

酶法制备豆皮低聚木糖的工艺研究

汪辉, 李爱军, 欧仕益, 蒋文明, 徐文瑶

(暨南大学理工学院食品科学与工程系, 广东 广州 510632)

摘要: 利用木聚糖酶酶解豆皮制备低聚木糖, 通过单因素试验考察酶解温度、pH 值、时间、料液比以及酶添加量对酶解液中低聚木糖含量的影响, 并在此基础上通过正交试验确立最佳酶解工艺条件: 酶添加量 0.3%、pH4.3、料液比 1:15(g/mL)、温度 40℃、酶解时间 2h。该最佳工艺条件下, 总还原糖含量为 5.74mg/mL。通过离子色谱检测酶解液中的糖分组成, 发现酶解液中的单糖以木糖为主, 相对含量达到 54.99%。

关键词: 大豆皮; 低聚木糖; 酶解; 离子色谱

Use of Xylanase for Enzymatic Preparation of Xylooligosaccharides from Soybean Hull

WANG Hui, LI Ai-jun, OU Shi-yi, JIANG Wen-ming, XU Wen-yao

(Department of Food Science and Engineering, College of Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: In this study, soybean hull was first subjected to sequential pretreatment with an aqueous sodium hydroxide solution followed by an aqueous ammonium oxalate solution for the removal of protein and pectin and then hydrolyzed with xylanase to prepare xylooligosaccharides. To maximize total sugar content in soybean hull hydrolysate, this study emphatically focused on optimizing hydrolysis process of soybean hull. Effects of hydrolysis parameters including hydrolysis temperature and time, pH, ratio of solid to liquid and xylanase amount on total sugar content in soybean hull hydrolysate were analyzed by single factor and orthogonal array design methods. Results indicated that the optimal values of these parameters were as follows: hydrolysis for 2 h at 40 °C, pH 5.3, a ratio of solid to liquid of 1:15 and an enzyme amount of 0.3%. The total sugar content in soybean hull hydrolysate obtained under such conditions was 5.74 mg/mL. Ion chromatographic detection revealed that the predominant monosaccharide in soybean hull hydrolysate was xylose with a relative content of 54.99%.

Key words: soybean hull; xylooligosaccharides; enzymatic hydrolysis; ion chromatography

中图分类号: TQ914.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)08-0051-05

豆皮是大豆加工副产物之一, 大豆皮主要是大豆外层的物质, 颜色为米黄或浅黄色, 约占整粒大豆重量的 8%。据资料介绍^[1], 大豆皮含有大量的中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、酸性洗涤木质素、水不溶性半纤维素和纤维素成分。Aspinall 等^[2]研究指出大豆皮中的多糖主要是半乳甘露聚糖、木聚糖和纤维素。

低聚木糖是由 2~7 个木糖以 β -1,4 糖苷键连接而成的低聚糖, 以木二糖和木三糖为主^[3]。自然界中众多富含木聚糖的植物, 如玉米芯、甘蔗渣、棉籽等经木聚糖酶水解后即得低聚木糖。低聚木糖与其他低聚糖相比, 难被人体消化吸收, 对双歧杆菌的增殖效果最好, 具有抗龋齿性, 同时能改善排便并促进钙的吸收, 是一种优良的功能性食品基料^[4-5]。豆皮中含有大量由木聚糖聚合而成的半纤维素^[1], 木聚糖是一种水不溶性糖,

通过酶解木聚糖制备功能性的低聚木糖可以有效提高大豆皮的工业附加值。本实验通过比较酶解液水解前后还原糖含量的差值大小实现快速判定酶解豆皮制备低聚木糖的最优条件。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

大豆皮 东莞中谷粮油公司。

木聚糖酶 丹麦 Novozymes 公司; 3,5-二硝基水杨酸 上海润捷化学试剂公司; 棉籽糖、蔗糖、水苏糖 Sigma 公司; 海藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖 德国 Augsburg 公司; 木糖 上海伯奥生物科技有限公司; 200mmol/L NaOH 溶液 美国 Fisher 公司; 超纯水 Milli-Q 纯水系统; 其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2009-06-16

基金项目: 广东高校科技成果产业化重大项目(cgzhzd0709)

作者简介: 汪辉(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为农畜产品深加工。E-mail: wangh213@163.com

