

# 固定化嗜热脂肪芽孢杆菌连续合成半乳糖寡糖的研究

魏东芝 王筱兰 陈少欣 俞俊棠

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 生物化学研究所 上海 200237)

**摘 要** 利用固定了产  $\beta$ -半乳糖苷酶的嗜热脂肪芽孢杆菌,以乳糖为底物,在纤维床反应器中连续合成半乳糖寡糖(GOS),最高得率为 50.7%。在连续反应体系中,研究了底物浓度、pH、反应温度和停留时间对半乳糖寡糖合成的影响,确定最佳反应条件为底物浓度 450 g/L、反应温度 55℃、pH7.0、停留时间 100 min。在连续反应 24 h 后,流加 1.5% 的 D-半乳糖能提高合成 GOS 的能力,固定化细胞反应体系中连续稳定操作 120 h。

**关键词** 半乳糖寡糖,  $\beta$ -半乳糖苷酶,固定化细胞,纤维床反应器

中图分类号 Q556.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0392-04

$\beta$ -半乳糖苷酶不仅能将乳糖水解为半乳糖和葡萄糖而且能催化转糖苷反应合成半乳糖寡糖(Galactooligosaccharide, GOS)<sup>[1,2]</sup>,GOS 是一种双歧因子,能促进肠道内双歧杆菌增殖<sup>[3,4]</sup>,对人类的健康有许多益处,渐渐成为营养学研究方面的热点。由于  $\beta$ -半乳糖苷酶价格较贵,转糖苷活力较低,导致 GOS 生产成本高,从而限制了 GOS 在保健食品和医药领域的广泛应用。虽然国外文献报道了多种  $\beta$ -半乳糖苷酶都具有转糖苷活力,但合成 GOS 的产率都很低<sup>[5-7]</sup>。Kam T. 等就 GOS 生产工艺发表专利<sup>[8]</sup>,其最高产率只有 31%。现迫切需要研究一种高效、低消耗生产 GOS 的方法。

本文利用固定化细胞在纤维床反应器中连续合成 GOS,通过反应条件优化,力求提高 GOS 合成的产率,以降低其生产费用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*),实验室保藏;乳糖、乙腈、其他试剂都为 A.R.。

HPLC 色谱仪,型号 Waters model 510, Waters 公司制造。

### 1.2 方法

**1.2.1 嗜热脂肪芽孢杆菌的培养:**取斜面孢子接种种子培养基,在 55℃ 通气培养 20 h,以 10% 的接种量接种发酵培养基,55℃ 培养 24 h,得到的菌液

用于细胞的固定化。

**1.2.2 固定化细胞制备:**取一块长 60 m,宽 30 cm 的纤维绕轴卷成圆柱状装入一带夹套的玻璃反应器中,夹套中用 55℃ 恒温水循环。采用恒流泵把 250 mL 嗜热脂肪芽孢杆菌菌液循环 12 h,依靠微生物自身分泌的粘附素及纤维的拦截作用把细胞固定在纤维床上。再用 300 mL 发酵培养基循环 12 h,使微生物细胞增殖。

**1.2.3 固定化细胞的酶活力测定:**取 1 cm<sup>2</sup> 含固定化细胞的纤维,加 2 滴甲苯,振荡 15 min,加入 5 mL pH6.8 的缓冲液和 0.5 g 的乳糖,55℃ 水浴振荡 15 min,用葡萄糖试剂盒测定反应液中葡萄糖的量,以每分钟产生 1  $\mu$ mol 的葡萄糖为 1 单位酶活。

**1.2.4 半乳糖寡糖的连续合成:**在固定化细胞纤维床反应器中,夹套中用 50℃ 恒温水循环,450 g/L 的乳糖溶液(pH7.0 的磷酸缓冲液配制)用恒流泵连续泵入填充柱,定时取样 HPLC 分析。

**1.2.5 糖的分析:**单糖、双糖和寡糖都采用 HPLC 分析。层析柱:Lichosorb RP18(25 cm  $\times$  15 cm)。色谱条件为:流动相乙腈:H<sub>2</sub>O = 65:35(V/V),流速为 1.2 mL/min,测定温度为 25℃,进样量为 10  $\mu$ L。

