

米曲霉 β -半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖的工艺研究

许牡丹, 杨伟东, 柯 蕾, 檀志芬, 崔丽娜

陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西咸阳 712081

摘要: 研究了反应时间、乳糖浓度、温度、加酶量、pH 对低聚半乳糖合成的影响, 结果表明, 加酶量、乳糖浓度、反应温度的影响较大。通过正交实验确定的米曲霉 β -半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖的最佳工艺条件为: pH 6.0、温度 55℃、乳糖浓度 40%、加酶量 40U/g、反应时间 32h。在最佳工艺条件下, 低聚半乳糖的合成率为 32.4%。

关键词: 米曲霉, 低聚半乳糖, β -半乳糖苷酶

Abstract The effects of the initial lactose concentration, temperature, enzyme amount and pH on the synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase were investigated. The result showed as follow: initial lactose concentration, enzyme amount and temperature had strong impacts on the reaction and the galacto-oligosaccharide yield reached 32.4% under the optimum conditions: time was 32h, temperature was 55℃, the initial lactose concentration was 40%, pH was 6.0 and the enzyme amount was 40U/g.

Key words Aspergillus oryzae, galacto-oligosaccharide, β -galactosidase

中图分类号: TS201.25 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2006)01-0183-04

低聚半乳糖 (简称 GOS) 是在乳糖的半乳糖基一侧以 β (1 $\rightarrow$ 3) β (1 $\rightarrow$ 4) 或 β (1 $\rightarrow$ 6) 键连接有 1~4 个半乳糖分子的寡糖类混合物¹。GOS 是母乳中的天然成分, 能有效促进双歧杆菌生长繁殖, 具有整肠、分解致癌物质、促进钙吸收和维生素合成等功能²。获取 GOS 主要有三条途径: 从天然原料中提取、酶法合成和化学合成³。但是自然界中 GOS 含量极少, 且无色, 不带电荷, 难以分离提取; 化学合成法需要使用大量的化学试剂, 易造成化学物质残留; 酶法合成,

尤其微生物酶法合成, 条件温和、生产成本低, 是生产 GOS 最理想的方法。酶法合成 GOS 又分为游离酶和固定化酶两种^{4,5}, 固定化酶法合成 GOS 具有酶利用率高、稳定性好、GOS 产率高、产物后处理工艺少等优点, 已成为 GOS 合成研究的热点。本文以乳糖为原料, 研究了不同因素对固定化 β -半乳糖苷酶催化合成 GOS 的影响, 并对其合成工艺条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

米曲霉 β -半乳糖苷酶 自制; 考马斯亮蓝 G-250 英国进口分装; 葡萄糖测定试剂盒 上海荣盛生物技术有限公司; 海藻酸钠、乳糖、戊二醛 均为分析纯试剂。

HWY-100B 恒温培养摇床, DG-401 型电热恒温培养箱, YY0088-92 型微量进样器, 722 型分光光度计, FA2004 电子天平。

1.2 实验方法

1.2.1 固定化酶的制备 将一定浓度的海藻酸钠与一定比例 β -半乳糖苷酶液混合, 37℃ 水浴使海藻酸钠融化, 再用注射器逐滴滴入氯化钙溶液中, 移入 4℃ 冰箱中硬化 2h, 过滤洗涤, 加入戊二醛溶液, 交联 4h, 洗涤, 测定酶活力。

1.2.2 固定化酶活力的测定 10mL 1% 乳糖底物 (pH 6.0 磷酸缓冲液配制) 加入 2g 固定化酶, 200r/min 50℃ 反应 10min, 用葡萄糖试剂盒测酶活。酶活定义为: 在 55℃, pH 6.0 条件下, 每分钟释放 μ mol 葡萄糖所需酶量为 1 个活力单位。

