

β-半乳糖苷酶的固定化及其合成低聚半乳糖研究

李智慧¹, 赖田甜², 张 敏², 郝瑞敏¹, 姚梦珂¹, 赵 华¹, 杨贞耐^{1,*}

(1.北京工商大学 老年营养与健康教育部重点实验室, 北京 100048; 2.农业农村部规划设计研究院 农业农村部产地初加工重点实验室, 北京 100125)

摘 要: 选用壳聚糖、海藻酸钠、海藻酸钠/明胶、海藻酸钠/羧甲基纤维素为固定化载体材料, 探究 β-半乳糖苷酶的固定化方法, 并将获得的适宜固定化酶应用于合成低聚半乳糖 (galacto-oligosaccharide, GOS)。结果表明, 较优固定化载体为壳聚糖, β-半乳糖苷酶的优化固定化条件为壳聚糖质量浓度 0.03 g/mL, 静置时间 2 h, 戊二醛体积分数 2%, 交联时间 3 h, 吸附时间 12 h, 固定化温度 60 °C, 加酶量 0.4 mg/g (以壳聚糖微球质量计)。与游离酶相比, 固定化酶的耐酸、碱、热的稳定性显著提升。进一步利用壳聚糖固定化 β-半乳糖苷酶合成 GOS, 确定了优化反应条件: 加酶量为 2 U/ mL, pH 值 6.0, 温度为 50 °C, 初始乳糖质量浓度为 500 g/L, 反应时间为 14 h。此条件下 GOS 产率可达到 52.61%, 高于已报道的 GOS 产率, 且产物中聚合度大于等于 3 的 GOS 含量为 37.07%。固定化酶重复使用 5 次后, 产 GOS 活性仍保留了 97.21%, 研究获得的壳聚糖固定化 β-半乳糖苷酶在 GOS 合成领域具有良好的应用前景。

关键词: β-半乳糖苷酶; 低聚半乳糖合成; 固定化方法; 壳聚糖; 交联

Studies on Immobilization of β-Galactosidase and Synthesis of Galacto-Oligosaccharide

LI Zhihui¹, LAI Tianian¹, ZHANG Min², HAO Ruimin¹, YAO Mengke¹, ZHAO Hua¹, YANG Zhennai^{1,*}

(1.Key Laboratory of Geriatric Nutrition and Health of Ministry of Education, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048,China; 2.Key Laboratory of Agro-Products Primary Processing,Academy of Agricultural Planning and Engineering, MARA, Beijing 100125,China)

Abstract: Chitosan, sodium alginate, sodium alginate/gelatin, sodium alginate/carboxymethyl cellulose were used as immobilized carrier materials to investigate the immobilization methods of β-galactosidase, and the synthesis of galacto-oligosaccharide (GOS) by the immobilized enzyme was studied. The results showed that the obtained suitable immobilization carrier was chitosan, and the optimal immobilization conditions were determined as follows: chitosan mass concentration 0.03 g/mL, standing time 2 h, glutaraldehyde volume fraction 2%, crosslinking time 3 h, adsorption time 12 h, immobilization temperature 60 °C, enzyme dosage 0.4 mg/g chitosan microspheres. Compared with the free enzyme, the immobilized enzyme's stability against acid, alkali and heat was significantly improved. Chitosan immobilized β-galactosidase was further used to synthesize GOS, and the optimal reaction conditions were determined: amount of enzyme 2 U/ mL, pH 6.0, 50 °C, initial lactose mass concentration 500 g/L, and reaction time 14 h. Under these conditions, the GOS yield reached 52.61%, which was higher than those reported. And the content of GOS with DP ≥ 3 in the GOS product was 37.07%. After repeated use of the immobilized enzyme for five times, the GOS production activity remained 97.21%. The chitosan-immobilized β-galactosidase obtained from the study has a promising application in the field of GOS

收稿日期: 2023-04-14

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作/港澳台科技创新合作重点专项(2017YFE0131800)。

Foundation: National Key Research and Development Program of China (2017YFE0131800).

第一作者: 李智慧, 女, 硕士研究生, 研究方向为乳品生物技术。

*通信作者: 杨贞耐, 男, 教授, 博士, 主要从事乳品科学及加工技术方面的研究。

synthesis.

Keywords: β -Galactosidase; Galacto-oligosaccharide synthesis(GOS); Immobilization method; Chitosan; Crosslink

中图分类号: TS245.5 文献标志码: A; 文章编号:

低聚半乳糖(galacto-oligosaccharide, GOS)是由多个半乳糖单元通过 β -(1-4)、 β -(1-6)或 β -(1-3)等 β -糖苷键相互连接或与葡萄糖单元连接形成的一种聚合度(DP)在2~8的寡糖混合物^[1]。由于GOS具有改善食品质构特性、改善腹泻、调节肠道菌群平衡等多种生理功能^[2]。目前GOS已成为食品和饮料行业应用前景十分广阔的一种功能性低聚糖^[3]。

GOS在天然产物中含量较少,分离提取难度较大^[4]。目前工业化生产GOS主要是利用酶法合成,但是游离的 β -半乳糖苷酶在使用过程中存在稳定性差、生产成本高等问题,酶固定化技术为此提供了有效解决方法。酶的固定化是利用酶蛋白中氨基酸侧链上不同官能团与载体分子之间的相互作用将酶连接在载体上。固定化方法通常包括物理法和化学法,前者通过相对较弱的相互作用力结合,后者通过稳定的、不可逆性共价键结合^[5]。且与游离酶相比,固定化酶易于从反应体系中实现完全分离。研究表明,将 β -半乳糖苷酶固定在壳聚糖包被的磁性纳米颗粒上,固定化酶的耐热稳定性显著提高,循环使用多次后仍保持较高活性^[6]。通过对比硅藻土吸附、壳聚糖共价藕联和交联聚合3种不同技术对米曲霉 β -半乳糖苷酶的固定化效果,发现三者均使酶的米氏常数 K_m 增加,其中壳聚糖为固定化载体材料时具有最高的酶产率和低聚糖合成率^[7],主要的GOS产物为6'-O- β -半乳糖、异己乳糖和6-半乳糖^[8]。

尽管利用固定化 β -半乳糖苷酶水解乳糖的研究较多,但是固定化 β -半乳糖苷酶对转半乳糖苷作用的研究相对较少,且因GOS产率不高,其应用受到限制。因此,本研究选用壳聚糖(chitosan, CS)、海藻酸钠(sodium alginate, SA)、海藻酸钠/明胶(sodium alginate/gelatin, SA/GEL)、海藻酸钠/羧甲基纤维素(sodium alginate/carboxymethyl cellulose, SA/CMC)为固定化载体材料对 β -半乳糖苷酶进行固定化处理,探讨了不同的酶固定化方法对固定化酶活性的影响,并将获得的适宜固定化酶应用于GOS的合成,确定最佳GOS合成条件,提高GOS产率,希望为实现GOS产品的固定化酶连续化生产提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

