

研究报告

β -呋喃果糖苷酶的固定化及其在低聚乳果糖合成中的应用

丁为龙¹ 张庆明² 马旺¹ 吴斌¹ 何冰芳^{1,3*}

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院 江苏 南京 211816)

(2. 南京军区总医院制剂科 江苏 南京 210002)

(3. 南京工业大学药学院 江苏 南京 211816)

摘要:【目的】探索适宜的树脂作为载体固定 β -呋喃果糖苷酶,并研究该固定化酶催化合成低聚乳果糖。【方法】选择9种大孔吸附树脂和碱性离子交换树脂固定 β -呋喃果糖苷酶,筛选固定化效果较好的树脂作为载体。用聚乙烯亚胺(PEI)修饰得到PEI-树脂,采用吸附法将酶固定于PEI-树脂上,并对固定化条件进行优化。考察固定化酶的重复使用稳定性及其催化合成低聚乳果糖的能力。【结果】通过筛选发现大孔阴离子交换树脂D311固定化效果较好,经过PEI修饰后,D311固定化效果显著提高。用PEI修饰的载体PEI-D311固定果糖苷酶,最优固定化条件为:PEI浓度2%,加酶量103 U/g,吸附温度25℃,吸附pH 6.0-8.0,吸附时间8 h。最优条件下固定化酶活达57 U/g,酶活回收率达55.3%。用固定化酶催化水解1 mol/L蔗糖,重复利用15批载体酶活没有明显降低。用固定化酶催化合成低聚乳果糖,8 h内低聚乳果糖产量最高达到137 g/L。【结论】PEI-D311固定的果糖苷酶具有较好的重复使用稳定性及较高的低聚乳果糖合成能力,这为固定化酶法生产低聚乳果糖研究奠定了基础。

关键词: β -呋喃果糖苷酶, D311树脂, 固定化, 聚乙烯亚胺, 低聚乳果糖

Immobilization of β -fructofuranosidase for the synthesis of lactosucrose

DING Wei-Long¹ ZHANG Qing-Ming² MA Wang¹ WU Bin¹ HE Bing-Fang^{1,3*}

(1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing, Jiangsu 211816, China)

(2. Preparation section, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China)

(3. School of Pharmaceutical Sciences, Nanjing Tech University, Nanjing, Jiangsu 211816, China)

Abstract: [Objective] We explored an appropriate resin to immobilize β -fructofuranosidase (β -FFase) to produce lactosucrose. [Methods] β -FFase was immobilized onto nine adsorption and ion-exchange resin, to select the best resin for immobilization. To improve immobilization efficiency, β -FFase was immobilized onto the resin modified by polyethylenimine (PEI). A series of immobilization conditions

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 21376119); National High-tech R&D Program of China (863 Program) (No. 2012AA022200)

*Corresponding author: Tel: 86-25-58139902; E-mail: bingfanghe@njtech.edu.cn

Received: March 29, 2015; Accepted: May 19, 2015; Published online (www.cnki.net): June 25, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21376119); 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(No. 2012AA022200)

*通讯作者: Tel: 86-25-58139902; E-mail: bingfanghe@njtech.edu.cn

收稿日期: 2015-03-29; 接受日期: 2015-05-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-25

were optimized. The stability of the immobilized enzyme and lactosucrose synthesized by the immobilized enzyme were also explored. **[Results]** Ion-exchange resin D311 was excellent for β -FFase immobilization. Immobilization efficiency was improved apparently when D311 resin activated by PEI. The immobilized conditions were as follows: 2% PEI, 103 U/g resin, 25 °C, pH between 6.0 and 8.0, 8 h adsorption time. Under these conditions, the immobilized enzyme activity reached 57 U/g, and immobilized yield was 55.3%. Using the immobilized β -FFase to hydrolysis 1 mol/L sucrose, the immobilized enzyme can be used for 15 times with no apparently activity loss, and approximately 137 g/L lactosucrose was synthesized within 8 h. **[Conclusion]** β -FFase immobilized onto the resin modified by PEI showed a good operational stability and a high productivity of lactosucrose.

Keywords: β -Fructofuranosidase, D311 resin, Immobilization, Polyethylenimine, Lactosucrose

低聚乳果糖(Lactosucrose)是由半乳糖、葡萄糖和果糖组成的一种功能性三糖^[1], 它不但可以促进体内双歧杆菌增殖、抑制致病菌产生, 而且可以调整肠道功能、降血脂、降胆固醇、促进矿物质吸收, 是健康食品的原料及新型甜味剂。广泛应用于食品、饲料添加剂等行业中, 深受广大消费者的青睐。

