β-呋喃果糖苷酶法合成低聚乳果糖工艺优化

廖春龙[1,2]，印遇龙[1,2,3]，阮 征[1,2,*]，文红艳[1,2]
(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室，江西 南昌 330047；2.南昌大学生命科学与食品工程学院，江西 南昌 330031；3.中国科学院亚热带农业生态研究所，湖南 长沙 410125)

摘 要：目的：确定β-呋喃果糖苷酶合成低聚乳果糖的最佳工艺条件。方法：以蔗糖和乳糖为底物，利用β-呋喃果糖苷酶粗酶液合成低聚乳果糖，通过单因素和Box-Behnken试验，对酶法合成工艺进行响应面分析，得到酶法合成低聚乳果糖的最佳工艺参数。结果：最佳工艺条件为反应时间22.77h、pH7.0、反应温度35.0℃、底物质量浓度20.0g/100mL、底物与酶的体积比1:1，低聚乳果糖含量为22.70%。结论：Box-Behnken结合响应面优化果糖苷酶法合成低聚乳果糖工艺，模型可靠，方法可行。
关键词：低聚乳果糖；β-呋喃果糖苷酶；Box-Behnken试验设计；响应面

Process Optimization for *Beta*-fructofuranoside-catalyzed Synthesis of Lactosucrose

LIAO Chun-long[1,2]，YIN Yu-long[1,2,3]，RUAN Zheng[1,2,*]，WEN Hong-yan[1,2]
(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China；
2. College of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China；
3. Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract：Objective: To obtain the optimum process conditions for the synthesis of lactosucrose under the catalysis of β-fructofuranoside. Methods: Lactosucrose was prepared from lactose as an acceptor and sucrose as a fructosyl donor by a fructose-transferring enzyme, β-fructofuranoside derived from *Arthrobacter* sp.10138. The process was optimized by Box-Behnken experimental design followed by response surface analysis. Results: Adding the same volume of β-fructofuranoside solution to a mixture of lactose and sucrose in equal proportion by weight in aqueous solution to catalyze the reaction between the two sugars for 22.77 h at 35.0 ℃ provided optimum synthesis of lactosucrose, and the content of lactosucrose in reaction product was 22.70%. Conclusion: Combined use of Box-Behnken experimental design and response surface methodology has the feasibility to be used as a mathematical approach to optimize the synthesis process for lactosucrose, and the established model is reliable in predicting the content of lactosucrose in reaction product.
Key words：lactosucrose；β-fructofuranoside；Box-Behnken experimental design；response surface methodology
中图分类号：TS247 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2011)04-0102-05

低聚乳果糖(lactosucrose, LS)，化学名为*O*-β-*D*-galactopyranosyl-(1→2)-β-*D*-fructofuranoside，低聚乳果糖是以蔗糖和乳糖为底物，经节杆菌(*Arthrobacter* sp.)产生的β-呋喃果糖苷酶的作用生成的。β-呋喃果糖苷酶是一种胞外酶，由节杆菌发酵获得，它具有水解活力和果糖基转移活力，能将蔗糖水解成葡萄糖和果糖基，并通过转移活力将果糖基转移到乳糖的还原性末端C1原子上，得到低聚乳果糖[1-2]。

目前，低聚乳果糖生理功能的研究主要集中在作用机理、基因代谢调控以及其在医用保健方面的价值等方面[3-6]。低聚乳果糖很难被人唾液中的消化酶、胃液及小肠黏膜中的酶消化水解，几乎不被分解直达大肠，能量值极低，很少被转化为脂肪，具有降血脂、降低胆固醇等功效。研究发现[7]每天摄入5g低聚乳果糖，粪便中双歧杆菌数会有显著增加。研究表明低聚乳果糖可以改变肠道微生态环境，调节肠道的免疫功能[8]。由于能调节肠道微生物菌群的关系，低聚乳果糖对治疗慢性肠炎有一定效果[9]。低聚乳果糖经过肠道微生物代谢为乙酸、丙酸和丁酸等短链脂肪酸，可使得肠道内的pH值下降，从而抑制了肠道内腐败微生物和病源微生物的

收稿日期：2010-04-15
基金项目：南昌大学“赣江学者奖励计划”项目；中国博士后科学基金资助项目(20080440166)
作者简介：廖春龙(1985—)，男，硕士研究生，研究方向为农产品加工与碳水化合物利用。E-mail：lclong0213@126.com
*通信作者：阮征(1978—)，男，副教授，博士，研究方向为食物营养调控与糖工程。E-mail：ezruan@yahoo.com

