

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A23F 5/18

C12N 11/02

C12N 9/00

# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95103639.4

[45] 授权公告日 2001 年 7 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1068503C

[22] 申请日 1995.4.6 [24] 颁证日 2001.4.12

[21] 申请号 95103639.4

[30] 优先权

[32] 1994.4.7 [33] EP [31] 94105366.2

[73] 专利权人 雀巢制品公司

地址 瑞士沃韦

[72] 发明人 P·尼古拉斯 E·雷兹 S·雷蒙  
J·-L·索瓦吉特

[56] 参考文献

CN1059759A 1992. 3. 25 C12N11/08

CN1059759A 1992. 3. 25 C12N11/08

US2801920 1957. 8. 6 A23F5/16

US28101920 1957. 8. 6 A23F5/16

食品生物化学 1981. 8. 1 天津轻工业学院 无锡轻工业学院  
分编中国轻工业出版社

食品生物化学 1981. 8. 1 天津轻院, 无锡轻院合编中国轻工业出版社

审查员 王文庆

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

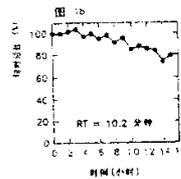
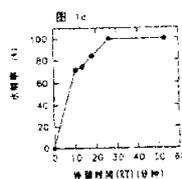
代理人 刘元金 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图页数 5 页

[54] 发明名称 液体咖啡萃出物中半乳甘露聚糖的水解方法

[57] 摘要

一种使液体咖啡萃出物中的半乳甘露聚糖水解脱的方法, 其中该萃出物是在 20—80℃ 的温度下用固定化 β-甘露聚糖酶进行水解的。



ISSN 1008-4274

## 权利要求书

---

1. 液体咖啡萃出物中半乳甘露聚糖的水解方法，其中所述萃出物是在 20 - 80 °C 的温度下用固定化  $\beta$  - 甘露聚糖酶进行水解的，而且在至少 500 次连续循环水解咖啡萃出物后其酶活性能保留 60% 以上。

2. 如权利要求 1 提出的方法，其中  $\beta$  - 甘露聚糖酶是通过共价键连接固定在一种基质上的。

3. 如权利要求 1 提出的方法，其中  $\beta$  - 甘露聚糖酶是通过吸附在基质上的甘露聚糖酶的聚合而固定的。

4. 如权利要求 1 提出的方法，其中所述的萃出物是在 30 - 70 °C 的温度下进行水解的。

5. 如权利要求 1 提出的方法，其中所述的  $\beta$  - 甘露聚糖酶是从 *Aspergillus niger* 中提取出来的  $\beta$  - 甘露聚糖酶。

6. 如权利要求 1 提出的方法，其中所述的液体咖啡萃出物是从经研磨烘烤过的咖啡的分裂提取法中的加压段得到的萃出物。

7. 如权利要求 2 或 3 提出的方法，其中所述的基质是一种多孔基质。

8. 如权利要求 7 提出的方法，其中所述基质的孔径为 20 - 200 毫微米。

9. 如权利要求 7 提出的方法，其中所述多孔基质可选自二氧化硅、玻璃、丙烯酸类聚合物和酚醛聚合物的颗粒。

10. 如权利要求 3 提出的方法，其中吸附在基质上的  $\beta$  - 甘露聚糖酶是用戊二醛进行聚合的。

11. 如权利要求 1 提出的方法，其中所述的液体咖啡萃出物是

在含有固定化  $\beta$  - 甘露聚糖酶的固定床反应器中进行连续水解的。

1 2 . 如权利要求 1 提出的方法, 其中所述的液体咖啡萃出物是在含有固定化  $\beta$  - 甘露聚糖酶的流化床反应器中进行连续水解的。

1 3 . 如权利要求 1 提出的方法, 其中所述的液体咖啡萃出物是在含有固定化  $\beta$  - 甘露聚糖酶悬浮液的槽罐中进行水解的。

# 说明书

---

## 液体咖啡萃出物中半乳甘露聚糖的水解方法

本发明涉及液体咖啡萃出物中所含的半乳甘露聚糖的一种水解方法。

美国专利2802920公开了咖啡萃出物中所含的半乳甘露聚糖的水解方法，水解时使用 $\beta$ -甘露聚糖酶制剂，以便防止这种萃出物在冷冻过程中形成凝胶。

Food Review, 8/9, 37-39 (1984) 公开了 $\beta$ -甘露聚糖酶的工业用途，即降低液体咖啡萃出物的粘度，使得有可能将其浓缩成高含量的干物质。

