

葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶复合体系提纯 异麦芽低聚糖的研究

徐小艳¹, 彭 聪¹, 田兴国²

(1 广州市农业标准与监测中心, 广东 广州 510308; 2 华南农业大学 科技处, 广东 广州 510642)

摘要:以葡萄糖氧化酶(GOD)和过氧化氢酶(CAT)协同作用提纯商品异麦芽低聚糖,并采用均匀设计法结合单因素试验确定了最佳工艺条件:当温度 40 ℃, pH 4.0, 底物质量浓度 200 g/L, GOD 的用量 100 U/g, CAT 与 GOD 的酶活力比为 15 时, 其中的葡萄糖被完全除去, 异麦芽低聚糖的纯度由 62.78% 提高到 85.28%.

关键词:复合酶; 提纯; 异麦芽低聚糖

中图分类号: TS245.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)04-0102-04

Studies on purifying isomalto-oligosaccharide by combined enzyme of glucose oxidase and catalase

XU Xiao-yan¹, PENG Cong¹, TIAN Xing-guo²

(1 Guangzhou Agricultural Standard and Supervisory Center, Guangzhou 510308, China;

2 Division of Science and Technology Management, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Commercial isomalto-oligosaccharide was purified by combined enzyme of glucose oxidase (GOD) and catalase (CAT). The optimal conditions for the reaction were obtained by using uniform design and single factor experiment, which were 40 ℃, pH 4.0, 200 g/L sugar concentration, 100 U/g GOD concentration and 15 of ratio of GOD to CAT. The glucose was completely eliminated, and the purity of isomalto-oligosaccharide was increased to 85.28% from 62.78%.

Key words: combined enzyme; purify; isomalto-oligosaccharide

异麦芽低聚糖(IMO)具有低甜度、低热量、抗龋齿以及双歧因子特性等许多优异的生理功能. 近年来,在医药保健、功能性食品和饲料添加剂等行业得到了广泛的应用. 目前采用酶法生产异麦芽低聚糖的产率仅为 50% 左右,其中葡萄糖和麦芽糖的含量将近一半^[1],严重影响了其功能效价和商业价值. 因此,如何提高 IMO 的纯度,一直是工艺需要解决的关键问题. 本研究确定了葡萄糖氧化酶(GOD)和过氧化氢酶(CAT)双酶协同作用提纯 IMO 的最佳工艺条件,将葡萄糖氧化成葡萄糖酸而分离除去,从而提高产品的纯度,为今后的研究工作提供了可靠的参考数据.

1 材料与方法

1.1 材料

葡萄糖氧化酶(GOD, EC1.1.3.4)产于黑曲霉,标签活性为 20 U/mg,购于 Amresco 公司;过氧化氢酶(CAT, EC1.11.1.6)从牛肝提取,标签活性为 2 000 ~ 5 000 U/mg,购于 Sigma 公司;其余试剂均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 葡萄糖含量的测定 采用葡萄糖氧化酶法^[2,3].

1.2.2 葡萄糖氧化酶活力测定 化学滴定法^[4,5]:以每分钟催化生成 1 μmol 葡萄糖酸的酶量为一个酶

活力单位(U);分光光度法^[6]:以光密度对反应时间作图,线性部分斜率即为 GOD 活性.

1.2.3 pH 的测定 用 pH S-3C 精密 pH 计测定.

1.2.4 异麦芽低聚糖成分的测定 HPLC 法(归一化定量法)^[7]:采用惠普 HP 1100 液相色谱仪,250 mm×4.6 mm zorbax 氨基柱,示差检测器.流动相为 V(乙腈):V(水)=7:3,流速 1 mL/min.柱温 30 ℃,进料量 10 μL;进样前,异麦芽低聚糖液过 0.45 μm 微孔滤膜.

