

甘露聚糖酶 *RmMan134B* 与非均相湿热技术 协同制备魔芋甘露寡糖

刘 学, 王 羽, 卢海强, 张莉娟, 王玉印, 陈 伟, 谷新晰*
(河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000)

摘要 为挖掘新型 GH134 家族来源的甘露聚糖酶, 评价其与非均相湿热技术协同制备魔芋甘露寡糖的应用潜力, 从小孢根霉 GZHF10 的基因组中成功获得 1 个新型 GH134 家族甘露聚糖酶(*RmMan134B*), 该基因编码 181 个氨基酸和 1 个终止密码子, 经分析, 与已报道的 GH134 家族活性基因的序列一致性较低(<69.6%)。采用大肠杆菌 PET 表达系统对该基因进行异源表达及性质测定, 结果表明, 该酶最适底物为魔芋甘露聚糖, 最适温度和 pH 值分别为 40 °C 和 5.0。将魔芋粉在 115 °C 和 0.1 MPa 的条件下进行非均相湿热处理, 魔芋聚糖的结构和性质发生显著改变, 其中处理 2 h 魔芋粉的溶液的表观黏度(30 g/L)降低 96.1%, 粉末粒径变小, 热稳定性提高, 改性魔芋粉的水解率提高 0.6~1 倍。进一步研究发现, *RmMan134B* 酶解产物的主要成分为单糖(0.922 mg/L)、二糖(1.4 mg/L)和三糖(0.613 mg/L)。本研究对魔芋甘露聚糖资源的高效利用和产业化发展具有一定的推动作用。

关键词 协同; β -甘露聚糖酶; GH134; 非均相湿热技术; 魔芋甘露寡糖

文章编号 1009-7848(2023)04-0181-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.018

魔芋甘露聚糖(Konjac glucomannan, KGM)是由葡萄糖和甘露糖残基聚合而成的高分子杂多糖, 具有良好的水结合和凝胶能力, 以及较好的成膜性, 具有抗糖尿病、抗肥胖、抗炎和预防癌症作用^[1-2]。然而, KGM 的高分子质量、高黏度、低溶解度等特性, 限制了其在食品领域中的应用。研究表明, 低分子质量 KGM 有良好的免疫调节^[3]、抗氧化^[4-5]和促进益生菌生长^[6-7]的作用。魔芋甘露寡糖在食品加工领域前景巨大。目前, 酶法制备因高效性、成本低廉和绿色环保等特点, 而成为制备甘露寡糖的首选方法^[8]。该技术的研究热点之一是挖掘高效的甘露聚糖酶。

β -甘露聚糖酶(β -mannanase)是一类水解甘露聚糖、半乳甘露聚糖、葡萄甘露聚糖以及半乳葡萄甘露聚糖中 β -1,4-D-吡喃甘露糖苷键的内切酶^[9]。根据氨基酸序列同源性和结构的相似性属于 4 个糖苷水解酶(Glycoside hydrolases, GH)家族, 即 GH5^[10]、GH26^[11]、GH113^[12]和 GH134^[13]家族。目前, 甘露寡糖主要由 GH5 和 GH26 家族来源的甘露聚糖酶制备。然而, 上述两者的最适底物分别是

角豆胶和瓜尔豆胶。筛选更加优良的甘露聚糖酶是该领域的主要研究内容。2015 年, Shimizu 等^[13]首次从构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中挖掘一个全新糖苷水解酶家族, 并命名为 GH134。研究发现该家族显示出甘露聚糖酶活性, 且具有与另外 3 个家族的甘露聚糖酶截然不同的催化机制。除此之外, GH5、GH26 和 GH113 家族的 β -甘露聚糖酶的最小底物是甘露二糖(M2)或甘露三糖(M3)^[14], 而 GH134 家族 β -甘露聚糖酶的最小底物是甘露戊糖(M5)或六糖(M6), 这有利于酶解过程中甘露寡糖的积累^[15]。到目前为止, 只有 4 个 GH134 家族的甘露聚糖酶被报道, 分别是来自构巢曲霉的 *AnMan134A*^[13]、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的 *AoMan134A*^[16]、链霉菌属(*Streptomyces sp*) NRRL B-24484 的 *SsGH134*^[17]和小孢根霉(*Rhizopus microsporus*)的 *RmMan134A*^[18]。挖掘新的 GH134 家族甘露聚糖酶, 不仅有利于丰富该家族酶的相关知识, 也可为其其它新型酶的获得提供借鉴。

高黏度的 KGM 会阻碍酶水解, 降低水解率, 限制酶法工艺的应用。研究表明, 高压和热处理可提高多糖溶解度, 降低多糖溶液黏度, 提高其生物活性。如 Apostolidis 等^[19]通过高压均质设备对淀粉进行改性, 淀粉的平均粒径由 7.5 μm 降至 0.5 μm , 且随着均质压力的提高, 淀粉颗粒比表面积

收稿日期: 2022-04-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31901631)

第一作者: 刘学, 女, 硕士生

通信作者: 谷新晰 E-mail: helloguxinxi@163.com

增大,溶解度提高。Akesowan^[20]采用高温、高压处理魔芋溶液,结果发现魔芋溶液黏度降低。石德玲等^[21]通过高温、高压工艺降解海参硫酸多糖,快速、高效地制备低分子量硫酸多糖,且回收率高,易控制。Chen等^[22]采用非均相湿热降解法制备部分降解魔芋葡甘聚糖,其(10 g/L)表观黏度可从39 894 mPa·s 降到3437 mPa·s。到目前为止,通过非均相湿热技术处理魔芋甘露聚糖与甘露聚糖酶协同制备魔芋甘露寡糖的研究鲜有报道。

本研究拟从小孢根霉 GZHF10 中发掘新型 GH134 家族 β -mannanase (*RmMan134B*),在大肠杆菌 BL21(DE3)中异源表达,研究其酶学性质。采用非均相湿热工艺处理魔芋粉,探究其理化性质的改变,并结合甘露聚糖酶 *RmMan134B* 协同制备魔芋甘露寡糖,旨在为酶法高效制备魔芋甘露寡糖提供新方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

菌株小孢根霉 (*Rhizopus microsporus*) GZHF10 由本课题组筛选并保存;载体 pET30a(+)、感受态大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 BL21(DE3),北京博迈德基因技术有限公司;魔芋粉、槐豆胶、瓜尔胶、半乳糖醛酸,源叶生物有限公司;微晶纤维素、果胶、甘露糖等试剂,北京索莱宝科技有限公司;其它试剂为国产分析纯级。

