

刘忠莹,王小平,陆阳,等. 离子色谱-脉冲安培法同时测定蔗糖酶和果聚糖酶活力的方法建立 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 280-287. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020096

LIU Zhongying, WANG Xiaoping, LU Yang, et al. Establishment of Ion Chromatography-Pulse Amperometric Method for Simultaneous Determination of Sucrase and Inulinase Activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(24): 280-287. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020096

· 分析检测 ·

离子色谱-脉冲安培法同时测定蔗糖酶和果聚糖酶活力的方法建立

刘忠莹^{1,2},王小平^{1,2},陆 阳^{1,2},何叶馨^{1,2},王 鑫^{1,2},黄韬睿^{3,*}

(1.四川省食品检验研究院,四川成都 610097;

2.国家市场监督管理总局重点实验室(白酒监管技术),四川成都 610097;

3.四川旅游学院,四川成都 610100)

摘 要: 本文旨在建立一种采用离子色谱仪同时测定蔗糖酶、果聚糖酶活力的方法。以蔗糖为底物,先加入蔗糖酶酶解并以硼氢化钠还原酶解产物葡萄糖和果糖得到甘露醇和山梨醇,再将蔗糖酶高温失活后加入果聚糖酶,得到含甘露醇、山梨醇、葡萄糖和果糖四种化合物的混合溶液。以水-氢氧化钠溶液-乙酸钠溶液为流动相进行梯度洗脱,在流速为 1.0 mL/min、柱温为 30 ℃ 条件下经 CarboPaC™ PA1 250 mm×2 mm 分离以测定四种化合物的含量。最后以甘露醇和山梨醇总量计算蔗糖酶活力,以葡萄糖和果糖的总量计算果聚糖酶的活力。结果表明:甘露醇、山梨醇、葡萄糖和果糖四种化合物在 20 min 内完成测定,且线性相关系数均达到 0.9995 以上,分离度均在 1.0 以上;果聚糖酶活力的测定可以采用蔗糖为底物;加入 1.2 mL 10 mg/mL 的硼氢化钠溶液并 60 ℃ 水浴 30 min 后,葡萄糖和果糖能够分别完全转化为甘露醇和山梨醇;本方法测定的蔗糖酶活力、果聚糖酶活力与 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 法)测定的蔗糖酶活力、果聚糖酶活力结果无显著性差异($P>0.05$);且测定的蔗糖酶活力、果聚糖酶活力含量结果的 RSD 分别为 2.0% 和 1.7%,精密度好,且本方法不涉及传统方法所用的有毒有害试剂。因此,所建方法可以同时用于测定蔗糖酶和果聚糖酶的活力,同时也为其它酶活力测定提供了一种新的思路。

关键词: 蔗糖酶,果聚糖酶,离子色谱-脉冲安培法,酶活力

中图分类号:TS207.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2022)24-0280-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020096

本文网刊:



Establishment of Ion Chromatography-Pulse Amperometric Method for Simultaneous Determination of Sucrase and Inulinase Activity

LIU Zhongying^{1,2}, WANG Xiaoping^{1,2}, LU Yang^{1,2}, HE Yexin^{1,2}, WANG Xin^{1,2}, HUANG Taorui^{3,*}

(1.Sichuan Institute of Food Inspection, Chengdu 610097, China;

2.Key Laboratory of Baijiu Supervising Technology for State Market Regulation, Chengdu 610097, China;

3.Sichuan Tourism University, Chengdu 610100, China)

Abstract: This study aimed to establish a new method for simultaneous determination of sucrase and inulinase activity using ion chromatography. Sucrose was used as the substrate and enzymatic hydrolysed by sucrase. Sodium borohydride solution was applied for converting glucose and fructose to mannitol and sorbitol. Afterwards, sucrase was inactivated at high temperature, and inulinase was added to get the mixed solution containing mannitol, sorbitol, glucose and fructose. To determine the concentration of four compounds in the mixed solution, chromatographic separation was carried out using CarboPaC™ PA1 250 mm×2 mm column with water, sodium hydroxide and sodium acetate as gradient eluents (the flow rate of 1.0 mL/min and the column temperature of 30 ℃). Finally, sucrase activity was calculated based on the total amount of mannitol and sorbitol, and inulinase activity was calculated according to the total amount of glucose and fructose. The

收稿日期: 2022-02-15

作者简介: 刘忠莹 (1988-) (ORCID: 0000-0003-3979-4891), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 食品检验及研究, E-mail: lzyqiao@126.com。

* 通信作者: 黄韬睿 (1982-) (ORCID: 0000-0001-7843-2389), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 食品安全, 食品加工技术, E-mail: htr12@163.com。

results showed that mannitol, sorbitol, glucose and fructose could be determined within 20 min. All the linear correlation coefficients were all above 0.9995, and resolutions were above 1.0. Thus, sucrose could be used as substrate for the determination of inulinase activity. Glucose and fructose could be completely converted into mannitol and sorbitol after adding 1.2 mL of 10 mg/mL sodium borohydride solution in a water bath at 60 °C for 30 min. The activities of sucrase and inulinase determined by this method did not show significantly differences compared to 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetry determination method (DNS method) ($P>0.05$). The relative standard deviation of sucrase activity and inulinase activity determined were 2.0% and 1.7% respectively. The method did not involve toxic and harmful reagents used in traditional methods. Therefore, this method could be used to determine the activities of sucrase and inulinase simultaneously, and would provide a new idea for the determination of other enzyme activities.