2 结果与分析

2.1 均匀设计试验结果

在总结有关文献资料^[8,9]进行大量预试验的基础上,筛选对反应有重要影响的 4 个因素:反应温度(X_1)、体系 pH(X_2)、糖质量浓度(X_3)以及 GOD 的用量(X_4).根据均匀设计的试验原理和使用原

则^[10],按均匀设计表 $U_9(9^5)$ 设计试验方案,考察 4 个因素对葡萄糖残留率(Y)的影响(表 1),应用中国均匀设计学会和东北制药总厂研究院联合研制的“均匀设计软件包”进行数据处理和线性回归,所得回归方程为 $Y=0.5332+5.332\times 10^{-4}X_1^2-1.292\times 10^{-5}X_3-5.532\times 10^{-2}X_4$,理论最优值: X_1 为 30 ℃, X_2 为 5, X_3 为 200 g/L, X_4 为 100 U/g(固定 CAT 与 GOD 的酶活力比为 14.5),预报最优 Y 值为 0.75%.根据所得结果和试验现象,确定单因素试验的基本范围:温度 30~55 ℃;pH 3~10;糖质量浓度 100~300 g/L;酶用量:GOD 按总糖量 80~140 U/g, CAT 为 1160~2030 U/g.

2.2 最优条件的确定

在均匀设计试验结果的理论分析基础上进行单因素试验,进一步分析研究各试验条件下的 GOD 酶活力或糖液中葡萄糖残留率,从而确定最优条件.

表 1 反应条件的均匀设计试验及结果 $U_9(9^5)$

Tab. 1 The tests and results of uniform design for reaction condition

$t/^\circ\text{C}$ (X_1)	pH (X_2)	$\rho(\text{糖 sugar})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ (X_3)	GOD 量 GOD conc./($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) (X_4)	葡萄糖残留率 glucose residual rate/% (Y)
30	4	100	100	1.02
35	6	180	90	0.89
40	8	80	80	1.23
45	10	160	70	1.58
50	3	60	60	1.87
55	5	140	50	1.96
60	7	40	40	2.30
65	9	120	30	2.86
70	11	200	20	2.90

2.2.1 温度对 GOD 酶活性的影响 温度对酶反应的影响很大,绝大多数酶在 60 ℃ 以上即失活,在低温下则反应进行十分缓慢.将含酶体系分别在 30、35、40、45、50 和 55 ℃ 下反应 10 min,然后用化学滴定法测 GOD 酶活性.结果如图 1 所示,GOD 的最适温度为 40 ℃.

将 pH 5.6 的含酶缓冲液分别置于 30、35、40、45、50 和 55 ℃ 下保温 2 h.然后按酶活力测定方法测定其残余酶活力,由图 1 可知,当温度高于 40 ℃ 时,GOD 热稳定性下降.当温度至 55 ℃ 时,酶活性仅为最高活性的 31%.

2.2.2 pH 对 GOD 酶活性的影响 配制不同 pH 缓冲液:pH 为 3~8 时,用柠檬酸-磷酸氢二钠溶液配制;pH 为 8~10 时,用甘氨酸-氢氧化钠溶液配制.然后用分光光度法测定 GOD 酶活力.结果如图 2 所示,GOD 的最适 pH 为 4.0.

将酶液置于不同 pH 缓冲液中,于 30 ℃ 条件下保存 2 h,然后用化学滴定法测定其残余酶活力.由

图 2 可知在 pH 3.5~7.0 范围内,GOD 残余酶活力在 80% 左右.当 pH 高于 7.0 时,酶活力急剧下降.

