

重组 β -环糊精葡萄糖基转移酶生产偶合糖的工艺优化

黄燕^{1,2,3}, 杨玉路^{1,2,3}, 夏伟^{1,2,3}, 王蕾^{1,2,3}, 吴敬^{1,2,3}, 陈晟^{1,2,3}

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 教育部食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122

黄燕, 杨玉路, 夏伟, 等. 重组 β -环糊精葡萄糖基转移酶生产偶合糖的工艺优化. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1415-1424.

Huang Y, Yang YL, Xia W, et al. Optimization of maltooligosyl fructofuranosides production by recombinant β -cyclodextrin glycosyltransferase. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1415-1424.

摘要: 偶合糖为一种可代替蔗糖的新型甜味剂, 因其具有着色性能良好、保水性能优良、抗龋齿等优点, 在食品、医药等领域具有良好的应用前景。本研究旨在找到廉价且易获得的供受体, 并利用环状芽孢杆菌 *Bacillus circulans* 251 来源的环糊精转移酶 (β -CGTase) 生产偶合糖, 并优化确定制备偶合糖工艺。以蔗糖为受体, 分别从加酶量、淀粉种类、温度、pH、供受比、异淀粉酶复配等因素对 β -CGTase 制备偶合糖工艺进行了优化。采用 105 g/L 马铃薯淀粉、95 g/L 蔗糖为底物, 向反应体系中添加 13.5 U/g 固定化 β -CGTase 和 45.0 U/g 异淀粉酶, 在 pH 5.5、40 °C 条件下反应 21 h 偶合糖产率达到 88.4%。本研究创新性使用异淀粉酶协同 β -CGTase 制备偶合糖, 该方法在产率和成本上均具有明显优势, 为酶法制备偶合糖的工业化应用进一步奠定了理论和实验基础。

关键词: 偶合糖, 环糊精葡萄糖基转移酶, 固定化, 异淀粉酶, 响应面

Optimization of maltooligosyl fructofuranosides production by recombinant β -cyclodextrin glycosyltransferase

Yan Huang^{1,2,3}, Yulu Yang^{1,2,3}, Wei Xia^{1,2,3}, Lei Wang^{1,2,3}, Jing Wu^{1,2,3}, and Sheng Chen^{1,2,3}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology and Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Joint Laboratory for International Cooperation in Food Safety by the Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Coupling sugar is a kind of new sweetener which can substitute sucrose. It has a good application prospect in food, medicine and other fields because of its good coloration, water retention and anti caries. The purpose of this study was to find

Received: July 29, 2020; **Accepted:** September 17, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31801472, 31972032), Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20180604), Science and Technology Project of Jiangsu Province, China-Modern Agriculture (No. BE2018305).

Corresponding author: Sheng Chen. Tel: +86-510-85327802; Fax: +86-510-85326653; E-mail: chensheng@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31801472, 31972032), 江苏省自然科学基金 (No. BK20180604), 江苏省科技项目现代农业-面上项目 (No. BE2018305) 资助。

cheap and easily available donor and acceptor, and to optimize the preparation process of coupling sugar by using β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* 251. Using sucrose as acceptor, the factors of preparing coupling sugar was optimized, including enzyme dosage, starch types, temperature, pH, ratio of starch/sucrose, and cooperation of isoamylase and β -CGTase. When 105 g/L potato starch and 95 g/L sucrose was used as substrates, the yield of coupling sugar reached 88.4%, which was catalyzed by 13.5 U/g immobilized β -CGTase and 45.0 U/g isoamylase under the conditions of pH 5.5 and 40 °C for 21 h. In this study, isoamylase and β -CGTase were used to prepare coupling sugar innovatively. This method had obvious advantages in yield and cost, which laid both theoretical and experimental foundation for the industrial enzymatic preparation of coupling sugars.

Keywords: coupling sugar, maltooligosyl fructofuranosides, immobilized enzyme, isoamylase, response surface

偶合糖 (Coupling sugar), 又称呋喃葡萄糖基蔗糖 (Maltooligosyl fructofuranosides), 是在蔗糖分子的葡萄糖一侧通过 α -1,4-糖苷键连接数个葡萄糖而形成的多种低聚糖的总称^[1], 通常以 GnF (G 表示葡萄糖, F 表示果糖, $n=2-7$) 来表示偶合糖^[2]. 最初在 20 世纪 70 年代由日本大阪市立工业研究所采用淀粉和蔗糖为底物, 经环糊精葡萄糖基转移酶催化制得^[3], 后于 1979 年上市销售, 同时期部分欧美国家也开始完成研制工作。由于偶合糖具有甜度纯正、着色性能良好、防结晶析出、优良的保水性能及抗龋齿效果显著等优点, 因此作为一种可代替蔗糖的新型甜味剂广泛用于糖果、糕点、果酱、冰淇淋、面包等食品行业^[4-5]。

环糊精葡萄糖基转移酶 (Cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase, EC.2.4.19) 是一种具有水解、歧化、环化、偶合 4 种反应的多功能酶^[6]。CGTase 是生产偶合糖的重要酶类, 其反应原理是通过偶合或歧化反应将供体环糊精或淀粉链上的葡萄糖单元以 α -1,4-糖苷键连接到受体蔗糖的葡萄糖单元上^[7]。其中环糊精为供体的工艺虽具有工艺简单、易操作的特点, 但为了降低成本, 工业生产常采用淀粉作供体。

