

# 蔗渣木聚糖制备低聚木糖的最优复合酶降解工艺研究\*

## The Research on Optimal Production Process of Xylooligosaccharides by Composite Enzymatic Hydrolysis of Bagasse Xylan

陆登俊<sup>1</sup>,何亮亮<sup>2</sup>,刘桂云<sup>1</sup>,黄琳娟<sup>1</sup>,李坚斌<sup>1</sup>,梁欣泉<sup>1\*\*</sup>

LU Deng-jun<sup>1</sup>, HE Liang-liang<sup>2</sup>, LIU Gui-yun<sup>1</sup>, HUANG Lin-juan<sup>1</sup>, LI Jian-bin<sup>1</sup>, LIANG Xin-quan<sup>1</sup>

(1. 广西大学轻工与食品工程学院,广西南宁 530004; 2. 云南省轻工业科学研究所,云南昆明 650034)

(1. Guangxi University College of Light Industry and Food Engineering, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. Science Research Institute of Light Industry, Kunming, Yunnan, 650034, China)

**摘要:**【目的】研究复合酶解蔗渣木聚糖制备低聚木糖的方法。【方法】采用混料试验设计中的单纯形质心方法对木聚糖酶 A,木聚糖酶 B 和  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶 3 种酶进行配方设计试验,以低聚木糖得率为评价指标。【结果】低聚木糖得率的最优酶复合配比为木聚糖酶 A 39.5%,木聚糖酶 B 25%, $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶 35.5%,在此条件下预测低聚木糖得率为 85.20%。【结论】该配比能显著提高蔗渣木聚糖酶解效率和低聚木糖的产率。

**关键词:**复合酶 蔗渣木聚糖 低聚木糖 蔗渣

**中图分类号:**TS245.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2014)06-0610-04

**Abstract:**【Objective】The production of xylooligosaccharides was studied by composite enzymatic hydrolysis of bagasse xylan.【Methods】The formulation of xylanase A, xylanase B and alpha-L-arabinofuranosidase was optimized through simplex-centroid method for mixture design experiments, with the XOS extraction rate as evaluation index.【Results】The best formula was determined as: Xylanase A 39.5%, xylanase B 25% and alpha-L-arabinofuranosidase 35.5%. Under these conditions, the extraction rate of XOS was 85.20%.【Conclusion】The optimization rate of compound enzyme has the characteristic of increasing yield and efficiency.

**Key words:** complex xylanase, bagasse xylan, xylooligosaccharide, bagasse

【研究意义】把富含纤维素与半纤维素的生物质原料转化为生物燃料、食品及化学药品是当前的热门

研究领域之一。这些原料包括森林中的树木、林业副产品、草料、农业作物及工农业的各种副产品<sup>[1~3]</sup>。而利用生物质原料来制造上述产品的方法中,酶法水解是目前应用广泛且具有发展前景的一种方法。【前人研究进展】蔗渣木聚糖原料具有特殊的化学结构,而且其纤维素与各种多糖之间有结合,若单纯使用木聚糖酶对蔗渣木聚糖进行降解会导致酶解效果不理想,生物转化率偏低等问题<sup>[4,5]</sup>。【本研究切入点】混料试验设计是一种研究多种成分产品的响应面试验方法,该方法可应用于各组分间有交互作用的实验研究,能够用较少的试验次数得到最佳的混料配

收稿日期:2014-9-30

修回日期:2014-11-1

作者简介:陆登俊(1978-),女,副教授,博士,主要从事糖料资源功能研究与综合利用。

\* 广西科学基金项目(桂科青 0832009)和 2011 广西大学实验教学示范中心精品、特色项目建设项目资助。

\*\* 通讯作者:梁欣泉(1966-),博士,高级工程师, E-mail: lxq10713@163.com。

比<sup>[6,7]</sup>。【拟解决的关键问题】采用混料试验设计中的单纯形质心方法对不同微生物合成的木聚糖酶 A 与木聚糖酶 B 及  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶进行复配,通过分析试验结果建立回归方程,考察各组分对酶解效果的影响,以低聚木糖得率为评价指标,得到最优复合酶降解工艺<sup>[8,9]</sup>。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

