

# 橄榄绿链霉菌 E-86 产木聚糖酶水解 玉米芯汽爆液生产低聚木糖

李里特, 艾志录, 江正强\*, 朱运平, 张宁  
(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘要:** 本文以橄榄绿链霉菌 E-86 产木聚糖酶水解玉米芯汽爆液生产低聚木糖为目的, 研究了玉米芯汽爆液的水解特征, 并与玉米芯木聚糖的酶解产物组成进行了比较, 得到如下结果: 加酶量 120U/100ml、酶解反应 8h 可获得较好的酶解效果, 直接还原糖量  $46\mu\text{mol/ml}$ 、平均聚合度 3.1、水解率 46%; 玉米芯汽爆液和玉米芯木聚糖的酶解产物中低聚糖组成大致相同, 主要是木二糖和少量的木三糖、木糖, 汽爆液酶解产物中还含有极少量的鼠李糖和阿拉伯糖; 玉米芯汽爆液可代替玉米芯木聚糖为底物生产低聚木糖。

**关键词:** 玉米芯汽爆液; 低聚木糖生产; 木聚糖酶; 橄榄绿链霉菌 E-86

## Xylanase of *Streptomyces olivaceovirdis* E-86 Used to Hydrolyze Steam-exploded Corn cob Extract for Xylooligosaccharides Production

LI Li-te, AI Zhi-lu, JIANG Zheng-qiang\*, ZHU Yun-ping, ZHANG Ning  
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

收稿日期: 2003-12-19 \* 通讯联系人

基金项目: 教育部研究重点项目; 国家“十五”攻关课题(2001BA708B04-06)

作者简介: 李里特(1946-), 男, 教授, 研究方向为食品科学。

回温三阶段有不同的结晶行为, 其二者降温( $28^{\circ}\text{C}$ )与回温( $32^{\circ}\text{C}$ )相比差异显著。TC(热焓值极差为  $7.04\text{J/g}$ )的晶相对热较稳定, 而 CC(热焓值极差为  $20.93\text{J/g}$ )的晶相对热不够稳定, 受温度变化影响较大。该研究结果与有关 TC 与 CC 的偏光显微镜和扫描电镜研究结果一致, 即有利于形成稳定的晶型。

综上所述, 5%~8% 茶叶粉的加入对 CTCBE 晶相的变化具有良好的影响效果, 能增强巧克力乳化体系稳定性, 降低巧克力酱料粘度, 并延长酱料平稳期, 达到了改善巧克力加工性能的目的。TC 不仅抗霜花性能好, 而且热稳定性好, 更好保存, 巧克力的品质得到了较大的改善和提高。

### 参考文献:

[1] 陈才水, 高荫榆. 以乌柏类脂(或籽)为原料制取类可可脂的方法[P]. 发明专利 CN8510005; 以乌柏类脂为原料制取类可可脂的方法[P]. 发明专利 CN8510006.

- [2] 陈才水, 高荫榆, 熊华, 等. 判定可可脂代用品方法—冷却曲线法[J]. 食品科学, 1985, (9): 45-48.
- [3] 高荫榆, 陈才水, 熊春红, 等. 营养功能性巧克力的研究[J]. 中国畜产与食品, 1994, 1(2): 68.
- [4] 高荫榆, 刘梅森, 陈才水. 乳化性物质抗巧克力起霜花[J]. 食品工业科技, 2000, (3): 77-79.
- [5] 王云. 绿茶蛋白质、绿茶多糖的提取及其对类可可脂巧克力抗霜花的研究[D]. 南昌大学硕士学位论文, 1998, 11.
- [6] Ph Rousset. Polymorphism and solidification kinetics of the binary system POS-SOS [J]. JAOCS, 1998, 75(7): 857-864.
- [7] 许新德. 乳化性物质抗类可可脂巧克力霜花的机理研究[D]. 南昌大学硕士学位论文, 2000, 5.
- [8] 刘梅森. 类可可脂同质多晶衍变与巧克力起霜及香菇茶叶抗霜研究[D]. 南昌大学博士学位论文, 2001, 6.
- [9] 高荫榆, 游海, 何小立, 等. 茶叶抗巧克力霜花机理研究—茶叶多糖[J]. 食品科学, 2001, 22(11): 29-33.
- [10] 刘梅森, 高荫榆, 陈才水, 等. 香菇、茶叶抗类可可脂巧克力脂霜之形态学研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(2): 1-4.

