

# 酶法制备葛根纤维低聚糖

刘胜男, 宛晓春, 杜先锋\*

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽 合肥 230036)

**摘 要:** 以葛根膳食纤维为原料, 采用酶法制备功能性纤维低聚糖, 并采用高效阴离子交换色谱法测定所制备样品的糖分组成。研究酶制剂、酶解时间和酶用量对纤维低聚糖组分及含量的影响。结果表明: 选择  $\beta$ -葡聚糖酶制备纤维低聚糖优于纤维素酶, 酶解产物主要成分为葡萄糖、纤维二糖和纤维三糖。 $\beta$ -葡聚糖酶法制备纤维低聚糖, 酶解时间 2h、酶用量 3U/g 时所得酶解产物中纤维二糖和纤维三糖所占比例均较高, 纤维低聚糖得率为 11.8g/100g。

**关键词:** 葛根膳食纤维; 纤维低聚糖;  $\beta$ -葡聚糖酶

## Enzymatic Preparation of Cello-oligosaccharides from *Radix Puerariae* Fiber

LIU Sheng-nan, WAN Xiao-chun, DU Xian-feng\*

(College of Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** An enzymatic method for the preparation of cello-oligosaccharides from *Radix Puerariae* fiber was developed, and HPLC was employed to determine the sugar composition of cello-oligosaccharide extracts. The effects of enzyme type and dose as well as hydrolysis time on cello-oligosaccharide composition and contents were explored. The results showed that  $\beta$ -glucanase was more suitable for the preparation of cello-oligosaccharides than cellulase. Hydrolysates consisting of mainly glucose, cellobiose and cellotriose were obtained using  $\beta$ -glucanase. The hydrolysate obtained after 2 h of hydrolysis with 3 U/g  $\beta$ -glucanase contained a high proportion of cellobiose and cellotriose and the yield of cello-oligosaccharides was 11.8 g/100 g under these conditions.

**Key words:** *Radix Puerariae* fiber; cello-oligosaccharides;  $\beta$ -glucanase

中图分类号: TS241

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0066-05

葛根为卫生部颁布的“药食兼用”植物之一, 在我国分布广泛, 其所含的膳食纤维是很好的天然膳食纤维来源。目前, 我国葛根大部分用来制作淀粉<sup>[1]</sup>, 少量用来加工饮料、酸奶等产品<sup>[2]</sup>, 剩余的葛渣少数用来造纸和作为饲料, 相当一部分被废弃, 未能充分利用。葛渣中含有约 50% 以上的纤维素, 纤维素经过生物降解得到的纤维低聚糖是高附加值的功能性生理活性物质。

纤维低聚糖又称纤维寡糖(cello-oligosaccharide), 通常是指由 2~10 个葡萄糖依靠  $\beta$ -1,4 糖苷键相连而成的线性低聚糖, 属于功能性低聚糖范畴, 不被人 and 动物肠道吸收并促进双歧杆菌增殖, 可作为功能性食品或食品添加剂<sup>[3-5]</sup>。纤维低聚糖带有一定的甜味, 一般甜度相当于蔗糖的 30%~40%, 可以作为食品的调味料, 尤其适合作为糖尿病患者的甜味剂(如纤维二糖)。另外, 纤维低聚糖因其结构刚性, 分子质量小, 稳定性好<sup>[6]</sup>等特性, 还可以应用于制药工业和化妆品工业, 其前景

非常广阔<sup>[7-8]</sup>。纤维低聚糖作为一种功能性低聚糖, 然而目前有关其生产和应用的报道较少。

本实验以葛根膳食纤维为原料, 采用酶法制备纤维低聚糖, 并使用高效阴离子色谱对纤维低聚糖组分进行定性定量分析, 为纤维低聚糖的定向制备提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

葛渣(安徽省霍山县); 纤维素酶 湖南尤特尔生化有限公司;  $\beta$ -葡聚糖酶 宁夏夏盛实业有限公司; 葡萄糖、纤维二糖、纤维三糖标准品 加拿大 Toronto Research Chemicals 公司; 氢氧化钠与乙酸钠为优级纯; 其他药品及试剂均为市售分析纯。

### 1.2 仪器与设备

ICS3000 高效阴离子色谱、脉冲安培检测器、CarboPac PA1002-mm 分析柱和保护柱 美国戴安公司;

