

嗜热脂肪芽孢杆菌 β -半乳糖苷酶合成低聚半乳糖动力学模型

陈少欣 魏东芝* 胡振华 王筱兰 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 根据反应机理和产物的化学结构,建立了嗜热脂肪芽孢来源的 β -半乳糖苷酶催化乳糖水解和转半乳糖苷反应偶合的动力学模型,模型中包含了低聚三糖和低聚四糖的生成。通过优化计算,估算反应动力学参数,结果表明该模型能较好地与实验结果相吻合。

关键词 β -半乳糖苷酶,低聚半乳糖,动力学模型

中图分类号 TQ925.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0735-05

低聚半乳糖(GOS)是一种有助于人体健康的功能性食品,目前已受到广泛的重视。研究表明,GOS是人类肠道双歧杆菌的促进因子,它能促进双歧杆菌的生长,从而改善肠道的微生态平衡^[1,2]。同时GOS还有许多生理功能^[3]。GOS的生产主要有化学法^[4]和酶法两种,由于化学法合成糖的步骤繁琐,且得率不高,目前的研究主要是利用酶法生产GOS。

β -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.32)能够催化乳糖水解和转糖苷反应生成GOS。乳糖浓度较低时,水解反应占优势,随着乳糖浓度增加,GOS的产率也增大。一般GOS的产率仅为25%~45%^[5],因此有必要从反应动力学角度来优化GOS合成。由于乳糖水解和低聚糖合成同时发生,这使得整个酶催化反应动力学变得十分复杂。文献对仅有乳糖水解的反应动力学研究较多,很少有关于水解和转糖苷反应并存的动力学模型。Andrew P Bakken等人^[6]和Boon M A等人^[7]分别提出包含有三糖生成的反应动力学模型,但这种模型也只适用于低乳糖浓度的反应,这时转糖苷反应的产物主要是三糖,但在高浓度乳糖情况下,转糖苷反应产物还包含有四糖等更高聚合度的糖。本文利用嗜热脂肪芽孢杆菌来源的 β -半乳糖苷酶水解乳糖,研究水解反应和转糖苷反应偶合的反应动力学模型,为优化GOS合成提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

β -半乳糖苷酶(来源于嗜热脂肪芽孢杆菌,自备),葡萄糖测定试剂盒,卫生部上海生物制品研究所生产,乳糖及其它试剂购于上海化学试剂公司,均为市售化学纯或分析纯。

1.2 方法

1.2.1 乳糖酶促反应 配制浓度50%(W/V)乳糖液(pH7.0磷酸盐缓冲液)20 mL,加入 β -半乳糖苷酶,置于带夹套反应罐内,反应温度55℃。间歇取样0.3 mL,经沸水浴加热15 min,离心,取上清液用高效液相色谱分析产物成分和浓度。

1.2.2 核磁共振谱鉴定低聚半乳糖四糖的结构 反应产物经过活性碳柱层析获得低聚半乳糖三糖和四糖纯品,利用核磁共振鉴定四糖的化学结构。在60℃用AVANCE 500光谱检测器检测¹H,¹³C,H-H cosy和C-H cosy光谱。¹H-NMR在400 Hz,¹³C-NMR在200 Hz,H-H cosy,C-H cosy分别在500 Hz测定。光谱测定的糖溶液用重水配制成2%的溶液。化学位移测定用丙酮作为内标物。

1.2.3 糖的测定 用高效液相色谱法,系统为Shimadzu HPLC,Shimadzu RID 10A示差检测器,Lichrosorb PR18层析柱,移动相为乙腈:水=70:30(V/V),进样量10 μ L。单糖峰(含有葡萄糖和半乳糖)中葡萄糖的含量由葡萄糖试剂盒测定。

