

黑曲霉 β -甘露聚糖酶水解魔芋粉制备甘露低聚糖的研究

许牡丹, 柯 蕾, 曾 桥, 杨卫东, 王雪莲, 范 瑾

(陕西科技大学生命科学与工程学院, 咸阳 712081)

摘 要: 以魔芋粉为原料, 研究了用黑曲霉 β -甘露聚糖酶制备低聚甘露糖的工艺条件。结果表明: 反应时间、魔芋粉浓度、温度、加酶量、pH 对酶法制备低聚甘露糖的工艺均有不同程度的影响, 其中反应时间和温度影响较大, pH 影响较小。通过正交试验确定了用黑曲霉 β -甘露聚糖酶制备低聚甘露糖的最佳工艺条件为: 反应体系的 pH 4.2、魔芋粉浓度 2.0%、温度 65℃、加酶量 108 U/g、反应时间为 4.0 h。在最佳工艺条件下, 低聚甘露糖的产率可达 32.3%。

关键词: β -甘露聚糖酶; 低聚甘露糖; 魔芋粉

中图分类号: TS245.4

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2005)06-0115-04

Investigated Production of Mannan-oligosaccharides Using Konjak Power by β -mannan Mannohydrolase from *Aspergillus Niger*

XU Mu-dan, KE Lei, ZENG Qiao, YANG Wei-dong, WANG Xue-lian and FAN Jin

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xianyang Shaanxi 712081, China)

Abstract: The optimum conditions of production of mannan-oligosaccharides are investigated using β -1,4-D-mannan mannohydrolase acts on konjak power. And the quantity of mannan-oligosaccharides is estimated by Thin-Layer Chromatography. The optimum is: time is 4.0 h, temperature is 65℃, konjak powder concentration is 2.0%, enzyme activity is 108 U/g, and the pH is 4.2, the yield is 32.3% under the best optical conditions. The primary factors of this reaction are time and temperature, while the least one is pH.

Key words: β -mannan mannohydrolase; Mannan-oligosaccharides; Konjak power

低聚甘露糖(简称MOS)是一类由2~10个甘露糖以糖苷键聚合而成的直链或支链低聚糖。MOS作为双歧杆菌的增殖因子,能有效促进体内有益菌增殖、改善肠道菌群结构,具有保肝、抗肿瘤、增强免疫力、促进肠道蠕动、降低血清胆固醇、抗衰老等生理活性。此外,MOS还具有吸附病原体、阻断病原体定植、刺激动物免疫功能以及强大的竞争性排斥作用等,在某些方面有望成为抗生

素的替代品。

MOS既可以从天然原料中提取,也可以采用酶法或化学方法进行合成^[3]。酶法合成,尤其微生物酶法合成,条件温和、生产成本低,是生产MOS最理想的方法。 β -甘露聚糖酶(EC. 3. 2. 1. 78)是一种内切水解酶,可水解 β -1,4-D-甘露糖苷键,能够将甘露聚糖、葡甘露聚糖和半乳甘露聚糖等降解成MOS。本文以魔芋粉为原料,研究了不同因

收稿日期:2005-09-08 修回日期:2005-09-14

基金项目:陕西省自然科学基金资助项目(2001SM29)。

作者简介:许牡丹(1963—),女,教授,研究方向:食品生物技术与分析检测。电话:0910-3577315,Email:xumd@sust.edu.cn

素对黑曲霉 β -甘露聚糖酶制备MOS工艺的影响,并对其工艺条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 黑曲霉 β -甘露聚糖酶(自制);魔芋粉(武汉市清江魔芋制品有限公司);甘露低聚糖(武汉东方天琪生物工程有限公司);DNS试剂、醋酸钠、正丙醇和苯酚等均为分析纯试剂。

