

吸附交联法固定化蔗糖异构酶及其在异麦芽酮糖制备中的应用

耿梦华^{1,2,3}, 陈晟^{1,2,3}, 吴敬^{1,2,3}, 吴丹^{*1,2,3}

(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. 江南大学, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以壳聚糖为载体、戊二醛为交联剂, 采用吸附交联法对重组短小芽孢杆菌来源的蔗糖异构酶进行固定化。以表观酶活力回收率为指标, 对壳聚糖浓度、戊二醛加量、游离酶加量、固定化时间等条件进行了优化; 并考察了温度、pH、固定化酶加量、反应时间以及底物浓度等因素对固定化蔗糖异构酶转化生产异麦芽酮糖的影响。结果表明, 最佳固定化条件为: 壳聚糖质量浓度 3 g/dL、戊二醛加量(体积分数) 0.75%、酶加量 50 U/g、固定化时间 16 h, 此时固定化酶活力回收率达到 70.3%; 最佳转化条件为: 温度 30 ℃、初始 pH 4.5、酶用量 15 U/g, 转化 10 h, 蔗糖质量浓度 600 g/L, 异麦芽酮糖最大产物得率达到 87.8%。在最佳的转化条件下连续转化 16 次, 产物得率仍保持在 87.52%, 显示该固定化酶具有良好的操作稳定性及较高的异麦芽酮糖合成能力。

关键词: 蔗糖异构酶; 固定化; 异麦芽酮糖

中图分类号: TS 252 文章编号: 1673-1689(2019)04-0104-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.04.016

Immobilization of Sucrose Isomerase by Adsorption and Crosslinking Method for the Synthesis of Isomaltulose

GENG Menghua^{1,2,3}, CHEN Sheng^{1,2,3}, WU Jing^{1,2,3}, WU Dan^{*1,2,3}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Sucrose isomerase from the recombinant strain was immobilized on chitosan cross-linked with glutaraldehyde. The effects of chitosan concentration, glutaraldehyde content, enzyme concentration, crosslinking time were investigated using the immobilized enzyme activity recovery rate as an index, and the effects of temperature, pH, enzyme dosage, reaction time and substrate concentration on the production of isomaltulose by immobilized sucrose isomerase were also investigated. The immobilization efficiency reached up to 70.3% under the optimal condition of immobilization achieved with 3.0% of the chitosan, 0.75% glutaraldehyde content, 50 U/g chitosan beads and 16 h. The optimum conditions of the synthesis of isomaltulose were as follows: reaction

收稿日期: 2016-10-07

基金项目: 国家杰出青年基金项目(31425020); 江苏高校优秀科技创新团队项目[111 计划(111-2-06)]。

* 通信作者: 吴丹(1976—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 从事微生物发酵过程优化与控制研究。E-mail: wudan@jiangnan.edu.cn

引用本文: 耿梦华, 陈晟, 吴敬, 等. 吸附交联法固定化蔗糖异构酶及其在异麦芽酮糖制备中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(04): 104-110.

temperature 30 °C, initial pH 4.5, enzyme concentration 15 U/g sucrose, conversation time 12 h, initial sucrose concentration 600 g/L. When the reaction was performed under this specified conditions, the isomaltulose yield reached the maximum of 87.8%. The yield ratio was still up to 87.52% after 16 times of continuous conversion and it shows a good operational stability and a high productivity of isomaltulose.

Keywords: sucrose isomerase, immobilization, isomaltulose

异麦芽酮糖(isomaltulose), 又名帕拉金糖, 是蔗糖的同分异构体^[1-3]。与蔗糖相比, 异麦芽酮糖热量低、甜度低、不致龋齿^[4]。人体食用异麦芽酮糖后, 会在血液中以较缓慢的速度代谢为果糖和葡萄糖, 不影响体内胰岛素的分泌, 特别适合于糖尿病人及肥胖人群食用^[5]。因此, 现在越来越多的人开始关注和食用异麦芽酮糖。

