

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2019.03.003

固定化 β -甘露聚糖酶水解魔芋粉制备葡甘露低聚糖工艺研究

杨伟东

(宝鸡文理学院, 陕西 宝鸡 721013)

摘要: 以魔芋精粉为原料, 通过研究固定化 β -甘露聚糖酶水解魔芋粉制备葡甘露低聚糖工艺条件。结果表明, 反应时间、魔芋精粉浓度、反应温度、加酶量及 pH 等对葡甘露低聚糖的制备都有不同程度的影响, 其中魔芋精粉浓度和反应时间影响较大, 加酶量和 pH 影响较小。通过正交实验优化得出的固定化酶水解魔芋精粉制备葡甘露低聚糖的最佳工艺条件为: 底物浓度为 1.5%、加酶量为 80×10^3 U/g、反应时间为 6 h、反应温度为 75 , pH 值为 3.5。葡甘露低聚糖的得率为 29.5%。

关键词: 葡甘露低聚糖; 固定化 β -甘露聚糖酶; 魔芋精粉

中图分类号: TS219 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2019)03-0015-05

Study on preparation of glucomannan oligosaccharides by hydrolyzing Konjac powder with immobilized β -mannanase

YANG Wei-dong

(Baoji University of Arts and Sciences, Baoji Shaanxi 721013)

Abstract: Taking Konjac powder as raw material, glucomannan oligosaccharides was prepared by hydrolyzing Konjac powder with immobilized β -mannanase. The experimental results showed that the reaction time, Konjac powder concentration, reaction temperature, enzyme amount and pH had different effects on the preparation of glucomannan oligosaccharides, in which the influence of concentration of Konjac powder and reaction time was larger than that of enzyme amount and pH. The optimal process conditions for the preparation of glucomannan oligosaccharides by hydrolyzing Konjac powder with immobilized enzyme by orthogonal test were as follows: substrate concentration 1.5%, enzyme dosage 80×10^3 U/g, reaction time 6 h, reaction temperature 75 , and pH 3.5. The yield of glucomannan oligosaccharide was 29.5%.

Key words: glucomannan oligosaccharides; immobilized β -mannanase; Konjac powder

葡甘露低聚糖(Glucomannan oligosaccharides)是甘露聚糖的酶降解产物,由 2~10 个甘露糖通过糖苷键连接形成主链,主链上连接葡萄糖或半乳糖的杂聚寡糖^[1-2]。广泛存在于魔芋粉、瓜儿豆胶、田菁胶及多种微生物细胞壁内,具有低热、稳定、安全无毒等良好的理化性质,能有效促进人体内

双歧杆菌的生长繁殖,调节肠道菌群平衡,增强人体免疫力等多种功能^[3-7]。用固定化酶来生产甘露低聚糖具有酶可重复利用且活力稳定、产物可以直接分离得到,可实现连续生产,且体系中可溶性蛋白质少,利于脱色等许多游离酶无法比拟的优点^[8]。本实验通研究以甲壳素为载体固定的 β -甘露聚糖酶,制备葡甘露低聚糖的工艺条件,以期获得较大规模低聚糖连续化生产的参数,为进一步扩大到工业化生产打下基础。

收稿日期: 2019-01-10

基金项目: 宝鸡文理学院 2015 年校级科研计划项目(ZK15099)

作者简介: 杨伟东, 1979 年出生, 男, 硕士, 实验师。

1 材料与方法

1.1 实验材料

黑曲霉 β -甘露聚糖酶：自制；魔芋精粉：武汉市清江魔芋制品有限公司；甘露低聚糖：武汉市东方天琪有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 固定化 β -甘露聚糖酶的制备^[8]

取一定量 30 目的甲壳素，加入 0.8% 的戊二醛，在 4 温度下，交联 3 h 后彻底水洗至洗脱液中没有戊二醛，再按照 2000 U/g 载体加入 pH 值为 4 的 β -甘露聚糖酶溶液于冰浴中搅拌 1 h 后，放入冰箱中 4 吸附固定 8 h 以上。然后用蒸馏水彻底水洗，过滤干燥，即得到固定化 β -甘露聚糖酶。

