

文章编号: 1007- 2985(2003) 03- 0042- 03

纤维素酶制备魔芋葡甘低聚糖*

张迎庆^{1,2}, 干 信², 谢笔钧¹

(1. 华中农业大学食品科技学院天然产物化学研究室, 湖北 武汉 430070;

2. 湖北工学院生物工程系, 湖北 武汉 430068)

摘 要: 利用纤维素酶(绿色木霉, E c 3.2.1.4) 酶解魔芋葡甘聚糖. 10 g 魔芋精粉, 500 U 纤维素酶, 在 40 ℃, pH 值为 5.0 时反应 2 h 为最适条件. 此条件下所得低聚糖数均相对分子量为 5 100, 重均相对分子量为 7 160.

关键词: 魔芋; 葡甘聚糖; 低聚糖; 纤维素酶

中图分类号: Q946

文献标识码: B

魔芋(*Amarphophallus konjac*) 是天南星科魔芋属多年生草本植物, 又称 花伞把、蛇仓谷、鬼头、花连杆等. 一般认为, 魔芋葡甘聚糖(KGM) 是由 $n[D- \text{葡萄糖}(G)]: n[D- \text{甘露糖}(M)]$ 的值约为 1: 1.6 或 1: 1.6, 通过 $\beta-1,4$ 吡喃糖苷键结合构成的复合多糖, 在主链甘露糖的 C3 位上存在通过 $\beta-1,3$ 键结合的支链结构, 每 32 个糖残基上有 3 个左右支链, 支链只有几个残基的长度.^[1] 魔芋葡甘低聚糖因具特殊的生理功能, 其研究和应用倍受人们重视^[2]. 笔者研究了利用纤维素酶对葡甘聚糖进行酶法降解形成魔芋葡甘低聚糖的工艺条件, 并初步探讨了其作用机理.

1 实验材料

主要原料与试剂: 魔芋精粉(由湖北美力集团提供), 工业酒精, 醋酸(分析纯), 醋酸钠(分析纯), 盐酸(分析纯), 过氧化氢(分析纯), 无水乙醇(分析纯), 纤维素酶(绿色木霉, E c 3.2.1.4, 酶活大于 15 000 U/g).

主要设备仪器: 超级恒温水浴(J-20 型), 电动搅拌器(JJ-1 型), 过滤器(100 目), 旋转蒸发器(RE-52A 型), 真空干燥箱(ZK-82A 型), 旋转式粘度计(NDJ-1 型), 离心机(4 000 r/min), 722 型分光光度计, 高效液相色谱仪 Waters 600-410-system.

2 实验步骤

2.1 酶解 KGM

将魔芋精粉 10 g 投入旋转蒸发器圆底烧瓶中, 加入 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠的缓冲液(pH 值为 5.0) 100 mL 和纤维素酶 500 U, 恒温 40 ℃, 间隔 15 min 旋转(500 r/min) 1 min, 酶解 2 h.

2.2 去杂及脱水干燥

将上述酶解液加入体积分数为 50% 的乙醇溶液, 开动电动搅拌器反复搅拌洗涤, 过滤去除杂质(蛋白

* 收稿日期: 2003-02-25

基金项目: 湖北省科技厅重点攻关项目(991P1402-7)

作者简介: 张迎庆(1969-), 女, 湖北省黄石市人, 华中农业大学食品科技学院博士研究生, 湖北工学院生物工程系讲师, 主要从事天然产物的开发研究.

质、脂类、寡糖等)并脱水干燥. 滤液回收酒精, 取滤渣于 40 °C 真空干燥, 即得 KGM 低聚糖.

2.3 酶解液粘度测定

利用旋转粘度计法测定. 选择合适转子, 并将转子置于 40 °C 水浴恒温. 待酶解液达到酶解时间后, 将转子放入酶解液中, 在 40 °C 恒温条件下测定, 测得绝对粘度(MPa·s) 或称表观粘度.

2.4 酶解液还原糖含量测定

用移液管移取 1 mL 酶解液至 1 000 mL 容量瓶定容即稀释 1 000 倍, 从稀释液中移取 1 mL (每次取 3 个平行样)于试管中. 按蒽酮- 硫酸比色法测定.

2.5 低聚糖分子量及其分布测定

利用凝胶色谱法测定. 仪器: 高效液相色谱仪 Waters 600- 410- system, 标准品: 葡聚糖(Dextran) 分子量分别为 1 180, 3 500, 5 700, 10 000, 14 700, 42 000, 74 500. 凝胶柱: TSK G3000SW(分子量范围 1 000~ 100 000); 流动相: 0.2 mol/L CH₃COOH: 0.1 mol/L CH₃COONa(体积比) = 1: 1; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 50 μL; 显色方法: 苯酚- 硫酸法.