异麦芽酮糖的生产方法主要有生物转化法和化学转化法。由于化学转化法的高能耗、高污染等问题, 目前国内外生产异麦芽酮糖普遍采用基于生物催化的蔗糖异构化法^[6-12], 即利用微生物合成的蔗糖异构酶(EC 5.4.99.11, sucrose isomerase, SIase)以蔗糖为底物酶转化生产异麦芽酮糖, 催化作用反应式如图 1。生物转化法主要有细胞转化法和酶转化法两种。细胞转化法是直接发酵菌体或将菌体固定化来转化蔗糖。生产强度低、菌体浓度低及易污染杂菌等问题是在利用细胞转化法生产异麦芽酮糖时无法避免的, 而酶转化法一般不存在上述问题,

所以目前一般是将蔗糖异构酶从微生物细胞中提取出来, 再通过游离酶或固定化酶将蔗糖转化为异麦芽酮糖。相比于游离酶, 固定化酶由于其良好的操作稳定性及存储稳定性、产物易分离等优点而使酶的工业化应用更加经济。

目前关于蔗糖异构酶固定化的报道较少。国外仅见 FABIANO 等^[13]以硅藻土吸附法与微胶囊包埋法两种方法对 *Erwinia* sp. 来源的蔗糖异构酶进行固定化, 然而这两种方法所制得的固定化酶酶活力回收率及操作稳定性都较差; 国内仅见南京工业大学的 WU 等^[14]以 ϵ -poly-L-lysine 修饰过的介孔 TiO₂ 为载体对蔗糖异构酶进行固定化, 所得固定化酶具有良好的操作稳定性与酶活力回收率, 且材料较为新颖, 但是考虑到成本问题, 此方法并不能用于大规模的工业化生产。因此, 寻求一种成本经济、操作简单、酶活力回收率高且操作稳定性良好的蔗糖异构酶的固定化方法仍然是目前亟待解决的问题。

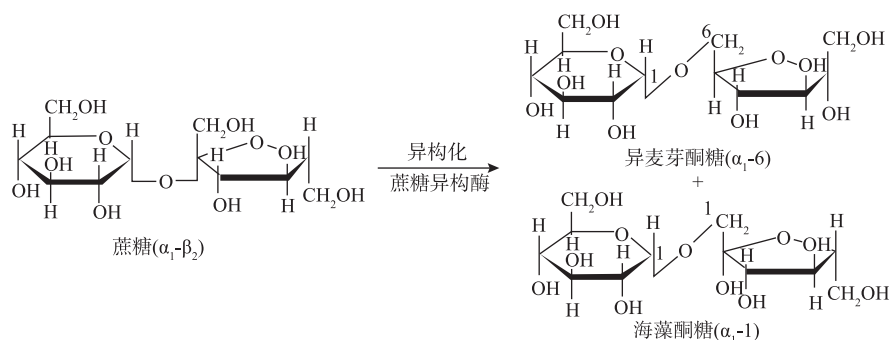


图 1 蔗糖异构酶生物催化蔗糖反应式

Fig. 1 Reaction of sucrose isomerase biocatalysis sucrose

壳聚糖是天然的碱性多糖, 吸附性强, 常用于酶的固定化^[15-16]。本研究拟以壳聚糖微球为载体、戊二醛为交联剂, 对重组工程菌来源的蔗糖异构酶进行固定化, 考察各种固定化条件对酶活回收率的影响, 并对固定化酶的最佳转化条件及固定化酶重复使用稳定性进行探讨, 以期为提高蔗糖异构酶の利用效率、降低异麦芽酮糖的生产成本提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

菌种: 短小芽孢杆菌(*B. brevis*/pSVEB-pal I^{LSP})由本实验室保藏。

试剂: 牛肉蛋白胨(CP)购自杭州木木生物科技有限公司, 大豆蛋白胨(CP)购自上海国药集团化学

试剂有限公司,壳聚糖(脱乙酰度>90%,CP)购自上海国药集团化学试剂有限公司,戊二醛(CP)购自阿拉丁公司,异麦芽酮糖、海藻酮糖(GR)购自 Sigma 公司,其他试剂均为国产 AR 级。