但是， $\beta$ -甘露聚糖酶的这种工业用途具有一定的缺点。例如，由于这种酶只使用一次，因而被浪费掉。在成品中存在这种酶也是所不希望的。

本发明旨在弥补先有技术的这些缺点。

为此目的，在本发明的液体咖啡中的半乳甘露聚糖的水解方法中，该萃出物是在20-80℃用固定化 $\beta$ -甘露聚糖酶进行水解的。

$\beta$ -甘露聚糖酶较好是通过共价键连接固定在基质上或通过吸附在基质上的 $\beta$ -甘露聚糖酶的聚合作用而达到固定化。

因此，本发明的一个优点是达到了节省酶的目的。

另一个优点是 $\beta$ -甘露聚糖酶不会从基质上盐析出来。

再一个优点是可以在不会产生细菌污染的温度下操作。

本发明的一个令人惊奇的优点是 $\beta$ -甘露聚糖酶通过共价键连接在基质上后或在吸附于基质上的分子聚合之后不会失去活性，类似地，固定化 $\beta$ -甘露聚糖酶的酶活性对时间而言是相对恒定的。

最后，本发明还有一个优点，即咖啡萃出物既可以在搅拌槽罐式反应器中进行，也可以在包括固定化 $\beta$ -甘露聚糖酶的固定床或流化床的反应器中进行，不必考虑咖啡萃出物的粘度。

在下面的叙述中“搅拌槽罐式反应器”一词意指含有处于悬浮状态的固定化 $\beta$ -甘露聚糖酶的、进行机械搅拌的系统。

类似地“固定化 $\beta$ -甘露聚糖酶的固定床”一词应理解为固定在紧密装填在适用于连续加工液体咖啡萃出物的反应器中的基质上或基质中的 $\beta$ -甘露聚糖酶。

“固定化 $\beta$ -甘露聚糖酶的流化床”一词应理解为固定在装填但并非紧密装填在适用于连续加工液体咖啡萃出物的反应器中的基质上的 $\beta$ -甘露聚糖酶。然后，咖啡萃出物从底部到顶部的循环流动使基质颗粒处于悬浮状态。这种类型的反应器称为“流动床反应器”，特别有利于加工含有悬浮状固体物质的介质。

“二聚甘露糖 (manobiose)”和“垮糖”这两个术语分别指甘露糖的二聚体和三聚体，而术语“甘露糖类” (mannosaccharide) 应理解为至少两种甘露糖的聚合物。

$\beta$ -甘露聚糖酶的单位定义为在 pH 5 及 30 °C 条件下每分钟从角豆树胶释放出来的相当于 1 微摩尔甘露糖的还原蔗糖的量。

因此，为了实施本发明， $\beta$ -甘露聚糖酶例如可通过共价键连接固定在常用基质的表面上，或者也可以通过事先吸附在常用基质表面上的 $\beta$ -甘露聚糖酶的聚合作用而达到固定化。

然后例如可用这些固定化的酶将液体咖啡萃出物在 40 - 70 °C 的温度下进行水解。

为此目的，较好是使用细菌或霉菌  $\beta$  - 甘露聚糖酶，特别是从 *Aspergillus niger* 中提取的  $\beta$  - 甘露聚糖酶，例如特别是以 Gamanase® 商标（丹麦，NOVO - NORDISK 公司）销售的，经纯化的 *Aspergillus niger*  $\beta$  - 甘露聚糖酶。

此外，可让萃取液滤过装填有经研磨烘烤过的咖啡萃取槽来获得液体咖啡萃出物。这种萃取方法可以逆流方式进行，即可在压力下在 150 - 180 °C 的温度下，把水引入到装有经研磨烘烤过的最大限度耗尽的咖啡料的萃取槽中，而该咖啡料已在其底部经过 N 次萃取。然后使从该萃取槽出来的液体萃出物通过装有已经使用过 (N - 1) 次的咖啡料的萃取槽中，如此直至液体萃出物通过装填有经研磨烘烤的新鲜咖啡的萃取槽为止。最后使用的萃出物来自温度约为 100 °C 的最后一个萃取槽。因此可以分成由装有最大限度耗尽的咖啡的萃取槽构成的加压段，和由装有最小限度耗尽的咖啡的萃取槽构成的常压段。

