

重组 β -甘露聚糖酶制备低聚葡甘露糖 工艺条件的优化

赵梅¹, 王春娟¹, 董运海¹, 李剑芳^{*1}, 邬敏辰²

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究了利用自主构建的重组毕赤酵母菌株 GS115/*Auman26A* 所产 β -甘露聚糖酶水解魔芋粉制备低聚葡甘露糖的工艺条件。以底物魔芋粉的水解率为指标, 通过单因素试验确定酶法制备低聚葡甘露糖的酶解条件如下: 加酶量 60 U/g, 酶解温度 40 °C, 魔芋粉质量浓度 30 g/L, 酶解时间 5 h。魔芋粉水解率和酶解液还原糖质量浓度分别为 53.3% 和 10.45 mg/mL。超滤后的酶解产物经高效液相色谱检测可知组分主要以低聚葡甘露糖为主, 其中还原性单糖占 9.83%, 二糖以上的低聚葡甘露糖占 90.17%。

关键词: 重组 β -甘露聚糖酶; 魔芋粉; 低聚葡甘露糖; 超滤

中图分类号: Q 78 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)07—0704—05

Optimization of Hydrolytic Conditions for Glucomannan–Oligosaccharides by Recombinant β -Mannanase

ZHAO Mei¹, WANG Chunjuan¹, DONG Yunhai¹, LI Jianfang^{*1}, WU Minchen²

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The hydrolytic conditions of konjac powder were optimized for glucomannan-oligosaccharides (GMOS) by recombinant β -mannanase produced from *Pichia pastoris* GS115/*Auman26A*. The condition was optimized using the single factor test with the hydrolysis rate of substrate as the index. The optimized enzymatic condition was determined to use 60 U enzyme per gram konjac powder and 30 g/L konjac powder at 40 °C for 5 h enzymolysis. The hydrolysis rate of konjac powder and reducing sugar concentration were 53.3% and 10.45 mg/mL, respectively. The enzymatic hydrolysate after ultrafiltration was detected by high performance liquid chromatography (HPLC). The hydrolysate was mainly composed by glucomannan-oligosaccharides, including 9.83% reducing monosaccharide and 90.17% glucomannan-oligosaccharides. This research can greatly improve the added value of konjac powder and lay the research foundation for further refining and functionalization of GMOS.

Keywords: β -mannanase, glucomannan-oligosaccharides, konjac powder, ultrafiltration

收稿日期: 2015-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271811)。

* 通信作者: 李剑芳(1965—), 女, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 主要从事食品与生物技术研究。E-mail: lijf@163.com

魔芋是广泛分布在我国云南、四川、贵州等地区的特有经济作物,目前在國內主要作为一种粗纤维食物或食品添加剂使用。魔芋的主要活性成分为葡甘露聚糖,它是对魔芋进行深加工利用的重要成分。魔芋葡甘露聚糖(konjac glucomannan,KGM)是由葡萄糖和甘露糖按一定的摩尔比(1:1.6)以 β -1,4糖苷键结合而成的杂多糖,在主链甘露糖的C3位置上存在以 β -1,3糖苷键形成的分支结构^[1]。利用酶法水解魔芋粗提产品魔芋粉制备低聚葡甘露糖(glucomannan-oligosaccharides,GMOS),既可拓宽魔芋的应用范围、提高原料的附加值,同时又可减少酸碱使用量,具有较好的经济与社会效益。

β -甘露聚糖酶(EC 3.2.1.78),是一类能够水解甘露聚糖、葡甘露聚糖、半乳甘露聚糖及半乳葡萄甘露聚糖的内切酶,广泛存在于动植物及微生物中^[1]。目前,低聚甘露糖可由芽孢杆菌、黑曲霉、毛霉等微生物来源的 β -甘露聚糖酶水解甘露聚糖(从魔芋、角豆胶及瓜尔豆胶等植物中提取)制得^[1-3],其结构是由2~10个单糖分子通过 β -1,4或 β -1,3糖苷键连接而成。研究表明,低聚甘露糖可有效促进双歧杆菌、乳酸杆菌等肠道有益菌群的特异性增殖,降低肠道pH以抑制有害菌的生长;可通过提高肠粘膜局部免疫力、增强动物非特异性免疫、促进肝脏分泌甘露糖结合蛋白来增强机体免疫力^[4];还具有改善血清脂质、降低胆固醇和三酸甘油酯含量、不增加血糖浓度等特点^[5],是新一代功能性食品。