Key words: sucrase; inulinase; ion chromatography-pulsed amperometric detector; enzyme activity

蔗糖酶(Sucrase, EC 3.2.1.26)又称转化酶, 可以从果糖末端切开蔗糖的果糖糖苷键, 使蔗糖水解生成葡萄糖和果糖^[1-2]。果聚糖酶(Inulinase, EC 3.2.1.80)又称菊粉酶, 能够水解 β -2, 1-D-果聚糖果糖苷键的一类水解酶, 能使菊粉水解生成葡萄糖和果糖^[3-5]。蔗糖酶与果聚糖酶的应用与生活密切相关, 蔗糖酶广泛应用于食品和发酵工业^[6], 果聚糖酶广泛用于生产高果糖浆^[7-8]、生产酒精^[9]、甚至可生产生物柴油的原料^[10]、医药产氢、制备乳酸。菊粉酶还可直接发酵菊粉制备各种产品, 如可制备丙酮丁醇, 用于诊断肾脏疾病, 控制血糖升高^[11]等。此外, 在两种酶应用过程中发现存在同时使用的情况, 如果聚糖含量测定^[11]、应用菊粉生产酒精等领域, 如能同时测定这两种酶活力将大大节约分析时间。

酶活力的测定方法对确定酶活力的水平、酶特异性及归类有着重要意义。目前关于蔗糖酶活力测定国内外采用的方法集中于 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 法), 如韩芸娇等^[12]采用 DNS 法测定出面包酵母冻干粉中蔗糖酶活力; 李勤^[13]采用 DNS 法测定出海藻酸钠包埋法固定啤酒酵母泥前后蔗糖酶活力; Liu 等^[14]调查 15 个不同样地蔗糖酶随季节变化的酶活性, 也是用了 DNS 法。果聚糖酶活力测定方法主要是包括 DNS 法^[15-16]、费林试剂热滴定法、塞氏比色法、Somogi-Nelson 法^[17-18]等, 以上测定蔗糖酶活力、果聚糖酶活力方法虽然对仪器设备要求低, 检测成本低, 实用性好, 但这些方法都会涉及有毒有害试剂的使用, 比如 DNS 法^[19-20]、Somogi-Nelson 法中会用到高毒性的苯酚, 滴定法中会用到易制毒试剂硫酸, 塞氏比色法中会用到 3 类致癌物的间苯二酚等不利于实验人员身体健康和环境保护的试剂, 而目前检测方法单一, 还没有出现创新新颖环境友好的酶活力测定方法。

本文采用蔗糖为底物, 加入蔗糖酶后用硼氢化钠将其水解产物葡萄糖和果糖还原成甘露醇和山梨醇, 并将蔗糖酶高温失活后加入果聚糖酶, 再次得到水解产物葡萄糖和果糖; 最后采用离子色谱-脉冲安培法测定甘露醇和山梨醇的总量来计算蔗糖酶的活力, 测定葡萄糖和果糖的总量来计算果聚糖酶的活力, 建立一种全新的环境友好的能同时测定蔗糖酶、

果聚糖酶活力的方法, 为酶活力的测定提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蔗糖、山梨醇 BePure 公司; 菊粉 阿达玛斯试剂有限公司; 蔗糖酶、果聚糖酶、葡萄糖、果糖 德国 Sigma 公司; 甘露醇 美国 A Chemtek Inc 公司; 50% 氢氧化钠溶液(色谱纯) 赛默飞科技(中国)有限公司; 乙酸钠 氢氧化钠(色谱纯) 美国 ThermoFisher 公司; 马来酸、硼氢化钠、冰乙酸 均为分析纯。

Dionex™ ICS-5000+离子色谱仪(配有电化学检测器)、Evolution201 紫外-分光光度计、色谱柱 CarboPaCTMPA20 250 mm×2 mm 和 CarboPaCT-MPA1 250 mm×2 mm 美国 ThermoFisher 公司; SW22 恒温水浴锅 丹麦 FOSS 公司; MS3 漩涡振荡仪 德国 IKA 公司。

1.2 实验方法

本文部分色谱条件, 蔗糖酶溶液、果聚糖酶溶液配制, 加入硼氢化钠步骤可参考 GB 5009.255-2016^[11]。

1.2.1 单糖检测色谱条件及标曲绘制

1.2.1.1 色谱条件 色谱柱: CarboPaCTMPA1 250 mm×2 mm, 淋洗液: A: 水; B: 氢氧化钠溶液(100 mmol/L); C: 氢氧化钠(150 mmol/L)乙酸钠(500 mmol/L)混合溶液, 梯度洗脱条件见表 1, 进样量: 20 μ L, 柱温: 30 °C, 检测波形参见表 2。标准溶液配制: 用 4 个容量瓶分别准确称取 10 mg 山梨醇、10 mg 甘露醇、10 mg 葡萄糖和 10 mg 果糖, 用水稀释定容至刻度, 得 1000 μ g/mL 山梨醇、甘露醇、葡萄糖和果糖标准溶液。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Program of gradient elution

时间(min)	流速(mL/min)	淋洗液(%)			曲线
		A	B	C	
0~18	1	60	40	0	线性
18.1~23	1	0	0	100	线性
23.1~28	1	0	100	0	线性
28.1~33	1	60	40	0	线性

表 2 检测波形

Table 2 Detection waves

时间/s	电位(V)	积分	时间(s)	电位(V)	积分
0.00	+0.10	—	0.42	-2.00	—
0.20	+0.10	开始	0.43	+0.60	—
0.40	+0.10	结束	0.44	-0.10	—
0.41	-2.00	—	0.50	-0.10	—