1.2.3 GOS 的合成 将配制的磷酸缓冲溶液置于 150mL 带塞锥形瓶中, 加入乳糖溶液, 预热后加入固定化 β -半乳糖苷酶, 在转速为 200r/min 的恒温摇床中震荡反应, 取样, 用薄层色谱法检测各糖组分的含量。

收稿日期: 2005-07-22

作者简介: 许牡丹 (1963-), 女, 教授, 研究方向: 食品生物技术与分析检测。

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目 (2001SM 29)。

1.2.4 GOS的检测 采用上行的薄层色谱法,以硅胶G作薄板,正丙醇:水=85:15为展开剂,点样量为 $0.2\mu\text{g}/\mu\text{L}$,用苯胺-二苯胺-磷酸溶液喷雾后于 110°C 加热下显色 10min ,用直接测定法检测各糖组分含量。

1.2.5 单因素实验 按照GOS的合成方法,以GOS合成率为考察指标,依次进行了6个乳糖浓度(%):20 30 40 50 60 70;5个反应温度($^{\circ}\text{C}$):30 40 50 60 70;6个pH:3.5 4.5 5.0 5.75 6.5 7.5;10个加酶量(U/g乳糖):10 20 30 40 50 60 70 80 90 100;16个反应时间(h)的单因素实验。每个水平重复3次,测定结果取平均值。

1.2.6 正交实验 根据单因素实验结果,以GOS得率为考察指标,选择反应温度、乳糖浓度、酶用量和反应时间,设计五因素四水平正交实验 $L_{16} 4^5$,并重复3次,结果取其平均值,再通过极差分析和实验结果优化GOS酶法合成的最佳工艺条件。

2 结果与讨论

2.1 不同因素对GOS合成的影响

2.1.1 反应时间的影响 在反应温度 50°C 、乳糖浓度30%、pH5.5加酶量 40U/g 乳糖时,研究了水相中酶法合成GOS的反应历程,结果见图1。

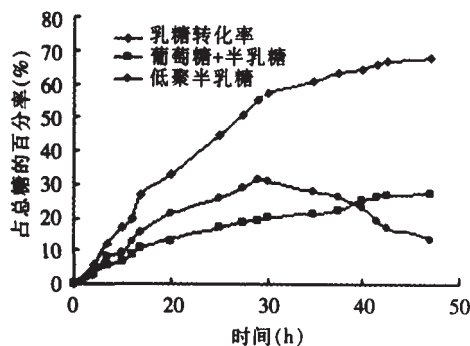


图1 反应时间对GOS合成的影响

随着时间的延长,乳糖转化率呈上升的趋势,葡萄糖和半乳糖的产率也呈缓慢上升的趋势,而GOS的合成率则呈现先上升后下降的变化,说明GOS的合成存在着最适的酶反应时间,反应时间太短或太长都不利于GOS的合成。

2.1.2 乳糖浓度的影响 在反应时间30h、温度 50°C 、pH5.5加酶量 40U/g 乳糖的条件下,研究了乳糖浓度对GOS合成的影响,结果如图2所示。

当乳糖起始浓度低于40%时,随着乳糖浓度的增加,乳糖转化率逐渐下降,葡萄糖和半乳糖的产率逐渐增加,GOS的合成率也呈增加的趋势,说明在一定范围内增加乳糖起始浓度能促进 β -半乳糖苷酶对乳糖的转苷作用。当乳糖起始浓度大于40%时,随着乳糖起始浓度继续增加,GOS合成率反而逐渐减少,这可能是由于乳糖不完全溶解,乳糖分子在水中的分散状态不好以及大量 β -乳糖异构化,影响了 β -

