皂荚多糖胶酶解制备低聚糖

杨 洋，菅红磊，徐永霞，朱莉伟*
(北京林业大学材料科学与技术学院，北京 100083)

摘 要：利用β-甘露聚糖酶对皂荚多糖胶进行解聚改性。采用$L_9(3^4)$正交设计法对底物质量浓度、加酶量、反应温度和反应时间4个因素进行考察。正交试验结果表明：皂荚多糖胶酶解的最佳工艺条件为底物质量浓度50g/L、加酶量1300U/g、反应温度65℃、反应时间11h。在此最佳工艺条件下，还原性末端糖基得率为49.92%，酶解产物的平均聚合度为2.00。此外，通过初期补料方式提高底物浓度，在反应24h后100g/L和150g/L的反应液中还原性末端糖基得率分别为50.89%和46.97%。表面活性剂对酶解反应有促进效果，皂荚皂素和吐温80可将还原性末端糖基得率分别相对提高5.25%和9.40%。高效液相色谱分析表明，皂荚多糖胶的酶解产物主要为甘露四糖(17.25%)、甘露三糖(28.68%)、甘露二糖(4.55%)，水解产生的单糖仅为1.81%。

关键词：皂荚多糖胶；酶解；还原性末端糖基；正交试验；低聚糖

Preparation of Oligosaccharides from Polysaccharide Gum of *Gleditsia sinensis* by Enzymatic Hydrolysis

YANG Yang，JIAN Hong-lei，XU Yong-xia，ZHU Li-wei*
(College of Materials Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract：The depolymerization of gum derived from *Gleditsia sinensis* was performed by enzymatic hydrolysis with β-mannanase. The optimal hydrolysis conditions were investigated by using an $L_9(3^4)$ orthogonal array design to explore the effects of substrate concentration, enzyme dosage, hydrolysis time and hydrolysis temperature on average polymerization degree of hydrolysates and reducing end glycosyl group yield. The results showed that the optimal conditions for depolymerization of the gum were substrate concentration of 50 g/L, enzyme dosage of 1300 U/g, reaction temperature of 65 ℃, and reaction time of 11 h. Under the optimal hydrolysis conditions, the reducing end glycosyl group yield was 49.92% and the average degree of polymerization 2.00. In addition, fed batch operation at the beginning could increase substrate concentration, and he reducing end glycosyl group yields in 100 g/L and 150 g/L reaction solutions after reaction for 24 h were 50.89% and 46.97%, respectively. The addition of surfactants such as gleditsia saponin and T-ween 80 could improve reducing end glycosyl group yield by 5.25% and 9.40%, respectively. Moreover, HPLC analysis indicated that the hydrolysates of *Gleditsia sinensis* gum mainly consisted of mannotetraose (17.25%), mannotriose (28.68%), mannobiose (4.55%) and monosaccharide (1.81%).

Key words：*Gleditsia sinensis* gum；enzyme hydrolysis；reducing saccharides；orthogonal array design；oligosaccharide
中图分类号：TQ432.9 **文献标识码**：A **文章编号**：1002-6630(2011)18-0138-04

皂荚(*Gleditsia sinensis* Lam.)又名皂角、台树、乌犀，为落叶乔木，是我国分布最广的特有种，所以又被称作中国皂荚，在我国河北、山东、山西、福建、江苏、浙江、江西、广东等地均有分布。皂荚多糖胶存在于皂荚种子的胚乳中[1]，主要成分为半乳甘露聚糖，相对重均分子质量250000[2]，其分子结构是由β-(1-4)-*D*-甘露糖构成的主链上，通过α-(1-6)糖苷键连接有单个*D*-半乳糖形成的支链。目前，皂荚多糖胶主要作为增稠剂、稳定剂和悬浮剂应用于食品、纺织、造纸和石油开采等行业[3-5]。近年来对大分子多糖进行酸解或酶解的研究表明，水解后的低聚糖不但具有水溶性好、稳定性高、安全无毒等良好的理化特性，还能促进肠道内有益菌群的生长，起到改善肠内菌群平衡、保障人体健康的重要作用[6-8]。经甘露聚糖酶水解半乳甘露聚糖胶产生的低聚糖为功能性糖类，可作为非营养型食品添加剂，从而促进人体肠道中的有益菌群(双歧杆菌

收稿日期：2011-04-07
基金项目：国家自然科学基金面上基金项目(30771685)；北京林业大学大学生科研训练计划项目(100504)
作者简介：杨洋(1990—)，女，学士，研究方向为林产化学加工。E-mail：menghuan0109@126.com
*通信作者：朱莉伟(1969—)，女，高级实验师，本科，研究方向为生物工程。E-mail：zhulw1969@yahoo.com.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