生长[10]。基于低聚乳果糖的上述几种生理功能，服用一定量的低聚乳果糖不仅能够调整肠道菌群，而且可以降低某些疾病发生的风险性。

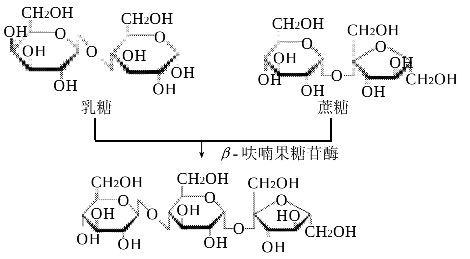


图 1　低聚乳果糖的生成反应
Fig.1　Reaction mechanism for lactosucrose synthesis

目前，国内的低聚糖生产厂家总的年产能大约为 10 万吨左右，其中主要种类为低聚异麦芽糖和低聚果糖，而我国 2011 年低聚糖产品的年需求量将达 20 万吨以上，市场缺口比较大。由于我国低聚糖的种类和产能都与国外存在较大的差距，所以研究开发新型的低聚糖及实现其工业化具有重要的意义。低聚乳果糖的产业化在国内一直未见报道，原因是在生产中酶的活力和糖的纯化制约了其在国内的发展。随着人们保健意识的日益增强和食品工业的发展，各种新型功能性食品添加剂的市场需求越来越大，作为具有巨大发展潜力的低聚乳果糖的需求缺口也将越来越大，而酶法合成低聚乳果糖是唯一能解决这个问题的方法，因此低聚乳果糖酶法合成技术已成为急待解决的问题。

本实验拟通过单因素和 Box-Behnken 试验设计，对酶法合成工艺进行响应面分析，以期获得酶法合成低聚乳果糖的最佳工艺参数，为低聚乳果糖的中试和生产提供一定参考。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

菌种(*Arthrobacter* sp. 10138)　中国普通微生物菌种保藏管理中心；β-呋喃果糖苷酶粗酶液(酶活 250U/mL)　实验室自制；低聚乳果糖标准样　日本 WAKO 有限公司；乙腈(色谱纯)　美国 Tedia 公司；蔗糖、乳糖均为分析纯；二次蒸馏水。

1.2　仪器与设备

SHA-CA 水浴恒温振荡器　江苏金坛市荣华仪器有限公司；1200 高效液相色谱仪(配有美国 Softa Model 300s ELSD 检测器)　美国 Agilent 公司。

1.3　方法

1.3.1　粗酶液制备

菌种活化后按体积分数 2% 的接种量接入发酵培养基中，30℃、pH7.0、110r/min 培养 24h，装液量为 500mL 发酵瓶装 200mL。培养结束后将培养液以 4000r/min 离心 20min，收集上清液置于－20℃冰柜中放置 1d，再取出解冻，使没有离心干净的节杆菌因溶胀作用而失活。经过酶活测定，酶活为 250U/mL。一个酶活力单位定义为在 pH7.0 条件下，将 3mL 粗酶液和 3mL 糖液(含 20g/100mL 蔗糖和乳糖)于 37℃反应 24h，每分钟产生 10^{-9}mol 低聚乳果糖的量。

1.3.2　酶法合成低聚乳果糖

乳糖蔗糖混合液与酶混合，考察底物质量浓度、反应时间、反应 pH 值、酶用量、反应温度 5 因素对低聚乳果糖得率的影响，用单因素试验得出水平范围，再用 Box-Behnken 设计结合响应面分析确定找到最佳酶法合成条件。

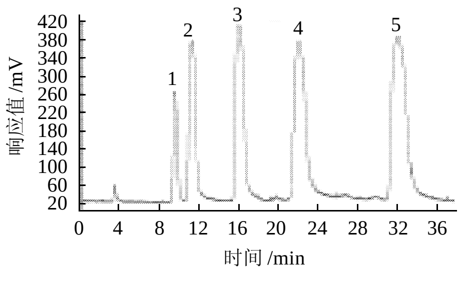
1.4　检测方法

采用 HPLC-ELSD 法对低聚乳果糖含量进行测定。HPLC 色谱条件：色谱柱：Kromasil 氨基柱(250mm × 4.6mm，5μm)；流动相：乙腈 - 水(75:25)；流速：1mL/min；柱温：30℃；漂移管温度：70℃；检测器：蒸发光散射检测器。