目前低聚乳果糖主要是以蔗糖和乳糖为原料, β -呋喃果糖苷酶(EC3.2.1.26)或果聚糖蔗糖酶(EC2.4.1.10)为催化剂催化合成^[2]。商品化的低聚乳果糖在 1992 年首次被日本盐水港精糖有限公司以 β -呋喃果糖苷酶催化合成^[3], 然而国内目前工业化生产还未见报道, 其中最主要的原因可能在于酶法生产低聚乳果糖成本高, 产品后期分离难度大。酶的固定化技术为提高酶的使用效率、降低成本提供了可能性。由于低聚糖的快速发展, β -呋喃果糖苷酶的固定化逐渐成为研究的热点, 其中研究最为广泛的是壳聚糖和海藻酸钠包埋法^[4-6], 但是这些材料机械强度不高。Chen 等^[4]用壳聚糖作为载体固定果糖苷酶, 固定化酶使用 10 批后酶活仅剩 55%。大孔树脂作为一种机械强度高、吸附能力强的材料, 广泛地应用于各种糖苷酶的固定化中^[7-8]。单纯的物理吸附存在固定化效率低、容易脱附等缺点, 需要对载体进行一定的修饰, 常用的修饰方法有戊二醛交联^[8]、壳聚糖包埋^[9]等。但在戊二醛固定化过程中, 酶活性损失比较严重, 吸附包埋法过程也较为繁琐。聚乙烯亚胺(PEI)作为一种水溶性高分子聚合物, 它具有极性基团(氨基)和疏水性基团(乙烯基), 有很高的附着性和吸附性, 可为载体和酶之间提供

更广阔的接触面积^[10], 近几年广泛应用于载体修饰的研究^[11-12]。

本研究以筛选获得的弱碱性离子交换树脂 D311 为载体进行果糖苷酶固定化研究。采用 PEI 修饰载体以提高载体对果糖苷酶的吸附性能, 并对固定化条件及固定化酶重复使用稳定性进行探讨, 最后用固定化酶催化合成低聚乳果糖, 为提高果糖苷酶的利用效率、降低低聚乳果糖的生产成本提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂及仪器

带有信号肽^[13]的果糖苷酶基因(*bff*)来源于节杆菌 *Arthrobacter arilaitensis* NJEM01, 该菌为本实验室自主筛选^[14-15], 其重组菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET-*bff* 由本实验室自行构建保存^[16]。树脂 AB-8、BS-65、D101、D311、D301、D345、D330、D318、D201, 购自安徽三星树脂科技有限公司, 其中 D101、AB-8 和 BS-65 为大孔吸附树脂, D201 为大孔强碱性阴离子交换树脂, D301、D311、D318、D330 和 D345 为大孔弱碱性阴离子交换树脂; 聚乙烯亚胺(PEI), 分子量 1 800, 购自阿拉丁公司; 50%戊二醛水溶液, 购自阿拉丁公司; 其他试剂均为分析纯。

冷冻离心机, Hermer 公司 HZ36K; 恒温混匀仪, 德国 Ditas/HLC; SBA-40E 生物传感分析仪, 山东省科学院生物研究所; 真空干燥箱, 上海索谱仪器有限公司; Ultimate 3000 高效液相色谱仪, 赛

墨飞(Thermo Scientific)公司; Tristar II型比表面与孔隙分析仪, 美国 Micromeritics 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 果糖苷酶的制备: 果糖苷酶具体获得方法如下: 重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-*bff* 在 37 °C 条件下生长, 酶在低温条件下(30 °C)经 IPTG 诱导表达分泌到胞外, 发酵 10 h 后在 4 °C、8 000 r/min 条件下离心收集上清粗酶液, 放置于 4 °C 备用。

1.2.2 树脂选择: 9 种树脂用乙醇浸泡 12 h, 以去除树脂内部的致孔剂和杂质, 再用蒸馏水冲洗至中性备用; 离子交换树脂用 1 mol/L 盐酸处理成阴离子型, 再用蒸馏水洗至中性, 置于 4 °C 保存备用。树脂预处理后加入 1 mL 游离的果糖苷酶(116 U/mL), 在 35 °C、pH 7.0 的条件下吸附固定 12 h。固定后检测固定化载体酶活, 筛选出固定化效果较好的树脂作为载体。

1.2.3 树脂的修饰: 取 0.1 g 经预处理的树脂加入一定浓度的 PEI 溶液, 35 °C、500 r/min 振荡反应 5 h, PEI 浓度为 0、1%、2%、3%、4%、5%。修饰后的树脂用蒸馏水洗涤去除多余的 PEI 溶液, 得到 PEI-D311 载体, 真空干燥后待用。

D311 经过 PEI 修饰后, 其表面形态会发生一些变化, 进而导致比表面积发生改变。本研究通过 N_2 吸附-脱附等温曲线法测载体的比表面积, 操作温度为 -196.15 °C, 测试前在 80 °C 抽真空脱气 30 min。采用 BET (Burnauer-Emmett-Teller) 方程计算载体 D311 修饰前后的比表面积。

