

酶催化魔芋葡甘聚糖的可控降解^{*}

祁 黎¹ 李光吉^{1**} 宗敏华²

(¹ 华南理工大学 高分子材料科学与工程系 广州 510640)

(² 华南理工大学 生物工程系 广州 510640)

摘 要 魔芋葡甘聚糖(KGM)是一种来自植物的天然高分子,它具有优异的可生物降解性和生物相容性,并具有许多独特的生理和药理功能.本实验首先测定了 β -甘露糖酶在不同条件(温度、pH 值、介质)下的活性,发现 β -甘露糖酶在 50℃ 左右, pH 9.4 附近,乙醇含量低于 5% 的水介质中具有较高的活力;而在 pH 7.0 以下,或温度低于 30℃,或加入 20% 乙醇的条件下均基本上失活.在此研究基础上,探讨了 β -甘露糖酶催化 KGM 降解反应的规律,通过调节反应条件制备了一系列分子量不同的降解样品,并确定了 KGM 的分子量与特性粘度之间的关系为: $[\eta] = 5.06 \times 10^{-4} M_w^{0.754}$,使得酶催化 KGM 的可控降解成为可能,从而为深入研究 KGM 及其衍生物的结构与性能,扩展其应用领域奠定了良好的理论和实验基础.

关键词 魔芋葡甘聚糖, β -甘露糖酶, 可控降解, 酶催化

魔芋是一种天南星科魔芋属的草本植物.魔芋葡甘聚糖(Konjac glucomannan, 简称 KGM)是魔芋的主要成分,在干魔芋块茎中的含量高达 55% ~ 60%^[1].它是由 D-葡萄糖(G)和 D-甘露糖(M)按 1:1.6 或 1:1.69 的摩尔比通过 β -1,4-吡喃糖苷键结合的复合多糖.KGM 通常带有短支链,并含有少量乙酰基^[2,3].它在食品、石油、化工、纺织、医疗及化妆品等行业都具有广泛的用途^[4].国内已有一些学者对 KGM 的理化性质和开发应用进行了研究.其中,中科院成都生物所的贾成禹、莫卫平等^[5]研究了 KGM 的结构、凝胶性能和应用;华中农业大学的谢笔钧等^[6]研究了 KGM 及其衍生物的制备和应用;近年来,武汉大学的田炳寿等^[7,8]对 KGM 的长链脂肪酸酯的常规化学法制备以及产物的乳化性能进行了探讨,何东保等^[9]研究了 KGM 与黄原胶的协同作用及凝胶化性质,张俐娜等^[10-12]则对 KGM 与其它天然高分子的复合膜的性质和应用进行了较为深入的研究.

一般说来,KGM 的分子量可达 10^6 数量级.高分子量一方面使其具有优良的增稠性、凝胶性,另一方面却使其应用范围受到了很大限制.能够实现 KGM 的可控降解,得到预期分子量范围的 KGM 将极大地扩展 KGM 的应用领域.本研究利用生物催化反应具有高效、专一、条件温和、产物较纯以及对环境的影响较小等优点,选择嗜碱性

β -甘露糖酶^[13]作为催化剂来实现 KGM 的可控降解.

1 实验材料及仪器

1.1 实验材料和试剂

魔芋精粉(3A-PF-120),由海南多环保健品有限公司提供;嗜碱性 β -甘露糖酶,由中国科学院北京微生物研究所提供.其它试剂均为分析纯,使用前未经处理.

1.2 主要实验仪器

NDF-1A 型旋转式粘度计:上海安德仪器设备有限公司;751G 型分光光度计:上海分析仪器厂;乌式粘度计:毛细管孔径 0.5 ~ 0.6 mm, 30℃ $\pm$ 0.5℃ 条件下水流出时间 > 100 s;真空冷冻干燥机:德国 Christ 公司, Alpha 1-2 型.

2 实验方法

2.1 β -甘露糖酶活力的测定

将 250 mg 魔芋精粉溶于 50 mL 一定 pH 的缓冲液中,不加或加入一定量的无水乙醇,磁力搅拌,得到均匀的水溶胶;取 9.0 mL 该水溶胶于刻度试管内,加入 4.0 mL β -甘露糖酶(含 4.0 mg 固体酶),混合均匀;然后,将这一试管置于一定温度的水浴中保温 20 min,再置于沸水中加热 5 min,使酶失活.水解液经过滤后,将滤液定容到 50 mL,

^{*} 2002-10-14 收稿, 2002-12-28 修稿; 2001 年国家留学回国人员启动基金和 2003 年广州市科技计划应用基础研究项目资助;