收稿日期: 2011-01-14

作者简介: 刘胜男(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品卫生学。E-mail: amylsn\_2008@126.com

\* 通信作者: 杜先锋(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品加工。E-mail: dxf@ahau.edu.cn

HMB701 超微粉碎机 北京鑫环亚科技有限公司; UV-2102C 型紫外-可见分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司; JR-2 集热式磁力加热搅拌器 天津市欧诺仪器仪表有限公司; PHB-10 型酸度计 上海虹益仪器仪表有限公司; MA110 型电子天平 上海良平仪器仪表有限公司; SHB-III 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 原料预处理

将葛渣洗涤数次, 除去杂质, 80℃烘干后超微粉碎过 200 目筛备用。采用硝酸-乙醇法<sup>[9]</sup>分析检测纤维素含量为 41.71%。

#### 1.3.2 纤维低聚糖的制备

##### 1.3.2.1 工艺流程

超微粉碎后的葛根膳食纤维加入 pH5.0 柠檬酸缓冲溶液配成底物质量分数 4% 的悬浊液→添加适量的酶→50℃磁力加热搅拌器中酶解一定时间→立即 100℃灭酶 10min →抽滤, 滤液即为纤维低聚糖溶液。

##### 1.3.2.2 酶制剂的选择

纤维素是由葡萄糖分子通过  $\beta$ -1,4-糖苷键连接而形成的葡聚糖, 纤维素酶和  $\beta$ -葡聚糖酶均可水解  $\beta$ -1,4-糖苷键, 因此分别考察这两种酶制备功能性纤维低聚糖的糖分组成, 从而选择适合生产纤维低聚糖的酶。

在底物质量分数 4%、pH5.0、反应温度 50℃条件下, 分别加入纤维素酶和  $\beta$ -葡聚糖酶各 3U/g, 水解 2h, 采用配有脉冲电流检测器的高效阴离子色谱(high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detector, HPAEC-PAD)测定纤维低聚糖溶液的糖分组成, 以标准品为对照, 选择适合生产纤维低聚糖的酶。

##### 1.3.2.3 酶解时间对纤维低聚糖组分含量的影响

使用所选的合适生产纤维低聚糖的酶, 在底物质量分数 4%、加酶量 5U/g、pH5.0、反应温度 50℃条件下分别酶解 1、2、3、4、5、6h, 采用 HPAEC-PAD 方法测定纤维低聚糖溶液的糖分组成, 观察酶解过程中各糖的质量浓度及比例随时间变化, 确定合适的酶解时间。

##### 1.3.2.4 加酶量对纤维低聚糖组分含量的影响

使用所选的合适生产纤维低聚糖的酶, 在加酶量分别为 1、3、5、7、9U/g, 底物质量分数 4%、pH 5.0、反应温度 50℃的条件下酶解 2h, 采用 HPAEC-PAD 方法测定纤维低聚糖溶液的糖分组成, 观察加酶量对各糖的质量浓度及比例的影响, 确定合适的加酶量。

### 1.3.3 纤维素酶酶活力的测定

以 1% 羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)溶液为底物, 采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic

acid, DNS)法测定。

酶活力单位定义: 1g 酶粉(1mL 酶液)于 50℃、pH4.8 条件下, 每分钟水解 1% CMC 溶液产生 1 $\mu$ mol 还原糖(以葡萄糖计)所需的酶量定义为一个 CMC 酶活力单位<sup>[10]</sup>。

#### 1.3.4 $\beta$ -葡聚糖酶酶活力的测定

以 1% 羧甲基纤维素溶液为底物, 采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定。

酶活力单位定义: 1g 酶粉(1mL 酶液)于 50℃、pH4.8 条件下, 每分钟水解产生 1 $\mu$ mol 葡萄糖所需的酶量定义为一个  $\beta$ -葡聚糖酶酶活力单位<sup>[11]</sup>。

