双酶混合水解玉米皮渣制备阿魏酰低聚糖研究

杜 娟¹ 游雪娇^{2 3 4} 解春艳^{1 5 *} ,侯晓强^{1 5} ,乔 洁^{1 5} 郭红珍^{1 5} ,吴智艳^{1 5} (1.廊坊师范学院生命科学院,河北廊坊 065000; 2.广东省微生物研究所,广东广州 510000;

- 3.省部共建华南应用微生物国家重点实验室 广东广州 510000;
 - 4.广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东广州 510000;
- 5.河北省高校食药用真菌应用技术研发中心,河北廊坊 065000)

摘 要:以玉米皮渣为原料,采用酶解方法制备阿魏酰低聚糖(Feruloyl oligosaccharides ,FOs),通过比较不同酶解条件下阿魏酰低聚糖产量的差异及不同酶解方式下玉米皮渣细胞壁结构的变化,确定酶解阿魏酰低聚糖生成的方法,并优化获得玉米皮渣中阿魏酰低聚糖的最佳酶解条件。结果表明:纤维素酶和木聚糖酶混合酶解可使玉米皮渣细胞壁出现溶洞,可有效提高阿魏酰低聚糖产量;经单因素和响应面实验确定双酶混合酶解的最佳条件为混合酶的添加量为 $15.7~{\rm g/L}$,混合酶中纤维素酶添加比例为 70%,酶解 $1~{\rm h}$,玉米皮渣底物添加量为 $100~{\rm g/L}$,在此条件下 ${\rm FOs}$ 产量最高,为 $1008.43~{\rm \mu mol/L}$ 。本研究为双酶混合酶解制备玉米皮渣 ${\rm FOs}$ 提供理论依据。

关键词:玉米皮渣 阿魏酰低聚糖 混合酶解 酶解条件

Study on production of feruloyl oligosaccharides by compound enzymatic hydrolysis from maize bran

DU Juan¹, YOU Xue-jiao^{2,3,4}, XIE Chun-yan^{1,5,*}, HOU Xiao-qiang^{1,5}, QIAO Jie^{1,5}, GUO Hong-zhen^{1,5}, WU Zhi-yan^{1,5}

(1.College of Life Sciences Langfang Teachers University Langfang 065000 China;

2. Microbiology Institute of Guangdong Province Guangzhou 510000 China;

3. State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangzhou 510000, China;

4.Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application ,Guangzhou 510000 ,China;

 Applied Technology Researcher Center of Medicinal and Edible Mushroom of Higher Education School of Hebei Province Langfang 065000 (China)

Abstract: Production of feruloyl oligosaccharides by enzymatic hydrolysis form maize bran was investigated in this paper. In order to explore the reason that influenced the yield of feruloyl oligosaccharides, maize bran was hydrolyzed by different enzymes and the cell wall of maize bran was also determined. In the end, the optimal enzyme hydrolysis condition was optimized by single factor and response surface experiment. Results showed that the mixture of cellulase and xylanase could improve maize bran cell wall dissolving and could improve the yield of feruloyl oligosaccharides. The optimal condition for FOs production was mixture enzyme addition of 15.7 g/L, which was consist with 70% cellulase addition and the maize bran material addition was at 100 g/L, and hydrolysis for 1 h, under this condition, the yield of FOs was 1008.43 μmol/L. This result provides theoretical basis for FOs production by compound enzymatic hydrolysis from maize bran.

Key words: maize bran; feruloyl oligosaccharides; compound enzymatic hydrolysis; hydrolysis condition

中图分类号:TS210.1 文献标识码:A 文章编号:1002-0306(2017)08-0193-06

doi:10.13386/j.issn1002 - 0306.2017.08.029

收稿日期:2016-09-19

作者简介:杜娟(1983-),女 硕士 实验师 研究方向:生物化学 E-mail: dujuan0203@163.com。

^{*} 通讯作者:解春艳(1983-),女 博士 副教授 研究方向:食品生物技术 E-mail: xcy8046@163.com。

基金项目: 河北省科技计划项目(15222913);河北省教育厅优秀青年基金项目(YQ2013027);河北省高等学校科学技术研究项目(Z2014049);河北省高校食药用菌应用技术研发中心项目(YF201411-321);河北省高等学校遗传学重点发展学科项目(201221);廊坊师范学院微生物学重点学科项目(201501);廊坊师范学院博士基金项目(LSLB201407)。

Science and Technology of Food Industry

玉米皮是玉米籽粒的表皮部分,其量可占玉米重量的 8%~10%^[1]。玉米皮渣是玉米淀粉加工过程中形成的副产物,主要是玉米皮及少量淀粉、蛋白质等,报道称玉米皮渣中含有膳食纤维(52.6%~86.0%)、蛋白质(5.0%~13.0%)、淀粉(4.0%~20.0%)和酚类化合物(2.0%~5.5%)等^[2]。玉米皮渣总酚类化合物中,阿魏酸及其聚合物占 90%以上^[3]。在植物中阿魏酸多以酯键与细胞壁多糖链接^[4],水解后可获得阿魏酰低聚糖(Feruloyl oligosaccharides FOs)。