HH-4 型恒温水浴锅 江苏金坛宏华仪器厂; JJ-1 型增力电动搅拌器 新一佳公司; KDC-1044 低速离心机 科大创新股份有限公司; 722 可见分光光度计、PHS-3C 型 pH 计、MP502B 型电子天平 上海精科仪器公司; 中空纤维超滤组件 无锡市超滤设备厂; ICS-2500 离子色谱仪 美国戴安公司; 0.2 μm 一次性滤头 美国 Agilent 公司。

1.2 测定方法

通过测定酶解液中的总还原糖(总糖)、还原糖和聚合度可以粗略估算由木糖聚合成的低聚木糖的含量, 在低聚木糖水解前先测还原糖含量, 然后将低聚木糖完全水解测得总还原糖量, 总还原糖与还原糖的差值越大在一定程度上说明由木糖聚合成的低聚木糖被降解的也越多, 在考察木聚糖酶解液中低聚木糖组分及含量时, 可采用还原糖量、可溶性总还原糖量及平均聚合度作为考察指标, 并主要以平均聚合度作为考察指标^[6-7]。所以通过测定总还原糖和还原糖的方法可以用于酶解制备低聚木糖最优条件的快速判断。

1.2.1 木聚糖酶活力

以 55℃、pH7.5 巴比妥钠 - 盐酸缓冲液中每毫升待测酶液(或每克酶制剂)每分钟催化底物生成 1 μmol 木糖的量定义为一个酶活力单位。

1.2.2 还原糖(reducing sugar)测定

采用 DNS 比色法。分别取 1 mL 木聚糖酶解液置于 25 mL 刻度试管中, 然后加入 DNS 试剂 2 mL, 沸水浴中煮沸 2 min 后显色, 然后迅速用流水冷却, 用蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 540 nm 波长处测定吸光度。

1.2.3 总还原糖(total reducing sugar)测定

准确量取浓 H₂SO₄ 加入到酶解液中, 使其质量浓度为 72 g/L, 水浴煮沸 2 h 后, 用 6 mol/L 的 NaOH 溶液调至中性后用 DNS 法 540 nm 波长处测定其吸光度^[5]。

1.2.4 单糖测定

采用离子交换色谱仪, 氨基酸分离柱, 在流动相为 12.5 mmol/L 的 NaOH 溶液, 柱温 30℃, 进样量 25 μL, 流速 0.25 mL/min 的条件下测定酶解液中单糖的种类和含量。

1.2.5 聚合度(polymerization degree)计算

$$\text{聚合度(DP)} = \frac{\text{总还原糖质量浓度}}{\text{还原糖质量浓度}}$$

1.3 木糖标准曲线的绘制

取木糖标准品配制成 10 mg/mL 的标准液, 然后稀释成 1、2、3、4、5、6、7 mg/mL 的木糖标准液, 分别取 1 mL 置于 25 mL 刻度试管中, 然后加入 DNS 试剂

2 mL, 沸水浴中煮沸 2 min 后显色, 然后迅速用流水冷却, 用蒸馏水定容到刻度, 摇匀, 用蒸馏水做空白, 540 nm 波长处测定吸光度, 以木糖含量对吸光度作图, 绘制标准曲线。

1.4 大豆皮的预处理

将大豆皮粉碎后过 80 目筛, 然后用 NaOH 溶液调 pH9.0, 用蒸馏水调液比 1:12(g/mL)、45℃ 条件下浸提 50 min, 采用两次碱提法除蛋白^[8], 收集滤渣, 在草酸铵添加量为溶液质量的 0.6%、料液比为 1:35、100℃ 条件下处理 2 h 除果胶^[9], 过滤后滤渣用清水冲洗 3 次后烘干待用。

1.5 酶解单因素试验^[10]

1.5.1 酶解时间对酶解液中低聚木糖含量的影响

称取经过预处理的豆皮 10.0 g, 按料液比 1:10 加入蒸馏水 100 mL, 调 pH5.3, 加入木聚糖酶, 酶添加量为溶液质量 0.5%, 45℃ 条件下水浴水解时间分别为 2、4、6、8、10 h 后, 3000 r/min 离心 10 min, 测定酶解液中还原糖和总糖的含量并计算聚合度^[11]。