^{**} 通讯联系人

用3,5-二硝基水杨酸法^[14](DNS法)测定滤液中的还原糖的含量。

本研究中 pH 值为 4.0、7.0 和 8.0 的缓冲溶液由磷酸氢二钠-柠檬酸体系组成;pH 值为 9.0、9.4 和 10.0 的缓冲溶液由甘氨酸-氢氧化钠体系组成,分别如表 1 和表 2 所示。

Table 1 The preparation of Na_2HPO_4 -citric acid buffer solution

pH	0.2 mol/L Na_2HPO_4 Solution (mL)	0.1 mol/L Citric acid solution (mL)
4.0	7.71	12.29
7.0	16.47	3.53
8.0	19.45	0.55

Table 2 The preparation of glycine-NaOH buffer solution

pH	0.2 mol/L Glycine solution (mL)	0.2 mol/L NaOH Solution (mL)
9.0	50	8.8
9.4	50	16.8
10.0	50	32.0

β -甘露糖酶的活力定义为在一定条件(温度、pH、底物浓度)下,每毫克 β -甘露糖酶每分钟能催化生成的还原糖的量(μmol)。

2.2 β -甘露糖酶催化 KGM 降解反应

将一定量的 β -甘露糖酶溶于尽量少的蒸馏水中,并将所得的酶液加入 100 mL pH 为 9.0 的缓冲液中,于 30℃ 水浴中边搅拌边加入一定量的 KGM,搅拌反应一定时间后向反应体系中加入一倍体积的乙醇,终止降解反应。沉淀出来的降解产物过滤并用无水乙醇多次洗涤和脱水,经真空冷冻干燥、碾磨后得到白色粉末状的 KGM 降解产物。

2.3 特性粘度的测定

将降解产物配成浓度为 0.05% 的水溶液,在 $30^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 的条件下用乌式粘度计测定其特性粘度。

2.4 分子量测定

用 Waters 公司的 GPC 测定一组 KGM 降解产物的分子量。测试条件:Waters 410 检测器,Ultrahydrogel 500 凝胶柱,柱温 40℃,流动相为 NaCl 溶液,流速为 0.6 mL/min。

3 结果与讨论

3.1 β -甘露糖酶活力的影响因素

实验研究了 β -甘露糖酶在一定条件下,反应温度、pH 值和反应介质水/乙醇中的乙醇含量对

酶的活力的影响及其规律,结果分别如图 1、2、3 所示。

由图 1 可以看到,在 30℃ ~ 70℃ 之间, β -甘露糖酶均具有催化活力;在 50℃ 附近催化活力最高。但进一步的实验发现,较高反应温度下得到的 KGM 降解产物的水溶性变差。因此,为了得到水溶性好的降解产物,下一步的酶催化降解反应均在 30℃ 下进行。

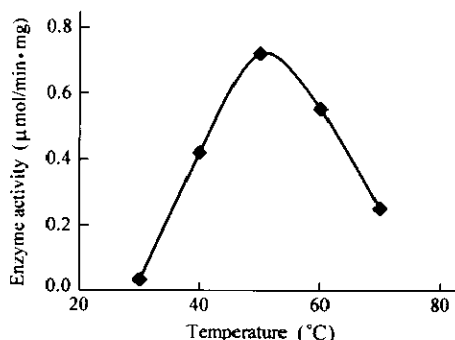


Fig. 1 Enzyme activity as a function of temperature
pH 9.4; Ethanol:0%

图 2 则显示,在中性和酸性条件下, β -甘露糖酶对这一反应没有催化活力。而在碱性条件下,特别是 pH 9.4 附近, β -甘露糖酶表现出较高的催化活力。同时,考察了 pH 为 11.0 时酶的活力。这一实验表明,在 pH 为 11.0 的介质中,KGM 水溶胶在受热条件下不稳定,形成不可逆凝胶,故无法测出此条件下相应的酶的活力。

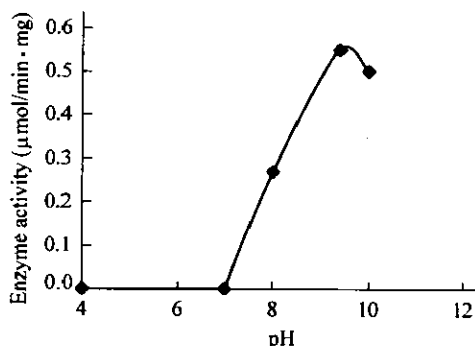


Fig. 2 Enzyme activity as a function of pH of the medium
Reaction temperature: 60℃; Ethanol:0%