FOs 是阿魏酸(Ferulic acid,FA)与糖的羟基通过酯键连接成的一类重要的功能性低聚糖^[1] 具有多种生理功效 报道称 FOs 可增强小鼠免疫力^[5]、改善肠道菌群^[6]、预防癌症等^[7-10]作用。目前阿魏酰低聚糖的研究主要集中在其生物活性方面,也有少量以禾本科植物为原料进行 FOs 制备的报道^[11-12],但研究仅限于制备条件的优化,且研究中多数仅用木聚糖酶解,单一酶酶解效率显著低于纤维素酶和木聚糖酶混合酶解^[13],推测双酶中酶的添加比例亦会影响产物的生成。本研究以玉米皮渣为原料,采用双酶酶解制备 FOs 在确定最佳酶解条件的同时,通过比较不同酶解方式下玉米皮渣细胞壁结构的差异,探讨 FOs 生成与酶种类及酶组成的关系。研究结果将有助于玉米皮渣的合理利用及 FOs 的工业生产。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

玉米皮渣 购自河北省沧州市淀粉加工厂; 纤维素酶、木聚糖酶 由宁夏夏盛实业集团有限公司提供,酶活分别为 600 万 $\mu g/min \cdot g$ 和200 万 $\mu g/min \cdot g$; NaOH、浓 HCI、无水乙醇、磷酸等 为国产分析纯 国药集团化学试剂有限公司; 乙腈 为国产色谱级 国药集团化学试剂有限公司。

Hitachi S-3000N 扫描式电子显微镜、安捷伦 1260 高效液相色谱仪 美国 Agilent 公司; Milli-Q 纯水机 美国 Merck Millipore 公司; MLS-3750 全自动立式灭菌锅 日本 Sanyo 公司; SHZ-82A 恒温振荡器 常州朗越仪器制造有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅 江苏金坛荣华仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 FOs 的测定

1.2.1.1 FOs 含量 阿魏酰低聚糖是阿魏酸与低聚糖以酯键形式连接 ,经碱解后可释放阿魏酸 ,现报道的 FOs 结构中阿魏酸与低聚糖组成比例相同 $^{[14]}$,即阿魏酸摩尔含量与 FOs 摩尔含量相同 ,故本实验中测定 FOs 样品液及其碱解液中阿魏酸含量 ,换算得出 FOs 的摩尔含量 $^{[15]}$ 。

1.2.1.2 FOs 碱解处理 取玉米皮渣酶解液 1 mL 于 10 mL 离心管中 ,添加 1 mL 浓度为 1 mol/L 的氢氧 化钠溶液 ,于 $100 \text{ }^{\circ}\text{ }$ 水解 90 min ,冷却后用 1 mol/L 的盐酸溶液中和。

1.2.1.3 阿魏酸的液相色谱测定条件 采用 Agilent TC- C_{18} 柱(4.6 mm × 250 mm ,5 μ m) ,25 $^{\circ}$ C ,进行 HPLC 分离 ,检测器为紫外检测器(UV);洗脱液为

0.1% 磷酸水(V/V)(A)和乙腈(B) ,两者比例为 17:83 流速为 1.0 mL/min ,进液量为 20 μL 检测波长为 320 nm。

1.2.2 酶种类对玉米皮渣 FOs 生成的影响 以高压蒸煮后的玉米皮渣为原料 $^{[12]}$,取一定量的玉米皮渣粉 按底物添加量为 100 g/L 添加磷酸盐缓冲溶液 (50 mmol/L $_{
m pH}$ 为 5.0) ,再分别添加纤维素酶、木聚糖酶以及两者的复合酶(纤维素和木聚糖酶添加比例为 1:1) ,添加量为 10 g/L ,于 60 ℃ 60 min $_{
m 4}$ 000 r/min 离心 15 min ,分别测定上清液中 FOs 含量。

高压蒸煮处理方法: 取 200 g 玉米皮渣 ,添加 100 mL蒸馏水 ,置于 500 mL 三角瓶中 ,于高压灭菌锅中 采用 121 ℃下处理 20 min ,温度降至 70 ℃时 ,取出 ,于 60 ℃烘箱中烘干待用。

1.2.3 酶解玉米皮渣制备 FOs 最佳条件研究 采用单因素和响应面实验对玉米皮渣 FOs 酶解的最佳条件进行优化。

1.2.3.1 单因素实验 外源酶酶解效果受底物添加量、酶解时间、pH、酶添加量等因素的影响^[14],本研究中分别对上述各因素进行单因素实验,找出各因素水平范围。