1.5.2 pH 值对酶解液中低聚木糖含量的影响

称取经过预处理的豆皮 10.0 g, 分别加入蒸馏水 100 mL, 调 pH 值为 4.3、4.8、5.3、5.8、6.3, 料液比为 1:10^[12], 加入木聚糖酶, 酶添加量为溶液质量的 0.5%, 45℃ 条件下水浴水解 6 h 后, 3000 r/min 离心 10 min, 测定酶解液中还原糖和总糖的含量并计算聚合度。

1.5.3 料液比对酶解液中低聚木糖含量的影响

称取经过预处理的豆皮 10.0 g, 按料液比为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 进行添加蒸馏水, 调节 pH5.8, 加入木聚糖酶, 使每一份中酶的添加量都为溶液质量的 0.5%, 45℃ 条件下水浴水解 6 h 后, 3000 r/min 离心 10 min, 测定酶解液中还原糖和总糖的含量并计算聚合度。

1.5.4 酶添加量对酶解液中低聚木糖含量的影响

称取经过预处理的豆皮 10.0 g, 按料液比为 1:10 加入蒸馏水 100 mL, 调节 pH5.8, 然后加入木聚糖酶, 酶添加量分别为溶液质量的 0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9%、1.1%, 45℃ 条件下水浴水解 6 h 后, 3000 r/min 离心 10 min, 测定酶解液中还原糖和总糖的含量并计算聚合度^[13]。

1.5.5 酶解温度对酶解液中低聚木糖含量的影响

称取经过预处理的豆皮 10.0 g, 按料液比为 1:10 加入 pH5.8 的蒸馏水 100 mL, 加入木聚糖酶, 酶添加量为溶液质量的 0.5%, 分别在 30、35、40、45、50℃ 条件下水浴水解 6 h 后, 3000 r/min 离心 10 min, 测定酶解液中还原糖和总糖的含量并计算聚合度。

1.6 酶解正交试验

在单因素试验基础上, 选取酶解时间、pH 值、料

液比、酶添加量、酶解温度 5 个因素进行五因素四水平进行 $L_{16}(4^5)$ 正交试验。

1.7 离子色谱法分析糖类组成

用分析天平分别称取海藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和木糖^[14]各 100.0mg 置于 50mL 烧杯中, 加入 5mL 超纯水溶解, 转移至 50mL 容量瓶中, 再用少许超纯水淋洗烧杯数次, 并转移至容量瓶中, 定容, 得各单糖质量浓度为 2000mg/L 的混合储备液。

用移液枪分别吸取上述储备液 0、25、50、150、750、1500 μ L 于 50mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度, 得质量浓度分别为 0、1、2、6、30、60mg/L 的标准溶液^[15]。绘制单糖标准曲线, 按酶解最优条件酶解制得糖液, 经相对分子质量 3000 的滤膜过滤, 浓缩后阴阳离子交换柱脱盐制得样品糖液, 将样品稀释 1000 倍后进行离子色谱检测。

2 结果与分析

2.1 木糖标准曲线的绘制

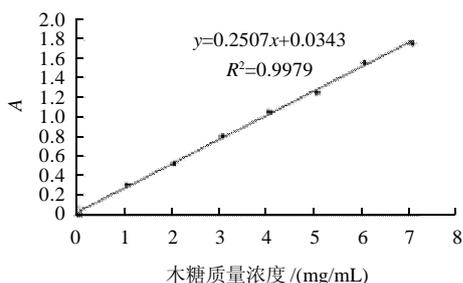


图1 木糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of xylose

由图 1 可知, 以木糖质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标, 作出标准曲线并回归出标准方程: $y = 0.2507x + 0.0343 (R^2 = 0.9979)$, 木糖在 1~7mg/mL 质量浓度范围内, 质量浓度与吸光度呈线性关系。

2.2 酶解条件的单因素试验

2.2.1 酶解时间对酶解液中糖含量的影响

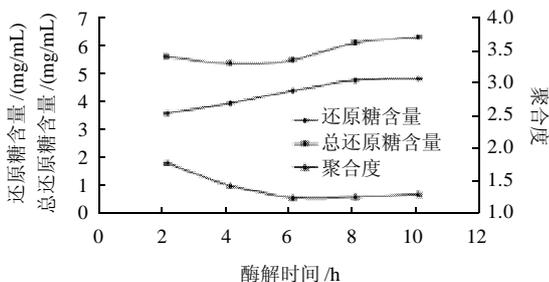


图2 酶解时间与糖含量的关系

Fig.2 Effect of hydrolysis time on xylooligosaccharide preparation

由图 2 可知, 随着酶解时间的延长, 还原糖和总还原糖的含量逐渐趋于稳定, 还原糖含量随酶解时间的延长而增加, 总还原糖含量 2~6h 内有所降低, 6h 后含量开始上升, 酶解时间为 8h 时达到最大值, 8h 时含量达到 6.17mg/mL, 8h 之后趋于稳定; 聚合度随酶解时间的延长而迅速降低, 6h 后聚合度不再降低且聚合度均较小, 这可能是酶的添加量过大的原因, 因此较为合适的酶解时间为 2h。