1.2 仪器与设备

ZWY-2102C 恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;Hettich Universal 320 高速冷冻离心机,德国 Hettich;SCIENTZ-II D 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;数显恒温水浴锅 HH-2,金坛市杰瑞尔仪器厂;TU-1810 紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;手提式湿热灭菌锅,上海东亚压力容器公司;NDJ-5S 数字式粘度计,上海佑科仪器仪表有限公司;Quanta 600 FEG 扫描电子显微镜,荷兰 FEI 公司;Mastersizer 3000E 激光粒度仪,马尔文帕纳科;TGA-DSC 3+同步热分析仪,梅特勒。

1.3 方法

1.3.1 *RmMan134B* 基因的克隆 将菌株 GZHF10 接种至查氏培养基中,于 45 °C 培养 3 d 后,离心(8 000 r/min,5 min)收集菌体。采用 CTAB 法提取菌株小孢根霉 GZHF10 总 DNA,根据已报道的 GH134 家族的甘露聚糖酶设计简并引物(表 1),并通过 Touchdown PCR 扩增基因片段,随后对其进行测序及 BLAST 分析。利用 SignalP4.0 预测信号肽,设计并合成引物扩增目的基因,正反引物两侧分别带有 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点,构建 pMD19-T-Man134B 克隆载体,采用在线工具 Clustal Omega 进行氨基酸序列比对,利用 Swiss-Model 对蛋白序列进行同源建模。引物由金唯智生物科技有限公司合成,结果如表 1 所示。

表 1 试验引物序列

Table 1 The primers used for this study

名称	引物序列(5'-3')
Man134UF	AA YTYGGYATHHTTYAARCARAAYTGG
Man134UR	ACRTC VACCCARAARCGMGRTRCRTC
<i>RmMan134B</i> -PF	GGGGAATTTCGCTACCACTGACCGTGGATCATACAC
<i>RmMan134B</i> -PR	GAATGCGGCCGCTTAGATAGGAGTAACATCGACCCAGAATC

1.3.2 *RmMan134B* 的载体构建与表达 将阳性质粒 pMD19-T-Man134B 和 pET30a(+)分别进行双酶切处理,并体外连接构建重组表达质粒 pET30a(+)-Man134B,热激转化至表达宿主大肠杆菌 BL21(DE3)中。筛选阳性转化子,将其接种到含卡那霉素的 LB 液体培养基中(37 °C,200 r/min),直至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.8 时,加入 1% 的 1 mol/L

异丙基硫代半乳糖苷,诱导表达甘露聚糖酶(20 °C,6 h)。随后,离心收集菌体(5 000 r/min,10 min),用 pH 5.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液重悬菌体,低温超声破碎(破碎 3 s,停止 4 s,循环 20 次),4 °C 离心(12 000 r/min,10 min)取上清,即为粗酶液。

1.3.3 *RmMan134B* 的纯化与 SDS-PAGE 分析 采

用碧云天的 His 标签蛋白纯化试剂盒纯化蛋白。具体如下:按每克细菌沉淀湿重加入 4 mL 非变性裂解液,低温超声破碎,4 ℃,5 000 r/min 离心 10 min,收集细菌裂解液上清并置于冰上。取 1 mL 混合均匀的 50%His-tag Purification Resin 装镍柱,然后用 0.5 mL 非变性裂解液平衡 3 次后加入约 4 mL 细菌裂解液上清,并重复上柱 5 次以充分结合目的蛋白。之后加入 1 mL 非变性洗涤液,洗柱 5 次,最后用 0.5 mL 非变性洗脱液洗脱目的蛋白 8 次,分别收集洗脱液。参照杨苗^[23]的方法,用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析纯化酶 *RmMan134B*。

1.3.4 *RmMan134B* 的酶活力和蛋白含量测定 参考 Miller^[24]的方法,以甘露糖含量为标准,采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-Dinitrosalicylic acid,DNS)法测定甘露聚糖酶 *RmMan134B* 酶活力。将 100 μ L 适当稀释的酶液加入到 900 μ L 魔芋甘露聚糖溶液中,摇匀后,50 ℃水浴 30 min,加入 1.5 mL DNS 试剂终止反应,煮沸 5 min 后冷却至室温,在 540 nm 波长处测定吸光值 OD。对照组为加入 DNS 后补加酶液。酶活单位(U):每分钟生成 1 μ mol 甘露糖所需的酶量。

参照 Bradford^[25]方法,以牛血清蛋白为标准,用考马斯亮蓝法测定蛋白含量。

1.3.5 温度和 pH 值对 *RmMan134B* 酶活性的影响 根据 1.3.4 节的方法,在 10~60 ℃下测定酶的最适温度,以最高酶活力为 100%,计算不同温度下的相对酶活力。在 30,40,50 ℃温度下将酶处理 0~60 min 后,按标准方法测定酶活力,分析其热稳定性。以未经热处理的酶溶液作对照,其酶活力定为 100%。

用 pH 2~3 的甘氨酸-盐酸缓冲液,pH 3~8 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液和 pH 8~12 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液,按标准方法测定酶活力,以最高酶活力为 100%,计算不同 pH 值下的相对酶活力。使用上述缓冲液适当稀释酶液,于 0 ℃处理酶液 1 h,按标准方法测定酶活力,分析其 pH 稳定性。以最适 pH 值处理的酶溶液作对照,其酶活力定为 100%。

1.3.6 金属离子和有机试剂对 *RmMan134B* 酶活性的影响 分析了金属离子(Li⁺,K⁺,Cu²⁺,Na⁺,

Al³⁺,Fe³⁺,Ca²⁺,Mn²⁺,Mg²⁺,Ag⁺,Zn²⁺)和有机试剂(丙酮、乙醇、吐温、尿素、CTAB、EDTA)对 *RmMan134B* 活性的影响。将不同浓度的金属离子和有机试剂溶液与魔芋甘露聚糖溶液混合均匀后,按标准方法测定酶活力。

1.3.7 *RmMan134B* 的底物特异性与动力学参数测定 分别以魔芋粉、瓜尔胶、槐豆胶、微晶纤维素、果胶和半乳糖醛酸为底物(2.5 g/L),在最适反应条件下测定酶活力。

用纯化后适当稀释的酶液,以不同质量浓度(0.1~3 g/L)的魔芋甘露聚糖溶液为底物,以甘露糖含量制作标准曲线,在最适反应条件下测定酶活力,根据米氏方程双倒数法计算 K_m 和 V_{max} 。