也可让萃取液滤过装填有经研磨烘烤的咖啡的加压段萃取槽来获得液体咖啡萃出物。这种方法称为“分裂提取”，在其余的叙述部分中也将使用这一术语。在该方法中使用两种萃取液，萃取槽分成加压段和常压段，每段用其自己的萃取液进行萃取。装在常压段中的咖啡是在适中的温度和压力条件下用第一种萃取液进行萃取的，而装在加压段中的咖啡是在高得多的温度和压力的条件下用第二种萃取液进行萃取的。因此必然会产生两种不同的液体萃出物，例如从加压段出来的萃出物经部分蒸发后可以互相合并，然后用常规方法制成粉末。

因此，在本发明中尤其可以使用从研磨烘烤的咖啡的分裂提取工

艺的加压段中得到的萃出物，然后才将其进行部分蒸发。

因此，较好是使用例如从EP 0 538 512所公开的加压段得到的萃出物。

按照本发明，所述基质可以是多孔基质，例如尤其是孔径为20-200毫微米的多孔基质。

具体说，多孔基质可以选自粒状的硅石、玻璃、丙烯酸类聚合物，尤其是牌号为Eupergit-C<sup>®</sup>的丙烯酸类聚合物(德国，Röhm公司)，和酚醛聚合物，尤其是牌号为Duolite<sup>®</sup>的酚醛树脂(美国，Supelco公司)，例如特别是Duolite<sup>®</sup> S-761牌号的树脂。

$\beta$ -甘露聚糖酶较好是通过共价键连接固定在丙烯酸类聚合物Eupergit-C<sup>®</sup>的表面上。该聚合物具有环氧乙烯基团，其环氧环可以固定 $\beta$ -甘露聚糖酶。因此每克Eupergit-C<sup>®</sup>可以固定例如至少1900单位的 $\beta$ -甘露聚糖酶。

多种 $\beta$ -甘露聚糖酶较好是通过吸附在酚醛树脂Duolite<sup>®</sup>颗粒表面上的 $\beta$ -甘露聚糖酶的聚合作用来固定。例如可以用戊二醛作为聚合剂。

在本发明的第一个优选的具体实施方案中，咖啡萃出液是用 $\beta$ -甘露聚糖酶的槽罐式反应器中进行水解的，所述 $\beta$ -甘露聚糖酶是由共价键连接固定在基质上的或由吸附在基质上的 $\beta$ -甘露聚糖酶的聚合而固定的。该系统可以以半连续方式，按如下三步自动进行操作。在该第一个方案中，将待处理的咖啡萃出物装入到槽罐中，然后进行水解，同时进行机械搅拌，经过预定的时间后将槽罐放空。在槽罐下部配置一个过滤器就可以保留反应器中的酶。该过滤器能截留住例如直径大于40微米的所有颗粒。

从这种水解方法，可以看出，通过共价键连接而固定在基质上的 $\beta$ -甘露聚糖酶具有良好的稳定性，因为在至少500次连续循环水解咖啡萃出物后其酶活性能保留60%以上。

本发明的第二个优选的具体实施方案中，液体咖啡萃出物是在含有 $\beta$ -甘露聚糖酶的固定床反应器中进行连续水解的，所述 $\beta$ -甘露聚糖酶是由共价键连接固定在基质上的或由吸附在基质上的 $\beta$ -甘露聚糖酶的聚合而固定的。当以这种方式使用时，该固定化 $\beta$ -甘露聚糖酶能保持良好的稳定性，因为在20小时以上的连续水解后其酶活性能保留80%以上。

在本发明的第三个优选具体实施方案中，液体咖啡萃出物是在含有由共价键连接固定在基质上的 $\beta$ -甘露聚糖酶的流化床反应器中进行连续水解的。

下列实例说明本发明的方法。在这些实例中使用了以Gamanase<sup>®</sup>商标销售的 $\beta$ -甘露聚糖酶，这种酶的比活性为65000单位/每克蛋白质，在其中的一些实例中用可溶性咖啡在蒸馏水中的2%混合物或从角豆树胶中制取的半乳甘露聚糖溶液作为标准基质，这很好地说明了由咖啡萃出物所得到的结果。