紫外可见分光光度计 UV-4802 型(上海尤尼柯仪器有限公司),高速台式离心机 Anke GL-16G(上海安亭科学仪器厂),电热恒温鼓风干燥箱 DHG-914A(上海精宏实验设备有限公司),涡流混合器 MVS-(北京金北德工贸有限公司),分析天平 JA1003N(上海精密科学仪器有限公司),pH 计 pHHS-3C 型(上海精密科学仪器有限公司),数显恒温水浴锅 HH-2 HH-4(国华电器有限公司),循环水式真空泵 SHZ-D 型(巩义市英峪予华仪厂)。

木聚糖酶 A、纤维素酶、果胶酶(诺维信生物技术有限公司), $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶(南京师范大学生物实验室),木聚糖酶 B(宁夏和氏璧生物技术有限公司)。蔗渣(实验室自制),氢氧化钠 AR,无水乙醇 AR(西陇化工),硫酸 AR(洛阳化学试剂厂),D-(+)-木糖 HR,冰醋酸 AR,3,5-二硝基水杨酸 CR(国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 复合酶的选择

由于木聚糖的主链上含有阿拉伯糖侧链和葡萄糖醛酸侧链,这些侧链在木聚糖酶降解蔗渣木聚糖时会产生阻碍作用,从而单纯使用木聚糖酶降解效果不佳,低聚木糖产率和质量不理想。又由于木聚糖酶是一种多组分的复合酶,不同微生物合成的木聚糖酶其酶系组成也不尽相同,对木聚糖的水解能力也有差异<sup>[10~12]</sup>。为了使低聚木糖的产量最大化,本实验采用不同微生物合成的两种木聚糖酶及  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶进行复合进而降解蔗渣木聚糖。

#### 1.2.2 实验设计

设计目的:(1)确定所选用的各种酶之间的复合对于酶解蔗渣木聚糖制备低聚木糖是否存在积极的协同作用;(2)确定有积极协同作用的酶之间最佳的配比。

采用 design expert 8.0 软件混合设计方案对各种酶复合对蔗渣木聚糖降解效果影响进行分析,各种酶之间的相互作用通过 3D 响应面直观表达,并根据响应面的二次拟合预测,各种酶之间配比的最优水

平。蔗渣木聚糖实验室自制<sup>[13]</sup>。取蔗渣木聚糖碱提液 10 mL 进行混合配料设计试验,加酶量上下限见表 1。

表 1 混合设计中加酶量

Table 1 Experimental mixture design of components and enzymes loading

标签 Code	因素 Factors	低比例 Low ratio(mL)	高比例 High ratio(mL)
X	木聚糖酶 A Xylanase A	25%(0.173)	50%(0.346)
H	木聚糖酶 B Xylanase B	25%(0.173)	50%(0.346)
Z	$\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶 Alpha-L-arabinofuranosidase	25%(0.173)	50%(0.346)

采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS)<sup>[14]</sup>测定低聚木糖。

## 2 结果与分析

### 2.1 蔗渣木聚糖复合水解对低聚木糖得率的影响

在 pH 值 5.3、酶解时间 6 h、酶解温度 46℃ 的条件下考察不同来源的两种木聚糖酶(A,B)与  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶之间的交互作用是否能提高低聚木糖得率。