**Abstract:** Xylanase produced by *Streptomyces olivaceovirdis* E-86 was used to hydrolyze steam-exploded corncob extract to produce xylooligosaccharides. Through this experiment, the hydrolysis nature of steam-exploded corncob extract was characterized and the composition of its end-products was compared to those of enzymatic hydrolyzed corncob xylan. The following results were obtained: Satisfactory hydrolysis was achieved at 120U/100ml of enzyme addition and 8h of reaction time. The amount of reducing sugar in the hydrolysate was  $46\mu\text{mol/ml}$  with average degree of polymerization of 3.1 and hydrolysis rate of 46%. The end-product composition of steam-exploded corncob extract and corncob xylan were almost the same, which made up of mainly xylobiose and small amounts of xylotriose and xylose. A trace amount of rhamnose and arabinose were also found in the hydrolysate of steam-exploded corncob extract. Thus, the steam-exploded corncob extract was appropriate to replace corncob xylan as the substrate for xylooligosaccharides production.

**Key words:** steam-exploded corncob; xylooligosaccharides production; xylanase; *Streptomyces olivaceovirdis* E-86

中图分类号: Q939.9; Q539

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)08-0087-04

低聚木糖因其独特的生理功能活性和良好的加工工艺性能,如:具有选择性双歧菌增殖效果,抑制肠道有害菌的生长发育、降低血清胆固醇和中性脂肪,防止老化和骨质疏松症等生理功能;对pH值及热的稳定性较好,即使在酸性条件(pH=2.5~7.0)加热也基本不分解等工艺特性<sup>[1]</sup>,近年来逐渐受到了人们的关注,成为功能性食品基材研究的热点课题,其生产和应用日渐增多。而低聚木糖生产所用的原料玉米芯、甘蔗渣等均为农产废弃物,低聚木糖的生产和应用不仅可提高农产品附加值,还可以改善农村生态环境,具有良好的社会、经济效益。

目前,低聚木糖的生产主要有酸水解法、热水抽提法(含蒸汽喷爆法)、酶水解法、微波降解法等。其中酶水解法已广泛应用于工业化生产。然而,迄今为止酶水解法生产所使用的底物木聚糖均采用碱处理玉米芯制得,该法不仅处理过程复杂、木聚糖得率低、难以保证均一质量,且产生大量的碱性、高盐废水严重污染环境。因此寻求高效、低成本、无污染的预处理方法倍受关注。蔡静平<sup>[2]</sup>等曾报道将粉碎后的玉米芯热水处理去除可溶性杂质后直接接种真菌分解生产低聚木糖;石波<sup>[3]</sup>等曾报道高温蒸煮玉米芯溶出木聚糖后酶解制备低聚木糖;杨瑞金<sup>[4]</sup>等进一步采用干法和湿法蒸煮处理玉米芯连渣一起酶解生产低聚木糖。而采用蒸汽喷爆预处理玉米芯,工艺简便且生产中不产生高碱高盐废水,不会对环境造成污染,而采用蒸汽喷爆预处理玉米芯然后酶解生产低聚木糖的工艺尚未见报道。本文即对此展开研究,以蒸汽喷爆法预处理玉米芯得到的汽爆液,代替传统的碱处理玉米芯木聚糖生产低聚木糖,研究了橄榄绿链霉菌(*Streptomyces olivaceovirdis* E-86)产木聚糖酶玉米芯汽爆液的水解特征,并与玉米芯碱提取木聚糖的酶解产物组成进行了比较,为工业化生产低聚木糖提供理论依据和工艺参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

橄榄绿链霉菌 E-86 菌株:采用日本筑波大学食品生化研究室馈赠,经本研究室驯化培养的高产菌株。菌种经平板活化后,在30℃、150r/min 摇瓶培养6d,离心得粗酶液,4℃冰箱保存备用。培养基:1.5% 木聚糖、1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05%  $\text{MgSO}_4$ 、0.5% 吐温80、0.3% Yeast Extract、1.5% Tryptone。

玉米芯木聚糖:按参考文献[5]自制;

