

固定化蔗糖酶水解蜂蜜蔗糖的研究

彭万霖 田小光 曹亚斌 李荣萍 姜秀兰 于得水*

(黑龙江省科学院应用微生物研究所, 哈尔滨 150010)

用复合破壁方法从酵母提取蔗糖酶, 用海藻酸钙凝胶包埋、戊二醛交联方法制备固定化蔗糖酶, 并在 40℃ 下进行脱水处理。对自然酶和固定化酶的酶学性质进行了系统研究。自然酶和固定化酶的最适底物浓度为 10%, 最适反应时间是 120 分钟, 最适 pH 是 4.0, 最适反应温度自然酶是 50℃, 固定化酶 60℃。果糖对自然酶和固定化酶有很强的抑制作用, 在果糖和葡萄糖并存情况下抑制作用降低。用固定化蔗糖酶反复水解蜂蜜蔗糖 40 批, 蜂蜜中蔗糖含量由 10% 下降为 5% 以下, 固定化蔗糖酶仍保持 75% 水解酶活力。

关键词 固定化蔗糖酶; 蜂蜜蔗糖

蜂蜜含有 35% 左右葡萄糖、35% 左右果糖和 5% 以下蔗糖, 这种蜂蜜既可内销, 又可出口。但因受气候条件等因素的影响, 蔗糖含量高达 10% 左右, 直接影响蜂蜜出口, 至今仍未有有效的解决办法。

从果糖末端切开蔗糖为葡萄糖和果糖的酶, 即为通常所指的蔗糖酶 (Sucrase, EC.3.2.1.26)。Berthelot 用乙醇沉淀法, 首先分离出酵母蔗糖酶^[1], 其后许多学者对蔗糖酶和固定化蔗糖酶作了许多研究, 但未见关于海藻酸钙-戊二醛方法制备固定化蔗糖酶的报道^[2-10]。我国也很少进行蔗糖酶的研究^[11]。

我们采用复合破壁方法, 从酵母提取蔗糖酶, 以海藻酸钙-戊二醛方法制备固定化酶。在对自然酶和固定化酶性质系统研究基础上, 对固定化蔗糖酶反复水解蜂蜜蔗糖进行了研究。

材 料 和 方 法

(一) 酵母

面包酵母为齐齐哈尔市嫩江食品厂产品。

(二) 蜂蜜

由哈尔滨市蜂产品加工厂提供。

(三) 试剂

蔗糖为优级纯(转化糖 0.05% 以下); 戊二醛为 E. Merck 进口分装; 海藻酸钠为食品级, 大连水产化工厂产品; 其他试剂均为分析纯。

(四) 蔗糖酶诱导培养基

1. 培养基 A(%): 蔗糖 1, KH_2PO_4 0.02, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.02, KNO_3 0.005, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005, pH4.5。

本文于 1991 年 1 月 19 日收到。

* 东北农学院生物工程系实习生。现在工作单位: 黑龙江省科学院应用微生物研究所。

2. 培养基 B(%) : 蔗糖 1, KH_2PO_4 0.02, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.02, KNO_3 0.005, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005, 酵母膏 0.3, 蛋白胨 0.3, pH 4.5。

(五) 蔗糖酶提取方法

酵母经充分冻融后, 用水浸出部分蔗糖酶, 10000r/min 离心 20 分钟, 然后用 1% NaOH 溶液处理酵母 30 分钟, 10000r/min 离心 20 分钟, 提取剩余的蔗糖酶, 用醋酸调 pH 4.5, 用 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析 16—18 小时, 收集沉淀蔗糖酶。

(六) 固定化蔗糖酶的制备

将一定量蔗糖酶同 3% 海藻酸钠溶液混匀, 注入 3% CaCl_2 溶液中, 固化 1 小时, 用水洗净, 再用 1% 戊二醛溶液交联 30 分钟, 洗净, 40℃ 以下吹干。

(七) 固定化蔗糖酶水解蜂蜜蔗糖

将固定化蔗糖酶加入预热的 50ml 蜂蜜中, 50℃ 振荡反应 30 分钟, 将固定化酶迅速滤出, 水洗淋干后, 进行下批反应。

(八) 各种糖的测定

1. 总糖与蔗糖测定: 费林法^[12]。
2. 转化糖测定: Somogyi 方法^[13]。

(九) 蔗糖酶活力测定

适当稀释的酶液 1ml, 0.06mol/L 蔗糖溶液 0.5ml, 0.1mol/L pH 5.2 磷酸盐缓冲液 0.5ml, 40℃ 反应 2 小时。终止反应后, 用 Somogyi 法测定转化糖。在测定条件下, 生成 1μg 转化糖所需的酶量定义为一个酶活力单位(u)。