#### 1.3.5 纤维低聚糖组分的检测

采用 HPAEC-PAD 方法测定所制备的纤维低聚糖的糖分组成, 以葡萄糖、纤维二糖、纤维三糖标准品为对照, 进行分析检测, 采用外标法测定试样中纤维低聚糖的质量浓度。葡萄糖标准曲线的回归方程:  $Y=144.38x+0.7861$ ,  $R^2=0.9998$ , 线性范围 0.05~0.3 $\mu$ g/mL; 纤维二糖标准曲线的回归方程:  $Y=61.921x+0.4871$ ,  $R^2=0.9996$ , 线性范围 0.05~0.3 $\mu$ g/mL; 纤维三糖标准曲线的回归方程:  $Y=53.639x+0.5519$ ,  $R^2=0.9996$ , 线性范围 0.05~0.3 $\mu$ g/mL。

##### 1.3.5.1 色谱条件

色谱柱: CarboPac PA-100 分析柱(2mm $\times$ 250mm)和保护柱(2 $\times$ 50mm); 柱温: 30℃; 检测器: 脉冲安培检测器(PAD); Au 工作电极: Ag/AgCl 参比电极; 进样体积: 20 $\mu$ L; 流动相: A: 250mmol/L 氢氧化钠, B: 1mol/L 乙酸钠; 流速: 0.25ml/min; 氢氧化钠和乙酸钠梯度洗脱。洗脱条件如表 1 所示, 糖检测波形见表 2。

表 1 纤维低聚糖梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions of cello-oligosaccharide

时间/min	流速/(mL/min)	流动相/%		曲线
		A	B	
0	0.25	40	0	线性
10	0.25	40	1	线性
25	0.25	40	3.8	线性
26	0.25	40	0	线性
36	0.25	40	0	线性

表 2 纤维低聚糖检测波形

Table 2 Test waveforms of cello-oligosaccharide

时间/s	电位/V	积分	时间/s	电位/V	积分
0.00	+0.10		0.42	-2.00	
0.20	+0.10	开始	0.43	+0.60	
0.40	+0.10	结束	0.44	-0.10	
0.41	-2.00		0.50	-0.10	

### 1.3.5.2 绘制标准品图谱

称取葡萄糖、纤维二糖、纤维三糖标准品各约1mg,用10mL超纯水分别溶解,混和均匀,用0.45 μm的滤膜过滤。

### 1.3.5.3 样品检测

取制备的纤维低聚糖粗品,用去离子水稀释至0.5 μg/mL,经0.22 μm水系滤膜过滤后进样。

### 1.3.6 纤维低聚糖得率计算

$$\text{纤维低聚糖得率/\%} = \frac{\text{纤维低聚糖质量}}{\text{原料葛根膳食纤维质量} \times \text{纤维素含量百分比}} \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 酶制剂的选择

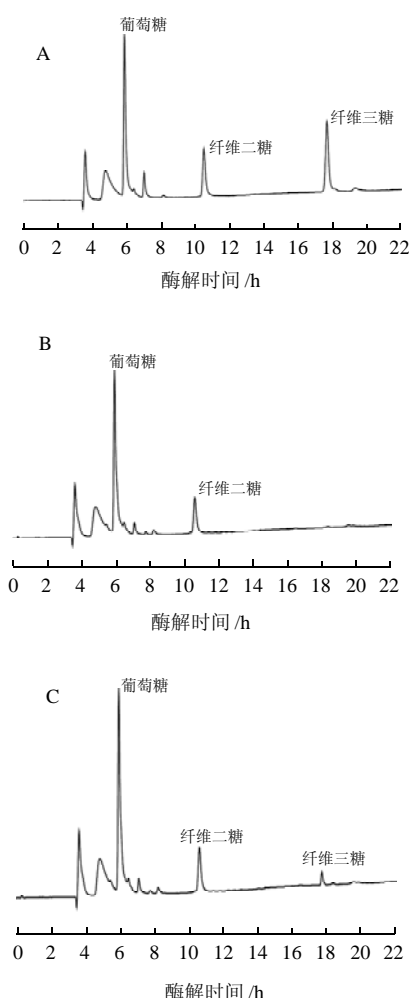


图1 纤维低聚糖标准品(A)、葛根膳食纤维纤维素酶酶解产物(B)和葛根膳食纤维 $\beta$ -葡聚糖酶酶解产物(C)的HPAEC-PAD图谱  
Fig.1 HPAEC-PAD chromatograms of standard cello-oligosaccharide and *Radix Puerariae* fiber hydrolysates prepared with cellulase and  $\beta$ -glucanase, respectively