玉米芯汽爆液:山东龙力生物科技股份有限公司生产,汽爆条件:165℃、0.65~0.75MPa、90min;固液比1:10;

薄层层析板:Gel Plate F 254, Merck, Germany。

### 1.2 仪器设备

TU-1810 紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;DK-S22 型恒温水浴槽 上海精宏实验设备有限公司;HZS-H 水浴恒温摇床 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;GL-20B 冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;FW-100 高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司。

### 1.3 橄榄绿链霉菌 E-86 产木聚糖酶水解玉米芯汽爆液的水解特性研究

在预备实验的基础上分别在加酶量为40、120U/ml 条件下进行对比试验,测定汽爆液在不同水解时间后的直接还原糖和总糖含量,分析其水解特征。水解方法如下:

取100ml 玉米芯汽爆液加入500ml 三角瓶中,调节并维持反应液pH值为5.3,加入实验设计量的木聚糖酶液,置50℃、217r/min 水浴摇床振荡反应,分别在反应0、15、30min、1、2、3、4、6、8、12、24h 时取样,沸水浴煮沸5min,冷却至室温离心。分别测定各样品直接还原糖和总糖含量,并计算汽爆液在不同反应时间产物的平均聚合度、水解率及水解速度。

### 1.4 水解液直接还原糖(DRS)和总糖含量测定

直接还原糖测定采用 Somogyi's 法<sup>[6]</sup>, 总糖含量测定采用 Orcinol-HCl 法<sup>[7]</sup>。

1.5 木聚糖含量的测定

取自制玉米芯木聚糖 0.1000g 或玉米芯汽爆液 10ml, 加入到 1.25ml 72%(W/W)的硫酸溶液中混匀, 30℃下反应 25min, 然后加入 13.5ml 蒸馏水, 100℃沸水浴反应 2h, 冷却至室温, 加入 3.1ml 32%(W/V)氢氧化钠溶液, 离心取上清液测总糖含量。木聚糖含量按 B.Nidetzky<sup>[8]</sup>方法计算: 木聚糖含量 = 总糖含量 × 0.88; 0.88 为校正系数。

1.6 木聚糖平均聚合度(DP)、水解率和水解速度

木聚糖平均聚合度(DP)= 总还原糖量 / 直接还原糖量 ;

水解率(%)= 不同反应时间样品直接还原糖量 / (总糖含量 - 初始直接还原糖量) × 100;

水解速度(μmol/ml · min)=(样品直接还原糖量 - 初始直接还原糖量) / 反应时间。

1.7 低聚木糖成分分析

薄层层析法(TLC)。展层剂: 乙腈 - 水(85:15/V:V); 显色剂: 5% 硫酸甲醇溶液。

2 结果与讨论

2.1 玉米芯汽爆液酶解过程中直接还原糖量的变化

酶解过程中直接还原糖含量的变化表征了汽爆液中低聚木糖产生的程度。按 1.3 方法进行酶水解, 并测定汽爆液在酶解过程中直接还原糖的变化, 结果如图 1 所示。

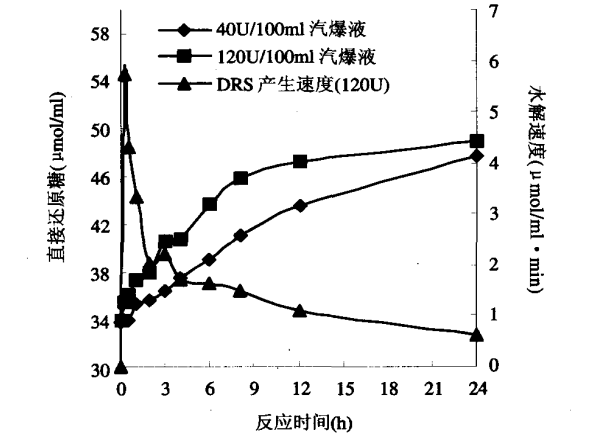


图1 DRS 随时间的变化(pH5.3、50℃)

由图 1 可以看出, 随着反应时间的增加, 汽爆液中直接还原糖量逐渐增加, 但增加速度逐渐下降; 加酶量对反应有极其明显影响, 在较低加酶量时直接还原糖量的增加低于高加酶量, 且在反应 12h 仍在增加, 而较高加酶量则在反应 8h 趋于平稳。此后的 16h 仅增加 3 μmol/ml。这说明加酶量明显影响酶解反应进程。这可能