2 结果与讨论

2.1 低聚半乳糖合成机理

β -半乳糖苷酶具有催化乳糖水解和转糖苷两种功能,在它的活性中心有两个官能基团,咪唑基和硫

基。Wallentelst 和 Malhotra 提出半乳糖苷酶水解和转糖苷的反应机理,见图 1^[8]。首先是酶与乳糖作用释放一分子葡萄糖,同时形成酶-半乳糖苷复合物(E-Gal)然后 E-Gal 转移半乳糖苷给水分子或其它含有-OH 基团的受体。当糖基受体为水时,即为水解反应;如果糖基受体为糖时则为转糖苷反应,例如受体是半乳糖、乳糖时,则转糖苷产物分别为半乳糖-半乳糖二糖和半乳糖-半乳糖-葡萄糖三糖。由于在乳糖水解反应过程中,反应体系有葡萄糖、半乳糖、乳糖、三糖、四糖等存在,如果在动力学模型中考虑每一步可能发生的反应,则整个反应网络将十分的复杂。Stuker 根据催化机理提出一个描述水解与转糖苷动力学模型,转糖苷产物是以 1,6 或 1,4 糖苷键连接的半乳糖三糖,Toba 更进一步,考虑有 1,3 糖苷键连接的半乳糖三糖生成的反应动力学模型^[8]。由于这些模型非常复杂,不可能建立其反应速率方程。

2.2 动力学模型

乳糖水解反应产物 HPLC 图谱见图 2,从图可知,产物中主要含有单糖(葡萄糖和半乳糖)、乳糖、低聚半乳糖三糖(GOS-3)、低聚半乳糖四糖(GOS-4)。图 3 是 β-半乳糖苷酶水解 50%乳糖的实验结果,图中是各种糖浓度随时间的变化情况。随着反应时间延长,乳糖浓度逐渐减少,单糖和 GOS 的浓度增加,当乳糖水解率为 70%~75%左右,GOS 得率最大,进一步反应会使 GOS 发生水解。另外,反应液中半乳糖浓度比葡萄糖浓度低,说明有更多的半乳糖被转移到产物上。

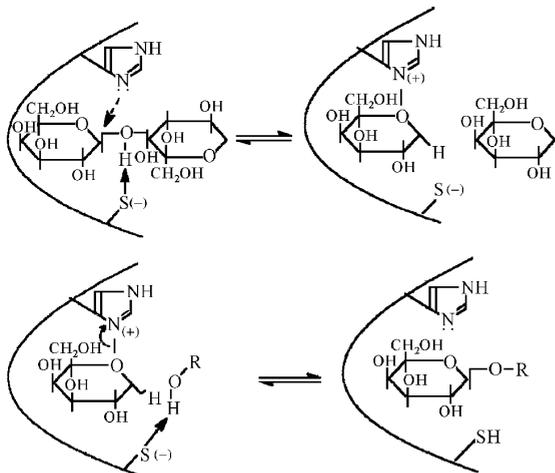


图 1 β-半乳糖苷酶催化反应机理

Fig. 1 Proposed mechanism of enzymatic reaction by β-galactosidase

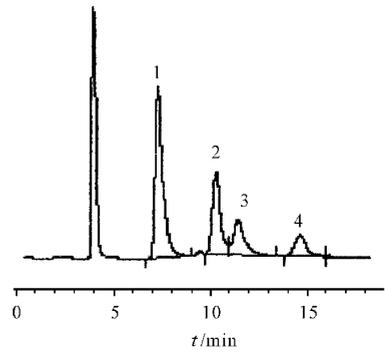


图 2 典型反应产物 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of a typical product.

- 1. Glucose and galactose
- 2. Lactose ;
- 3. Trisaccharide
- 4. Tetrasaccharide

通过活性碳柱层析对产物进行分离纯化,得到 GOS-4 纯品,利用核磁共振鉴定它的化学结构,结果为 β-D-Gal(1→3)-D-Gal(1→6)-D-Gal(1→4)-D-Glu。虽然未鉴定 GOS-3 的结构,但从反应机理可推断出三糖组成为 Gal-Gal-Glu,这些结果与文献报道的低聚半乳糖化学结构一致^[5]。从 GOS-3、GOS-4 结构可知,它们都含有一个乳糖基(-Gal-Glu)。因此假设 GOS-3 是由半乳糖与乳糖通过转糖苷反应生成的,然后半乳糖与 GOS-3 聚合生成 GOS-4。据此,提出酶促乳糖水解和低聚半乳糖生成的反应动力学模型,见图 4。为了减少动力学方程的参数,反应动力学模型假设 EC→E 是不可逆反应,这是根据 Tikhomirova 的实验发现得出的^[6]。由于反应中水浓度视为恒定,把它归入 k₀(k₀=k'₀*[H₂O])。

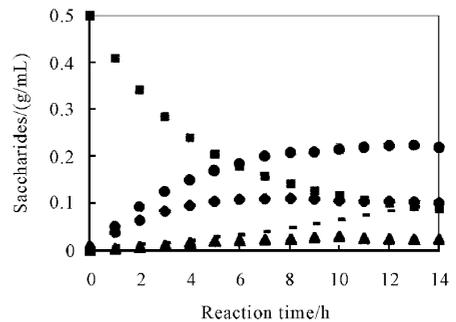


图 3 低聚半乳糖合成实验结果

Fig. 3 Time course of GOS production by β-galactosidase.