国内外对于偶合糖功能的研究较多, 但是其生产制备的报道较少。在 20 世纪, 有两种工业方法分别采用软化芽孢杆菌 *Bacillus macerans*^[8] 和高温厌氧杆菌 *Thermoanaerobacter* sp.^[9] 来源的 CGTase 来催化合成偶联糖, 且该两种工业工艺已获得专利。Monthieu 等^[10] 采用 *Thermoanaerobacter* sp. 来源的 CGTase, 并以 β -环糊精 (β -CD) 和蔗糖为供-受体进行催化合成偶合糖, 最后通过一系列

分离纯化鉴定得出偶合糖中的 6 种组分 (G_2F-G_7F)。Martín 等^[11] 也采用 *Thermoanaerobacter* sp. 来源的 CGTase 游离酶和固定化酶转化可溶性淀粉生成偶合糖, 在最优条件下, 可溶性淀粉: 蔗糖=1:2, 采用固定化酶催化反应 48 h, 最终偶合糖产率为 80.5%, 比游离化 CGTase 高出了 8.0%。

因偶合糖在食品领域应用较多, 为确保良好的食品安全性, 本团队已将来源于环状芽孢杆菌 *Bacillus circulans* 251 的 β -CGTase 在食品准入的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* CCTCCM 2016536 进行表达, 胞外酶活高达 571.2 U/mL (蛋白含量 2.5 mg/mL)^[12]。本研究采用上述酶液进行固定化处理并对其生产工艺进行了优化, 且创新性将异淀粉酶与 CGTase 进行复配以提高偶合糖产率, 为偶合糖的工业化生产应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 酶液

β -CGTase 由本实验室重组菌 *B. subtilis/pHY300PLK- β -CGTase* 发酵所得^[12]。

1.1.2 主要试剂

木薯淀粉购于广西武鸣淀粉厂, 玉米淀粉、蜡质玉米淀粉购于山西晋利集团玉米淀粉有限公司。

国药集团化学试剂有限公司: 马铃薯淀粉、环糊精、蔗糖均为分析纯, 壳聚糖、戊二醇为试剂纯, 磷酸盐等其他试剂。

色谱柱: 250 mm×10 mm 5.0 μ m Waters Xbridge amide NH₂ 购置于沃特世科技 (上海) 有限公司。250 mm×4.6 mm 5 μ m ShodexAsahipak NH₂P-50

4E 上海安谱实验科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组 β -CGTase 环化活力的测定

比色法测定酶活：测定原理是利用环化产物 β -CD 包埋酚酞从而使酚酞颜色变浅^[13]；具体测定方法及酶活定义详见杨玉路等报道的方法^[14]。

1.2.2 异淀粉酶活性测定

异淀粉酶的制备和酶活测定参考团队前期研究^[15]。

1.2.3 β -CGTase 固定化

参考校秋燕等关于壳聚糖共价交联固定化 β -CGTase 的方法^[16]。

1.2.4 偶合糖制备

①液化：采用 25 mmol/L 的 Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液 (pH 5.5) 溶解适量马铃薯淀粉，搅拌悬浮，于 73 °C 水浴反应充分糊化后，加入适量 β -CGTase，并于 70 °C 液化至澄清透明。

②转化：将上述经液化处理的淀粉溶液冷却至反应温度，分别加入适量蔗糖和酶液，混合均匀后，于水浴摇床 150 r/min 恒温反应一定时间。

③灭酶：将反应液煮沸 15 min 以终止反应和灭活酶，冷却至室温后于 12 000 r/min 离心 10 min，取上清并经滤膜 (0.45 μm) 过滤获得偶合糖粗液。

1.2.5 偶合糖 HPLC 检测方法

采用 Agilent 1 200 HPLC 色谱系统 (示差检测器)，色谱柱 250 mm \times 4.6 mm 5 μm ShodexAsahipak NH₂P-50 4E；采用体积比为 70 : 30 乙腈-水为流动相，柱温 40 °C，流速 0.8 mL/min。偶合糖产率计算公式如下：

$$\text{偶合糖转化率 (\%)} = \frac{\text{样品峰面积} \times \text{标样浓度 (g/L)} \times \text{样品体积 (L)}}{\text{标样峰面积} \times \text{蔗糖质量 (g)}} \times 100。$$

1.2.6 偶合糖标准样品 (G_2F) 的制备

①偶合糖粗液制备：采用 β -CD 为供体，受体分别采用蔗糖 (实验组) 和麦芽糖 (对照组)，加入适量 β -CGTase 进行制备偶合糖，具体制备条件见 1.2.3。

② G_2F 粗液制备：将步骤①所得的反应液升温至 60 °C，加入适量糖化酶并水浴反应 4–6 h，除去反应液残留的麦芽低聚糖及 G_3F – G_6F 组分。

③收集：采用 Waters 1 525 制备级色谱系统 (示差检测器) 收集样品，其收集条件为：色谱柱 250 mm \times 4.6 mm 5 μm ShodexAsahipak NH₂P-50 4E；采用体积比为 75 : 25 乙腈-水为流动相，柱温 40 °C，流速 3.5 mL/min。