1.1.2 主要仪器 HWY-100B 恒温培养摇床, DG-401 型电热恒温培养箱, YY0088-92 型微量进样器, 722 型分光光度计, FA2004 电子天平, 电热恒温水浴锅, WS70-1 型红外线快速干燥器, 手动薄层涂铺器。

1.2 方法

1.2.1 MOS的合成 配制一定pH的醋酸-醋酸钠缓冲液,置于200 mL带塞的锥形瓶中,加入一定量的魔芋粉溶液和黑曲霉 β -甘露聚糖酶,于恒温摇床中反应一定时间,取样,用薄层色谱法检测各糖组分的含量。

1.2.2 MOS的检测 以硅胶G作薄板,在薄层板下端2 cm处用微量进样器点样,将50~100 μ L样液点成一横条状。将点样后的薄层板以正丙醇:水=85:15为展开剂,采用上行法展开至18 cm,取出薄层板,挥干,同时作空白薄层板。根据标准MOS的 R_f 值确定样品中MOS在硅胶薄层板上的位置,准确刮取薄层板MOS处的硅胶,置于离心管中,同时刮取同样位置和大小空白薄层板的硅胶,置另一离心管中作为对照,各离心管加入5 mL蒸馏水,于50 $^{\circ}$ C水浴中加热溶解5 min,离心分离10 min,取上清液2 mL,用苯酚-硫酸法检测MOS含量。

1.2.3 单因素试验 按照MOS的制备方法,以MOS得率为考察指标,依次进行6个魔芋粉浓度(g/L):10、15、20、25、30、35;7个反应温度($^{\circ}$ C):30、40、50、55、60、70、80;6个pH值:3.0、3.6、4.2、5.0、5.5、6.4;5个酶用量(U/g):36、54、72、90、108;10个反应时间(h)1.00、2.00、3.00、3.25、3.50、3.75、4.00、4.50、5.25、6.00的单因素试验。每个水平重复3次,测定结果取平均值。

1.2.4 正交试验 根据单因素试验结果,以MOS得率为考察指标,选择反应温度、乳糖浓度、pH、酶用量和反应时间,设计五因素四水平正交试验 $L_{16}(4^5)$,并重复3次,结果取其平均值,再通

过极差分析和试验结果确定MOS酶法合成的最佳工艺条件。

2 结果与讨论

2.1 不同因素对MOS产率的影响

2.1.1 魔芋粉浓度的影响 在反应时间3 h,温度60 $^{\circ}$ C, pH4.2,酶用量90 U/g的条件下,研究了魔芋粉浓度对MOS酶法制备的影响,结果见图1。

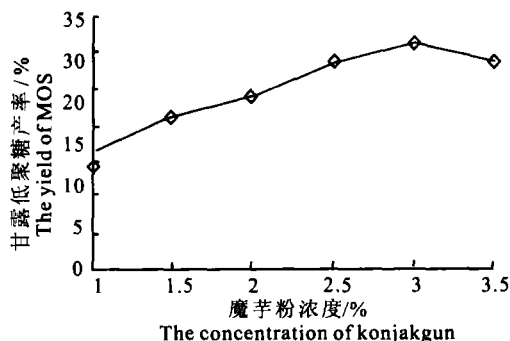


图1 魔芋粉浓度对甘露低聚糖产率的影响

Fig. 1 Effect of the concentration of konjak gun on the yield of MOS

当魔芋粉浓度低于3.0%时,随着魔芋粉浓度的增加,MOS产率呈逐渐增加的趋势,说明在一定范围内增加魔芋粉浓度有利于 β -甘露聚糖酶对魔芋粉的水解。当魔芋粉浓度大于3.0%时,随着魔芋粉浓度继续增加,MOS产率逐渐降低,可能是由于魔芋粉不完全溶解,甘露聚糖分子在水中分散程度低,影响了底物与酶的传质, β -甘露聚糖酶催化活力不能有效发挥的缘故。