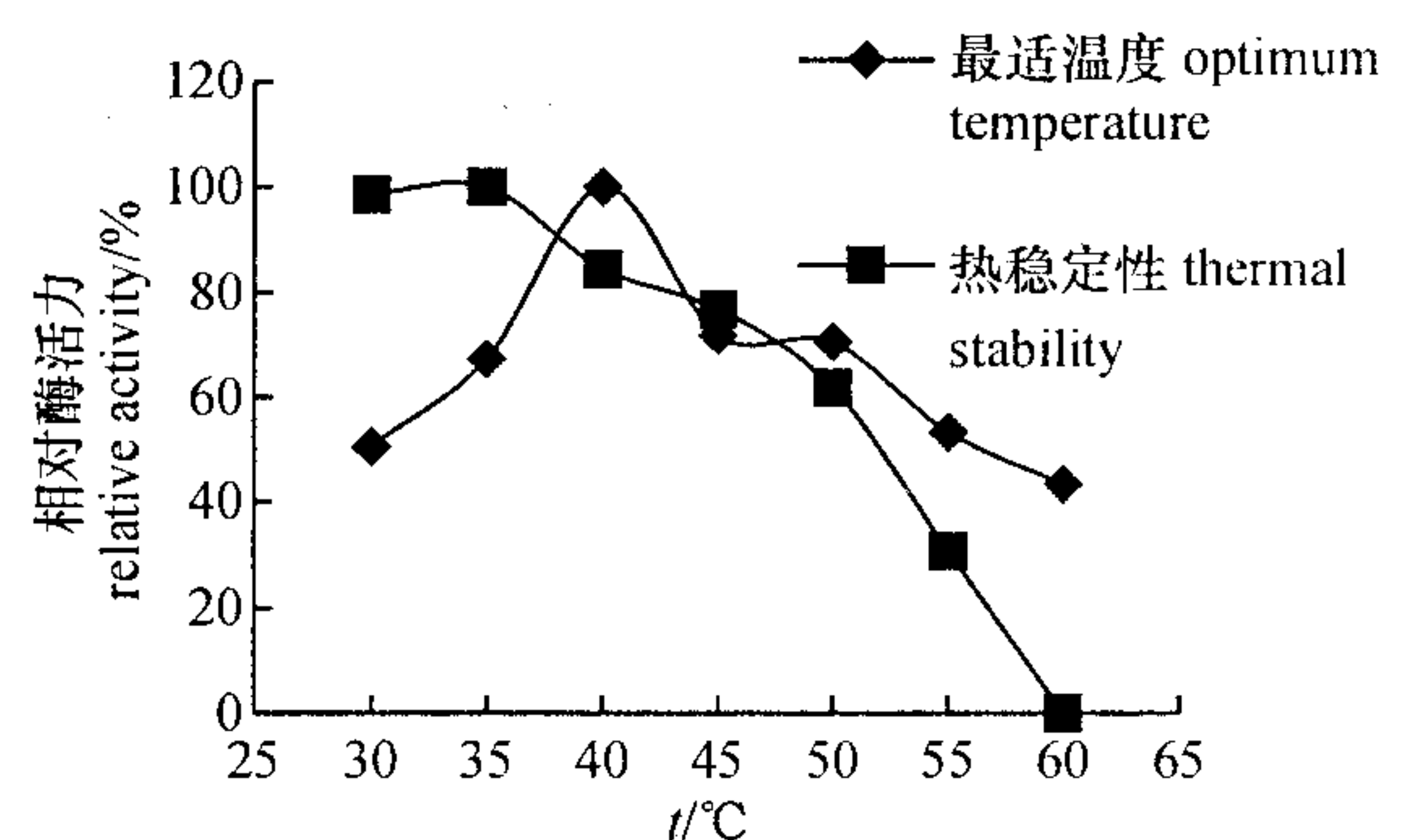


图 1 温度对 GOD 酶活性的影响

Fig. 1 Effect of temperature on activity of GOD

2.2.3 底物质量浓度对葡萄糖残留率的影响 按总糖量保持体系酶的添加量为 100 U/g,改变糖质量浓度.保持体系 pH 为 4.0,温度 40 ℃ 条件下反应 30 h 后测定葡萄糖残留量,结果如图 3.当底物质量浓度低于 200 g/L 时,随着底物质量浓度增加,葡萄

糖残留率降低,但当底物质量浓度高于 200 g/L 时,葡萄糖残留率反而增大,所以,最佳底物质量浓度为 200 g/L.