用 PEI 修饰的树脂对游离的果糖苷酶进行固定化, 条件同上, 固定后检测固定化载体酶活, 确定最佳的 PEI 浓度。

1.2.4 果糖苷酶固定化方法优化: 称取 0.1 g PEI-D311 树脂于离心管中, 加入一定量的粗酶液, 在一定的 pH 条件下恒温振荡吸附。固定一定时间后弃去上清, 所得到的固定化酶用缓冲液冲洗至检测不到蛋白为止, 然后放置于 50 mL 磷酸缓冲液(pH 6.5)中 4 °C 保存备用。

采用单因素实验分别研究加酶量(10、16、27、

49、72、103、116 U/g)、pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)、温度(4、15、25、35、45 °C)和固定化时间(0-12 h)对固定化效果的影响, 并探索戊二醛交联对固定化效果及其重复使用稳定性的影响。

采用单位载体固定化酶活(U/g 载体)和酶活回收率(%)两个指标来评价固定化效果, 固定化酶回收率按下式计算:

酶活回收率=(固定化酶的总活力/加入游离酶总酶活力)×100%。

1.2.5 酶活力测定: 游离果糖苷酶活性测定方法: 1 mol/L 的蔗糖底物溶解在 pH 6.5 的 Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 (1/15 mol/L)缓冲溶液中, 取 950 μ L 蔗糖底物溶液加入 50 μ L 粗酶液, 在 35 °C 条件下 800 r/min 振荡反应 30 min, 反应后在沸水中煮沸 10 min 终止反应, 用测糖仪测定反应产生的葡萄糖的含量。

固定化酶活测定方法: 取固定化后的树脂 0.1 g, 加入 1 mL 蔗糖底物溶液(1 mol/L), 35 °C 条件下 800 r/min 振荡反应 15 min, 反应完后取出固定化酶终止反应, 用测糖仪测定反应产生的葡萄糖的含量。

酶活定义: 在 35 °C、pH 6.5 条件下, 每分钟催化水解产生 1 μ mol 葡萄糖所需要的酶量定义为一个酶活性单位[U, μ mol/(mL·min)]。

1.2.6 固定化酶的稳定性研究及其催化合成低聚乳果糖: 以 1 mol/L 蔗糖溶液为底物, 加入 0.1 g 固定化酶树脂, 在 35 °C、pH 6.5 条件下水解蔗糖。反应 1 h 后去除反应液, 用磷酸缓冲液(pH 6.5)冲洗树脂直到检测不出糖分为止, 再加入底物溶液进行下一批的反应, 连续重复 15 批。每一批反应完后测定固定化载体酶活, 考察固定化酶的重复使用稳定性。

以 20% (质量体积比)蔗糖和 20% (质量体积比)乳糖为底物, 用固定化酶催化合成低聚乳果糖。在 5 mL 体系中加入 0.1 g 固定化酶树脂, 在 35 °C、pH 6.5 条件下连续反应 24 h。利用 RID-HPLC 检测低聚乳果糖含量, 分析固定化酶法合成低聚乳果糖

的最高产量及摩尔转化率,其中摩尔转化率=(产物摩尔量)/(底物蔗糖或乳糖摩尔量) \times 100%。色谱条件为:色谱柱(Kromasil),氨基柱(250 mm \times 4.6 mm);流动相为乙腈:水=75:25;流速为 1 mL/min;柱温为 30 $^{\circ}$ C。

2 结果与分析

2.1 树脂载体的选择

选择 9 种不同型号的树脂进行研究,不同树脂的固定化结果如表 1 所示。所试载体的固定化效果差异较大,弱碱性离子交换树脂 D301、D311 和 D318 单位载体酶活和回收率相对较高,其中 D311 单位载体酶活和酶活回收率最高。AB-8、BS-5 和 D101 为大孔吸附树脂,固定化效果较差,这可能是由于酶与载体之间的吸附作用力太弱,固定完后用缓冲液冲洗时容易脱落,这与艾志录等^[17]报道的结果一致。离子交换树脂的固定化效率普遍比大孔树脂高,这是由于离子电荷作用力比单纯物理吸附作用强。D201 是强碱性离子交换树脂,它的固定化效率只有 D311 的 41.9%,这可能是由于强碱性树脂容易使果糖苷酶失活导致。D330 和 D345 弱碱性树脂是凝胶型树脂,活性基团除了伯胺基团,还有仲胺和叔胺等基团,这些基团可能不利于酶的固定化^[18]。综合以上分析,采用 D311 为固定化载体,但总体来说所有载体的担载量均不理想,需要进一步的改善以提高载体对酶的吸附能力。

2.2 载体表面的修饰

为了增强载体对酶的吸附能力,采用聚乙烯亚胺修饰 D311 制备 PEI-D311 复合载体。进一步考察 D311 和 PEI-D311 载体比表面积的变化,通过 N_2 吸附-脱附法测定载体表面积发现修饰后单位载体的 BET 比表面积从原来的 0.459 7 m^2/g 提高到 18.168 6 m^2/g 。经过 PEI 修饰后的载体的比表面积得到很大提高,这说明 PEI 分子在树脂表面富集,极大提高了载体比表面积,Li 等^[19]也报道 PEI 修饰可以拓宽载体比表面积和表面阳离子氨基数量。