仪器:AR 2140 型电子天平购自梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司,冷冻立式离心机购自日本 Hitachi 公司,Agilent 1200 高效液相色谱购自美国 Agilent 公司,小型高速离心机购自德国 Eppendorf 公司,UV-1100 紫外可见分光光度计购自日本 Shimadzu 公司,空气恒温摇床购自上海精密仪器仪表有限公司,HZ-9212 SB 水浴恒温振荡器购自太仓市华利达实验设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 蔗糖异构酶游离酶的制备 将藏于本实验室-80℃冰箱的短小芽孢杆菌甘油管以体积分数 2%的接种量接种于含有 30 μg/mL 新霉素的 10 mL 的 TM 培养基中,于 200 r/min、30℃培养 8~10 h,制得种子液。按体积分数 1%的接种量将种子液转接入含有 30 μg/mL 新霉素的 50 mL 的 TM 培养基,30℃,200 r/min 培养 48 h 后,将发酵液在 12 000 r/min、4℃下离心 10 min,上清液即为 SIase 粗酶液。

1.2.2 蔗糖异构酶固定化方法的优化 壳聚糖载体的制备:将一定质量的壳聚糖溶解于体积分数 2.0%的醋酸溶液中,待形成均一透明的胶体后用注射器将其滴加到 4 mol/L 的氢氧化钠溶液中(滴加时注意针头与液面的距离并保持垂直),形成直径为 2.0 mm 左右的微球,后用蒸馏水洗至中性。将制好的壳聚糖微球加入到一定浓度的戊二醛溶液中,4℃放置 2 h 后用蒸馏水洗去多余的戊二醛,将壳聚糖小球 4℃条件下保存于蒸馏水中备用。

蔗糖异构酶的固定化:称取 5.0 g 湿壳聚糖微球,加入 10 mL 含一定单位酶活的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(50 mmol/L,pH 6.0),于 4℃振荡吸附交联一定时间后取出抽滤,用蒸馏水洗去未交联游离酶,即得到固定化酶。

采用单因素实验分别研究壳聚糖质量浓度(2、3、4、5 g/dL)、戊二醛加量(体积分数)(0.5%、0.75%、1.0%、1.25%、1.5%、2.0%、3.0%)、酶加量(30、50、70、100、200 U/g)和固定化时间(4、6、12、16、20、24 h)对固定化效果的影响。

1.2.3 酶活力测定 将 900 μL 含有蔗糖的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(50 mmol/L,pH 6.0)加入到

1.5 mL 的 EP 管中,加入 100 μL 适当稀释的酶液,使得蔗糖的终质量浓度为 100 g/L。将混合液振荡混匀,置 30℃的水浴中反应 15 min,高温灭酶,离心取上清。利用 HPLC 检测反应样品中异麦芽酮糖的含量。

酶活力单位定义:上述反应条件下,每分钟释放 1 μmol 异麦芽酮糖所需的酶量为一个酶活力单位(U)。

固定化酶活力的测定只需要将 100 μL 适当稀释的酶用一定质量的固定化酶代替,其他步骤相同。固定化酶活收率计算公式如下:

$$R = \frac{K_1}{K_0} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, R 为固定化酶活回收率; K_0 为加入游离酶总活力; K_1 为固定化酶总活力。

1.2.4 固定化蔗糖异构酶制备异麦芽酮糖工艺优化

1)温度对固定化蔗糖异构酶制备异麦芽酮糖的影响。用 pH 6.0 的磷酸缓冲液溶解 400 g/L 的蔗糖作为底物,固定化酶加量为 20 U/g,反应初始 pH 6.0,分别置于 20、25、30、35、40、45、50℃水浴恒温振荡器中,150 r/min,转化 12 h。HPLC 检测,计算产物得率。

2)pH 值对固定化蔗糖异构酶制备异麦芽酮糖的影响。分别用 pH 值为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 和 7.0 的磷酸缓冲液配制 400 g/L 的蔗糖作为底物,固定化酶加量为 20 U/g,置于 30℃、150 r/min 的水浴恒温振荡器,转化 12 h。HPLC 检测,计算产物得率。

3)加酶量对固定化蔗糖异构酶制备异麦芽酮糖的影响。以 pH 4.5 的 400 g/L 的蔗糖作为底物,固定化酶加量分别为 5、10、15、20、25 U/g 和 30 U/g,置于 30℃、150 r/min 的水浴恒温振荡器中,转化 12 h。HPLC 检测,计算产物得率。

