

β -甘露聚糖酶酶解植物胶及其产物对双歧杆菌的促生长作用

杨文博 佟树敏 沈庆 陈允

(南开大学微生物学系, 天津 300071)

陈锦英

(天津医科大学基础医学部, 天津 300070)

摘要 由地衣芽孢杆菌 NK-27 获得的 β -甘露聚糖酶在 40℃、酶液终浓度 1u/ml 时, 经 12h 水解魔芋粉、角豆胶、瓜儿豆胶和田菁胶所生成的酶解产物, 经薄层层析检测表明为单糖和低聚糖。在 PYG 和 GAM 液体培养基中, 添加不同量的四种植物胶酶解产物对青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*) 具有明显的促生长作用, 菌体增殖数从 10^7 提高到 10^8 个/ml。

关键词 β -甘露聚糖酶, 植物胶酶解, 双歧因子

β -甘露聚糖酶 [β -1,4-D-mannan mannohydrolase; EC 3.2.1.78] 是水解葡萄糖甘露聚糖、半乳甘露聚糖 (1 $\rightarrow$ 4) β -D 甘露吡喃糖的酶。魔芋粉、角豆胶、瓜儿豆胶和田菁胶等可食性植物胶其主要成分为葡萄糖甘露聚糖或半乳甘露聚糖。文献报道^[1-4]这些植物胶经 β -甘露聚糖酶水解后的产物中含有由不同单糖分子 (2—10 个单糖单位) 组成的低聚糖。而低聚糖则是对人体肠道内的有益细菌——双歧杆菌有效的促生长因子。因此, 研究 β -甘露聚糖酶对植物胶的酶解作用及其产物对双歧杆菌的促生长作用, 对于扩大植物胶在食品工业中的应用范围及人体保健作用具有很大的实用价值。本文报道由地衣芽孢杆菌 NK27 菌株产生的 β -甘露聚糖酶酶解植物胶及其产物对青春双歧杆菌的促生长作用。

1 材料和方法

1.1 菌种

1.1.1 产酶菌株及酶液: 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) NK27 (由本室保藏)。在含有魔芋粉、豆饼粉和无机盐的培养基中发酵 48h 后经 DEAE-纤维素和 Sephadex G-100 纯化后获得, 用 0.01mol/L tris-HCl (pH 8.9) 适当稀释成酶液。

1.1.2 测试菌株: 青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*) 由天津医科大学基础医学部提供。

1.2 培养基

PYG 和 GAM 培养基^[5], 用于双歧杆菌的培养。

1.3 试剂和实验材料

蛋白胨、琼脂粉 (日本进口分装), 胰酶 (英国 OXOID 公司), 酵母粉 (华美公司), 魔芋粉 (成都魔芋精粉厂), 其它试剂均为国产分析纯, 薄层层析用硅胶板 (50 × 100mm) (青岛海洋化工厂分厂出品)。

1.4 检测

1.4.1 植物胶的酸水解和总糖测定^[6]: DNS 法。

1.4.2 植物胶的酶解和还原糖测定: 用蒸馏水 (pH 6.5 左右) 配制浓度为 1% (W/V) 的植物胶溶液, 加纯化的 β -甘露聚糖酶酶液, 终浓度为 1u/ml, 在 40℃ 水浴中酶解, 于 3、6、9、12、24h 取样, 经适当稀释后用 DNS 法测定酶解液中以甘露糖计的还原糖量 (mg/ml) 按公式:

本文系南开大学科学发展基金项目
1994-09-30 收稿

$$\text{水解率}(\%) = \frac{\text{酶解液还原糖量}(\text{mg/ml})}{\text{植物胶总糖量}(\text{mg/ml})} \times 100$$

计算植物胶的酶解水解率。

1.4.3 植物胶粘度测定^[6]: 用蒸馏水配制浓度为 1% (W/V) 的植物胶溶液, 室温溶胀 1h 后搅拌均匀, 于 40℃ 用 NDJ-I 型旋转粘度计测酶解前和不同酶解时间后植物胶的表现粘度。

1.4.4 植物胶酸水解液和酶水解液产物的定性检测^[7]: 植物胶酸水解液经 NaOH 中和至 pH 6.5 并浓缩 5 倍; 酶水解液经浓缩 20 倍后分别在硅胶薄板上进行点样, 于正丁醇: 吡啶: 水 = 6:4:3 中层析 3h, 风干后, 用苯胺-二苯胺-磷酸显色 (50℃, 1h)。

1.5 植物胶酶解液对青春双歧杆菌的增殖作用

将酶解 12 h 的植物胶水解液过滤去除残渣后, 用 DNS 法检测水解液中的还原糖量并适当浓缩 20—30 倍, 按终浓度(%): 0.1、0.3、0.5、0.7、1 的量加入到 PYG 和 GAM 液体培养基中, 以 7% 的接种量接入青春双歧杆菌的菌悬液 (菌液浓度为 1×10^5 个/ml), 在充有流通并恒定的氮气和氢气的 1029 S/N 型厌氧培养箱中, 34℃ 培养 24h, 培养液稀释 5 倍用血球计数板测定菌体数目。