1.3.8 魔芋粉的非均相湿热处理 称取适量魔芋粉密封于锥形瓶中,于 115 ℃,0.1 MPa 的条件下处理,处理时间为 15,30 min 和 1,1.5,2 h。

1.3.9 处理前、后魔芋粉的理化性质表征 采用扫描电子显微镜(SEM)观察处理 2 h 前、后魔芋粉的微观形态。用水作分散剂,用马尔文激光粒度仪对处理 2 h 前、后魔芋粉的粒径大小及分布情况进行检测。使用 NDJ-5S 数字式粘度计,测定 30 g/L 不同处理时间的魔芋粉溶液表观黏度。用热重分析仪(TG)和差示扫描量热仪(DSC),在空气气氛下以 10 ℃/min 的加热速率从室温加热到 800 ℃,对处理 2 h 前、后的魔芋粉进行热分析。

1.3.10 处理前、后魔芋甘露聚糖的酶解效率测定 分别配制处理 2 h 前、后不同浓度的魔芋粉溶液(60~120 g/L),在最适反应条件下,按酶与底物比为 1:1.5 (V:V),用重组甘露聚糖酶 *RmMan134B* 酶解魔芋甘露聚糖,反应 20 min 后,煮沸 10 min 灭活酶,离心取上清(12 000 r/min,5 min),采用 DNS 法测定甘露糖含量,计算出魔芋甘露聚糖的水解率^[26]。

1.3.11 魔芋甘露聚糖粗品中寡糖成分测定

1.3.11.1 魔芋甘露寡糖粗品的制备 首先进行魔芋甘露聚糖的酶解。按酶:底物=1:2(V:V)水解 20 g/L 的魔芋甘露聚糖溶液,搅拌均匀后,封口,于 40 ℃下酶解 24 h。反应结束后,沸水浴 20 min 使酶失活,冷却至室温后离心取上清(5 000 r/min,10 min)。之后对上清液进行 Seavage 法除游离蛋白及真空冷冻干燥处理。按氯仿:异戊醇=4:1(V:V)

制备 *Sevage* 试剂。收集冻干粉于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.11.2 魔芋甘露寡糖组分测定 采用离子色谱法(IC)测定酶解产物中寡糖的成分。

色谱柱:DionexCarbopacTMPA200(3 mm \times 150 mm); 流动相:A:H₂O;B:130 mmol/L NaOH;C:65 mmol/L NaOH;D:1025 mmol/L NaOAc; 流速:0.3 mL/min;进样量:25 μ L;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;检测器:电化学检测器。

标准品为麦芽 1~7 糖,各单糖标准液质量浓度为 1 mg/L。样品处理为:精密称量 5 mg 冻干粉置于安瓿瓶中,加入 5 mL 水涡旋混匀,吸取 100 μ L 加入 900 μ L 去离子水,12 000 r/min 离心 5 min。取上清进行 IC 分析。

1.3.12 统计分析 每个试验重复 3 次。使用 GraphPad Prism 8.0.1 和 Excel 2010 对数据进行分析。结果以平均值和标准偏差值进行评估。

2 结果与分析

2.1 *RmMan134B* 基因序列分析

菌株 GZHF10 基因组 DNA 经简并引物 Man134UF 和 Man134UR(表 1)扩增后,获得 1 个基因片段(约 300 bp)。经分析该基因片段与假设蛋白基因(CEI91561.1)具有较高的一致性,并将该基因命名为 *RmMan134B*。*RmMan134B* 基因由 546 bp 碱基组成,无内含子,编码 181 个氨基酸和 1 个终止密码子。*RmMan134B* 基因与已报道 GH134 家族活性基因的氨基酸序列一致性较低(<69.6%),其中与甘露聚糖酶 *RmMan134A* (MF538624)、*AoMan134A* (XP_023093135.1)、*Ss-Man134* (PDB, 5JTS) 和 *AnMan134A* (ANID_02710) 的一致性分别为 69.6%,45.2%,51.6%,51%,该基因具有一定的新颖性,具有理论研究价值。

对 *RmMan134B* 与其它同家族的氨基酸序列进行比对,发现 GH134 家族的甘露聚糖酶存在 3 个较保守区域。保守 I 区序列最长(LDLAIAMLES DHMITDYAYGDNKSGDAANFGIFKQNWFLR),该区域结构主要为 Loop 结构,且具有活性催化位点(Glu53、Asp65、Ala71),这为底物的识别及催化提供了便利;保守 II 区序列由 26 个氨基酸组成(YGTDKWFGGHRNGESGLNNSDTADIN);保守 III 区由 11 个氨基酸组成(DTRFWVDVTPI),是最短

保守区,然而该区域相对而言最为保守,该区域主要是 β 折叠片结构,为酶蛋白分子结构的稳定提供保障。其中,图 2 中的氨基酸序列分别来自小孢根霉(XP_023461435.1 和 *RmMan134A*)、链霉菌属(*SsGH134*)、费氏曲霉(XP_001265500.1)、土曲霉(EAU35362.1)、米曲霉(*AoMan134A*)、黄曲霉(RMZ45232.1)、构巢曲霉(*AnMan134A*)和尖孢镰刀菌(SCO91189.1)。