(十) 蔗糖酶的诱导

以 5% 的酵母接种量接入 100ml 诱导培养基中, 30℃ 通气诱导 48 小时。

结 果

(一) 蔗糖酶的诱导

蔗糖酶是一种诱导酶, 用蔗糖诱导, 则酶活力有很大提高, 结果见表 1。低浓度诱导物效果较好, 1% 蔗糖诱导效果最好, 酶活力提高 71.9%; 培养基 B 的诱导效果好于培养基 A。

工厂以糖蜜为原料生产面包酵母, 糖蜜中含有大量蔗糖, 因而酵母的培养过程也是蔗糖酶的诱导过程。因此, 实验室使用工厂生产的酵母做诱导试验, 不可能取得更显著的效果。

(二) 表面活性剂对酶活力的影响

将酵母用表面活性剂——曲通 X-100 处理 1 小时, 观察对酶活力的影响, 结果见表 2。用曲通 X-100 处理细胞后, 细胞通透性明显加强, 有利于酶的释放。酶活力比对照组提高 10% 以上。

(三) 酵母细胞破壁方法的比较

酵母蔗糖酶是一种胞内酶, 细胞破壁效果直接影响酶的提取。为了确定有效的破壁方法, 我们对各种方法进行了比较, 从表 3 看出, 冻融法效果最好, 但为了使胞内酶全部提取出来, 最好采用复合破壁方法。

表 1 蔗糖酶的诱导

Table 1 Induction of sucrase

培养基 Medium	蔗糖 Sucrose 1%		蔗糖 Sucrose 3%		蔗糖 Sucrose 5%		蔗糖 Sucrose 7%	
	酶活 Activity (u/ml)	比对照提高 Increase (%)	酶活 Activity (u/ml)	比对照提高 Increase (%)	酶活 Activity (u/ml)	比对照提高 Increase (%)	酶活 Activity (u/ml)	比对照提高 Increase (%)
A	69300	44.0	66100	37.4	65000	35.1	78900	64.0
B	82700	71.9	81600	69.6	68700	42.8	72000	49.7
对照 None	48100 (u/ml)							

表 2 表面活性剂对蔗糖酶活力的影响

Table 2 Effect of surfactant on sucrase activity

组 别 Group	酶 活 力 Enzyme activity (u/ml)	比对照提高 Increase (%)
试验组 1 Test group 1	78400	13.5
试验组 2 Test group 2	76700	11.0
对照 None	69100	0

表 3 酵母细胞破壁方法的比较

Table 3 Comparison of breaking method of yeast cell wall

方 法 Method	酶活力 Activity (u/ml)
冻融法 Method of refrigeration and dissolution	195000
稀碱法 1% NaOH	58800
加热法 Heating method (38℃, 24h)	78000
研磨法 Grinding method	2004

(四) 蔗糖酶的性质

1. 不同酶量对蔗糖水解作用的影响: 将不同量 ($0.70 \times 10^5 \text{u}$ — $1.34 \times 10^5 \text{u}$) 的自然酶和固定化酶分别加到 pH 4.5, 50ml 10% 蔗糖溶液中, 50℃ 振荡反应 30 分钟, 终止反应后, 用 Somogyi 法测定转化糖。从图 1 看出, 随酶量增加, 对蔗糖水解作用加强, 自然酶水解作用分别高于固定化酶。

2. 底物浓度对蔗糖水解作用的影响: 取 pH 4.5 的 10%、20%、30%、40% 蔗糖溶液各 50ml, 分别加入 $1.34 \times 10^5 \text{u}$ 自然酶和固定化酶, 50℃ 振荡反应 30 分钟, 测定转化糖, 结果见图 2。10% 底物浓度, 酶水解速度最高, 随底物浓度增加, 酶水解速度降低。为保持酶最高水解速度, 一般应将底物浓度控制在 10% 左右为宜。