4)底物质量浓度对固定化蔗糖异构酶制备异麦芽酮糖的影响。分别配制 pH 4.5 的 200、300、400、500、600、700 g/L 和 800 g/L 的蔗糖溶液,固定化酶加量为 15 U/g,置于 30℃、150 r/min 的水浴恒温振荡器中,转化 12 h。HPLC 检测,计算产物得率。

5)反应时间对固定化蔗糖异构酶制备异麦芽酮糖的影响。以 pH 4.5 的 400 g/L 的蔗糖作为底物,加酶量为 15 U/g,置于 30℃、转速为 150 r/min 的水浴恒温振荡器中,每隔一定时间取样 500 μL。HPLC

检测,计算产物得率。

1.2.5 HPLC 检测法计算异麦芽酮糖产物得率 转化后的样品灭酶后离心,取上清适当稀释,过滤后备用。HPLC 检测条件参考程胜等^[17-18]的方法:流动相为体积分数 80% 的乙腈,超声脱气 20 min,流速为 0.8 mL/min;柱温 30 ℃。

$$I = \frac{A_1 \times C \times V \times k}{A_0 \times m} \times 100\% \quad (2)$$

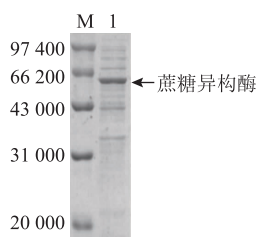
式(2)中, I 为异麦芽酮糖产物得率; A_1 为样品峰面积; C 为标样浓度; V 为样品体积; k 为样品稀释倍数; A_0 为标样峰面积; m 为底物蔗糖质量。

1.2.6 固定化酶的操作稳定性研究 以 pH 4.5 的 600 g/L 的蔗糖溶液为底物,固定化酶加量为 15 U/g,置于 30 ℃、150 r/min 的水浴恒温振荡器中,转化 10 h 后将反应液移出,用磷酸缓冲液(pH 4.5)淋洗固定化酶至检测不出糖,加入底物进行新一批的反应,连续转化 16 批。用 HPLC 检测每批异麦芽酮糖生成量,计算各批次产物得率及固定化酶的残余酶活,考察固定化酶的重复使用稳定性。

2 结果与讨论

2.1 蔗糖异构酶游离酶的制备

SDS-PAGE 电泳如图 2,在大约 65×10^3 处即为目的蛋白条带。



M: 蛋白质标准; 1: 重组菌发酵上清液

图 2 蔗糖异构酶 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the sucrose isomerase

2.2 蔗糖异构酶固定化方法的优化

2.2.1 壳聚糖质量浓度对固定化酶活回收率的影响 在戊二醛加量为 1%、加酶量为 50 U/g、固定化时间为 12 h 的条件下研究不同壳聚糖浓度对固定化蔗糖异构酶酶活回收率的影响,结果见图 3。

由图 3 可知,于 3 g/dL 的壳聚糖质量浓度下酶活力回收率达到最大值为 53.8%。在实验过程中发现,壳聚糖浓度大小会影响溶液的密度和黏度,当

壳聚糖质量浓度为 1 g/dL 时,制得的壳聚糖溶液黏度低。随着壳聚糖质量浓度的增加,酶活力和酶活力回收率均达到较好的效果。壳聚糖的质量浓度继续增大则浓度过高,粘结成块,这一现象与汤卫华等^[19]的研究结果一致。因此选择壳聚糖的质量浓度为 3 g/dL。

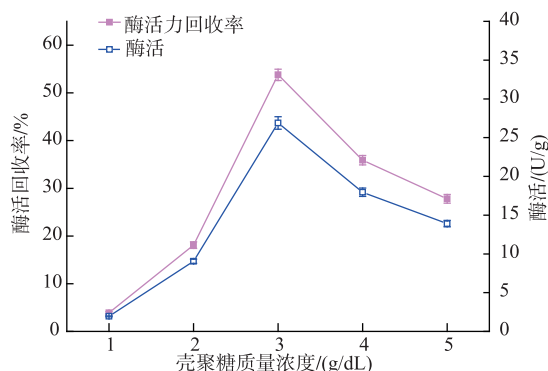


图 3 壳聚糖质量浓度对固定化蔗糖异构酶活力回收率的影响
Fig. 3 Effect of chitosan conversion on recovery of immobilized enzyme