2.2.2 酶解 pH 值对酶解液中糖含量的影响

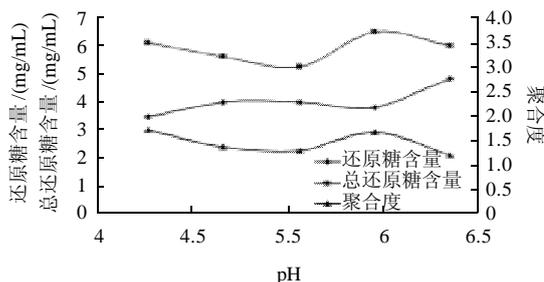


图3 pH值与糖含量的关系

Fig.3 Effect of pH on xylooligosaccharide preparation

由图 3 可知, 在 pH4.3 和 5.8 时总糖和还原糖的差值最大, 聚合度都接近 2, pH6.3 条件下虽然总糖的含量较高, 但是还原糖的含量相对也高, 计算其相对聚合度只有 1.23, 此聚合度较低, 不利于低聚木糖的制备。pH4.3~5.3 范围内, 还原糖含量虽有所增加, 但总糖含量明显降低; pH4.3 时, 糖含量及聚合度均较合适, 所以最适的反应体系 pH 值为 4.3。

2.2.3 料液比对酶解液中糖含量的影响

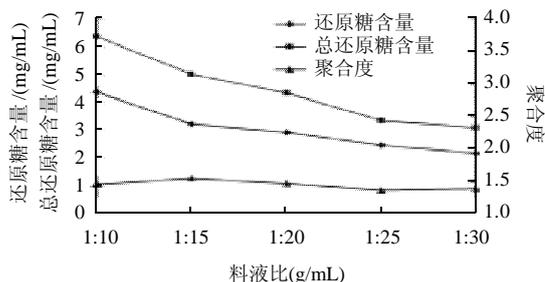


图4 料液比与糖含量的关系

Fig.4 Effect of ratio of solid to liquid on xylooligosaccharide preparation

由图 4 可知, 随着料液比的减小, 酶解液中的总糖和还原糖含量都呈现下降趋势, 这可能是料液比的减小比例高于糖含量增加的比例引起的, 从相对聚合度来看, 选择料液比为 1:15(g/mL) 的条件下, 低聚木糖的得率最高。

2.2.4 酶添加量对酶解液中糖含量的影响

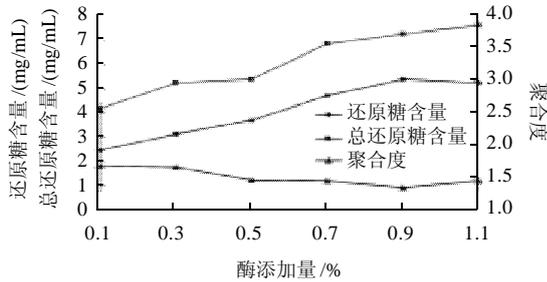


图5 酶添加量与糖含量的关系

Fig.5 Effect of xylanase amount on xylooligosaccharide preparation

由图5可知,随着酶添加量的增加,还原糖和总糖的含量都随之增加,但聚合度在酶添加量大于0.3%后就开始下降,且之后维持在一定水平附近,说明随着酶添加量的增加,低聚木糖被酶解的更完全,更多的降解为单糖,所以综合考虑应取酶添加量0.3%为宜。