分别设置底物添加量 25、50、75、100 和 125 g/L, 酶添加量分别设定为 5、10、15 和 20 g/L(酶比例为纤维素酶: 木聚糖酶为1:1) 酶解时间分别设定 1、2、4、6 和 8 h ,pH 分别设定为 4.5、5.0、5.5 和 6.0。按照上述设定方法进行单因素实验 在实验中 ,后次实验均以上次实验的最佳点作为实验参数 ,即当底物添加量最佳量确定后 ,后面均以该浓度为设定浓度 ,进行实验。

酶解结束后 分别于95 ℃灭酶10 min 4000 r/min 离心15 min 测定上清液中FOs含量。

1.2.3.2 响应面实验 为进一步优化混合酶酶解制备 FOs 最佳条件,在单因素实验基础上以纤维素酶添加比例(纤维素酶占混合酶的比例)、酶解时间、加酶量和底物添加量为变量,以 FOs 生成量为响应值,选用四因素三水平的 Box-Behnken 中心组合设计进行实验,实验设计见表 1。通过 Design-Expert 8.0 设计出如下 29 组实验。

表1 因素水平表

Table 1 The factors and levels graph

因素	水平				
凸糸	- 1	0	1		
A 纤维素酶添加比例(%)	0	50	100		
B 酶解时间(h)	1	2.5	4		
C 酶添加量(g/L)	10	15	20		
D 底物添加量(g/L)	50	75	100		

1.2.4 玉米皮渣电镜扫描 对不同酶酶解处理过的 玉米皮渣进行电子显微镜扫描 (scanning electron microscope SEM) 加速电压 15.0 kV 放大倍数 1500 × ,通过电镜扫描图观察不同酶酶解前后玉米皮渣原料 纵横切面形态的变化。

1.3 统计分析

实验设 3 次重复 ,取平均值 ,以 \bar{x} ± SD 表示 ,并进行方差分析和 Duncan 检验。数据采用 Design Expert 8.0 软件进行统计分析 ,设置显著性水平为 p < 0.05。

2 结果与分析

2.1 阿魏酰低聚糖液相分析

如图 1 所示 FOs 原样液液相图谱中在阿魏酸出峰时间内有较小峰出现但碱解后阿魏酸峰面积显著增加 原因是 FOs 经碱水解后阿魏酸酯碱断裂 释放阿魏酸 依据目前报道的阿魏酰低聚糖的结构可用阿魏酸的摩尔量代替 FOs 的摩尔量。

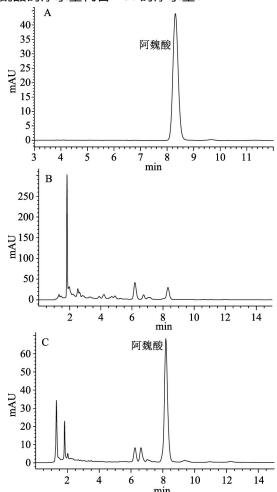


图 1 酶解获得 FOs 上清液碱解前后及阿魏酸标品液相图

Fig.1 HPLC figures of FOs before and after hydrolysis and HPLC figure of ferulic acid standard 注: 图中 A、B、C 分别为阿魏酸标准品、FOs 液碱解前和碱解后的液相图。

2.2 酶种类对玉米皮渣 FOs 生成的影响

以高压蒸煮后的玉米皮渣为原料,采用外源酶处理,测定玉米皮渣经木聚糖酶、纤维素酶和两者1:1比例混合酶处理后 FOs 生成量,结果如图 2 所示。

由图 2 可知纤维素酶与木聚糖酶按 1:1比例添加时, 玉米皮渣中 FOs 生成量显著高于单一酶的处理, 在单一酶处理中又以纤维素酶处理获得的 FOs

Vol.38, No.08, 2017

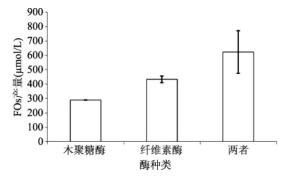


图 2 酶种类对 FOs 生成的影响

Fig.2 Effects of enzyme kinds on the production of FOs

量较高。其原因是玉米皮渣中细胞壁结构中纤维素与半纤维素及木质素紧密相连^[16-17] .外源酶进入需打破这种连接 .纤维素酶可作用于玉米皮细胞壁 ,使纤维素降解 .进而可促进木聚糖酶作用于玉米皮渣细胞壁 .获得 FOs; 单一酶中又以纤维素酶最佳 ,分析可能是该酶纯度不高 ,其中含有木聚糖酶。后续酶解中用两种酶的复合酶进行。

2.3 玉米皮渣经酶处理后细胞壁结构变化

玉米皮渣经外源酶处理后,其细胞壁结构如图 3 所示。结果显示玉米皮渣酶解过程中因所用酶的不同而造成其细胞壁结构的差异,与未酶解的玉米皮渣细胞壁结构相比,酶解后结构均出现断裂,且不同酶处理玉米皮渣断裂层不同,这与酶解后 FOs 生成