3 结果与讨论

3.1 酶解条件的确定

取魔芋精粉 10 g, 分别用 500 U, 1 000 U 和 1 500 U 的纤维素酶在 40 °C 条件下的 0.2 mol/L 醋酸- 醋酸钠的缓冲溶液(pH 值为 5.0) 中处理数小时, 其粘度变化情况如图 1 所示. 由图 1 可看出, 所选用的酶活力与酶解液粘度的变化密切相关, 选用酶活力越大, 粘度下降越快. 采用酶活 500 U, 粘度下降至 1 000 MPa·s, 需 120~ 135 min; 采用酶活 1 000 U, 粘度下降至 1 000 MPa·s, 需 75~ 80 min; 而采用酶活 1 500 U, 粘度下降至 1 000 MPa·s, 仅需 60~ 65 min.

以上述相同条件, 对酶解 KGM 产生的还原糖的浓度的变化情况进行考察, 结果如图 2 所示. 由图 2 可看出, 酶活力直接影响酶解产生的还原糖的量. 选用的酶活力越大, 还原糖浓度升高越快.

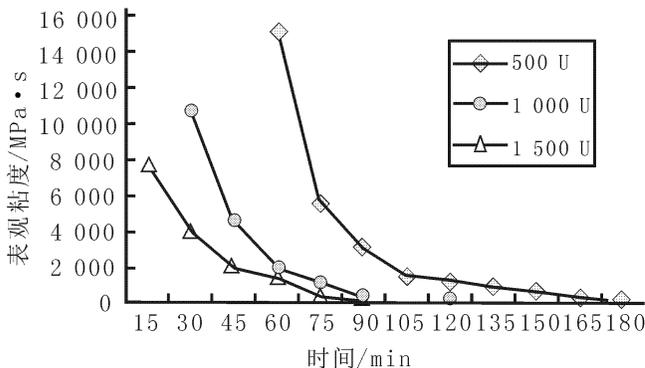


图 1 酶解液粘度的变化趋势

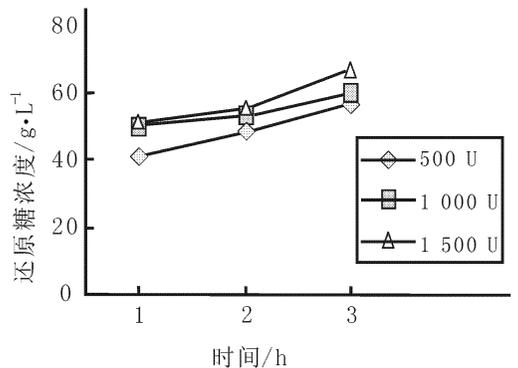


图 2 酶解产生还原糖的浓度趋势

综合考虑粘度和还原糖量的变化情况, 采用较低酶活(500 U) 处理 10 g 魔芋精粉, 反应时间为 2 h, 既可降低 KGM 粘度, 又不致使产生的还原糖量太高, 从而达到获得期望分子量大小的低聚糖的理想酶解效果. 另外, 由于纤维素酶最适温度范围为 40~ 50 °C, 在 60 °C 下加热 3 min, 酶活即显著下降; 加热到 65 °C, 活性基本丧失; 70 °C 下加热 3 min, 活性全部丧失. 同时, 笔者主要利用纤维素酶中内切 β- 1, 4 葡聚糖酶(Cx), 其最适 pH 值为 5.0^[3], 因此选定酶解的温度为 40 °C, pH 值为 5.0.

3.2 KGM 低聚糖分子量及其分布

魔芋精粉 10 g 中加入酶活力 500 U 的纤维素酶, 在 40 °C 条件下的 0.2 mol/L 醋酸- 醋酸钠溶液(pH 值为 5.0) 100 mL 中反应 2 h, 所得 KGM 低聚糖凝胶色谱图如图 3 所示. 图 3 表明, 经纤维素酶作用后, KGM 低聚糖的分子量主要分布在数均分子量 51 000, 重均相对分子量 7 160 处; 另有少量分布在数均分子量 2 625, 重均相对分子量 3 544 处.