和乳酸菌)增殖，抑制有害菌生长[9]。另外，半乳甘露寡糖在饲料添加剂方面的应用也备受关注，由于半乳甘露聚糖能调节动物非特异性免疫和肠道功能，并且其甘露糖末端还能凝集有害微生物，因而能起到抑制有害菌侵染的作用，因此用半乳甘露低聚糖替代饲用抗生素，对于肉鸡、肉兔和生长育肥猪等的畜牧养殖具有重大意义[10]。将大分子植物多糖水解为功能性低聚糖，已成为大分子多糖开发和应用研究的新热点，这将进一步拓宽植物多糖胶的应用领域，提高皂荚多糖胶的经济效益。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

皂荚荚果，由河北涉县供销社提供，经手工剥离获得皂荚种子。采用烘烤脱壳法[11]分离出胚乳，粉碎过120目筛得皂荚多糖胶；皂荚皂素 自制；吐温80(分析纯) 天津市津科精细化工研究所。

1,4-β-*D*-甘露四糖(95%)、1,4-β-*D*-甘露三糖(95%)、1,4-β-*D*-甘露二糖(95%)标准品 爱尔兰Megazyme公司；*D*-(+)-甘露糖(99%)、*D*-(+)-半乳糖(98%)标准品 美国Alfa Aesar公司。

β-1,4-*D*-甘露聚糖酶(EC3.2.1.78)，简称β-甘露聚糖酶(β-mannanase)，是一类能够水解含β-1,4-*D*-甘露糖苷键的内切水解酶，属于半纤维素酶类[12]，由中科院微生物研究所提供。

1.2 仪器与设备

2004-211(601)超级恒温水浴锅 常州国华电器有限公司；FA1004分析天平、雷磁PHS-25数显pH计 上海精密科学仪器有限公司；高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司；UV-2102C型紫外-可见分光光度计 尤尼科(上海)仪器有限公司；电热鼓风干燥箱 重庆市永生实验仪器厂；HZ9212S恒温振荡器 太仓市科教仪器厂；DZTW调温电热套 北京市永光明医疗仪器厂；e2695高效液相色谱仪、SUGAR PAK I(65mm×300mm)色谱柱、2414 RID示差折光检测器 美国Waters公司。

1.3 方法

1.3.1 β-甘露聚糖酶活力的测定

取质量浓度为10g/L的刺槐豆胶溶液(0.1mol/L、pH6.0的乙酸-乙酸钠缓冲溶液配制)1mL，加入0.1mL用蒸馏水适当稀释的酶液，再加入0.9mL乙酸-乙酸钠缓冲液，于40℃保温反应20min(增加底物浓度会使酶的最适作用温度相应提高)，用DNS显色法测定还原糖含量。酶活力单位(U)定义为在40℃、pH6.0条件下，1min催化5mg/mL质量浓度的LBG底物生成1μg还原糖(以甘露糖表示)所需的酶量。经试验测定，β-甘露聚糖酶的酶比活力为448625U/g。

1.3.2 还原性末端糖基的测定

还原糖含量：采用DNS法测定[13]；总糖含量：采用硫酸蒽酮法测定。

$$\text{还原性末端糖基得率}/\% = \frac{\text{还原糖含量}}{\text{总糖含量}} \times 100$$

$$\text{聚合度} = \frac{\text{总糖含量}}{\text{还原糖含量}}$$

1.3.3 皂荚多糖胶酶解的工艺优化

在单因素试验的基础上，选择底物质量浓度(*A*)、加酶量(*B*)、反应温度(*C*)和反应时间(*D*)作为考察因素，每个因素选择3个水平。以还原性末端糖基得率为参考指标，采用$L_9(3^4)$正交设计对酶解条件进行优化。用0.1mol/L乙酸-乙酸钠的缓冲溶液(pH6.0)配制皂荚多糖胶溶液，在正交试验设计条件下反应后，立即取出，用DNS法测定还原性末端糖基得率。

1.3.4 皂荚皂素的提取和纯化

将皂荚的豆荚外壳粉碎过20目筛，用沸程30～60℃的石油醚在45℃抽提6h，每小时至少回流6次。抽提完毕后，挥去石油醚，以料液比1:10加入无水乙醇，在60℃浸提皂荚粉1h，浸提操作在上述条件下重复1次。用旋转蒸发仪回收无水乙醇，将所得浸膏在真空干燥箱中干燥后，再用40℃无水乙醇溶解，重结晶，结晶操作重复进行3次，得到微黄色皂荚皂素结晶，纯度为81.5%。