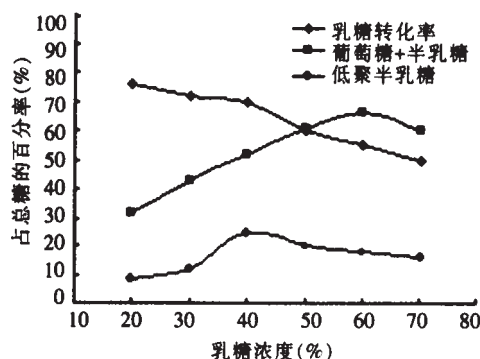


图2 乳糖浓度对GOS合成的影响

半乳糖苷酶的催化活力,致使 β -半乳糖苷酶水解和转苷作用同时下降。

2.1.3 反应温度的影响 在反应时间30h、pH5.5乳糖浓度40%、加酶量 40U/g 乳糖的条件下,研究了乳糖浓度对GOS合成的影响,结果见图3。

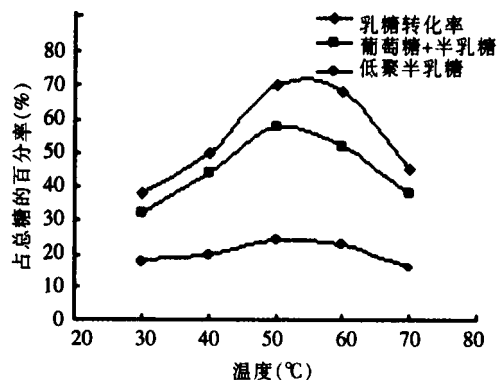


图3 反应温度对GOS合成的影响

由图3可以看出,反应温度小于 50°C 时,随着温度升高,乳糖转化率、葡萄糖和半乳糖产率逐渐增加,GOS合成率也呈增加趋势,说明温度在一定范围内升高利于转苷反应。这可能是由于水解反应的活化能较低,转苷反应的活化能较高的缘故。反应温度在 $55\sim 60^{\circ}\text{C}$ 范围内,乳糖转化率和GOS合成率变化均不明显。当温度超过 60°C 时,乳糖转化率和GOS合成率均明显降低,可能是由于 β -半乳糖苷酶部分变性所致。

2.1.4 酶用量的影响 在反应时间30h、乳糖浓度40%、温度 50°C 、pH5.5时,研究了不同酶用量对GOS合成的影响,结果见图4。

当酶用量低于 40U/g 乳糖时,随着酶量增加,GOS的合成率逐渐增加,但增加幅度不大。酶用量超过 40U/g 乳糖时,反应体系中GOS产量有所下降,GOS产量与加酶量之间未呈现线性关系。这是由于GOS在复杂的反应体系中,同时存在着的水解与糖苷转移反应,产物葡萄糖和半乳糖能够不同程度地抑制GOS的水解和糖苷转移反应。此外, β -半乳糖存在着变旋现象,由于变旋而产生的 α -半乳糖是更

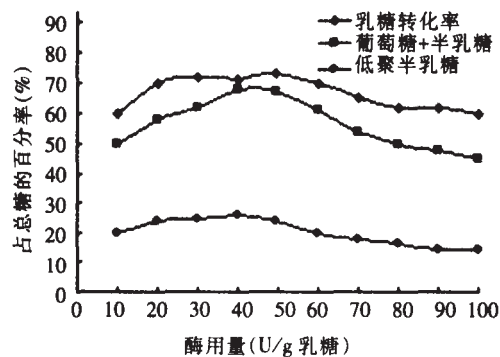


图4 酶用量对GOS合成的影响

强的抑制剂,致使酶的有效活力下降。
2.1.5 pH的影响 在反应时间 30h 乳糖浓度 40%、温度 50℃、加酶量为 40U /g乳糖时,研究了不同 pH 对 GOS合成及乳糖转化的影响,结果如图 5所示。