3.3 纤维素酶对葡甘聚糖的作用机理

目前,纤维素酶被公认为是 3 种酶共同组成的一个复合体^[4]。(1)内切 β -1,4-葡聚糖酶(C_x),此酶的底物为“结晶纤维素”或 CMC。(2)外切 β -1,4-葡聚糖酶,此酶存在 2 种形式:(i) β -1,4-葡聚糖葡萄糖水解酶,可将纤维素的非还原性末端的 D-葡萄糖残基逐个切下;(ii) β -1,4-葡聚糖纤维二糖水解酶(C_1),可将纤维素的非还原性末端的纤维二糖残基逐个切下。(3) β -葡萄糖苷酶(即纤维二糖酶),可将纤维二糖中的 β -1,4-糖苷键水解,并生成 2 个分子的 D-葡萄糖。

以往认为,纤维素酶是先由 C_1 酶起催化作用,然后 C_x 酶再发挥作用的。但近年研究表明,在天然纤维素酶的作用中, C_x 酶采取随机反应的方式先作用于天然的结晶纤维素分子中的某些 β -1,4-糖苷键,将纤维素切割成许多短的链;然后,通过 C_1 酶的催化作用,将短链的非还原性末端纤维二糖残基逐个切下;最后, β -葡萄糖苷酶与纤维二糖作用,将纤维二糖转变为 D-葡萄糖。

魔芋葡甘聚糖与纤维素结构类似,也是 β -1,4-糖苷键连接,只不过是 D-葡萄糖和 D-甘露糖以摩尔比约 1:1.6 的比例组成的聚合物,同时含有少量 β -1,3-糖苷键连接的支链。利用纤维素酶旨在利用其中 C_x 酶对 β -1,4-葡萄糖苷键的破坏作用,将 KGM 切割成许多短的链,使其降解为 KGM 低聚糖。纤维素酶中的 C_x 酶之所以能对葡甘聚糖起作用,是因为糖苷酶的底物专一性,包括糖基一侧的专一性、糖苷键的 α -、 β -异头专一性、糖苷配基一侧的专一性。糖苷酶对糖基一侧的专一性和糖苷键的 α -、 β -异头碳专一性要求较严格,而对糖苷配基一侧的专一性要求不严格^[4]。KGM 中含有 β -1,4-葡萄糖苷键和 β -1,4-甘露糖苷键这 2 种糖苷键连接方式,因此 C_x 酶也可裂解 KGM 中的 β -1,4-葡萄糖苷键连接,而对 β -1,4-甘露糖苷键不起作用。由此可推测,纤维素酶能对葡甘聚糖起降解作用,但其作用是不均一的,这也是凝胶色谱图中除主要分布区域外还有一次峰的原因。

4 结论

研究表明,纤维素酶能较好地对葡甘聚糖起到降解作用。通过实验,确定了酶解反应的最佳条件:10 g 魔芋精粉加入酶活力 500 U 的纤维素酶,在 40 °C 条件下的 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠溶液(pH 值为 5.0) 100 mL 中反应 2 h。此条件下,所得低聚糖的分子量主要分布在数均相对分子量 5 100,重均相对分子量 7 160 处。

参考文献:

- [1] 许时婴,钱和.魔芋葡甘露聚糖的化学结构与流变性质[J].无锡轻工业学院学报,1991,10(1):1-11.
- [2] 周中凯,夏英.甘露寡聚糖的生产与研究[J].饲料工业,1999,20(8):27-29.
- [3] 齐义鹏.纤维素酶及其应用[M].重庆:四川人民出版社,1980.
- [4] 吴东儒.糖类的生物化学[M].北京:高等教育出版社,1987.

Preparation of Konjac Oligo- Glucomannan by Cellulase

ZHANG Ying-qing^{1,2}, GAN Xin², XIE Bi-jun¹

(1. Natural Products Chemistry Laboratory, Food Science and Technology College, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, Hubei China; 2. Bioengineering Department, Hubei Polytechnic University, Wuhan 430068, Hubei China)

Abstract: Konjac glucomannan was enzymolysized by cellulase (Ec. 3. 2. 1. 4). The optimal parameters were 10 g konjac refined powder were reacted with 500 U cellulase at pH 5.0 and in 40 °C for 2 h. The molecular weight of the oligo- glucomannan was measured by GPC, the mean Mw was 5 100 and the mean Mn was 7 610.

Key words: *Amorphophallus konjac*; konjac glucomannan; oligo- glucomannan; cellulase

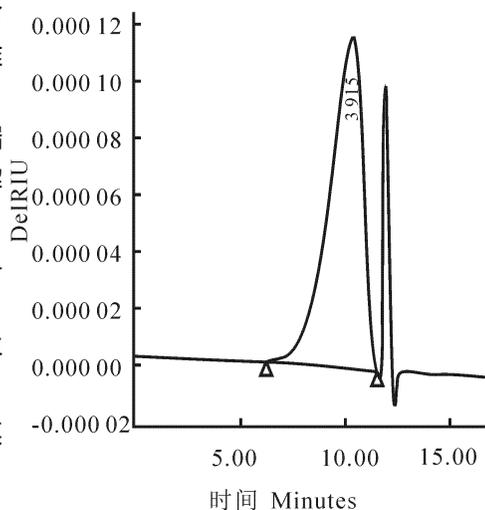


图 3 KGM 低聚糖凝胶色谱图