2.2.2 戊二醛加量对固定化酶活回收率的影响 在壳聚糖质量浓度为 3.0 g/dL、加酶量为 50 U/g、固定化时间为 12 h 的条件下研究戊二醛加量对固定化蔗糖异构酶酶活回收率的影响,结果见图 4。

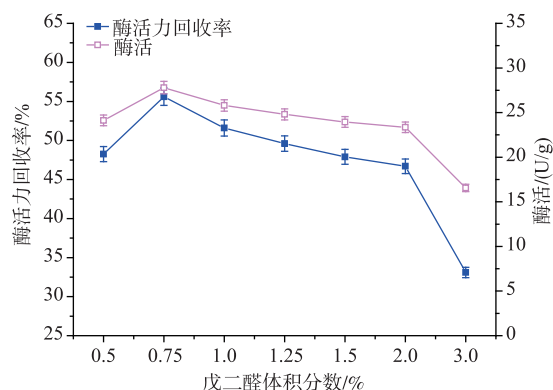


图 4 戊二醛加量对固定化蔗糖异构酶活力回收率的影响
Fig. 4 Effect of glutaraldehyde concentration on recovery of immobilized enzyme

由图 4 可知,酶活力回收率与戊二醛含量呈倒 U 型关系。戊二醛不仅是固定化酶反应的交联剂,同时可使酶变性。戊二醛加量增多,壳聚糖微球内的游离醛基数则随之增多,但过量的戊二醛基会导致酶失活。当戊二醛加量为 0.75% 时,酶活回收率达到最大值 55.6%。因此,选择固定化酶的最适戊二醛加

量为 0.75%。

2.2.3 游离酶加量对固定化酶活回收率的影响 在壳聚糖质量浓度为 3.0 g/dL、戊二醛加量为 0.75%、固定化时间为 12 h 的条件下研究不同酶加量对固定化蔗糖异构酶酶活回收率的影响,结果见图 5。

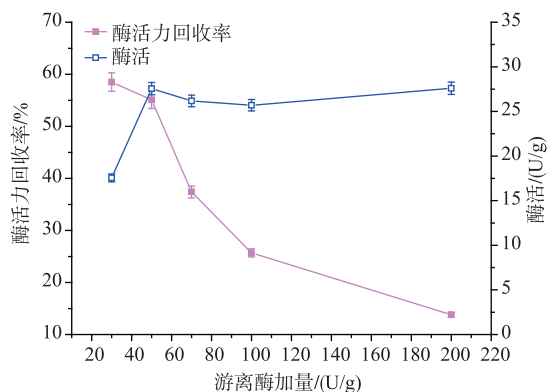


图 5 游离酶加量对固定化蔗糖异构酶活力回收率的影响
Fig. 5 Effect of free enzyme concentration on activity and recovery of immobilized enzyme

由图 5 可以看出,当加酶量为 50 U/g 时,酶活达到最大为 27.6 U/g,继续加大酶加量则固定化酶的活力增加不显著。这可能与载体与酶的固定化作用方式有关。在酶加量与固定化上的游离醛基数量未达到平衡时,固定化酶的酶活随给酶量的增加而增大,但当载体上的醛基与酶作用达到饱和之后继续加大酶加量,酶活不会再增加,相应的酶活力回收率逐渐降低。综合考虑酶制剂的成本、酶活和酶活力回收率,选择加酶量为 50 U/g。

2.2.4 固定化时间对固定化酶活回收率的影响 在壳聚糖质量浓度为 3.0 g/dL、戊二醛加量为 0.75%、加酶量为 50 U/g 的条件下,研究固定化时间对固定化蔗糖异构酶酶活力回收率的影响,结果见图 6。