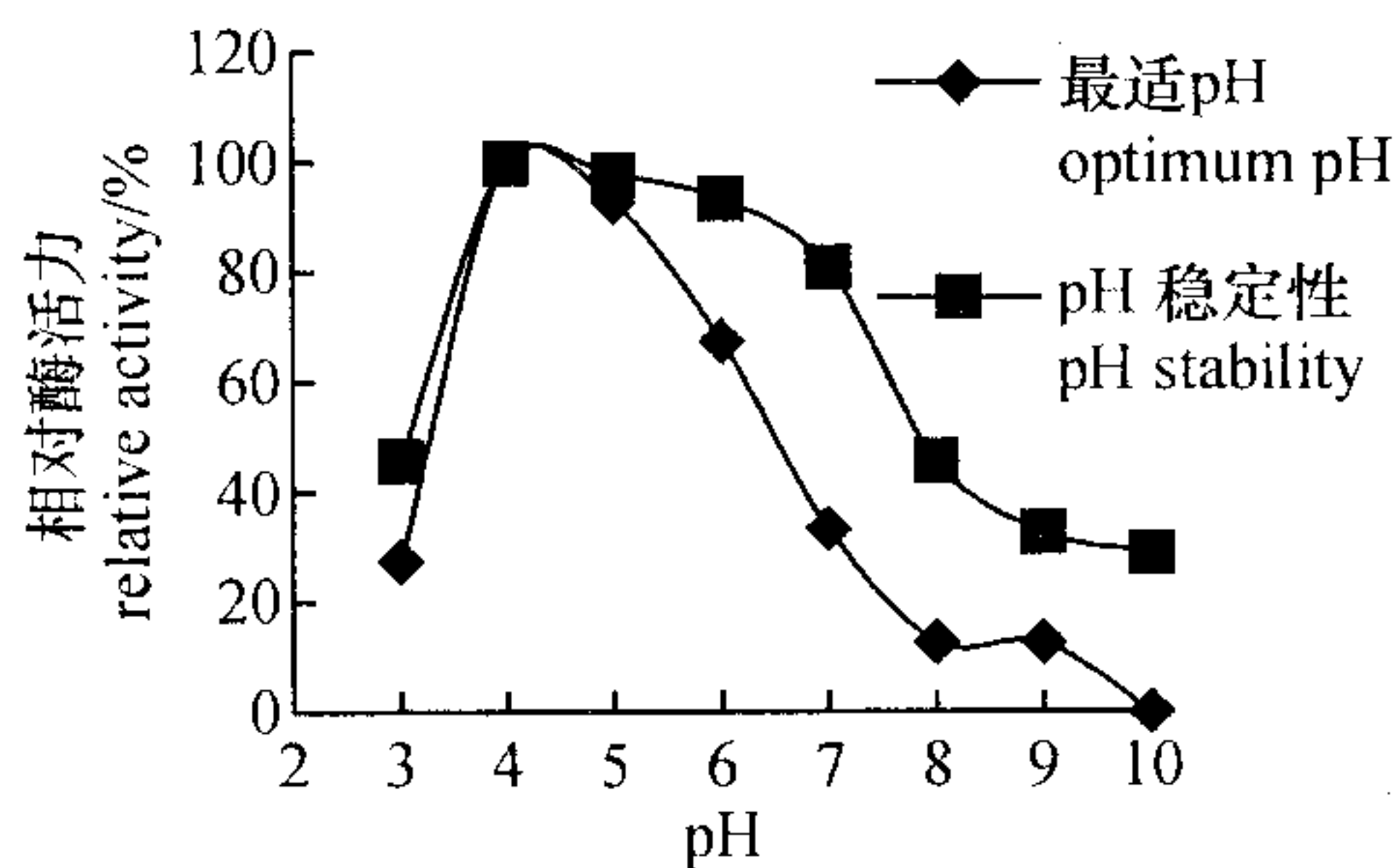


图2 pH 值对 GOD 酶活性的影响

Fig. 2 Effect of pH on activity of GOD

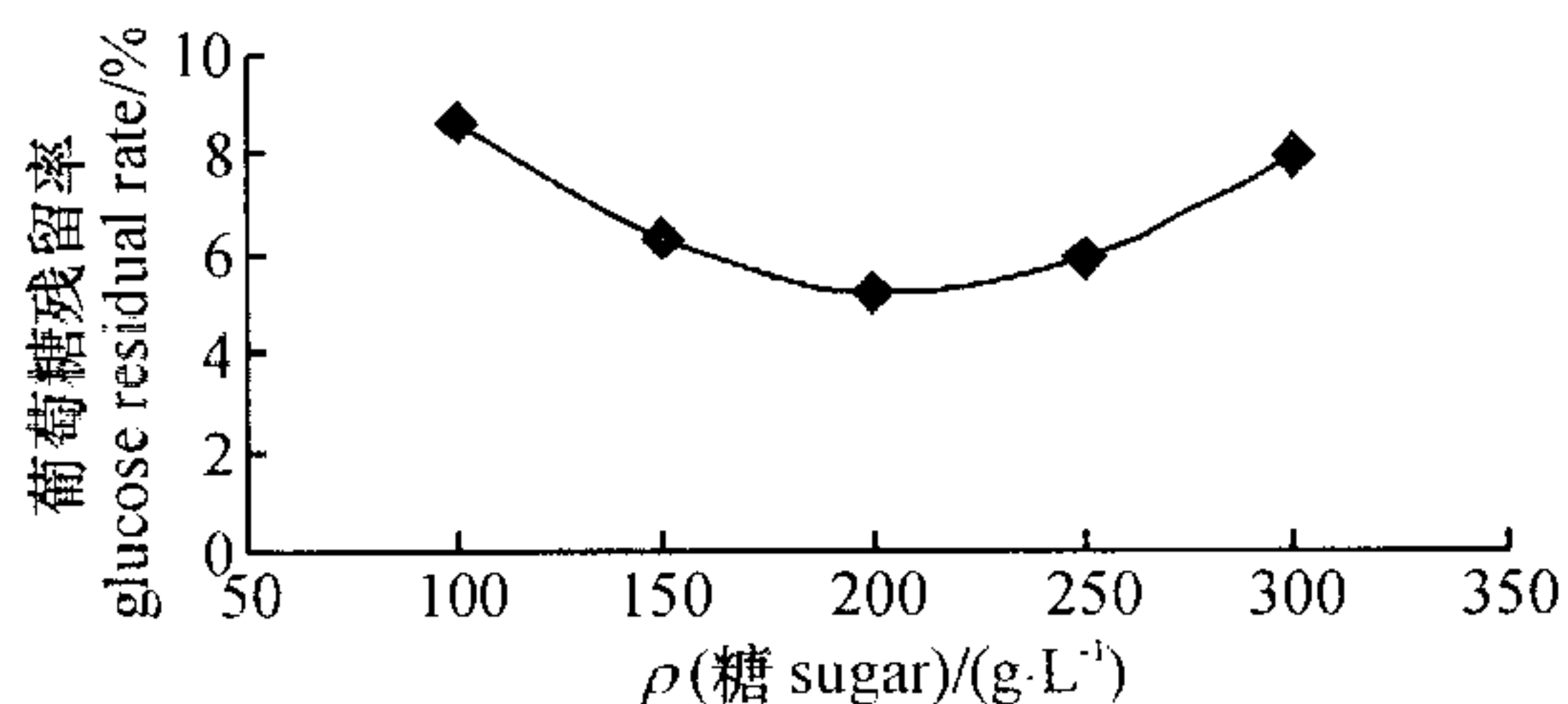


图3 底物质量浓度对葡萄糖残留率的影响

Fig. 3 Effect of sugar on glucose residual rate

2.2.4 酶用量的确定 固定 CAT 与 GOD 的酶活力比为 10, 分别添加不同量 GOD (80、100、120 和 140 U/g). 在反应过程中, 不断滴加 0.1 mol/L 的 NaOH 以保持体系 pH 4.0 左右, 得到图 4. 结果表明, 随着反应时间延长, 葡萄糖残留率降低, 而且酶用量越大, 葡萄糖氧化速度越快. 但是到一定时间后, 葡萄糖含量趋于稳定, 而且除了 GOD 为 80 U/g 外, 其余的最终趋于一致. 所以, GOD 用量采用 100 U/g.

确定 GOD 的用量, 改变 CAT 的用量, 得到图 5. 结果表明: 当 CAT 与 GOD 的酶活力比低于 15 时, 随着 CAT 与 GOD 的用量比增大, 葡萄糖残留率降低.

当 CAT 与 GOD 的酶活力比高于 15 以后, 葡萄糖残留率的变化趋于平缓. 这说明, CAT 与 GOD 的用量达到一定比例后, 再增加 CAT 已经无益于反应. 所以, CAT 与 GOD 的最佳酶活力比为 15.

2.3 葡萄糖去除前后异麦芽低聚糖的成分比较

在经过酶反应后的异麦芽低聚糖液中加入氢氧化钙, 生成葡萄糖酸钙, 再结晶、过滤纯化. 用 HPLC 法检测分离纯化后糖液的组分, 并与原料糖液对比, 结果如表 2 所示. 经过分离纯化后, 葡萄糖已完全被除去, 而其他成分在总糖中的相对含量增大, 异麦芽低聚糖的质量分数提高到 85.28%, 功能性成分也由 42.58% 提高到 65.86%.