④提取：采用旋转蒸发将③收集液进行浓缩，最后将浓缩液进行冷冻干燥，得到偶合糖结晶。

1.2.7 响应面实验设计

根据单因素实验结果选择合适因素水平，后采用 Design-Expert 12 软件进行响应面实验分析。

2 结果与分析

2.1 偶合糖标品的制备

偶合糖作为一种新型甜味剂，在食品行业有广阔前景，但其为一种混合型低聚糖，目前国内无偶合糖标准样品 (G_2F) 购买，故需制备偶合糖标准品。

以 1.2.6 所述方法制备 G_2F ，CD 环在 CGTase 偶合和歧化催化反应下被打开，且反应中的单糖、双糖和低聚糖等小分子产物跟麦芽糖和蔗糖进行偶合反应，对应的产物分别是麦芽低聚糖和偶合糖^[17]。对应葡萄糖、麦芽糖、蔗糖标品的出峰时间，分别在图 1 进行了标示。根据出峰时间与分子大小的关系，图 1A 中 1–5 应分别表示为 G_2F – G_6F (12.37、17.61、25.26、35.85、50.83 min)；图 1B 中的 6–9 应分别表示麦芽三糖到麦芽六糖 (14.57、21.29、31.20、44.37 min)。1–5 和 6–9 的出峰时间是相互错开且不重叠，因此猜想 1 为 G_2F 。

为进一步验证及鉴定分析 G_2F ，向以蔗糖为受体的反应液中，加入适量糖化酶充分反应，以除去反应液中麦芽低聚糖及 G_3F – G_6F 。以 1.2.6 步骤③、④收集、干燥结晶获得纯品 G_2F ，并对其纯度鉴定。如图 2 所示，样品只有一个峰 (11.67 min)，未见杂峰。采用该样品进行质谱分

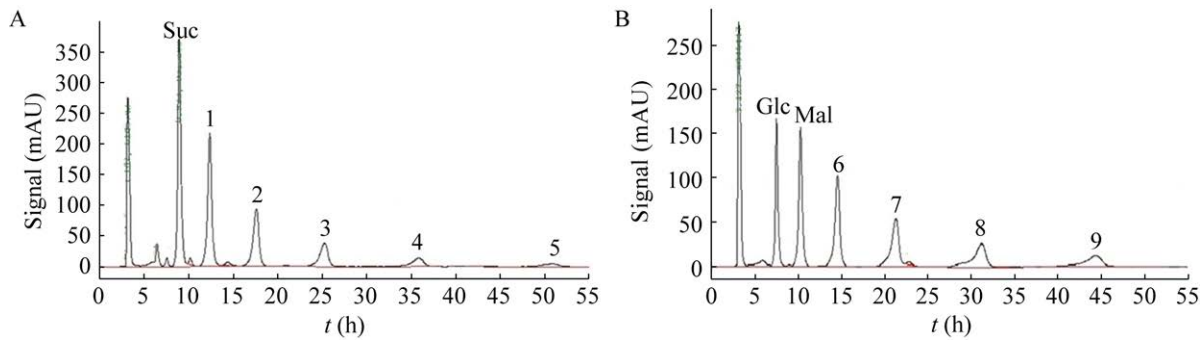


图1 CD 偶合反应产物色谱图

Fig. 1 HPLC analysis profiles of CD coupling reaction products. (A) Sucrose as acceptor. (B) Maltose as acceptor.

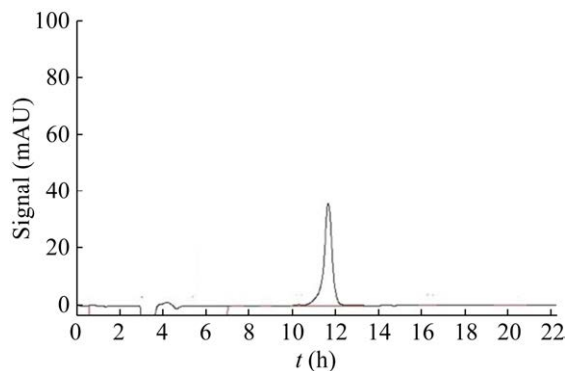


图2 G₂F 的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC analysis profiles of G₂F.

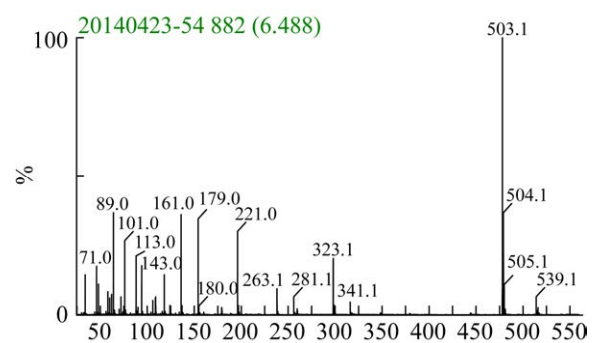


图3 G₂F 质谱图

Fig. 3 Mass spectrum of G₂F.

