



## 胡芦巴半乳甘露聚糖酶法改性的工艺条件

孙 茜, 张黎明

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 采用正交实验法优选纤维素酶降解胡芦巴半乳甘露聚糖的最佳工艺条件, 以黏均分子质量和还原糖得率为指标, 考察了酶解温度、酶解时间、酶用量及 pH 对降解效果的影响. 结果表明, 纤维素酶降解最佳工艺条件为: 酶用量 1 500 U/g, 酶解温度 50 ℃, pH 5.0, 酶解时间 150 min, 影响降解工艺的主次因素顺序为: 酶解温度>酶用量>酶解时间>pH. 所得产物的黏均相对分子质量  $1.2 \times 10^5$ , 还原糖得率 5.1%.

**关键词:** 胡芦巴; 半乳甘露聚糖; 纤维素酶

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1672-6510 (2008) 01-0033-05

### Technology Conditions of Degradation for Galactomannan from *Trigonella*

#### *Foenumgraecum* by Cellulose

SUN Qian, ZHANG Li-ming

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The optimum conditions of degradation for galactomannan from *Trigonella foenumgraecum* by cellulose were investigated by orthogonal design, taking the molecular weight of galactomannan and the yield of reducing sugar as indexes which were used to appraise the degradation effect, degrading temperature, reacting time, the amount of cellulose and pH were reviewed clearly. The results reveal that the optimum parameters are 1g galactomannan are reacted with 1 500 U cellulose at pH 5.0 and at 50℃ for 150 min. The effects of factors decreased in the following order: degrading temperature, the amount of cellulose, reacting time and pH. The molecular weight of product is  $1.2 \times 10^5$  and the yield of reducing sugar is 5.1%.

**Keywords:** *Trigonella foenumgraecum*; galactomannan; cellulose

胡芦巴 (*Trigonella foenumgraecum*) 又名香豆子、芦巴、香草等, 系豆科胡芦巴属一年生草本植物, 在我国新疆、河北、陕西等地均有分布. 胡芦巴胶系胡芦巴种子内胚乳中提取出的一种多糖胶, 主要成分为半乳甘露聚糖<sup>[1]</sup>, 其分子式为  $(C_6H_{10}O_5)_n \cdot 2H_2O$ , 其结构是由  $\beta$ -D-甘露糖通过  $\beta$ -D-1, 4 糖苷键连接形成主链, 在某些  $\beta$ -D-甘露糖基的 1→6 位上  $\alpha$ -D-吡喃半乳糖通过  $\alpha$ -1, 6 半乳糖苷键形成侧链而构成多分枝的聚糖, 其中所含的半乳糖与甘露糖之比为 1 : 1.2. 已有文献报道<sup>[3,4]</sup>, 半乳甘露聚糖降解产物具有许多独特的生物学活性: 在人体肠道内能活化增殖双歧杆菌, 抑制大肠杆菌的生长, 且水溶性好、稳定性

高、安全无毒, 并可作为饲料广泛应用于肉鸡、肉兔、早期断奶仔猪、常规断奶仔猪、生长育肥猪和泌乳母猪的养殖. 酶解法具有条件温和、环境污染小、反应过程和降解产物分子质量分布易于控制、选择性好、产物质地疏松易于研磨等优点<sup>[3]</sup>. 因此对其进行酶法改性, 制备分子质量较小的胡芦巴半乳甘露聚糖, 对扩大其应用范围具有重要意义.

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器与材料

WFJ-2000 型紫外可见光光度计, 万尼柯上海仪

收稿日期: 2007-07-02; 修回日期: 2007-11-18

作者简介: 孙 茜 (1983—), 女, 天津人, 硕士研究生.