1.2.2 甘露低聚糖的制备

配制一定 pH 值和浓度的魔芋精粉溶液置于带塞锥形瓶中，预热到一定温度后，加入固定 β -甘露聚糖酶，在恒温摇床上反应一段时间后，过滤分离固定 β -甘露聚糖酶，用薄层—比色法测定检测低聚糖含量。

1.2.3 葡甘露低聚糖的测定^[7]

采用薄层色谱法，以硅胶 G 为载体，正丙醇与水 85 : 15 为展开剂，点样量为 50 μ L 带状点样，展开后按照标准样低聚糖的 R_f 值，将硅胶板上相对应的硅胶刮下，用纯净水洗脱定容至 25 mL。取洗脱液 2 mL 用苯酚-硫酸法检测总糖量（即为葡甘露低聚糖的量）。

1.2.4 固定化酶活力测定

取 10 mL 用 pH 3.4 的缓冲溶液配制的 0.3% 的魔芋精粉溶液，在 75 的水浴中预热 10 min，然后加入 0.3 g 的固定化酶准确反应 10 min 后终止反应，吸取 1 mL 反应液加 3 mL DNS 沸水浴中，加热反应 5 min 后比色。

1.2.5 单因素实验

按照葡甘露低聚糖的制备方法，以葡甘露低聚糖得率为考察指标，分别考察 7 个乳糖浓度（%）：0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5；6 个反应温度（ $^{\circ}$ C）：60、65、70、75、80、85；5 个

底物溶液 pH：2.5、3.0、3.5、4.0、4.5；7 个加酶量（ $\times 10^3$ U）50、60、70、80、90、100、110；9 个反应时间（h）：0.5、1、2、3、4、5、6、6、7、8。

1.2.6 正交实验

根据单因素实验确定了各单因素对葡甘露低聚糖得率的影响，选择反应温度、魔芋精粉浓度、酶用量和反应时间，通过 5 因素 4 水平的 $L_{16}(4^5)$ 正交，并进行极差分析，实验结果优化甘露低聚糖酶法合成葡甘露低聚糖的最佳工艺条件。

2 结果与分析

2.1 不同因素对葡甘露低聚糖得率的影响

2.1.1 反应时间对葡甘露低聚糖得率的影响

在加酶量为 80×10^3 U、魔芋精粉体积和浓度分别为 50 mL 和 1.0%、pH 3.4、温度 75 的条件下，研究了不同反应时间对葡甘露低聚糖得率的影响。

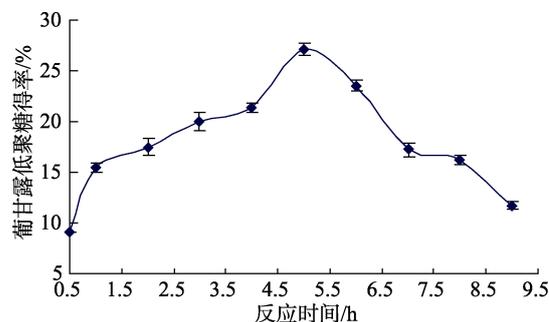


图 1 反应时间对葡甘露低聚糖得率的影响

由图 1 可以看出：反应时间对葡甘露低聚糖有显著影响，反应时间较短的时候，固定化酶将产物分子水解成中、低等分子量的糖类，得率随着时间的增加而逐渐增加，所以在反应的前 5 h 里得率逐渐的增加。在 5 h 时，得率达到最大值 27.1%。在 5 h 之后，低聚糖的得率又呈现出下降趋势。这主要是因为反应中酶与底物反应时，底物在载体的内部和外部都存在扩散阻力，底物在固定化酶表面和内部都存在逐渐减小的浓度梯度，另外产物在固定化酶表面形成了较高的浓度，从而抑制了反应向正方向的进行，由于这两个方面使得低聚糖产率的降低。与大部分固定化酶水

