [3] 周世宁,路勇军,杜扬.木聚糖降解菌的筛选和木聚糖酶性质的研究[J].中山大学学报,1996,33(1):91-96.
- [4] 禹慧明,林勇,徐有良,等.木聚糖酶高产菌株选育[J].工业微生物,2002,32(1):43-44.
- [5] Ebringerová A, Hromádková Z. Effect of ultrasound on the extractability of corn bran hemicelluloses[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2002, 9: 225-229.
- [6] 王宜磊,邓振旭.透明圈法快速筛选半纤维素分解菌[J].生物技术,2000,10(1):37-39.
- [7] 邵佩兰,徐明,朱晓红.影响玉米芯木聚糖提取的因素探讨[J].宁夏农学院学报,2002,23(2):56-57.
- [8] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426-428.
- [9] Khan A W. Enzyme Microb[J]. *Technol*, 1986, 8: 373-377.
- [10] 王丽丽,莫卫民,卢耀平,等.毛竹水解制取木糖[J].浙江化工,1996,27(2):27-31.
- [11] Gil Garrote, Herminia Dominguez, Juan Carlos Parajo. Kinetic modelling of corncob autohydrolysis[J]. *Process Biochemistry*, 2001, 36: 571-578.
- [12] 邵佩兰,徐明,李海峰,等.碱法提取玉米芯木聚糖的研究[J].宁夏农学院学报,2000,21(4):47-49.
- [13] 杨瑞金,许时婴,王璋.酶法生产低聚木糖过程中纤维素和木聚糖-木质素复合物结构的变化[J].中国粮油学报,2001,16(6):43-46.

(责任编辑:杨萌)

(上接第34页)

2) 显著的影响因素:麦芽糖与  $\beta$ -环糊精的摩尔比

$\sim 60^\circ\text{C}$ , 酶量 220~308 U/g  $\beta$ -CD, 麦芽糖与  $\beta$ -环糊精的摩尔比为 7:1~8:1, 反应时间 35~38 h.

3) 实验条件优化结果: pH 4.0~4.2, 温度 58

## 参考文献:

- [1] Takanori Shirashi. Synthesis of maltosyl(1 $\rightarrow$ 6) $\beta$ -cyclodextrin through the reverse reaction of thermostable *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase[J]. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(8): 2181-2188.
- [2] 魏众述. 生物化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996. 34.
- [3] 魏众述. 生物化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996. 138.

(责任编辑:杨勇)