采用自主构建的酵母工程菌GS115/Auman26A作为产重组 β -甘露聚糖酶菌株,通过该重组酶降解魔芋葡甘露聚糖制备GMOS。与其他方法相比^[6],该方法具有产酶活性高、操作简易、易分离纯化及安全环保等优点。作者以水解率为指标,分别考察加酶量、酶解温度、底物质量浓度以及酶解时间对酶解过程的影响。通过控制水解率(50%~60%)并结合膜分离法制备获得GMOS,并利用高效液相色谱(HPLC)对酶解产物进行分析,以期为后期进行单一组分的分析和进一步精制研究奠定基础,同时也是为其工业化生产提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与培养基

魔芋粉,购自武汉靖江魔芋制品有限公司;毕赤酵母工程菌GS115/Auman26A,由作者所在实验

室构建并保藏;D-甘露糖、角豆胶:购自Sigma公司;3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、苯酚、亚硫酸钠、氢氧化钠等试剂均为国产分析纯。YPD、BMGY和BMMY培养基的配制参照Multi-Copy Pichia Expression Kit (Invitrogen公司)操作手册。

1.2 β -甘露聚糖酶的制备

在YPD平板上活化重组毕赤酵母GS115/Auman26A菌种,挑取重组子接种至BMGY液体培养基中,于30℃、220 r/min培养至 $A_{600\text{ nm}}$ 值为2~4;4 000 r/min离心5 min收集菌体,将菌体重悬于BMMY液体培养基中,于30℃、220 r/min诱导培养96 h,每隔24 h添加一次甲醇至终体积分数为0.5%。诱导结束后8 000 r/min离心5 min收集上清液,同时测定 β -甘露聚糖酶活性。

1.3 β -甘露聚糖酶的酶活性测定(DNS法)

采用改良的DNS法测定 β -甘露聚糖酶活性。取2.4 mL 5 mg/mL角豆胶溶液(pH 5.5的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液配制)于40℃预热5 min后加入0.1 mL适当稀释的酶液,40℃下准确反应10 min,加入2.5 mL DNS试剂,沸水浴中显色7 min,加入5 mL去离子水混匀后测定 $A_{540\text{ nm}}$ 。在上述反应条件下,每分钟产生1 μmol 还原糖(以甘露糖计)所需的酶量定义为1个酶活性单位(U)。

1.4 魔芋粉总糖含量测定

总糖是指样品被酸完全水解后所有还原性单糖之和。测定方法:准确称取0.2 g魔芋粉,置于25 mL具塞试管内,依次加入去离子水10 mL和0.5 mL浓 H_2SO_4 ,于100℃水解2 h,冷却后用NaOH溶液中和。将中和液转移并定容至100 mL,滤纸过滤,取上清液1 mL用DNS法测定还原糖(以甘露糖计)量,计算总糖量。

1.5 魔芋粉水解率测定

在魔芋粉中加入 β -甘露聚糖酶液(加酶量以U/g魔芋粉计),在一定条件下进行酶解反应,取样,离心取上清适当稀释用DNS法测定酶解液中的还原糖(以甘露糖计)量。

1.6 魔芋粉酶解条件试验

利用自主构建的毕赤酵母工程菌GS115/Auman26A作为产 β -甘露聚糖酶菌种,以魔芋粉为底物酶解制备GMOS。考虑到缓冲液会向体系带入过多离子,故采用以去离子水代替缓冲液溶胀魔芋粉的方法^[8],以达到简化后续产品精制工艺、减少酸

碱使用量、降低生产成本及保护环境等目的。利用单因素试验分别探讨加酶量、酶解温度、底物质量浓度以及酶解时间对酶解过程的影响,利用 DNS 法测定还原糖的含量,通过对水解率 (50%~60%) 的控制,确定酶解魔芋粉的最优条件。

1.7 酶解产物的制备与超滤分离

以优化过的反应条件进行酶解反应,将反应完毕后的魔芋粉酶解液沸水灭酶、冷却、离心,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后移至超滤装置。选取截留相对分子质量为 2 000 的超滤膜,在 0.2 MPa 的压力下进行超滤,收集超滤透过液。将收集的透过液用旋转蒸发仪浓缩后冻干,即得 GMOS 干粉。准确称取其质量,计算 GMOS 得率。

1.8 酶解产物定性检测

称取冻干后的 GMOS 粉末水溶至终质量浓度为 2 mg/mL,用 HPLC 检测酶解产物中组分的构成及含量。色谱条件:色谱柱 Sugar-PakTM I (6.5 mm $\times$ 300 mm),柱温 85 $^{\circ}\text{C}$,流速 0.4 mL/min,进样量为 10 μL ,流动相:纯水,检测器:示差折光。根据 GMOS 保留时间定性,色谱峰面积归一化法定量。