析, 如图 3 所示, 该样品只有一个强信号, 位于质荷比 (m/z) 503.1 处, 与离子化的三糖标品质荷比一致, 说明产物为三糖, 这进一步验证我们的猜想所得产品为 G₂F。

2.2 β -CGTase 制备偶合糖的单因素分析

2.2.1 酶固定化对偶合糖产率的影响

根据文献报道, β -CGTase 固定化可以明显提高酶的热稳定性及其转化效率^[11,16], 为探究酶固定化对偶合糖转化的影响, 分别采用固定化和游离 β -CGTase 来进行催化反应。即采用 pH 5.0 的 10% (W/V) 可溶性淀粉为底物, 5% (W/V) 蔗糖为供体, 分别添加为 5.0–20.0 U/g 的游离和固定化 β -CGTase, 30 °C 反应一定时间, 期间每隔 3 h 取样。

由图 4 可知, 随着加酶量的增加, 游离酶和固定化酶催化作用下的偶合糖产率都随之增大, 当加酶量增加到 10.0 U/g 时, 两者都于 24 h 达到

最高值 (57.8% 和 67.6%), 之后加酶量增加, 产率轻微下降, 且在相同加酶量的情况下, 固定化酶转化效率都明显高于游离酶 (3.7%–9.8%), 该现象与其他不同来源 CGTase 的固定化现象一致^[11]。考虑到固定化酶具有可连续使用、易回收等优点, 故选用固定化酶用于后续研究, 且以 10.0 U/g 为最适加酶量。

2.2.2 淀粉种类对偶合糖产率的影响

淀粉为高分子化合物, 不同来源的淀粉性质差异很大, 主要受晶体构造、粒径、脂质含量以及支链、直链的组成比例等多种因素共同影响^[18]。为探究最适底物, 本研究分别以 10% (W/V) 的 β -环糊精 (β -CD)、木薯淀粉、可溶性淀粉、马铃薯淀粉、玉米淀粉和蜡质玉米淀粉作为底物, 5% (W/V) 蔗糖为供体, pH 5.0, 加入 10.0 U/g 固定化 β -CGTase, 30 °C 反应一定时间, 每隔 3 h 取样。

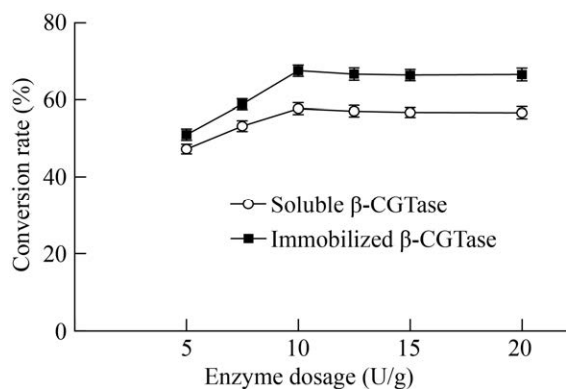


图 4 酶固定化对偶合糖产率的影响

Fig. 4 The effect of enzyme immobilization on the yield of coupling sugar.

可溶性淀粉和马铃薯淀粉, 因具有油脂含量低、快速水合、支链淀粉含量较高、易于糊化等优点, 表现出良好的应用性能^[19], 如图 5 所示, 可溶性淀粉为底物时, 偶合糖产率最高 (67.6%), 马铃薯淀粉次之 (64.5%); 玉米淀粉支链含量较少, 油脂等含量较根茎类来源的淀粉含量高, 因此难于糊化, 从而影响淀粉的利用率, 其偶合糖产率最低 (57.2%)^[20]; 木薯淀粉因存在不溶于冷水、易老化、抗剪切能力差等不足^[21], 其偶合糖产率也较低 (59.9%); 而蜡质玉米淀粉和 β -CD 因具备良好的膨胀性、抗老化性等优点^[22], 其转化效率也相对较好, 分别为 63.19% 和 63.30%, 但两个底物生产成本较高。综合分析, 均衡生产成本、产率等因素, 选择马铃薯淀粉作为底物用来制备偶合糖。

2.2.3 温度对偶合糖产率的影响

温度是影响酶催化效率的重要因素之一, 首先温度影响酶的催化活性, 其次温度影响淀粉溶液的物理特性从而影响产率。为探究转化偶合糖的最适温度, 以 10% (W/V) 马铃薯淀粉为供体, 5% (W/V) 蔗糖为供体, pH 5.0, 加入 10.0 U/g β -CGTase, 分别在 25–70 °C 反应一定时间, 每隔 3 h 取样。

由图 6 可得, 偶合糖产率随着温度的升高而增高, 当温度为 40 °C 时, 产率于 21 h 时达到最大值 68.96%, 在 40–50 °C, 反应时间缩短为 18 h,

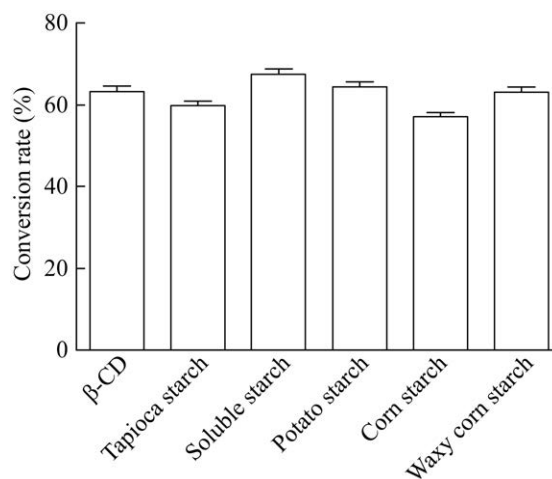


图 5 淀粉种类对偶合糖产率的影响

Fig. 5 Effects of starch types on the yield of coupling sugar.