2.2.5 酶解温度对酶解液中糖含量的影响

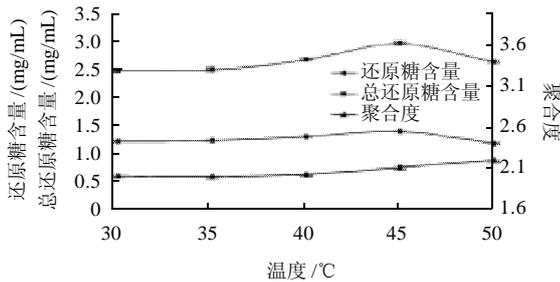


图6 酶解温度与糖含量的关系

Fig.6 Effect of reaction temperature on xylooligosaccharide preparation

由图6可知,酶解温度的变化对酶解液中还原糖的含量影响很小,在45°C时总糖和还原糖的含量都达到最高,温度再升高糖含量反而有下降的趋势,综合考虑糖含量和低聚木糖的聚合度,适宜的酶解温度为45°C。

2.3 正交试验结果

在单因素试验基础上,选取酶解时间、pH值、料液比、酶添加量、酶解温度5因素进行L₁₆(4⁵)的正交试验,因素水平设计表见表1,结果见表2。

表1 豆皮酶解条件的正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels in orthogonal array design

水平	因素				
	A 酶解时间/h	B pH	C 料液比(g/mL)	D 酶添加量/%	E 酶解温度/°C
1	2	4.3	1:30	0.1	35
2	4	4.8	1:20	0.5	40
3	6	5.3	1:25	0.7	45
4	8	5.8	1:15	0.3	50

从表2可以看出,聚合度的变化均在1~3之间,在此聚合度范围内,选取聚合度大的作为因素优水平的指标,所以影响酶解液糖含量的最主要因素是酶的添加量,其次是酶解时间和料液比,温度和pH值的影响相对较弱,正交试验的最优条件为在pH4.3、温度40°C条件下添加0.3%的木聚糖酶即按料液比1:15酶解2h。按最优方案条件进行酶解,得到总还原糖含量为5.74mg/mL,高于正交试验中各条件下的含量,所以选定正交试验的优方案条件为酶解最佳条件。

表2 豆皮酶解条件的正交试验结果

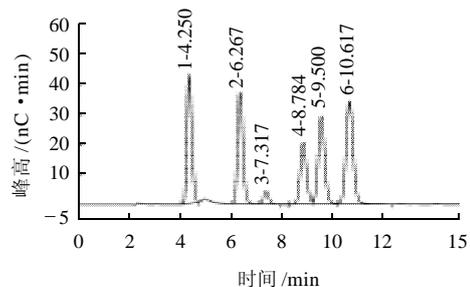
Table 2 Orthogonal array design matrix and experimental results of mean degree of polymerization of soybean hull hydrolysate

试验号	A 酶解时间/h	B pH	C 料液比(g/mL)	D 酶添加量/%	E 酶解温度/°C	聚合度
1	1(2)	1(4.3)	1(1:30)	1(0.1)	1(35)	2.02
2	1	2(4.8)	2(1:20)	2(0.5)	2(40)	1.63
3	1	3(5.3)	3(1:25)	3(0.7)	3(45)	1.52
4	1	4(5.8)	4(1:15)	4(0.3)	4(50)	3.06
5	2(4)	1	2	3	4	1.30
6	2	2	1	4	3	2.04
7	2	3	4	1	2	2.04
8	2	4	3	2	1	1.13
9	3(6)	1	3	4	2	2.23
10	3	2	4	3	1	1.57
11	3	3	1	2	4	1.46
12	3	4	2	1	3	1.40
13	4(8)	1	4	2	3	1.38
14	4	2	3	1	4	1.24
15	4	3	2	4	1	1.90
16	4	4	1	3	2	1.25
k ₁	2.058	1.733	1.693	1.675	1.655	
k ₂	1.628	1.620	1.558	1.400	1.788	
k ₃	1.665	1.730	1.530	1.410	1.585	
k ₄	1.442	1.710	2.013	2.308	1.765	
R	0.616	0.113	0.483	0.908	0.203	