图 3 反映了当反应体系中乙醇含量低于 5% 时,乙醇的存在对酶活力的影响不是很明显。随着乙醇含量的增加,酶的活力下降很快。当乙醇含量达到 10% 时,酶的活力几乎下降了一半;当乙醇含量达到 20% 时,酶基本上失去了活力。因此,在

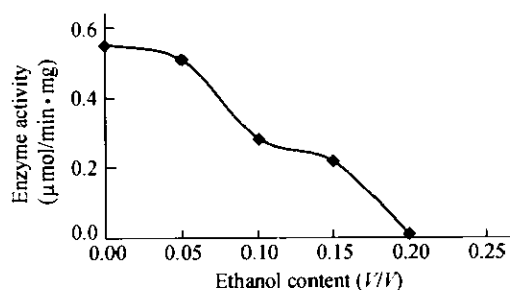


Fig. 3 Enzyme activity as a function of ethanol content in the medium

Reaction temperature: 60°C; pH 9.4

酶催化 KGM 降解反应中,当达到预定反应时间后,向体系中加入 20% (V/V) 以上的乙醇可确保酶催化反应及时中止。

3.2 β -甘露糖酶催化 KGM 降解产物分子量的表征

图 4 显示了酶用量为 8 mg 的条件下,不同底物(KGM)浓度下的酶催化 KGM 降解反应过程中,降解产物的特性粘数 $[\eta]$ 随降解反应时间的变化。可以看出,随着降解反应的进行, $[\eta]$ 快速下降;初始底物浓度越低,则 $[\eta]$ 下降的速度越快;随着反应时间的延长,这种下降的趋势减缓。特性粘数的变化趋势反映了分子量的变化趋势,即 KGM 的分子量在降解反应开始后的 10 min 快速下降,随后趋于平缓。分子量降低速率变慢可以从 β -甘露糖酶的性质以及它对聚多糖的作用机理上来进行分析。

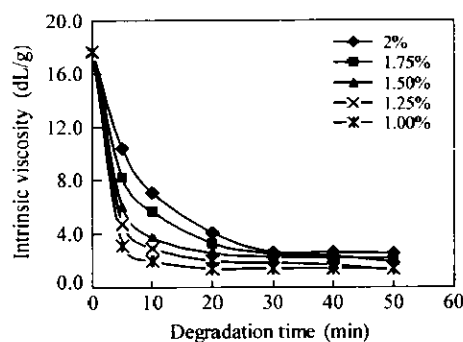


Fig. 4 The curves of intrinsic viscosity versus degradation time for the KGM samples enzymatically degraded KGM at various substrate concentrations

β -Mannanase: 8.0 mg; Reaction temperature: 30°C

葡甘聚糖是一种杂多糖,它由葡萄糖单元(G)和甘露糖单元(M)以 1:1.6 或 1:1.69 的比例随机连接构成。虽然连接各糖单元的均是 β -1,4

糖苷键,但依然存在着种类上的不同,即连接不同糖单元的 β -1,4 糖苷键属于不同的类型。例如葡甘聚糖就有 4 种 β -1,4 糖苷键:甘露糖苷键(M $\rightarrow$ M)、葡萄糖苷键(G $\rightarrow$ G)、甘露糖-葡萄糖糖苷键(M $\rightarrow$ G)和葡萄糖-甘露糖糖苷键(G $\rightarrow$ M)。日本学者甲藤等^[15]做过通过 β -1,4 糖苷键连接的二糖类的酸降解研究。研究结果表明,不同种类的 β -1,4 糖苷键的“强度”不同。在反应开始后,弱的 β -1,4 糖苷键如 M $\rightarrow$ G 和 M $\rightarrow$ M 被迅速切断,强的 β -1,4 糖苷键如 G $\rightarrow$ M 和 G $\rightarrow$ G 则保留下来,因而降解反应的速率随反应时间的延长而降低。由此可以推测,酶催化降解过程中同样存在这一现象,即虽然 β -甘露糖酶能够使 β -1,4 糖苷键断裂,但使不同种类的 β -1,4 糖苷键断裂的难易程度不同。在反应初期,大量存在的较弱的 β -1,4 糖苷键迅速被 β -甘露糖酶切断,降解反应迅速发生;随着降解反应的进行,较易断裂的部位减少,故分子量的降低趋于平缓。

用 GPC 测定了未降解 KGM 样品以及一组酶催化降解的 KGM 样品的分子量。用 $\lg M_w$ 对 $\lg [\eta]$ 作图,结果如图 5 所示。