器设备有限公司; LD5-10 型离心机, 北京医用离心机厂; 电热恒温水浴锅, 北京市长风仪器仪表公司; Laborota 4000 型旋转蒸发仪, 德国; 平型乌氏黏度计 (毛细管内径 0.5~0.6 mm), 浙江椒江玻璃仪器厂。

胡芦巴胶 (经脱色脱蛋白处理得胡芦巴半乳甘露聚糖), 购自泗县金达植物胶公司; D-无水葡萄糖, 中国药品生物制品检定所提供; 纤维素酶 (XWS-G-1, 酶活 10 000 U/g), 天津市诺澳科技发展有限公司; 无水乙醇、丙酮、冰醋酸、结晶醋酸钠, 均为分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 葡萄糖标准曲线的制备

采用苯酚-硫酸法<sup>[5]</sup>, 在 490 nm 波长下测定吸光度 (A), 由葡萄糖浓度 (C) - 吸光度 (A) 标准曲线拟合得回归方程:  $A=0.0592C+0.0376$ ,  $R^2=0.9993$ 。

### 1.2.2 总糖含量的测定

精密称取干燥至恒重的多糖 0.010 0 g, 加入热水使之溶解, 定容至 100 mL。精密吸取样品溶液 1 mL, 按照标准曲线的测定方法测定吸光度, 代入标准曲线方程中计算样品液的总糖含量。

### 1.2.3 还原糖含量的测定

采用 DNS 法<sup>[6]</sup>, 在 540 nm 波长下测定吸光度 (A), 由还原糖浓度 (C) - 吸光度 (A) 标准曲线拟合得回归方程:  $A=0.0143C-0.062$ ,  $R^2=0.9972$ 。

### 1.2.4 还原糖得率的测定

半乳甘露聚糖水解后, 样液适当稀释后用 DNS 法测定水解液中以葡萄糖计的还原糖含量, 用苯酚-硫酸法测定总糖含量。还原糖得率 (M) 按下式计算:

$$\text{还原糖得率} = \frac{\text{还原糖含量}}{\text{总糖含量}} \times 100\%$$

### 1.2.5 半乳甘露聚糖黏均分子质量的测定

精密称取 0.100 0 g 降解产物, 以 0.2 mol/L 的 NaCl 水溶液为溶剂配制溶液, 为了得到可靠的外推值, 溶液浓度需限制在 1.1~1.5 g/cm<sup>3</sup> 的范围内<sup>[7]</sup>。取 10 mL 溶液于乌氏黏度计中, 在 30 °C 水浴恒温的条件下, 用秒表测定溶剂以及不同浓度的半乳甘露聚糖溶液在乌氏黏度计中下落的时间, 根据 Mark 经验式  $[\eta] = KM_{\eta}^{\alpha}$  计算黏均分子质量, 其中,  $\eta$  为溶液黏度,  $M_{\eta}$  为黏均分子质量,  $K=7.5 \times 10^{-2}$ ,  $\alpha=0.662$ <sup>[8,9]</sup>。

### 1.2.6 纤维素酶降解半乳甘露聚糖单因素实验<sup>[10]</sup>

称取 1.0 g 多糖, 置入 250 mL 容量瓶中, 加入乙酸-乙酸钠缓冲溶液 100 mL, 水浴加热, 加入纤维素酶, 搅拌降解一定时间后, 加入无水乙醇, 使乙醇的体积分数达到 80%, 过滤, 将沉淀经乙醇、丙酮洗涤, 真空干燥后按照 1.2.5 的方法测定黏均分子质量, 按

照 1.2.4 的方法测定还原糖得率。

### 1.2.7 纤维素酶降解半乳甘露聚糖正交实验

在单因素实验的基础上, 选择酶解时间、酶用量、pH 及酶解温度作为考察因素, 每个因素选择三个水平, 最终通过正交实验来确定酶解最优工艺。

### 1.2.8 实验评价指标

通过研究各因素对降解效果的影响, 确定可以制备具有较小黏均分子质量产物的反应条件, 由于生成较少的还原糖可使产物中各多糖片段的分子质量趋于均一, 因此以降解产物的黏均分子质量和还原糖得率为指标, 其中黏均分子质量和总还原糖得率的权重系数均定为 50。

$$\text{综合评分} = \frac{\text{最小黏均分子质量}}{\text{黏均分子质量}} \times 50 + \frac{\text{最小还原糖得率}}{\text{还原糖得率}} \times 50$$