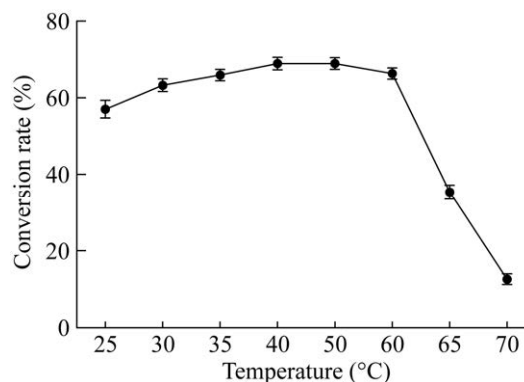


图 6 温度对偶合糖产率的影响

Fig. 6 Effects of temperature on the yield of coupling sugar.

产率没有明显的变化, 但是在高于 50 °C 之后, 产率开始下降, 并于 60 °C 急剧下降, 70 °C 时产率仅有 12.7%, 这可能是由于高温导致酶失活引起。综合生产能耗等因素, 选择 40 °C 作为最适转化温度。

2.2.4 pH 对偶合糖产率的影响

为探究反应体系的最适 pH, 以 10% (W/V) 马铃薯淀粉为供体, 5% (W/V) 蔗糖为供体, 分别将底物 pH 调至 4–8, 并加入 10.0 U/g β -CGTase, 于 40 °C 反应一定时间, 每隔 3 h 取样。

由图 7 可得, 当 pH 为 5.5 时, 产率于 21 h 达到最大值 73.90%, 当 pH 小于 5.5 或大于 5.5 时, 偶合糖产率都逐渐下降, 这可能是当过酸或

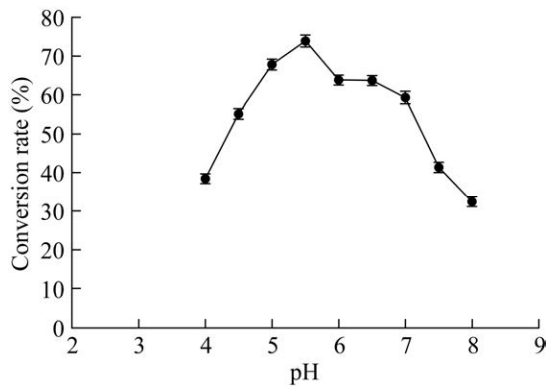


图7 pH对耦合糖产率的影响

Fig. 7 Effects of pH on the yield of coupling sugar.

过碱的环境条件对酶的催化活性和稳定性都有不利的影响,进而影响到耦合糖的产率,因此选择pH 5.5作为酶转化的最适pH。

2.2.5 淀粉/蔗糖比对耦合糖产率的影响

淀粉/蔗糖比对抑制环糊精的合成和调节过程的选择性具有重要意义^[11]。为考察马铃薯淀粉/蔗糖比及底物浓度对耦合糖转化的影响,实验以马铃薯淀粉浓度为基准,分别将马铃薯淀粉/蔗糖(W/W)调至1:2-3:1,研究不同底物浓度对耦合糖产率的影响,其他条件采用上述优化结果。

由表1可知,在供受体比相同的情况下,耦合糖产率都随着马铃薯淀粉浓度的增大而呈逐渐下降趋势;在相同马铃薯淀粉浓度条件下,供受体比例在1:1耦合糖产率最高,2:1次之,3:1最差,即总体表现为底物浓度过高、供体过量或受体太多,都不利于酶催化反应而导致产率偏低。在马铃薯淀粉浓度为50 g/L,供受体比例分别为1:1和2:1时,产率为79.8%和77.1%,转化效率最高,但因底物浓度过低其生产强度弱,不适合工业生产;当马铃薯淀粉为100 g/L,供受体比例为1:1和2:1,耦合糖产率分别为76.2%和74.8%。综合分析,选择供受体比(W/W)1:1,即淀粉100 g/L,蔗糖100 g/L,作为最适供受比及底物浓度用于后期研究。

2.2.6 异淀粉酶复配对耦合糖产率的影响

淀粉可分为直链淀粉和支链淀粉,在天然淀

粉中,直链淀粉仅占20%~26%,其余都是支链淀粉,即支链分子的分支位置为 α -1,6-糖苷键,其余为 α -1,4糖苷键^[23]。CGTase只能水解 α -1,4-糖苷键,不能水解 α -1,6-糖苷键,因此淀粉中有很多成分不能被利用。而脱支酶可以水解 α -1,6-糖苷键,能将支链水解变为直链,正好与CGTase共同作用,增大淀粉利用率。

如若与CGTase复配,则需选择在40℃、pH 5.5范围内都保持较高活性的脱支酶,本团队前期研究中已表达的*Thermobifida fusca* YX来源的异淀粉酶与 β -CGTase生产耦合糖工艺条件吻合^[15],因此考虑将二者进行复配研究对耦合糖产率的影响。采用上述最优反应条件的基础上,向反应体系中加入0~72 U/g异淀粉酶,结果如表2所示。