2 结果与讨论

2.1 β -甘露聚糖酶活性及魔芋粉总糖量

利用 DNS 法测定同一批次毕赤酵母 GS115/*Auman26A* β -甘露聚糖酶的酶活性,其对角豆胶的酶活性为 517.2 U/mL。由此可知,重组菌株 GS115/*Auman26A* 具有极高的产酶活性,对工业化生产有着重要意义。0.2 g 魔芋粉经浓 H_2SO_4 彻底水解后,定容至 100 mL,测定还原糖量,计算得魔芋粉中总糖质量分数为 87.1%。

2.2 魔芋粉酶解加酶量的确定

在魔芋粉质量浓度 20 g/L、45 $^{\circ}\text{C}$ 水解 4 h 条件下,考察加酶量对魔芋粉水解率的影响,结果如图 1 所示。当底物魔芋粉量充足、其他条件固定,反应体系不含有抑制酶活性的物质时,酶促反应的速率与酶浓度成正比。由图 1 可知,当加酶量在 30~60 U/g 范围时,水解率和还原糖浓度随着加酶量的增加而逐渐增加。当加酶量为 60 U/(g 魔芋粉)时,水解率最高达到 40.60%,还原糖质量浓度为 7.07 mg/mL,之后趋于平稳。若加酶量不足,底物水解不充分;而过多的加酶量致使酶解速度过快,可将底物迅速降解为短链低聚糖,从而促进了单糖生成的可能性。

考虑到生产成本及制备高含量的 GMOS 并尽量减少单糖含量的目的,所以需控制酶解过程的加酶量和酶解程度。因此,确定加酶量为 60 U/g。

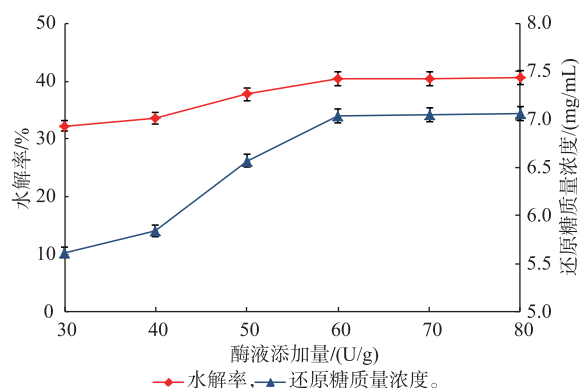


图 1 加酶量对魔芋粉水解率和还原糖质量浓度的影响

Fig. 1 Effect of the enzyme dosage on hydrolysis rate of konjac powder and reducing sugar concentration

2.3 魔芋粉酶解温度的确定

向质量浓度 20 g/L 的魔芋粉中添加 60 U/(g 魔芋粉)的 β -甘露聚糖酶,置于不同温度下水解 4 h,考察酶解温度对魔芋粉水解率的影响,结果如图 2 所示。由图可见,该酶在 35~45 $^{\circ}\text{C}$ 时魔芋粉的水解率和还原糖质量浓度基本稳定,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 时魔芋粉水解率和还原糖质量浓度达到最高,分别为 41.4% 和 7.20 mg/mL;当温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,酶解能力迅速降低。通常酶的作用速率随温度的升高而升高,但温度过高会降低酶的稳定性,使其部分失活直至完全失活。据之前报道显示,该酶的最适温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 且具有良好的稳定性,之后酶活性随温度的升高而逐渐降低,45 $^{\circ}\text{C}$ 时相对酶活性为 88.2%,而 50 $^{\circ}\text{C}$ 的相对酶活性迅速下降为 37.7%。由此可知,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下具有最高反应速率,并可长时间发挥作用且保持较高活性,故确定酶解反应温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4 魔芋粉酶解底物质量浓度的确定

取 20 mL 不同质量浓度的魔芋粉溶液,分别加入 60 U/g 的 β -甘露聚糖酶,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h,考察底物质量浓度对魔芋粉水解率的影响,结果如图 3 所示。由图可见,当魔芋粉质量浓度在 5~30 g/L 之间时,还原糖质量浓度呈现急速上升趋势,随后增加逐渐减慢;随着魔芋粉质量浓度增加,水解率呈现先上升后下降的趋势,当底物质量浓度达到 30 g/L 时,水解率最高可达 42.70%;随后逐渐降低,其原因可能是由于魔芋粉质量浓度的不断增加导致其粘

度的增加,阻碍了酶与魔芋粉的接触,从而降低其酶解作用。但由于酶解反应可以在短时间内迅速减低魔芋粉的粘度,因此在工业生产上可以批量添加魔芋粉的方式,从而获得高质量浓度的酶解液。

