

以糖蜜为原料利用双酶法制备低聚果糖

潘莹¹, 甄远航¹, 徐光辉^{2,3}, 谢凌波², 张菡³, 江波^{*1}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 中粮屯河崇左糖业有限公司 广西壮族自治区认定企业技术中心, 广西 崇左 532200; 3. 中粮糖业控股股份有限公司 新疆维吾尔自治区甜菜制糖工程研究中心, 新疆 昌吉 831100)

摘要: 以制糖业的加工副产品糖蜜为原料, 利用糖蜜中蔗糖通过双酶法转化开发一种饲料级低聚果糖的加工工艺, 以提高糖蜜的附加值及利用率。以果胶酶和果糖基转移酶为复合酶液, 通过单因素实验确定的糖蜜酶反应制备低聚果糖的最佳条件为: 反应温度 55 °C、pH 5.5、果胶酶与果糖基转移酶的体积比为 20:1、酶反应时间 10 h。在最佳条件下, 低聚果糖的转化率可达 45%。随着酶反应时间的延长, 反应体系的黏度逐渐下降并趋于稳定, 有利于酶反应转化率的提高和后续的干燥。

关键词: 糖蜜; 果胶酶; 果糖基转移酶; 低聚果糖

中图分类号: TS 249.3 文章编号: 1673-1689(2021)09-0050-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.09.007

Studies of Dual-Enzymatic Preparation for Fructo-Oligosaccharides with Molasses

PAN Ying¹, ZHEN Yuanhang¹, XU Guanghui^{2,3}, XIE Lingbo², ZHANG Han³, JIANG Bo^{*1}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 21422, China; 2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Enterprise Technology Center, Cofco Tunhe Chongzuo Sugar Co., Ltd., Chongzuo 532200, China; 3. Xinjiang Uygur Autonomous Region Engineering Research Center of Beet Sugar, Cofco Sugar Holding Co., Ltd., Changji 831100, China)

Abstract: Molasses, a by-product of sugar industry, was used as the raw material in this study to improve the added value and utilization of molasses, and a feed grade fructo-oligosaccharide processing technology was developed through the dual-enzyme reaction to use the sucrose from molasses. The optimal conditions for enzymatic preparation method of fructo-oligosaccharides were determined by single-factor experiments. The results showed that the optimal reaction conditions were as follows: temperature of 55 °C, pH value of 5.5, reaction ratio between pectinase and fructosyltransferase of 20:1 and reaction time for 10 h. The conversion rate of fructo-oligosaccharides was up to 45%. In addition, the viscosity gradually decreased to a stable value with the increased reaction time, which was beneficial for improving the conversion rate and subsequent drying process.

Keywords: molasses, pectinase, fructosyltransferase, fructo-oligosaccharides

收稿日期: 2021-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871745); 广西壮族自治区崇左市科技计划项目(CTCZ-YF-BCXY-2019-11-01)。

* 通信作者: 江波(1962—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品化学和应用酶技术研究。E-mail: bjiang@jiangnan.edu.cn

糖蜜作为制糖业的加工副产品,是一种深褐色、呈黏稠状、半流动的液体,仅在蔗糖加工过程中每年就能产生 350 万吨的废料糖蜜。糖蜜中可溶性碳水化合物质量分数较高,含有 40%~50%,蔗糖在所含糖类中质量分数超过 50%,还含有质量分数 8%~10%的矿物质和少量的蛋白质^[1]。作为益生元的重要组成部分,低聚果糖(FOS)根据其结构可分为两类:葡萄糖-果糖型(GF_n)和果糖-果糖型(F_n),GF_n型 FOS 一般由蔗果三糖(GF₂)、蔗果四糖(GF₃)和蔗果五糖(GF₄)组成^[2]。FOS 因具有良好的溶解性、热稳定性及较低的甜度,常用于提升食品口感与延长产品货架期^[3]。此外,优良的保健功能和特殊的生理活性,如具有促进消化道有益菌的生长、吸附肠道病原菌、刺激机体产生免疫因子和提高饲料利用率等作用,使 FOS 逐渐被大众所关注,并被视为取代抗生素的可能配料之一。因此,将糖蜜作为原料利用双酶法制备低聚果糖具有重大意义^[4-5]。