2　结果与分析

2.1　低聚乳果糖的成分分析

微生物酶法合成的低聚乳果糖成分比较复杂，主要包括果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、低聚乳果糖，低聚乳果糖的液相色谱图如图 2 所示。



1.果糖；2.葡萄糖；3.蔗糖；4.乳糖；5.低聚乳果糖。

图 2　低聚乳果糖的液相色谱图
Fig.2　HPLC chromatogram of lactosucrose synthesized under the catalysis of β-fructofuranoside

2.2　底物质量浓度对 LS 合成的影响

以等质量混合乳糖和蔗糖为底物，取不同质量分数的底物混合液 3mL，与 3mL 粗酶液混合，底物 pH7.0，反应温度 37℃，反应时间为 16h，混合后底物质量浓度水平选择 10、20、30、40、50、60g/100mL。

由图 3 可以看出，底物质量浓度的变化对 LS 的得

率影响不大，理论上增加底物质量浓度可以降低整个体系的水分活度，可以增加酶的转移活性，但是增加底物质量浓度，底物的黏度也会随之增加，不利于反应的进行，所以在实际的操作过程中，底物质量浓度选择20g/100mL是比较符合实验要求的。

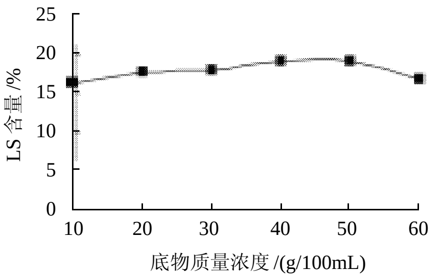


图3 底物质量浓度对LS合成的影响

Fig.3 Effect of total concentration of two sugars in aqueous solution on lactosucrose synthesis

2.3 反应时间对LS合成的影响

乳糖蔗糖混合液3mL与3mL粗酶液混合，底物质量浓度20g/100mL，底物pH7.0，反应温度37℃，反应时间水平为8、16、24、32、40、48h。

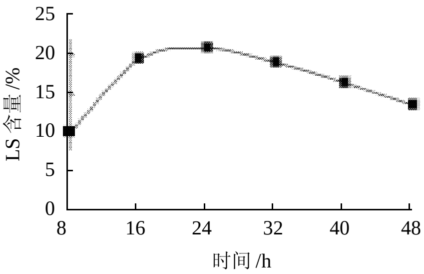


图4 反应时间对LS合成的影响

Fig.4 Effect of reaction time on lactosucrose synthesis

当底物质量浓度20g/100mL、反应时间24h，LS最大得率为20.91%，当反应时间继续增加时，低聚乳果糖含量反而会降低。LS酶法合成是一个可逆反应，随着反应时间的增加，水解产物葡萄糖的增加会抑制合成反应的正向进行，LS水解，含量降低。

2.4 底物pH值对LS合成的影响

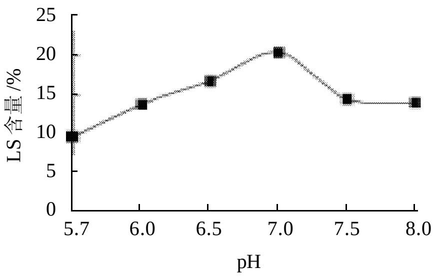


图5 pH值对LS合成的影响

Fig.5 Effect of pH on lactosucrose synthesis

乳糖蔗糖混合液3mL与3mL粗酶液混合，底物质量浓度20g/100mL，反应时间24h，反应温度37℃，底物pH5.7、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。

由图5可得，底物pH7.0时，LS含量为20.51%，说明底物pH7.0时，酶的转移活力最高，pH值过高或者过低都会影响酶的转移活力。

2.5 酶用量对LS合成的影响

配制60%混合糖液，取3mL，分别加入0.5、1、2、3、4、5mL粗酶液，然后再加入PBS缓冲液(0.05mol/L、pH7.0)至9mL，确保体系的底物质量浓度20g/100mL，反应时间24h，反应温度37℃，底物pH7.0，考察酶用量对LS合成的影响。