1.2.1.2 标曲绘制 分别精密移取山梨醇、甘露醇、葡萄糖和果糖标准溶液各 1 mL 至同一 20 mL 量瓶中,以水稀释至刻度,摇匀,制成山梨醇、甘露醇、葡萄糖和果糖浓度均为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的混合储备液。分别精密移取该储备液 0.04、0.1、0.2、0.4、0.5、1 mL 至 10 mL 量瓶中,以水稀释至刻度,摇匀,制成系列混合标准使用液,即山梨醇、甘露醇、葡萄糖和果糖浓度均为 0.2、0.5、1.0、2.0、2.5、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 。将标准系列工作液分别注入离子色谱仪中,得到各浓度标准工作液色谱图,测定相应的峰面积,以标准工作液的浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.2 水解底物筛选

1.2.2.1 蔗糖与菊粉的纯度考察 蔗糖溶液:准确移取 1.0 mol/L 蔗糖溶液(pH6.5 的马来酸钠缓冲液为溶剂)0.8 mL 于 10 mL 刻度试管中,以去离子水稀释至刻度,摇匀,试液稀释 50 倍后待测。菊粉溶液:准确移取 1.0 mol/L 菊粉溶液(pH6.5 的马来酸钠缓冲液为溶剂)0.8 mL 于 10 mL 刻度试管中,以去离子水稀释至刻度,摇匀,试液稀释 50 倍后待测。

1.2.2.2 果聚糖酶酶解蔗糖考察 准确移取 1.0 mol/L 蔗糖溶液 0.8 mL 于 10 mL 刻度试管中,准确加入果聚糖酶(用 pH4.5 的乙酸钠缓冲液稀释至 1~10 U/mL,下同)0.1 mL, (55 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴保温 30 min,立即沸水浴中加热 3 min,以终止酶促反应。用水稀释至刻度,混匀。试液稀释 50 倍后待测。

1.2.3 糖醇转化条件考察 在含有 0.5 mg 葡萄糖和 0.5 mg 果糖的混合溶液中加入一定量的 10 mg/mL 硼氢化钠溶液(100、200、300、400、500 μL),旋涡振荡混匀,置于一定温度下(20、30、40、60 $^{\circ}\text{C}$)的恒温水浴摇床中,150 r/min 振摇一定时间(5、10、30、60 min)后,取出,冷却至室温,加入 3 mL 200 mmol/L 乙酸溶液,静置 10 min 后摇匀,待测。当考察还原剂使用量时,固定还原温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,还原时间为 30 min;当考察还原时间时,固定还原剂使用量为 300 μL 、还原温度为 40 $^{\circ}\text{C}$;当考察还原温度时,固定还原剂使用量为 300 μL ,还原为 30 min。

1.2.4 离子色谱法测定蔗糖酶和果聚糖酶活力

1.2.4.1 酶解溶液制备 蔗糖酶的酶解:准确移取 1.0 mol/L 蔗糖溶液 0.8 mL 于 10 mL 刻度试管中,准确加入蔗糖酶(用 pH6.5 的马来酸钠缓冲液稀释至约 4.5 U/mL,下同)0.1 mL,在(37 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中保温 30 min 后,立即沸水浴中加热 3 min,以终止

酶促反应。

葡萄糖和果糖的转化:取出冷却至室温后的蔗糖酶酶解溶液加入 1.2 mL 硼氢化钠溶液(10 mg/mL,下同),旋涡振荡混匀,置于(60 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴摇床中,150 r/min 振摇 30 min 后,取出,冷却至室温,加入 3 mL 200 mmol/L 乙酸溶液,静置 10 min 后加入 1 mol/L 入氢氧化钠溶液 0.25 mL,摇匀。

果聚糖酶的酶解:继续在上述溶液中准确加入果聚糖酶 0.1 mL, (55 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴保温 30 min,立即沸水浴中加热 3 min,以终止酶促反应。用水稀释至刻度,混匀。试液稀释 50 倍后待测。

1.2.4.2 试样溶液的测定 将试样溶液注入离子色谱仪中,得到试样溶液的峰面积,根据标准曲线得到待测液中山梨醇、甘露醇、葡萄糖和果糖的浓度($\mu\text{g/mL}$),通过酶活力计算公式得蔗糖酶和果聚糖酶活力。蔗糖酶活力表示为:在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH6.5 条件下,以蔗糖为底物每分钟水解产生 1 μmol 还原糖相应的醇(山梨醇和甘露醇)所需的酶量(活性)定义为 1 个酶活力单位。果聚糖酶活力表示为:在 55 $^{\circ}\text{C}$ 、pH4.5 条件下,以蔗糖为底物每分钟水解产生 1 μmol 还原糖(葡萄糖和果糖)所需的酶量(活性)定义为 1 个酶活力单位。

蔗糖酶活力计算:根据步骤所得山梨醇浓度、甘露醇浓度,用下述公式计算,得到蔗糖酶活力,蔗糖酶活力计算公式:

$$X_1 = \frac{C_1 \times V}{M_1 \times V_{x1} \times t_1} + \frac{C_2 \times V}{M_2 \times V_{x1} \times t_1}$$

式中: X_1 , 蔗糖酶活力, U/mL; C_1 , 试样中山梨醇的浓度, $\mu\text{g/mL}$; C_2 , 试样中甘露醇的浓度, $\mu\text{g/mL}$; V , 试样的最终定容体积, mL; M_1 , 山梨醇的摩尔质量, 182 g/mol; M_2 , 甘露醇的摩尔质量, 182 g/mol; V_{x1} , 制备试样时蔗糖酶溶液取用体积, mL; t_1 , 制备试样时蔗糖酶酶解蔗糖的时间, min。

果聚糖酶活力计算:根据所得葡萄糖浓度、果糖浓度,用下述公式计算,得到果聚糖酶活力,果聚糖酶活力计算公式:

$$X_2 = \frac{C_3 \times V}{M_3 \times V_{x2} \times t_2} + \frac{C_4 \times V}{M_4 \times V_{x2} \times t_2}$$