是由于随着反应的进行, 底物量逐渐减少, 并且作为酶解产物的低聚糖增加而导致的产物抑制效应。该结果与杨瑞金<sup>[9]</sup>报道的采用湿法蒸煮和干法蒸煮玉米芯提取液酶水解制备低聚木糖的反应进程相似。

图中的水解速度曲线更清楚的表明随着水解时间的增加水解速度迅速下降, 24h 后趋近于 0。

实际生产中长时间的水解极易引起微生物污染, 并且生产效率也大大降低, 因此推荐采用较高加酶量 120U/100ml 汽爆液, 反应 8h 较合适。该条件下酶解液中直接还原糖量 46 μmol/ml。

2.2 玉米芯汽爆液酶解过程中平均聚合度的变化

酶解过程中汽爆液平均聚合度的变化表征了其可溶性木聚糖的降解程度。图 2 是不同加酶量的汽爆液在不同酶解时间测定得到的 DP 变化曲线。

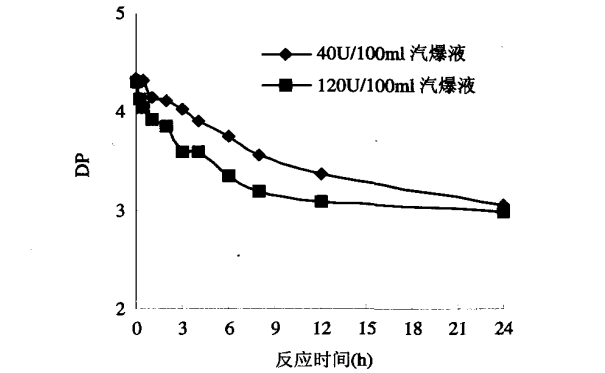


图2 DP 随时间的变化(pH5.3、50℃)

由图可知: 随酶解时间的增加可溶性木聚糖的聚合度迅速下降, 加酶量 120U/100ml 处理在反应 8h 后 DP 降至 3 左右, 其后几乎不再变化; 而加酶量 40U/100ml 处理则在 12h 后趋于稳定, 24h 后两者近似相等, 木聚糖的降解程度明显滞后于高加酶量处理。

该结果表明: 本实验条件下玉米芯汽爆液酶解的极限聚合度约为 3, 酶解时间和加酶量具有等效互补性, 高加酶量可以缩短处理时间, 延长水解时间可以节约用酶量。从提高生产效率而言, 采用加酶量 120U/100ml、水解反应 8h 可获得较好效果。

2.3 玉米芯汽爆液酶解过程中水解率的变化

酶解过程中水解率的变化表征了汽爆液酶解反应的效率和酶解进程。图 3 是不同加酶量的汽爆液在不同酶解时间测定得到的木聚糖水解率变化曲线。

由图 3 可以看出: 随水解时间的增加汽爆液的水解率逐渐增加, 且酶解初期增加较快, 达一定时间后趋于平稳, 水解率增加缓慢。加酶量 120U/100ml 处理在反应 8h 后水解率达 46%, 其后的 16h 仅增加约 5%。而加酶量 40U/100ml 处理在酶解过程中水解率明显滞后,

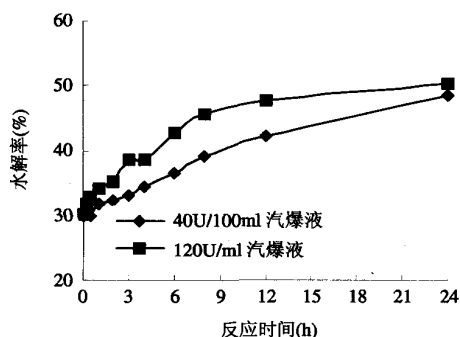
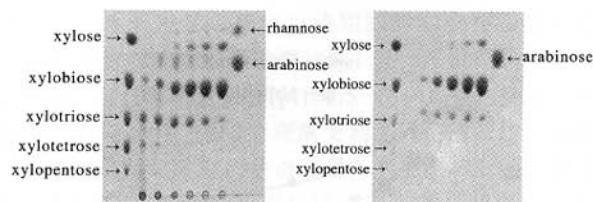