表1 不同供受体比对耦合糖产率的影响

Table 1 Effects of ratio starch/sucrose (W/W) on the yield of coupling sugar

Ratio starch/sucrose (W/W)	1:2	1:1	2:1	3:1
Concentration of starch (g/L)	Conversion rate (%)			
50	69.2	79.8	77.1	57.2
100	63.8	76.2	74.8	49.2
150	59.9	69.4	66.5	42.6
200	57.2	65.2	62.5	34.6

表2 异淀粉酶与 β -CGTase复配对耦合糖产率的影响

Table 2 Effects of compound of isoamylase and β -CGTase on the yield coupling sugar

β -CGTase (U/g)	Isoamylase (U/g)	Conversion rate (%)
7.5	24	64.6
7.5	48	68.9
7.5	72	72.5
10.0	24	77.5
10.0	48	81.7
10.0	72	82.2
12.5	24	78.1
12.5	48	87.1
12.5	72	82.9
15.0	24	75.6
15.0	48	81.6
15.0	72	78.4

由表 2 可知,随着 β -CGTase 和异淀粉酶用量增大,偶合糖产率不断增加,直到 β -CGTase 为 12.5 U/g,异淀粉酶为 48 U/g,产率达到最高值,87.1%。当异淀粉酶加酶量继续增大时,产率开始下降,这是因为,随着异淀粉酶用量增加,淀粉脱支速度大于 β -CGTase 利用速度,而导致大量不能溶于水中的直链淀粉累积,形成絮状沉淀,难以被 β -CGTase 利用。在异淀粉酶复配作用下,获得可利用的底物直链淀粉增多,因此 β -CGTase 需求量也相应增加,最适加酶量由单酶作用时的 10.0 U/g 提高至 12.5 U/g,当继续增加 β -CGTase 加酶量时,其偶合反应达到饱和,而水解能力还在增加,从而导致产率降低。因此,可以将 β -CGTase 和异淀粉酶用量分别控制在 12.5 U/g 和 48 U/g。

2.3 响应面分析

根据单因素结果分析,模型的建立分别以马铃薯淀粉浓度 (A)、蔗糖浓度 (B)、固定化 β -CGTase 加酶量 (C) 和异淀粉酶加酶量 (D) 作为实验因素,偶合糖产率为响应值 (Y),进行 4 因素 3 水平进行响应面实验分析,实验设计及结果见表 3。

以偶合糖产率为响应值,利用 Design Expert12 对表 3 进行二次多元回归拟合,得到马铃薯淀粉浓度 (A)、蔗糖浓度 (B)、固定化 β -CGTase 加酶量 (C) 和异淀粉酶加酶量 (D) 的二次多项回归方程: $Y=87.1+2.48A-11.49B+3.32C-0.0.85D+2.36AB-3.06AC-7.50AD+4.65BC+8.66BD+1.58CD-11.55A^2-6.61B^2-6.74C^2-9.67D^2$,及响应值 (Y) 与 4 个因素交互作用的关系 (图 8)。

表 3 Box-Behnken 响应面实验设计及偶合糖产率

Table 3 The Box-Behnken design and experimental yield of coupling sugar

No.	Concentration of starch (g/L)	Concentration of sucrose (g/L)	β -CGTase (U/g)	Isoamylase (U/g)	Conversion rate (%)
1	50	100	7.5	48	56.62
2	50	100	17.5	48	75.03
3	50	150	12.5	48	40.99
4	50	100	12.5	24	58.10
5	100	150	12.5	72	60.98
6	150	100	12.5	72	68.98
7	100	50	17.5	48	90.07
8	100	100	17.5	72	68.40
9	100	150	7.5	48	58.45
10	100	50	12.5	24	89.21
11	100	100	7.5	24	74.60
12	100	100	12.5	48	87.10
13	150	50	12.5	48	90.64
14	150	100	12.5	24	77.29
15	100	100	12.5	48	87.10
16	100	100	12.5	48	87.10
17	150	150	12.5	48	59.22
18	100	50	7.5	48	84.83
19	100	100	12.5	48	87.10
20	50	50	12.5	48	81.84
21	100	100	17.5	24	64.57
22	100	150	12.5	24	56.13
23	100	150	17.5	48	82.29
24	150	100	17.5	48	66.10
25	100	100	12.5	48	87.10
26	100	50	12.5	72	59.42
27	100	100	7.5	72	72.12
28	50	100	12.5	72	79.77
29	150	100	7.5	48	59.95

