

真菌分解玉米芯生产低聚木糖的研究

蔡静平 黄淑霞 曾实*

(郑州粮食学院 河南 450052)

摘要 从53种真菌中筛选出3株能分解玉米芯木聚糖并产生低聚木糖的菌株。摇瓶发酵的适当条件为: 基质含木聚糖提取物5%, 蛋白胨0.1%、尿素0.1%, 温度32℃, 摇床转速180r/min, 培养时间48h, 木二糖相对于木聚糖的转化率最高为52.2%; 直接用固体玉米芯接种培养所选菌种, 加水保温, 分解玉米芯中的木聚糖生产低聚木糖, 在适宜的条件下木二糖相对于玉米芯的最高转化率为8%。

关键词 真菌, 玉米芯, 低聚木糖

近年来, 低聚糖作为一类功能性食品添加剂引起了人们的广泛兴趣。很多低聚糖不易为人体消化吸收、低热值; 不易为腐败菌发酵, 具防腐和抗龋齿的特性; 能够促进人体肠道中

有益的双歧杆菌增殖, 抑制肠道有害腐败菌的

* 本院94级毕业生时光辉, 95级毕业生江练新, 乔文传分别参加了部分研究工作

1995-11-18 收稿

生长,从而改善肠道微生态环境,起到调整人体生理功能,增强机体免疫力,预防疾病发生等效果^[1]。在国外,很多功能性低聚糖已被大规模生产,并广泛地被添加到糖果、饮料及各类保健营养液中。国内近几年也有人研究和生产麦芽低聚糖和异麦芽低聚糖等^[2]。

低聚木糖通常由 2~7 个木糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成。据报道,每人每日只需摄取 0.7g 低聚木糖即有明显改善肠道功能的效果^[3]。我国尚未见到低聚木糖的研究和生产。由于生产低聚木糖的原料来源广泛,价格低廉,且低聚木糖用于改善肠道微生态环境的效果好,因此研究开发该产品很有前途。

1 材料与方法

1.1 材料

玉米芯:郑州市郊购得。
化学试剂:均为分析纯。
菌种:本院微生物学教研室保藏菌种。
菌种培养基:PDA。

1.2 方法

木聚糖提取^[4] 将玉米芯粉碎,用沸水浸提,除去可溶性杂质,用 5% NaOH 浸提

离心除去不溶物,清液用 HCl 中和,取沉淀物反复用蒸馏水洗涤即可得到木聚糖粗提物。

低聚木糖测定:取发酵液调 pH 值至中性,滤去不溶物,清液以 3,5-二硝基水杨酸法测木糖含量^[5] 再另取清液用 6mol/L HCl 水解,经中和后以同样方法测木糖含量;将水解前后木糖含量的差值乘以低聚木糖聚合度系数(如木二糖即乘以 2)即得低聚木糖的含量。

低聚木糖种类的分析:取澄清发酵液经适当稀释后在硅胶 G 薄层板上点样,用溶剂展开(正丁醇:乙酸:水=2:1:1),再用显色剂(0.5g 地衣酚溶于 100ml 20% 的硫酸中)喷板,烘干后与标准对照,确定发酵液中低聚木糖的种类和相对浓度^[6]。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

以木聚糖粗提物作为碳源(加入量 5%),取代察氏培养基中的蔗糖,制成培养基平板,接种各类真菌共 53 种,发现大部菌种不分解利用木聚糖,因而不能生长,只有 11 个菌种能在该培养基上生长,且分解木聚糖后在培养基平板上显示明显的透明圈(表 1)。

表 1 不同菌种对木聚糖的分解及产物种类

菌种	平皿培养(30℃, 5d)		摇瓶培养(30℃, 3d)	
	菌落直径(cm)	透明圈直径(cm)	低聚木糖(以木二糖计, mg/ml)	产物种类*
粉红单端孢霉	1.5	3.0	23.5	X ₁ , X ₂ , X ₄
卷毛壳	4.0	5.3	21.9	X ₁ , X ₂ , X ₄
黑曲霉	3.0	3.8	11.9	X ₁ , X ₂
头孢霉	4.0	4.6	2.0	X ₁ , X ₂
禾谷镰刀菌	5.2	5.6	0	X ₁
椭圆曲霉	2.6	3.4	0	X ₁
白曲霉	1.7	3.7	0	X ₁
黄叉曲霉	3.1	4.1	0	X ₁
构巢曲霉	3.0	4.0	0	X ₁
溜曲霉	2.8	3.8	0	X ₁
杂色曲霉	0.6	1.5	0	X ₁