1.3.5 补料方式对酶解的影响

50g/L皂荚多糖胶配制完成后呈凝胶状，几乎无流动性。当按照β-甘露聚糖酶与多糖胶比例为1300U/g加入β-甘露聚糖酶后，皂荚多糖胶的黏度快速下降，变为液体状态，流动性能得到改善，因此可以通过补充底物的方式获得高浓度水解液。在正交试验得出的最优反应条件下，反应0.5h后在50g/L的反应液中补加皂荚胶，从而将底物质量浓度提高到100g/L。按照上述补料方式分别在反应0.5h和1h后补加多糖胶，将底物质量浓度提高到150g/L。在酶解反应过程中，测定50、100g/L和150g/L底物质量浓度反应液中的还原性末端糖基得率变化。

1.3.6 表面活性剂对酶解的影响

在正交试验得出的最优反应条件下，在反应液中添加皂荚皂素和吐温80，降低酶解液的界面张力，增加酶与多糖胶底物的接触，从而提高酶解效率。皂荚皂素和吐温80的添加量是根据临界胶束质量浓度确定的，分别为0.15g/L和0.30g/L。在酶解反应过程中，分别测定空白和添加皂荚皂素和吐温80反应液中的还原性末端糖基得率变化。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3.7 酶解产物的高效液相色谱分析

酶解液经0.22μm滤膜过滤后为样品液。HPLC的分析条件为：SUGAR PAK I(65mm×300mm)色谱柱、柱温85℃、流动相为双蒸水(0.22μm滤膜过滤、脱气)、流速0.5mL/min、进样量10μL，示差折光检测器温度30℃。

2 结果与分析

2.1 皂荚多糖胶酶解条件正交试验

表1 $L_9(3^4)$正交试验设计及结果

Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal array design and experimental results

试验号	A 底物质量浓度/(g/L)	B 加酶量/(U/g)	C 温度/℃	D 时间/h	还原性末端糖基得率/%	平均聚合度
1	30(1)	1200(1)	55(1)	9(1)	30.71	3.26
2	30	1300(2)	60(2)	10(2)	40.83	2.45
3	30	1400(3)	65(3)	11(3)	44.4	2.25
4	40(2)	1200	60	11	42.68	2.34
5	40	1300	65	9	47.09	2.12
6	40	1400	55	10	36.04	2.77
7	50(3)	1200	65	10	49.37	2.03
8	50	1300	55	11	41.82	2.39
9	50	1400	60	9	45.13	2.22
平均1	38.647	40.920	36.190	40.977		
平均2	41.937	43.247	42.880	42.080		
平均3	45.440	41.857	46.953	42.967		
极差	6.793	2.327	10.763	1.990		
优水平	A_3	B_2	C_3	D_3		
因素主次	$C>A>B>D$					

采用$L_9(3^4)$正交试验方案，皂荚多糖胶酶解试验结果见表1。正交试验结果经SPSS 1310软件分析得出，各因素的影响程度依次为温度＞底物浓度＞加酶量＞时间。温度对皂荚多糖胶的酶解影响最大，高于65℃就有抑制酶活的效应[14-15]。水解时间对反应过程影响最小，这是因为正交设计选择的时间水平处于还原性末端糖基得率基本不再变化的平台区。正交试验结果得出，甘露聚糖酶解聚皂荚多糖胶的最佳工艺条件组合为$A_3B_2C_3D_3$，即底物质量浓度50g/L、加酶量1300U/g、反应温度65℃、反应时间11h。在此最佳工艺条件下进行验证实验，结果显示还原性末端糖基得率为49.92%，高于方案7(49.37%)，酶解产物的平均聚合度为2.00。

2.2 补料方式对酶解的影响

通过补料方式获得100g/L和150g/L底物质量浓度的反应液，反应过程中还原性末端糖基得率的变化情况见图1。由于补料的影响，100g/L和150g/L质量浓度的反应液在1h时未取样。在正交所得的最佳工艺条件下，随着酶解时间的延长，水解液中还原性末端糖基得率逐渐升高，10h以后基本稳定。因此，从工业生产的角度来看，酶解时间应控制在10h左右。通过一次补料和二次补料分别将底物质量浓度提高到100g/L和150g/L，在酶解进行24h后，50、100g/L和150g/L底物质量浓度的反应液中还原性末端糖基得率分别为49.92%、50.89%和46.97%。以上结果说明，将补料方式用于提高多糖胶酶解的底物质量浓度，通过延长反应时间可以获得相同的酶解效果，这对于多糖胶的工业化应用具有非常显著的意义。