在列举这些实例之前先说明一下萃出物的色谱分析及附图。

#### 高效薄层色谱法（HPTLC）

液体咖啡萃出物中存在的寡糖可用色谱法进行定性和定量测定，而无需将该萃出物进行初步纯化。因此这种方法可用于各种不同的测试中，例如半乳甘露聚糖水解释的酶动力学研究和水解后咖啡萃出物中残留酶活性的测定等。

为此，在HPTLC色谱中使用了硅胶片“硅胶60”（Merck 5631

5641)。沉积出80微克当量的干咖啡萃出物，用由比例为30/35/11的氯仿、乙酸和水组成的溶剂进行三次连续显色。用由4ml苯胺、4克二苯胺、200ml丙酮和30ml 85%磷酸组成的药剂使该硅胶片在110℃暴露30分钟。

然后就可以定性测定萃出物中所存在的寡糖，例如游离的甘露糖、二聚甘露糖、棉糖和聚合度低于8的其它甘露糖类。

通过比较硅胶片上相应于萃出物中寡糖的色斑和以已知浓度沉积在硅胶片上相应于这种寡糖的色斑的密度，也可以测定萃出物中各种寡糖的含量。当萃出物中只剩下二聚甘露糖和棉糖时就可以认为半乳甘露聚糖达到100%的水解，因为上述两种甘露糖是酶无法再将其分解的最终反应产物。

附图说明：

图1(1a和1b)：说明半乳甘露聚糖在装有固定在Duolite® S-761上的β-甘露聚糖酶的固定床反应器中的水解情况。图1a说明水解百分率与停留时间的关系，图1b说明酶的相对活性与时间的关系。

图2(2a和2b)：说明半乳甘露聚糖在装有固定在二氧化硅珠上的β-甘露聚糖酶的固定床反应器中的水解情况。图2a说明水解百分率与停留时间的关系，图2b说明酶的相对活性与时间的关系。

图3(3a和3b)：说明半乳甘露聚糖在装有固定在Eupergit-C®上的β-甘露聚糖酶的固定床反应器中的水解情况。图3a说明水解百分率与停留时间的关系，图3b说明酶的相对活性与时间的关系。

图4说明咖啡萃出物在流动床中被固定在Eupergit-C®上的β

—甘露聚糖酶水解的情况。图中曲线说明水解百分率与标准化停留时间的关系。

图 5 说明咖啡萃出物在搅拌槽罐中被固定在 Eupergit-C<sup>®</sup> 上的  $\beta$ -甘露聚糖酶水解的情况。图中曲线说明所产生的甘露糖类的百分率与水解循环次数的关系。

#### 实例 1

按下述方法通过吸附和聚合将  $\beta$ -甘露聚糖酶固定在酚醛聚合物中。

使用孔径约 60 毫微米的树脂 Duolite<sup>®</sup> S-761 (美国 Supelco 公司)。将该树脂过筛, 得到 0.2-0.4 毫米的颗粒, 用 0.5N NaOH 处理 1 小时, 然后水洗, 再用 0.25N HCl 处理 30 分钟, 最后用蒸馏水洗涤至 pH 4。将 25 ml 由 5 ml Gamanase<sup>®</sup> 和 20 ml 0.1M pH=6 的磷酸钠缓冲液组成的溶液加入到 5 克上述经处理过的树脂中, 在徐徐搅拌下于 22<sup>°</sup>C 让 Gamanase<sup>®</sup> 吸附在该树脂上达 12 小时之久。然后用蒸馏水洗涤该制剂, 所吸附的酶用 2.5% 的戊二醛溶液在 22<sup>°</sup>C 聚合 3 小时, 然后用蒸馏水最后洗涤该制剂。

另外, 将 3 克角豆树胶加入到 1 升 0.1M pH 为 5 的乙酸盐缓冲液中并加热至 80<sup>°</sup>C, 由此制得半乳甘露聚糖溶液, 其中可溶部分用于进行下述测试。