2.1.2 反应温度的影响 在反应时间3 h, pH4.2,酶用量90 U/g,魔芋粉浓度30 g/L条件下,研究了反应温度对MOS酶法制备的影响,结果见图2。

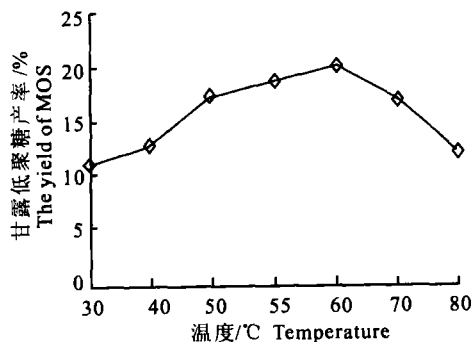


图2 反应温度对甘露低聚糖产率的影响

Fig. 2 Effect of the temperature on the yield of MOS

反应温度低于 60℃ 时,随着温度升高,MOS 产率也逐渐增加。当温度升高到 60℃ 时,MOS 产率达到最高。反应温度超过 60℃ 时,随着温度升高,MOS 产率又呈现下降的趋势,可能是高温导致 β -甘露聚糖酶发生部分变性所致。

2.1.3 β -甘露聚糖酶用量的影响 在反应时间 3 h,温度 60℃,pH 4.2,魔芋粉浓度 30 g/L 的条件下,研究了酶用量对 MOS 酶法制备的影响,结果见图 3。

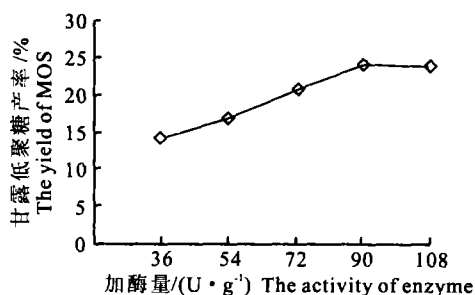


图 3 加酶量对甘露低聚糖产率的影响

Fig. 3 Effect of the activity of enzyme on the yield of MOS

从图 3 可以看出,随着 β -甘露聚糖酶用量的增加,MOS 产率也逐渐增加;酶用量为 90 U/g 时,MOS 产率基本上达到最大值;酶用量超过 90 U/g 时,MOS 产率趋于平稳。说明采用酶法制备 MOS 时存在着最适酶用量,继续增加酶的用量,不但不能明显增加 MOS 的产率,反而会增加生产成本。

2.1.4 不同 pH 的影响 在反应时间 3 h,温度 60℃,酶用量 90 U/g,魔芋粉浓度 30 g/L 的条件下,研究了不同 pH 值对 MOS 酶法制备的影响,结果见图 4。

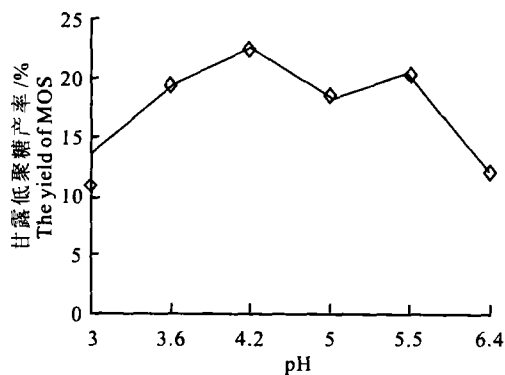


图 4 pH 对甘露低聚糖产率的影响

Fig. 4 Effect of the pH on the yield of MOS

由图 4 可以看出,pH 对 MOS 产率的影响较

大。pH 小于 4.2 时,随 pH 的增大,MOS 产率呈增加趋势;pH 为 4.2 时,MOS 产率达到最大值;在 pH 4.2~5.6 区间,MOS 产率呈现先下降后上升的变化,但变化幅度不大;pH 大于 5.6 时,随着 pH 的增大,MOS 产率又呈现下降的趋势。这是由于 pH 能够影响 β -甘露聚糖酶的构象和稳定性、底物的解离状态以及酶与底物分子的亲和力等,从而影响了 MOS 的产率。