2.3 固定化条件的优化

2.3.1 聚乙烯亚胺浓度对固定化的影响: D311 树脂处理成阴离子型后,利用不同浓度的聚乙烯亚胺修饰载体。结果如图 1 所示,载体经 PEI 修饰后固定化效果显著提高,固定化酶活和酶活回收率随 PEI 浓度的升高而升高,经 2% PEI 修饰后 D311 固定化效率达到 45.51 U/g,酶活回收率达到 39%。随着 PEI 浓度继续增加,酶活回收率没有继续增加,反而略有下降,表明高浓度 PEI 不利于该酶的固定,因此采用 2%浓度的 PEI 修饰载体。

2.3.2 加酶量对固定化效果的影响: 由图 2 可以看出,随着加酶量的增加,固定化酶活逐渐增加,而酶活回收率逐渐降低,当加酶量达到 103 U/g 载体后,固定化酶的活力增加不显著。这是因为离子交换树脂 D311 的表面活性基团在未被酶吸附饱和之前,固定化酶活将随着加酶量的增加而增加,当活

表 1 不同树脂固定化效果比较
Table 1 The immobilization effects of different resin

树脂材料 Resin materials	AB-8	BS-65	D101	D201	D301	D311	D318	D330	D345
功能基团 Functional group	弱极性 Weak polarity	非极性 Nonpolarity	非极性 Nonpolarity	$-N^+(CH_3)_3$	$-N^+(CH_3)_2$	$-NH_2$	$-NH_2$	$-NH_2$ $=NH$ $\equiv N$	$-NH_2$ $=NH$ $\equiv N$
载体酶活 Enzyme activity (U/g resin)	1.06	1.44	0.71	8.98	15.46	21.46	14.39	0.43	0.64
酶活回收率 Immobilized enzyme yield (%)	0.92	1.24	0.61	7.74	13.33	18.5	12.41	0.37	0.55

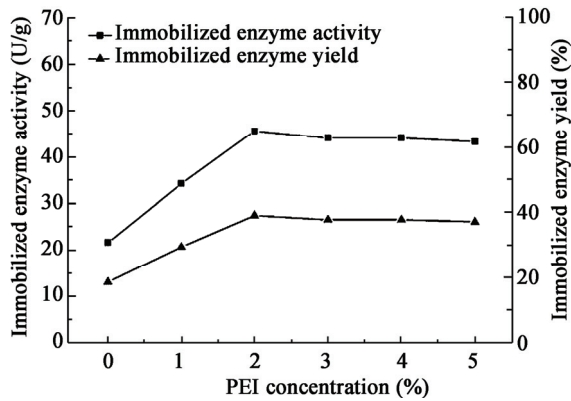


图1 PEI浓度对固定化效果的影响

Figure 1 Effect of PEI concentration on immobilized enzymatic activity

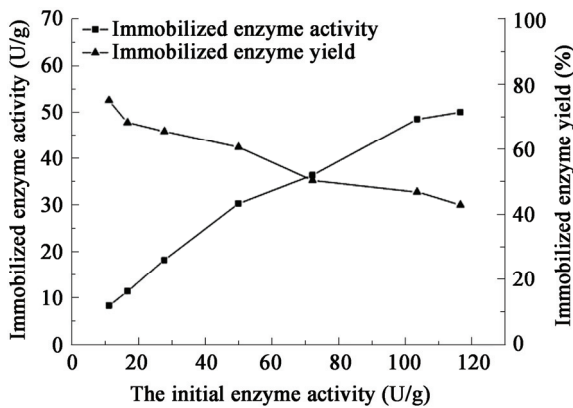


图2 加酶量对固定化效果的影响

Figure 2 Effect of the initial enzyme activity on immobilized enzymatic activity

性基团基本上被酶吸附饱和后,酶分子在载体表面过多富集而造成载体表面空间位阻加大,此时固定化酶的活力不再随加酶量的增加而增加。因此从酶活回收率和酶的经济性考虑加酶量定为 103 U/g,固定化酶活为 48 U/g,酶活回收率为 46.6%。

2.3.3 吸附温度对固定化效果的影响: 温度不仅影响载体的吸附能力,同时影响酶的活力。由图 3 可以看出,在较低的温度范围内,随着温度的升高,固定化酶活和回收率都逐渐增加,但是当温度超过 25 °C 后,固定化酶活迅速下降,当温度达到 45 °C 后,固定化酶活回收率降到 5% 左右。这可能是由于高温不利于酶的稳定性,温度较高时,酶固定 12 h 容易失活。25 °C 左右固定化载体酶活达到