于是可以在普通的固定床反应器中测定固定化的酶。该反应器包括一个管状玻璃壳体和两个尼龙过滤器 (70 微米), 保持壳体各端的水平表面。将该反应器浸没在 30<sup>°</sup>C 的水浴中, 用普通蠕动泵将半乳甘露聚糖溶液泵入该反应器中, 在通过该反应器之前先加热至 30<sup>°</sup>C。

在第一种情况下，半乳甘露聚糖溶液以各种不同速度泵入反应器中。然后用习用方法测定洗脱液中还原糖的量随萃出物在反应器中的停留时间（RT）不同而变化的情况。然后测定半乳甘露聚糖的水解百分率与萃出物在反应器中的停留时间的函数关系。可以认为，当所生成的还原糖的量等于用未固定的Gamanase<sup>®</sup>进行单独试验使基质全部水解时所得到的还原糖的量时，就算达到了100%的水解率。结果示于图1 a中。

在第二种情况下，半乳甘露聚糖溶液被迫连续通入到反应器中，为此目的选定一个能提供在实验开始时水解率小于100%的停留时间（RT）。然后定期测定洗脱液中还原糖的量。可以看出，该量随时间而减少，可能是由于酶活性的损失。正是由于这个原因，可以通过比较所得到的还原糖的量与实验开始时所存在的还原糖量来测定酶的相对活性（%）与时间的函数关系。结果示于图1 b。

下表说明基质的一些特性。

固定在Duolite <sup>®</sup> S-761上的Gamanase <sup>®</sup>	
温度（℃）	30
床层高度（毫米）	19
床体积（毫升）	2.15
蛋白质（毫克/每克基质）	37.2

## 实例 2

通过共价键连接使  $\beta$ -甘露聚糖酶固定在直径为 0.1-0.3 毫米，孔径约 60 毫微米的二氧化硅珠 X-030 LS (Sepracor, 法国) 上，方法如下。

用 H. H. Weetall 在 "Method of Silanisation in an aqueous medium" (Methods in Enz., 44 135 - 148, 1976) 中所公开的方法先使二氧化硅珠与  $\gamma$ -氨基丙基三乙氧基硅烷偶联。5 克二氧化硅珠用 50 ml 2.5% 戊二醛在 0.1M pH = 7 的磷酸钠缓冲液中的溶液在真空下处理 1 小时，接着在常压下处理 2 小时。然后依次用蒸馏水、0.5M NaCl 溶液和 0.1M pH = 6 的磷酸钠缓冲液洗涤上述处理过的颗粒。然后在活化基质中加入 2.5 ml 含有 5 ml Gamanase<sup>®</sup> 和 20 ml pH = 6 的磷酸钠缓冲液的溶液，然后在 4 °C 令其在氨气氛中反应 12 小时。最后依次用蒸馏水和 0.1M pH = 6 的磷酸钠缓冲液充分洗涤这些硅胶珠。

然后按实例 1 的相同方法在固定床反应器中测试上述制剂。于是测得了半乳甘露聚糖的水解百分率与基质在反应器中的停留时间的函数关系 (图 2 a)，以及酶的相对活性与时间的函数关系 (图 2 b)。

下表说明所用基质的一些特性。

固定在二氧化硅珠 X-030 L S 上的Gamanase <sup>®</sup>	
温度 (°C)	30
床层高度 (毫米)	20
床体积 (毫升)	2.26
蛋白质 (毫克/每克基质)	34.4

### 实例 3

通过共价键连接使  $\beta$ -甘露聚糖酶固定在含有反应性环氧乙烷基团、孔径为约 3.5 毫微米的 Eupergit-C<sup>®</sup> 丙烯酸类聚合物珠上 (德国, Röhm), 其方法如下。

将 37.5ml 由 7.5ml Gamanase<sup>®</sup> 和 30ml 0.5M pH = 7 的磷酸钾缓冲溶液组成的溶液加入到 5 克 Eupergit-C<sup>®</sup> 中, 在轻轻搅拌下令其在室温下反应 48 小时。然后用 pH = 7 的 0.5M 磷酸钾缓冲溶液洗涤所得制剂。

再按实例 1 所述的相同方法在固定床反应器中对该制剂进行测试。于是可测定半乳甘露聚糖的水解百分率与该基质在反应器中的停留时间的函数关系 (图 3a) 以及酶的相对活性与时间的函数关系 (图 3b) 可以看出, 在该基质上酶的稳定性特别好, 因为经 16 小时连续水解