β -果糖基转移酶 (FTase, 亦称 β -呋喃果糖苷酶)通过水解蔗糖分子上葡萄糖和果糖间的 β (1 $\rightarrow$ 2) 糖苷键,使果糖基与另一蔗糖分子连接而生成 FOS^[6]。Reddy 等报道以 2%(质量分数)甘蔗糖蜜和 0.5%(质量分数)豆粕为底物,使 *Aspergillus niger* PSSF21 产出的 β -呋喃果糖苷酶(FFase)酶活最高,生成的主要产物为 GF₂ 和 GF₃^[7]。以甜菜糖蜜为原料,Zhang 通过发酵法制取低聚果糖,培养方法简单易行,操作方便,但该方案中仅利用微生物产生的果糖基转移酶水解糖蜜,长时间的发酵使低聚果糖含量大幅度降低,使低聚果糖在行业中的应用受到限制^[8]。Khatun 等鉴定出一种高效产低聚果糖的菌株 *Aureobasidium pullulan*, 以此作为全细胞生物催化剂,从而避免了昂贵的酶回收和纯化的需要^[9]。但菌株的培养及活化通常需要 36~72 h,二级种子液也至少需要发酵 72 h,耗费时间过长。糖蜜中含有 10%(质量分数)的胶体含量,其中胶体的主要成分是果胶质,较高的胶体含量引起糖蜜黏度过大,导致糖蜜利用困难,因此利用果胶酶(Pectinase)去除果胶质是糖蜜生产 FOS 的一个良好前提^[10]。当前研究均以果糖基转移酶为单一酶,而作者以糖蜜为原料,利用果胶酶和果糖基转移酶为复合酶液,制备高转化率的低聚果糖,提高了制糖副产物的利用率及附加值,降低了饲料级低聚果糖的生产成本。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

糖蜜:中粮屯河崇左糖业有限公司提供;*D*-葡萄糖、*D*-果糖、蔗糖标准品:国药集团化学试剂公司产品;蔗果三糖(GF₂)、蔗果四糖(GF₃)、蔗果五糖(GF₄):Sigma 公司产品;果胶酶(800 U/mL)、果糖基转移酶(5 000 U/mL):作者所在实验室提供;所用其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

夹层酶反应器:上海申迪玻璃仪器有限公司产品;DF0825 型浸入式高低温恒温循环装置:南京百思禾生物科技有限公司产品;RVDV-II+P 型黏度计:美国 Brookfield 公司产品;FE20 型 pH 计:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品;FreeZone 冷冻干燥机:美国 Labconco 公司产品;Carbolite 马弗炉:弗尔德(上海)仪器设备有限公司产品;K-360 型凯氏定氮仪:瑞士 Buchi 公司产品;Waters e2695 高效液相色谱仪:美国 Waters 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 样品成分分析及检测方法 蛋白质含量测定参照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中凯氏定氮法;总糖含量测定参照 GB 5009.7—2016《食品安全国家标准 食品中还原糖的测定》中直接滴定法;水分含量测定参照 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中直接干燥法;灰分含量测定参照 GB 5009.4—2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》。糖组分及含量测定通过高效液相色谱仪和示差折光检测器联用测定。色谱条件如下:色谱柱为 ZORBAX NH₂ 柱(Agilent, 4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m);流动相比为 *V*(乙腈):*V*(水)=70:30;流量 1 mL/min;进样量 10 μ L;柱温 30 $^{\circ}$ C。

1.3.2 糖蜜酶解液的制备方法 取一定量的糖蜜制备为水溶液,将糖蜜与水混合后搅拌至糖蜜完全溶解于水中并调整其固形物质量分数为 50%,在一定的温度及 pH 条件下加入果胶酶和果糖基转移酶的复合酶液进行反应,定时取样,通过高效液相色谱检测溶液的糖分组成^[11]。