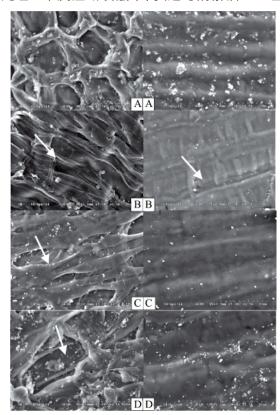


图 3 外源酶酶解后玉米皮细胞壁结构图 Table 3 SEM of maize bran cell wall treated by different enzyme

注: 图中 A 为玉米皮渣原样 $B\sim D$ 分别为纤维素酶、木聚糖酶及两者共同酶解后样品 图中 $A\sim D$ 为放大 1500 倍的效果图。

Science and Technology of Food Industry

量的趋势相同; 纤维素酶处理后玉米皮渣横纵向出现裂痕 纵向断裂情况明显; 木聚糖酶处理后在玉米皮渣内层裂痕明显 ,纵向未见断裂; 经两酶共同处理后,玉米皮渣结构溶解 ,出现大的空洞 ,此结果与张暖等^[18] 采用混合酶处理麦麸后麦麸细胞壁结构变化情况类似。但复合酶处理后玉米皮渣纵向结构变化比单一纤维素酶处理要小 ,原因是在复合酶中纤维素酶比例为 50% 与单一纤维素酶相比酶量较少 ,造成纵向断裂效果不显著 ,由此推测在复合酶酶对程中纤维素酶与木聚糖酶比例亦会影响玉米皮渣细胞壁结构的变化 ,同时造成 FOs 生成量的差异。

2.4 酶解玉米皮渣制备 FOs 的条件优化

2.4.1 底物添加量对 FOs 生成的影响 由图 4 可知 ,FOs 产量随着底物添加量的增加先上升后保持不变; 底物添加量为 75 g/L 时 ,FOs 产量达到最大值(为 886 μmol/L); 底物添加量低于 75 g/L 时 ,随着底物的增加 ,FOs 产量增加 ,而超过 75 g/L 时 ,底物添加量的增加对 FOs 产量影响不显著。其原因是在酶添加量一定的情况下 ,底物增加可增加提供 FOs的主体 ,而当其增大到一定量下 ,外源酶已不足以使其完全水解获得 FOs ,致使 FOs 产量保持不变。

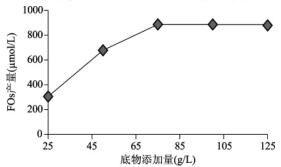


图 4 底物添加量对 FOs 生成含量

Fig.4 Effects of substrate addition on the production of FOs 2.4.2 酶添加量对 FOs 生成的影响 由图 5 可知 ,

FOs 产量随酶添加量的增加先增加后下降 ,当酶的添加量为 15 g/L 时 FOs 产量达到最大值 746 µmol/L 原因可能是 ,当底物添加量一定的情况下 ,FOs 的产量会随着酶的添加量的增加而增加 ,直至达到最大限度 ,之后酶再继续添加便会抑制产物的生成 ,酶中可能有一些物质会使 FOs 分解 ,从而使 FOs 产量下降。

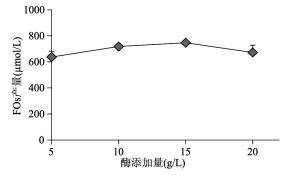


图 5 酶添加量对 FOs 生成的影响

Fig.5 Effects of enzyme addition on the production of FOs 2.4.3 酶作用时间对 FOs 生成的影响 由图 6 可知 FOs 产量随着酶处理时间的延长呈先增加后减小

的变化趋势,当酶处理时间是 2 h 时,FOs 的产量达到最大值,之后其值有下降的趋势。其原因是: 酶作用于底物需要一定的时间,达到一定时间时 FOs 的产量最大,时间再延长 FOs 被分解使其产量下降。所以酶的最适作用时间是 2 h。

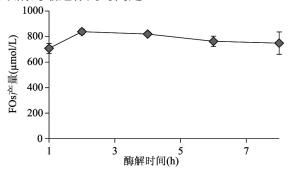


图 6 酶解作用时间对 FOs 生成含量

Fig.6 Effects of enzyme time on the production of FOs

2.4.4 pH 对 FOs 生成的影响 由图 7 可知 在 4.5 ~ 6.0 范围内 ,随着 pH 的升高 ,FOs 产量先增大后减小 在 5.0 ~ 5.5 时 ,FOs 产量最大 ,原因是所用商品酶中木聚糖酶和纤维素酶的最适 pH 均为 5.0 ~ 5.5 ,由 FOs 产量比较 ,FOs 制备的最适 pH 应为 5.5 。

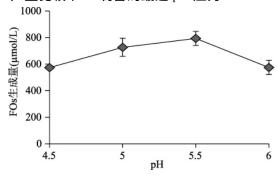


图 7 pH 对 FOs 生成量的影响

Fig.7 Effects of pH on the production of FOs

2.5 FOs 酶解条件响应面优化研究

在单因素实验基础上,选取纤维素酶添加比例、 酶解时间、加酶量和底物添加量四因素,采用响应面 优化法对上述四因素生成 FOs 最佳参数进行优化, 实验设计及结果见表 2。