## 2 结果与讨论

**2.1 游离酶与固定化细胞合成 GOS 反应历程比较:**由图 1 可看出,固定化细胞合成 GOS 的能力和稳定性都高于游离酶。由于游离酶暴露于溶液中,直接受搅拌剪切力的影响,酶易失活,合成 GOS 的

能力随着反应时间延长而下降。而固定化细胞受载体的保护和屏蔽,合成 GOS 的能力和稳定性都比游离酶好。

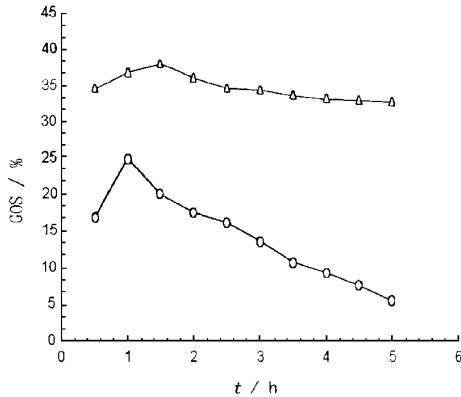


图 1 合成 GOS 的反应历程

Fig. 1 Reaction course of GOS synthesis

○—Free enzyme; △—Immobilized cell

## 2.2 连续合成 GOS 反应条件的优化

**2.2.1 底物浓度对半乳糖寡糖合成的影响:**  $\beta$ -半乳糖苷酶能把乳糖水解为半乳糖和葡萄糖,同时具有转糖苷活性,又能把半乳糖苷转移到乳糖上形成半乳糖寡糖。 $\beta$ -半乳糖苷酶水解乳糖的动力学模型符合有产物抑制的米氏方程,水解反应受乳糖水解产物-半乳糖的抑制。当底物浓度较低时,水解产物半乳糖浓度较低,其对水解反应的抑制作用较小,此时酶表现出水解活力较高,而转糖苷活力较低,因此产物中单糖含量较高。当乳糖浓度较高时,水解产物半乳糖浓度较高,当其达到一定值就对水解酶活

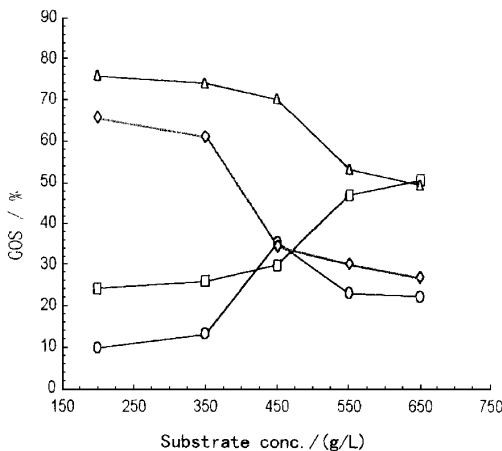


图 2 底物浓度对 GOS 合成的影响

Fig. 2 Effect of initial substrate concentration on GOS synthesis

○—GOS; □—Disaccharide;  
◇—Monosaccharides; △—Lactose conversion

产生抑制作用。半乳糖是转糖苷的底物,浓度高有利于半乳糖寡糖的合成,因此底物浓度较高时,产物中寡糖含量较高。由图 2 可见,起始底物浓度低时,产物中的单糖含量很高,说明在此条件下,对水解有利,对合成不利;底物浓度的增高可促进寡糖合成。乳糖浓度在 450 g/L 以下时,随着底物浓度增大,寡糖的浓度有显著增加,但底物浓度大于 450 g/L 时,糖液很粘稠,影响了传质,从而不利于底物传递到固定细胞内部而影响寡糖的合成。

**2.2.2 反应温度对半乳糖寡糖合成的影响:** 试验结果见图 3,由图 3 可看出,温度在 55℃ 以下时,酶的水解能力强,单糖的浓度较高。这可能是由于水解反应的活化能较低,而转糖苷反应的活化能较高,温度稍高有利于寡糖的合成。温度大于 55℃ 时,由于固定化细胞中的酶易失活,乳糖的转化率较低,无论是对水解还是对合成都不利。55℃ 为半乳糖寡糖合成的最适温度。