海藻酸钠(食品级),西安天利生物科技有限公司;壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 95\%$),北京酷来搏科技有限公司;明胶(分析纯)、羧甲基纤维素(黏度为8000~12000 mPa·s),上海陆安生物科技有限公司; β -半乳糖苷酶(液体酶),北京斐乐生物科技有限公司;邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(分析纯)、Brandford法蛋白浓度测定试剂盒,索莱宝科技有限公司;乳糖(分析纯),上海麦克林生化科技有限公司;葡萄糖、半乳糖、乳糖、棉子糖、水苏糖(均为标准品),上海源叶生物有限公司;半乳二糖、异乳糖(均为标准品),爱尔兰Megazyme公司。

1.2 仪器与设备

Infinite M200 Pro型酶标仪,帝肯(上海)贸易有限公司;恒温水浴锅HWS12、电热恒温培养箱THZ-D,上海一恒科学仪器有限公司;-80℃超低温冰箱705,美国Thermo Electron公司;真空冷冻干燥机Beta1-8 LDplus,德国Christ公司;钙型阳离子交换柱Waters Sugar-Pak I糖分析柱、蒸发光散射检测器2424、高效液相色谱仪E2695,美国Waters公司;氨基色谱柱NH2-HPLC,美国安捷伦公司;示差折光检测器RID-20A,日本岛津公司;数显pH计HZQ-Q,哈尔滨市东联电子有限公司;高速冷冻离心机CR21GIII,日本Hitachi公司;恒温振荡水浴摇床SHZ-82B,常州市国旺仪器制造有

限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 固定化 β -半乳糖苷酶的制备

1.3.1.1 以CS为载体的固定化酶

采用师广波等^[9]的方法,并稍加修改。将一定量CS溶液逐滴滴入1mol/L NaOH水溶液中,静置,洗涤至中性,戊二醛水溶液交联,蒸馏水多次洗涤,最后置于 β -半乳糖苷酶溶液中,4℃振荡反应,用磷酸盐缓冲液(pH值为7.0、20 mmol/L)洗涤,过滤收集微球,滤干后4℃下保存备用,记为CS组。

1.3.1.2 以SA为载体的固定化酶

将SA溶于水中得到质量浓度0.03 g/mL的SA胶体溶液,用磷酸盐缓冲液(pH值为7.0、20 mmol/L)稀释 β -半乳糖苷酶制剂至一定倍数,二者按1:1的体积比混合,用注射器将混匀后的溶液逐滴滴入质量浓度0.02 g/mL的CaCl₂溶液中,静置2 h,再用磷酸盐缓冲液洗涤3次,滤干后4℃下保存备用^[10],记为SA组。

1.3.1.3 以SA/GEL为载体的固定化酶

将SA与GEL以质量比2:1的比例混合溶于水中,得到基质溶液总质量浓度为0.03 g/mL的复合胶体溶液^[11],同1.3.1.2方法进行固定化及保存,记为SA/GEL组。

1.3.1.4 以SA/CMC为载体的固定化酶

将CMC与SA以质量比为1.8:1.2的比例混合溶于水中,得到基质溶液总质量浓度为0.03 g/mL的复合胶体溶液^[12],同1.3.1.2方法进行固定化及保存,记为SA/CMC组。

1.3.2 β -半乳糖苷酶活力的测定

参照郑义等^[13]的方法,略加改动。以磷酸盐缓冲液(pH值为7.0、20 mmol/L)为溶剂配制质量浓度为1 mg/mL的邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(ONPG)溶液,50℃预热10 min;取3 mL ONPG溶液,加入0.1 mL液态样本(供试样本稀释所得)或0.1 g固定化酶,50℃反应15 min;加入2 mL 1 mol/L Na₂CO₃水溶液使酶灭活;测定420nm处的吸光度。

酶活力单位(U):一定的条件下, β -半乳糖苷酶1 min内水解ONPG生成1 μ mol邻硝基苯酚(ONP)所需的酶量。

固定化酶或游离酶的相对酶活力(%):设定同一实验对象在同一组实验中的最高酶活力为100%,其余条件下的固定化酶或游离酶的酶活力相较于最高酶活力的占比。

酶活回收率按式(1)计算。

$$Y = \frac{Y_2}{Y_0 - Y_1} * 100\% \quad (1)$$

式(1)中, Y_0 为制备固定化酶时加入的游离酶总活力, Y_1 为未固定化酶的酶活力, Y_2 为固定化酶的酶活力。

1.3.3 固定化酶的性质测定

酸碱稳定性^[14]:将固定化酶与游离酶分别置于不同的pH值(4.0~8.0)环境中保存30 min,测定酶活力。

耐热稳定性:将固定化酶与游离酶分别置于不同的温度(35℃~80℃)中保存30 min,测定酶活力。

米氏常数 K_m :在单一水解体系中, β -半乳糖苷酶对ONPG水解遵循米氏方程,以浓度分别为0.664、1.328、1.992、2.656、2.320 mmol/L的ONPG为底物,分别测定固定化 β -半乳糖苷酶与游离酶反应15 min后水解液中ONP的含量,计算出ONPG的水解速率 V ,并采用双倒数作图,按式(2)计算。

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (2)$$

式(2)中, K_m 为米氏常数, V_m 为酶达到底物饱和时的反应速率, $[S]$ 为底物浓度, V 为ONPG

水解速率。

1.3.4 GOS 的固定化酶法合成

利用磷酸盐缓冲液制备一定质量浓度的乳糖溶液，取 20 mL，加入优化载体材料制备的固定化酶。1) 取 20 mL 乳糖溶液(pH 值为 6.0, 500g/L)，添加不同酶量(1~6 U/ mL)(加酶量/乳糖溶液体积)，在 60 °C、120 r/min 的恒温振荡水浴中反应 12 h，探究加酶量的影响；2) 取 20 mL 乳糖溶液(pH 值为 5.0~7.5, 500 g/L)，加酶量 2 U/ mL，在 60 °C、120 r/min 的恒温振荡水浴中反应 12 h，探究 pH 值的影响；3) 取 20 mL 乳糖溶液(pH 值为 6.0, 500 g/L)，加酶量 2 U/ mL，在不同水浴温度(40~65 °C)，120 r/min 的恒温振荡水浴中反应 12h，探究温度的影响；4) 取 20 mL 乳糖溶液(pH 值为 6.0, 质量浓度 100~500g/L)，加酶量 2 U/ mL，在 60 °C、120 r/min 的恒温振荡水浴中反应 12 h，探究初始乳糖质量浓度的影响；5) 取 20 mL 乳糖溶液(pH 值为 6.0, 500 g/L)，加酶量 2 U/ mL，在 60 °C、120 r/min 的恒温振荡水浴中反应不同时间(2~16h)，探究反应时间的影响。所有样本充分反应后，高纯水稀释 10 倍，用 0.22 μ m 规格的针筒过滤器过滤，装入液相小瓶，进行 HPLC 分析，实验重复 3 次。