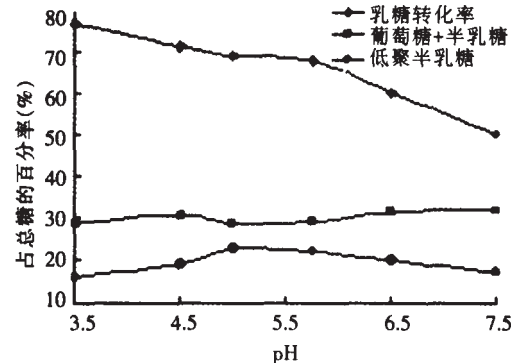


图5 不同pH对GOS合成的影响

随着反应体系中 pH的增加,乳糖转化率逐渐下降,GOS的产量表现为先增加后降低。pH在 4.5~5.75 区间,乳糖转化率缓慢下降,GOS的合成率较高,且变化幅度不大。当 pH小于 4.5或者大于 6.5时,GOS合成率均较低。乳糖转化率在 pH小于 4.5时比较高,可能是由于乳糖发生了酸水解的缘故。

2.2 GOS合成条件的优化

为了进一步确定固定化 β -半乳糖苷酶合成 GOS的最佳工艺参数,本研究进行了五因素四水平正交实验,共 16个处理,每个处理重复三次。结果见表 2。

对正交实验结果进行极差分析可知,各因素极差值大小顺序为 $R_C > R_D > R_A > R_B > R_E$,五个因素对 GOS合成影响的主次顺序为 $C \rightarrow D \rightarrow A \rightarrow B \rightarrow E$ 。分析得知各因素的最优水平组合是 $A_2 B_2 C_2 D_3 E_3$,即温度 55℃、pH6.0 乳糖浓度 40%、加酶量为 40U /g乳糖、反应时间 32h。在各因素的最优水平组合条件下对 GOS进行合成,重复三次进行验证实验,测得 GOS合成率平均为 32.4%,明显优于正交实验表中的 16个处理。

3 小结

选用米曲霉 β -半乳糖苷酶对 GOS进行催化合成,能明显提高 GOS的合成率。实验结果表明,反应时间、乳糖浓度、温度、加酶量、pH对 GOS的合成均能产生不同程度的影响,其中加酶量、乳糖浓度和反应温度的影响较大,是影响 GOS合成的主要因素。通过正交实验优化出的米曲霉 β -半乳糖苷酶催化合成

表 2 正交实验结果及分析

实验号	A 温度 /℃	B pH	C 乳糖浓度 %	D 加酶量 U /g乳糖	E 反应时间 h	GOS%
1	1 50	1 5.5	1 35	1 20	1 28	20.1
2	1	2 6	2 40	2 30	2 30	18.3
3	1	3 6.5	3 45	3 40	3 32	21.4
4	1	4 7	4 50	4 50	4 34	25.6
5	2 55	1	2	3	4	28.2
6	2	2	1	4	3	26.5
7	2	3	4	1	2	22.3
8	2	4	3	2	1	20.0
9	3 60	1	3	4	2	20.3
10	3	2	4	3	1	22.1
11	3	3	1	2	4	20.0
12	3	4	2	1	3	24.3
13	4 65	1	4	2	3	23.4
14	4	2	3	1	4	18.2
15	4	3	2	4	1	24.1
16	4	4	1	3	2	25.6
K_1	85.4	92.0	92.2	84.9	86.3	
K_2	97.0	85.1	94.9	81.7	86.5	
K_3	86.7	87.8	79.9	97.3	95.6	
K_4	91.3	95.5	93.4	96.5	92.0	
k_1	21.4	23.0	23.1	21.23	21.6	$\Sigma=360.4$
k_2	24.3	23.9	23.8	20.43	21.6	
k_3	21.7	22.0	20.0	24.33	23.9	
k_4	22.8	21.3	23.4	24.13	23.0	
R_j	2.9	2.6	3.8	3.7	2.3	

羧甲基壳聚糖可食用膜在油豆角保鲜中的应用

连玉晶¹, 唐晓珍¹, 赵海田², 姚磊², 邬元娟³, 王静²

1. 山东农业大学食品学院, 山东泰安 271018 2. 哈尔滨工业大学食品科学与遗传工程研究院, 黑龙江哈尔滨 150001 3. 山东省农科院, 山东济南 271000