500 mg of lactose per mL and 0.1 mol/L potassium phosphate buffer (pH7.0) in a total volume of 50 mL was incubated at 55°C

- Lactose ● Glucose - Galactose
- ◆ Trisaccharide ▲ Tetrasaccharide

2.3 动力学方程及模型的参数估算

根据图 4 可写出各种糖的反应速率方程式, 见方程 (1)~(5)。

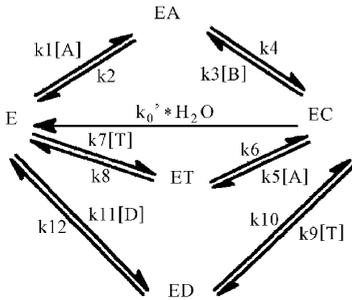


图 4 反应动力学模型

Fig. 4 Model of the hydrolysis with trisaccharide and tetrasaccharides formation by β -galactosidase.

A. Lactose ; B. Glucose ; C. Galactose ;
T. Trisaccharide ; D. Tetrasaccharide

$$r_A = dA/dt =$$

$$-k_1[E][A] + k_2[EA] - k_3[A][EC] + k_4[ET] \quad (1)$$

$$r_B = dB/dt = k_4[EA] - k_3[EC][B] \quad (2)$$

$$r_C = dC/dt = k_3[E][C] \quad (3)$$

$$r_T = dT/dt = -k_7[E][T] + k_8[ET] + k_{10}[ED] - k_9[EC][T] \quad (4)$$

$$r_D = dD/dt = -k_{11}[E][D] + k_{12}[ED] \quad (5)$$

因为动力学模型中有 5 个中间络合物, 直接用代数法推导速率方程十分复杂。为了简化推导过程, 采用 King-altman 图解法, 将反应写成循环形式。写出每种酶存在形式的浓度和总酶浓度的比例, 表示为: 每种酶中间物浓度/总酶浓度 = 若干项的加和/相同的分母, 分子中每一项可以由 King-altman 图形中每一根线所表示的由其他酶形式转变为这种形式的速度常数, 或速度常数与反应物浓度的乘积, 分母为所有分子项的总和。把所得的中间物浓度代入方程 (1)~(5), 可以方便地推导出速率方程式 (6)~(10)。

$$r_A = dA/dt = (-v_A[A] - 2v_{AA}[A]^2 - v_{AT}[A][T] + v_{BT}[B][D] - v_{AT}[A][D] + v_T[T] + v_{TT}[T]^2) \Sigma \quad (6)$$

$$r_B = dB/dt = (v_A[A] + v_{AA}[A]^2 + v_{AT}[A][T] - v_{BT}[B][T] - v_{BT}[B][D]) \Sigma \quad (7)$$

$$r_C = dC/dt = (v_T[T] + v_T[D] + v_A[A]) \Sigma \quad (8)$$

$$r_T = dT/dt = (-v_T[T] - v_{BT}[B][T] + 2v_{AT}[A][D] + v_{AA}[A]^2 + v_{BT}[B][D] - 2v_{TT}[T]^2 - v_{AT}[A][T]) \Sigma \quad (9)$$

$$r_D = dD/dt = (-v_T[D] - v_{AT}[A][D] - v_{BT}[B][D] + v_{TT}[T]^2 + v_{AT}[A][T]) \Sigma \quad (10)$$