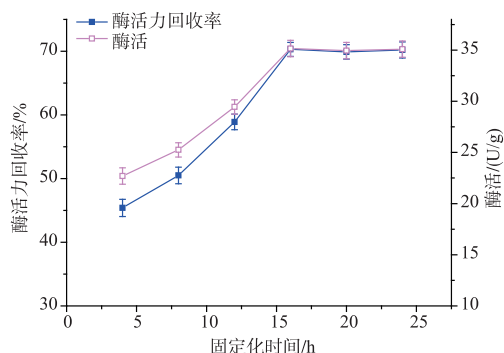


图 6 固定化时间对固定化蔗糖异构酶活力回收率的影响
Fig. 6 Effect of immobilization time on activity and recovery of immobilized enzyme

由图 6 可以看出,当固定化时间达到 16 h 后,载体与酶的作用达到饱和,此时酶活力回收率达到 70.3%,酶活为 35.2 U/g,酶固载量为 0.04 mg/g,因此选择的固定化时间是 16 h。

2.3 固定化蔗糖异构酶制备异麦芽酮糖工艺优化

2.3.1 温度对固定化蔗糖异构酶制备异麦芽酮糖的影响 如图 7 所示,30 ℃时,异麦芽酮糖产物得率达到最大值 83.4%。温度升高或降低,产物得率均呈下降趋势。这与蔗糖异构酶同时具有水解与异构活性有关。实验过程中发现,高温可能有利于蔗糖的水解反应,酶转化体系中单糖含量会随着温度的升高而增加。而低温虽然有利于异构化,但此时酶的构象更利于生成海藻酮糖。这与 ZHANG 等^[20]研究 *Klebsiella* sp. LX3 蔗糖异构酶的发现一致。综合以上因素,以 30 ℃为后续研究的反应温度。

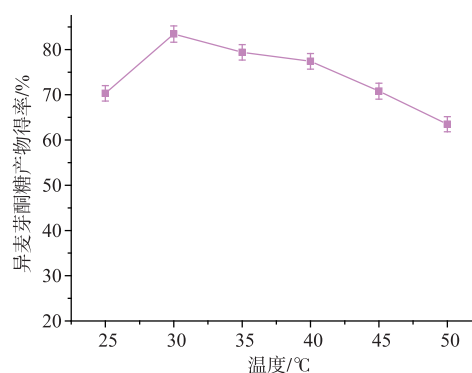


图 7 温度对异麦芽酮糖产物得率的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the yield of isomaltulose

2.3.2 初始 pH 对固定化蔗糖异构酶制备异麦芽酮糖的影响 见图 8,当初始 pH 为 4.5 时,异麦芽酮糖产物得率最高,达到 84.8%。推测 pH 可能影响酶活性部位有关基团的解离状态,高于或低于最适 pH 值时,酶处于不利于催化的解离状态。因此以 4.5 为最适 pH。

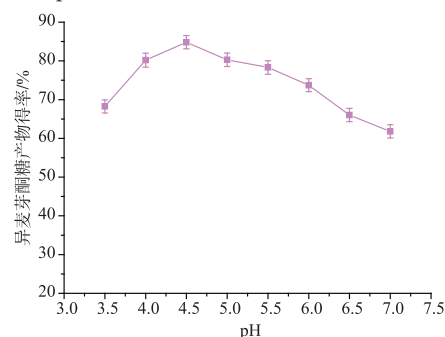


图 8 初始 pH 对异麦芽酮糖产物得率的影响

Fig. 8 Effect of initial pH on the yield of isomaltulose

2.3.3 底物质量浓度对固定化蔗糖异构酶制备异麦芽酮糖的影响 见图 9,底物质量浓度为 500 g/L 时,产物得率达 87.9%。而以 500~700 g/L 蔗糖为底物时,虽然转化率基本保持恒定,但考虑到高质量浓度的蔗糖时体系水活力较低,后续以质量浓度 600 g/L 的蔗糖进行试验。