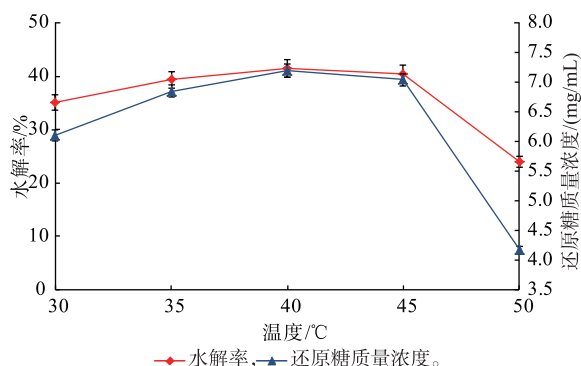


图2 酶解温度对魔芋粉水解率和还原糖质量浓度的影响
Fig. 2 Effect of temperature on hydrolysis rate of konjac powder and reducing sugar concentration

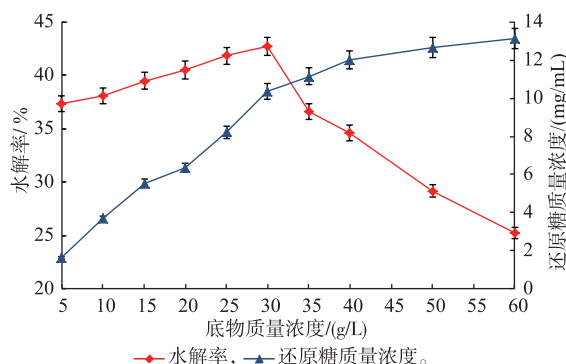


图3 底物质量浓度对魔芋粉水解率和还原糖浓度的影响
Fig. 3 Effect of substrate concentration on the hydrolysis rate of konjac powder and reducing sugar concentration

2.5 魔芋粉酶解时间的确定

向质量浓度为 30 g/L 魔芋粉溶液中加入 60 U/g 的 β -甘露聚糖酶,于 40 °C 反应,每隔 1 h 取样测定还原糖量,考察酶解时间对魔芋粉水解率的影响,结果如图 4 所示。由图可见,当加酶量一定时,随着酶解时间的增加,酶解率和还原糖质量浓度逐渐增加。当酶解时间达到 6 h 时,还原糖质量浓度和水解率逐渐平稳,还原糖质量浓度为 10.45 mg/mL,其中水解率达到 60.1%,极大程度提高了魔芋粉的利用率。 β -甘露聚糖酶总是优先作用长链甘露聚糖,其活性随甘露聚糖链长的降低而降低。随着时间的延长,当底物中能被有效水解的长链甘露聚糖完全水

解,酶转而攻击短链低聚糖促使还原性单糖生成量增加,为充分提高底物的利用率并控制水解率为 50~60%,故选择酶解时间为 5 h。

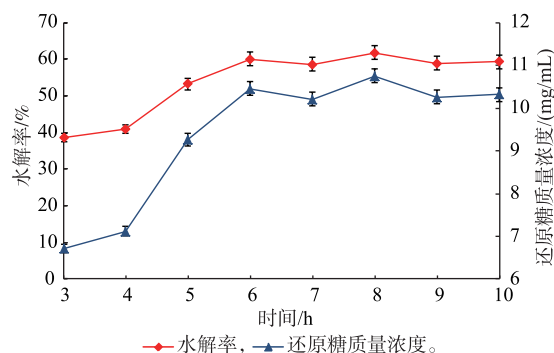


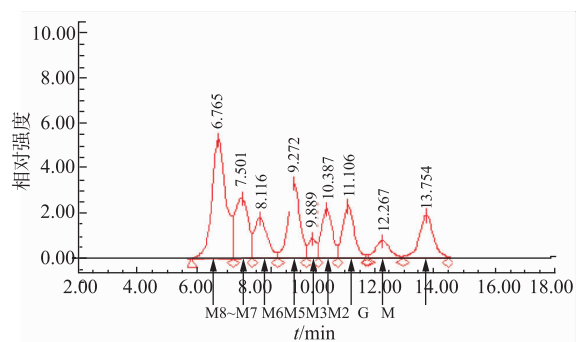
图4 酶解时间对魔芋粉水解率和还原糖浓度的影响
Fig. 4 Effect of time on the hydrolysis rate of konjac powder and reducing sugar concentration