式中各个动力学常数定义如下:

$$v_A = (k_0 k_1 k_4 k_6 k_{10} + k_0 k_1 k_4 k_8 k_{10} + k_0 k_1 k_4 k_6 k_{12} + k_0 k_1 k_4 k_8 k_{12}) E_t \quad (E_t \text{ 为酶的浓度})$$

$$v_{AT} = (k_1 k_4 k_6 k_9 k_{12} + k_1 k_4 k_8 k_9 k_{12}) E_t$$

$$v_{AA} = (k_1 k_4 k_5 k_8 k_{12} + k_1 k_4 k_5 k_8 k_{10}) E_t$$

$$v_{BT} = (k_2 k_3 k_6 k_7 k_{12} + k_2 k_3 k_6 k_7 k_{10}) E_t$$

$$v_{BD} = (k_2 k_3 k_6 k_{10} k_{11} + k_2 k_3 k_6 k_{10} k_{11}) E_t$$

$$v_{AD} = (k_{11} k_{10} k_5 k_4 k_8 + k_{11} k_{10} k_5 k_2 k_8) E_t$$

$$v_T = (k_0 k_2 k_6 k_7 k_{10} + k_0 k_4 k_6 k_7 k_{12} + k_0 k_4 k_6 k_7 k_{10} + k_0 k_2 k_6 k_7 k_{12}) E_t$$

$$v_{TT} = (k_4 k_6 k_7 k_9 k_{12} + k_2 k_6 k_7 k_9 k_{12}) E_t$$

$$v_D = (k_0 k_4 k_6 k_{11} k_{10} + k_0 k_4 k_8 k_{10} k_{11} + k_0 k_2 k_6 k_{10} k_{11} + k_0 k_2 k_8 k_{11} k_{10}) E_t$$

$$\Sigma = k + k_T[D] + k_{TT}[T]^2 + k_{AD}[A][D] + k_{TT}[T][D] + k_{AT}[A][T] + k_{BT}[B][D] + k_A[A] + k_{AA}[A]^2 + k_{AB}[A][B] + k_{BT}[B][T] + k_T[T] + k_{AT}[A][T] + k_T[T] + k_T[B]$$

$$k_D = k_0 k_4 k_6 k_{11} + k_0 k_4 k_8 k_{11} + k_0 k_2 k_6 k_{11} + k_0 k_2 k_8 k_{11} + k_4 k_6 k_{10} k_{11} + k_4 k_8 k_{10} k_{11} + k_2 k_6 k_{10} k_{11} + k_2 k_8 k_{10} k_{11};$$

$$k_{TT} = k_4 k_6 k_7 k_9 + k_2 k_6 k_7 k_9 + k_4 k_7 k_9 k_{12} + k_2 k_7 k_9 k_{12};$$

$$k_{AD} = k_2 k_5 k_8 k_{11} + k_4 k_5 k_8 k_{11} + k_4 k_5 k_{10} k_{11} + k_2 k_5 k_{10} k_{11};$$

$$k_{TD} = k_4 k_6 k_9 k_{11} + k_4 k_8 k_9 k_{11} + k_2 k_6 k_9 k_{11} + k_2 k_8 k_9 k_{11};$$

$$k_{AT} = k_1 k_4 k_6 k_9 + k_1 k_4 k_8 k_9 + k_1 k_6 k_9 k_{12} + k_1 k_8 k_9 k_{12};$$

$$k_{BD} = k_2 k_3 k_6 k_{11} + k_2 k_3 k_8 k_{11} + k_3 k_6 k_{10} k_{11} + k_3 k_8 k_{10} k_{11};$$

$$k_A = k_0 k_1 k_6 k_{10} + k_0 k_1 k_8 k_{10} + k_0 k_1 k_6 k_{12} + k_0 k_1 k_8 k_{12} + k_1 k_4 k_6 k_{12} + k_1 k_4 k_8 k_{12} + k_1 k_4 k_6 k_{10} + k_1 k_4 k_8 k_{10} + k_4 k_5 k_8 k_{10} + k_2 k_5 k_8 k_{12} + k_2 k_5 k_8 k_{10} + k_4 k_5 k_8 k_{12};$$

$$k_{AA} = k_1 k_5 k_8 k_{12} + k_1 k_5 k_8 k_{10} + k_1 k_4 k_5 k_{12} + k_1 k_4 k_5 k_{10};$$

$$k_{AB} = k_1 k_3 k_6 k_{12} + k_1 k_3 k_8 k_{12} + k_1 k_3 k_6 k_{10} + k_1 k_3 k_8 k_{10};$$