解底物规律基本相似,但与硅胶等材料固定 - 甘露聚糖酶制备葡甘露低聚糖(低聚糖达到峰值时间为 15 h)方法相比^[7],低聚糖得率达到峰值时间显著缩短。

2.1.2 加酶量对葡甘露低聚糖得率的影响

在魔芋精粉体积和浓度分别为 50 mL 和 1.0%、pH 3.4、温度 75 的条件下反应 5 h,研究不同加酶量对葡甘露低聚糖得率的影响。

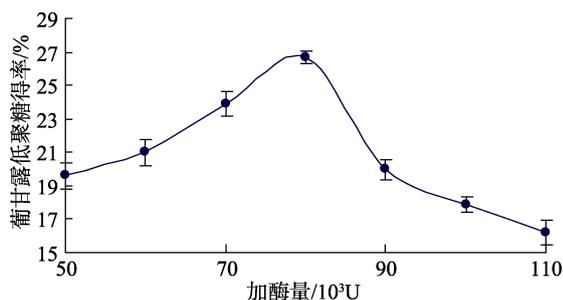


图 2 加酶量对葡甘露低聚糖得率的影响

不同加酶量对葡甘露低聚糖得率的影响结果如图 2 所示,可以看出,在一定范围内,随着加酶量的增加,得率也在逐渐增加,加酶量为 80×10^3 U/g 魔芋精粉时,葡甘露低聚糖得率最高达,为 26.7%,当加酶量超过 80×10^3 U/g 魔芋精粉时,葡甘露低聚糖得率反而逐渐下降,说明得率与加酶量不成线性关系,这是因为当加酶量过大时,反应中生成的产物又被酶分解成为单糖,从而降低了得率,因此选择酶量不宜过高。综合考虑,选择 80×10^3 U/g 的加酶量为最佳。

2.1.3 底物浓度对葡甘露低聚糖得率的影响

在反应温度 75、pH 3.4、反应时间 5 h、加酶量 80×10^3 U/g 魔芋精粉条件下,不同的底物浓度对葡甘露低聚糖得率的影响如图 3 所示。

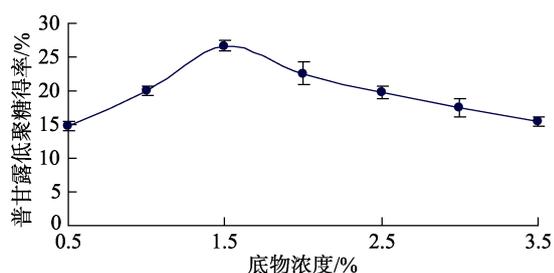


图 3 底物浓度对葡甘露低聚糖得率的影响

由图 3 可以看出,魔芋精粉的浓度对葡甘露低聚糖得率有显著的影响,这与其它报道的结果一致。当底物浓度增加的时候,葡甘露低聚糖得率也随之增加,在底物浓度在 1.5% 时达到最大值。当大于 1.5% 时,低聚糖的得率反而下降。这是由于魔芋精粉浓度过高,反应中传质困难,从而使固定化酶表面的葡甘露低聚糖又被酶所分解,从而导致得率下降。综合考虑选用 1.5% 的魔芋精粉浓度为宜。

2.1.4 反应温度对葡甘露低聚糖得率的影响

在魔芋精粉浓度为 1.5%、pH 3.4、反应时间 5 h、加酶量 80×10^3 U/g 魔芋精粉条件下,反应中反应温度对葡甘露低聚糖得率的影响结果如图 4 所示。

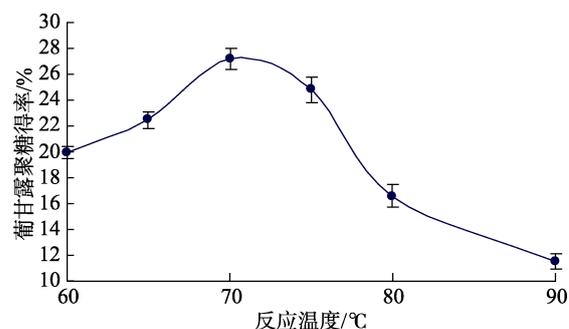


图 4 温度对葡甘露低聚糖得率的影响

由图 4 可以看出,固定化酶能在 70 时保持较高的催化活力。固定化酶的催化活力随着温度的升高而增大,较高的反应温度有利于获得葡甘露低聚糖,这主要是合成需要一定的活化能;另外高温会增加葡甘露低聚糖的溶解度,降低了黏度,有利于底物向固定化酶表面的传递。但是在更高的温度时,会促使固定化酶的变性,使酶的活力下降,从而使葡甘露低聚糖得率的降低。