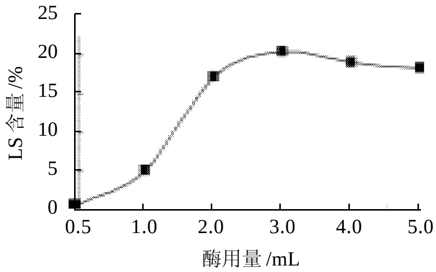


图6 酶用量对LS合成的影响

Fig.6 Effect of enzyme amount on lactosucrose synthesis

酶用量过低，LS含量也低，究其原因是因为酶浓度过低，底物与酶的结合不充分，随着酶用量的增加，LS含量会急剧增加，当酶用量为3mL的时候，LS含量为20.32%，随着酶用量的继续增加，LS的含量反而有所降低，分析其原因可能是因为酶所具有的水解活性水解低聚乳果糖所造成的，所以3mL混合糖液中酶用量为3mL，即混合糖液与酶用量体积比为1:1为最佳。

2.6 反应温度对LS合成的影响

乳糖蔗糖混合液3mL与3mL粗酶液混合，底物质量浓度20g/100mL，反应时间24h，底物pH7.0，反应温度水平选择为27、32、37、42、47℃。

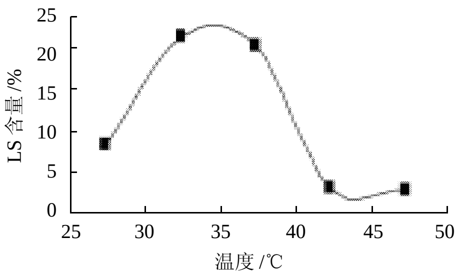


图7 反应温度对LS合成的影响

Fig.7 Effect of reaction temperature on lactosucrose synthesis

温度过低时，则酶的活性低，故合成的LS含量也低，在32～37℃的时候，LS含量比较高，在32℃时，LS含量达到21.77%。随着温度的再度增加，酶活降低，LS合成的量急剧下降。

2.7 响应面优化LS合成工艺

根据单因素试验结果，选择反应时间、底物pH值、反应温度这3个因素设计试验，用响应面对合成工艺进行优化。

表1 β-呋喃果糖苷酶法合成低聚乳果糖响应面试验因素水平编码表

Table 1 Coded values and corresponding actual values of variables in response surface analysis

因素	水平		
	－1	0	1
X_1 时间/h	16	24	32
X_2 pH	6.5	7.0	7.5
X_3 温度/℃	30	35	40

表2 β-呋喃果糖苷酶法合成低聚乳果糖Box-Behnken试验设计与结果

Table 2 Scheme and experimental results for response surface analysis

试验号	X_1	X_2	X_3	LS含量/%
1	－1	－1	0	17.30
2	－1	1	0	21.45
3	1	－1	0	18.72
4	1	1	0	17.51
5	0	－1	－1	14.71
6	0	－1	1	19.71
7	0	1	－1	18.23
8	0	1	1	15.31
9	－1	0	－1	16.77
10	1	0	－1	19.75
11	－1	0	1	19.90
12	1	0	1	18.25
13	0	0	0	22.45
14	0	0	0	22.96
15	0	0	0	22.23

利用SAS软件对试验结果进行分析，得到LS得率与反应时间、底物pH值、反应温度的二次多项回归模型为Y=22.54667－0.14875X_1＋0.2575X_2＋0.46375X_3－1.062083X_1^2－1.34X_1X_2－1.1575X_1X_3－2.739583X_2^2－1.98X_2X_3－2.817083X_3^2，由表3可知，X_1X_2、X_1X_3项显著，X_2^2、X_2X_3、X_3^2项极显著，其因变量和全体自变量之间的线性关系即回归方程的相关系数为0.9554，这也表明响应值的变化有95.54%来自有所选变量(反应时间、底物pH值、反应温度)，平方项极显著、交互项显著、模型极显著，失拟项不显著，表明该方程对试验拟合较好，可以用于LS酶法合成的预测。

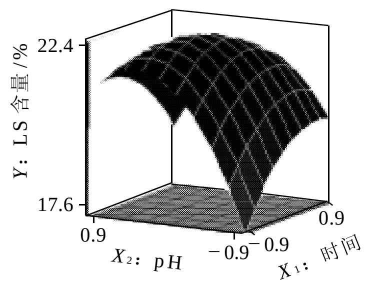
表3 响应面试验结果方差分析

Table 3 Analysis of variance of the predicative regression model for the content of lactosucrose in reaction product