2.6 酶解产物组分分析

膜分离过程的实质是依据滤膜孔径的大小使得原料侧组分有选择性地透过膜,而达到物质分离、提纯和浓缩的目的。按分离粒子或分子大小将膜分离法分为:反渗透、透析、电渗析、纳滤、超滤、微滤 6 种。反渗透和纳膜过滤有望用于功能性低聚糖的分离。作者采用超滤方法将十糖以内的 GMOS 与甘露聚糖酶、淀粉、纤维素、高聚合度葡甘露聚糖及少量菌体进行分离。

粗糖液先经 10 000 r/min 高速离心,0.45 μ m 微孔滤膜过滤后移至超滤装置,再经超滤膜超滤以有效地控制产物相对分子质量。收集超滤透过液,浓缩、冷冻、干燥,按照公式(3)计算其产率为 48.1%。

用 HPLC 检测酶解产物的组分构成及含量,结果如图 5 所示。甘露糖、葡萄糖标准品的保留时间分别为 13.765、12.288 min (谱图未给出),由此可知 M 为甘露糖,G 为葡萄糖。比较图中出峰的保留时间,可知各种糖是按照相对分子质量从大到小规律出峰,HPLC 色谱图中自左向右分别是 GMOS、葡萄糖和甘露糖。其中还原性单糖含量占 9.83%,二糖以上的 GMOS 占 90.17%。酶解液经超滤膜过滤后,截留的基本是聚合度为十糖以内的 GMOS。研究证明, β -甘露聚糖酶作用于魔芋胶或角豆胶的作用位点是多糖链非还原端的第 3 或第 4 个糖分子。虽然不同来源的 β -甘露聚糖酶对底物的作用深度不同,但主要产物是甘露低聚糖,相对来说,很少产生单糖^[4]。



M:甘露糖,G:葡萄糖,M2:二糖,M3:三糖,M4:四糖,M5:五糖,M6:六糖,M7:七糖,M8~:八糖及以上

图5 魔芋粉酶解产物组分的HPLC色谱图

Fig. 5 HPLC chromatogram of enzymatic hydrolysate fractions from konjac powder

3 结语

我国魔芋资源丰富,但所开发的魔芋产品品种有限,目前主要作为粗纤维食物或食品添加剂使

用,采用现代生物技术开发高附加值的魔芋产品具有重要意义。利用微生物产生的 β -甘露聚糖酶水解魔芋制备GMOS,可极大地拓宽魔芋应用范围、提高其附加值,且安全环保。采用自主构建的重组毕赤酵母工程菌GS115/Auman26A作为产 β -甘露聚糖酶菌株,具有产酶活性高、易分离纯化等优点。以底物魔芋粉的水解率为指标,通过单因素试验确定酶法制备低聚葡甘露糖的酶解条件如下:加酶量60 U/g,酶解温度40℃,魔芋粉质量浓度30 g/L,酶解时间5 h。在优化条件下进行酶解反应,测得魔芋粉水解率和酶解液还原糖质量浓度分别为53.3%和10.45 mg/mL。超滤后的酶解产物经高效液相色谱检测可知,组分主要以十糖以内的GMOS为主,其中还原性单糖含量占9.83%,二糖以上的低聚葡甘露糖占90.17%。作者所建立的生产工艺操作简单,成本较低,生产流程不对环境造成污染,具有良好的经济效益和社会效益。

参考文献:

- [1] MOREIRA L R S, FILHO E X F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(2): 165-178.
- [2] CHAUHAN P S, SHARMA P, PURI N, et al. Purification and characterization of an alkali-thermostable β -mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 and its application in mannooligosaccharides preparation having prebiotic potential[J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 238(6): 927-936.
- [3] WANG M F, YOU S P, ZHANG S S, et al. Purification, characterization, and production of β -mannanase from *Bacillus subtilis* TJ-102 and its application in gluco-mannooligosaccharides preparation [J]. *European Food Research and Technology*, 2013, 237(3): 399-408.
- [4] XU Q, CHAO Y L, WAN Q B. Health benefit application of functional oligosaccharides [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77(3): 435-441.
- [5] NUGROHO R A, FOTEDAR R. Comparing the effects of dietary selenium and mannan oligosaccharide supplementation on the growth, immune function, and antioxidant enzyme activity in the cultured marron *Cherax cainii* (Austin, 2002)[J]. *Aquaculture International*, 2014, 22(2): 585-596.
- [6] 段蕾, 孟艳芬, 高润池. 魔芋低聚糖的制备及其应用[J]. 广西轻工业, 2007, 109(12): 7-8.
DUAN Lei, MENG Yanfen, GAO Runchi. Preparation and application of konjac oligosaccharides [J]. *Journal of Light Industry*, 2007, 109(12): 7-8. (in Chinese)