分别使用纤维素酶和 $\beta$ -葡聚糖酶在其他酶解条件相同的情况下对葛根膳食纤维进行酶解,所得酶解产物用去离子水稀释10000倍后采用HPAEC-PAD法进行分析。图1中A为葡萄糖、纤维二糖和纤维三糖标准品的高效阴离子色谱图,B、C分别为纤维素酶和 $\beta$ -葡聚糖酶降解产物的高效阴离子色谱图。通过图谱可以看出,采用PA100糖柱,以250mmol/L氢氧化钠及1mol/L乙酸钠溶液梯度洗脱效果较好,可将低聚糖完全分离开。

通过比较图1中B、C两个图谱,可以看出使用纤维素酶水解得到的酶解产物中只有纤维二糖和葡萄糖,使用 $\beta$ -葡聚糖酶水解得到的产物主要是葡萄糖、纤维二糖和纤维三糖。由于纤维素酶是一组复杂酶系的总称,其主要包含内切葡聚糖酶(EG),外切葡聚糖酶(CBH)和 $\beta$ -葡萄糖苷酶(BG)三大类,从纤维素酶降解纤维素的机理来看,EG首先随机水解切断无定形区的纤维素分子链,使结晶纤维素暴露出更多的分子端基,CBH酶和EG酶再协同作用得到水解产物纤维二糖,由BG酶水解成葡萄糖<sup>[12-14]</sup>。因此,在这三种酶的协同作用下使得纤维素酶水解纤维素所得的产物中只以葡萄糖和纤维二糖为主,产物中未出现聚合度(degree of polymerization, DP)大于2的低聚糖。 $\beta$ -葡聚糖酶是典型的内切型葡聚糖酶,随机切断葡聚糖主链的 $\beta$ -1,4糖苷键,生成纤维低聚糖,但是产物中并没有聚合度(DP)4~7的纤维低聚糖(DP>7的纤维低聚糖不溶于水)。Nazir等<sup>[15]</sup>从*Aspergillus terreus*中分离纯化的内切葡聚糖酶降解CMC得到的产物中只含有DP2~4的纤维低聚糖,Medve等<sup>[16]</sup>利用从Novo纤维素酶中纯化得到的内切葡聚糖酶降解磷酸润胀的纤维素产物中同样没有DP>4的低聚糖。本实验使用 $\beta$ -葡聚糖酶水解得到的产物只有DP2~3的低聚糖,可能是由于所使用的 $\beta$ -葡聚糖酶为商品酶,其中还包含有部分纤维素酶其他组分酶活性,使得较高聚合度的纤维低聚糖被进一步水解。由此可得,使用 $\beta$ -葡聚糖酶生产纤维低聚糖优于纤维素酶。

### 2.2 $\beta$ -葡聚糖酶法制备纤维低聚糖

由2.1节得出结论 $\beta$ -葡聚糖酶适合生产纤维低聚糖,因此考察 $\beta$ -葡聚糖酶水解过程中酶解时间和加酶量对制备纤维低聚糖的影响。

#### 2.2.1 酶解时间对纤维低聚糖组分及其含量的影响

由图2可以看出,随着酶解时间的延长,葡萄糖、纤维二糖的质量浓度随之增加,当酶解时间达到2h后,增加较为缓慢。而纤维三糖的质量浓度则呈先增加后又降低的趋势,0~2h内纤维三糖质量浓度随着酶解时间的延长而增加,随着酶解时间的继续延长,纤维三糖质量浓度呈下降趋势,5h时从产物中基本消失。这是由于在纤维素降解初期, $\beta$ -葡聚糖酶随机切断纤维素分子长链,产生纤维二糖和纤维三糖,但随着酶解时

间的增加,  $\beta$ -葡聚糖酶继续作用于纤维三糖, 将其降解为纤维二糖和葡萄糖<sup>[17]</sup>。从糖组分比例来看, 酶解产物主要是纤维二糖, 其次是葡萄糖和少量的纤维三糖, 当酶解时间为 2h 时, 纤维二糖和纤维三糖的比例均较高, 含量分别占总糖的 50.2% 和 5.01%, 因此, 酶解时间选择 2h 为宜。