### 1.2.9 溶液黏度及溶解率的测定

溶液黏度的测定方法与 1.2.5 相同。

溶解率的测定方法为: 精密称取 0.100 0 g 原半乳甘露聚糖及降解后的低分子质量半乳甘露聚糖, 溶于 100 mL 热水中, 冷却至室温后离心, 将沉淀物干燥至恒重并称量。

$$\text{溶解率} = \frac{\text{半乳甘露聚糖质量} - \text{沉淀物质量}}{\text{半乳甘露聚糖质量}} \times 100\%$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 纤维素酶降解半乳甘露聚糖单因素实验

#### 2.1.1 酶解时间对产物黏均分子质量及还原糖得率的影响

按 1.2.6 所述方法, 取乙酸-乙酸钠缓冲溶液 pH5.0, 酶解温度 40 °C, 酶用量 500 U/g, 酶解时间分别为 30、60、90、120、150、180 min, 观察酶解时间对产物黏均分子质量及还原糖得率的影响, 结果见图 1。

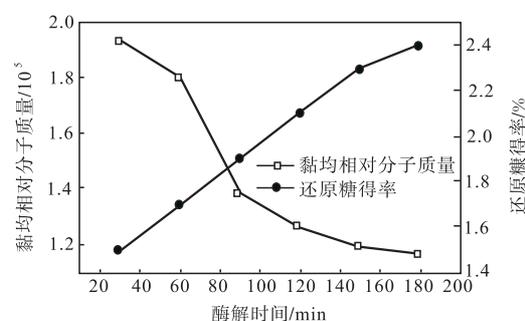


图 1 酶解时间对黏均分子质量及还原糖得率的影响  
Fig. 1 Effect of degradation time on molecular weight and yield of reducing sugar

从图 1 可以看出,反应在 30~180 min 内,随着反应时间的延长,酶解产物的黏均分子质量呈现逐渐减小的趋势.在酶解 30~60 min,黏均分子质量下降较缓慢;60~90 min,黏均分子质量急剧下降,90 min 以后,由于产物的抑制、酶的部分变性失活等因素的影响,酶反应速度逐渐降低,黏均分子质量变化趋于平稳.随着酶解时间的延长,还原糖得率基本上呈现直线上升的趋势,这是由于纤维素酶在切断主链  $\beta$ -1,4 糖苷键的同时会不断生成还原糖,60 min 时虽然还原糖得率较少,但黏均分子质量过大,所以选择 90、120、150 min 进行正交实验.

### 2.1.2 酶用量对产物黏均分子质量及还原糖得率的影响

按 1.2.6 所述方法,取乙酸-乙酸钠缓冲溶液 pH 5.0,酶解温度 40 °C,酶解时间 30、60、90、120、150、180 min,酶用量分别为 500、1 000、1 500、2 000、2 500 U/g,观察酶解用量对产物黏均分子的质量及还原糖得率的影响,结果见图 2、图 3.