主次因素: D > A > C > E > B

优方案: D₄A₁C₄E₂B₁

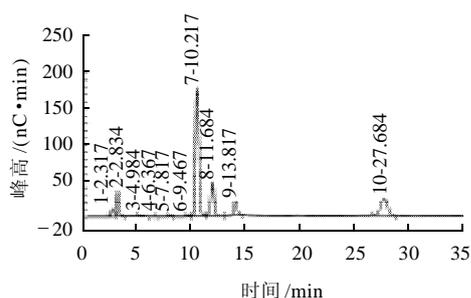
2.4 离子色谱的糖成分分析



1.海藻糖; 2.鼠李糖; 3.阿拉伯糖; 4.半乳糖; 5.葡萄糖; 6.木糖。

图7 6种糖标准的离子色谱图

Fig.7 Ion chromatogram of mixed six monosaccharide standards



3.海藻糖; 4.鼠李糖; 5.阿拉伯糖; 6.葡萄糖; 7.木糖。

图8 样品稀释 1000 倍后离子色谱图

Fig.8 Ion chromatogram of 100-fold diluted soybean hull hydrolysate

如图 7、8 所示, 6 种单糖分离情况良好, 基本上是完全分离。6 种糖标准样品的出峰时间都较早, 均在 15min 以内, 在 2~4min 内出现两个峰, 这有可能是棉籽糖和水苏糖的峰, 但也有可能是杂质峰, 具体不能确定, 在这以后有一连串小峰, 但含量均不高, 在 10~11min 内出现一较高的 7 号峰, 对照糖标准图谱, 7 号峰应该是木糖峰, 由积分面积可知木糖的相对含量为 54.99%, 之后的 8、9、10 号峰含量都较高, 相对含量分别为 14.00%、5.33% 和 14.90%, 以 10 号峰含量最大, 但没有标准色谱峰对照, 需进一步开展实验确定它们是何物质。

3 结论

通过酶解的单因素试验和正交试验的研究结果, 确定了木聚糖酶酶解豆皮制备低聚木糖的最适条件为酶加量 0.3%、料液比 1:15、pH4.3、40℃ 条件下酶解 2h, 得到总还原糖含量为 5.74mg/mL。

离子色谱检测出酶解液中木糖的相对含量达 54.99%, 酶解液中木糖的含量相对单一且较高, 说明糖液中还原糖以木糖为主, 糖液完全水解前后多出的木糖主要来自低聚木糖的水解。由离子色谱的出峰情况可知, 采

用聚合度作为快速判断低聚木糖酶解最优条件的依据可行。

参考文献:

- [1] KARR-LILIENTHAL L K, KADZERE C T, GRIESHOP C M, et al. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: a review[J]. *Livestock Production Science*, 2005, 97 (1): 1-12.
- [2] ASPINALL G O, HUNT K, MORRISON I M. Polysaccharides of soybeans: II. Fractionation of hull cell-wall polysaccharides and the structure of a xylan[J]. *J Chem Soc C*, 1966, 21: 1945-1949.
- [3] NISHIMURA T, ISHIHARA M, ISHII T, et al. Structure of neutral branched xylooligosaccharides produced by xylanase from in situ reduced hardwood xylan[J]. *Carbohydrate Research*, 1998, 308(1/2): 117-122.
- [4] SUBMARNAIYNA S, PREMA P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2002, 22(1): 33-64.
- [5] 郑建仙. 功能性低聚糖[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 178-179.
- [6] 黄家骥. 酶法水解玉米芯木聚糖制备低聚木糖[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [7] 杨书艳, 徐春梅, 邬敏辰. 用玉米芯酶法制备低聚木糖的研究[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(12): 3651-3653.
- [8] 汪勇, 欧仕益, 李爱军, 等. 大豆皮制备膳食纤维的研究[J]. *食品科学*, 2003, 24(5): 110-113.
- [9] 周艳红, 金征宇. 大豆皮果胶多糖的提取工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2004(3): 76-95.
- [10] XU Zhong, WANG Qunhui. Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2007, 31(2/3): 162-167.
- [11] 杨健. 玉米芯木聚糖的提取及纤维素酶酶解去半纤维素玉米芯的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2005.
- [12] 石波, 李里特. 玉米芯酶法制取低聚木糖的研究[J]. *中国农业大学学报*, 2001, 6(2): 92-95.
- [13] 李相前, 任世英. 以秸秆为原料制备低聚木糖工艺研究[J]. *现代化工*, 2008, 28(10): 380-382.
- [14] LEQUART C, NUZILLARD J M, KUREK B, et al. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides[J]. *Carbohydrate Research*, 1999, 319(1/4): 102-111.
- [15] 欧云付, 尹平河, 赵玲, 等. 离子色谱法测定大蒜中的糖[J]. *光谱实验室*, 2006, 23(3): 629-632.