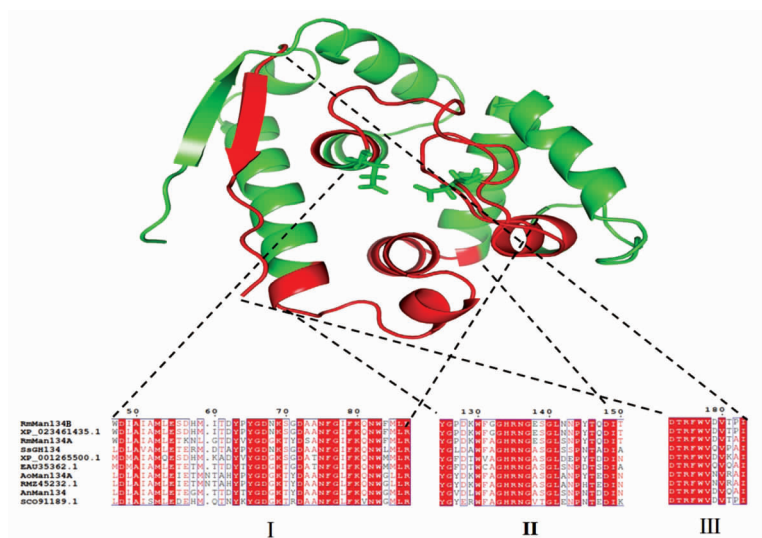
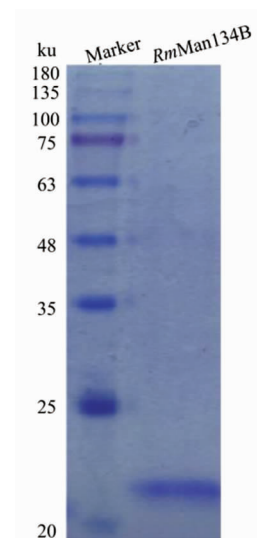
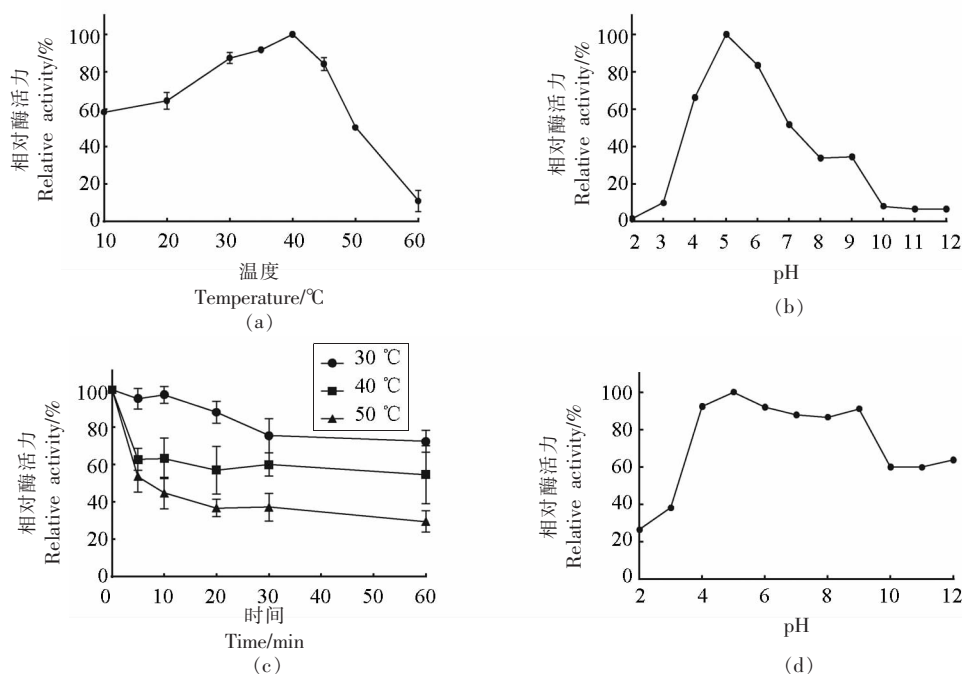
2.2 *RmMan134B* 的基因表达及 SDS-PAGE 分析

通过双酶切克隆载体 pMD19-T-Man134B 和载体 pET30a(+),成功构建表达载体 pET30a(+)-Man134B,之后对热激转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)中的单菌落进行培养和诱导。经测定,发酵粗酶液的甘露聚糖酶活力为 1.8 U/mL。对纯化的酶液进行 SDS-PAGE 分析,发现该酶在 21 ku 左右有清晰的蛋白条带,大于其理论分子质量 20.1 ku(图 2),推测可能是由于 His 标签所致(0.84 ku),仍需进一步研究^[27]。

2.3 *RmMan134B* 的酶学性质分析

2.3.1 温度和 pH 值对 *RmMan134B* 酶活性的影响 如图 3 所示,*RmMan134B* 的最适温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ (图 3a),根据不同温度处理 0~60 min 后的热稳定性结果显示,在 30,40,50 $^{\circ}\text{C}$ 热处理 1 h 后,该酶可保持(70.3 \pm 4.8)%,(54.7 \pm 4.3)%,(29.6 \pm 4.6)%的残余酶活力(图 3c)。最适 pH 值为 5.0,在 pH 4.0~7.0 范围内,可保持 50%以上的酶活力(图 3b)。根据不同 pH 值处理的稳定性结果显示,该酶在 pH 4.0~9.0 的处理下,酶活力较稳定,相对酶活力在 85%以上(图 3d)。上述结果表明,*RmMan134B* 是中温酶,30 $^{\circ}\text{C}$ 热处理后的残余酶活力较高,且在中性和碱性 pH 范围内有较好的耐受性。

2.3.2 金属离子和有机试剂对 *RmMan134B* 酶活性的影响 为重组酶的应用提供数据参考,本文探究了金属离子和有机试剂对 *RmMan134B* 酶活性的影响。如表 2 所示,金属离子对酶活性的研究表明,1 mmol/L 金属离子处理对该酶具有不同程度的抑制作用。其中 Mg^{2+} 的抑制作用最强,仅保留 20%的酶活力;其余金属离子处理后,可保留 50%~75%的酶活力。5 mmol/L 金属离子除 Ca^{2+} 外,均可抑制酶活力,抑制率为 10%~30%。其中,5 mmol/L

图 1 重组甘露聚糖酶 *RmMan134B* 结构及保守序列分析Fig.1 Structure and conserved sequence analysis of recombinant mannanase *RmMan134B*图 2 重组酶 *RmMan134B* 的蛋白纯化Fig.2 Protein purification diagram of recombinant *RmMan134B*图 3 温度和 pH 值对重组酶 *RmMan134B* 酶活性的影响Fig.3 Effects of temperature and pH value on the activity of recombinant *RmMan134B*

的 Ag^+ 抑制作用最强, 仅保留 10% 的酶活力。有机试剂对酶活性的研究表明 (表 3), 吐温、EDTA、乙醇可使酶活力提高约 10%~25%, 这可能是由于这些试剂改变了酶分子的构象, 利于酶与底物的接触。而 CTAB 作为蛋白变性剂, 对酶活性的抑制作用较强。丙酮则对酶活性影响不大。所得数据表

明, *RmMan134B* 对金属离子和有机试剂的耐受性较好, 对进一步研究 *RmMan134B* 的催化机理和应用具有重要意义。

2.3.3 *RmMan134B* 的底物特异性与动力学参数测定 经测定, 甘露聚糖酶 *RmMan134B* 对多种底物均表现出一定的水解活性。其中, 对魔芋甘露

表2 金属离子对重组酶 *RmMan134B* 酶活性的影响Table 2 The influence of metal ions on the recombinant *RmMan134B* activity