1.3.5 GOS 含量的测定

采用高效液相色谱法(HPLC)对 GOS 产物进行定性和定量检测。取一定量的样品，用 0.22 μ m 规格的针筒过滤器过滤，装入液相小瓶中待测。采用双柱法^[15]对不同聚合度(DP)的 GOS 含量进行检测，利用面积归一化法进行定量分析。

钙型阳离子交换柱：Waters Sugar-Pak I 糖分析柱(6.5 mmx300 mm, 5 μ m)；RID 检测器，检测器温度为 40 °C；流动相为高纯水，流动相流速 0.5 mL/ min；柱温设置为 80 °C；进样量为 10 μ L。

氨基柱：Agilent NH₂-HPLC(4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m)；ELSD 检测器，增益值为 6；气压为 172.37kPa；流动相为乙腈-水（体积比为 0.75: 0.25），流速为 1.0 mL/ min；柱温设置为 30 °C；进样量为 10 μ L；

1.4 数据处理

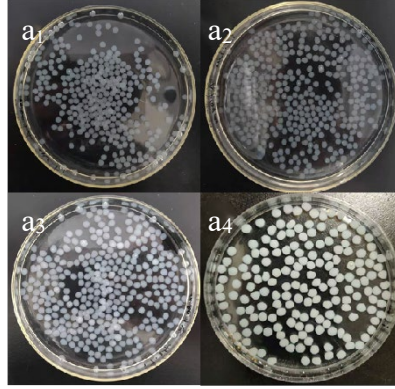
所有数据均以多次重复实验结果的均值和标准差表示，对实验结果进行单因素 ANOVA 分析和 *t* 检验，以 $p < 0.05$ 为统计学显著水平，用软件 Origin 2018 64bit 绘图。

2 结果与分析

2.1 β -半乳糖苷酶固定化方法的选择

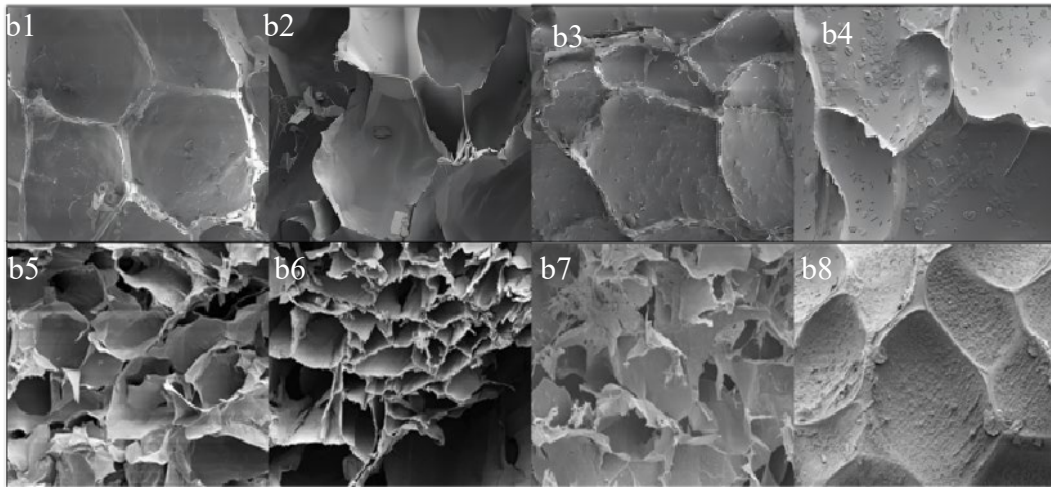
2.1.1 不同固定化方法制备的 β -半乳糖苷酶颗粒表观及微观形貌分析

4 种固定化方法制备的固定化酶微球颗粒，如图 1(a)。4 种凝胶微球颗粒均呈规则的圆球状，但是其外观存在一定差异。SA 凝胶微球与 SA/GEL 凝胶微球均为无色透明状，SA/CMC 凝胶微球透明度稍低，CS 凝胶微球呈白色。将固定化酶凝胶微球冻干后，用扫描电子显微镜(SEM)观察其形貌特征，如图 1(b)。SA 和 SA/CMC 凝胶微球的外表面粗糙褶皱[图 1(b1)、(b3)]，表面有微小孔道，有利于反应过程中的传质^[12]。SA/GEL 凝胶微球外表面光滑致密而平整[图 1(b2)]。SA 和 SA/GEL 凝胶微球内部呈三维网络立体结构[图 1(b5)、(b6)]，明显比 SA/CMC 凝胶微球的孔道均匀，SA/CMC 凝胶微球的机械强度可能相对较弱[图 1(b7)]。此外，交联后的 CS 凝胶微球外表面更加粗糙，呈现颗粒堆积结构[图 1(b4)、(b8)]可能对酶蛋白的吸附更有利^[16]。



a1:SA 微球；a2: SA/GEL 微球；a3:SA/CMC 微球；a4:CS 微球。

(a) 固定化酶微球



b1:SA 表面；b2:SA/GEL 表面；b3:SA/CMC 表面；b4:CS 表面(未交联)；b5: SA 横截面；b6:SA/GEL 横截面；b7: SA/CMC 横截面；b8:CS 表面(交联后)。

(b) 固定化酶微球表面及横截面

图1 不同固定化方法制备的 β -半乳糖苷酶微球颗粒外观及表面和横截面扫描电镜结果

Fig.1 Appearance and surface and cross-sectional scanning electron microscopy results of β -galactosidase microsphere particles prepared by different immobilization methods

2.1.2 不同固定化方法制备的 β -半乳糖苷酶活力及稳定性分析

图 2(a)反映了不同 pH 值对游离酶及其固定化酶活力的影响。结果表明，游离酶以及以 SA、SA/CMC、CS 为载体的固定化酶的最适 pH 值均为 7.0，而 SA/GEL 固定化酶的最适 pH 值为 6.0，其他 pH 值条件下测定的 4 种固定化酶活力较于游离酶具有不同程度地提高，表明酶的固定化一定程度上改善了其 pH 值稳定性。Mai 等^[12]研究发现，将 β -半乳糖苷酶固定在 SA/CMC 复合凝胶中，与游离酶相比，固定化酶的最适 pH 值变化不大。将 β -半乳糖苷酶固定在葡萄糖酸涂层纳米载体上也不会改变酶的最适 pH 值^[17]。

不同温度对游离酶与固定化酶的酶活力影响见图 2 (b)。游离酶以及以 CS 为载体的固定化酶的最适温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ ，而其他固定化酶(SA、SA/GEL、SA/CMC)的最适温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ ，同时，温度高于 60 $^{\circ}\text{C}$ 时，固定化酶活力均不同程度高于游离酶活力，表明酶的固定化一定程度上改善了酶的热稳定性。Nguyen 等^[18]将商业化酶制剂 Pectinex Ultra SP-L 固定在活性 CS 颗粒上，其最适温度未受到固定化工艺的影响。