57.4 U/g,酶活回收率达到 55.7% 以上,因此固定化温度在 25 °C 左右为宜。

2.3.4 吸附 pH 对固定化效果的影响: 由图 4 可以看出,在 pH 6.0–8.0 之间载体固定化效果变化不大,固定化酶活均在 57 U/g 以上,表明 pH 在 6.0–8.0 之间对酶吸附效果的影响不太显著。这可能是因为酶通过疏水作用和离子吸附作用固定到 PEI-D311 载体表面,外界环境 pH 的微弱改变并不影响酶与载体之间的吸附力。当 pH 在 5.0 以下和 9.0 以上时,载体酶活显著降低,这可能是因为果糖苷酶在过酸过碱条件下酶活不稳定导致^[14],也可能过酸过碱能显著影响 PEI 的电荷分布从而影响吸附性能,所以 pH 在 6.0–8.0 之间比较合适固定化。

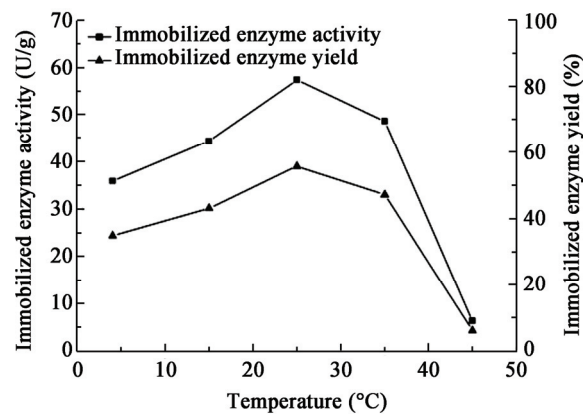


图3 吸附温度对固定化效果的影响

Figure 3 Effect of the temperature on immobilized enzymatic activity

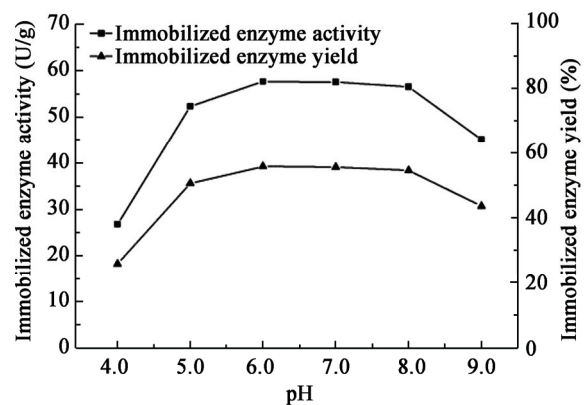


图4 pH对固定化效果的影响

Figure 4 Effect of the pH on immobilized enzymatic activity

2.3.5 吸附时间对固定化效果的影响: 由图 5 可以看出, 随着吸附时间的延长, 单位载体的酶活在逐渐增加, 8 h 后载体酶活没有继续增加, 稳定在 57 U/g 左右。延长吸附时间固定化酶活基本没有变化, 因此吸附时间定为 8 h。

通过上述研究, 经 PEI 修饰后, 离子交换树脂 D311 在 25 °C、pH 7.0 左右, 加入 103 U/g 游离酶固定 8 h, 固定化酶活达到 57 U/g, 回收率为 55.3%。Katsuhiko 等^[20]用 FE4611 树脂为固定化材料, 通过吸附交联的方法固定 β -呋喃果糖苷酶, 固定化酶活达到 30 U/g; 张艳等^[21]以 D201 树脂为固定化材料, 通过吸附交联的方法固定果糖转移酶, 固定化酶活达到 120 U/g, 回收率相对较低为 30.2%。通过聚乙烯亚胺对载体修饰, 显著提高了其对果糖苷酶的吸附性能, 取得了较高的酶活回收率。

2.3.6 戊二醛浓度对固定化效果的影响: 戊二醛是一种交联剂, 酶分子吸附到载体表面后再用戊二醛进行交联, 可以增强载体和酶之间的作用力。D311 吸附果糖苷酶后, 加入一定浓度的戊二醛室温交联 2 h。

从图 6 可以看出, 添加戊二醛交联对固定化酶的活力没有显著影响, 酶活基本保持在 58 U/g 左右。随着戊二醛浓度的增加, 单位载体酶活反而有所下降, 可能是由于高浓度的戊二醛容易引起酶的失活。通常吸附后加入戊二醛交联固定化效率会得