金属离子	相对酶活性/%	
	1 mmol/L	5 mmol/L
对照组	100 ± 4.01	100 ± 4.01
Li ⁺	68.80 ± 1.15	92.58 ± 3.36
K ⁺	74.47 ± 2.06	92.80 ± 6.74
Cu ²⁺	62.94 ± 1.47	72.60 ± 1.69
Na ⁺	48.74 ± 4.05	89.40 ± 6.26
Al ³⁺	74.45 ± 0.63	73.83 ± 2.77
Fe ³⁺	63.08 ± 2.77	90.70 ± 1.95
Ca ²⁺	72.57 ± 3.0	100.83 ± 1.43
Mn ²⁺	23.40 ± 0.78	23.67 ± 2.73
Mg ²⁺	69.71 ± 3.32	93.81 ± 3.4
Ag ⁺	66.53 ± 3.44	10.50 ± 3.05
Zn ⁺	74.08 ± 5.69	84.33 ± 4.02

表3 有机试剂对重组酶 *RmMan134B* 酶活性的影响Table 3 The organic reagents on the recombinant *RmMan134B* activity

有机试剂	相对酶活性/%	
	浓度	相对酶活性/%
丙酮	1%	107.36 ± 3.57
	5%	99.82 ± 2.00
乙醇	1%	113.93 ± 2.40
	5%	114.01 ± 4.04
吐温 80	1%	123.69 ± 2.32
	5%	125.82 ± 4.02
尿素	1 mmol/L	89.26 ± 5.04
	5 mmol/L	105.94 ± 1.33
CTAB	1 mmol/L	20.63 ± 3.85
	5 mmol/L	13.31 ± 1.74
EDTA	1 mmol/L	111.62 ± 3.25
	5 mmol/L	121.25 ± 1.39

聚糖的水解活性最高, 将其酶活力定为 100%, 瓜尔胶、微晶纤维素、槐豆胶、果胶、半乳糖醛酸的酶活力依次为 21%, 18%, 14%, 8%, 4%。结果表明, *RmMan134B* 有广泛的底物特异性, 应用范围广。当以魔芋甘露聚糖为底物时, *RmMan134B* 的 K_m 和 V_{max} 分别是 2.447 mg/mL 和 2.399 $\mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ 。

2.4 处理前、后魔芋粉的理化性质表征

为探究处理前、后魔芋粉的变化, 对魔芋粉粉

末形态、粒径、溶液黏度等进行测定, 旨在比较处理前、后的性质差异, 为魔芋粉的进一步加工应用提供理论依据。经 SEM 结果显示(图 4), 处理前魔芋粉颗粒较大, 表面粗糙有棱角, 且有褶皱和微孔; 处理后魔芋粉颗粒变小, 表面相对平整光滑, 几乎无可见微孔。进一步采用马尔文激光粒度仪测定颗粒粒径, 粒度分布特征参数结果如表 4 所示, 结果显示, 相比于处理前, 处理后魔芋粉的颗粒粒径明显变小, 粒径分布较集中。

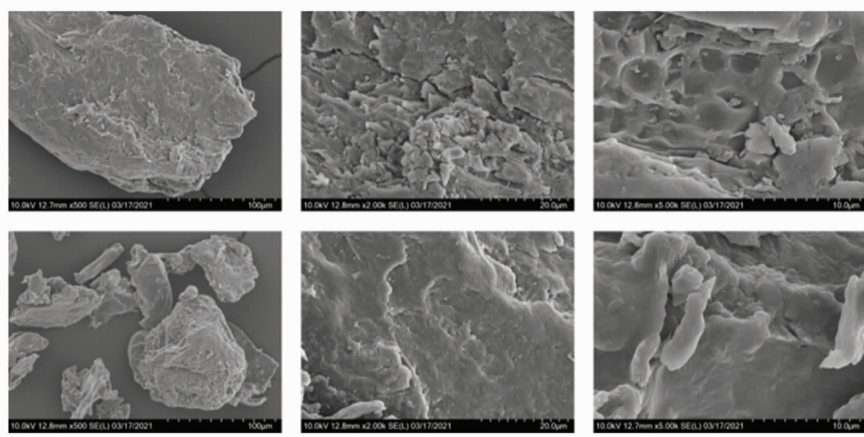


图4 魔芋粉处理前(上)、后(下)的 SEM 图像分析

Fig.4 SEM image analysis of konjac flour before (top) and after (bottom) treatment

表 4 魔芋粉处理前、后的粒度分布特征参数

Table 4 The characteristic parameters of particle size distribution of konjac flour before and after treatment

特征参数	处理前	处理后
ASD[3]/ μm	277	186
D[3,2]/ μm	168	124
D[4,3]/ μm	363	313
Dv(10)/ μm	81.9	62.0
Dv(50)/ μm	302	297
Dv(90)/ μm	716	571

粘度仪的测定结果显示, 处理 0.25~2 h 的魔芋粉, 其 30 g/L 溶液表观黏度分别为 1 170, 783, 98, 58, 49 mPa·s, 其中处理 2 h 的溶液表观黏度值最小, 比处理前降低了 96.1%。

TG-DSC 结果如图 5 所示 (5a 为处理前, 5b

为处理后), 由 TG 曲线可知, 处理前、后的魔芋粉, 由于水分的蒸发, 在 100 °C 左右均发生第 1 次质量损失, 其中处理前魔芋粉的 5% 失重温度 (89.9 °C) 小于处理后 (124.5 °C); 在 300 °C 左右, 魔芋粉出现热分解, 导致了最大的质量损失, 处理前的失重率 (50%) 大于处理后 (40%); 处理前、后魔芋粉的第 3 次失重分别发生在 430 °C 和 460 °C 左右。结合 DSC 曲线进一步分析魔芋粉的热转变, 结果显示, 处理前魔芋粉在 300, 434, 468 °C 出现放热峰, 处理后, 在 300 °C 和 460 °C 出现放热峰, 分别对应了魔芋粉 TG 曲线的失重损失温度。综合分析表明, 魔芋粉耐较高温, 且处理 2 h 魔芋粉的热稳定性有一定程度的提高, 因此可以通过高温高压工艺对魔芋粉进行改性处理, 达到降低魔芋胶黏度的效果。