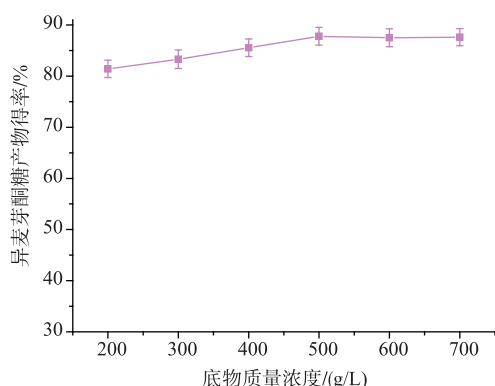


图 9 底物质量浓度对异麦芽酮糖产物得率的影响

Fig. 9 Effect of sucrose concentrations on the yield of isomaltulose

2.3.4 固定酶用量对固定化蔗糖异构酶制备异麦芽酮糖的影响 见图 10,异麦芽酮糖转化率随着酶加量的增加而升高,当酶用量为 15 U/g 时,产物得率达到最大 85.2%。但随着酶用量的继续增加,异麦芽酮糖转化率稍微降低。故而以 15 U/g 为最优酶加量。

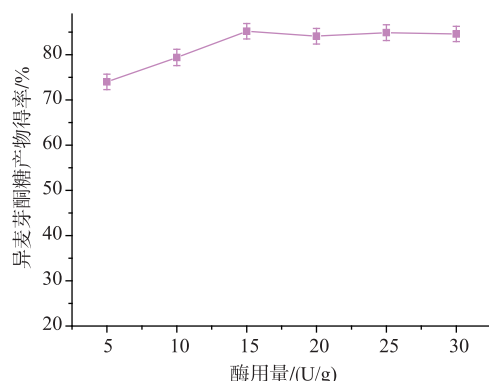


图 10 加酶量对异麦芽酮糖产物得率的影响

Fig. 10 Effect of enzyme concentration on the yield of isomaltulose

2.3.5 反应时间对固定化蔗糖异构酶制备异麦芽酮糖的影响 见图 11,在转化 10 h 时转化率达到最大值 87.8%,10 h 后转化率基本不变。因此,最佳转化时间可以选择为 10 h。

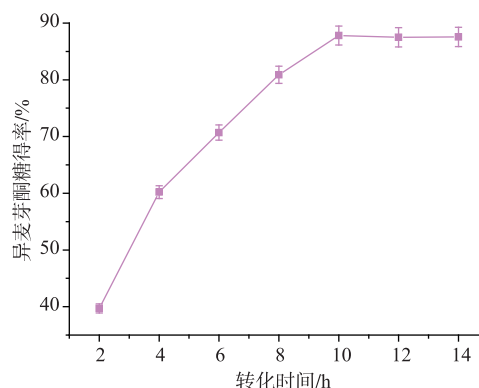


图 11 反应时间对异麦芽酮糖产物得率的影响

Fig. 11 Effect of reaction time on the yield of isomaltulose

2.4 固定化酶的操作稳定性研究

图 12 为固定化酶连续转化 16 次的产物得率与残余酶活。固定化酶连续转化 10 次,酶活保留率超过 50%;连续转化 16 次,产物得率仍有 87.52%,显示该固定化酶具有较好的操作稳定性及较高的异麦芽酮糖合成能力。

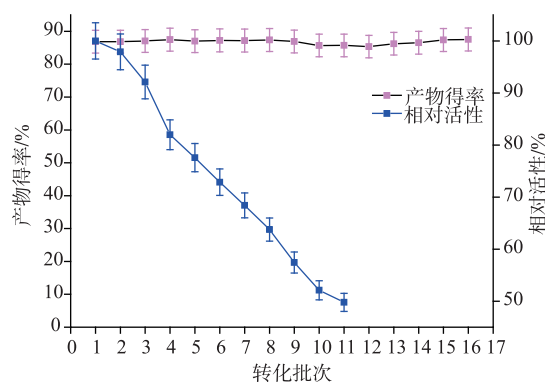


图 12 固定化酶的操作稳定性

Fig. 12 Operational stability of immobilized enzyme

3 结语

本研究以壳聚糖为载体、戊二醛为交联剂,采用吸附交联法对重组工程菌来源的蔗糖异构酶进行固定化。结果表明,最佳固定化条件:壳聚糖质量浓度 3 g/dL、戊二醛加量 0.75%、酶加量 50 U/g、固定化时间 16 h,此时固定化酶活力回收率达到 70.3%。重组酶制备异麦芽酮糖的最佳转化条件:温度 30 ℃、初始 pH 4.5、酶用量 15 U/g、转化 10 h,蔗糖质量浓度 600 g/L,异麦芽酮糖最大产物得率可以达到 87.8%。在最佳的转化条件下连续转化 16 次,产物得率无明显降低,显示该固定化酶具有良好的操