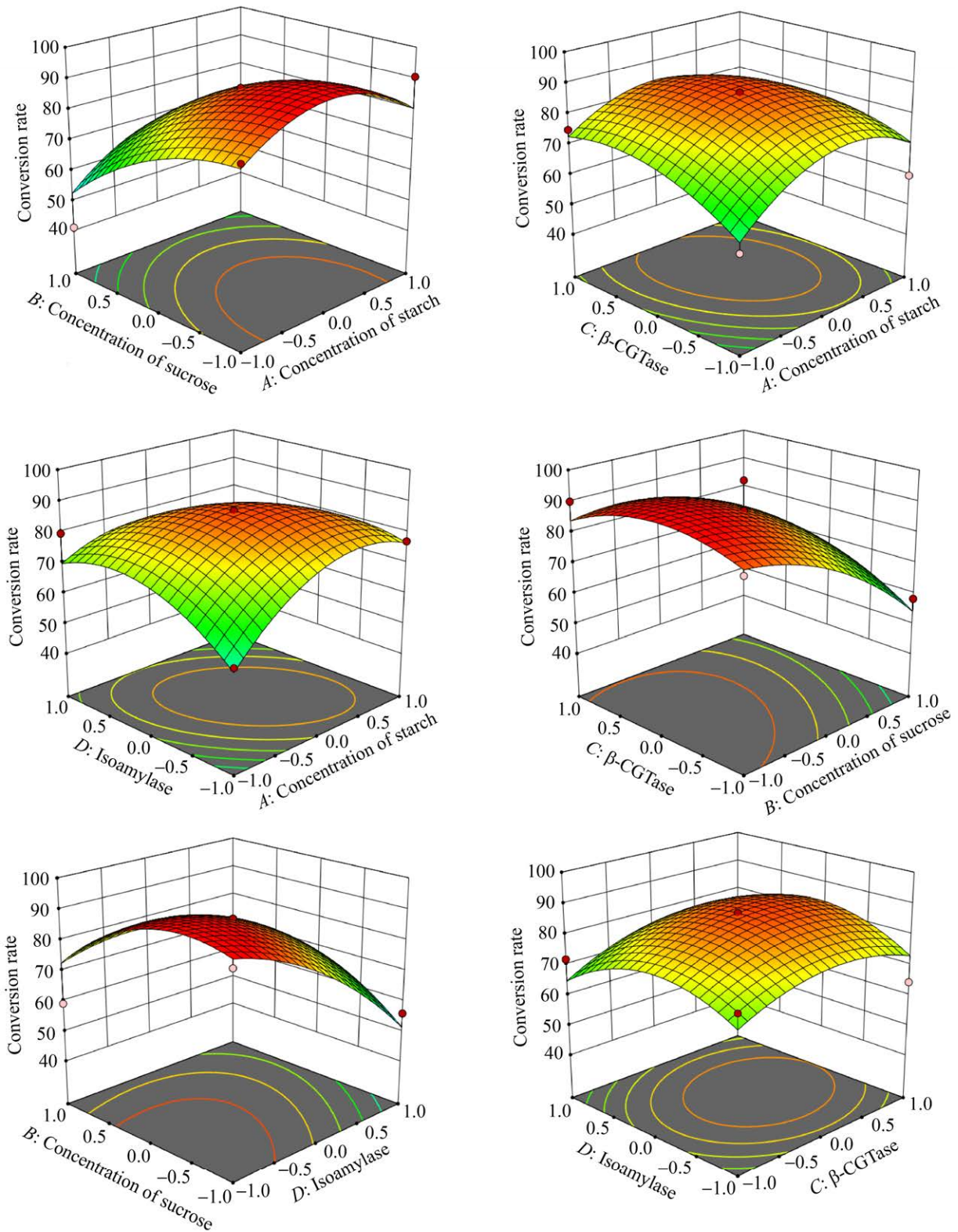


图 8 淀粉、蔗糖、 β -CGT 和异淀粉酶交互作用对耦合糖转化率的影响

Fig. 8 Effects of interaction of starch, sucrose, β -CGTase and isoamylase on the yield coupling sugar.

通过软件分析,得到偶合糖转化各因素的最优条件:马铃薯淀粉浓度 110 g/L、蔗糖 50 g/L、11.4 U/g 固定化 β -CGTase 与 33.6 U/g 异淀粉酶,偶合糖产率可达 92.6%,但该条件下淀粉的使用率较低,且获得的偶合糖浓度低。为了适应工业化生产,结合 Design Expert12 软件分析获得较优条件:马铃薯淀粉浓度 105 g/L、蔗糖 95 g/L、13.5 U/g 固定化 β -CGTase 与 45.0 U/g 异淀粉酶,其偶合糖产率为 88.4%。

3 结论

偶合糖因具有甜度纯正、着色性能良好、防结晶析出及抗龋齿效果显著等优点,被作为一种可代替蔗糖的新型甜味剂,得到越来越多的关注。鉴于偶合糖主要在食品领域应用,获得一种高效、食品安全、绿色的偶合糖制备工艺具有重要意义。

本研究以蔗糖为受体,分别从淀粉种类、温度、pH、加酶量、供受比、异淀粉酶复配等因素对 β -CGTase 制备偶合糖工艺进行了优化,具体优化工艺条件为:分别以 105 g/L 马铃薯淀粉,95 g/L 蔗糖为底物,调控 pH、温度分别为 5.5、40 $^{\circ}\text{C}$,将 45.0 U/g 异淀粉酶与 13.5 U/g 固定化 β -CGTase 进行复配反应 21 h,最终反应液中偶合糖产率为 88.4%,该产率为目前已报道的最高水平。该方法采用固定化酶,不仅酶催化效果好,且固定化酶可以反复多次使用,在效率、成本等方面更具有生产优势;本研究创新性将异淀粉酶复配应用于偶合糖的制备中,使淀粉的分支成分被水解而得到充分利用,进而产率提高了 12.2%。综上所述,文中关于 β -CGTase 制备偶合糖的工艺优化结果为酶法制备偶合糖的工业化应用进一步奠定了理论和实验基础。