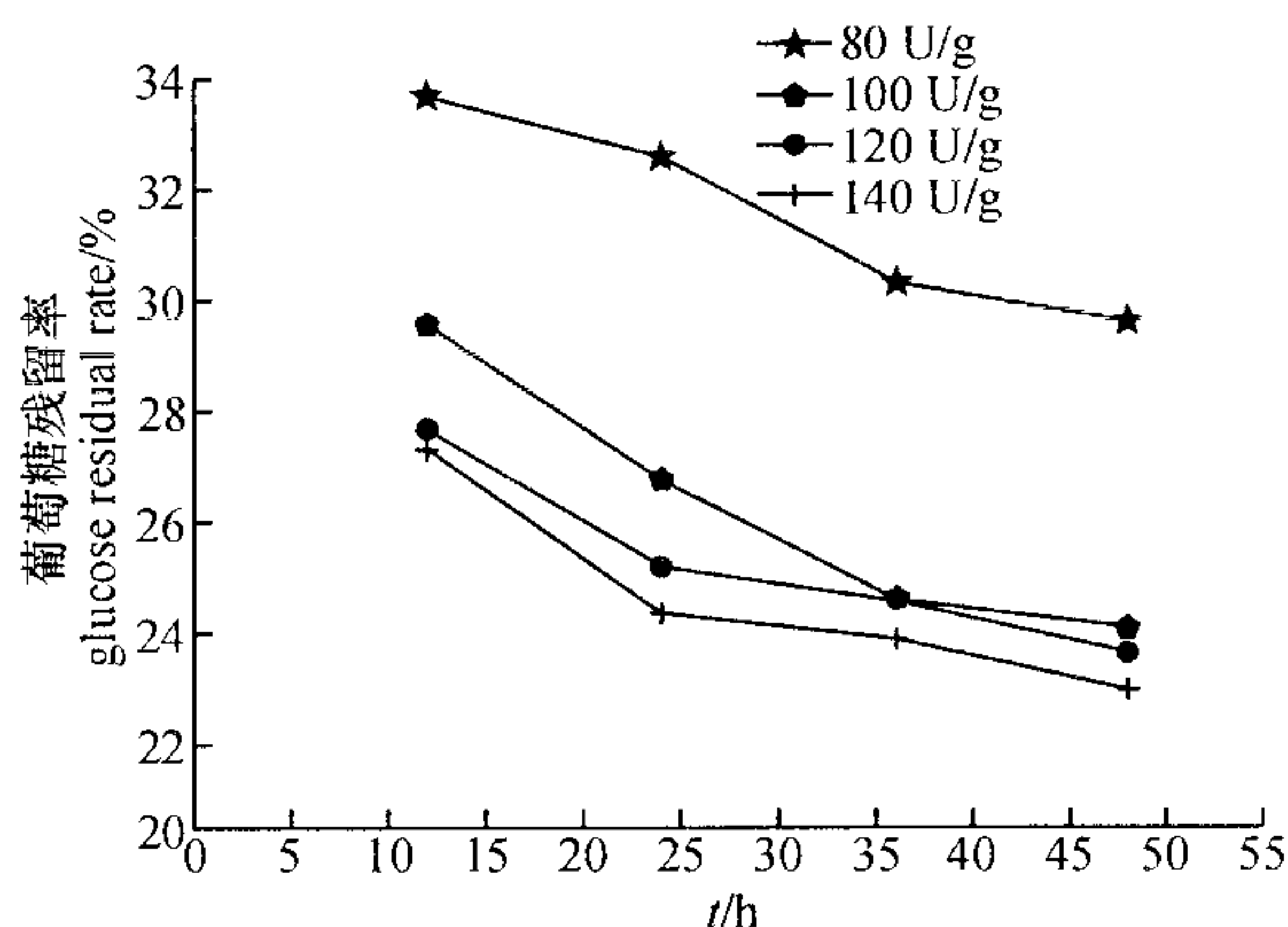


图4 GOD 用量对葡萄糖残留率的影响

Fig. 4 Effect of GOD on glucose residual rate

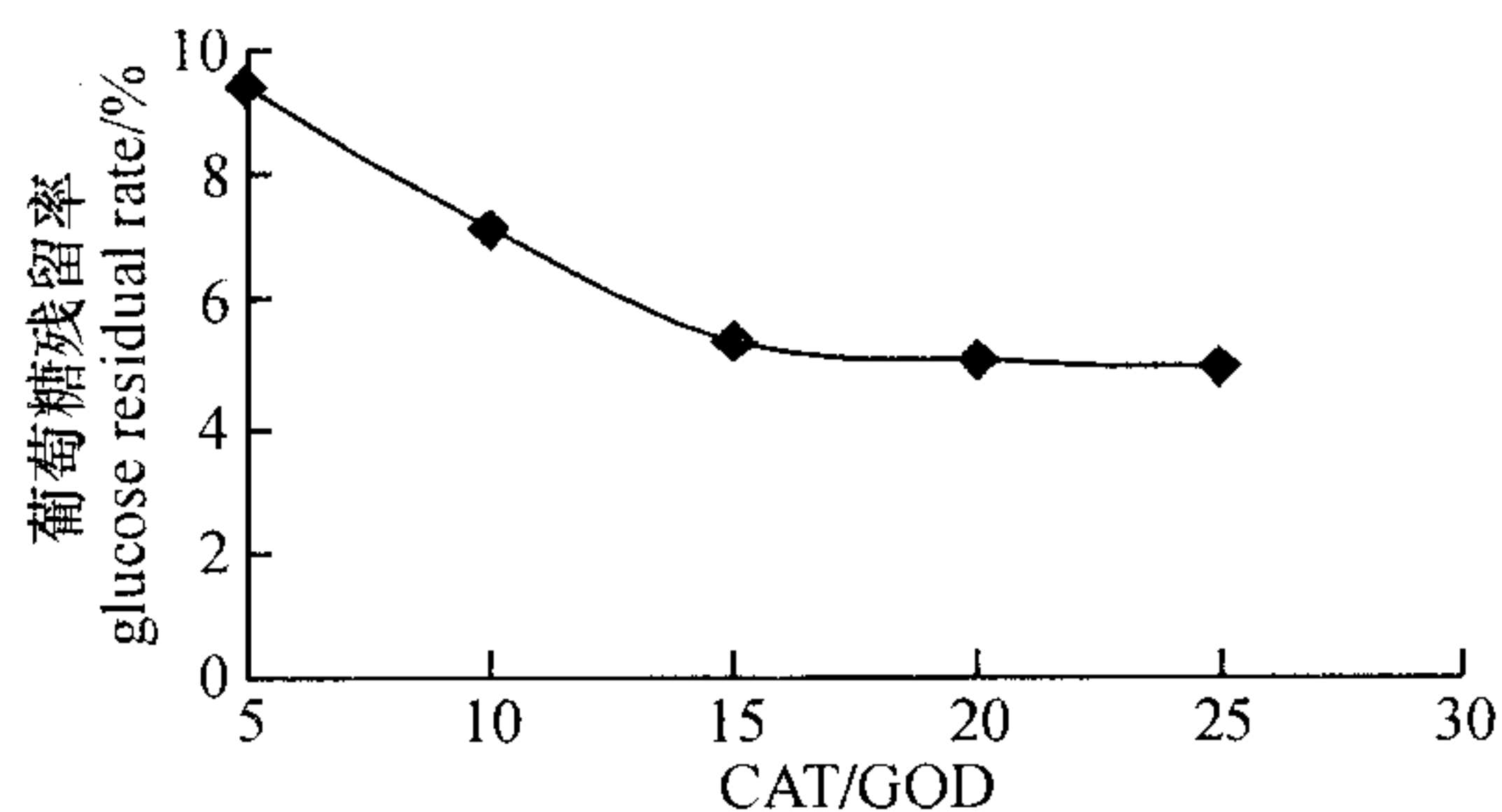


图5 CAT 与 GOD 的酶活力比对葡萄糖残留率的影响

Fig. 5 Effect of ratio of CAT to GOD on glucose residual rate

表2 分离纯化后异麦芽低聚糖组分的变化

Tab. 2 Change of isomalto-oligosaccharide (IMO) ingredients after separation and purification

异麦芽低聚糖浆 IMO syrup	葡萄糖 glucose	麦芽糖 maltose	异麦芽糖 isomaltose	麦芽三糖 maltotriose	潘糖 panose	异麦芽三糖 isomaltotriose	功能性成分 functional ingredients	异麦芽低聚糖 IMO
原料 raw syrup	26.31	8.36	18.20	2.55	19.60	4.78	42.58	62.78
纯化后 purified syrup	0	10.77	25.41	3.95	32.29	8.17	65.83	85.28

3 讨论与结论

对异麦芽低聚糖的研究, 我国起步较晚. 与日本普通商品异麦芽低聚糖相比, 我国的商业产品中异

麦芽低聚糖含量较低. 因此必须把葡萄糖去除, 从而提高其有效糖分. 目前已有报道用酶法成功地分离葡萄糖和果糖^[6,8].