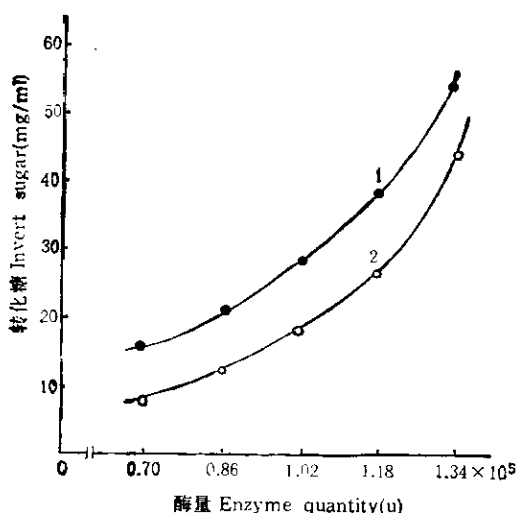


图1 酶量对蔗糖水解的影响

Fig. 1 Effect of different quantity of enzyme on sucrose hydrolysis

1. 自然酶 Native enzyme; 2. 固定化酶 Immobilized enzyme

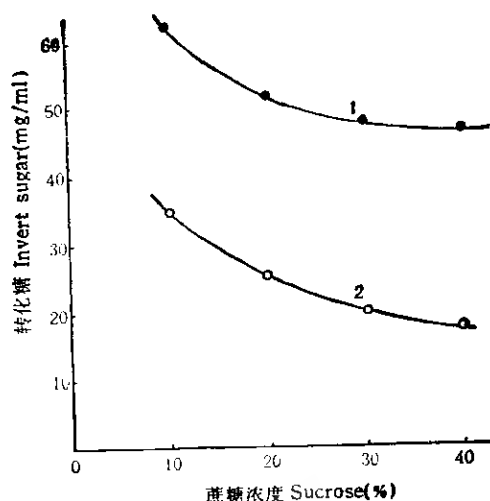


图2 底物浓度对蔗糖水解作用的影响

Fig. 2 Effect of substrate concentration on hydrolysis of sucrose

1. 自然酶 Native enzyme; 2. 固定化酶 Immobilized enzyme

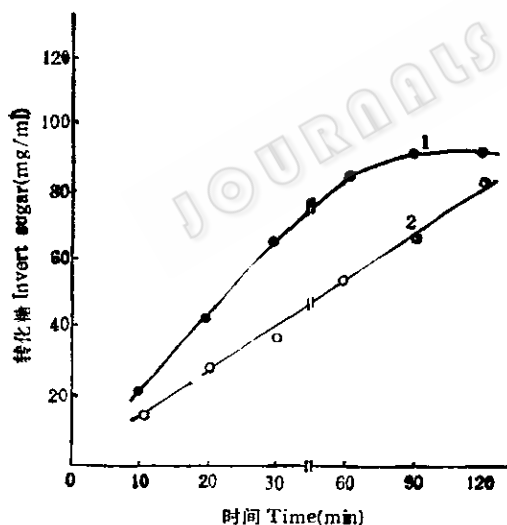


图3 反应时间对蔗糖水解作用的影响

Fig. 3 Effect of reaction time on hydrolysis of sucrose

1. 自然酶 Native enzyme; 2. 固定化酶 Immobilized enzyme

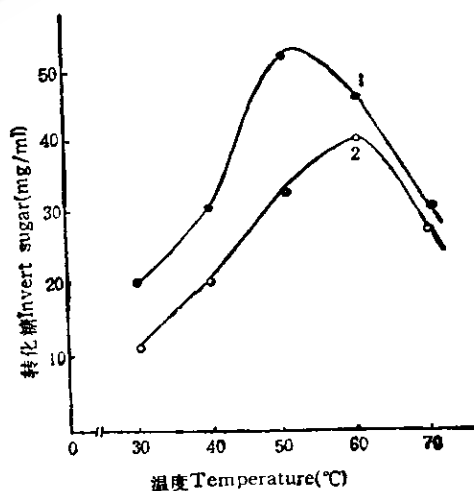


图4 温度对蔗糖水解作用的影响

Fig. 4 Effect of temperature on hydrolysis of sucrose

1. 自然酶 Native enzyme; 2. 固定化酶 Immobilized enzyme

3. 反应时间对蔗糖水解作用的影响: 取 pH 4.5 的 10% 蔗糖溶液各 50ml, 分别加入 1.34×10^5 u 的自然酶和固定化酶, 50°C 振荡反应不同时间, 测定转化糖, 结果见图 3。酶最适反应时间为 120 分钟, 自然酶反应初速度高于固定化酶, 随反应时间延长, 两种酶的