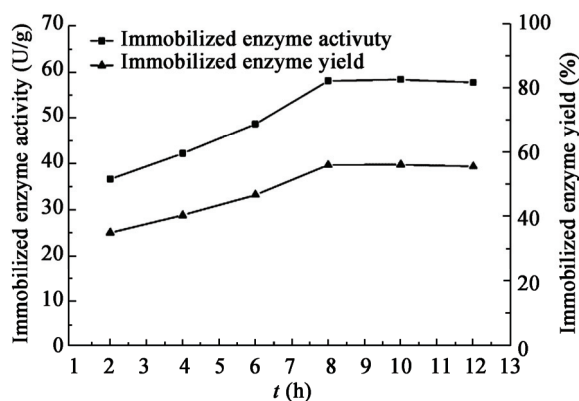


图 5 吸附时间对固定化效果的影响

Figure 5 Effect of adsorption time on immobilized enzymatic activity

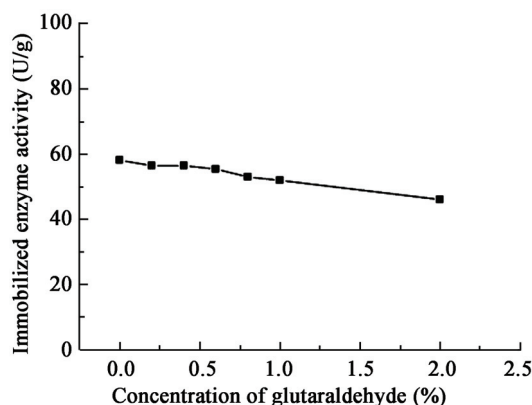


图 6 戊二醛浓度对固定化效果的影响

Figure 6 Effect of glutaraldehyde concentration on immobilized enzymatic activity

到一定提高, 桑亚新等^[22]以离子交换树脂 D152 为载体, 采用先吸附后交联的方法对果胶酶进行固定, 吸附法固定果胶酶酶活达到 300 U/mL, 戊二醛交联后酶活达到 370 U/mL, 相比提高了 23%。以 PEI-D311 为载体, 吸附后加入戊二醛交联没有提高固定化效率。这可能是因为酶吸附到 PEI 表面后, 与载体结合较为紧密, 戊二醛不能有效连接载体上的酶和环境中的游离酶, 因此戊二醛交联对固定化酶活没有提高作用, 但是它可能对酶活稳定性有一定的作用。

2.3.7 固定化酶的重复使用稳定性: 载体酶活和载体固定化酶的重复使用稳定性是评价一个固定化效果的两个重要指标。用固定化果糖苷酶催化水解蔗糖, 连续反应 15 批, 考察固定化酶的重复使用稳定性。

如图 7 所示, 未经 PEI 修饰的固定化酶在重复使用了 3 批后酶活开始下降, 10 批后降低到了 20% 以下。用 PEI 修饰后的固定化酶的重复使用稳定性大大提高, 连续使用 15 批后, 固定化酶依然保持 90% 以上的酶活。从图 7 中也可以看出加戊二醛交联后的固定化酶的重复使用稳定性也非常好, 两者均具有较高的固定化酶稳定性, 表明 PEI 修饰后的载体有足够强的吸附能力。Liu 等^[9]用大孔树脂和壳聚糖通过先吸附后包埋的方法固定果胶酶和脂肪

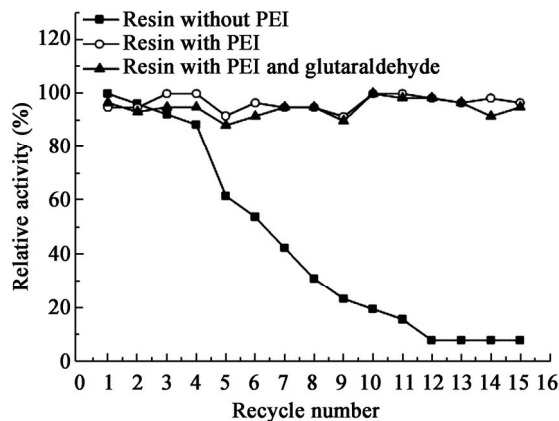


图 7 不同固定化方式对固定化酶重复使用稳定性的影响

Figure 7 Reusability of immobilized enzyme through different immobilization method

酶, 重复使用 8 批(每批 15 min)后, 脂肪酶和果胶酶活力保留 82%和 65%; 张丰华等^[23]用氨基树脂固定 β -半乳糖苷酶, 重复使用 16 批(每批 15 min)后, 酶活保留 75%左右。相比较而言, 载体 PEI-D311 在 15 批内具有很强的稳定性, 表明 PEI 修饰载体具有较强的重复使用稳定性。

2.4 固定化酶催化合成低聚乳果糖

以蔗糖和乳糖为底物, 固定化果糖苷酶为催化剂催化合成低聚乳果糖, HPLC 法定量分析低聚乳果糖产量。如图 8 所示, 反应 6 h 后在 27 min 左右出现的新峰即为催化产物。

研究反应时间对低聚乳果糖合成的影响, 反应曲线如图 9 所示。随着反应的进行, 低聚乳果糖的含量逐渐增加, 在 8 h 时低聚乳果糖含量最大达到 137 g/L 左右, 摩尔转化率达到 46.5%, 时空产量达 17.1 g/(L·h)。再继续反应, 低聚乳果糖含量反而有所降低, 这可能是由于低聚乳果糖在反应后期发生了水解反应, 这种现象在低聚果糖合成中也普遍存在^[24-25]。朱桂兰等^[26]以来源于节杆菌 10137 的游离 β -呋喃果糖苷酶为催化剂催化合成低聚乳果糖, 在 20%蔗糖、20%乳糖、pH 6.5、35 °C 条件下催化 12 h, 得到低聚乳果糖最大产量为 163.8 g/L 左右, 时空产量达 13.6 g/(L·h)。Katsuhiko 等^[20]用 FE4611