利用 Design-Expert8.0 软件对表 2 实验数据拟合 得到 FOs 产量(Y) 对纤维素酶比例(A)、酶解时间(B)、酶添加量(C)、底物添加量(D) 的二次多项回归模型为:

 $Y = 568.15 + 144.59A - 85.08B + 24.02C + 170.58D - 78.85BD - 183.22A^2 - 86.81C^2 + 77.19D^2$

利用 Design-Expert 软件对数据进行回归分析,得到方差分析结果见表 3。分析可知 模型是极显著的(p < 0.01),因素 $A \times B \times D$ (p 值分别为 < 0.001, 0.0012 和 < 0.0001) 对 FOs 产量的影响极显著; 由实验值与回归方程预测值的相关系数 $R^2 = 0.9188$,可知模型预测值与实际值拟合情况良好,说明采用响应曲面法进行 FOs 制备条件优化实验设计所得回归方程模型是可行的。

从表 3 中各因素 F 值大小分析可知 影响 FOs

表 2 响应面实验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface

実験号 A B C D Y: FOs 产量 (μmol/L)		Table 2	Design and results of response surface				
2 1 -1 0 0 652.48 3 -1 1 0 0 164.39 4 1 1 0 0 495.84 5 0 0 -1 -1 264.72 6 0 0 1 -1 493.71 7 0 0 -1 1 636.41 8 0 0 1 1 719.82 9 -1 0 0 -1 213.12 10 1 0 0 -1 455.85 11 -1 0 0 1 487.66 12 1 0 0 1 637.78 13 0 -1 -1 0 688.94 14 0 1 -1 0 418.41 15 0 -1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 118.83	实验号	A	В	С	D		
3 -1 1 0 0 164.39 4 1 1 0 0 495.84 5 0 0 -1 -1 264.72 6 0 0 1 -1 493.71 7 0 0 -1 1 636.41 8 0 0 -1 1 636.41 8 0 0 -1 1 636.41 8 0 0 -1 1 636.41 8 0 0 -1 1 719.82 9 -1 0 0 -1 213.12 10 1 0 0 -1 455.85 11 -1 0 0 1 487.66 12 1 0 0 1 637.78 13 0 -1 -1 0 418.41 15 0 -1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83	1	- 1	- 1	0	0	257.91	
4 1 1 0 0 495.84 5 0 0 -1 -1 264.72 6 0 0 1 -1 493.71 7 0 0 -1 1 636.41 8 0 0 1 1 719.82 9 -1 0 0 -1 213.12 10 1 0 0 -1 455.85 11 -1 0 0 1 487.66 12 1 0 0 1 637.78 13 0 -1 -1 0 688.94 14 0 1 -1 0 418.41 15 0 -1 1 0 534.55 16 0 1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 511.41	2	1	- 1	0	0	652.48	
5 0 0 -1 -1 264.72 6 0 0 1 -1 493.71 7 0 0 -1 1 636.41 8 0 0 -1 1 719.82 9 -1 0 0 -1 213.12 10 1 0 0 -1 455.85 11 -1 0 0 1 487.66 12 1 0 0 1 637.78 13 0 -1 -1 0 688.94 14 0 1 -1 0 418.41 15 0 -1 1 0 534.55 16 0 1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 1 448.06	3	- 1	1	0	0	164.39	
6 0 0 1 -1 493.71 7 0 0 -1 1 636.41 8 0 0 1 1 719.82 9 -1 0 0 -1 213.12 10 1 0 0 -1 455.85 11 -1 0 0 1 487.66 12 1 0 0 1 637.78 13 0 -1 -1 0 688.94 14 0 1 -1 0 418.41 15 0 -1 1 0 534.55 16 0 1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 1 180.88 20 1 0 -1 448.06	4	1	1	0	0	495.84	
7 0 0 -1 1 636.41 8 0 0 1 1 719.82 9 -1 0 0 -1 213.12 10 1 0 0 -1 455.85 11 -1 0 0 1 487.66 12 1 0 0 1 637.78 13 0 -1 -1 0 688.94 14 0 1 -1 0 418.41 15 0 -1 1 0 534.55 16 0 1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 1 448.06 22 0 1 0 1 1102.12	5	0	0	- 1	- 1	264.72	
8 0 0 1 1 719.82 9 -1 0 0 -1 213.12 10 1 0 0 -1 455.85 11 -1 0 0 1 487.66 12 1 0 0 1 637.78 13 0 -1 -1 0 688.94 14 0 1 -1 0 688.94 14 0 1 -1 0 418.41 15 0 -1 1 0 534.55 16 0 1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 1 448.06 22 0 1 0 1 1102.12	6	0	0	1	- 1	493.71	
9 -1 0 0 -1 213.12 10 1 0 0 -1 455.85 11 -1 0 0 1 487.66 12 1 0 0 1 637.78 13 0 -1 -1 0 688.94 14 0 1 -1 0 418.41 15 0 -1 1 0 534.55 16 0 1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 -1 448.06 22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 771.66 </td <td>7</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>- 1</td> <td>1</td> <td>636.41</td>	7	0	0	- 1	1	636.41	
10 1 0 0 -1 455.85 11 -1 0 0 1 487.66 12 1 0 0 1 637.78 13 0 -1 -1 0 688.94 14 0 1 -1 0 418.41 15 0 -1 1 0 534.55 16 0 1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 -1 448.06 22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 </td <td>8</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>719.82</td>	8	0	0	1	1	719.82	