$$k_{BT} = k_3 k_6 k_7 k_{10} + k_3 k_6 k_7 k_{12} + k_2 k_3 k_7 k_{12} + k_2 k_3 k_7 k_{10};$$

$$k_T = k_4 k_6 k_7 k_{10} + k_2 k_6 k_7 k_{12} + k_2 k_6 k_7 k_{10} + k_4 k_6 k_7 k_{12} + k_0 k_2 k_7 k_{10} + k_0 k_4 k_7 k_{12} + k_0 k_4 k_7 k_{10} + k_0 k_2 k_7 k_{12};$$

$$k_{AT} = k_4 k_5 k_7 k_{10} + k_2 k_5 k_7 k_{12} + k_2 k_5 k_7 k_{10} + k_4 k_5 k_7 k_{12};$$

$$k_T = k_4 k_6 k_9 k_{12} + k_4 k_8 k_9 k_{12} + k_2 k_6 k_9 k_{12} + k_2 k_8 k_9 k_{12};$$

$$k_B = k_2 k_3 k_6 k_{12} + k_2 k_3 k_8 k_{12} + k_2 k_3 k_6 k_{10} + k_2 k_3 k_8 k_{10};$$

$$k = k_0 k_2 k_6 k_{10} + k_0 k_2 k_8 k_{10} + k_0 k_4 k_6 k_{12} + k_0 k_4 k_8 k_{12} + k_0 k_4 k_6 k_{10} + k_0 k_4 k_8 k_{10} + k_0 k_2 k_6 k_{12} + k_0 k_2 k_8 k_{12}$$

为了评估所提出的动力学模型, 必须求解微分方程式 (6~10)。首先要确定方程中的动力学参数。利用单纯形法优化动力学参数, 使得动力学模型结果与实验数据的误差尽可能小, 在此用数学模型计算结果与实验数据之差的平方和最小为目标函数, 定义为:

$$J = \sum_{j=1}^{15} \sum_{i=1}^{15} (y_{ij}^{\text{计算}} - y_{ij}^{\text{实验}})^2$$

式中 J 是目标函数, i 和 j 分别为第 i 次实验和第 j 个物质, y_{ij} 实验和 y_{ij} 计算分别为实验结果和模型计算值。方程式 (6)~(10) 各种糖浓度用四阶龙格-库塔

法求解。经过优化计算, 得到反应速率常数 (k_i), 然后把 k_i 值代入微分方程式 (6)~(10) 式定义的常数, 可求得微分方程的动力学参数。

表 1 反应速率常数估算值

Table 1 Estimation of Rate Constants of Eq.(1)~(5)

Rate constants												
k_0	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	k_6	k_7	k_8	k_9	k_{10}	k_{11}	k_{12}
0.141	1.076	0.708	0.498	0.322	1.252	0.081	3.284	0.997	1.755	0.202	0.992	0.198

数学模型的计算结果与实验结果见图 5。从图可见, 所建立的动力学模型能够较好地模拟半乳糖苷酶催化水解乳糖和低聚半乳糖合成过程。表 2 是各种糖拟合的平均相对误差。该数学模型在反应后期对三糖和四糖的拟合误差比较大, 可能是在反应后期, 四糖被酶水解成三糖和单糖的速度变快, 导致四糖的拟合值比实验值大, 而三糖的拟合值比实测值小。另外, 有小部分三糖和四糖进一步转化成为五糖和六糖。由于反应中五糖和六糖含量很少, 在模型中未加以考虑。

此模型的建立, 为优化 GOS 合成提供理论依据。从模型可知, 半乳糖是乳糖水解的产物又是低聚糖合成的底物, 如果在反应中补加一定量的半乳糖, 会有利于 GOS 的合成。当反应进行 2 h 时, 在反应液中添加 2% (W/V) 半乳糖, 测得 GOS 最大得率为 36%, 比未加入半乳糖的反应提高 15%。同时, 模型也表明葡萄糖会抑制 GOS 的合成, 利用葡萄糖氧化酶去除反应生成的部分葡萄糖, GOS 得率比对照组提高 29% 左右。

表 2 估算的平均误差

Table 2 Average relative error of estimation Equation ($n = 15$, sum of square = 0.0001)

Product	Glucose	Galactose	Lactose	Trisaccharide	Tetrasaccharide
Relative error/(%)	3.97	5.14	8.87	2.55	8.31