1.3.3 不同复合酶液比例对 FOS 转化率的影响 取 1 L 溶解后的糖蜜水溶液在反应温度为 55 $^{\circ}$ C、pH 5.5 的条件下,加入 12.5 mL 不同比例的果胶酶

和果糖基转移酶的复合酶液(果胶酶与果糖基转移酶体积比分别为 10:1、15:1、20:1、25:1),并与单独加入果胶酶及果糖基转移酶的酶解液进行比较,反应过程中定时取样检测低聚果糖的转化率及黏度。

黏度测定:调节黏度计高度,使转子逐渐浸入样品中并稳定 3 min 后开始测量,当 2 号转子以 100 r/min 的转速在液体中旋转 20 圈后读数,每个样品测量 3 次。

1.3.4 不同反应温度对 FOS 转化率的影响 将溶解后的糖蜜水溶液在反应温度分别为 40、45、50、55、60 °C, pH 5.5 的条件下,加入果胶酶和果糖基转移酶的复合酶液(果胶酶与果糖基转移酶的体积比为 20:1),反应过程中定时取样检测。

1.3.5 不同反应 pH 对 FOS 转化率的影响 将溶解后的糖蜜水溶液在反应温度为 55 °C, pH 分别控制为 4.5、5.0、5.5、6.0 的条件下,加入果胶酶和果糖基转移酶的复合酶液(果胶酶与果糖基转移酶的体积比为 20:1),反应过程中定时取样检测。

1.3.6 冷冻干燥 将所得酶解液沸水浴灭酶 10 min, FOS 糖浆浓缩至 80%(质量分数)后放入真空冷冻干燥机内,调节真空冷冻干燥机的温度为-60 °C,干燥得到固体。

1.4 数据处理

采用 Origin 8.0 进行曲线拟合和 SPSS 21.0 软件进行数据统计与分析。

2 结果与分析

2.1 糖蜜样品成分分析

对糖蜜样品的组成成分进行分析(见表 1)。糖蜜中总糖的质量分数为 55.03 g/hg, 其中蔗糖质量分数为 33.29 g/hg, 占总糖质量分数的 60.5%, 与报道结果基本吻合^[12]。

2.2 复合酶液比例对 FOS 转化率的影响

研究了果胶酶和果糖基转移酶的比例对 FOS 转化率的影响。由图 1 可知,果胶酶单独使用时对糖的组成几乎没有影响,果胶酶与果糖基转移酶的复配较单一使用果糖基转移酶可以显著提高 FOS 的转化率,且反应 10 h 后 FOS 转化率基本保持平衡。当果胶酶与果糖基转移酶的体积比从 10:1 增加到 25:1 时,FOS 的转化率不断增加,最高达 41.5%。而果胶酶与果糖基转移酶的体积比由 20:1 增加到 25:1 时,FOS 的转化率增加不明显。因此,选用果胶

表 1 糖蜜样品成分分析

Table 1 Composition analysis of molasses

成分	质量分数/(g/hg)
蛋白质	8.14±0.38
总糖	55.03±1.22
果糖	3.75±0.22
葡萄糖	0.77±0.16
蔗糖	33.29±1.58
低聚果糖	0.42±0.13

注:总糖的质量分数以葡萄糖量计。

酶与果糖基转移酶的体积比为 20:1。袁伟岗^[13]利用固定化果糖基转移酶生产低聚果糖时,当蔗糖质量分数在 45%~65%时,FOS 的质量分数最高可达 40%。而本文中底物仅含约 25%(质量分数)的蔗糖即可达到相同的效果。