11 -1 0 0 1 487.66 12 1 0 0 1 637.78 13 0 -1 -1 0 688.94 14 0 1 -1 0 418.41 15 0 -1 1 0 534.55 16 0 1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 -1 448.06 22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 538.08 26 0 0 0 538.08 27<	9	- 1	0	0	- 1	213.12	
12 1 0 0 1 637.78 13 0 -1 -1 0 688.94 14 0 1 -1 0 418.41 15 0 -1 1 0 534.55 16 0 1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 -1 448.06 22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 538.08 26 0 0 0 538.08 27 0 0 0 538.08 28 0 </td <td>10</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>- 1</td> <td>455.85</td>	10	1	0	0	- 1	455.85	
13 0 -1 -1 0 688.94 14 0 1 -1 0 418.41 15 0 -1 1 0 534.55 16 0 1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 -1 448.06 22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 538.08 26 0 0 0 538.08 27 0 0 0 538.08 28 0 0 0 538.08	11	- 1	0	0	1	487.66	
14 0 1 -1 0 418.41 15 0 -1 1 0 534.55 16 0 1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 -1 448.06 22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 538.08 26 0 0 0 538.08 27 0 0 0 538.08 28 0 0 0 538.08	12	1	0	0	1	637.78	
15 0 -1 1 0 534.55 16 0 1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 -1 448.06 22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 538.08 26 0 0 0 538.08 27 0 0 0 538.08 28 0 0 0 538.08	13	0	- 1	- 1	0	688.94	
16 0 1 1 0 379.76 17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 -1 448.06 22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 538.08 26 0 0 0 538.08 27 0 0 0 538.08 28 0 0 0 538.08	14	0	1	- 1	0	418.41	
17 -1 0 -1 0 118.83 18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 -1 448.06 22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 538.08 26 0 0 0 538.08 27 0 0 0 538.08 28 0 0 0 538.08	15	0	- 1	1	0	534.55	
18 1 0 -1 0 404.55 19 -1 0 1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 -1 448.06 22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 538.08 26 0 0 0 538.08 27 0 0 0 538.08 28 0 0 0 538.08	16	0	1	1	0	379.76	
19 -1 0 1 0 180.88 20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 -1 448.06 22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 538.08 26 0 0 0 538.08 27 0 0 0 538.08 28 0 0 0 538.08	17	- 1	0	- 1	0	118.83	
20 1 0 1 0 511.41 21 0 -1 0 -1 448.06 22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 0 538.08 26 0 0 0 0 538.08 27 0 0 0 0 538.08 28 0 0 0 0 538.08	18	1	0	- 1	0	404.55	
21 0 -1 0 -1 448.06 22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 0 538.08 26 0 0 0 0 538.08 27 0 0 0 0 538.08 28 0 0 0 0 538.08	19	- 1	0	1	0	180.88	
22 0 1 0 -1 432.99 23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 0 538.08 26 0 0 0 538.08 27 0 0 0 538.08 28 0 0 0 538.08	20	1	0	1	0	511.41	
23 0 -1 0 1 1102.12 24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 0 538.08 26 0 0 0 0 538.08 27 0 0 0 538.08 28 0 0 0 538.08	21	0	- 1	0	- 1	448.06	
24 0 1 0 1 771.66 25 0 0 0 0 538.08 26 0 0 0 0 538.08 27 0 0 0 0 538.08 28 0 0 0 0 538.08	22	0	1	0	- 1	432.99	
25 0 0 0 0 538.08 26 0 0 0 0 538.08 27 0 0 0 0 538.08 28 0 0 0 0 538.08	23	0	- 1	0	1	1102.12	
26 0 0 0 0 538.08 27 0 0 0 0 538.08 28 0 0 0 0 538.08	24	0	1	0	1	771.66	
27 0 0 0 0 538.08 28 0 0 0 0 538.08	25	0	0	0	0	538.08	
28 0 0 0 0 538.08	26	0	0	0	0	538.08	
	27	0	0	0	0	538.08	
29 0 0 0 0 538.08	28	0	0	0	0	538.08	
	29	0	0	0	0	538.08	