从表 2 可以看出,木聚糖酶 A、木聚糖酶 B 与  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶三者之间的复合酶提高了低聚木糖得率,相比于木聚糖酶 A 单酶水解时最佳低聚木糖 78.84% 的得率,有了进一步的提高。酶解结果的回归方程模型为

$$Y = +87.71A + 86.28B + 76.60C - 35.70AB + 31.64AC - 83.99B.$$

式中, Y 为模型预测响应值,即低聚木糖得率; A 为木聚糖酶 A; B 为木聚糖酶 B; C 为  $\alpha$ -阿拉伯糖苷酶。A、B、C 三者之间两两交互作用的 F 值分别是 AB 为 7.84, AC 为 4.29, BC 为 30.20, 由此可知 A、B、C 三者之间两两交互中 BC 作用即木聚糖酶 B 与  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶的交互作用对低聚木糖得率影响最为显著, AB、AC 次之。

由回归方差分析结果(表 3)可知:该模型整体 F 值为 9.06, P 值为 0.0038,  $R^2$  为 0.8499, 说明该响应面回归模型有高度显著性。P < 0.05 表示具有显著性,模型信噪比 10.471 > 4 则表示模型可以用于预测。模型拟合优度  $R^2$  和调整  $R^2$  分别为 0.6768 与 0.7560, 两者的差值在可接受的范围内。

从图 1 可见,所有数据都在 -3.0~3.0, 表明该响应面模型与实验数据拟合度良好。从图 2 和图 3 可看出,不同微生物合成的木聚糖酶及  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶之间的复合对低聚木糖的提取有着显著的提高,

适量的添加  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶能够去除阿拉伯糖侧链对木聚糖酶水解时空间上的阻碍作用,使木聚糖酶可以更好的接近其临近的木聚糖主链上相关结合位点;但是过量的添加  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶则会造成低聚木糖得率的下降,可能是因为过多的  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶会阻碍木聚糖酶接近其相关的结合位点,两者产生竞争拮抗机制,进而导致低聚木糖得率的下降。

表 2 复合酶解实验低聚木糖得率

Table 2 The XOS extraction rate of mix enzymatic hydrolysis experiments

序号 Number	X(%) Xylanase A	H(%) Xylanase B	Z(%) Alpha-L- arabin of uranosidase	低聚木糖得率 The XOS extraction rate(%)
1	37.5	25	37.5	83.17
2	25	25	50	58.24
3	29	29	42	68.31
4	25	50	25	79.43
5	37.5	37.5	25	81.97
6	42	29	29	82.95
7	25	50	25	80.84
8	50	25	25	84.68
9	29	42	29	80.89
10	25	37.5	37.5	83.14
11	50	25	25	84.21
12	37.5	37.5	25	81.76
13	33	33	33	86.14
14	25	25	50	57.86

表 3 低聚木糖得率回归模型方程分析

Table 3 ANOVA for the regression of response surface model of the XOS extraction rate

方差来源 Vaxation soruces	平方和 Sum of the squares	自由度 Freedom degress	Square	F	Prob> F
Model	682.91	5	136.58	9.06	0.0038
Linear Mixture	75.08	2	37.54	2.49	0.1444
AB	118.18	1	118.18	7.84	0.0232
AC	64.62	1	64.62	4.29	0.0722
BC	455.44	1	455.44	30.20	0.0006
Residual	120.64	8	15.08		
Lack of Fit	117.81	4	29.45	41.65	0.0016
Pure Error	2.83	4	0.71		
Cor Total	803.55	13			
R-Squared	0.8499	Adj-Squared 0.7560			
Adeq-precision	10.471	Pre-Squared 0.6768			

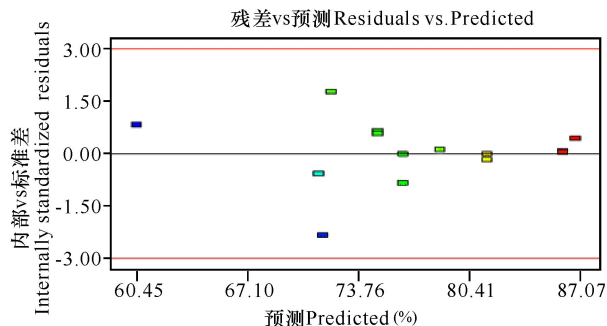


图 1 复合酶水解蔗渣木聚糖响应面模型残差分布

Fig. 1 Residual distribution for the response surface model of enzymatic hydrolysis of bagasse xylan