式中: X_2 , 果聚糖酶活力, U/mL; C_3 , 试样中葡萄糖的浓度, $\mu\text{g/mL}$; C_4 , 试样中果糖的浓度, $\mu\text{g/mL}$; V , 试样的最终定容体积, mL; M_3 , 葡萄糖的摩尔质量, 180 g/mol; M_4 , 果糖的摩尔质量, 180 g/mol; V_{x2} , 制备试样时果聚糖酶溶液取用体积, mL; t_2 , 制备试样时果聚糖酶酶解蔗糖的时间, min。

1.2.5 DNS 法测定蔗糖酶和果聚糖酶活力 为了验证本试验测定蔗糖酶和果聚糖酶活力的可靠性,将本方法测定的结果与 DNS 法测定的结果进行比较, DNS 方法参考 GB 5009.255-2016 中蔗糖酶和果聚糖酶活力的测定方法。过程如下:

标准曲线绘制:在葡萄糖系列浓度的比色管中

分别加入 0.5 mL 3,5-二硝基水杨酸溶液,混匀后于沸水浴中加热 10 min。取出后立即放入盛有冷水的烧杯中冷却至室温,用水定容至 10 mL,混匀,以未加入葡萄糖的比色管为空白,用分光光度计测定波长 540 nm 处的吸光值。以吸光值为纵坐标,葡萄糖质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.2.5.1 蔗糖酶活性测定 准确移取 1.0 mol/L 蔗糖溶液 0.8 mL 于 10 mL 刻度试管中,准确加入蔗糖酶 0.1 mL,在(37±1)℃ 恒温水浴保温 30 min 后,沸水浴中加热 3 min,以终止酶促反应,取出,冷却至室温后,再向该溶液中加入 0.5 mL 3,5-二硝基水杨酸溶液后同 1.2.5 标准曲线绘制操作,混匀后稀释 5 倍测定,由标准曲线计算待测酶测定液中和试剂空白测定液中葡萄糖的质量浓度。在相同的条件下,以沸水浴钝化酶液作为试剂空白。根据 1.2.4.2 蔗糖酶活力计算公式计算蔗糖酶活力。

1.2.5.2 果聚糖酶活性测定 准确移取 1.0 mol/L 蔗糖溶液 0.8 mL 于 10 mL 刻度试管中,准确加入果聚糖酶 0.1 mL,在(55±1)℃ 恒温水浴保温 30 min 后,沸水浴中加热 3 min,以终止酶促反应,取出后立即放入盛有冷水的烧杯中冷却至室温,加入 0.5 mL 3,5-二硝基水杨酸溶液后同 1.2.5 标准曲线绘制操作,混匀后稀释 5 倍测定。由标准曲线计算待测酶测定液中和试剂空白测定液中葡萄糖的质量浓度。在相同的条件下,以沸水浴钝化酶液作为试剂空白。根据 1.2.4.2 果聚糖酶活力计算公式计算果聚糖酶活力。

1.3 数据处理

本文采用 Chromeleon Client Program(6.80)色谱工作站进行数据采集,结果重复性平行测定 5 次,采用 Microsoft Office Excel 2007 进行结果计算,计算后的结果利用 SPSS 23.0 统计软件对本试验方法与 DNS 方法测定的酶活力结果进行方差分析,置信区间百分比为 95%,色谱图为直接截取色谱工作处理的图谱。

2 结果与分析

2.1 色谱条件确定及标准曲线绘制

目前关于应用离子色谱测定糖醇的文献报道很多,de Souza 等^[21]建立了一种同时检测葡萄酒样品中的糖、有机酸和糖醇的方法,彭丽诗等^[22]建立了一种离子色谱-脉冲安培法同时测定食品中 9 种糖和糖醇的方法,张水锋等^[23]也建立了一种离子色谱-脉冲安培法分析婴幼儿配方乳粉中的糖和糖醇的方法。本试验色谱条件为 CarboPaC™PA1 250 mm×2 mm,40% 100 mmol/L 氢氧化钠。在该色谱条件下,山梨醇、甘露醇、葡萄糖和果糖能够很好地分离,且色谱峰型也好,4 种化合物的线性相关性良好,能够满足分析要求,具体结果见表 3 和图 1。

2.2 水解底物的筛选

通常,蔗糖酶活力测定采用的底物为蔗糖,果聚

表 3 山梨醇、甘露醇、葡萄糖和果糖四种化合物的线性及范围

Table 3 Linearity and range of annitol, sorbitol, glucose and fructose			
化合物名称	标准曲线	相关系数	线性范围(μg/mL)
山梨醇	Y=9.031X+0.7566	0.9996	0~4.5
甘露醇	Y=7.050X+0.4133	0.9999	0~4.5
葡萄糖	Y=9.137X-0.1150	0.9998	0~5.5
果糖	Y=4.866X-0.2568	0.9995	0~5.5