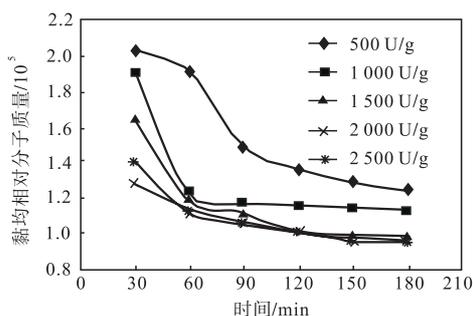


图 2 酶用量对黏均分子质量的影响

Fig. 2 Effect of the amount of cellulase on molecular weight

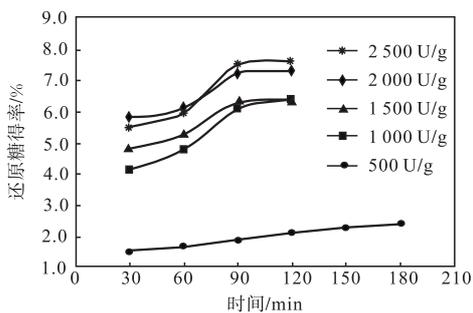


图 3 酶用量对还原糖得率的影响

Fig. 3 Effect of the amount of cellulase on yield of reducing sugar

从图 2 可以看出,随着降解时间的延长,增大酶量使得产物的黏均分子质量迅速下降,2 500 U/g 的酶量降解 30 min 后的产物黏均分子质量与 1 000 U/g

的酶量降解 180 min 基本相同,500 U/g 的酶量降解 150 min 后黏均分子质量变化趋于平缓.加入酶量为 2 000 U/g 后,在其他条件不变的情况下,单纯增大酶量并不能继续减小黏均分子质量,因此基本达到水解终点.当酶量为 2 500 U/g 降解 90 min 后黏均分子质量的变化已趋于平缓,说明增大酶量有利于降解.

从图 3 可以看出,随着降解时间的延长,增大酶量使得还原糖得率有明显增加,当酶量在 1 000~2 500 U/g 范围内,还原糖得率的变化趋势基本相同,酶量越大,产生的还原糖就越多,而 2 000 U/g 与 2 500 U/g 条件下生成还原糖的量基本相同,分别为 5.2%和 5.3%.虽然酶量为 500 U/g 时,生成还原糖的量较少,但相对应的黏均分子质量较大,因此选择 1 000、1 500、2 000 U/g 的酶量进行正交实验.

### 2.1.3 pH 对产物黏均分子质量及还原糖得率的影响

按 1.2.6 所述方法,取酶解温度 40 °C,酶解时间 60 min,酶用量 1 000 U/g,乙酸-乙酸钠缓冲溶液 pH 分别为 4.0、4.4、5.0、5.4、5.8,观察 pH 对黏均分子质量及还原糖得率的影响,结果见图 4.

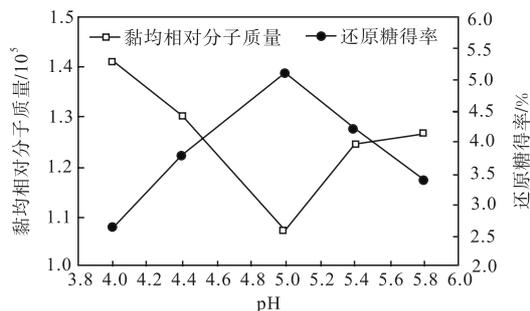


图 4 pH 对黏均分子质量及还原糖得率的影响

Fig. 4 Effect of pH on molecular weight and yield of reducing sugar

从图 4 可以看出,随着 pH 的增大,黏均分子质量逐渐减小,当 pH 增大到 5.0 时,降解后产物的黏均分子质量最小,之后反而增大,生成还原糖的量在此时也出现峰值,因此纤维素酶水解半乳甘露聚糖的最佳 pH 为 5.0.

### 2.1.4 酶解温度对产物黏均分子质量及还原糖得率的影响

按 1.2.6 所述方法,取乙酸-乙酸钠缓冲溶液 pH 5.0,酶解时间 60 min,酶用量 1 000 U/g,酶解温度分别为 35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C,观察酶解温度对产物黏均分子的质量及还原糖得率的影响,结果见图 5.