方差来源	自由度	平方和	R^2	均方	F值	P值	显著性
X_1	1	0.177012		0.177012	0.22223	0.657199	
X_2	1	0.53045		0.53045	0.665952	0.451577	
X_3	1	1.720513		1.720513	2.160014	0.201593	
X_1^2	1	4.165001		4.165001	5.228942	0.070942	
X_1X_2	1	7.1824		7.1824	9.017131	0.030001	*
X_1X_3	1	5.359225		5.359225	6.728229	0.048608	*
X_2^2	1	27.711942		7.71194	34.7909	0.001993	**
X_2X_3	1	15.6816		15.6816	19.68744	0.006783	**
X_3^2	1	29.302		29.302	36.78714	0.001759	**
一次项	3	2.427975	0.0272		1.02	0.4591	
平方项	3	54.595092	0.6119		22.85	0.0024	**
交互项	3	28.223225	0.3163		11.81	0.0105	*
模型	9	85.246292	0.9554	9.47181	11.89137	0.0070	**
失拟项	3	3.702175		1.234058	8.80	0.1038	
纯误差	2	0.280467		0.140233			
总误差	5	3.982642		0.796528			
总和	14	89.22893					

注：*.差异显著，P＜0.05；**.差异极显著，P＜0.01。下同。

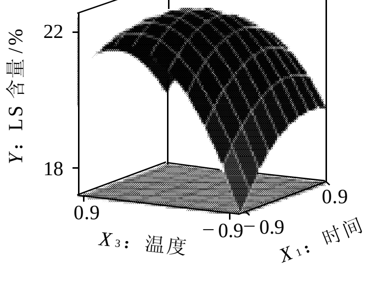
响应面图形是响应值对各因素X_1、X_2、X_3所构成的三维空间曲面图，从这些三维图可以很直观的看出各参数和最佳参数之间的相互作用。



固定水平：温度30℃。

图8 $Y=f(X_1,X_2)$的响应面

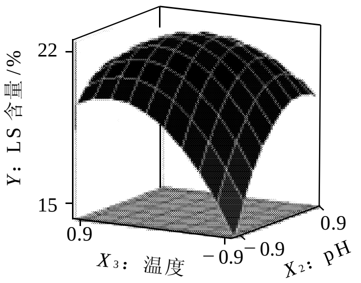
Fig.8 Response surface polt of $Y=f(X_1,X_2)$



固定水平：pH7.0。

图9 $Y=f(X_1,X_3)$的响应面

Fig.9 Response surface polt of $Y=f(X_1,X_3)$



固定水平：时间24h。

图10 $Y=f(X_2,X_3)$的响应面

Fig.10 Response surface polt of $Y=f(X_2,X_3)$

通过运行所编写程序得到最佳工艺参数的临界值，如表6所示，反应时间22.77h、pH7.03、反应温度35.48℃，在最佳工艺条件下LS预测值22.59%，由于在实际操作过程中，条件控制达不到如此精确，故取最佳反应时间22.77h、pH7.0、反应温度35℃，在此条件下的实际值为(22.70 ± 0.2)%(重复3次)，说明该模型可靠。

表4 临界值

Table 4 Critical values of various reaction conditions

因素	X_1	X_2	X_3
编码	－0.154003	0.049807	0.096445
实际值	22.77	7.03	35.48

3 讨论与结论

中心组合(CCD)设计和Box-Behnken设计均可以拟合一个二次完全析因设计的响应面设计，也是目前较为常用的响应面法。作为3水平部分因素设计的Box-Behnken设计是相对于中心组合设计的较优选择。通过Box-Behnken设计和响应面分析，利用SAS软件，优化低聚乳果糖的酶法合成工艺参数(底物质量浓度、酶用量、反应时间、底物pH值、反应温度)，最终得到最佳工艺参数为底物质量浓度20g/100mL、底物与酶的体积比1:1、反应时间22.77h、pH7.0、反应温度35℃，在此条件下酶法合成低聚乳果糖含量为22.7%，取得较理想效果，该实验对酶法合成低聚乳果糖的工业化有一定的指导作用。