2.1.5 反应时间的影响 在反应温度 60℃,pH 4.2,酶用量 90 U/g,魔芋粉浓度 30 g/L 条件下,研究了反应时间对 MOS 酶法制备的影响,结果见图 5。

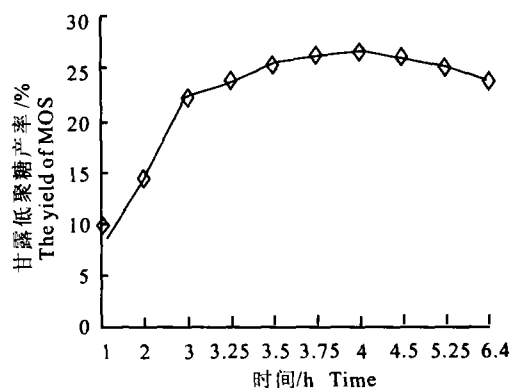


图 5 反应时间对甘露低聚糖产率的影响

Fig. 5 Effect of the time on the yield of MOS

随着反应时间的延长,MOS 产率呈现先增加后逐渐减小的变化。反应 4 h 时,MOS 产率基本上达到最大值。4 h 以后,MOS 产率逐渐降低。说明采用酶法制备 MOS 时存在着最适酶反应时间,反应时间太短或太长都不利于 MOS 生成。反应时间过长 MOS 又能被 β -甘露聚糖酶水解为单糖。

2.2 酶法制备 MOS 工艺条件的优化

为进一步确定酶法制备 MOS 的最佳工艺参数,本研究进行了五因素四水平正交试验,共 16 个处理,每个处理重复 3 次。试验结果见表 1。

对正交试验结果进行极差分析可知,各因素极差值大小顺序为 $R_A > R_D > R_C > R_B > R_E$,5 个因素对 MOS 产率影响的主次顺序为 $A \rightarrow D \rightarrow C \rightarrow B \rightarrow E$,其中反应时间和温度的影响较大,pH 影响较小。分析得知各因素的最优水平组合是 $A_3 B_1 C_4 D_3 E_2$,即反应时间 4.0 h、魔芋粉浓度 2.0%、加酶量 108 U/g、温度 65℃、pH 4.2。在各因素的最优水平组合条件下对 MOS 进行酶法制备,重复 3 次进行验证试验,测得 MOS 产率平均为 32.3%,明显优于正交表中的 16 个处理。

表 1 正交试验结果及分析

Table 1 Orthogonal experiment and results

序号 No.	A 时间 /h Time	B 魔芋粉浓度 /% Concent- ration of konjak gun	C 加酶量 /(U·g ⁻¹) Activity of enzyme	D 温度 /°C Temper- ature	E pH	MOS 产率 % Yield of MOS
1	3.0	2.0	54	55	3.6	20.9
2	3.0	2.5	72	60	4.2	22.1
3	3.0	3.0	90	65	4.6	21.6
4	3.0	3.5	108	70	5.0	19.3
5	3.5	2.0	72	65	5.0	25.7
6	3.5	2.5	54	70	4.6	21.8
7	3.5	3.0	108	55	4.2	26.2
8	3.5	3.5	90	60	3.6	22.3
9	4.0	2.0	90	70	4.2	25.1
10	4.0	2.5	108	65	3.6	30.2
11	4.0	3.0	54	60	5.0	21.3
12	4.0	3.5	72	55	4.6	22.1
13	4.5	2.0	108	60	4.6	27.3
14	4.5	2.5	90	55	5.0	24.5
15	4.5	3.0	72	70	3.6	21.7
16	4.5	3.5	54	65	4.2	24.8
K ₁	83.9	99.0	88.8	93.7	95.1	
K ₂	96.0	98.6	91.6	93.0	98.2	
K ₃	98.7	90.8	93.5	102.3	92.8	
K ₄	98.3	88.5	103.0	87.9	90.8	
k ₁	20.97	24.75	22.20	23.43	23.78	
k ₂	24.00	24.65	22.90	23.25	24.55	
k ₃	24.68	22.70	23.38	25.58	23.20	
k ₄	24.58	22.13	25.75	21.98	22.70	
R _i	3.71	2.62	3.55	3.60	1.85	