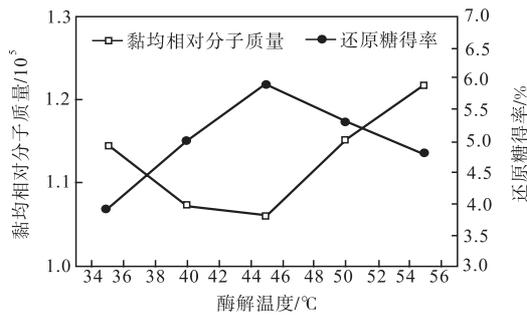


图5 酶解温度对黏均分子质量及还原糖得率的影响

Fig. 5 Effect of the degrading temperature on molecular weight and yield of reducing sugar

由图5可以看出,降解产物的黏均分子质量先是随着温度的升高而降低,在45℃附近出现峰值,此时水解效果最好.随后随着温度的增加,黏均分子质

量反而升高,说明当超过最适温度时,酶逐渐失活,水解效果也相应下降.生成还原糖的量先是随着温度的升高而升高,在45℃附近出现峰值,随后随着温度的增加,还原糖得率反而降低.已有文献报道<sup>[9]</sup>纤维素酶最适温度范围为40~50℃,在60℃下加热30min,酶活即显著下降,因此,纤维素酶水解半乳甘露聚糖的最佳温度为45℃.

2.2 纤维素酶降解半乳甘露聚糖正交实验

根据单因素实验结果,分别对酶解时间、酶用量、pH及酶解温度选择三个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表设计实验,因素水平见表1.准确称取多糖1.0g,置入250mL容量瓶中,在不同条件下进行正交实验,实验结果见表2,方差分析结果见表3.

表1 因素水平表

Tab. 1 Actors and levers of orthogonal design

因素	酶用量(A)/U·g <sup>-1</sup>	时间(B)/min	pH(C)	温度(D)/°C
水平1	1 000	90	4.4	40
水平2	1 500	120	5.0	50
水平3	2 000	150	5.4	45

表2  $L_9(3^4)$ 正交实验结果

Tab. 2 Orthogonal test and results

实验号	A	B	C	D	黏均相对分子质量/ $10^5$	还原糖得率/%	综合评分
1	1	1	1	1	1.4	4.0	72
2	1	2	2	2	1.1	3.3	89
3	1	3	3	3	1.3	4.3	71
4	2	1	2	3	1.4	4.2	70
5	2	2	3	1	1.3	3.7	78
6	2	3	1	2	1.1	3.2	91
7	3	1	3	2	1.1	7.4	63
8	3	2	1	3	1.3	7.4	56
9	3	3	2	1	0.9	7.5	71
均值1	80.000	73.667	75.667	74.667			
均值2	82.000	76.333	78.333	86.333			
均值3	68.000	80.000	76.000	69.000			
极差	14.000	6.333	2.667	17.333			

表3 方差分析表

Tab. 3 Analysis of variance

因素	离差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
A	344.000	2	27.157	9.00	*
B	60.667	2	4.789	9.00	
C	12.667	2	1.000	9.00	
D	468.667	2	36.999	9.00	*
误差	12.667	8			

注: \*代表较显著  $F_{0.10}(2,2) = 9.00$ .

由表2正交实验结果显示,纤维素酶降解半乳甘露聚糖各影响因素的最佳组合为 $A_2B_3C_2D_2$ ,即酶用

量1 500 U/g,酶解时间150min,pH 5.0,酶解温度50℃.值得注意的是,正交实验得出的最优工艺中温

度为 50 ℃, 而单因素实验中最佳温度在 45 ℃附近, 两个实验结果有冲突. 其原因之一在于该反应体系的初始黏度在 45 ℃时比在 50 ℃时大, 以至于使酶的分散和传质过程成为制约反应速率的主要因素; 原因之二在于就降解反应而言, 温度的升高有利于反应的进行. 因此, 尽管 45 ℃时酶活力比 50 ℃时高, 50 ℃时的降解速率还是比 45 ℃时要快一些. 由表 3 正交实验的方差分析结果可见, 影响效果诸因素的主次关系依次是: 酶解温度>酶用量>酶解时间>pH, 温度和酶用量的影响较显著.