摘要: 采用三因素三水平正交实验, 来确定 N O-羧甲基壳聚糖涂膜保鲜油豆角的保鲜液的最佳配比。结果表明, 2.0%壳聚糖、2.0 g/mL 6-BA 及 0.1 g/kg 脱氢醋酸钠混合制成的保鲜液, 可有效地保持油豆角良好的感官品质。

关键词: 油豆角, N O-羧甲基壳聚糖, 可食用膜

中图分类号: TS255.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2006)01-0189-02

壳聚糖 (Chitosan)^[1]是由甲壳质经脱乙酰作用, 脱去 C₂上的乙酰基而得到的。它不溶于水和碱溶液及一些有机试剂, 能与多种稀酸, 如盐酸、醋酸等结合形成盐类而溶于水。由于壳聚糖不溶于水和普通溶剂, 使其应用受到了很大的限制。通过对壳聚糖进行化学改性, 可以增加其水溶性, 提高其应用范围。将壳聚糖羧甲基化, 可制得 N O-羧甲基壳聚糖 (N O-carboxymethyl chitosan), 它溶于水, 在水溶液

中易形成牢固膜, 此膜对气体有选择渗透性, 特别适于果蔬保鲜。

油豆角 (*Phaseolus vulgaris* L.) 是黑龙江省特有的蔬菜品种, 它色泽嫩绿、味道鲜美、营养丰富, 深受消费者的喜爱, 但供应季节性强, 不耐贮存, 因此油豆角的保鲜问题一直是亟待解决的问题。本研究以羧甲基壳聚糖为主剂, 辅配其它助剂制成涂膜材料, 对油豆角进行涂膜保鲜实验, 以延长油豆角的贮藏期。

1 材料与方法

1.1 实验材料

油豆角 选取均匀、顺直、成熟度适当和无机械伤的紫花油豆角, 采摘后及时在 10℃冰箱中预冷; N O-羧甲基壳聚糖 由本实验室制备, 取代度为 1.02。

1.2 实验方法

1.2.1 涂膜液的配制 将制备的 N O-羧甲基壳聚糖溶于水, 分别配成浓度为 1.0%、1.5%、2.0% 的溶液作为主剂, 然后与不同浓度的副剂混合制成涂膜液, 副剂有 6-BA、脱氢醋酸钠等。

1.2.2 涂膜的方法 将供试油豆角在 100 mg/kg 次

收稿日期: 2005-07-05 通讯联系人

作者简介: 连玉晶 (1978-), 女, 助教, 研究方向: 食品化学。

基金项目: 黑龙江省教育厅科技重大项目 (No 105118004); 山东农业大学大学生研究训练 (SRT) 计划项目资助项目 (C0409076)。

上接第 185 页 GOS 的最佳工艺条件为: 反应体系的 pH 6.0, 温度 55℃, 乳糖浓度 40%, 加酶量 40 U/g 乳糖, 反应时间 32 h, 在此条件下 GOS 的合成率为 32.4%。

采用固定化 β-半乳糖苷酶对 GOS 进行催化合成, 不但能增加 β-半乳糖苷酶的稳定性, 而且能大大延长该酶的使用寿命, 减少由于酶的分离纯化所带来的生产成本的增加, 具有良好的发展应用前景。

参考文献:

1 Stahl B, Thul S, Zeng J, et al. Anal Biochem J 1994

223 218-226

2 Zarate S, Lopez-Leiva M H. Journal of Food Protection J 1990 53 3 262-268

3 Gekas V, Lopez-Leiva M H. Process Biochemistry J 1985 20 1 2-12

4 Prenosil J E, Stuker E, Boume J R. Biotechnol Bioeng J 1987 30 1026-1031

5 吴昊等. 高效薄层色谱法分析低聚半乳糖及其共存物 J. 乳品工业 2001 2.