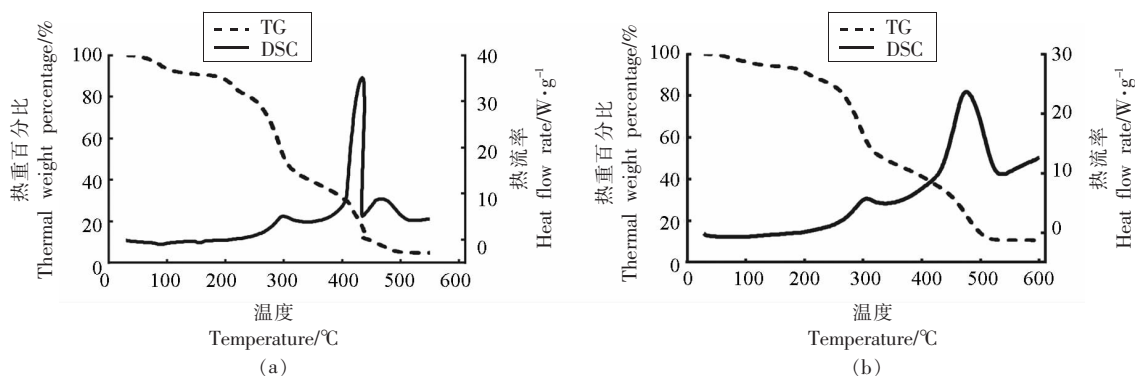


图 5 处理前 (a)、后 (b) 魔芋粉的热分析图

Fig.5 Thermal analysis diagram of konjac flour before (a) and after treatment (b)

2.5 处理前、后魔芋甘露聚糖的酶解效率分析

魔芋甘露聚糖是已知黏度最高的多糖之一, 其溶于水时发生脱乙酰化反应, 因此 KGM 分子链上的羟基暴露出来与水分子形成氢键而产生一种部分结晶结构, 这种结晶结构随着魔芋胶质量浓度的增大而增多, 阻碍酶分子与 KGM 的结合, 减弱酶的降解作用^[28], 不利于魔芋甘露寡糖的工业化生产和应用。因此, 为提高酶解效率并降低高黏度魔芋胶的阻碍作用, 有必要对多糖进行改性处理。

前期结果显示, 处理后魔芋胶的表观黏度显著降低, 之后分别测定改性前、后 60~120 g/L 的魔芋胶的水解率, 比对分析改性处理前、后酶解法制

备魔芋甘露寡糖的差异, 为实际生产应用提供数据支持。如图 6 所示, 水解率的变化趋势与计艳艳^[29]的研究结果类似, 研究发现, 当酶的添加量一定时, 随着魔芋胶浓度的增加, 魔芋胶的水解率下降。处理后魔芋胶由于黏度降低, 增加了酶与葡甘露聚糖分子的扩散运动, 其水解率较改性前提高了约 0.6~1 倍。

2.6 魔芋甘露寡糖成分测定结果

与标准品的离子色谱图相比较, 如图 7 所示, 酶解产物的低聚糖成分为单糖 (0.922 mg/L)、二糖 (1.4 mg/L)、三糖 (0.613 mg/L), 其结果与 Sakai 等^[17]和 You 等^[18]的研究结果相似, *RmMan134B* 适合生产较低聚合度的寡糖。

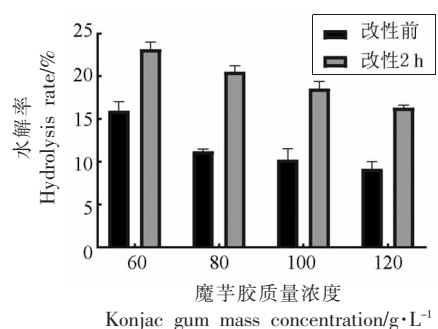


图6 处理前、后魔芋粉的水解率对比图

Fig.6 Comparison chart of hydrolysis rate of konjac flour before and after treatment

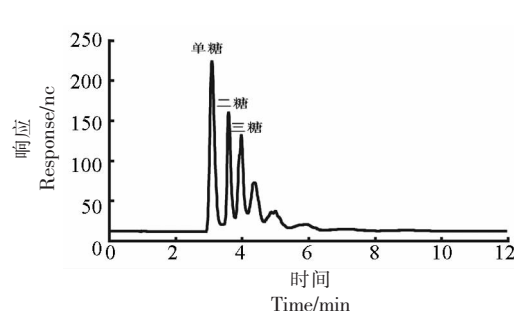


图7 酶解产物的寡糖组分分析

Fig.7 Analysis of oligosaccharide components of enzymatic hydrolysis products

3 讨论

魔芋是唯一可进行商业化提取魔芋甘露聚糖的植物,在我国的云南、贵州、四川等地广泛分布^[30]。研究发现,魔芋甘露寡糖具有促进益生菌增殖、免疫调节、降低血脂、控制血糖等功能活性^[31],可以利用 β -甘露聚糖酶降解魔芋甘露聚糖得到。目前报道的GH5^[32]、GH26^[33]和GH113家族^[34]的甘露聚糖酶细菌来源较多,而GH134家族的甘露聚糖酶,多数来自于真菌,如构巢曲霉、米曲霉和小孢根霉。

本研究从小孢根霉中获得了一个新型GH134家族甘露聚糖酶(*RmMan134B*),该酶由546 bp的核苷酸组成,蛋白分子质量小,为20.1 ku,与之前报道的*AnMan134A*(18 ku)、*AoMan134A*(19 ku)、*SsGH134*(20 ku)和*RmMan134A*(17.7 ku)的分子质量相近。利用该酶水解不同聚糖底物,结果表明,该酶可降解魔芋甘露聚糖、瓜尔胶、微晶纤维素、槐豆胶、果胶等,其中对魔芋甘露聚糖有最高的酶活力,其催化效率是瓜尔胶的4.7倍,槐豆胶的7.1倍。这一研究结果与*AoMan134A*的水解性能略有不同,*AoMan134A*对槐豆胶的催化效率与魔芋甘露聚糖相近,然而比瓜尔胶高6.8倍。经测定*RmMan134B*的最适温度为40℃,最适pH值为5.0,pH 4.0~9.0的缓冲液处理1 h后,酶活力保持在85%以上,与其它来源的GH134家族甘露聚糖酶的研究结果相似,都属于中温酶,且酶的稳定性较好,如*AoMan134A*水解葡甘聚糖时,在60,70,80,90℃热处理120 min后,其相对酶活力为58%,50%,40%,28%,在中性到碱性的pH范