2 结果

2.1 植物胶的总糖含量

经酸水解后测得四种植物胶的总糖含量 (%) 分别为: 魔芋粉 58.6, 角豆胶 50.5, 瓜儿豆胶 59.36, 田菁胶 44.5。

2.2 植物胶的酶解

在浓度为 1% (W/V) 的四种植物胶溶液中, 加入 1u/ml β -甘露聚糖酶酶液, 于 40℃ 水浴进行不同时间的酶解。从表 1 的结果可以看出, 魔芋粉和角豆胶经 3h 酶解, 水解率可达 57%, 随酶解时间延长, 水解率略有增加。但 12h 后即使延长酶解时间, 水解率也不见明显增加。说明 β -甘露聚糖酶已将魔芋粉和角豆胶中大分子的葡萄甘露聚糖 (分子量 120 万)、半乳甘露聚糖 (分子量 22 万)^[4] 主链的 β -1,4 糖苷

表 1 不同酶解时间植物胶的水解率

水解率 (%) \ 酶解时间 (h)					
	3	6	9	12	24
植物胶					
魔芋粉	57.0	63.3	64.9	65.2	65.5
角豆胶	56.9	65.0	68.0	69.5	69.5
瓜儿豆胶	5.6	6.9	7.8	8.8	9.0
田菁粉	3.8	7.7	10.0	13.3	13.7

键已基本水解。随酶解时间的延长, 瓜儿豆胶和田菁胶的水解率也呈上升趋势, 但与魔芋粉和角豆胶相比, 水解率很低, 最高达 13.7%, 这可能与不同植物胶中甘露糖主链与葡萄糖或半乳糖支链中糖的分子比例不同有关。魔芋粉中每间隔 60 个甘露糖分布 1 个 α -1,6 糖苷键的葡萄糖支链, 而瓜胶中每间隔 1 个甘露糖分布 1 个 α -1,6 糖苷键的半乳糖支链^[4], 因此, 以甘露糖计的还原糖含量偏低。

2.3 植物胶酶解后的粘度变化

由于四种植物胶均为水溶性大分子胶, 在水中溶胀后, 粘度很高, 含量为 1% 的四种植物胶在 40℃ 时用 NDJ-I 型旋转粘度计检测其表现粘度均在 5.7 Pa·s 以上。经 3h β -甘露聚糖酶水解后, 以魔芋粉为例其表现粘度已下降为 0.063 Pa·s, 粘度下降率达 99.989%。随酶解时间的延长, 粘度继续下降, 至 12h, 粘度已降为 0.0025 Pa·s, 下降率达 99.995%。在实验中观察到加入酶液 30min 后, 粘度已见明显下降, 根据这一现象分析, NK27 菌株产生的 β -甘露聚糖酶应为液化型的内切酶, 从大分子聚糖的甘露糖主链内部随机水解 β -1,4 糖苷键, 致使水溶性胶的粘度迅速下降, 生成甘露糖和不同分子数目的低聚糖。

2.4 植物胶酸水解液和酶水解液的薄层层析

为了定性检测四种植物胶的单糖组分和 β -甘露聚糖酶酶解植物胶的产物, 进行了薄层层析, 结果如图 1 和图 2 所示。从层析图谱可以看出, 经酸水解后, 魔芋粉系由葡萄糖和甘露糖组成, 为葡萄甘露聚糖; 角豆胶、瓜儿豆胶、田菁胶系由半乳糖和甘露糖组成, 为半乳甘露聚糖。四种植物经 β -甘露聚糖酶水解后在产物中均

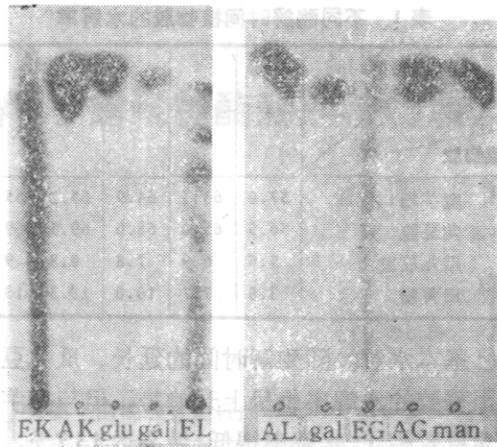


图 1 β -甘露聚糖酶酶解和酸解魔芋粉、角豆胶和瓜儿豆胶产物的薄层层析图谱

EK: 酶解魔芋粉, AK: 酸解魔芋粉, glu: 葡萄糖, EL: 酶解角豆胶, AL: 酸解角豆胶, gal: 半乳糖, EG: 酶解瓜儿豆胶, AG: 酸解瓜儿豆胶, man: 甘露糖