* X₁代表木糖, X₂代表木二糖, X₄代表木四糖

为了检测各菌种产低聚木糖的能力, 采用液体培养基(营养成分同上述固体培养基), 在 250ml 三角瓶中(装 100ml 培养基)摇瓶培养。结果表明(表 1): 粉红单端孢霉, 卷毛壳和黑曲霉产生低聚木糖的能力较强, 其它各菌种虽然有的分解木聚糖的能力很强, 但产物只有木糖。用薄层层析法对产低聚木糖菌种的发酵产物分析表明, 主要产物为木二糖, 另外也含少量的木糖和木四糖。

2.2 营养物对菌种分解木聚糖的影响

2.2.1 蛋白胨: 在培养基中加入蛋白胨, 菌种对木聚糖的利用速度大大加快, 以卷毛壳为例(表 2), 添加 0.1% 的蛋白胨后, 发酵液澄清的时间比对照组缩短了 16h; 加大蛋白胨添加量, 分解木聚糖的速度可进一步加快, 但产物中的低聚糖含量却大大减少, 因此以添加 0.1% 的蛋白胨为宜。

表 2 蛋白胨对卷毛壳分解木聚糖的影响

蛋白胨添加量 (%)	发酵液澄清 时间(h)	低聚木糖含量 (木二糖 mg/ml)
0	72	14.6
0.1	56	13.3
0.3	48	2.6

2.2.2 无机氮源: 测试三种无机氮化合物对卷毛壳分解木聚糖的影响表明(表 3), 以添加尿素组效果最佳。黑曲霉和粉红单端孢霉也表现基本相似的特性。

表 3 无机氮化合物对卷毛壳分解木聚糖的影响

无机氮化合物	产物低聚木糖含量 (以木二糖计, mg/ml)
0.1% 硝酸铵	11.6
0.1% 硫酸铵	16.6
0.1% 尿素	21.6

2.2.3 无机盐: 在发酵液中分别添加或组合添加 K_2HPO_4 和 $MgSO_4$, 结果表明它们对卷毛

壳、粉红单端孢霉、黑曲霉的生长和低聚木糖的产生均无明显的影响, 这可能是因为添加的木聚糖粗提物及蛋白胨中已经含有菌体生长所需的无机盐类。

2.3 不同发酵条件的影响

2.3.1 木聚糖粗提物摇瓶发酵: 将三个菌种分别接入装有 100ml 培养液的 250ml 三角瓶中进行摇瓶发酵, 结果表明(表 4), 菌种发酵的适合温度均为 33℃, 这与报道的木聚糖酶最适作用温度不同^[4], 其原因是虽然木聚糖酶最适作用温度较高, 但高的温度不利用菌体生长和酶的产生; 发酵时间应不少于 48h, 继续延长时间, 产物没有明显增多, 相反, 如卷毛壳延长至 60h 反而比 48h 的木二糖产量有所减少; 摇瓶转速在 150r/min 提高到 180r/min 时产物有明显增多现象, 继续提高转速至 210r/min, 未见木二糖产量继续增多。在最适条件下, 卷毛壳, 粉红单端孢霉和黑曲霉发酵产生木二糖相对木聚糖粗提物的转化率分别为 45.8%, 52.2%, 41.6%。