水解速度差逐渐缩小。

4. 反应温度对蔗糖水解作用的影响: 取 pH 4.5 的 10% 蔗糖溶液各 50ml, 分别加入 1.34×10^3 u 的自然酶和固定化酶, 于不同温度下分别反应 30 分钟, 测定转化糖, 结果见图 4。自然酶最适反应温度为 50℃, 以后随反应温度增加, 酶反应速度降低; 固定化酶最适反应温度为 60℃, 说明固定化酶对温度的耐受能力增强。

5. pH 对蔗糖水解作用的影响: 以 Na_2HPO_4 和柠檬酸配制 0.1mol/L 不同 pH 的缓冲液各 100ml, 分别溶解 10g 蔗糖, 各取 50ml, 分别加入 1.34×10^3 u 的自然酶和固定化酶, 50℃ 振荡反应 30 分钟, 测定转化糖。自然酶在 pH 3.0 时有最高水解速度, 在 pH 4.0 和 4.5 时酶仍保持较高的水解速度, 在中性或微碱条件下, 酶水解速度迅速降低。固定化酶在 pH 3.0 时亦有最高水解速度, 当 pH 值大于 3.0 时, 水解速度明显降低。当 pH 8.0 时, 凝胶变软。但在 pH 3.0 时容易引起蔗糖的自然水解, 因此应在 pH 4.0 和 4.5 时进行酶解反应。

6. 还原糖对蔗糖酶的抑制作用:

(1) 葡萄糖对蔗糖酶的抑制作用: 在 50ml 10% 蔗糖溶液 (pH 4.5) 中, 分别加 10%、20% 和 30% 葡萄糖, 1.34×10^3 u 的自然酶和固定化酶, 50℃ 振荡反应 30 分钟, 测定转化糖。随葡萄糖浓度增加, 对酶的抑制作用加大, 以 30% 葡萄糖对酶的抑制作用最大, 对自然酶和固定化酶分别可抑制 30% 和 40% 酶活力。

(2) 果糖对蔗糖酶的抑制作用: 在 20ml 10% 蔗糖溶液 (pH 4.5) 中, 分别加入 10%、20% 和 30% 果糖, 0.54×10^3 u 的自然酶和固定化酶, 50℃ 振荡反应 30 分钟, 测定转化糖。以 10% 果糖对酶的抑制作用最大, 随浓度加大, 果糖抑制作用减弱。果糖对蔗糖酶的抑制作用远高于葡萄糖。

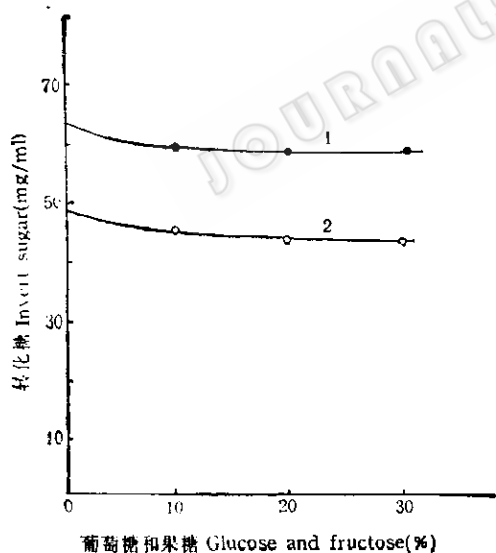


图 5 果糖和葡萄糖并存对酶的抑制作用

Fig. 5 Inhibition of both fructose and glucose existence simultaneously on the enzyme

1. 自然酶 Native enzyme; 2. 固定化酶 Immobilized enzyme

(3) 果糖和葡萄糖并存情况下对蔗糖酶的抑制作用: 在 20ml 10% 蔗糖溶液 (pH 4.5) 中, 分别加入 10% 果糖和 10% 葡萄糖、20% 果糖和 20% 葡萄糖、30% 果糖和 30% 葡萄糖、 0.54×10^3 u 的自然酶和固定化酶, 50℃ 振荡反应 30 分钟, 测定转化糖, 结果见图 5。在两种还原糖并存情况下, 对酶的抑制作用比还原糖单独存在时明显减弱, 以 10% 浓度的复合糖抑制作用最小。对自然酶和固定化酶的抑制作用强度差别不大。

(五) 固定化蔗糖酶反复水解蜂蜜蔗糖

1. 酶法水解蜂蜜蔗糖的工艺要求: 在蔗糖酶水解蜂蜜蔗糖时, 必须遵循原蜂蜜生产工艺。使用不经稀释的含有 75% 左右总糖的原蜜, 保持蜂蜜 pH (4.0 左右), 水解反应温度不超过 50℃, 反应时间要求在 30 分钟内完成。如果温度过高或反应时间延长, 都可能