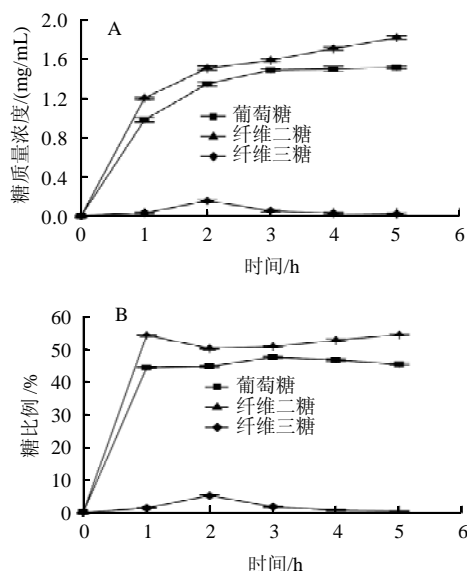


图2  $\beta$ -葡聚糖酶酶解时间对纤维低聚糖质量浓度(A)和比例(B)的影响

Fig.2 Effect of  $\beta$ -glucanase hydrolysis time on cello-oligosaccharide composition and contents

## 2.2.2 酶用量对纤维低聚糖组分及其含量的影响

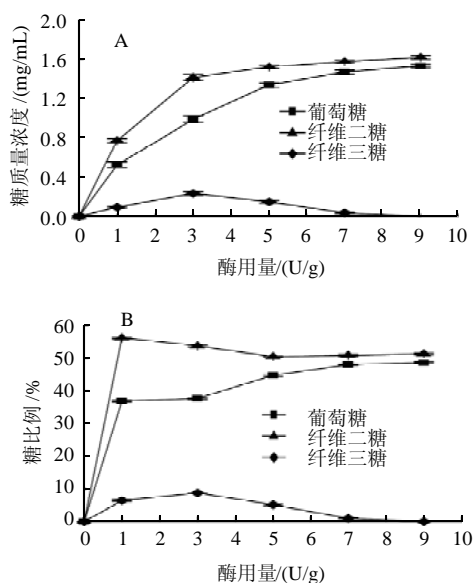


图3  $\beta$ -葡聚糖酶酶用量对纤维低聚糖质量浓度(A)和比例(B)的影响

Fig.3 Effect of  $\beta$ -glucanase dose on cello-oligosaccharide composition and contents

由图3可看出, 随着酶用量的增加, 酶解产物中各糖组分的质量浓度和比例都有较大的变化。葡萄糖和纤维二糖的质量浓度随着酶用量的增加而增加, 当酶用量达到 3U/g 后继续增加, 纤维二糖的质量浓度增加幅度减小, 葡萄糖的质量浓度在酶用量达到 5U/g 后增加幅度减小。纤维三糖的质量浓度变化则随着酶用量的增加呈先上升后下降的趋势, 当加酶量为 3U/g 时达到最大, 加酶量大于 3U/g 时, 纤维三糖的质量浓度逐渐降低, 酶用量为 9U/g 时从产物中消失, 这是由于当反应体系中酶用量继续增加时, 游离的酶参与了纤维三糖的降解。从糖组分比例来看, 酶解产物仍然主要是纤维二糖, 其次是葡萄糖和少量的纤维三糖, 当酶用量为 3U/g 时, 纤维二糖和纤维三糖的比例均较高, 含量分别占总糖的 53.6% 和 8.75%, 因此, 加酶量选择 3U/g 为宜。

## 2.2.3 纤维低聚糖得率的计算

选择  $\beta$ -葡聚糖酶, 在酶用量 3U/g、酶解时间 2h、底物质量分数 4%、pH5.0、反应温度 50℃ 条件下对葛根膳食纤维进行酶解, 所得纤维低聚糖得率按 1.3.3.4 节方法计算为 11.8g/100g。

## 3 结论

3.1 采用酶法水解葛根膳食纤维制备功能性纤维低聚糖选择  $\beta$ -葡聚糖酶优于纤维素酶, 通过 HPAEC-PAD 对酶解产物进行分析, 纤维素酶酶解产物中只有葡萄糖和纤维二糖,  $\beta$ -葡聚糖酶酶解产物中存在葡萄糖、纤维二糖和纤维三糖。