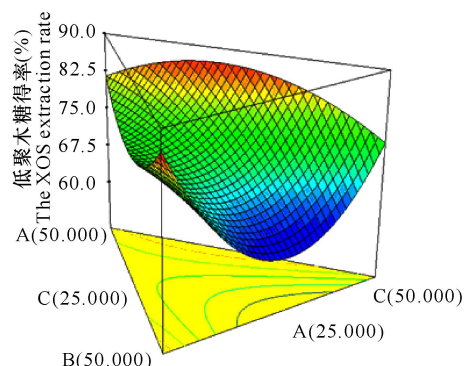


图 2 复合酶水解的混合曲面

Fig. 2 Mixed response surface plot for the concentration of XOS at different volumes of mixed enzymes

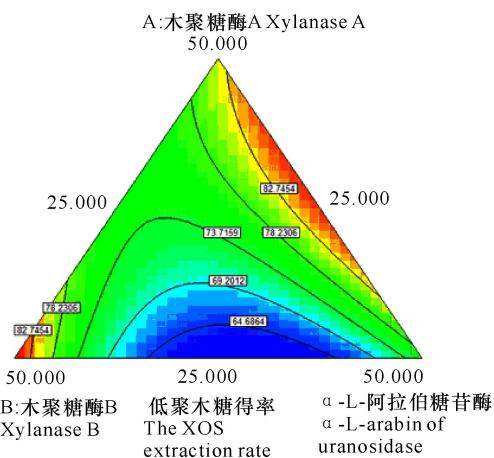


图 3 复合酶水解蔗渣木聚糖实验结果等量线

Fig. 3 Mixture contour plot for the concentration of XOS at different volumes of mixed enzymes

## 2.2 混合曲面图分析及工艺优化

由复合酶水解的混合曲面图及复合水解模型的分析,得出低聚木糖得率的最优化酶复合搭配为木聚糖酶 A,木聚糖酶 B 及  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶;最优配比:木聚糖酶 A 占 39.511%,木聚糖酶 B 占 25%, $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶占 35.489%;在此条件下模型预测低聚木糖得率为 87.27%。考虑到实验进行过程中的可操作性,将最优酶的配比设定为木聚糖酶 A 占 39.5%,木聚糖酶 B 占 25%, $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶占

35.5%。在此设定的条件下进行验证试验,得到低聚木糖得率为 85.20%,折算成蔗渣原料低聚木糖产率为 15.34%。

### 3 结论

目前制备低聚木糖的方法有化学降解、热水抽提、微波降解辅助等。酸水解法对于设备的要求较高,需要耐酸、耐热、耐压的设备;且在反应的过程中,酸水解的速度较快,还会导致低聚木糖过度水解生成木糖。热水抽提法得到的低聚木糖结晶颜色较深。微波降解辅助受到设备的限制不能大规模生产。随着酶工业的蓬勃发展,酶的应用得到极大提升,在生产低聚木糖方面,酶法相对于其它方法有其固有优点,如原料来源广泛、反应条件温和、所得低聚木糖产品生理活性比一般的低聚木糖高等优点。虽然酶法是一种精巧而有前景的制备低聚木糖的方法,但是单纯使用木聚糖酶降解木聚糖往往产率不高,而使用多种酶复配的方式对不同原料木聚糖进行酶解能显著提高酶解效率,提高低聚木糖的产率。

本文采用混料试验设计中的单纯形质心方法对木聚糖酶 A,木聚糖酶 B 和  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶进行配方设计,通过分析试验结果建立回归方程,考察各组分对酶解效果的影响,以低聚木糖得率为评价指标,分析得出低聚木糖得率的最优化酶复合配比为木聚糖酶 A 39.5%,木聚糖酶 B 25%及  $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶 35.5%。在此设定的条件下进行验证试验,得到低聚木糖得率为 85.20%,折算成蔗渣原料低聚木糖产率为 15.34%。

#### 参考文献:

[1] 殷福珊. 中国生物质能源的发展现状及趋势[J]. 日用化学科学, 2006, 29(11): 1-2.  
Yin F S. The current development situation and trends of biomass energy in China[J]. Detergent & Cosmetics, 2006, 29(11): 1-2.