图3 水解率随时间的变化(pH5.3、50℃)

在反应24h后接近于前者达48%。

## 2.4 玉米芯木聚糖和汽爆液酶解过程中产物组成比较



玉米芯汽爆液酶解产物

玉米芯木聚糖酶解产物

0: 标样, 1: 30 min, 2: 2h, 3: 6h, 4: 8h, 5: 12h, 6: 24h, 7: 标样

图4 玉米芯汽爆液和玉米芯木聚糖的酶解产物组成 TLC 图

图4为玉米芯汽爆液和玉米芯木聚糖在不同酶解时间酶解液中糖组分变化的TLC图。由图可见: ①采用汽爆液和碱提取木聚糖为底物进行酶解所产生的低聚糖组成大致相同, 组分中主要是木二糖和少量的木糖、木三糖, 而汽爆液酶解产物中还含有极少量的鼠李糖(rhamnose)和阿拉伯糖(arabinose), 这是由于玉米芯木聚糖已经过高高浓度碱处理将玉米芯中的杂质成分基本去除, 而汽爆液则是直接由原料玉米芯汽爆得到, 原料中的各种成分都包含在其中因此会有一些杂糖存在, 可在精制时考虑去除; ②汽爆液酶解过程中木三糖、木四糖等在水解初始阶段形成较多, 其后木四糖逐渐被水解而消失, 木三糖亦逐渐减少, 而木二糖和木糖则随着水解的进行逐渐增加, 且木糖的增加滞后于木二糖。这与前述的还原糖和平均聚合度检测结果相符, 并且符合该酶水解特点<sup>[9]</sup>。因此可以考虑通过控制酶解时间使产

物组成中人们希望的功能性成分木二糖和木三糖的比例最大。③采用橄榄绿链霉菌E-86产木聚糖酶酶解玉米芯汽爆液和碱提取木聚糖的酶解产物中没有检测到葡萄糖的存在。显示本实验所用的橄榄绿链霉菌E-86菌株所产木聚糖酶液中主要为木聚糖酶, 无纤维素酶活性, 提示亦可将该酶扩展用于要求无纤维素酶活性的纸浆造纸业等中。

## 3 结论

3.1 加酶量120U/100ml、酶解反应8h可获得较好的酶解效果, 直接还原糖量46μmol/ml、平均聚合度降至3.1、水解率46%。

3.2 玉米芯汽爆液和碱提取木聚糖的酶解产物中低聚糖组成大致相同, 组分中主要是木二糖和少量的木三糖、木糖; 汽爆液酶解产物中还含有极少量的鼠李糖和阿拉伯糖。

3.3 玉米芯汽爆液可有效代替碱法提取木聚糖为底物酶法水解生产低聚木糖。

## 参考文献:

- [1] 小林昭一監修.オリゴ糖の新知識・16キシロオリゴ糖[M]. 食品科学新聞社, 1998, 12.
- [2] 蔡静平, 黄淑霞, 曾实. 真菌分解玉米芯生产低聚木糖的研究[J]. 微生物学通报, 1997, 24(2): 91-94.
- [3] 石波, 李里特. 功能性添加剂木寡糖的制备研究[J]. 国外畜牧科技, 2000, 27(6): 14-17.
- [4] 杨瑞金, 许时婴, 王璋. 低聚木糖的功能性质与酶法生产[J]. 中国食品添加剂, 2002, (2): 89-93.
- [5] 王海, 李里特, 石波. 不同诱导物对 *Streptomyces olivaceoviridis* E-86产高活性木聚糖酶研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(6).
- [6] M Somogyi. A new reagent for the determination of sugars [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1945, 160: 61.
- [7] W R Fernell. The simultaneous determination of pentose and hexose in mixtures of sugars[J]. Analyst, 1953, 78: 80-83.
- [8] B Nidetzky, W Steiner, M Hayn, et al. Enzymatic hydrolysis of wheat straw after steam pretreatment: experimental data and kinetic model[J]. Bioresource Technology, 1993, 44: 25-32.
- [9] 日下部功, 川口政良, 安井恒男ら. 菌体外放線菌キシラナ-ゼの精製とその諸性質について[J]. 農化, 1977, 51(7): 429-437.