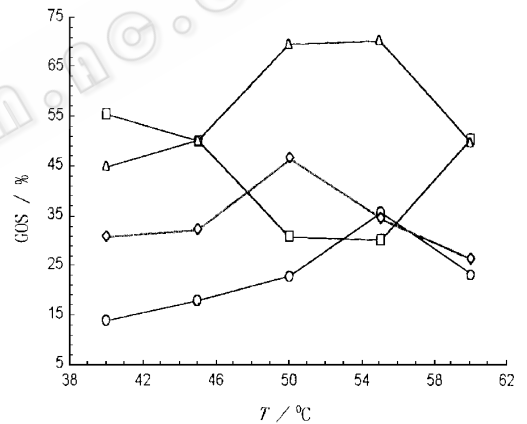


图 3 反应温度为 GOS 合成的影响

Fig. 3 Effect of reaction temperature on synthesis of GOS

○—GOS; ◇—Monosaccharides; □—Disaccharide;  
△—Lactose conversion

**2.2.3 pH 对半乳糖寡糖合成的影响:** 试验结果见图 4,由图 4 得知,在 pH 低于 6.0 时,乳糖转化率较低,固定化细胞的水解活力和转糖苷活力都较低。pH 在 6.0~7.0 之间,固定化细胞转糖苷作用较强;pH 大于 7.0 时,对寡糖的合成不利。因此 pH 为 7.0 时,最有利于寡糖的合成。

**2.2.4 停留时间对半乳糖寡糖合成的影响:** 连续反应的停留时间直接影响半乳糖寡糖的合成,底物从溶液到细胞内部和产物从细胞内到溶液中都涉及传质过程。停留时间太短,不利于底物向反应场所的充分扩散和利用,转糖苷反应未达到平衡,GOS 的合成量未达到最大值。停留时间太长,不利于产

物及时传递而离开反应场所，GOS 会被水解为双糖和单糖。根据实验结果图 5 得到 100 min 为连续合成 GOS 的最佳停留时间。

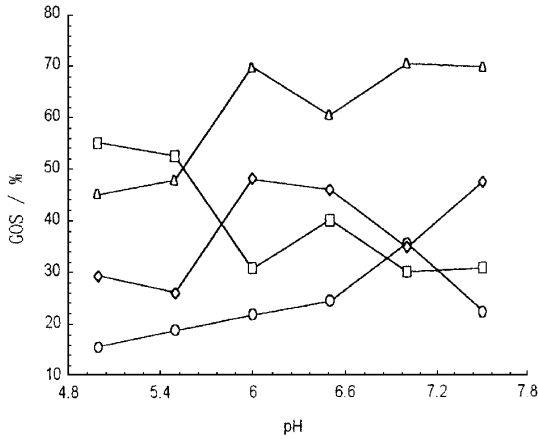


图 4 pH 对 GOS 合成的影响

Fig. 4 Effect of pH on synthesis of GOS

○—GOS ;◇—Monosaccharides □—Disaccharide  
△—Lactose conversion

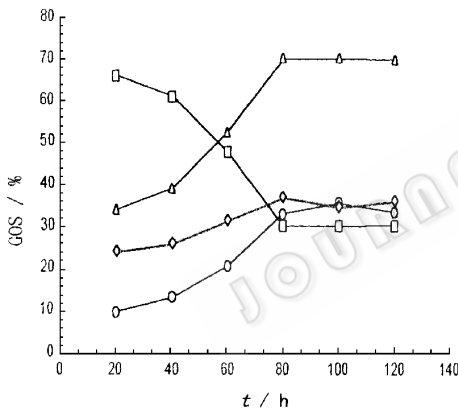


图 5 停留时间对 GOS 合成的影响

Fig. 5 Effect of retention time on reaction

○—GOS □—disaccharide ;  
◇—monosaccharides ;△—Lactose conversion

由以上实验确定了固定化细胞在纤维床反应器中连续合成半乳糖寡糖的最佳反应条件为：底物浓度为 450 g/L，温度为 55℃，pH 为 7.0，停留时间为 100 min。最高半乳糖寡糖浓度为 162.0 g/L，用钠