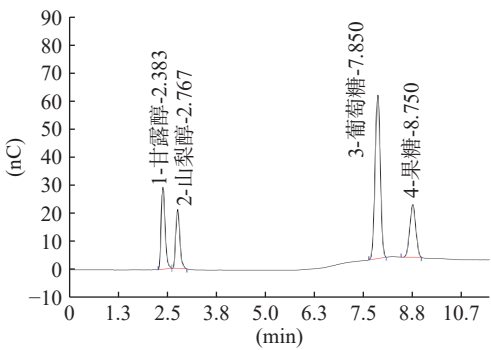


图 1 四种化合物色谱分离图

Fig.1 Chromatograms of mannitol, sorbitol, glucose and fructose

糖酶活力测定采用的底物为菊粉,但菊粉很容易水解且高纯度的菊粉很难获得^[24-25]。图 2 为一定量的蔗糖和菊粉分别进样得到的色谱图,可见蔗糖色谱峰中不含葡萄糖和果糖,而菊粉中含有一定量的葡萄糖和蔗糖,即采用此菊粉为底物测得的果聚糖酶活力将偏高。林晨^[18]、常晓川^[26]、王东方^[27]等多篇文献都报道过果聚糖酶可酶解蔗糖。图 3 是采用蔗糖为底物,经果聚糖酶水解后的图谱,可见图谱中出现了蔗糖和果糖的峰,即证明了果聚糖酶能够水解蔗糖为葡萄糖和果糖,即采用蔗糖底物也能够测定出果聚糖酶的活力。因此本试验可采用同一底物蔗糖以同时测定蔗糖酶和果聚糖酶的活力。

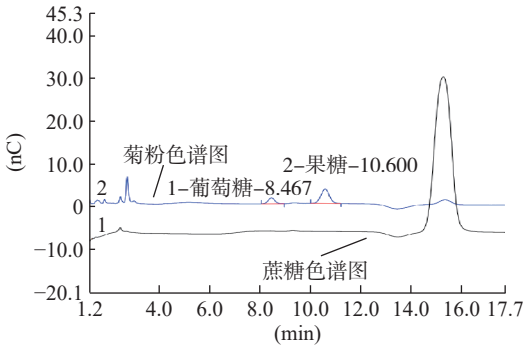


图 2 菊粉和蔗糖色谱峰

Fig.2 Chromatograms of inulin and sucrose

2.3 糖醇转化

通过上述水解底物筛选的讨论可发现,蔗糖酶和果聚糖酶的活力均可通过测定酶解蔗糖后的产物(葡萄糖和果糖)进行测定,若能在一次进样后同时将

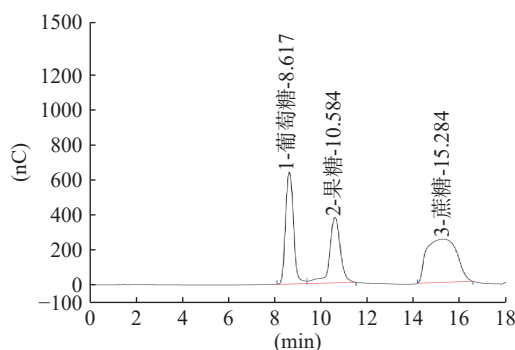


图3 果聚糖酶酶解蔗糖的色谱图

Fig.3 Chromatograms of sucrose enzymatic hydrolysis by inulinase

蔗糖酶和果聚糖酶的活力进行测定,将能大大节约时间。而两种酶的酶解产物均是葡萄糖和果糖,如何分别表达两种酶的活性是试验的关键。在进一步试验过程发现葡萄糖和果糖是还原性糖,能够在适宜条件下被还原成相应的醇。Tathod 等^[28]建立了一种利用双金属为催化剂将农业废弃物(C5糖、C6糖、半纤维素、菊粉和农业废弃物)转化为糖醇的方法。章青等^[29]公开了一种通过采用硼氢化盐为还原剂,将葡萄糖还原制备得到山梨醇的方法;窦光朋等^[30]公开了一种利用钼酸盐为催化剂,使果糖和葡萄糖在加氢作用下向甘露醇和山梨醇的转化,实现低聚果糖废液生产出甘露醇和山梨醇的方法。可见,蔗糖酶酶解并将蔗糖酶钝化后的产物葡萄糖和果糖可以被还原剂还原为甘露醇和山梨醇,在此条件下再进行果聚糖酶酶解蔗糖反应得到其产物葡萄糖和果糖,产物便不会相互干扰。试验即可分别用甘露醇和山梨醇表达蔗糖酶的活力,用葡萄糖和果糖表达果聚糖酶的活力。这便是本实验的原理关键所在,见图4。

本试验能否在一次进样后同时、准确测定出两种酶活力,取决于蔗糖酶解的产物葡萄糖和果糖能否完全转化为山梨醇和甘露醇,因此本试验对还原剂硼氢化钠的用量、作用时间及作用温度进行了考察。

试验以 1 mg 还原糖(0.5 mg 葡萄糖、0.5 mg 果糖)为本底,并以转化率(山梨醇和甘露醇的总量与葡萄糖和果糖总量的百分比值,约接近 100%,转化越彻底)为指标,同时以色谱图佐证,确定还原剂硼氢化钠的用量、作用时间和作用温度。为考察还原剂硼

氢化钠的用量,控制作用时间为 30 min、温度为 40 ℃,从表4可看出,随着硼氢化钠用量的增加,转化率升高,当硼氢化钠用量达到 400 μL 时已足以使葡萄糖和果糖完全还原为山梨醇和甘露醇,即转化率已经达到 100%,即 0.5 mg 葡萄糖和 0.5 mg 果糖已经全部转化为葡萄糖和果糖;为考察还原剂硼氢化钠的作用时间,控制用量为 300 μL、作用温度为 40 ℃。从表5可以看出作用时间在 30 min 时转化率已达到 97%,60 min 转化率为 98%。

表4 还原剂用量对转化率的影响

Table 4 Effect of reductant dosage on conversion rate

还原剂用量(μL)	山梨醇与甘露醇总量(mg)	转化率(%)
100	0.896	91
200	0.967	98
300	0.975	99
400	0.985	100
500	0.981	100