作稳定性及较高的异麦芽酮糖合成能力,为固定化酶法合成异麦芽酮糖的工业化提供了一定的参考价值。

参考文献:

- [1] TAKAZOE I. Palatinose; an isomeric alternative to sucrose[P]. United States, US9046960, 1989.
- [2] LOW N, SPORNS P. Analysis and quantitation of minor di- and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography [J]. **J Food Sci**, 1988, 53(2): 558-561.
- [3] HAMADA S. Role of sweeteners in the etiology and prevention of dental caries[J]. **Pure Appl Chem**, 2002, 74(7): 1293-1300.
- [4] MINAMI T, FUJIWARA T, OOSHIMA T, et al. Interaction of structural isomers of sucrose in the reaction between sucrose and glucosyltransferases from mutans streptococci[J]. **Oral Microbiol Immun**, 1990, 5(4): 189-194.
- [5] LINA BA, JONKER D, KOZIANOWSKI G. Isomaltulose (Palatinose): a review of biological and toxicological studies[J]. **Food Chem Toxicol**, 2002, 40(10): 1375-1381.
- [6] CHO M H, PARK S E, LIM J K, et al. Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose-producing microorganism isolated from traditional Korean food[J]. **Biotechnol Lett**, 2007, 29(3): 453-458.
- [7] KRATANOV A, YOSHIDA A. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan[J]. **J Ind Microbiol Biot**, 2003, 30(10): 593-598.
- [8] KRATANOV A, BLAZHEVA D, STANCHEV V. Sucrose conversion into palatinose with immobilized *Serratia plymuthica* cells in a hollow-fiber bioreactor[J]. **Process Biochem**, 2007, 42(12): 1655-1659.
- [9] SU Xuemei. Production process and market analysis of palatinose[J]. **Food and Biology**, 2012, 161(4): 1-2. (in Chinese)
- [10] LI S, CAI H, XU H, et al. Cloning and characterization of a sucrose isomerase from *Erwinia hapontici* NX-5 for isomaltulose hyperproduction[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2011, 163(1): 52-63.
- [11] WU L, BIRCH R G. Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2005, 71(3): 1581-1590.
- [12] SHA L, HONG X, PINGKAI O Y, et al. Enhancing isomaltulose production by recombinant *Escherichia coli* producing sucrose isomerase: culture medium optimization containing agricultural wastes and cell immobilization[J]. **Bioprocess Biosyst Eng**, 2013, 36(10): 1395-1405.
- [13] FABIANO J C, CAROLINA I, CARLOS R F G, et al. Immobilization of glucosyltransferase from *Erwinia* sp. using two different techniques[J]. **Journal of Biotechnology**, 2012, 158(3): 137-143.
- [14] WU L T, LIU Y, CHI B, et al. An innovative method for immobilizing sucrose isomerase on e-poly-L-lysine modified mesoporous TiO₂[J]. **Food Chemistry**, 2015(187): 182-188.
- [15] XIA Wenshui, TAN Li. Research progress in chitosan immobilized enzymes[J]. **Food and Machinery**, 2007, 23(6): 7-10, 30. (in Chinese)
- [16] WANG Lirong, YONG Liangmin, LIU Shisheng. Study on immobilized rubber seed β -glucosidase by chitosan microspheres[J]. **Food Industry**, 2014(5): 119-122. (in Chinese)
- [17] 程胜. *Serratia plymuthica* 蔗糖异构酶的重组表达、热稳定性改造及应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [18] CHENG Sheng, DUAN Xuguo, WU Jing. Preparation of recombinant sucrose isomerase and optimization of application conditions[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2014, 41(5): 41-47. (in Chinese)
- [19] TANG Weihua, WANG Lihui. Immobilization of β -galactosidase by chitosan microsphere[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2005, 5. (in Chinese)
- [20] ZHANG D, LI X, ZHANG L H. Isomaltulose synthase from *Klebsiella* sp. strain LX3: gene cloning and characterization and engineering of thermostability[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68(6): 2676-2682.