本研究中, 通过温度和 pH 值对 GOD 酶活力影

响的试验分析,发现 GOD 的最适温度为 40 ℃. 当温度高于 40 ℃时,GOD 酶热稳定性下降,这与 Nakamura 等^[11]报道的一致. 在 pH 3.5 ~ 7.0 范围内,GOD 残余酶活力在 80% 左右. 当 pH 高于 7.0 时,酶活力急剧下降,最适 pH 为 4.0,这与 Lamia 等^[6]、毛秋霞等^[9]报道相符. 最佳底物质量浓度为 200 g/L. 体系反应速度随着酶用量的增大而加快,但是如果酶的添加量过高会引起酶的使用率下降,并且使用成本升高. 故 GOD 用量采用 100 U/g 为宜. 与有些报道^[6,8]不同的是,本试验讨论了反应中 CAT 和 GOD 这 2 种酶的酶活力比对葡萄糖残留率的影响,为酶的合理经济使用提供了可靠的参考数据. 另外,本研究采用均匀设计法初步确定 4 个影响因素的试验范围. 这样大大减少了试验次数,缩短了试验时间.

用复合酶法分离提纯异麦芽低聚糖,可以将葡萄糖转化成葡萄糖酸,再转化成葡萄糖酸钙,从而获得新产品——葡萄糖酸钙. 葡萄糖酸钙易被人体吸收,是良好的补钙原料,这又给工厂带来新的收益. 该法也为其他低聚糖的生产提供试验基础和参考资料.

参考文献:

- [1] 杨连生,扶雄,何小维,等. 以 α -葡萄糖苷酶为主酶制备异麦芽低聚糖[J]. 食品科学, 1999, 20(2):20-22.
- [2] ZHU M, HUANG X M, SHEN H X. Microbial enzymatic

assay of glucose in serum[J]. Analytica Chemic Acta, 1997, 349:165-170.

- [3] 张宗成. 食品中葡萄糖的酶-比色法分析[J]. 中国科学技术大学学报, 1996, 26(4):534-538.
- [4] 张树政. 酶制剂工业:下册[M]. 北京:科学出版社, 1984. 679-680.
- [5] LU T H, PENG X Y, JI L N. The production of glucose oxidase using the waste myceliums of *Aspergillus niger* and the effects of metal ions on the activity of glucose oxidase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 19: 339-342.
- [6] LAMIA L H, 江波,王璋. 双酶法生产高纯度低聚果糖的研究[J]. 食品科学, 1997, 18(9): 24-27.
- [7] 钟振声,徐小艳,田兴国. 提纯异麦芽低聚糖的酵母菌株筛选及发酵条件[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(2):45-48.
- [8] 郑喜群,王文侠,刘晓兰,等. 酶法分离葡萄糖和果糖的研究[J]. 中国甜菜糖业, 2001, 6(2):16-18.
- [9] 毛秋霞,黄永芳,陈甜女,等. 几种葡萄糖氧化酶部分性质的比较[J]. 华南农业大学学报, 2000, 21(2):54-56.
- [10] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京:科学出版社, 1994. 13-18.
- [11] NAKAMURA S, HAYASHI S, KOGA K. Effect of periodate oxidation on the structure and properties of glucose oxidate[J]. Biochem Biophys Acta, 1976, 445: 294-308.

【责任编辑 李晓卉】

(上接 98 页)

3 结论

本次试验结果表明,总产仔数和产活仔数以长大杜太最高,生长速度和饲料报酬以杜长大、长大杜太和长大皮太较好,胴体瘦肉率依次为杜长大、皮杜太、长大皮太和长大杜太,保水性好的有长大杜太,肌肉脂肪含量以长大杜太较好. 因此,太湖猪土四元杂交组合在繁殖性能和肉质特性方面有突出表现,尤其是以长大杜太组合的杂交效果较为理想.

参考文献:

- [1] 柳小春,施启顺,陈斌,等. PIC 配套系组合与杜长大

杂种猪肥育对比试验报告[J]. 养猪, 2003, 4: 18-20.

- [2] 许振英. 中国地方猪种质特性[M]. 杭州:浙江科技出版社, 1989. 72-156.
- [3] 储明星,吴常信. 我国关于太湖猪与西方猪的杂交效果[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1999, 6:9-11.
- [4] 江西省畜牧兽医局. 种畜种禽品种标准及生产技术规范[M]. 南昌:江西科学技术出版社, 1996. 246-252.
- [5] 明道绪. 生物统计附试验设计[M]. 第3版. 北京:中国农业出版社, 2003. 92-149.

【责任编辑 柴焰】