图 2 β -甘露聚糖酶酶解和酸解田菁胶产物的薄层层析图谱

ES: 酶解田菁胶, AS: 酸解田菁胶, gal: 半乳糖, man 甘露糖

含有低聚糖和单糖。

2.5 酶解产物对青春双歧杆菌的促生长作用

双歧杆菌是人体肠道中的有益细菌,对维护人体健康有一定作用。双歧杆菌的营养要求苛刻,培养基需要多种物质,行厌氧呼吸,许多低聚糖对双歧杆菌的生长有促进作用,称为双歧因子^[2]。本实验在用于培养双歧杆菌的 PYG 和 GAM 液体培养基中,添加四种植物胶的酶解产物以考查低聚糖对双歧杆菌生长的影响。

从表 2 的结果可以看出,四种植物胶经 β -

表 2 植物胶酶解液对双歧杆菌的增殖效果

培养基	PYG		GAM	
	浓度(%)	菌数 ($\times 10^8$ 个/ml)	浓度(%)	菌数 ($\times 10^8$ 个/ml)
魔芋粉	0.1	0.61	0.1	0.29
	0.3	1.24	0.3	0.82
	0.5	1.74	0.5	1.00
	0.7	2.77	0.7	1.36
	1.0	3.08	1.0	1.51
角豆胶	0.1	0.64	0.1	0.28
	0.3	1.07	0.3	0.80
	0.5	1.90	0.5	1.42
	0.7	2.46	0.7	1.63
	1.0	2.66	1.0	2.27
瓜儿豆胶	0.1	0.78	0.1	0.24
	0.3	1.00	0.3	0.79
	0.5	1.29	0.5	1.16
	0.7	1.57	0.7	1.54
	1.0	2.46	1.0	1.87
田菁胶	0.1	0.60	0.1	0.23
	0.3	0.64	0.3	0.27
	0.5	0.99	0.5	0.70
	0.7	1.30	0.7	0.90
	1.0	1.83	1.0	1.11
对 照	0	0.53	0	0.19

甘露聚糖酶酶解后的低聚糖对青春双歧杆菌的生长均有较明显的促进作用。以角豆胶为例,添加 1% 酶解产物与不加低聚糖的对照相比,菌液浓度可以提高一个数量级。在 PYG 培养基中,魔芋粉、角豆胶和瓜儿豆胶低聚糖的效果均好于田菁胶;在 GAM 培养基中以角豆胶和瓜儿豆胶的效果明显,而魔芋粉和田菁胶的低聚糖的作用相当。同时,表 2 的结果还表明,随着培养基中低聚糖含量的增加,对青春双歧杆菌的促生长作用呈上升趋势。

3 讨论

地衣芽孢杆菌 NK27 菌株产生的 β -甘露聚糖酶对魔芋粉、角豆胶、瓜儿豆胶和田菁胶中甘露糖主链的 β -1,4 糖苷键具有较强的水解作用,水解产物中不同分子大小的低聚糖对青春双歧杆菌具有明显的促生长作用,可以应用于食用植物胶的酶解以制取低聚糖作为双歧因子。

本实验中植物胶的水溶液均以 pH 6.5 左右的蒸馏水配制, 酶解温度为 40℃, 这对于今后应用该酶制取低聚糖的生产工艺有利, 不但可以降低酶解时的能源消耗, 同时还可避免水解液因过酸或过碱而带来的脱盐工序。

低聚糖对双歧杆菌的促生长作用, 通过本实验已得到证实, 但对动物体和人体内双歧杆菌的增殖效果尚有待进一步实验研究。

致谢 南开大学生命科学学院王树荣、张兆惠协助拍摄照片。

参 考 文 献

- [1] 黄秀梨. 应用微生物, 1987, (3): 24—27.
- [2] 马延和, 周培瑾. 食品与发酵工业, 1992, (1): 80—82.
- [3] 金世琳. 食品与发酵工业, 1988, (5): 62—69.
- [4] 蔡妙英, 张 渊. 中华流行病学杂志, 1988, 9(特刊 2 号): 164—165, 410—413.
- [5] 北京大学生物系. 生物化学实验指导. 北京: 高教出版社, 1979, 22—24.
- [6] 华侨大学化工系, 天津商学院食品工程系, 南开大学化学系, 等编译. 食品胶和工业胶手册. 福州: 福建人民出版社, 1987, 126—127.
- [7] 林卓坤主编. 色谱法. 北京: 科学出版社, 1987, 134—154.

β -MANNANASE FROM NK27 STRAIN DEGRADATE PLANT GUM AND PRODUCTS PROMOTE GROWTH OF BIFIDOBACTERIUM

Yang Wenbo Tong Shumin Shen Qing Chen Yun

(Department Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)

Chen Jinying

(Department Fundamental Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070)

Abstract The β -mannanase-producing from *Bacillus lichniiformis* hydrolysis Konjac powder, Locust bean gum, Guar gum and *Sesbania cannabina* gum (under the condition: 40℃, ultimate concentration of enzyme lu/ml, hydrolysis time 12 hours) produced mono-di, tri and tetra-saccharides determined by thin-layer chromatogram.

Add various weight enzyme hydrolysis-products of tetra-plant gum in the PYG and GAM liquid medium can dramatically increase the growth of *Bifidobacterium adolescentis* and the reproductive number of bacteria cell increases from 10^7 to 10^8 cell/ml.

Key words β -mannanase, enzyme hydrolysis of plant gum, bifidofacter