2.3.2 玉米芯直接发酵: 将玉米芯粉碎后用热水处理除去可溶性杂质, 再添加 4% 的麸皮并灭菌、接种, 在适温下培养, 待菌丝在基质中充分生长后, 加无菌水在一定温度下继续保温, 然后测定抽提液中低聚木糖的含量。结果表明, 卷毛壳、粉红单端孢霉和黑曲霉表现出基本相同的特性。以卷毛壳为例(表 5), 在菌丝培养阶段, 温度以 30℃ 较为适宜, 过高或过低的温度均不利于菌体的生长, 也不利于在菌体中形成低聚木糖酶; 但菌体内形成的低聚木糖酶耐温性较高, 在 45℃ 时表现出最高的酶活, 分解生成的木二糖量最多, 达 12mg/ml; 菌丝培养和加水保温两个阶段所需的时间均以 72h 为宜, 延长时间未见产物木二糖产量的增多。在上述最适的温度和时间条件下, 产物木二糖相对于玉米芯的最高转化率为 8%。

2.4 真菌生产低聚木糖的安全性

本试验选出了 3 株能分解玉米芯中的木聚糖生产低聚木糖的菌株, 其中黑曲霉为生产柠檬酸的菌株, 不会产生任何真菌毒素。

表 4 不同条件对各菌种分解木聚糖粗提物的影响

菌种	温度(℃)			时间(h)			摇瓶转速(r/min)		
	25	33	40	40	48	60	150	180	210
卷毛壳	11.6	22.7	21.0	17.0	21.6	19.8	17.7	21.4	22.9
粉红单端孢霉	13.5	26.1	18.3	20.1	25.3	26.5	20.8	25.7	25.1
黑曲霉	17.1	19.7	18.5	18.2	20.5	20.8	16.7	18.6	19.7

注: (1) 发酵液配比: 木聚糖 5%、蛋白胨 0.1%、尿素 0.1%, (2) 表中数据以木二糖计(mg/ml)

表 5 不同条件对卷毛壳直接分解玉米芯的影响

阶段	温度(℃)					时间(h)			
	25	30	35	45	55	24	48	72	96
菌丝培养	9	12	10	0	/	/	8	12	11
加水保温	/	/	6	12	11	6	10	12	12

注: (1) 表中数据以木二糖计, 单位 mg/ml, (2) 每 250ml 三角瓶中加玉米芯干物 15g, 加水 100ml

毛壳菌是粮食中常见的一类真菌^[7], 但未见有毛壳菌在食品中产生毒素和引起人中毒的报道^[8], 日本用于生产低聚木糖的菌种也是毛壳菌^[3]。粉红单端孢霉在本试验中虽然表现出最高的低聚木糖产率, 但据报道该菌可能产生单端孢霉毒素^[8], 因此用于生产之前必须测试其产毒特性。

参 考 文 献

[1] 杨雅清, 蒋凤琳, 丘志威等. 食品科学, 1993, 20(2): 187 ~ 197.

[2] 金其荣. 食品工业, 1995, 3: 5 ~ 6.

[3] 陈瑞娟. 食品与发酵工业, 1993, 2: 82 ~ 90.

[4] Bastawde k B. World J Microb Biotech, 1992, 8: 353 ~ 368.

[5] 蔡武城, 袁厚积. 生物物质常用化学分析法, 北京: 科学出版社, 1982.

[6] Patrice Pellerin, Michele Gosselin, Jean-Paul Lepoutre, et al. Enzyme Microb Technol. 1991, 13: 617 ~ 621.

[7] 殷蔚申. 食品微生物学, 北京: 中国财政经济出版社, 1991.

[8] 孟昭赫, 张国柱, 宋圃菊. 真菌毒素研究进展, 北京: 人民卫生出版社, 1979.

STUDIES ON CONVERSION CORNCOB INTO XYLO-OLIGOSACCHARIDES BY FUNGI

Cai Jingping Huang shuxia Zeng Shi

(Zhengzhou Grain College, Henan 450052)

Abstract Three strains of molds with capability of degrading the corncob xylan and producing xylo-oligosaccharides were selected from 53 species of molds. The suitable conditions in shake-flask experiment were the medium contained corncob xylan extracts 5%, peptone 0.1%, urea 0.1%, at 32℃, 180r/min for 48h, and the maximal conversion rate of the xylobiose to xylan was 52.2%. When the solid corncob medium was inoculated and formanted, the maximal rate of corncob conversion into xylobiose was 8%.

Key words Fungi, Corncob, Xylo-oligosaccharide