将 4 种固定化酶和游离酶置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏，其酶活力随储存时间的变化如图 2 (c)。游离酶活力

下降最为明显, 16d 时下降了 43.99%; 以 CS 为载体的固定化酶储存稳定性最好, 16d 后酶活力仍保留了初始活性的 87.14%。Haghju 等^[19]通过静电纺丝成功地将 β -半乳糖苷酶固定在壳聚糖/聚乙烯醇共混纳米纤维上, 在 4 °C 条件下贮藏 28d, 固定化酶活力仍保持了 77% 的初始活性。

不同固定化酶的可重复性使用次数见图 2 (d)。由图 2 (d) 可知, SA/CMC 为载体的固定化酶与 SA 为载体的固定化酶分别重复使用 3 次和 4 次后, 会变黏、部分溶解; 以 SA/GEL 为载体的固定化酶重复使用 5 次后酶活力损失严重; 而以 CS 为载体的固定化酶重复使用 5 次后, 酶活力仍保留 81.92%, 操作稳定性最好。Rejikumar 等^[20]将米曲霉 β -半乳糖苷酶固定在交联聚乙烯醇或天然多糖壳聚糖上, 用于乳糖和乳清的连续水解, 在使用 12~20 个周期后仍然保持较好活性。

酶活回收率越高, 越有利于节约生产成本。图 2 (e) 反映了 4 种固定化酶的酶活回收率。结果表明, 以 CS 为载体的固定化酶酶活回收率最高, 与其他 3 种固定化酶的酶活回收率存在显著差异 ($p < 0.05$)。

确定以 CS 为载体获得的固定化 β -半乳糖苷酶具有较优的酶活力及酶活稳定性, 并选用 CS 进行后续固定化酶实验。

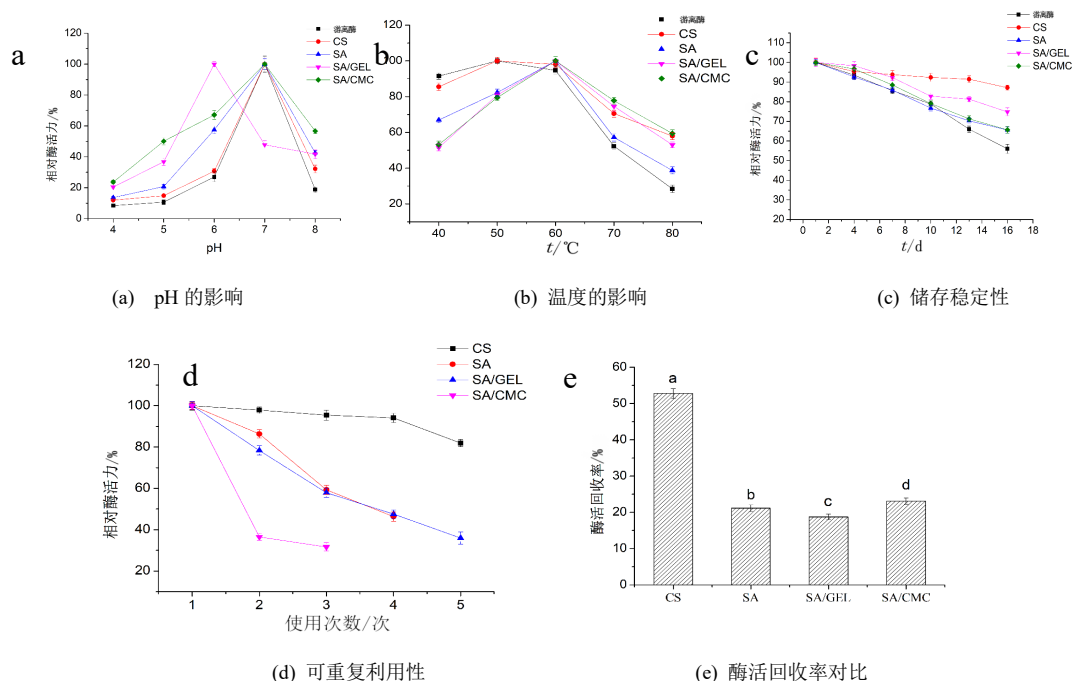


图 2 不同固定化方法制备的 β -半乳糖苷酶的酶活力及稳定性

Fig.2 Enzyme activity and stability of β -galactosidase prepared by different immobilization methods

2.2 CS 固定化 β -半乳糖苷酶的制备及其酶学性质分析

2.2.1 CS 固定化 β -半乳糖苷酶的制备条件优化

CS 质量浓度对固定化酶的影响见图 3 (a), 如图 3 (a) 显示, 随着 CS 质量浓度增加, 固定化酶活力呈下降趋势, 这可能与不同质量浓度 CS 形成的凝胶微球的结构特性不同有关。当 CS 质量浓度为 0.02 g/mL 时, 其胶体溶液黏度过低, 在 NaOH 溶液中不易形成球形载体, 这与李鸿玉等^[21]的结论是相似的。质量浓度继续增加至 0.03 g/mL 和 0.04 g/mL 时, 胶体溶液的成球效果和微球颗粒的机械强度均有所提高。但质量浓度过高, 达 0.05 g/mL 时, 胶体溶液黏度过大, 出现拖尾现象, 形成的凝胶微球形状不规则。因此, 选择 CS 质量浓度 0.03 g/mL 较佳。

静置硬化时间对固定化效果的影响见图 3 (b)。由图 3 (b) 可以看出, 随着固定化酶制备过程中静置时间的延长, 固定化酶的酶活力提高, 当静置时间为 2 h 时, 固定化效果最好。戊二醛体积分数对固定化效果的影响见图 3 (c)。由图 3 (c) 可知, 随着戊二醛体积分数增大, 固定化酶酶活力

先上升后下降。当戊二醛体积分数较低时,凝胶微球表面活性基团数量较少,固定的酶数量偏低,载体机械强度差,酶易脱落;若戊二醛体积分数过大,过量的戊二醛自身会发生羟醛缩合使其附着在载体表面,影响酶与固定化载体的结合,也可能会造成酶分子构象的变化,导致酶活性的损失^[22]。因此,戊二醛体积分数选用2%时,固定化效果较佳。交联时间对固定化效果的影响见图3(d)。由图3(d)可知,随着交联时间的延长,固定化酶的酶活力先上升后下降,当交联时间为3 h时,固定化效果较好。当交联时间为5 h时,固定化酶酶活力出现了显著下降($p<0.05$),因此,选择交联时间3 h较佳。吸附时间对固定化效果的影响见图3(e)。由图3(e)可知,随着吸附时间的延长,吸附作用增加,固定化酶的酶活力增强,12 h时达到最大,此时CS吸附位点达到饱和。吸附时间继续延长,酶活力略微降低,因此,吸附时间选择12 h。图3(f)反映了不同加酶量对固定化酶活力、酶活回收率以及吸附率的影响。结果表明,随着加酶量的增加,固定化酶活力增加,但酶活回收率有所降低。这是由于CS凝胶微球载体的载酶量达到一定上限就会饱和^[23]。当加酶量超过0.4 mg/g(以CS质量计)时,吸附率显著降低($p<0.05$),因此,选用加酶量为0.4 mg/g。固定化 β -半乳糖苷酶的优化制备条件为CS质量浓度0.03 g/mL,静置时间2 h,戊二醛体积分数2%,交联时间3 h,吸附时间12 h,加酶量0.4 mg/g。