后该固定化 $\beta$ -甘露聚糖酶能保持其酶活性80%以上。

还可以看出，在整个过程中在洗脱液中没有发现这种酶从基质上盐析出来。当将该洗脱液在30℃保温数小时并测定还原糖含量变化时，未发现有任何改变。

下表说明所用基质的一些特性。

固定在Eupergit-C <sup>®</sup> 上的Gamanase <sup>®</sup>	
温度(℃)	30
床层高度(毫米)	24
床体积(毫升)	2.74
蛋白质(毫克/每克基质)	31.4

#### 实例4

通过共价键连接将酶固定在5克具有约70毫微米 确定孔径并含有氨基基团的普通玻璃颗粒(Sigma G5019)上，固定方法与实例2中固定硅胶珠的方法相同。

按实例1所述方法，用普通可溶性咖啡萃出物(Nescafé<sup>®</sup>，雀巢公司)的2%蒸馏水溶液在固定床反应器中测试上述制剂。

改变咖啡萃出物的流量，并用HPTLC法分析从反应器流出的萃出物。可以看出，停留时间为6.4秒和8.1秒时反应产物大部分是二聚

甘露糖和栲糖。并仍然可见到含有 5 聚和 6 聚甘露糖的痕量低聚物。当停留时间增加到 105 秒时，萃出物中所存在的仅有的低聚糖是二聚甘露糖和栲糖，这说明半乳甘露聚糖已完全水解。

下表说明所用基质的特性。

固定在具有确定孔隙的玻璃上的Gamanase®	
温度 (°C)	30
床层高度 (毫米)	15
床体积 (毫升)	1.69
蛋白质 (毫克 / 每克基质)	32.2

#### 实例 5

从 EP 专利 0 538 512 所述的经研磨烘烤后的咖啡的分裂提取法的加压段得到的液体咖啡萃出物用来连续供入保持在 50 °C 的实例 1 中所述的固定床反应器。

该反应器装有按实例 3 所述方法固定在 Eupergit - C® 上的 Gamanase®。控制流量使停留时间为 8 分钟。在 48 小时内定期取样，用 HPTLC 法测定所产生的寡糖。

分析结果表明萃出物中的半乳甘露聚糖达到完全水解，因为经处理后的萃出物中仅有的寡糖是二聚甘露糖和栲糖。

### 实例 6

用实例 5 中所述的咖啡萃出物在含有固定在Eupergit-C® 上的Gamanase® 流化床的普通立式柱中进行若干次水解试验。

基质中每克含有28.6毫克蛋白质，该蛋白质用类似于实例 3 中所述方法固定。试验在 65 °C 进行。

用上述色谱法测定每次试验的洗脱液中所含的二聚甘露糖的量。于是测得半乳甘露聚糖的水解百分率与该萃出物在反应器中的标准停留时间（分钟×蛋白质的毫克数/毫升）的函数关系。图 4 说明了这些试验的结果。

各次试验的实验条件及所得结果列于下表。

试验序号	Eupergit-C® 的量(克/秒)	流量 (毫升/小时)	标准停留时间 分·毫克/毫升	水解百分 率(%)
1	1.31	1148	1.96	27.3
2	1.31	575	3.91	42.7
3	3.94	1180	5.73	54.7
4	3.94	585	11.6	85.5
5	3.94	150	45.1	100

### 实例 7

用实例 5 中所述的萃出物在含有固定在 Eupergit-C<sup>®</sup> 上的 Gamanase<sup>®</sup> 悬浮液的槽罐式搅拌反应器中进行大约 500 次连续水解试验。

在 5 克 Eupergit-C<sup>®</sup> 中加入 37.5ml 由 7.5ml Gamanase<sup>®</sup> 和 30ml 1.25M pH = 7 的磷酸钾缓冲液组成的溶液，使酶固定。在轻轻搅拌下令其在室温下反应 72 小时。

各次水解相当于 30 分钟的循环，在此期间头两分钟用泵将萃出物引入到槽罐中，在搅拌下让该萃出物反应 26 分钟，在最后 2 分钟用泵从槽罐底部抽吸经水解的萃出物。用安装在槽罐底部的过滤器（40 微米）截留固定化酶，该槽罐恒温控制在 60℃，用上述 HPTLC 色谱法分析各次洗脱液。然后测定对应于二聚甘露糖和棉糖色斑的密度。