朱桂兰等[11]对低聚乳果糖的酶法合成进行研究，反应条件为等体积的粗酶液和糖液(含40%的蔗糖和乳糖)，pH6.5于37℃反应24h，得到低聚乳果糖含量为16.38%。Han等[12]也对该反应进行了研究，得到的最佳工艺参数是23℃、pH7.0、底物质量浓度36g/100mL(蔗糖18%、乳糖18%)，得到的低聚乳果糖含量28.50%，此结果与本实验的结果相比较高，可能是因为酶有所不同，Han等[12]使用的酶为果聚糖蔗糖酶(levansucrase)。

由于在合成低聚乳果糖的过程中，会存在副反应和逆反应，即β-呋喃果糖苷酶会水解蔗糖产生葡萄糖和水解低聚乳果糖，会抑制合成反应的进行，如果想使反应产生更多的低聚乳果糖，就必须使用一定的手段移除反应过程中产生的葡萄糖，否则很难将低聚乳果糖的含量提高。如利用酵母消耗反应过程中的葡萄糖，利用流化床移除葡萄糖，或者利用双酶法等方法提高酶催化反应产生的低聚乳果糖含量，再通过过膜、离子交换层析等方法来提高低聚乳果糖的含量[13-16]，而国内这些技术在低聚乳果糖开发利用上的研究较少，是进一步研究的重点。

参考文献：

[1] FUJITA K, HARA K, HASHIMOTO H, et al. Purification and some properties of β-fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. K-1[J]. Agric Biol Chem, 1990, 54(4): 913-919.

[2] FUJITA K, HARA K, HASHIMOTO H, et al. Transfructosylation catalyzed by β-fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp.K-1[J]. Agric Biol Chem, 1990, 54(10): 2655-2661.

[3] KISHINO E, NORII M, FUJITA K, et al. Enhancement by lactosucrose of the calcium absorption from the intestine in growing rats[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70(6): 1485-1488.

[4] TANIGUCHI Y, MIZOTE A, KOHNO K, et al. Effects of dietary lactosucrose (4^G-β-*D*-galactosylsucrose) on the IgE response in mice[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(11): 2766-2773.

[5] AKIKO M, YOSHIFUMI T, YASUHIKO T, et al. Lactosucrose inhibits body fat accumulation in rats by decreasing intestinal lipid absorption [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(3): 582-587.

[6] NAOKO H, YOSHIAKI S, HIROMI T. Effect of post-prandial posture on orocecal transit time and digestion of milk lactose in humans[J]. Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science, 2004, 23(3): 75-80.

[7] OHKUSA T, OZAKI Y, SATO C, et al. Long-term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp. in human fecal flora[J]. Digestion, 1995, 56 (5): 415-420.

[8] KEIKO H, MAYUMI K, TAKEO S, et al. Effect of dietary lactosucrose (4^G-β-*D*-galactosylsucrose) on the intestinal immune functions in mice [J]. The Japanese Society of Applied Glycoscience, 2007, 54(3): 169-172.

[9] TERAMOTO F, ROKUTAN K, KAWAKAMI Y. Effect of 4^G-β-*D*-galactosylsucrose (lactosucrose) on fecal microflora in patients with chronic inflammatory bowel disease[J]. J Gastroenterot, 1996, 31(1): 33-39.

[10] RUPEREZ P. Oligosacáridos bifidogénicos[J]. Food Science and Technology International, 1998, 4(4): 237-243.

[11] 朱桂兰, 童群义. 节杆菌10137产β-呋喃果糖苷酶条件及酶学性质[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(5): 78-81.

[12] HAN W C, BYUN S H, KIM M H, et al. Production of lactosucrose from sucrose and lactose by a levansucras from zymomonas mobilis[J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19(10): 1153-1160.

[13] 冈部浩幸, 阿贺创, 久保田伦夫, 等. 乳蔗糖高含量糖及其制造方法和用途: 中国, CN1946853A[P]. 2007-04-11.

[14] 村上和史, 伊藤哲也, 藤田孝辉, 等. 结晶乳果寡糖或含该糖的含蜜结晶及其用途: 中国, CN1993374A[P]. 2007-07-04.

[15] KAWASE M, PILGRIM A, ARAKI T, et al. Lactosucrose production using a simulated moving bed reactor[J]. Chemical Engineering Science, 2001, 56(2): 453-458.

[16] PILGRIM A, KAWASE M, MATSUDA F, et al. Modeling of the simulated moving-bed reactor for the enzyme-catalyzed production of lactosucrose[J]. Chemical Engineering Science, 2006, 61(2): 353-362.