3 小结

试验结果表明,以魔芋粉为原料,选用黑曲霉β-甘露聚糖酶制备MOS能够取得良好的结果。反应时间、魔芋粉浓度、温度、加酶量、pH对酶法制备MOS均可产生不同程度的影响,其中反应温度和加酶量影响较大,pH影响较小。通过正交试验优化出的黑曲霉β-甘露聚糖酶制备MOS最佳工艺条件为:反应体系的pH4.2,魔芋粉浓度2.0%,温度65℃,加酶量108U/g,反应时间为4.0h。在此条件下MOS的产率为32.3%。

参考文献:

- [1] Bolduan G, Beck M, Chubert C S. Effect of oligosaccharide on piglets[J]. Archives of Nutrition, 1993, 44(1): 21~27.
- [2] 张迎庆, 干信, 谢笔钧. 纤维素酶制备魔芋葡甘低聚糖[J]. 吉首大学学报, 2003, 24(3): 42~44.
- [3] 龙健儿, 陈一平. β-甘露聚糖酶的研究现状[J]. 微生物学杂志, 1998, 18(3): 44~49.
- [4] 尉芹, 马希汉. 魔芋开发利用研究综述[J]. 西北林学院报, 1998, (3): 62~63.
- [5] 朱国华, 李小明, 李顺意, 等. 魔芋低聚糖对小鼠血糖含量和抗氧化能力的影响[J]. 中草药, 2001, 32(2): 142~144.

(上接第111页)

节适宜温度、湿度、光照强度等, 驯苗成活率可达95%以上, 且苗长势旺。

参考文献:

- [1] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998. 224.
- [2] 龙雅直. 切花生产技术[M]. 北京: 金盾出版社, 1994. 123.
- [3] 张健华, 陈火英, 庄天明, 等. 非洲菊叶片离体诱导成株的激素调控[J]. 北方园艺, 2000, (4): 60~61.
- [4] 刘福平, 林丽仙, 邹小鲁, 等. 非洲菊组织培养(简报)[J]. 亚热带植物通讯, 2000, 29(2): 52.
- [5] 王红梅. 非洲菊的组培快繁技术研究[J]. 甘肃农业科技, 2000, (4): 42~43.

- [6] 杨波, 康明. 非洲菊组培快繁技术研究[J]. 湖北农业科学, 2000, (2): 48~49.
- [7] 徐立, 李克烈, 李志英, 等. 非洲菊的组织培养和快速繁殖[J]. 热带农业科学, 2000, (2): 26~27.
- [8] 席梦利, 王节萍, 章静娟, 等. 多效唑在非洲菊组织培养中的应用[J]. 2000, (3): 55~56.
- [9] 黄燕芬, 唐丽, 孙林, 等. 非洲菊组织培养快速繁殖[J]. 贵州农业科学, 2002, 30, (6): 34~35.
- [10] 倪丹, 杨世湖, 徐士清, 等. 非洲菊组培快繁技术的优化[J]. 细胞生物学杂志, 2002, 24, (5): 316~319.
- [11] 王春彦, 高年春, 张效平, 等. 非洲菊幼花托离体培养研究[J]. 江苏农业科学, 2003, (1): 47~49.
- [12] 梅红, 苗红梅, 孔德政. 非洲菊丛芽诱导的新途径[J]. 西南园艺, 2003, 31, (1): 27~28.