型阳离子树脂使部分单糖和双糖吸附，寡糖浓度可浓缩到 350 g/L 以上，得到的产品为粘稠的糖浆能直接作保健食品的添加剂。

### 2.3 在纤维床反应器中连续合成 GOS 的稳定性

利用固定化的产 β-半乳糖苷酶的嗜热脂肪芽孢杆菌在纤维床反应器中连续操作过程中(实验结果见图 6)，GOS 合成能力的下降有以下两方面的原因：一方面由于固定在纤维床上的细胞部分脱落，使酶活降低；另一方面是由于产物在固定化细胞内部积累到一定的浓度后，造成产物抑制，使反应平衡向着寡糖水解方向移动，从而造成 GOS 合成能力的下降。在操作 72 h 时改变反应的停留时间，使停留时间由原来的 100 min 延长到 110 min，可提高流出液中 GOS 的浓度。在连续反应 24 h 后流加 1.5% D-半乳糖能大大促进 GOS 的合成，使 GOS 的产率从 36.8% 提高到 50.7%。由于 β-半乳糖苷酶水解反应是受 D-半乳糖竞争性抑制，D-半乳糖能使反应平衡朝着转半乳糖苷方向移动，有利于 GOS 的合成。固定化细胞能较稳定地操作 120 h，GOS 的最高得率为 50.7%。

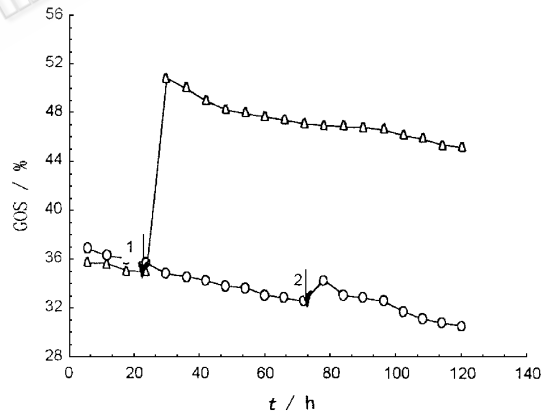


图 6 连续合成 GOS 的反应历程

Fig. 6 The time courses of continuous GOS synthesis

Arrow 1 ↓ indicated the time when D-galactose was fed, Arrow 2 ↓ indicated the time when retention time was changed  
△—Fed-galactose ; ○—No fed-galactose

### 参 考 文 献

[ 1 ] Prenosil J E, Stuker E, Bourne J R. *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, **30**: 1019~1025  
 [ 2 ] Prenosil J E, Stuker E, Bourne J R. *Biotechnology and Biotengineering*, 1987, **30**: 1026~1031  
 [ 3 ] Toba Takahiro, Yokota Akitsugu, Adachi Susumu. *Food Chem*, 1985, **16**: 147~162  
 [ 4 ] Ohtsuka K, Benno Y, Endo K et al. *Bifidus*, 1989, **2**: 143~149  
 [ 5 ] Minami Y, Yazawa Y, Tamura Z et al. *Chem Pharm Bull*, 1983, **31**: 1688-1691  
 中国生物工程研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 6 ] Huber R E ,Wallenfels K. *Biochemistry* ,1976 ,**15** :14~20
- [ 7 ] Burvall A ,Asp N G, Schleifer K H. *Food Chem* ,1979 **4** 243~250
- [ 8 ] Kan T ,Kobayashi Y. US Patent 4957860

## Study on Continuous Synthesis of Galacto-oligosaccharide by Immobilized *Bacillus stearothermophilus*

WEI Dong-Zhi WANG Xiao-Lan CHEN Shao-Xin YU Jun-Tang  
( State Key Laboratory of Bioreactor Engineering ,Research Institute of Biochemistry ,East  
China University of Science & Technology ,Shanghai 200237 )

**Abstract** The galacto-oligosaccharide was synthesized continuously by immobilized *Bacillus stearothermophilu* producing  $\beta$ -galactosidase in fibrous bed reactor. The effect of substrate concentration ,pH ,reaction temperature and retention time on production of GOS was investigated. The optimal reaction conditions were determined. Substrate concentration were 450 g/L ;Reaction temperature was 55°C ;pH was 7. 0 ;Residence time was 100 min. The product yield reached up to 50. 7% . GOS synthesis was promoted by feeding 1. 5% D-galactose after 24h. The immobilized cell reactor can work stably for 120h.

**Key words** Galacto-oligosaccharide ,*Bacillus stearothermophilus*  $\beta$ -galactosidase ,immobilized cell ,fibrous bed bioreactor