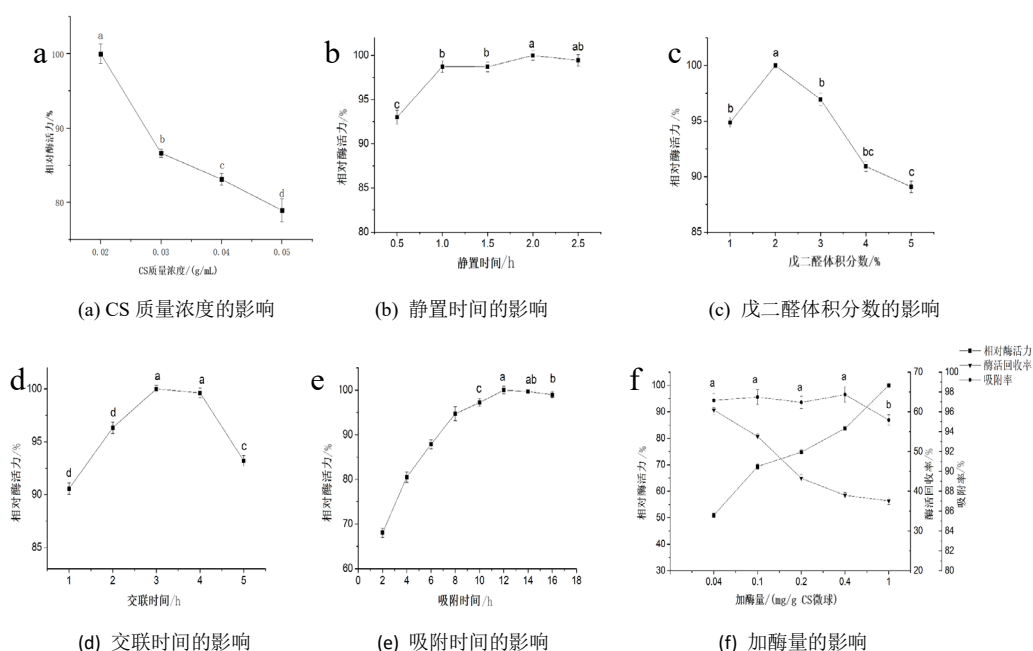


图3 不同制备条件对CS固定化 β -半乳糖苷酶的影响

Fig. 3 Effect of different preparation conditions on CS immobilized β -galactosidase

2.2.2 CS固定化 β -半乳糖苷酶的稳定性及动力学参数分析

固定化 β -半乳糖苷酶与游离酶的酶学性质见图4。固定化酶与游离酶的耐热稳定性分析见图4(a)。由图4(a)可知,固定化酶和游离酶在50℃以上酶活力均损失严重,相对于游离酶而言,固定化酶的耐热稳定性有所增强。这是由于游离酶经固定化后,酶分子与载体共价结合,载体的物理性能可以保护酶分子在高温条件下不易变性^[24]。图4(b)反映了固定化酶与游离酶的酸碱稳定性。由图4(b)可知,固定化酶的pH值耐受性明显提高。这可能是由于 β -半乳糖苷酶经固定化后,通过多点共价固定,形成对酶蛋白具有保护作用的周围环境体系,减少了因溶液pH值改变对酶分子的活性基团及其蛋白结构造成的破坏,显著提高了固定化酶的酸碱稳定性。

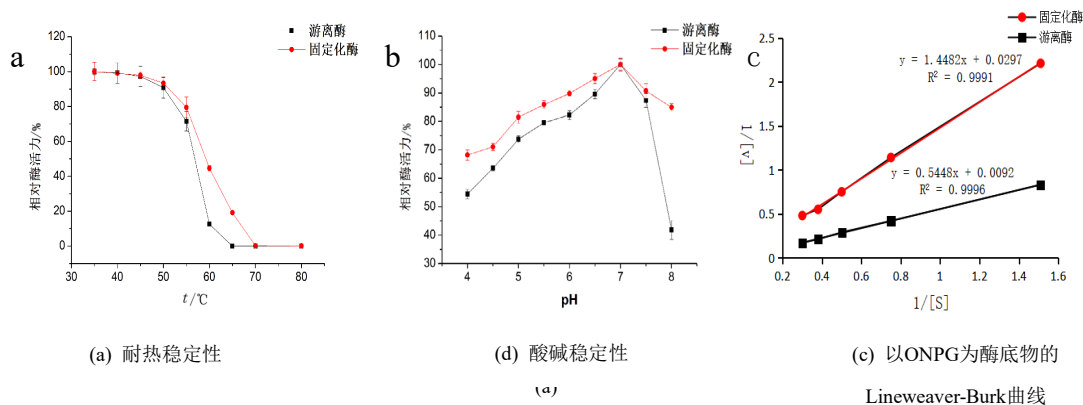


图 4 固定化 β -半乳糖苷酶与游离酶的酶学性质

Fig.4 Enzymological properties of immobilized and free β -galactosidase

如图 4 (c) 可知, 根据线性拟合方程的斜率与截距, 可以求出其米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_m 。通常 K_m 越小, 酶与底物的亲和能力就越强, 对实际生产越有利。经计算, 固定化酶的 K_m 为 59.65 mmol/L, V_m 为 40.98 mmol/min; 游离酶的 K_m 为 64.99 mmol/L, V_m 为 119.05 mmol/min, 固定化酶的 K_m 较游离酶小, 说明 β -半乳糖苷酶经固定化操作后还具有很强的与底物的结合力。这可能是由于 CS 凝胶微球表面存在静电效应, 增强了 CS 凝胶微球对底物的吸附能力, 有利于酶与底物的结合^[24]。李黎等^[25]利用磁性 CS 微球对 β -半乳糖苷酶进行固定化, 在固定化后 K_m 减小, 其与底物的亲和能力有所增强。