### 2.3 验证实验

按最佳酶解条件追加验证实验, 测定产物黏均分子量及还原糖得率, 结果见表 4. 实验结果表明, 在最佳酶解条件下平均黏均相对分子量  $\overline{M}_\eta = 1.2 \times 10^5$ , RSD=1.52%<2%; 平均还原糖得率  $\overline{M} = 5.1\%$ , RSD=0.25%<2%.

表 4 验证实验结果

Tab. 4 Results of reproducibility test

序号	$M_\eta/10^5$	$\overline{M}_\eta \pm \text{RSD}$	$M/\%$	$\overline{M} \pm \text{RSD}$
1	1.1		4.9	
2	1.2	$1.2 \times 10^5 \pm 1.52\%$	5.1	$5.1\% \pm 0.25\%$
3	1.2		5.4	

### 2.4 溶液黏度及溶解率的测定结果

表 5 为原半乳甘露聚糖及降解产物的溶液黏度及溶解率.

表 5 溶液黏度及溶解率测定结果

Tab. 5 Results of viscosity of solution and rate of solubility

样品	溶液黏度/ $\text{mPa} \cdot \text{s}$	溶解率/%
原半乳甘露聚糖	471.24	73.30
低分子量半乳甘露聚糖	173.79	91.50

由表 5 可知, 随着半乳甘露聚糖黏均分子质量的降低, 溶液黏度明显下降, 且由于降解后颗粒粒度减小, 颗粒表面积增加, 使溶解性明显提高. 可见, 为达到降低半乳甘露聚糖溶液黏度、提高溶解性的目的, 降低黏均分子量是一种行之有效的方法.

## 3 结论

采用纤维素酶降解胡芦巴半乳甘露聚糖, 提高纤维素酶降解半乳甘露聚糖效果要解决的两个关键问题: 一是增加酶与底物作用的机会; 二是提高酶的活性. 因此, 以酶用量、酶解时间、pH 和酶解温度为影响因素进行实验, 由正交实验得出降解最优工艺为: 酶用量 1 500 U/g, 酶解时间 150 min, pH 5.0, 酶解温度 50 ℃. 通过方差分析得出影响降解效果诸因素的主次关系依次是: 酶解温度>酶用量>酶解时间>pH, 温度和酶用量的影响较显著. 在此条件下得到的低分子量胡芦巴半乳甘露聚糖, 其溶液黏度显著下降, 颗粒表面积增大, 溶解性提高.

### 参考文献:

- [1] 王宗训. 中国资源植物利用手册 [M]. 北京: 中国科技出版社, 1989: 463—465.
- [2] Madar Z, Shomer I J. Polysaccharides composition of gel fraction derived from fenugreek and its effect on starch digestion and bile acid absorption in rats [J]. Agric Food Chem, 1990, 38 (3): 1535—1595.
- [3] 缪月秋, 梅秋红, 顾龚平, 等. 胡芦巴中性杂多糖酶解工艺优化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.
- [4] 王彬, 胡媛, 印遇龙, 等. 半乳甘露寡糖在饲料工业中的应用 [J]. 广东饲料, 2006, 15 (4): 30—31.
- [5] 李瑞, 赵浩如, 陈乃林. 白花蛇舌草多糖除蛋白的方法研究 [J]. 江苏中医药, 2003, 24 (10): 56—57.
- [6] 朱海霞, 石瑛, 张庆娜, 等. 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 比色法测定马铃薯还原糖含量的研究 [J]. 中国马铃薯, 2005 (5): 266—269.
- [7] 赵振河. 高分子化学和物理 [M]. 1 版. 北京: 中国纺织出版社, 2003: 296—300.
- [8] 韩哲文. 高分子科学实验 [M]. 1 版. 上海: 华东理工大学出版社, 2005: 55—61.
- [9] 王丽伟, 卢拥军, 单文文, 等. 瓜尔胶低分子量降解条件研究 [J]. 油田化学, 2006, 23 (1): 33—35.
- [10] 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: 自然科学版, 2003, 24 (3): 42—44.