生成的大小顺序依次为 D(底物添加量) 、A(纤维素酶添加比例) 、B(酶解时间) 、C(酶添加量) ,其中纤

Vol.38, No.08, 2017

维素酶添加比例、作用时间和底物添加量达到极显著水平 此结果与前面显微观察推测相同 ,由此说明在复合酶酶解制备 FOs 的过程中除了两种酶的添加外 ,两种酶比例亦是酶解控制的重要参数。此外 ,底物添加量和酶解时间的交互作用对 FOs 产量的影响显著。

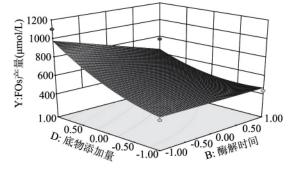


图 8 底物添加量和酶解时间对 FOs 产量的影响 Fig.8 Influence of substrate addition and enzyme time on the yield of FOs

对实验数据进行多元回归拟合,得到二次回归方程的响应曲面图,见图 8。由图 8 可知,底物添加量和酶解时间具有交互作用,随着底物添加量的增大 FOs 的生成量有明显的增加,随着酶解作用时间的增加 FOs 生成量略有减少。

通过数据分析 ,双酶混合制备 FOs 的最佳工艺条件为: 纤维素酶添加比例 69.73% ,混合酶添加量 15.68~g/L 酶解时间 1.0~h 底物添加量 100~g/L 在此条件下 ,FOs 的产量为 $1010.04~\mu mol/L$ 。考虑到可操作性 将条件调整为纤维素酶添加比例 70% ,混合酶添加量 15.7~g/L ,酶解时间 1.0~h ,底物添加量 100~g/L。进行验证实验得到 FOs 的产量为 $1008.43~\mu mol/L$,与理论值基本相符 ,进一步验证了回归模型的可靠性 ,因此响应面法对双酶混合制备 FOs 条件优化是可行的。

3 结论

经酶解 FOs 生成量的测定及细胞壁结构观察 ,明确了外源酶酶解制备 FOs 需要在纤维素酶和木聚糖酶的共同作用下效果最佳 基于此 通过单因素与响应

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

差异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	1059317	8	132414.6	21.68	< 0.0001	**
A	250881.7	1	250881.7	41.08	< 0.0001	**
В	86871.46	1	86871.46	14.23	0.0012	**
C	6924.69	1	6924.69	1.13	0.2996	
D	349183.5	1	349183.5	57.18	< 0.0001	**
BD	24868.6	1	24868.6	4.07	0.0572	
A^2	225823.9	1	225823.9	36.98	< 0.0001	**
C^2	50691.71	1	50691.71	8.30	0.0092	**
D^2	40078.66	1	40078.66	6.56	0.0186	*
残差	122134.2	20	6106.712			
失拟项	122134.2	16	7633.39			
纯误差	0	4	0			
总离差	1181451	28				

注: * 代表影响显著(p < 0.05) ,**代表影响极显著(p < 0.01) 。

Science and Technology of Food Industry

面优化相结合的方法确定了混合酶酶解玉米皮渣制备 FOs 的最佳条件为混合酶中纤维酶添加比例为 70%、酶解时间 1h、酶添加量 15.7~g/L 和底物添加量 100~g/L,在此条件下 FOs 产量可达 $1008.43~\mu mol/L$ 。

参考文献

- [1]李新华 董海洲.粮油加工学[M].北京: 中国农业大学出版社 2013:122-123.
- [2] Rose DL ,Inglett GE ,Liu SX. Utilisation of corn(Zea mays) bran and corn fiber in the production of food components [J]. Journal of Food Agriculture 2010 90:915–924.
- [3] Wang T, Zhu YD, Sun XH. Effect of microfluidisation on antioxidant properties of corn bran [J]. Food Chemistry, 2014, 152: 37–45.
- [4]解春艳 吴智艳 杜娟 等.阿魏酰低聚糖研究进展[J].食品科学 2012 33(7):336-340.
- [5] Ou JY, Sun Z. Feruloylated oligosaccharides: Structure, metabolism and function [J]. Journal of Functional Foods 2014, 7: 90–100.
- [6] Yuan XP , Wang J , Yao HY. Feruloyl oligosaccharides stimulate growth of $\it Bifidobacterium\ bifidum\ [J]$. Anaerobe ,2005 , 11: 225–229.
- [7] Ou JY , Sun Z. Feruloylated oligosaccharides: Structure , metabolism and function [J]. Journal of Functional Foods ,2014 , (7):90-100.
- [8] Zhang HJ, Wang J, Liu YL, et al. Wheat bran feruloyl oligosaccharides modulate the phase II detoxifying/antioxidant enzymes via Nrf2 signaling [J]. International Journal of Biological Macromolecules 2015 74: 150–154.
- [9] Wang J , Sun BG , Cao YP , et al. Protection of wheat bran

feruloyl oligosaccharides against free radical – induced oxidative damage in normal human erythrocytes [J]. Food and Chemical Toxicology 2009 47(7):1591–1599.