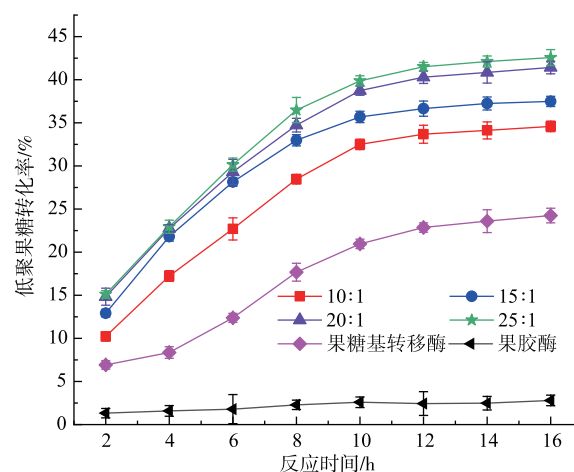


图 1 果胶酶与果糖基转移酶不同添加比例对低聚果糖转化率的影响

Fig. 1 Effects of different ratio of pectinase to FTase on recovery of FOS

2.3 反应温度对 FOS 转化率的影响

温度过高会使维持酶蛋白空间构象的次级键发生断裂从而导致酶变性失活,温度太低则导致酶的转化率降低^[14]。考虑到果胶酶和果糖基转移酶的最适反应温度,研究了反应温度对 FOS 转化率的影响。由图 2 可知,随着反应温度从 40 °C 升至 55 °C 时,FOS 的转化率逐渐升高,最高达 35%。而随着温度进一步升高至 60 °C,FOS 的转化率有所下降。由此表明,酶反应的最佳温度为 55 °C。当温度低于 55 °C 时,反应速率受到影响,当高于 55 °C 时,由于酶的部分失活,产物的合成受到抑制,这也反映出

酶的稳定性与温度呈一定的相关性^[15]。Zhang^[8]的研究结果表明,温度对 FOS 的产量有显著影响,发酵温度为 30 ℃时 FOS 产量达到最高,而升至 35 ℃后,FOS 的产量就下降了 22%。

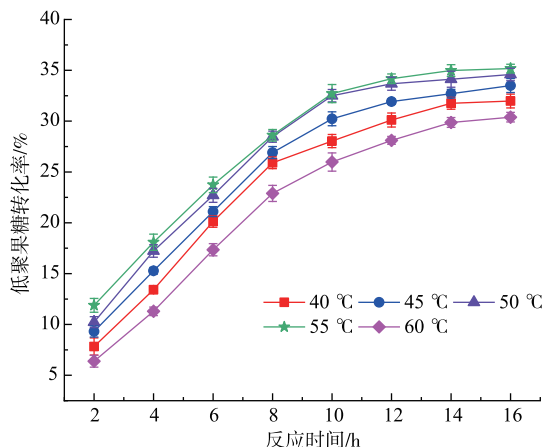


图2 不同反应温度对低聚果糖转化率的影响

Fig. 2 Effects of temperatures on recovery of FOS

2.4 反应 pH 对 FOS 转化率的影响

反应液的 pH 会影响酶和底物带电情况,从而影响酶和底物的解离和结合。因此,研究了酶反应的 pH 对低聚果糖转化率的影响,最终确定最适反应 pH。由图 3 可知,pH < 5.0 时,过酸的反应体系导致酶活力大幅度下降,因此 FOS 的转化率也相应降低。同时,pH 为 6.0 的反应环境对酶活力也有一定的影响,对生产高转化率的 FOS 并无提高作用。因此,确定该反应的最适宜 pH 为 5.0~5.5,这与 Mouelhi 等^[16]的实验结果相符。