围内稳定;*RmMan134A*在pH 4.0~10.0的范围内可保持90%以上的酶活力。不同家族 β -甘露聚糖酶的最小水解底物有所不同。大部分GH5家族甘露聚糖酶的最小水解底物为M3,多数GH26家族甘露聚糖酶的最小水解底物为M4^[35],相比之下,GH134甘露聚糖酶的最小水解底物为M5和M6,如*Man134A*水解M5产生M2和M3;*SsGH134*水解M5产生M3和M2,水解M6产生大量的M3和少量的M4和M2;*RmMan134A*水解M6产生M3和少量的M2和M4。因选取的魔芋胶底物不同,利用*RmMan134B*酶解魔芋甘露聚糖,经离子色谱法分析,结果显示酶解产物的组分为31.41%单糖、47.70%二糖和20.89%三糖,表明可利用*RmMan134B*制备甘露寡糖,增加食品酶制剂的选择。

KGM为水溶性膳食纤维,是生物医学和食品领域的研究热点。然而,KGM分子质量大,且具有遇水后高膨胀、高黏度特性,因此,在酶解过程中,通过提高底物浓度来增大酶解效率的方法受到限制,不利于工业化生产和应用。针对这种情况,徐春梅等^[6]采用逐步水解魔芋甘露聚糖的策略,最终使得魔芋胶质量浓度提高到150 g/L。然而分步溶解魔芋甘露聚糖虽然取得了较好的水解效果,却增加了生产操作的复杂性。本研究通过非均相湿热改性处理魔芋粉,使得溶液黏度比改性前降低了96.1%,极大提高了甘露聚糖酶解反应的有效浓度,同时测定质量浓度为60~120 g/L的水解率,发现非均相湿热技术使得水解效率提高了0.6~1倍。

4 结论

本研究成功从小孢根霉获得了一个新型 GH134 家族甘露聚糖酶(*RmMan134B*),并在大肠杆菌中异源表达。甘露聚糖酶 *RmMan134B* 基因编码 181 个氨基酸和 1 个终止密码子,N 端有 51 个氨基酸残基的信号肽,蛋白理论分子质量为 20.1 ku。该酶的最适底物为魔芋甘露聚糖,最适温度为 40 ℃,属中温酶;且在 pH 4.0~9.0 的缓冲液范围内有较好的耐受性;非均相湿热技术处理魔芋粉,可显著降低魔芋粉末的粒径和溶液黏度,提高热稳定性;结合酶解协同制备魔芋甘露寡糖,结果显示处理后魔芋粉溶液的水解率提高了 0.6~1 倍。该酶水解魔芋甘露聚糖的主要产物为甘露二糖,在食品加工中具有一定的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] DEVARAJ R D, REDDY C K, XU B. Health-promoting effects of konjac glucomannan and its practical applications: A critical review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 126(4): 273-281.
- [2] YIN J Y, MA L Y, XIE M Y, et al. Molecular properties and gut health benefits of enzyme-hydrolyzed konjac glucomannans[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 237(12): 1-8.
- [3] ONISHI N, KAWAMOTO S, NISHIMURA M, et al. A new immunomodulatory function of low-viscous konjac glucomannan with a small particle size: Its oral intake suppresses spontaneously occurring dermatitis in NC/Nga mice[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2005, 136(3): 258-265.
- [4] JIAN W J, TU L Y, WU L L, et al. Physicochemical properties and cellular protection against oxidation of degraded konjac glucomannan prepared by γ -irradiation[J]. Food Chemistry, 2017, 231(18): 42-50.
- [5] LIU J H, XU Q H, ZHANG J J, et al. Preparation, composition analysis and antioxidant activities of konjac oligo-glucomannan[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 1309(20): 398-404.
- [6] AL-GHAZZEWI F H, SHEPHERD S, TESTER R F, et al. The potential use of hydrolysed konjac glucomannan as a prebiotic[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87(9): 1758-1766.
- [7] LI F, SUN X J, YU W, et al. Enhanced konjac glucomannan hydrolysis by lytic polysaccharide monooxygenases and generating prebiotic oligosaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 253(4): 1-9.
- [8] ALBRECHT S, VAN MUISWINKEL G C, XU J, et al. Enzymatic production and characterization of konjac glucomannan oligosaccharides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(23): 12658-12666.
- [9] 陈晓飞, 李珊珊, 刁文涛, 等. 高产 β -甘露聚糖酶菌株的分离鉴定及酶学性质研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(9): 92-97.
CHEN X F, LI S S, DIAO W T, et al. Isolation and identification of β -mannanase-producing strain and its enzymatic property[J]. China Brewing, 2021, 40(9): 92-97.
- [10] CHEN X, WANG X H, LIU Y, et al. Biochemical analyses of a novel thermostable GH5 endo β -1,4-mannanase with minor β -1,4-glycosidic cleavage activity from *Bacillus* sp. KW1 and its synergism with a commercial α -galactosidase on galactomannan hydrolysis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 166(1): 778-788.
- [11] WANG N N, LIU J, LI Y X, et al. High-level expression of a glycoside hydrolase family 26 β -mannanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* for production of partially hydrolysed fenugreek gum[J]. Process Biochemistry, 2021, 100(1): 90-97.
- [12] ZHANG Y L, JU J S, PENG H, et al. Biochemical and structural characterization of the intracellular mannanase AaManA of *Alicyclobacillus acidocaldarius* reveals a novel glycoside hydrolase family belonging to clan GH-A[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(46): 31551-31558.
- [13] SHIMIZU M, KANEKO Y, ISHIHARA S, et al. Novel β -1,4-mannanase belonging to a new glycoside hydrolase family in *Aspergillus nidulans*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(46): 27914-27927.
- [14] SONG Y J, SUN W Y, FAN Y L, et al. Galactomannan degrading enzymes from the mannan utilization gene cluster of Alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 and their synergy on galactomannan degradation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,