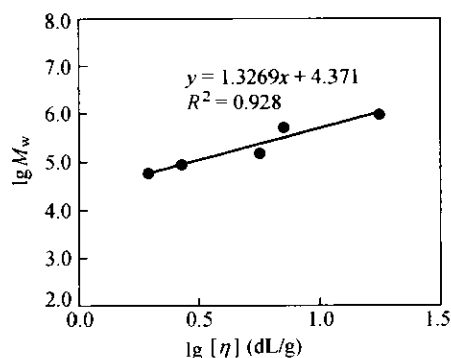


Fig. 5 The plot of $\lg M_w$ versus $\lg [\eta]$ for the aqueous solution of KGM samples prepared by enzyme-catalyzed degradation

对图 5 中的 $\lg M_w$ - $\lg [\eta]$ 关系进行线性回归分析,可以得到 $\lg M_w$ 与 $\lg [\eta]$ 之间存在着的数学关系:

$$\lg M_w = 1.327 \times \lg [\eta] + 4.371 \quad (1)$$

经数学变换可得到:

$$[\eta] = 5.06 \times 10^{-4} M_w^{0.754} \quad (2)$$

Kishida 等^[16]曾给出部分甲基化的 KGM ($DS = 0.45$) 的特性粘数和分子量之间的关系,即

$$[\eta] = 6.37 \times 10^{-4} M_w^{0.74} \quad (3)$$

Kishida 等人之所以选用甲基化 KGM 而不是未甲基化改性的 KGM,是因为他们发现未甲基化改性的 KGM 溶解性和溶液的稳定性都不够好,给特性粘数的测定带来困难.经过甲基化后,产物的溶解性和溶液的稳定性都得到了很大的改善,使这一问题得到了解决.在本研究中,曾尝试将试样配制成 0.2 g/dL 的溶液来进行特性粘数的测定,结果也发现溶液的稳定性不够好,流出时间的重现性比较差.然而,当将 KGM 溶液的浓度降至 0.05 g/dL 后,流出时间就能表现出良好的重现性,溶液的稳定性问题不再对特性粘数的测定造成影响.比较式(2)和(3),可以看出,二者的 α 值比较接近,而本研究中所测得的 k 值要小于 Kishida 等所得到的 M_w - $[\eta]$ 关系式中的 k 值,这应该与 Kishida 等对 KGM 进行了甲基化改性有关.KGM 特性粘数与分子量之间数学关系的确定,使 KGM 分子量的确定更加便捷,使其可控降解成为可能,为扩展 KGM 的应用范围提供了实验基础.

另外研究了酶的用量对 KGM 降解反应的影响.图 6 给出了底物(KGM)浓度为 2%,反应温度为 30℃,介质 pH 为 9.0,降解时间为 20 min 条件下,降解产物的特性粘数随酶用量的变化规律.由图 6 可以看出,酶的浓度越高,相同条件下降解产物的特性粘数就越低.当酶浓度达到 48 mg/dL 时,这种下降的趋势明显地变缓.

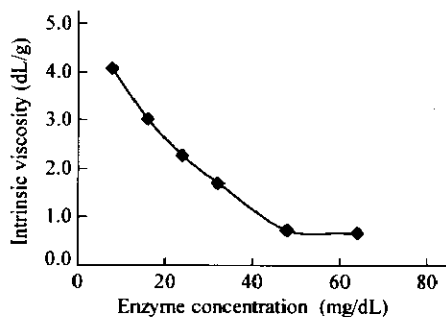


Fig. 6 The plot of intrinsic viscosity versus enzyme concentration for the KGM samples prepared by the enzymatic degradation reaction at various enzyme concentrations

Substrate concentration: 2%; Reaction time: 20 min;
Reaction temp.: 30℃; pH 9.0

通过对 β -甘露糖酶催化魔芋葡甘聚糖可控降解反应的研究,可以得出以下结论: β -甘露糖酶在 50℃左右, pH 9.4 附近,乙醇含量低于 5 % 的水介质中具有较高的活力;而在 pH 7.0 以下,或温度低于 30℃,或加入 20% 乙醇的条件下均基本上失活;在降解反应初期, KGM 的特性粘数快速下降,随后趋于平缓;酶的浓度越高,相同条件下降解产物的特性粘数就越低,当酶浓度达到 48 mg/dL 时,下降趋势明显变缓; KGM 的特性粘数与其重均分子量之间的关系为: $[\eta] = 5.06 \times 10^{-4} M_w^{0.754}$.