图 5 说明所产生的二聚甘露糖和棉糖的相对量与水解循环次数的函数关系。可以看出酶损失其酶活性的速度特别慢，因为咖啡萃出物经过 500 次连续水解循环后，固定化  $\beta$ -甘露聚糖酶能保留 60% 以上的酶活性。

下表列出了实验条件。

固定在Eupergit-C <sup>®</sup> 上的Gamanase <sup>®</sup> 在搅拌槽罐中的连续水解	
温度 (°C)	60
处理的体积 (毫升)	38
循环时间 (分钟)	30
蛋白质 (毫克/每克基质)	47.3
湿固定化酶 (毫克)	400

# 说明书附图

图 1

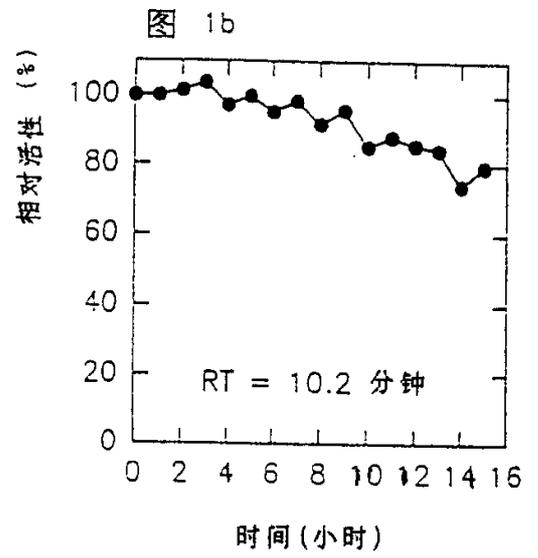
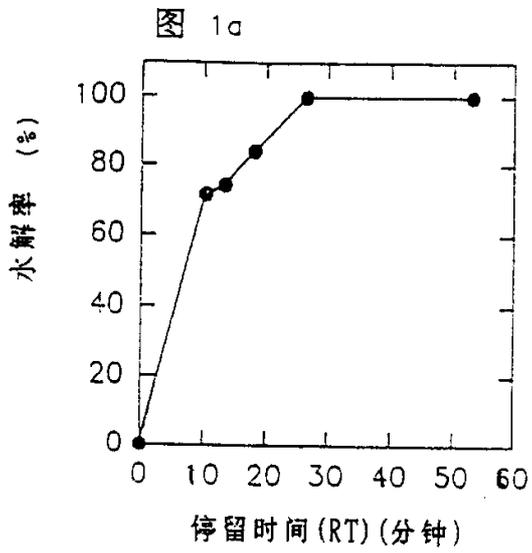


图 2

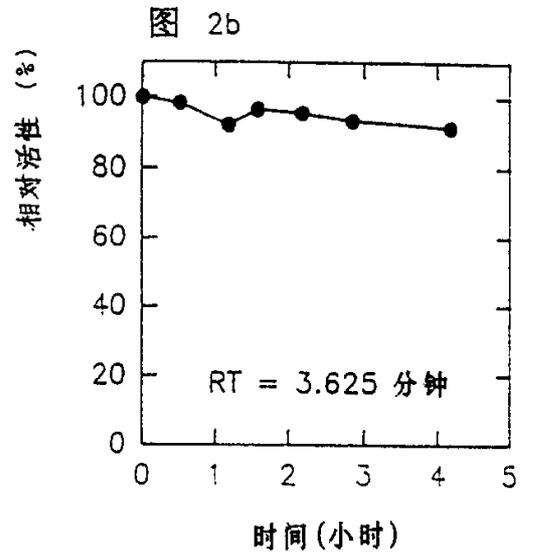
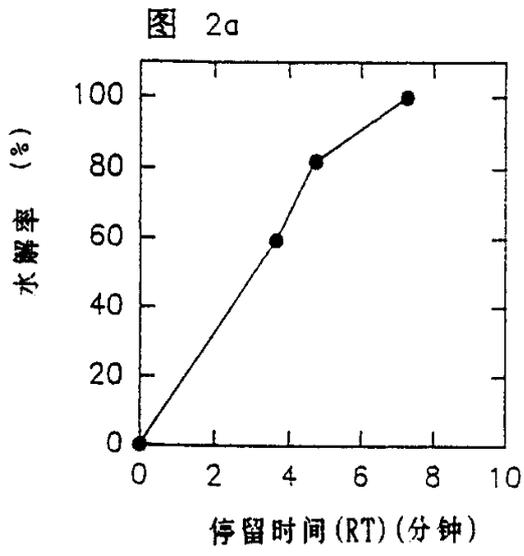