3.2 选用  $\beta$ -葡聚糖酶制备纤维低聚糖, 分别考察酶解时间和酶添加量对纤维低聚糖糖组分和含量的影响, 结果表明, 酶解时间 2h, 酶添加量 3U/g 时所得酶解产物中纤维二糖和纤维三糖所占比例均较高, 纤维低聚糖得率为 11.8g/100g。

3.3 通过酶法降解葛根膳食纤维制备高附加值纤维低聚糖具有很好的应用前景, 但实验结果表明, 酶解产物中仅存在纤维二糖和少量的纤维三糖, 并未出现 DP4~7 的纤维低聚糖。国外文献中通常采用柱层析或壳聚糖亲和沉淀法等除去  $\beta$ -葡萄糖苷酶(BG)组分, 以便纤维二糖等寡糖大量积累<sup>[18]</sup>, 或分离纯化得到内切葡聚糖酶组分, 利用分离纯化得到的单一纤维素酶组分解解膳食纤维制备纤维低聚糖。但 Nazir 等<sup>[15]</sup>和 Medve 等<sup>[16]</sup>分别利用从纤维素酶中分离纯化得到内切葡聚糖酶组分解解纤维素得到的酶解产物中同样没有 DP > 4 的纤维低聚糖。从工业化角度看, 采用分离纯化方法得到纤维素酶单一组分(内切葡聚糖酶)生产纤维低聚糖工业操作麻烦, 费用高, 难以进行大规模生产, 而利用商品酶  $\beta$ -葡聚糖酶(一种内切葡聚糖酶)得到的酶解产物中只有 DP2~3 的

纤维低聚糖。因此, 纤维低聚糖的工业开发还面临种种问题, 在酶制剂的选择和酶解产物的调控等方面有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 黄彤, 金邦荃. 葛根及葛根异黄酮的应用[J]. 中国食物与营养, 2004 (1): 23-24.
- [2] 黄靖, 罗健加. 葛根的开发利用[J]. 江西食品科技, 2002(1): 19-21.
- [3] 郑建仙. 功能性低聚糖[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 395.
- [4] CHEIKHYOUSEEF A, POGORI N, CHEN W, et al. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(3): 215-222.
- [5] CHEIKHYOUSEEF A, POGORI N, CHEN H, et al. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by Bifidobacterium infantis BCRC 14602[J]. Food Control, 2009, 20(6): 553-555.
- [6] 彭红, 林鹿, 刘玉环, 等. 纤维低聚糖的热稳定性研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(12): 110-112.
- [7] 沈雪亮. 功能性纤维低聚糖的研究现状及发展前景[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(8): 100-104.
- [8] 夏黎明, 岑沛霖. 酶法制备活性纤维寡糖的研究[J]. 浙江大学学报, 1999, 33(4): 381-385.
- [9] 朱年青. 里氏木霉纤维素酶的分离纯化及应用的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2008.
- [10] 张永凤, 卢红梅, 黄永光, 等. 酸性纤维素酶活力的测定[J]. 酿酒科技, 2007(12): 99-100.
- [11] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 690.
- [12] 余兴莲, 王丽, 徐伟民. 纤维素酶降解纤维素机理的研究进展[J]. 宁波大学学报, 2007, 20(1): 79-81.
- [13] 刘树立, 王华, 王春艳, 盛占武. 纤维素酶分子结构及作用机理的研究进展[J]. 食品科技, 2007, 32(7): 12-15.
- [14] 陈育如, 陈志芳, 刘媛. 酶法水解麦麸制取功能性低聚糖[J]. 南京师范大学学报: 工程技术版, 2003, 3(4): 21-23.
- [15] NAZIR A, SONI R, SAINI R H S, et al. Purification and characterization of an endoglucanase from *Aspergillus terreus* highly active against barley  $\beta$ -glucan and xyloglucan[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2009, 25(2): 1189-1197.
- [16] MEDVE J, KARLSSON J, LEE D. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes[J]. Biotechnology, 1998, 59(5): 632-634.
- [17] 彭红, 林鹿, 刘玉环, 等. 纤维素酶水解纤维低聚糖的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(13): 218-222.
- [18] HOMMA T, FUJII M, MORI J, et al. Production of cellobiose by enzymatic hydrolyse: removal of  $\beta$ -glucosidase from cellulase by affinity precipitation using chitosan[J]. Biotechnol Bioeng, 1993, 41(4): 405-410.