- 2018, 66(42): 11055–11063.
- [15] LI Y X, LIU H J, YU Q, et al. Preparation, characterization, and prebiotic activity of manno-oligosaccharides produced from cassia gum by a glycoside hydrolase family 134 β -mannanase[J]. Food Chemistry, 2020, 309(6): 1–10.
- [16] SAKAI K, MOCHIZUKI M, YAMADA M, et al. Biochemical characterization of thermostable β -1,4-mannanase belonging to the glycoside hydrolase family 134 from *Aspergillus oryzae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(1): 3237–3245.
- [17] SAKAI K, KIMOTO S, SHINZAWA Y, et al. Characterization of pH-tolerant and thermostable GH 134 β -1,4-mannanase SsGH134 possessing carbohydrate binding module 10 from *Streptomyces* sp. NR-RL B-24484[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 125(3): 287–294.
- [18] YOU X, QIN Z, LI Y X, et al. Structural and biochemical insights into the substrate-binding mechanism of a novel glycoside hydrolase family 134 β -mannanase[J]. BBA-General Subjects, 2018, 1862(6): 1376–1388.
- [19] APOSTOLIDIS E, MANDALA I. Modification of resistant starch nanoparticles using high-pressure homogenization treatment[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 103(3): 1–7.
- [20] AKESOWAN A. Viscosity and gel formation of a konjac flour from *Amorphophallus oncophyllus*[J]. AU Journal of Technology, 2002, 5(3): 52–59.
- [21] 石德玲, 齐俊华, 卢海燕, 等. 海参硫酸多糖的高温高压降解工艺及其降解机制[J]. 中国海洋药物, 2019, 38(1): 1–10.
- SHI D L, QI J H, LU H Y, et al. Hydrothermal degradation process and mechanism of sulfated polysaccharides from sea cucumber[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2019, 38(1): 1–10.
- [22] CHEN Z J, WANG S H, SHANG L C, et al. An efficient and simple approach for the controlled preparation of partially degraded konjac glucomannan[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108(6): 1–5.
- [23] 杨苗. β -甘露聚糖酶产生菌的筛选鉴定、产酶条件优化及酶学特性研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2016.
- YANG M. Screening and identification of β -mannanase production strain and optimization of fermentation conditions and its enzymatic properties[D]. Wuhan: Hubei University of Technology, 2016.
- [24] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Biochemistry, 1959, 31(3): 426–428.
- [25] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Academic Press, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [26] 董振香, 顾秋亚, 李丹晨, 等. 不同分子量魔芋甘露聚糖的制备及功效活性分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8): 48–53.
- DONG Z X, GU Q Y, LI D C, et al. Preparation and active component analysis of konjac mannans with different molecular weights[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(8): 48–53.
- [27] 唐威华, 张景六, 王宗阳, 等. SDS-PAGE法测定His-tag融合蛋白分子量产生偏差的原因[J]. 植物生理学报, 2000, 36(1): 65–69.
- TANG W H, ZHANG J L, WANG Z Y, et al. Reasons for the deviation of the molecular weight of His-tag fusion protein determined by SDS-PAGE[J]. Plant Physiology Communications, 2000, 36(1): 65–69.
- [28] 李斌, 谢笔钧. 魔芋葡甘聚糖凝胶机理研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(11): 1411–1415.
- LI B, XIE B J. Study on the gelatin mechanism of konjac glucomannans[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2002, 35(11): 1411–1415.
- [29] 计艳艳. 魔芋甘露低聚糖的制备与抗氧化性研究及应用[D]. 吉林: 吉林大学, 2018.
- JI Y Y. Preparation and application of konjac mannanoligosaccharides and research on its antioxidant[D]. Jilin: Jilin University, 2018.
- [30] 张东华, 汪庆平, 段志柏, 等. 东南亚珠芽魔芋多苗接力生长特性及应用前景[J]. 资源开发与市场, 2009, 25(8): 682–710.
- ZHANG D H, WANG Q P, DUAN Z B, et al. Mechanism of relay multi-seedling release *amorphophallus bulbifer* and its application in southeast asia[J]. Resource Development & Market, 2009, 25(8): 682–710.
- [31] TESTER R F, AL-GHAZZEWI F H. Beneficial health characteristics of native and hydrolysed konjac (*Amorphophallus konjac*) glucomannan[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(10): 3283–3291.
- [32] MIZUTANI K, SAKKA M, KIMURA T, et al. Es-

- essential role of a family -32 carbohydrate-binding module in substrate recognition by *Clostridium thermocellum* mannanase CtMan5A [J]. FEBS Letters, 2014, 58(9): 1726-1730.
- [33] WANG J, SHAO Z, HONG Y, et al. A novel β -mannanase from *Pantoea agglomerans* A021: Gene cloning, expression, purification and characterization [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2010, 26(3): 1777-1784.
- [34] LIU W T, MA C P, LIU W D, et al. Functional and structural investigation of a novel β -mannanase BaMan113A from *Bacillus* sp. N16-5[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 182(7): 899-909.
- [35] COUTURIER M, ROUSSEL A, ROSENGREN A, et al. Structural and biochemical analyses of glycoside hydrolase families 5 and 26 β -(1,4)-mannanases from *Podospira anserina* reveal differences upon manno-oligosaccharide catalysis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(20): 14624-14635.
- [36] 徐春梅, 邬敏辰, 李剑芳, 等. 魔芋葡甘露聚糖的酶水解工艺条件[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(3): 120-124.
- XU C M, WU M C, LI J F, et al. Study on hydrolytic conditions of konjak glucomannan by β -mannanase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2008, 27(3): 120-124.

Synergistic Preparation of Konjac Mannan Oligosaccharides by Mannanase *RmMan134B* and Heterogeneous Hygrothermal Technology

Liu Xue, Wang Yu, Lu Haiqiang, Zhang Lijuan, Wang Yuyin, Chen Wei, Gu Xixi*
(College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei)

Abstract This study was to explore the new GH134 family mannanase and its application potential for synergistic preparation of konjac mannan oligosaccharides with heterogeneous hygrothermal technology. In this paper, a new GH134 family mannanase (*RmMan134B*) was successfully obtained from the genome of *Rhizopus microsporum* GZHF10, which encoded 181 amino acids and a stop codon. The sequence identity with the reported GH134 mannanase was low (<69.6%). So the *E. coli* PET expression system was used for heterologous expression and property analysis, and the results showed that the most suitable substrate for the enzyme was konjac mannan, and the optimum temperature and pH were 40 °C and 5.0. Amorphophallus konjac powder was subjected to heterogeneous hygrothermal treatment at 115 °C and 0.1 MPa. The structure and properties of konjac were changed significantly. After 2 h of treatment, the apparent viscosity (30 g/L) of the solution of konjac flour was reduced 96.1%, the particle size of the powder was reduced, the thermal stability was improved, and the hydrolysis rate of the modified konjac flour was increased by 0.6-1 times. Further study found that the main components of *RmMan134B* enzymatic hydrolysis products are monosaccharides (0.922 mg/L), disaccharides (1.4 mg/L) and trisaccharides (0.613 mg/L). This research had a certain role in promoting the efficient utilization of konjac mannan resources and the development of industrialization.

Keywords synergistic; β -mannanase; GH134; heterogeneous hygrothermal technology; konjac mannose oligosaccharide