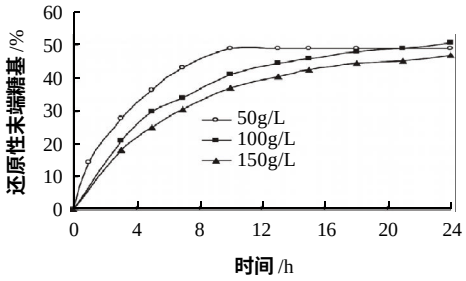

图1 补料方式对皂荚多糖胶酶法解聚反应的影响

Fig.1 Effect of fed batch operation on depolymerization of *Gleditsia sinensis* gum

2.3 表面活性剂对酶解的影响

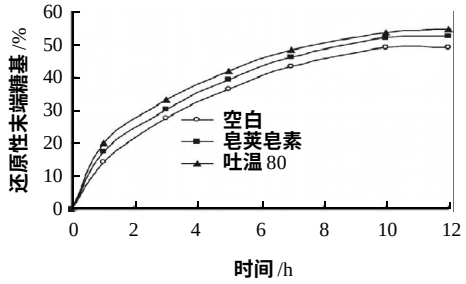

图2 表面活性剂对皂荚多糖胶酶法解聚反应的影响

Fig.2 Effect of surfactants on depolymerization of *Gleditsia sinensis* gum

由图2可以看出，加入表面活性剂的样品中还原性末端糖基得率均高于空白对照样品。在酶解反应12h后，加入皂荚皂素和吐温80的样品中的还原性末端糖基得率分别为52.54%和54.61%，与空白对照(49.92%)相比分别提高了5.25%和9.40%，这说明皂荚皂素和吐温80对酶解反应均有促进效果。表面活性剂可以降低反应体系的表面张力，增加酶与多糖胶之间的有效接触，从而提高酶解的效率。

2.4 酶解液的HPLC分析

甘露四糖、甘露三糖、甘露二糖和甘露糖标准品的标准曲线见表2。根据标准品出峰时间定性以及外标标准曲线定量，各组分的质量浓度见表3。由于甘露糖和半乳糖的保留时间非常接近，不能得到分离，因此

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

单糖峰用甘露糖的标准曲线进行定量。5.658min的宽峰为五糖及以上的多糖以及溶剂出峰，无法进行定性定量。皂荚多糖胶中的半乳甘露聚糖含量为70%，计算得出皂荚多糖胶的酶解产物主要为甘露四糖(17.25%)、甘露三糖(28.68%)、甘露二糖(4.55%)。五糖以下低聚糖的得率为50.47%，而水解产生的单糖仅为1.81%，五糖及以上的宽峰可能为高取代的甘露糖单元，无甘露聚糖酶的作用位点。

表2 标准品的高效液相色谱测定结果

Table 2 Standard equations and their correlation coefficients for quantification of mannose, mannobiose, mannotriose and mannotetrose

标准品	标准曲线公式	相关系数 R
甘露四糖	$y = 9.84 \times 10^4 x$	0.9999
甘露三糖	$y = 1.27 \times 10^5 x$	0.9999
甘露二糖	$y = 1.19 \times 10^5 x$	0.9999
甘露糖	$y = 1.24 \times 10^5 x$	0.9999

注：x 为质量浓度/(g/L)，y 为峰面积/(μV·s)。

表3 酶解皂荚多糖胶的高效液相色谱测定结果

Table 3 HPLC analytical results of *Gleditsia sinensis* gum hydrolysate prepared under optimal hydrolysis conditions

组分	保留时间/min		质量浓度/(g/L)	得率/%
	标准品	样品		
不确定	—	5.658	—	47.71
甘露四糖	6.818	6.779	6.036	17.25
甘露三糖	7.631	7.663	10.037	28.68
甘露二糖	8.965	8.941	1.591	4.55
单糖	9.933	9.862	0.633	1.81

β-甘露聚糖酶水解底物的方式和深度主要与α-半乳糖残基在主链中的位置、含量、酯酰化的程度有关。β-甘露聚糖酶较易作用于4个以上且取代度低的甘露糖单元，水解半乳甘露聚糖的主要产物为甘露二糖和甘露三糖，甘露四糖可被甘露聚糖酶水解，但是水解速率要远远低于甘露五糖[16]。若完全水解甘露聚糖，β-甘露聚糖酶需要与其他酶协同作用，如β-1,4-甘露糖苷酶(EC 3.2.1.25)能够将甘露二糖或甘露三糖水解为甘露糖[17]。另外，β-甘露聚糖酶水解野皂荚多糖胶的研究结果显示，酶解产物主要为二糖以上的低聚糖，单糖含量较少[18-19]，这与本研究的结果一致。从另一方面来看，本研究结果也证明了相对于酸法改性，酶法改性容易控制且副产物少的优点。