REFERENCES

- [1] Kitahata S, Okada S. Transfer action of cyclodextrin glycosyltransferase on starch. *B ChemSoc JPN*, 1975, 39(11): 2185-2191.
- [2] Nilsson KGI. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Trends Biotechnol*, 1988, 6(10): 256-264.
- [3] Tonkova AA. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 22(8): 678-686.
- [4] Noguchi T, Kitamura S, Izumizawa K, et al. Clinical and microbial estimation of the effect of coupling sugar, sorbose and xylitol rinses on the early dental plaque formation in man. *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 1984, 51(3): 536-543.
- [5] Okada S. Studies on cyclomaltodextrin glucanotransferase and coupling sugar. *Journal of Applied Glycoence*, 1975, 34(1): 75-82.
- [6] Van der Veen BA, Van Alebeek GJ, Uitdehaag JC, et al. Uitdehaag, et al. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from bacillus circulans (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. *Eur J Biochem*, 2000, 267(3): 658-665.
- [7] Kobayashi S, Ashraf HRL, Braun P, et al. Coupling reaction of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase on glucosyl-cyclodextrin and Glucose. *Starch-Strke*, 1988, 40(3): 112-116
- [8] Okada S, Tsuyama N, Mitsuhashi M, et al. Process for preparing sucrose-starch sweetener free from reducing sugar: US, 3819484. 1974-06-25.
- [9] Sven P. Enzymatic process for glucosylation of glucosides: WO, 1992/013962. 1992-08-20
- [10] Monthieu C, Guibert A, Taravel FR, et al. Purification and characterisation of polyglucosyl-fructosides produced by means of cyclodextrin glucosyl transferase. *Biocatalysis*, 2003, 21(1): 7-15.
- [11] Martín MT, Cruces MA, Alcalde M, et al. Synthesis of maltooligosyl fructofuranosides catalyzed by immobilized cyclodextrin glucosyltransferase using starch as donor. *Tetrahedron*, 2004, 60(3): 529-534.
- [12] Zhang K, Su LQ, Duan XG, et al. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 32.
- [13] Mäkelä M, Korpela T, Laakso S. Colorimetric determination of β -cyclodextrin: two assay modifications based on molecular complexation of phenolphthalein. *J Biochem Biophys Methods*, 1987,

- 14(2): 85-92.
- [14] 杨玉路, 王蕾, 陈晟, 等. 重组 β -环糊精葡萄糖基转移酶生产 β -环糊精的工艺条件优化. 生物技术通报, 2014, (8): 175-181.
Yang YL, Wang L, Chen S, et al. Optimization of β -cyclodextrin production by recombinant β -cyclodextrin glycosyltransferase. *Biotechnol Bull*, 2014, (8): 175-181 (in Chinese).
- [15] Duan XG, Chen S, Chen J, et al. Enhancing the cyclodextrin production by synchronous utilization of isoamylase and α -CGTase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(8): 3467-3474.
- [16] 校秋燕, 夏咏梅. 固定化环糊精葡萄糖基转移酶的催化转苷. 中国食品添加剂, 2013, (1): 116-120.
Xiao QY, Xia YM. Immobilized cyclodextrin glycosyltransferase in catalyzing transglycosylation. *China Food Addit*, 2013, (1): 116-120 (in Chinese).
- [17] Plou FJ, Martín MT, De Segura AG, et al. Glucosyltransferases acting on starch or sucrose for the synthesis of oligosaccharides. *Can J Chem*, 2002, 80(6): 743-752.
- [18] BeMiller J, Whistler R, Eds. *Starch: Chemistry and Technology*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Inc., 2009, 3: 293-372.
- [19] 张攀峰. 不同品种马铃薯淀粉结构与性质的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
Zhang PF. Study on Structure and Properties of different varieties potato Starches[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012 (in Chinese).
- [20] 侯蕾, 韩小贤, 郑学玲, 等. 不同直链淀粉含量玉米淀粉研究进展. 粮食与油脂, 2013, 26(6): 11-14.
Hou L, Han XX, Zheng XL, et al. Research advance on corn starch with different content of amylose. *Cereals Oils*, 2013, 26(6): 11-14 (in Chinese).
- [21] 赵精杰, 刘培玲, 张晴晴, 等. 高静压糊化木薯淀粉的重结晶性质. 中国食品学报, 2019, 19(3): 75-85.
Zhao JJ, Liu PL, Zhang QQ, et al. Recrystallization properties of high hydrostatic pressure induced gelatinized tapioca starch. *J Chin Instit Food Sci Technol*, 2019, 19(3): 75-85 (in Chinese).
- [22] 马先红, 张文露, 张铭鉴. 玉米淀粉的研究现状. 粮食与油脂, 2019, 32(2): 4-6.
Ma XH, Zhang WL, Zhang MJ. Research status of corn starch. *Cereals Oils*, 2019, 32(2): 4-6 (in Chinese).
- [23] 余平, 石彦忠. 淀粉与淀粉制品工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 2011.
Yu P, Shi YZ. *Technology of starch and derived products*. Beijing: China Light Industry Press, 2011 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)