[2] Akpınar O, Erdogan K. Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes[J]. Food and Bioproducts Processing, 2009(87): 145-151.

[3] 王曦, 张赛仕. 农业废弃生物质资源的再利用[J]. 当代农机, 2009(1): 54-55.  
Wang X, Zhang S S. Recycling of agricultural waste biomass resources [J]. Contemporary Farm Machinery, 2009(1): 54-55.

[4] 聂国兴, 王俊丽, 明红. 木聚糖酶的应用现状与研发热点[J]. 工业微生物, 2008(1): 53-59.  
Nie G X, Wang J L, Ming H. Application status of xyla-

nase and its hot topics of researches and developments [J]. Industrial Microbiology, 2008(1): 53-59.

[5] 石国良, 周玉恒, 张厚瑞, 等. 木聚糖酶 Shearzyme 500L 酶解蔗渣木聚糖的特性研究[J]. 食品科学, 2010(24): 102-106.  
Shi G L, Zhou Y H, Zhang H R, et al. Xylanase Shearzyme 500L enzymolysis bagasse xylan characteristic research[J]. Food Science, 2010(24): 102-106.

[6] 林增祥, 张红漫, 岩立石, 等. 混料实验设计在纤维素酶复配中的应用研究[J]. 食品科学, 2009, 30(15): 169-171.  
Lin Z X, Zhang H M, Yan L S, et al. Mixture design of experiments in the application of cellulase distribution research[J]. Food science, 2009, 30(15): 169-171.

[7] 韦杰, 段永忠, 唐湘华, 等. 响应面分析法对甘蔗渣中木聚糖提取条件的优化[J]. 生物技术通报, 2009(S1): 291-296.  
We J, Duan Y Z, Tang X H, et al. Response surface of bagasse xylan extraction conditions optimization analysis [J]. Biotechnology Bulletin, 2009(S1): 291-296.

[8] Gao D, Chundawat S P S, Krishnan C, et al. Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover[J]. Bioresource Technology, 2010(101): 2770-2781.

[9] Lin Z X, Zhang H M, Ji X J, et al. Hydrolytic enzyme of cellulose for complex formulation applied research[J]. Biochemistry Biotechnology, 2011(164): 23-33.

[10] 高艳秀, 陈复生, 丁长河. 微生物木聚糖酶及其应用[J]. 中国酿造, 2012(3): 10-12  
Gao Y X, Chen F S, Ding C H. Microbial xylanase and its application[J]. China Brewing, 2012(3): 10-12.

[11] Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications; A review[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001(3-4): 326-338.

[12] 付冠华, 李端, 周晨妍, 等. 木聚糖酶的研究进展及其应用[J]. 安徽农业科学, 2011(35): 21566-21568.  
Fu G H, Li R, Zhou C Y, et al. Research progress and application of xylanase[J]. Journal of Anhui Agriculture Science, 2011, 39(35): 21566-21568.

[13] 何亮亮, 陆登俊. 响应面分析法优化蔗渣木聚糖提取工艺[J]. 轻工科技, 2012(4): 5-7.  
He L L, Lu D J. Response surface of bagasse xylan extraction process optimization analysis[J]. Light Industry Science and Technology, 2012(4): 5-7.

[14] 何亮亮. 复合酶解蔗渣木聚糖制备低聚木糖的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2012  
He L L. The Research on Production of Xylooligosaccharides by Composite Enzymatic Hydrolysis from Bagasses Xylan[D]. Nanning: Guangxi University, 2012.

(责任编辑: 尹 闯)