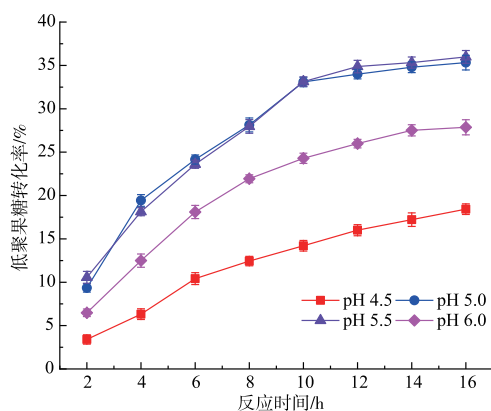


图3 不同反应 pH 对低聚果糖转化率的影响

Fig. 3 Effects of pH on recovery of FOS

2.5 反应过程中黏度变化

流体黏度是液体流动时不同速度层分子间的动量传递及分子间引力作用所产生的内摩擦的表现,与流体内部的微观分子作用有关^[17]。在反应温度 55 ℃、pH 5.5 的条件下,调节果胶酶和果糖基转移酶的体积比在最适条件下,测定不同反应时间下溶液黏度的变化。由图 4 可知,在反应初期,酶解液的黏度仍有 2.9 mPa·s,随着反应时间的延长,酶解液的黏度下降较快,当反应 8 h 后,反应体系黏度变化趋势变缓,并趋于一个定值,其中一个原因是果胶酶的存在引起这一现象的发生^[18]。可溶性树胶作为糖蜜的成分之一,由于两者之间的相互结合,形成一种相对稳定的可溶性状态液体。果胶酶可以通过降解其中的果胶物质破坏其混合胶体的结构,使其转变为不可溶状态,此时体系黏度则呈现较大幅度下降^[19]。由反应进程可知,体系黏度的下降更易于酶反应的进行,传质状况良好,使得反应过程中酶解液中 FOS 转化率上升。

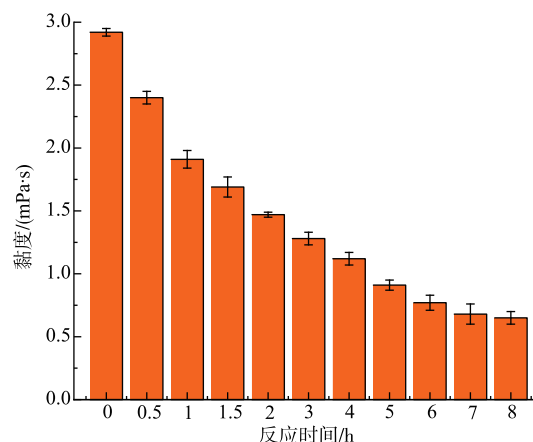


图4 不同时间下反应体系黏度的变化曲线

Fig. 4 Viscosity curve of reaction system under different times

2.6 FOS 固体粉末成分分析

在上述研究所得的最优条件下反应制备所得的酶反应液,经冷冻干燥后得到饲料级 FOS 固体粉末,并对其成分进行分析,结果如表 2 所示。与原样品相比,经过酶反应后,蔗糖占总糖质量分数降低而低聚果糖占总糖质量分数升高,蛋白质质量分数与其他研究结果相似^[20]。因此,所制备的 FOS 可以作为一种优质的无抗生素饲料资源。

表 2 FOS 固体粉末成分分析
Table 2 Composition analysis of FOS solid powder

成分	质量分数/%
水分	3.67±0.42
灰分	8.42±0.81
蛋白质	12.91±0.25
总糖	68.29±1.46
果糖	14.59±1.86
葡萄糖	18.51±0.38
蔗糖	7.12±0.71
低聚果糖	31.62±0.64

注:各成分质量分数均以干粉质量计,其中总糖质量分数以葡萄糖量计。

3 结 语

为了提高糖蜜的加工价值,扩大其应用范围,作者利用果胶酶和果糖基转移酶的复合酶液,确定了酶解糖蜜生产 FOS 的最佳条件,并通过真空冷冻干燥制备低聚果糖固体粉末。该法的最优反应条件为果胶酶与果糖基转移酶体积比为 20:1、反应温度 55 ℃、pH 5.5、酶解时间 10 h, FOS 转化率可达 45%。干燥后的固态低聚果糖粉,比液态低聚果糖更利于运输,因而减少了运输成本,具有更广泛的应用范围;该固态低聚果糖可以作为食品和饲料的添加剂,具有优质的加工性能,从而提高制糖工业经济效益,为废弃物的进一步综合利用提供较好的途径,符合国家提倡的循环经济发展理念。

参考文献:

- [1] ORLANDO D L R, ADRIANA C F G, DIANA M M, et al. Fructo-oligosaccharides production from agro-wastes as alternative low-cost source[J]. **Trends in Food Science and Technology**, 2019, 91: 139-146.
- [2] HAN Y Z, ZHOU C C, XU Y Y, et al. High-efficient production of fructo-oligosaccharides from inulin by a two-stage bioprocess using an engineered *Yarrowia lipolytica* strain[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2017, 173: 592-599.
- [3] SANGEETHA P T, RAMESH M N, PRAPULLAA S G. Fructo-oligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202[J]. **Process Biochemistry**, 2005, 40(3/4): 1085-1088.
- [4] AUNG T, JIANG H, LIU G L. Overproduction of a β -fructofuranosidase with a high FOS synthesis activity for efficient biosynthesis of fructo-oligosaccharides[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019, 130: 988-996.
- [5] ZHANG S H, JIANG H, XUE S J, et al. Efficient conversion of cane molasses into fructo-oligosaccharides by a glucose derepression mutant of *Aureobasidium melanogenum* with high β -fructofuranosidase activity[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019, 67(49): 13665-13672.
- [6] ZHENG H F, MAO D B. Application of fructosyltransferase in the synthesis of functional food additives [J]. **Guangxi Journal of Light Industry**, 2009, 3(3): 14-15.
- [7] REDDY P, REDDY G S N, SULOCHANA M B. Highly thermostable β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* PSSF21 and its application in the synthesis of fructo-oligosaccharides from agro industrial residue[J]. **Asian Journal of Biotechnology**, 2010, 2(2): 86-89.
- [8] ZHANG R. Study on the production of fructo-oligosaccharides by beet molasses[J]. **China Beet and Sugar**, 2013, 2: 17-20.
- [9] KHATUN M S, HARRISON M D, SPEIGHT R E, et al. Efficient production of fructo-oligosaccharides from sucrose and molasses by a novel *Aureobasidium pullulans* strain[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2020, 163: 107747-107757.
- [10] 黄俊杰. 碱性果胶酶在废糖蜜中的应用[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2009.
- [11] SHIN H T, BAIG S Y, LEE S W, et al. Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells[J]. **Bioresource Technology**, 2004, 93(1): 59-62.
- [12] NAJAFPOUR G D, SHAN C P. Enzymatic hydrolysis of molasses[J]. **Bioresource Technology**, 2003, 86(1): 91-94.
- [13] 袁伟岗. 固定化果糖基转移酶生产低聚果糖的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- [14] ZHAO C, WU Y, LIU X, et al. Functional properties, structural studies and chemoenzymatic synthesis of oligosaccharides[J]. **Trends in Food Science and Technology**, 2017, 66: 135-145.

- [15] TEK C B, BANSULI, NEERJA T, et al. Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: production, characterization and application in synthesis of fructo-oligosaccharides[J]. **LWT – Food Science and Technology**, 2017, 77: 178-185.
- [16] MOUELHI R, ABIDI F, MARZOUKI M N. An improved method for the production of fructo-oligosaccharides by immobilized β -fructofuranosidase from *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2015, 63(2): 281-291.
- [17] KANG N, ZUO Y J, HILLIOU L, et al. Viscosity and hydrodynamic radius relationship of high-power ultrasound depolymerised starch pastes with different amylose content[J]. **Food Hydrocolloids**, 2016, 52: 183-191.
- [18] 郭勇, 郑穗平. 酶在食品工业中的应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- [19] BIRCH G G, BLAKEBROUGH N, PARKER K J. Enzymes and Food Processing[M]. London: Applied Science Press, 1981.
- [20] BRADLEY J, KIDD A J, ANDERSON P A, et al. Rapid determination of the glucose content of molasses using a biosensor[J]. **The Analyst**, 1989, 114(3): 375-379.

科技信息

欧盟评估飞蝗冻干制剂作为新型食品的安全性

2021年7月2日,据欧盟食品安全局(EFSA)消息,欧盟营养、新型食品和食物过敏源(NDA)研究小组就飞蝗冻干制剂(Frozen and dried formulations from migratory locust)作为新型食品的安全性发表科学意见。

经过评估,专家小组得出结论,在提议的使用条件下,飞蝗冻干制剂作为新型食品是安全的。

[信息来源]食品伙伴网.欧盟评估飞蝗冻干制剂作为新型食品的安全性[EB/OL]. (2021-7-5). <http://news.foodmate.net/2021/07/598546.html>