2.3 基于 CS 固定化 β -半乳糖苷酶 GOS 的合成

2.3.1 不同酶解条件对 GOS 合成的影响

加酶量对合成 GOS 的影响见图 5。由图 5 (a) 可知, 随着加酶量的增大, GOS 的产率呈现先增加后降低的趋势。加酶量的增加可以提高反应速率, 当加酶量为 2 U/mL 时, GOS 产率达到最大, 为 50.72%。若加酶量继续增大, GOS 产率下降, 这是由于酶过多时, 生成的 GOS 又被二次水解^[26]。因此, 最终确定优化加酶量为 2 U/mL。图 5 (b) 反映了 pH 值对合成 GOS 的影响, 当 pH 值为 6.0 时, GOS 的产率最高, 说明该酶在稍微偏酸性环境内更利于其转糖苷反应, 而在偏碱性环境中容易失活, 这与李海方等^[27]的研究结果相似。因此, 选用 pH 值为 6.0 进行后续的实验。图 5 (c) 反映了温度对合成 GOS 的影响, 随着反应温度的升高, GOS 产率呈现出先上升后下降的趋势, 反应温度为 50、55 °C 时, GOS 产率达到最高。但温度过高, 固定化 β -半乳糖苷酶会发生变性, 催化活性受损。由于温度越低越有利于固定化酶的重复利用, 因此确定优化反应温度为 50 °C。图 5 (d) 反映了初始乳糖质量浓度对合成 GOS 的影响, 随着初始乳糖质量浓度的增大, GOS 产率升高, 当乳糖质量浓度为 500 g/L 时, GOS 产率达到最大。 β -半乳糖苷酶在低乳糖质量浓度下催化反应偏向水解方向进行, 在高乳糖质量浓度下催化反应主要偏向转糖苷方向进行。初始乳糖质量浓度的提高使得转糖苷活性高于水解活性, 从而使反应向有利于合成 GOS 方向进行^[28]。因此, 最终确定 500 g/L 为优化的初始乳糖质量浓度。图 5 (e) 反映了反应时间对合成 GOS 的影响, 反应初期底物浓度较大, 有利于转糖苷反应的进行, GOS 产率快速增加, 当反应时间达到 14 h 时, GOS 产率达到最高为 52.61%。若继续延长反应时间, GOS 产率则呈现下降趋势, 这是由于乳糖质量浓度逐渐降低, 固定化酶的水解活性增强, 合成的 GOS 开始分解^[10]。此外, 副产物葡萄糖也会抑制乳糖的水解及 GOS 的合成, 因此, 最终确定 14 h 为优化反应时间。

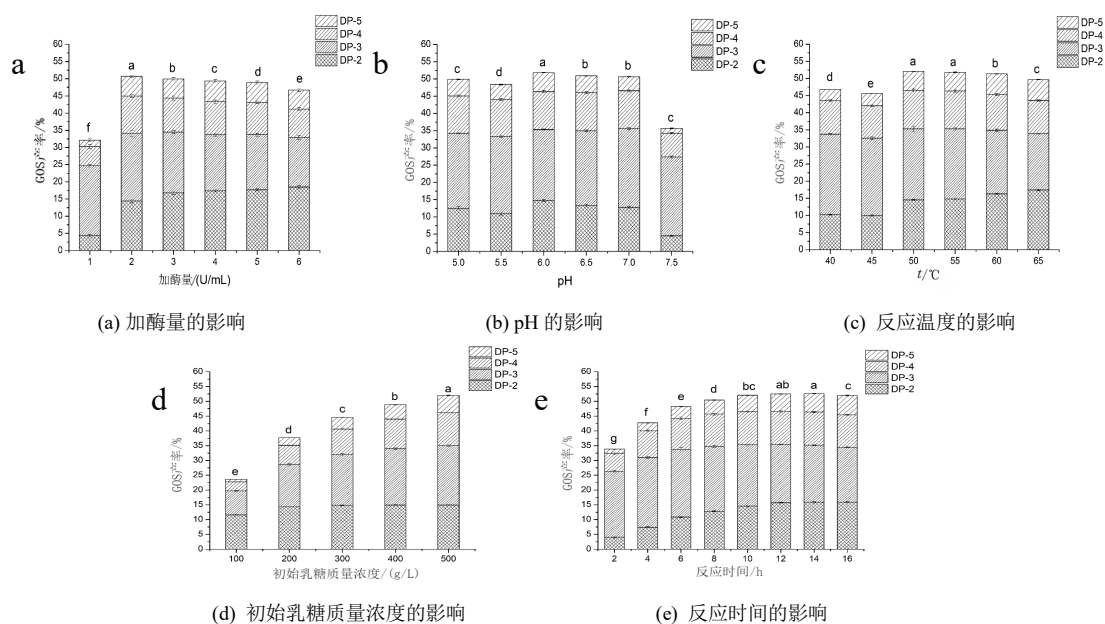


图5 不同酶解条件对CS固定化 β -半乳糖苷酶合成GOS的影响

Fig.5 Effect of different enzymatic conditions on synthesis of GOS by CS immobilized β -galactosidase

确定固定化酶法合成 GOS 的优化条件: CS 质量浓度为 0.03g/mL, 静置时间为 2 h, 戊二醛体积分数为 2%, 交联时间为 3 h, 吸附时间为 12 h, 固定化温度为 60 °C, 加酶量为 0.4 mg/g。

2.3.2 优化条件下固定化酶法合成 GOS 各组分含量随时间变化分析

图 6 反映了最适条件下反应体系中底物和产物随反应时间的变化。反应初期, GOS 大量生成, 乳糖被快速水解, 随着时间延长, 反应速率变慢。反应到 14 h 时, GOS 组分含量最高, 其产率达到 52.61%。高于已报道的 GOS 产率, 如 Wang 等(25.1%)^[29]、李宗显等(44%)^[30]、姚春晓(30.54%)^[31]、Rico-Rodríguez 等(32%~46%)^[32]等, 说明本研究利用固定化酶可以高效合成 GOS。若继续延长反应时间, GOS 含量轻微下降, 由于乳糖质量浓度降低, GOS 被 β -半乳糖苷酶二次水解, 且葡萄糖和半乳糖等单糖的质量浓度有所增加, 对 GOS 的合成产生抑制作用^[33]。

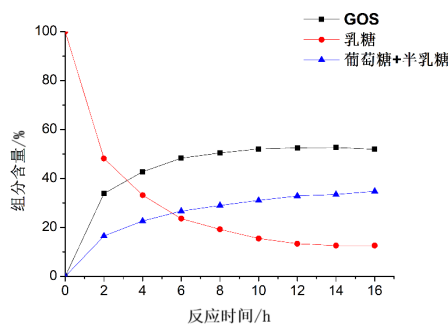


图6 优化条件下固定化 β -半乳糖苷酶合成GOS各组分含量随时间变化曲线

Fig.6 Time-dependent curve of each component of GOS synthesized by immobilized β -galactosidase under optimized conditions

2.3.3 优化条件下固定化酶法合成 GOS 的操作稳定性分析

优化条件下固定化酶合成GOS的操作稳定性分析见图7。由图7可知, 以CS凝胶微球为载体的固定化酶循环使用5次后, GOS产率从52.61%下降至51.14%, 产GOS活性仍保留了97.21%, 说明该固定化酶具有很好的操作稳定性, 具有很好的重复使用价值。