表5 还原时间对转化率的影响

Table 5 Effect of reduction time on conversion rate

还原时间(min)	山梨醇与甘露醇总量(mg)	转化率(%)
5	0.635	64
10	0.813	83
30	0.956	97
60	0.960	98

两者差异不大,因此选择还原时间为 30 min;为考察温度对糖醇转化的影响,控制还原剂硼氢化钠用量为 300 μL、作用时间为 30 min。从表6可以看出,随着温度的升高,转化率也明显升高,在温度升至 60 ℃ 时,转化率达到 94%,可以满足实验需求。

表6 还原温度对转化率的影响

Table 6 Effect of reduction temperature on conversion rate

还原温度(℃)	山梨醇与甘露醇总量(mg)	转化率(%)
20	0.441	45
30	0.784	80
40	0.900	91
60	0.926	94

综上,还原剂硼氢化钠的用量、作用时间、作用温度分别确定为 400 μL、30 min、60 ℃,在此条件下,如图5所示,葡萄糖和果糖色谱峰已消失,完全转化为山梨醇和甘露醇的色谱峰。在实际应用过程中,

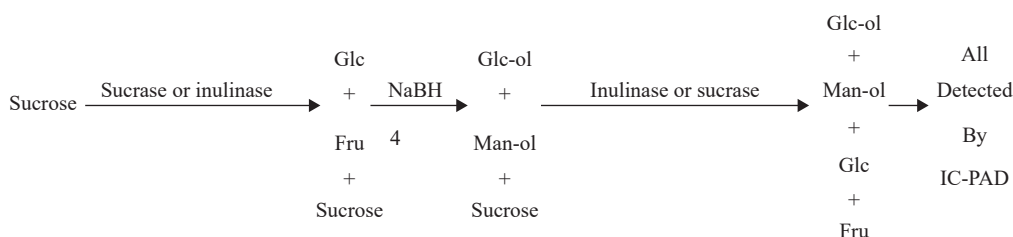


图4 实验过程原理图

Fig.4 Principle diagram of experimental process

注: Sucrose: 蔗糖; Sucrase: 蔗糖酶; Inulinase: 果聚糖酶; Glc: 葡萄糖; Fru: 果糖; Glc-ol: 山梨醇; Man-ol: 甘露醇; IC-PAD: 离子色谱安培检测器。

还原剂硼氢化钠的用量应与样品本底还原糖量成正比,经考察试验条件下 1.0 mol/L 蔗糖溶液 0.8 mL,使用蔗糖酶后的水解产物约有还原糖 3 mg,因此将还原剂硼氢化钠的用量确定 1.2 mL。该试验在还原剂硼氢化钠用量为 1.2 mL、作用时间为 30 min,温度为 60 ℃ 条件下,可将本试验中蔗糖酶酶解产物果糖和葡萄糖完全转化为山梨醇和甘露醇,见图 6。

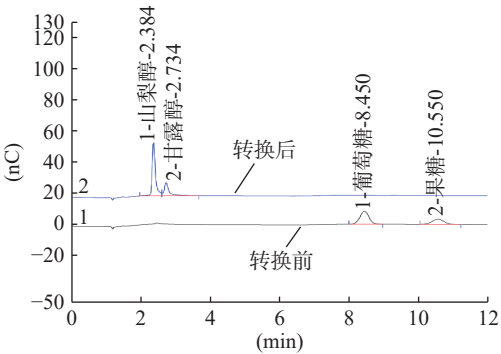


图 5 葡萄糖和果糖完全转化为山梨醇和甘露醇的色谱图
Fig.5 Chromatogram of complete conversion of glucose and fructose to sorbitol and mannitol

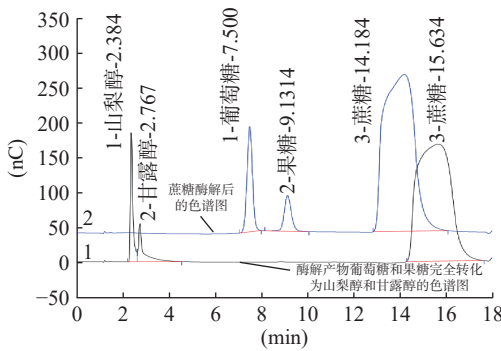


图 6 实验条件下的葡萄糖和果糖完全转化为山梨醇和甘露醇的对比图
Fig.6 Comparative chromatograms of complete conversion of glucose and fructose to sorbitol and mannitol under experimental conditions

2.4 方法对比

为验证本方法测定蔗糖酶和果聚糖酶活力的可靠性,将本试验方法测定的结果与 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 法)测定结果进行比较。根据 DNS 法测定酶活力的原理,酶解后的产物为葡萄糖和果糖,两者均为还原糖,因此均能与 3,5-二硝基水杨酸发生反应生成棕红色氨基化合物,因此传统的 DNS 法测得的量实际上是还原糖的总量。因此为了便于

比较,本方法用水解产物的总量来度量蔗糖酶、果聚糖酶活力的大小。本方法与 DNS 法测定的蔗糖酶和果聚糖酶活力比较见表 7。利用 SPSS 软件对两种方法的结果进行统计分析,分析结果见表 8。在 95% 置信区间百分比下,得到蔗糖酶两种方法测定的统计结果。莱文方差等同性检验显示, $P=0.121>0.05$,即方差齐性检验结果为两组方差齐性,因此两组比较平均值等同性 t 检验结果下的 $P=0.291>0.05$ 两种方法测定结果无统计学差异。同理得到果聚糖酶的统计结果见表 9。其莱文方差等同性检验显示, $P=0.058>0.05$,即方差齐性检验结果为两组方差齐性,因此两组比较平均值等同性 t 检验结果下的 $P=0.433>0.05$,果聚糖酶的两种方法测定结果亦无统计学差异。且本方法的 5 次测定的蔗糖酶活力、果聚糖酶活力 RSD 分别为 2.0%、1.7%,说明本方法精密度良好,综上所述说明离子色谱-脉冲安培法同时测定蔗糖酶和果聚糖酶的活性是可行可靠的。