2.1.5 底物溶液的 pH 对葡甘露低聚糖得率的影响

在魔芋精粉浓度为 1.5%、反应温度 75、反应时间 5 h、加酶量 80×10^3 U/g 魔芋精粉条件下,底物溶液的 pH 对葡甘露低聚糖得率的影响。

由图 5 可以看出,在反应中,底物溶液的 pH 对葡甘露低聚糖得率的影响比较平缓,而且在酸性的条件下也能保持较高的低聚糖得率,这主要

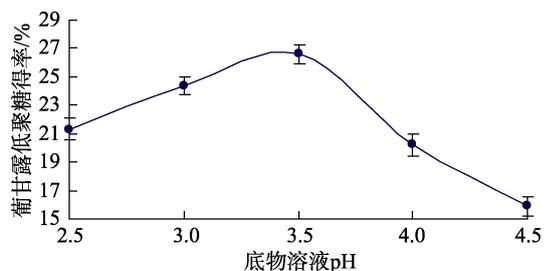


图 5 pH 值对葡甘露低聚糖得率的影响

葡甘露低聚糖的得率达到最大值 26.6%，考虑到反应中固定化酶的 pH 稳定性和最适 pH，选择在 pH3.5 制备葡甘露低聚糖。

2.2 水解条件的优化

为进一步确定固定化β-甘露聚糖酶水解魔芋精粉制备葡甘露低聚糖的最佳工艺参数，实验中进行了 5 因素 4 水平正交设计，共 16 个处理，结果见表 1。

是因为固定化酶的抗酸性增强，在 pH 值为 3.5 时，

表 1 正交实验结果

样品号	A/h	B/ (10 ³ U/g)	C/%	D/	E	葡甘露 低聚糖 得率/%	样品号	A/h	B/ (10 ³ U/g)	C/%	D/	E	葡甘露 低聚糖 得率/%
1	4	60	1.0	60	2.5	20.0	12	6	90	1.5	60	3.5	26.0
2	4	70	1.5	65	3.0	24.5	13	7	60	2.5	65	3.5	19.5
3	4	80	2.0	70	3.5	21.6	14	7	70	2.0	60	4.0	20.4
4	4	90	2.5	75	4.0	20.6	15	7	80	1.5	75	2.5	26.3
5	5	60	1.5	70	4.0	21.3	16	7	90	1.0	70	3.0	22.1
6	5	70	1.0	75	3.5	23.4	K ₁	21.675	20.300	22.775	21.575	21.400	
7	5	80	2.5	60	3.0	19.9	K ₂	21.150	21.900	24.525	22.400	21.725	
8	5	90	2.0	65	2.5	20.0	K ₃	22.825	23.350	20.600	21.075	22.625	
9	6	60	2.0	75	3.0	20.4	K ₄	22.075	22.175	19.825	22.675	21.975	
10	6	70	2.5	70	2.5	19.3	R	1.675	3.050	4.700	1.600	1.225	
11	6	80	1.0	65	4.0	25.6	最优组合				A ₃ B ₃ C ₂ D ₄ E ₃		