引起蜂蜜色泽加深和蜂蜜中淀粉酶值降低, 直接影响蜂蜜质量。为了不使海藻酸钙凝胶固定化酶在蜂蜜高渗溶液中大量脱水, 在使用前必须将固定化酶进行脱水处理。

2. 固定化蔗糖酶反复水解蜂蜜蔗糖: 在预热的 50ml 蜂蜜中, 加入 0.48×10^5 u 固定化酶, 50℃ 振荡反应 30 分钟, 将固定化酶迅速滤出, 水洗, 淋去水分, 加入新蜜进行下批反应, 测定蔗糖含量。固定化蔗糖酶可反复处理蜂蜜 40 批以上, 将蜂蜜中 10% 左右蔗糖, 降为 5% 以下, 达到出口标准, 固定化蔗糖酶仍保持 75% 水解酶活力。

讨 论

从酵母提取蔗糖酶采用冻融和稀碱处理相结合的方法, 在用 1% NaOH 溶液处理酵母时, 要严格控制好处理时间。应随时进行镜检, 以保证细胞全部自溶, 又使酶很少失活。在用稀碱处理酵母后, 要迅速将 pH 调到中性或微酸性。

固定化蔗糖酶在热蜂蜜中变硬, 同时蜂蜜中又无使海藻酸钙凝胶解体的磷酸盐, 因而延长了固定化酶的使用寿命。由于凝胶变硬, 使其通透性降低。为恢复通透性, 在每批反应后, 应用水洗涤固定化酶, 并脱去部分水分, 以防固定化酶在蜂蜜高渗溶液中脱水, 影响蜂蜜品质。

由海藻酸钠与氯化钙反应生成的海藻酸钙凝胶孔径较大^[4], 为防止蔗糖酶的逸出, 并提高凝胶机械强度, 对海藻酸钙凝胶再用戊二醛进行交联, 取得了较满意的效果。

参 考 文 献

- [1] 胡学智: 酶制剂工业(下册)(张树政主编), 第 817—818 页, 科学出版社, 北京, 1984 年。
- [2] Suzuki, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 30(8):807—812, 1966.
- [3] Hidekatsu, M. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 15(2):403—412, 1973.
- [4] Hradil, J. et al.: *Enzyme. Microb. Technol.*, 3(4):331—335, 1981.
- [5] Marconi, W. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 16(4):501—511, 1974.
- [6] Hidekatsu, M. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 15(3):607—610, 1973.
- [7] Usami, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 51(11):789—794, 1973.
- [8] Aizo K. et al.: *Japan Kokai*, 53-88392, 1978.
- [9] Negoro, H.: *J. Ferment. Technol.*, 48(11):689—697, 1970.
- [10] Negoro, H.: *J. Ferment. Technol.*, 50(3):136—142, 1972.
- [11] 李永丰等: 工业微生物, No. 1:16—19, 1989.
- [12] 黑龙江省土畜产进出口公司编: 蜂蜜资料汇编, 第 16—17 页, 黑龙江人民出版社, 哈尔滨, 1986 年。
- [13] Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 195:19, 1952.
- [14] 国府田悦男: 醱酵工学会誌, 86(2): 84, 1984.

STUDIES ON HYDROLYSIS OF SUCROSE IN HONEY BY IMMOBILIZED SUCRASE

Peng Wanlin Tian Xiaoguang Cao Yabin Li Rongping Jiang Xiulan Yu Deshui

(*Institute of Applied Microbiology, Heilongjiang Academe of Sciences, Harbin 150011*)

The sucrase was extracted from yeast by compound autolysis method and the immobilized sucrase was prepared by Ca-alginate-glutaraldehyde method, and dehydration was carried out below at 40°C. The enzymatic properties of native sucrase and immobilized sucrase were studied systematically. The optimum substrate concentration of the native and immobilized sucrase was 10%, the optimum reaction time was 120 min, the optimum pH was 4.0; the optimum reaction temperature of native sucrase was 50°C, but immobilized sucrase was 60°C. The inhibition of the fructose on both enzymes was very strong, but the inhibition was decreased while both fructose and glucose exist simultaneously. The 40 batch hydrolysis of sucrose in honey was done repeatedly by immobilized sucrase and the experimental data showed that the concentration of sucrose in honey was decreased from 10% to 5% below and the hydrolysis activity of immobilized sucrase still remains 75%.

Key words Immobilized sucrase; Sucrose in honey