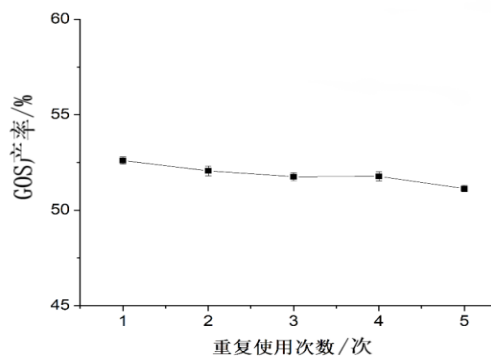


图7 固定化 β -半乳糖苷酶合成GOS的操作稳定性

Fig.7 Operational stability of the immobilized β -galactosidase for synthesizing GOS

2.3.4 固定化酶法合成 GOS 的产物分析

采用优化条件下制备的固定化酶合成 GOS，利用 HPLC 对比样品和标准品的出峰时间对 GOS 的产物进行定性和定量分析^[34-35]。图 8（a）显示了 GOS 产物的钙型阳离子交换柱 HPLC 分离结果。得到其主要组分按出峰顺序为五糖、四糖、三糖、二糖、葡萄糖和半乳糖。图 8（b）进一步显示氨基柱 HPLC 的 GOS 产物分离结果，其中二糖得到有效分离，确定为半乳二糖、异乳糖和乳糖。利用面积归一化法进行定量分析，确定 GOS 各聚合度糖组分的具体含量见表 1，其中 $DP \geq 3$ 的 GOS 含量为 37.07%。

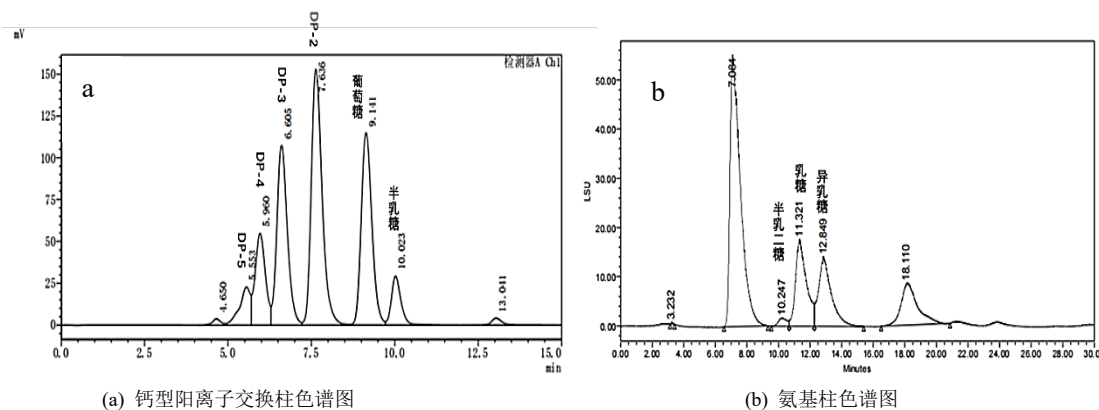


图 8 固定化酶法合成 GOS 产物的 HPLC 分析

Fig.8 HPLC analysis of GOS products synthesized by the immobilized enzyme

表 1 固定化酶法合成 GOS 产物的组成及比例

Tab.1 Composition and proportion of GOS products synthesized by the immobilized enzyme

不同聚合度(DP)	DP=2	DP=3	DP=4	DP=5	/	/
组分或糖名称	(半乳二糖、 异乳糖和乳糖)	/	/	/	葡萄糖+ 半乳糖	其他
含量(%)	14.93	20.16	10.99	5.92	33.46	14.54

3 结 论

通过比较不同载体材料制备的固定化 β -半乳糖苷酶，确定以 CS 为载体获得的固定化酶具有最

佳的酶活力及酶活稳定性。固定化酶优化制备条件为 CS 质量浓度 0.03 g/mL, 静置时间 2 h, 戊二醛体积分数 2%, 交联时间 3 h, 吸附时间 12 h, 固定化温度 60 °C, 加酶量 0.4 mg/g。进一步利用 CS 固定化酶合成 GOS, 通过单因素实验优化了该固定化酶合成 GOS 的条件, 优化条件为加酶量 2 U/mL, pH 值为 6.0, 温度 50 °C, 初始乳糖质量浓度 500 g/L, 反应时间 14 h, 此时, GOS 产率达到 52.61%, 高于文献报道的固定化酶合成 GOS 的产率, 而且固定化酶重复利用性较好。GOS 产物中 $DP \geq 3$ 的 GOS 含量为 37.07%。本研究旨在为工业生产中利用固定化酶法合成 GOS 提供参考, 具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] JI D W, SIMS I, XU M, et al. Production and identification of galacto-oligosaccharides from lactose using β -D-galactosidases from *Lactobacillus leichmannii* 313[J]. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, 2021, 2: 100038.
- [2] 王建宇, 李婷, 李敬, 等. 芽孢杆菌 35 家族 β -半乳糖苷酶的性质及其在合成低聚半乳糖中的应用[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(06): 29-38.
- WANG J Y, LI T, LI J, et al. Characterization of GH family 35 β -galactosidase from Bacillales sp. and its application in synthesis of galactooligosaccharides[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(06): 29-38.
- [3] 孙纯, 祝文兴, 刘新利. 低聚半乳糖的研究进展[J]. 中国调味品, 2017, 42(11): 170-174.
- SUN C, ZHU W X, LIU X L. Research progress on galactooligosaccharides[J]. China Condiment, 2017, 42(11): 170-174.
- [4] MEI Z J, YUAN J Q, LI D D. Biological activity of galacto-oligosaccharides: a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 993052.
- [5] MOHAMAD N R, MARZUKI N H C, BUANG N A, et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes[J]. Biotechnology, Biotechnological Equipment, 2015, 29(2): 205-220.
- [6] NGUYEN V D, STYEVKÓ G, MADARAS E, et al. Immobilization of β -galactosidase on chitosan-coated magnetic nanoparticles and its application for synthesis of lactulose-based galactooligosaccharides[J]. Process Biochemistry, 2019, 84: 30-38.
- [7] GAUR R, PANT H, JAIN R, et al. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase[J]. Food Chemistry, 2006, 97(3): 426-430.
- [8] URRUTIA P, RODRIGUEZ-COLINAS B, FERNANDEZ-ARROJO L, et al. Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(5): 1081-1087.
- [9] 师广波, 马艳芳, 郑明刚, 等. 壳聚糖固定化风味蛋白酶的制备及其酶学特性[J]. 食品科学技术学报, 2015, 33(04): 27-32.
- SHI G B, MA Y F, ZHENG M G, et al. Preparation and properties of immobilized flavourzyme on globular cross-linked Chitosan[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 33(04): 27-32.
- [10] 敖海英. 固定化的 β -半乳糖苷酶合成低聚半乳糖的研究 [D]; 天津科技大学, 2003: 11-12.
- AO H Y. The study on immobilized β -galactosidase and its application in syntheses of galactooligosaccharides[D]. Tianjin University of Science & Technology, 2003: 11-12.
- [11] 范倩, 邓凡, 乐春星, 等. 明胶/海藻酸钠复合微球的研究[J]. 化工新型材料, 2017, 45(1): 176-178.
- FAN Q, DENG F, LE C X, et al. Research on gelatin/sodium alginate complex microsphere material[J]. New Chemical Materials, 2017, 45(1): 176-178.
- [12] MAI T H A, TRAN V N, LE V V M. Biochemical studies on the immobilized lactase in the combined alginate-carboxymethyl cellulose gel[J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 74: 81-87.
- [13] 郑义, 张健, 曹永强, 等. 产 β -D-半乳糖苷酶马克斯克鲁维酵母的分离鉴定及其产酶特性[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 158-165.
- ZHENG Y, ZHANG J, CAO Y Q, et al. Isolation, identification and enzymatic characteristics of *Kluyveromyces marxianus* producing β -D-galactosidase[J]. Food Science, 2020, 41(2): 158-165.
- [14] 尉淑君. β -D-半乳糖苷酶的发酵生产、分离纯化和性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011: 13.