表 7 离子色谱法与 3,5-二硝基水杨酸比色法测定的酶活力比较

Table 7 Comparison of enzyme activity determined between ion chromatography-pulsed amperometric detector method and DNS method

序号	蔗糖酶活力(U)		果聚糖酶活力(U)	
	本方法	比色法	本方法	比色法
1	4.66	4.45	6.06	5.98
2	4.79	4.74	6.03	6.20
3	4.63	4.46	6.19	5.65
4	4.79	4.78	6.23	5.74
5	4.58	4.56	5.99	6.35
RSD	2.0%	3.4%	1.7%	5.0%

3 结论

本试验在选择如硼氢化钠、乙酸等为环境友好型试剂的前提下采用 CarboPaCTMPA1 250mm×2 m 的色谱柱,40%, 100 mmol/L 氢氧化钠等度洗脱的色谱条件对甘露醇、山梨醇、葡萄糖和果糖进行分析测定,能满足四种化合物测定的要求;验证并证明了果糖酶能够水解蔗糖为葡萄糖和果糖,果聚糖酶活力的测定可以采用蔗糖为底物;硼氢化钠用量为 1.2 mL,作用时间 30 min、作用温度 60 ℃,可以将本实验中的蔗糖酶解产物葡萄糖和果糖完全转化为山梨醇和甘露醇;最后将本方法与 DNS 法进行比较,两种方法测定的蔗糖酶活力、果聚糖酶活力均无显著性差异($P>0.05$);且本方法测定的蔗糖酶活力、果聚糖酶

表 8 两种方法蔗糖酶活性结果统计分析

Table 8 Statistical analysis of sucrase activity by two methods

莱文方差等同性检验				平均值等同性/检验					
		<i>F</i>	显著性	<i>t</i>	自由度	显著性(双尾)	平均值差值	标准误差差值	差值95% 置信区间
									下限 上限
蔗糖酶	假定等方差	3.019	0.121	1.131	8	0.291	0.09200	0.08133	-0.09554 0.27954
	不假定等方差			1.131	6.670	0.297	0.09200	0.08133	-0.10225 0.28625

表 9 两种方法果聚糖酶活性结果统计分析

Table 9 Statistical analysis of inulinase activity by two methods

		莱文方差等同性检验				平均值等同性t检验				
		F	显著性	t	自由度	显著性 (双尾)	平均值差值	标准误差 差值	差值95%置信区间	
									下限	上限
果聚糖酶	假定等方差	4.898	0.058	0.825	8	0.433	0.11600	0.14059	-0.20820	0.44020
	不假定等方差			0.825	4.977	0.447	0.11600	0.14059	-0.24591	0.47791

活力 RSD 分别为 2.0%、1.7%，精密度好，即本试验建立的离子色谱-脉冲安培法同时测定蔗糖酶和果聚糖酶的活力方法是可行的。据本试验原理，蔗糖酶和果聚糖酶的加入顺序是可以交换，且可以只测定其中一种酶的活力，即当某种酶酶解产物可以通过离子色谱法进行检测时，其酶活力是能通过离子色谱法进行测定的。

参考文献

- [1] BUCHHOLZ K, SEIBEL J. Industrial carbohydrate biotransformations[J]. *Carbohydrate Research*, 2008, 343(12): 1966-1979.
- [2] LI X, WANG X, MENG X, et al. Structures, physico-chemical properties, production and (potential) applications of sucrose-derived alpha-d-glucans synthesized by glucansucrases[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 249: 116818.
- [3] SINGH R S, CHAUHAN K, KENNEDY J F. A panorama of bacterial inulinases: Production, purification, characterization and industrial applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 96: 312-322.
- [4] SINGH R S, SINGH T, HASSAN M, et al. Updates on inulinases: Structural aspects and biotechnological applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 193-210.
- [5] SINGH R S, SINGH T, LARROCHE C. Biotechnological applications of inulin-rich feedstocks[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 273: 641-653.
- [6] 徐欣东, 王清, 齐鹏翔, 等. 右旋糖酐蔗糖酶纯化及生产应用的研究进展[J]. *中国调味品*, 2020, 45(1): 196-200. [XUN X D, WANG Q, QI P X, et al. Research progress on purification, production and application of dextranase[J]. *China Condiment*, 2020, 45(1): 196-200.]
- [7] SINGH R S, CHAUHAN K, PANDEY A, et al. Biocatalytic strategies for the production of high fructose syrup from inulin[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 260: 395-403.
- [8] 黎明兰, 蔡庆洲, 相宏宇, 等. 黑曲霉 VN-19493 葡粉酶的酶学性质及应用于果糖生产的研究[J]. *食品科学*, 1995(10): 32-34. [LI M L, CAI Q Z, XIANG H Y, et al. Study on enzymatic properties of inulinase from *Aspergillus niger* v-19493 and its application in fructose production[J]. *Food Science*, 1995(10): 32-34.]
- [9] 胡建锋, 邱树毅. 菊芋发酵生产酒精的研究进展[J]. *酿酒科技*, 2009(8): 100-104. [HU J F, QIU S Y. Research progress in ethanol production by the fermentation of *Jerusalem artichoke*[J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2009(8): 100-104.]
- [10] NIANCI S, WEIAN M, XIAOXIA H, et al. Co-expression of exo-inulinase and endo-inulinase genes in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient single cell oil production from inulin[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 185(1): 334-346.
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.255-2016 食品安全国家标准 食品中果聚糖的测定[S]. 北京: 标准物质出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.255-2016 National food safety standard. Determination of fructan in food[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.]
- [12] 韩芸娇, 张媛媛, 夏雪芬, 等. 面包酵母冻干粉保护剂筛选及其生物活性分析[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(7): 119-128. HAN Y, ZHANG Y Y, XIA X F, et al. Screening of protective agent and bioactivity analysis of bread yeast freeze-dried powder[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(7): 119-128.
- [13] 李勤. 固定化对酵母蔗糖酶活力的影响[J]. *食品与发酵科技*, 2011, 47(6): 70-72. [LI Q. Effect of immobilization on yeast invertase activity[J]. *Food and Fermentation Technology*, 2011, 47(6): 70-72.]
- [14] LIU P, LIU X, YANG C, et al. Seasonal variations of soil enzyme activity on rocky hillsides continuously planted with vitis heyneana roem[J]. *Agricultural Biotechnology*, 2021, 10(5): 86-92.
- [15] 高兆建, 王先凤, 芦宁, 等. 用于高果糖浆制备的宛氏拟青霉嗜热嗜酸葡粉酶酶学特性分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(8): 94-100. [GAO Z J, WANG X F, LU L, et al. Enzymatic properties of thermoacidophilic inulinase from *paecilomyces variotii* to be used in production of high fructose syrup[J]. *Food Science*, 2019, 40(8): 94-100.]
- [16] 陈晨, 杨革, 李莉莉, 等. 田口方法优化菌株产葡粉酶的培养条件[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(18): 192-196. [CHEN C, YANG G, LI L L, et al. Optimization of medium components for inulinase production of a strain using Taguchi method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(18): 192-196.]
- [17] MAUGERI F, HERNALSTEENS S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, 49(1-4): 43-49.
- [18] 林晨, 顾宪红, 何瑞国. 浅谈葡粉酶酶活测定方法[J]. *粮食加工*, 2005(1): 59-63. [LIN C, GU X H, HE R G. Discussion on the determination method of Inulinase activity[J]. *Grain Processing*, 2005(1): 59-63.]
- [19] DESHAVATH N N, MUKHERJEE G, GOUD V V, et al. Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 156: 180-185.
- [20] TEIXEIRA R S, DA SILVA A S, FERREIRA-LEITAO V S, et al. Amino acids interference on the quantification of reducing sug-