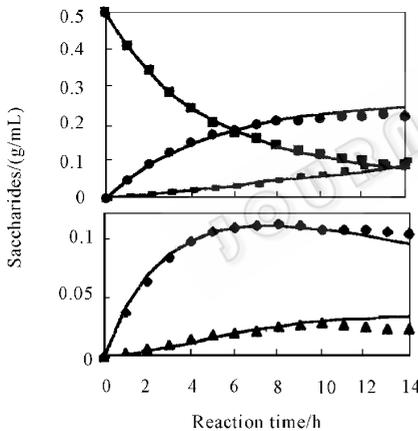


图 5 β -半乳糖苷酶催化反应动力学

Fig. 5 Change in the concentration of lactose, monosaccharide, trisaccharide and tetrasaccharide in enzymatic reactions.

Symbols were the same as in the Fig. 3

Solid line refers to the simulation.

2.4 结 论

β -半乳糖苷酶催化乳糖水解和低聚半乳糖合成是个十分复杂的反应, 本文以嗜热脂肪芽孢杆菌 β -半乳糖苷酶酶促反应为研究对象, 推测了半乳糖三糖是由乳糖与半乳糖通过转糖苷反应生成, 三糖和半乳糖进一步反应合成四糖。建立乳糖水解和低聚半乳糖合成耦合的本征动力学模型, 该数学模型能较好描述乳糖水解过程中单糖、乳糖、三糖和四糖的浓度随时间变化趋势, 同时也反映了反应产物葡萄糖不利于低聚半乳糖的合成。这个模型的建立, 对于优化低聚半乳糖合成和反应器的设计有很重要的意义。

符号说明

[A]——乳糖浓度 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

[B]——葡萄糖浓度 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

[C]——半乳糖浓度 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

[D]——四糖浓度 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

[E]—— β -半乳糖苷酶浓度 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

[E]—— β -半乳糖苷酶总浓度 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

EA——酶与乳糖的中间复合物

EC——酶与半乳糖的中间复合物

ET——酶与三糖的中间复合物

ED——酶与四糖的中间复合物

J ——目标函数值

k_1, k_2, r ——反应速率常数

K_{ij} ——各种糖的竞争性抑制常数 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

r_i ——各种糖反应速度 $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$

$[T]$ ——三糖浓度 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

v_j ——各种糖反应速度常数 min^{-1}

下标符号

A——乳糖

C——半乳糖

D——四糖

T——三糖

参 考 文 献

- [1] Norimasaoish Akihiro Yamashiro Kenzo Yokozeki. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **16** (11) :4022~4025
- [2] Hyun-Jae Shi Jong-Monn Park Ji-Won Yang. *Process Biochem*, 1998, **33** (8) :787~792
- [3] 郑建仙, 耿立萍. *食品与发酵工业*, 1997, **23** (1) :39~46
- [4] Schmidt R R. *Angew Chem Int*, 1986, **25** :212~235
- [5] Zarate M H S, Lopez-Levia. *J Food Protection*, 1990, **53** (3) :262~268
- [6] Andrew P Bakken Charles G Hill Clyde H Amundson. *Appl Biochem Biotechnol*, 1991, **28** (29) :741~756
- [7] Boon M A, Janssen A E M, Padt A Vander. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **64** (5) :557~567
- [8] Prenosil J E, Stuker E, Bourne J R. *Biotechnol Bioeng*, 1987, **30** :1019~1025

Kinetic Model of Galacto-oligosaccharide Synthesis by β -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*

CHEN Shao-Xin WEI Dong-Zhi* HU Zhen-Hua WANG Xiao-Lan YU Jun-Tang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Biochemistry East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract In the course of lactose hydrolysis, the β -galactosidase produced variable amounts of galacto-oligosaccharide (GOS) due to the transgalactosydic reaction. According to enzymatic reaction mechanism by β -galactosidase and structures of GOS, a model was developed to describe the process including GOS (trisaccharide and tetrasaccharide) formation by *Bacillus stearothermophilus* β -galactosidase. The Simple optimization method was employed to determine the kinetic parameters of rate expression. The kinetic model showed a good agreement between experimental and simulated results.

Key words β -galactosidase galacto-oligosaccharides kinetic model 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>