图 3

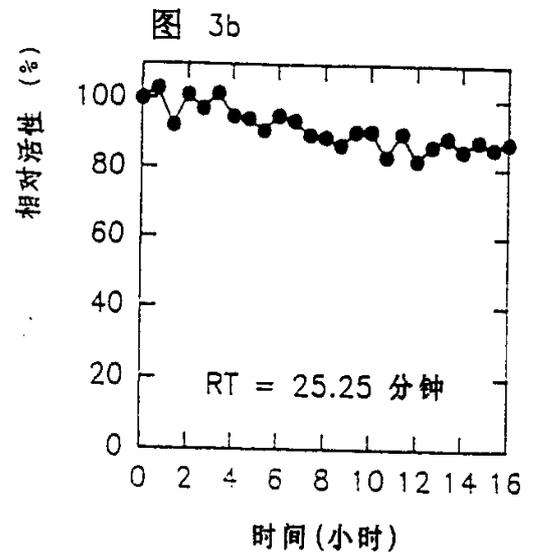
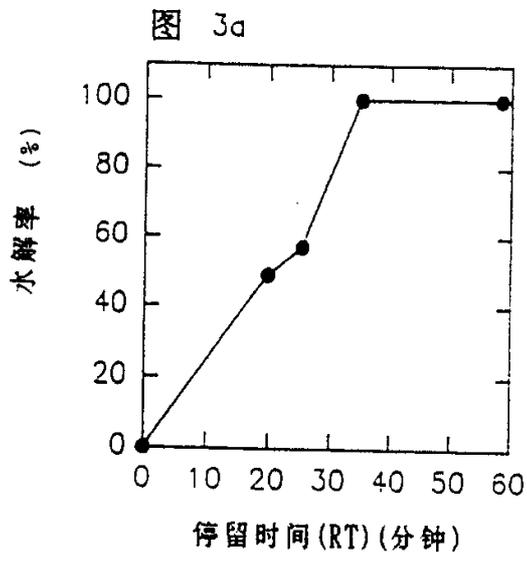


图 4

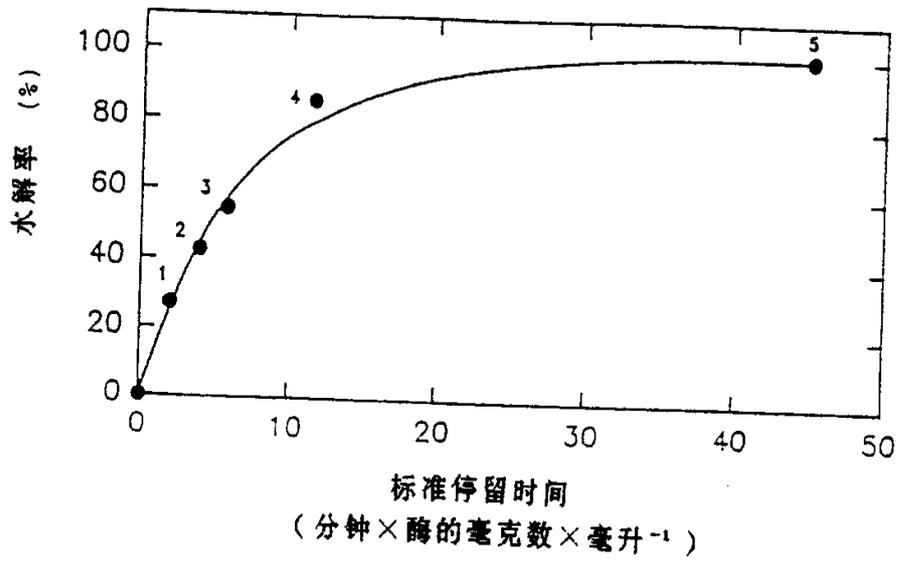


图 5