REFERENCES

- 1 Mo Xiangtao(莫湘涛), Zhang Meifen(张梅芬), Li Minyan(李敏艳). Journal of Hunan Normal University (Natural Science) (湖南师范大学自然科学学报), 1998, 21 (1): 85 ~ 88
- 2 Vipul Davé, Stephen P McCarthy. J Environ Polym Degrad, 1997, 5 (4): 237 ~ 241
- 3 Zou Xinxi(邹新禧), Xie Meiran(谢美然). Modern Chemical Industry (现代化工), 1995, 15 (12): 15 ~ 17
- 4 Wang Guiyun(王桂芸). Fine and Special Chemicals (精细与专用化学品), 1998, 21: 9 ~ 10
- 5 Jia Chengyu(贾成禹), Chen Suwen(陈素文), Mo Weiping(莫卫平), Mo Yiwen(蒙义文), Yang Lei(杨磊). Chinese Biochemical Journal (生物化学杂志), 1988, 4(5): 407 ~ 413
- 6 Hu Min(胡敏), Hu Weiwang(胡慰望), Xie Bijun(谢笔钧). J of Wuhan University (Natural Science Edition) (武汉大学学报(自然科学版)), 1994, 3: 101 ~ 109
- 7 Tian Binshou, Dong Changming, Chen Lei. J Appl Polym Sci, 1998, 67 (6): 1035 ~ 1038
- 8 Tian Bingshou(田炳寿), Dong Changming(董常明), Luo Dingfa(骆定法). Acta Polymerica Sinica (高分子学报), 1999, (3): 326 ~ 330
- 9 He Dongbao(何东保), Zhan Dongfeng(詹东风), Zhang Wenju(张文举). Acta Polymerica Sinica (高分子学报), 1999, (4): 460 ~ 464
- 10 Yang Guang, Zhang Lina, Yamane Chihiro, Miyamoto Ikuya, Inamoto Miki, Okajima Kunihiko. Journal of Membranes Science, 1998, 139: 47 ~ 56
- 11 Xiao Chaobo, Gao Shanjun, Wang Heng, Zhang Lina. J Appl Polym Sci, 2000, 76: 509 ~ 515
- 12 Xiao Chaobo, Gao Shanjun, Zhang Lina. J Appl Polym Sci, 2000, 77: 617 ~ 626
- 13 Ma Yanhe(马延和), Tian Xinyu(田新玉), Zhou Peijin(周培瑾). Acta Microbiological Sinica (微生物学报), 1991, 31 (6): 443 ~ 448

- 14 Zhang Longxiang (张龙翔), Zhang Tingfang (张庭芳), Li Lingyuan (李令媛). *Technique and Methods of Biochemistry Experiments (生化实验技术和方法)*. Beijing (北京): People's Education Press (人民教育出版社), 1981. 6 ~ 11
- 15 Kato K, Matsuda K. *Agr Biol Chem*, 1972, 36: 639 ~ 642
- 16 Noriko Kishida, Statoshi Okimasu, Toshio Kamata. *Agric Biol Chem*, 1978, 42 (9): 1645 ~ 1650

ENZYME-CATALYZED CONTROLLABLE DEGRADATION OF KONJAC GLUCOMANNAN

QI Li¹, LI Guangji¹, ZONG Minhua²

(¹ Department of Polymer Science and Engineering; ² Biotechnology Department, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract Konjac glucomannan (KGM) is a natural polymer from a plant. It possesses excellent biodegradability, biocompatibility and many unique physiological and pharmacological functions. In this work the effects of various factors (*i. e.*, temperatures, pH, medium) on the activity of β -mannanase was firstly studied. The results show that β -mannanase possesses high activity in the aqueous medium (pH 9.4) containing ethanol less than 5% (V/V) at about 50°C, and basically lose its activity in the medium with pH lower than 7.0 or containing ethanol more than 20% (V/V), or at temperatures lower than 30°C. Based on these results, the degradation reaction of KGM catalyzed by β -mannanase and its affecting factors were investigated, and a series of KGM samples with different molecular weights was prepared by adjusting the reaction conditions. Moreover, the intrinsic viscosity ($[\eta]$) and the weight-average molecular weight (M_w) of the degraded KGM products were measured, obtaining the following equation: $[\eta] = 5.06 \times 10^{-4} M_w^{0.754}$. This work makes it possible to realize controllable degradation of KGM by means of an enzyme-catalyzed reaction, thus laying a solid experimental and theoretical foundation for further studying the structure and properties of KGM and its derivatives, and developing new application fields of them.

Key words Konjac glucomannan, β -mannanase, Controllable degradation, Enzyme-catalyze