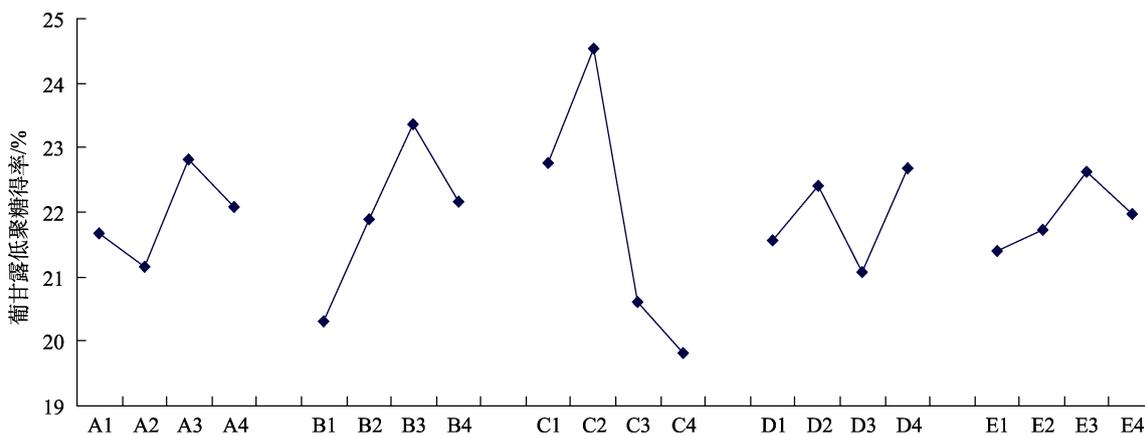


图 6 葡甘露低聚糖得率实验因素与水平

由 R 值可知，通过对固定化 β-甘露聚糖酶水解魔芋粉制备葡甘露低聚糖正交实验优化，影响得率的因素顺序为：底物浓度>加酶量>反应时间>反应温度>底物 pH，底物浓度对得率具有显著的影响。由分析可知最优组合为 C₂B₃A₃D₄E₃，即底物浓度为 1.5%、加酶量为 80×10³ U/g 魔芋

精粉、反应时间为 6 h、反应温度为 75℃，底物溶液 pH 值为 3.5。在各因素最优水平组合条件下，进行固定化酶水解魔芋粉制备葡甘露低聚糖验证实验，葡甘露低聚糖的得率为 29.5%，高于正交实验中的任一个处理，证明实验结果可信。

3 结论

以魔芋精粉为原料,通过选用甲壳素固定 β -甘露聚糖酶,对魔芋精粉水解制备葡甘露低聚糖的工艺进行研究。考察了反应时间、魔芋粉浓度、反应温度、加酶量、底物溶液 pH 等因素对葡甘露低聚糖得率的影响,采用正交实验优化最佳制备工艺条件,在各因素最优水平组合条件下,葡甘露低聚糖的得率为 29.5%。与其他文献报道的固定化方法(硅胶为固定化载体,反应时间 16 h,低聚糖得率为 30.8%)相比^[8],低聚糖得率大致相同,但是选用甲壳素固定 β -甘露聚糖酶能显著缩短水解时间,降低生产成本,并能实现连续化生产。后续将进一步研究固定化 β -甘露聚糖酶制备葡甘露低聚糖的机制,提高葡甘露低聚糖的产量,探索实现连续化生产葡甘露低聚糖工艺条件。

参考文献:

- [1] 赵若春,赵晓勤,毛开云.我国功能性低聚糖产业发展现状及发展趋势分析[J].生物产业技术,2018(6):5-8.
- [2] QUYNH ANH NGUYEN, EUN JIN CHO, DAE-SEOK LEE, et al. Development of an advanced integrative process to create valuable biosugars including manno-oligosaccharides and mannose from spent coffee grounds[J]. Bioresource Technology, 2018(2): 209-216.
- [3] 张帅. 魔芋甘露低聚糖与枯草芽孢杆菌对 LPS 诱导肠道氧化损伤的保护作用及机制研究[D]. 华中农业大学, 2018.
- [4] 郭跃平,徐广伟,韦何雯,等.利用咖啡豆渣酶法制备甘露低聚糖的研究[J].食品研究与开发,2017,38(21):59-64.
- [5] 刘紫征.甘露低聚糖的酶法制备工艺及功能研究[D].华中农业大学,2016.
- [6] 康立新,周玉玲,马立新.酶法制备甘露低聚糖[J].食品科技,2012,37(7):237-239.
- [7] 杨伟东.固定化 β -甘露聚糖酶制备甘露低聚糖的研究[J].食品研究与开发,2010,31(9):56-58.
- [8] 许牡丹,杨伟东,王振磊.甲壳素固定化 β -甘露聚糖酶的研究[J].食品科技,2007(1):50-52.
- [9] 许牡丹,汤木红.酸酶结合法制备葡甘露低聚糖的工艺研究[J].现代食品科技,2008(1):32-34.
- [10] 段蕾,王晓燕,唐湘华,等. β -甘露聚糖酶的制备及在饲料工业中的应用价值[J].饲料研究,2008(4):6-7+10.
- [11] 许牡丹,杨伟东,柯蕾.壳聚糖-硅胶固定化 β -甘露聚糖酶方法的研究[J].食品工业科技,2007(2):160-162.
- [12] 许牡丹,杨伟东,许宝红,等.微生物 β -甘露聚糖酶的制备与应用研究进展[J].动物医学进展,2006(9):31-34. 完