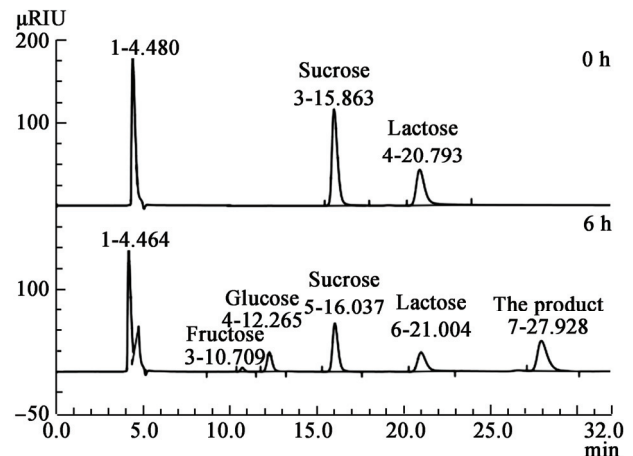


图 8 底物(0 h)和转化产物(6 h) HPLC 图

Figure 8 HPLC analysis of the substrate (0 h) and the transformed products (6 h) by immobilized enzyme

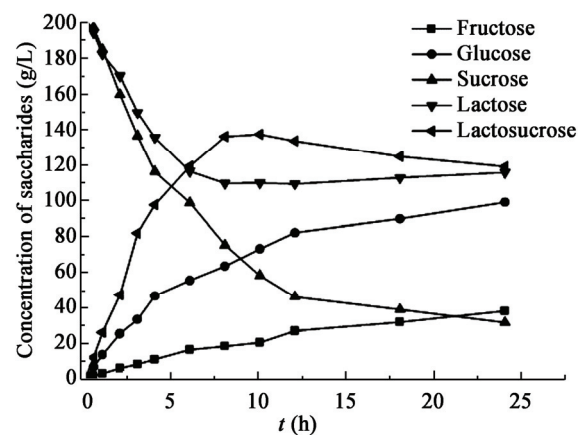


图 9 固定化酶催化合成低聚乳果糖的反应曲线

Figure 9 Time course of product composition during lactosucrose production by immobilized enzyme

树脂为固定化材料, 以 20% (质量比)的蔗糖和 20% (质量比)的乳糖为底物, 低聚乳果糖含量为 120 g/L。本文通过聚乙烯亚胺的修饰, 固定化酶稳定性得到一定提高, 固定化酶在 8 h 内催化合成 137 g/L 低聚乳果糖, 具有较高的时空产率, 这为固定化酶催化合成低聚乳果糖的工业化提供了参考。

3 结论

筛选出固定化效果较好的大孔弱碱性离子交换树脂 D311 为固定化载体, 经聚乙烯亚胺修饰极大提高了载体的固定化效率和重复使用稳定性。通

过吸附对 β -呋喃果糖苷酶进行固定, 条件优化后固定化树脂酶活达到 57 U/g, 酶活回收率达到 55.3%。载体固定化酶重复使用 15 批酶活均保持在 90%以上, 具有较好的重复使用稳定性。用固定化酶催化合成低聚乳糖, 8 h 内低聚乳糖产量达到 137 g/L。该方法为固定化酶法合成低聚乳糖的工业化提供了一定的参考价值。