3 结 论

利用β-甘露聚糖酶对皂荚多糖胶进行解聚改性，在单因素试验的基础上，设计$L_9(3^4)$正交试验得出酶解的最佳工艺条件为底物质量浓度50g/L、加酶量1300U/g、反应温度65℃、反应时间11h。各因素的影响程度依次为温度＞底物质量浓度＞加酶量＞时间。对酶解液进行高效液相色谱分析结果表明，皂荚多糖胶酶解的产物主要为甘露四糖、甘露三糖和甘露二糖，酶解过程中产生的单糖很少。在相同的酶解效率下，通过补料方式可以将皂荚多糖胶酶解的底物质量浓度提高到150g/L。将皂荚皂素和吐温80用于皂荚多糖胶的酶解反应，可以降低反应液的界面张力，从而提高酶与底物的有效接触，提高酶解效率。因此，补料方式和表面活性剂可提高酶解效率，可为工业化利用皂荚多糖胶生产半乳甘露低聚糖提供依据。

参考文献：

[1] 杨永利, 张继, 姚健, 等. 半乳甘露聚糖种子胶的研究进展[J]. 西安师范大学学报: 自然科学版, 1999, 35(1): 104-110.

[2] 缪月秋, 梅秋红, 顾龚平, 等. 葫芦巴中性杂多糖酶解工艺及其产物对青春双歧杆菌增殖作用的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(2): 238-242.

[3] BOCIEK M S, IZZARD J M, MORRISON A, et al. The ^{13}C-NMR spectra of(1-6) α-*D*-galactosyl-(l-4) β-*D*-mannans[J]. Carbohydrate Research, 1981, 93: 279-283.

[4] 李欣, 范明娟, 廉彬, 等. 24种豆科植物的半乳甘露聚糖胶的分析[J]. 植物学报, 1980, 14(4): 323-328.

[5] MADAR Z, SHOMER I J. Polysaccharide composition of gel fraction derived from fenugreek and its effect on starch digestion and bile acid absorption in rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38(3): 1535-1595.

[6] 钟卫鸿, 汪钊, 裘娟萍, 等. 酶法制备低聚糖浆的双歧杆菌促生作用研究[J]. 食品科学, 1998, 19(7): 5-9.

[7] MALLETT A K, BEARNE C A, ROWLAND I R, et al. The use of rats associated with a human faecal flora as a model for studying the effects of diet on the human gut microfloral[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1987, 63(1): 39-45.

[8] 张延坤. 大豆低聚糖的特性及其生理功能[J]. 解放军预防医学杂志, 1996, 14(1): 75-78.

[9] 徐红蕊. β-甘露聚糖酶之国内外最新研究概况[J]. 湖南饲料, 2008(2): 30-32.

[10] 荆政, 龚燕. 生物技术制备植物性来源的功能寡糖[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(2): 7-9.

[11] 蒋建新, 张卫明, 朱莉伟, 等. 烘炒法分离提取半乳甘露聚糖型种子胶[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(5): 34-36.

[12] 齐军茹, 廖劲松, 彭志英. β-甘露聚糖酶的制备及其应用研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2002(6): 12-16.

[13] 杨贵明, 蒋爱华, 薛秋生. 用DNS光度法测定还原糖的条件研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(14): 3258-3264.

[14] 赖萍, 林跃鑫. 天然多糖分子修饰研究进展[J]. 生命的化学, 2003, 23(3): 183-187.

[15] 严钦, 沈月新, 王慥. 壳寡糖制备研究进展[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(4): 383-387.

[16] TAPIE N, MALHIAC C, HUCHER N, et al. Determination of galactose and mannose residues in natural galactomannans using a fast and efficient high-performance liquid chromatography/UV detection[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1181(1/2): 45-50.

[17] 菅红磊, 张卫明, 蒋建新, 等. 半乳甘露聚糖胶酶法改性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(2): 5-12.

[18] 张敏, 史劲松, 孙达峰, 等. 野皂荚多糖胶酶法制备半乳甘露低聚糖的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(9): 57-62.

[19] 张卫明, 张敏, 史劲松, 等. 野皂荚多糖胶的微波辅助降黏技术研究[J]. 食品科学, 2009, 30(5): 86-90.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net