- JU S J. Production, purification and properties of β -D-galactosidase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011: 13.
- [15] 郑淼, 常迪, 周靖, 等. 液相色谱双柱法和高效离子交换色谱法测定低聚半乳糖含量比较[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(2): 201-209.
- ZHENG M, CHANG D, ZHOU J, et al. Determination of GOS by high performance ion exchange chromatography and double-HPLC-RI methods[J]. China Food Additives, 2022, 33(2): 201-209.
- [16] 狄婧, 刘海霞, 郭金鑫, 等. 戊二醛/壳聚糖交联复合材料的制备及其对 3 种染料的吸附性能及其机理[J]. 甘肃农业大学学报, 2020, 55(6): 175-183, 192.
- DI J, LIU H X, GUO J X, et al. Preparation of glutaraldehyde/chitosan cross-linked composite material and study on its adsorption properties and mechanism for three dyes[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2020, 55(6): 175-183, 192.
- [17] ANSARI S A, ALSHANBERI A M. Stability studies of β -galactosidase immobilized on gluconic acid coated fullerenes[J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2022, 39(2): 361-367.
- [18] NGUYEN V D, STYEVKÓ G, TAL P, et al. Immobilization and some properties of commercial enzyme preparation for production of lactulose-based oligosaccharides[J]. Food and Bioproducts Processing, 2018, 107: 97-103.
- [19] HAGHU S, BARI M R, KHALED-ABAD M A. Affecting parameters on fabrication of β -D-galactosidase immobilized chitosan/poly (vinyl alcohol) electrospun nanofibers[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 200: 137-143.
- [20] REJIKUMAR S, DEVI S. Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixed - bed reactor containing β - galactosidase covalently bound onto chitosan and cross - linked poly(vinyl alcohol)[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2001, 36: 91-98.
- [21] 李鸿玉, 厉重先, 李祖明. 磁性壳聚糖微球固定化果胶酶的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 399-403.
- LI H Y, LI C X, LI Z M. Study on immobilization of pectinase on magnetic chitosan microspheres[J]. Food Science, 2008, 29(9): 399-403.
- [22] AMAN A, SHAHID F, PERVEZ S. Exploration of a three-dimensional matrix as micro-reactor in the form of reactive polyaminosaccharide hydrogel beads using multipoint covalent interaction approach[J]. Biotechnology Letters, 2022, 44(2): 299-319.
- [23] 许可, 曾丹林, 吴洁, 等. 磁性壳聚糖微球的制备及其固定化乳糖酶的研究[J]. 应用化工, 2019, 48(11): 2550-2554.
- XU K, ZENG D L, WU J, et al. Preparation of magnetic chitosan microspheres and study on immobilized lactase[J]. Applied Chemical Industry, 2019, 48(11): 2550-2554.
- [24] 李娟. 乳糖酶的筛选、固定化及其在牛奶中的应用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015: 19-22.
- LI J. Selection and immobilization of lactase and its application in milk for reducing lactose[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015: 19-22.
- [25] 李黎, 马力. 磁性壳聚糖微球固定化乳糖酶及其酶学性质[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(4): 576-581.
- LI L, MA L. Immobilization of lactase on magnetic chitosan microspheres and its effect on enzymatic properties[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2021, 25(4): 576-581.
- [26] 孙槐胜. 基于乳酸克鲁维酵母菌的高纯度低聚半乳糖绿色生产工艺开发[D]. 天津: 天津大学, 2016: 21.
- SUN H S. Development of green production technology of high purity galactooligosaccharides based on *Kluyveromyces lactis*[D]. Tianjin: Tianjin University, 2016: 21.
- [27] 李海方. β -D-半乳糖苷酶酶学性质及制备高纯度低聚半乳糖关键工艺的研究 [D]; 江南大学, 2012:26.
- LI H F. Properties of β -D-galactosidase and the key technology of preparation of high purity galacto-oligosaccharides [D]. Jiangnan University, 2012:26.
- [28] GUERRERO C, VERA C, CONEJEROS R, et al. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2015, 70: 9-17.
- [29] WANG G, ZHU J, LIU L J, et al. Optimization for galactooligosaccharides synthesis: a potential alternative for gut health and immunity[J]. Life Sciences, 2020, 245: 117353.

- [30] 李宗显, 许丽亚, 朱运平, 等. 克雷伯氏菌产 β -半乳糖苷酶的异源表达及低聚半乳糖合成工艺优化[J]. 中国食品学报, 2021, 21(8): 245-251.
- LI Z X, XU L Y, ZHU Y P, et al. Optimization of synthesis technology of galacto-oligosaccharides by heterologous expression of β -galactosidase from *Klebsiella*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(8): 245-251.
- [31] 姚春晓. 低聚半乳糖的酶法合成及其纯化研究 [D]; 北京林业大学, 2019:1.
- YAO C X. Enzymatic Synthesis and Purification of Galacto-oligosaccharides[D]. Beijing Forestry University, 2019:1.
- [32] RICO-RODRÍGUEZ F, NORIEGA M A, LANCHEROS R, et al. Kinetics of galactooligosaccharide (GOS) production with two β -galactosidases combined: mathematical model and raw material effects[J]. International Dairy Journal, 2021, 118: 105015.
- [33] CAREVIĆ M, ČOROVIĆ M, MIHAILOVIĆ M, et al. Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin [J]. International Dairy Journal, 2016, 54:50-57.
- [34] 张志国, 生庆海, 王硕. HPLC 双柱法测定低聚半乳糖的平均聚合度[J]. 中国食品学报, 2013, 13(12): 237-242.
- ZHANG Z G, SHENG Q H, WANG S. Determination of average DP of galactooligosaccharides by Bi-column HPLC[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(12): 237-242.
- [35] SCHULTZ G, ALEXANDER R, LIMA F V, et al. Kinetic modeling of the enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides: describing galactobiose formation[J]. Food and Bioproducts Processing, 2021, 127: 1-13.