- ars by the 3, 5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements[J]. *Carbohydrate Research*, 2012, 363: 33–37.
- [21] DE SOUZA J C, DA SILVA J L, FABR O R M, et al. Electroactive sugars, organic acids and sugar alcohol analysis in wine using anion-exchange chromatography with electrochemical detection[J]. *Microchemical Journal*, 2019, 147: 972–978.
- [22] 彭丽诗, 陈琼, 黄盼, 等. 离子色谱-脉冲安培法同时测定食品中 9 种糖和糖醇的含量[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(9): 250–259. [PENG L S, CHEN Q, HUANG P, et al. Simultaneous determination of 9 sugars and sugar alcohols in foods by ion chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(9): 250–259.]
- [23] 张水锋, 盛华栋, 姜侃, 等. 梯度洗脱优化-离子色谱-脉冲安培法分析婴幼儿配方乳粉中的糖和糖醇[J]. *色谱*, 2016, 34(10): 946–950. [ZHANG S F, SHENG H D, JIANG K, et al. Determination of carbohydrates and sugar alcohol in infant formula by ion chromatography with pulsed amperometric detection and an optimized gradient elution[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2016, 34(10): 946–950.]
- [24] 罗登林, 许威, 袁海丽, 等. 菊粉加工性质的研究[J]. *粮油加工*, 2009(9): 142–144. [DENG L L, XU W, YAN H L, et al. Study on processing properties of inulin[J]. *Cereals and Oils Processing*, 2009(9): 142–144.]
- [25] ST KLE K, JUNG D, KRUSE A. Acid-assisted extraction and hydrolysis of inulin from chicory roots to obtain fructose-enriched extracts[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2020.
- [26] 常晓川, 郑昕, 王运吉, 等. 基因工程菊粉酶对高浓度蔗糖水解的研究[J]. *食品科技*, 2007(7): 76–79. [CHANG X C, ZHENG X, WANG Y J, et al. Study on gene engineering inulinase hydrolyzed hypso-concentration sucrose[J]. *Food Science and Technology*, 2007(7): 76–79.]
- [27] 王东方, 曹慧, 陈冠军. 黑曲霉菊糖酶酶学性质及酶解产物分析[J]. *食品工业*, 2015, 36(9): 168–171. [WANG D F, CAO H, CHEN G J. Enzymatic properties and enzymatic hydrolysates analysis of inulinase from *Aspergillus niger*[J]. *The Food Industry*, 2015, 36(9): 168–171.]
- [28] TATHOD A P, DHEPE P L. Efficient method for the conversion of agricultural waste into sugar alcohols over supported bimetallic catalysts[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 178: 36–44.
- [29] 章青, 张秀春, 姜欢欢, 等. 一种葡萄糖温和氢化制备山梨醇的方法: 中国, 109400441A [P]. 2019-03-01. ZHANG Q, ZHANG X C, JIANG H H, et al. Method for preparing sorbitol through mild hydrogenation of glucose: China, 109400441A [P]. 2019-03-01.
- [30] 窦光朋, 窦宝德, 张继红. 利用低聚果糖废液生产甘露醇和山梨醇的方法: 中国, 103508848A [P]. 2014-01-15. DOU G M, DOU B D, ZHANG J H. Method for producing mannitol and sorbitol through waste fructooligosaccharide liquid: China, 103508848A [P]. 2014-1-15.