- [10] Zhang HJ, Wang J, Liu YL, et al. Wheat bran feruloyl oligosaccharides modulate the phase II detoxifying/antioxidant enzymes via Nrf2 signaling [J].International Journal of Biological Macromolecules 2015,74:150–154.
- [11] Devin JR ,George EI.Production of feruloylated arabinoxylooligosaccharides from maize (*Zea mays*) bran by microwave – assisted autohydrolysis [J]. Food Chemistry ,2010 ,119: 1613 –1618.
- [12] Yuan XP, Wang J, Yao HY. Production of femloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fibre by xylanases from *Bacillus subtilis* [J].Food Chemistry 2006 95(3), 484–492.
- [13]解春艳 游雪娇 侯晓强 等 物理处理玉米皮渣对酶法提取阿魏酰低聚糖的影响 [J].食品工业科技 2016 37(8): 272-275.
- [14]曾凤彩 汪文侠 宋春丽. 酶解玉米麸皮制备阿魏酰低聚糖的研究[J].粮食与饲料工业 2011(2):31-35.
- [15] Xie CY, Wu ZY, Guo HZ, et al. Release of feruloylated oligosaccharides from wheat bran through submerged fermentation by edible mushrooms [J]. Journal of Basic Microbiology 2014, 54 (S1): 14–20.
- [16] Tadashi I. Structure and functions of feruloylated polysaccharides [J]. Plant Science ,1997 ,127:111-127.
- [17]张晓民.禾本科植物细胞壁的木质化和阿魏酰化[J].中国野生植物资源 2011 30(6):7-13.
- [18] 张璟 欧仕益 ,张宁 ,等 .酶解麦麸制备阿魏酸和低聚糖的研究[J].食品科学 2003 24(11):63-67.

(上接第192页)

参考文献

- [1]于东 林跃伟 陈桂星 等.紫山药营养成分分析研究[J]. 营养学报 2010 32(2):190-192.
- [2]宋曙辉 刘庞源 汪文琪 等 .不同产地紫山药营养和功能 成分分析[J].营养学报 2012 34(1):92-96.
- [3]刘水英 李新生 党娅 等.响应面法优化紫山药花青苷提取工艺及其抗氧化活性[J].食品科学 2014 35(22):84-91.
- [4]杭悦宇 秦慧贞,丁志遵.山药新药源的调查和质量研究 [J].植物资源与环境,1992,1(2):10-15.
- [5]刘杭达 冯千苏 汪傑 筹 紫山药粗多糖提取工艺的优化 及其抗氧化性的研究 [J]. 食品工业科技 ,2015 ,36 (23): 208-213.
- [6]徐国钧 徐珞珊 常用中药材品种整理和质量研究 [M].福州:福建科学技术出版社 ,1997:449-472.
- [7]刘苏苏 冯长鑫 冯叙桥 等 .果蔬多糖生物活性及其提取 纯化技术的研究进展[J].食品科学 2015 36(17):281-287.
- [8] QIAN Zhigang. Cellulase assisted extraction of polysaccharides from *Cucurbita moschataand* their antibacterial activity [J]. Carbohydrate Polymers 2014 30(101):432–434.
- [9] YING Zhi ,HAN Xiaoxiang ,LI Jianrong. Ultrasound—assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves [J]. Food Chemistry 2011 ,127(3):1273–1279.
- [10]王彦平 汤高奇,谢克英,等.紫山药主要活性成分提取

纯化技术研究进展 [J]. 食品工业科技,2016,37 (17):356-359.

- [11] LIU RuiHai ,John Finley. Potential cell culture models for antioxidant research [J]. Agricultiral and Food Chemistry ,2005 , 53 ,4311–4314.
- [12] 谭榀新,叶涛,刘湘新,等.植物提取物抗氧化成分及机理研究进展[J].食品科学 2010 32(15):288-292.
- [13]王涛 朱晓伟 邵果园 ,等 .正交设计法优选紫山药多糖的提取工艺[J].安徽农业科学 2015 ,43(34):62-64.
- [14] 苗慧琴 霍秀文 ,王阳 ,等 .山药多糖脱蛋白方法的研究 [J].食品科技 2014 39(1):210-214.
- [15]王泽锋 石玲,苏一兰,等.响应面法优化紫薯蓣粗多糖乙醇沉淀工艺[J].食品工业科技,2014,35(12):240-243,248.
- [16]陈月英,王彦平,孙瑞琳,等.葡萄皮渣原花青素微波辅助提取工艺的优化及其抗氧化活性研究[J].北方园艺 2016 (11):123-126.
- [17]姚以才 耿中华,王乃馨,等.芦根多糖的超声辅助提取及其抗菌活性[J].食品科学,2011,32(14):147-151.
- [18]王如涛 吴绵斌 ,林建平 ,等 .植物多糖分离提取技术的研究进展[J].中国生物工程杂志 2013 33(7):118-123.
- [19] Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria [J]. Science 2005, 308 (5730): 1909–1911.