参考文献

- [1] Avigad G. Enzymatic synthesis and characterization of a new trisaccharide, α -lactosyl- β -fructofuranoside[J]. Journal of Biological Chemistry, 1957, 229(1): 121-129
- [2] Mu WM, Chen QM, Wang X, et al. Current studies on physiological functions and biological production of lactosucrose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(16): 7073-7080
- [3] Fujita K, Hara K, Hashimoto H, et al. Method for the preparation of fructose-containing oligosaccharide: US Patent 5, 089, 401[P]. 1992-02-18 [http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnahtml%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=1&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1="Method+preparation+fructose-containing+oligosaccharide".TI.&OS=TTL/](http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnahtml%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=1&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=)
- [4] Chen SC, Sheu DC, Duan KJ. Production of fructooligosaccharides using β -fructofuranosidase immobilized onto chitosan-coated magnetic nanoparticles[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2014, 45(4): 1105-1110
- [5] Lorenzoni ASG, Aydos LF, Klein MP, et al. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized β -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 103: 193-197
- [6] Awad GEA, Amer H, El-Gammal EW, et al. Production optimization of invertase by *Lactobacillus brevis* Mm-6 and its immobilization on alginate beads[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 93(2): 740-746
- [7] Guidini CZ, Fischer J, Santana LNS, et al. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 52(2/3): 137-143
- [8] Ma YH, Weng GH, Zhang T, et al. Study on the immobilization of fructosyltransferase by anion-exchange resin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010(2): 174-177 (in Chinese)
马玉红, 翁桂华, 张涛, 等. 阴离子交换树脂固定化果糖基转移酶的研究[J]. 食品工业科技, 2010(2): 174-177
- [9] Liu K, Zhao GL, He BH, et al. Immobilization of pectinase and lipase on macroporous resin coated with chitosan for treatment of whitewater from papermaking[J]. Bioresource Technology, 2012, 123(3): 616-619
- [10] Liu JF, Liu H, Tan B, et al. Reversible immobilization of *K. fragilis* β -galactosidase onto magnetic polyethylenimine-grafted nanospheres for synthesis of galacto-oligosaccharide[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2012, 82: 64-70
- [11] Metin AÜ. Immobilization of laccase onto polyethyleneimine grafted chitosan films: effect of system parameters[J]. Macromolecular Research, 2013, 21(10): 1145-1152
- [12] Ondul E, Dizge N, Albayrak N. Immobilization of *Candida antarctica* A and *Thermomyces lanuginosus* lipases on cotton terry cloth fibrils using polyethyleneimine[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012, 95: 109-114
- [13] He BF, Chen WH, Mi L, et al. Strong excretion oligopeptide motifs for enhancing signal peptide and its application: China, CN103254277A[P]. 2013-08-21. <http://www.aaptchina.com/zhuanni/9057704/> (in Chinese)
- [14] Chu JL, Wu XM, Wu B, et al. Characteristics of an organic solvent-tolerant β -fructofuranosidase from *Arthrobacter arilaitensis* NJEM01 and efficient synthesis of prebiotic kestose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(24): 5408-5411
- [15] Wu XM, Chu JL, Wu B, et al. An efficient novel glycosylation of flavonoid by β -fructosidase resistant to hydrophilic organic solvents[J]. Bioresource Technology, 2013, 129: 659-662
- [16] He BF, Wang R, Wu XM, et al. The application of solvent-tolerant β -fructofuranosidase Fru6 and its mutants: China, CN102732456A[P]. 2012-10-17. <http://www.aaptchina.com/zhuanni/7893604/> (in Chinese)
何冰芳, 王瑞, 吴薛明, 等. 耐有机溶剂糖苷酶 Fru6 及其突变体和应用: 中国, CN102732456A[P]. 2012-10-17. <http://www.aaptchina.com/zhuanni/7893604/>
- [17] Ai ZL, Jiang ZQ, Li LT, et al. Immobilization of xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 using resin D380[J]. Food and Fermentation Industries, 2004, 30(2): 10-14 (in Chinese)
艾志录, 江正强, 李里特, 等. 大孔树脂 D380 固定化橄榄绿链霉菌 E-86 来源木聚糖酶的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2): 10-14
- [18] Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, et al. Glutaraldehyde behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking[J]. Biotechniques, 2004, 37(5): 790-796, 798-802
- [19] Li BB, Chen Y, Cao Z, et al. Reversible, selective immobilization of nuclease P₁ from a crude enzyme solution on a weak base anion resin activated by polyethylenimine[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 101: 92-100
- [20] Katsuhiko M, Wang Q, Fujita K, et al. Continuous production of 4 G- β -D-galactosylsucrose (lactosucrose) using immobilized β -fructofuranosidase[J]. Journal of Applied Glycoscience, 2000, 47(3/4): 281-285
- [21] Zhang Y, Jiang B, Chen C. Immobilizing fructosyltransferase with ion-exchange resin and the optimal conditions[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2004, 23(4): 60-64 (in Chinese)
张艳, 江波, 陈超. 离子交换树脂固定果糖转移酶[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(4): 60-64
- [22] Sang YX, Sun JL, Yu HW, et al. Studies on the immobilization of pectinase with ionic exchange resin[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2006, 6(1): 71-74 (in Chinese)
桑亚新, 孙纪录, 于宏伟, 等. 离子交换树脂固定化果胶酶的研究[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 71-74
- [23] Zhang FH, Sun N, Zhang W, et al. Comparison of epoxy and amino resin carriers in immobilization of β -galactosidase[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2014, 16(5): 47-52 (in Chinese)
张丰华, 苏宁, 张伟, 等. 环氧基和氨基树脂固定化 β -半乳糖苷酶的比较研究[J]. 中国农业科技导报, 2014, 16(5): 47-52
- [24] Smaali I, Jazsar S, Soussi A, et al. Enzymatic Synthesis of fructooligosaccharides from date by-products using an immobilized crude enzyme preparation of β -D-fructofuranosidase from *Aspergillus awamori* NBRC 4033[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2012, 17(2): 385-392
- [25] Gutiérrez-Alonso P, Fernández-Arrojo L, Plou FJ, et al. Biochemical characterization of a β -fructofuranosidase from *Rhodotorula dairenensis* with transfructosylating activity[J]. FEMS Yeast Research, 2009, 9(5): 768-773
- [26] Zhu GL, Tong QY. Study on the synthesis of Lactosucrose by β -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(12): 188-190 (in Chinese)
朱桂兰, 童群义. β -呋喃果糖苷酶合成低聚乳糖的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(12): 188-190