

## 固定化嗜热脂肪芽孢杆菌合成低聚半乳糖

陈少欣 魏东芝 胡振华

(华东理工大学国家反应器工程重点实验室 生物化学研究所 上海 200237)

**摘 要:**利用海藻酸钙、明胶和壳聚糖为固定化载体包埋嗜热脂肪芽孢杆菌细胞合成低聚半乳糖(GOS)。通过比较三种方法的酶活力回收、最适反应条件、GOS 的得率和和载体机械强度,选择明胶作为固定化细胞的载体。反应体系的温度、pH、乳糖浓度、乳糖的转化率和载体的传质阻力对 GOS 合成有明显影响。在 CSTR 反应器中水解 60% 乳糖, GOS 最大得率为 31.2%, 经过 96h(8 批反应), 产物得率为原来的 88%。在空速  $0.09\text{h}^{-1}$  条件下, 利用填充床反应器连续水解乳糖, GOS 的得率和反应器生产能力分别为 31.5% 和  $17.4\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ , 连续反应 140h, GOS 得率下降 20%。产物经过活性炭柱层柱分离纯化, 通过  $^{13}\text{C}$ -NMR 鉴定四糖的化学结构为  $\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{3)-D-Gal-(1}\rightarrow\text{6)-D-G-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glu}$ 。

**关键词:** 固定化细胞, 嗜热脂肪芽孢杆菌, 低聚半乳糖

**中图分类号:** Q556.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 03-0357-06

低聚半乳糖(GOS)是由 2~5 分子半乳糖和一分子葡萄糖组成的一类寡糖<sup>[1]</sup>。它具有低热量、低甜度、不被胃液消化的特点, 是人体肠道双歧杆菌生长促进因子<sup>[2]</sup>, 由于它是母乳的主要成分之一, 比其它低聚糖具有更好的生理活性。另外, GOS 的生产可以以乳清为原料, 这有利于乳清的综合利用和环境保护。目前, 只有日本生产 GOS, 而我国对 GOS 的研究才刚起步, 因此开发我国 GOS 产品将具有重要的经济意义。

GOS 一般是利用  $\beta$ -半乳糖苷酶水解乳糖来合成。 $\beta$ -半乳糖苷酶具有水解反应和转糖苷反应两种功能, 在它的活性中心有一个巯基和一个咪唑基团, 巯基作为广义酸使糖苷键的氧原子质子化, 然后咪唑基作为亲核试剂进攻半乳糖的 C-1, 当糖基受体为水时, 即为水解反应; 当糖基受体为糖时则为转糖苷反应<sup>[3]</sup>, 生成产物为 GOS(主要含有低聚三糖和低聚四糖)。文献报道的 GOS 合成方法主要有游离酶法和固定化酶法两种, 随着酶的来源不同, 一般 GOS 合成得率在 25%~45% 之间。由于大部分  $\beta$ -半乳糖苷酶属于胞内酶, 如果能够直接利用细胞进行固定化, 可以省去酶的提取和纯化步骤, 简化生产过程。本文对产胞内  $\beta$ -半乳糖苷酶的嗜热脂肪芽孢杆菌进行固定化, 用于催化合成 GOS 的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*), 本实验室保藏菌种。

### 1.2 试剂

乳糖由上海化学试剂公司购得, 其它试剂均为分析纯或化学纯试剂。

**作者简介:** 陈少欣(1972-), 男, 福建泉州人, 现为华东理工大学生物工程学院博士生, 主要从事生物化学工程研究。

**收稿日期:** 2000-05-22, **修回日期:** 2000-10-16

1.3 方法

1.3.1 细胞的固定化:①海藻酸钙包埋法:取 4mL 细胞悬浮液(含有 2g 湿细胞)与 20mL 5%海藻酸钠混匀,用 6 号针头挤入 200mL 0.1mol/L 的  $\text{CaCl}_2$  浓液中,于 4℃静置 6h,抽滤,用去离子水洗净,备用。②明胶包埋法:取 4mL 细胞悬浮液(含有 2g 湿细胞)与 10mL10%明胶混匀,在 40℃倒入平皿中,厚度约为 1mm,置于 4℃冰箱 2h。切成 1mm × 1mm 的小颗粒,再把固定化细胞用 0.25%戊二醛交联 2h,抽滤,用去离子水洗净。备用。③壳聚糖包埋法:取 2g 细胞与 2%壳聚糖-醋酸溶液混匀,用 6 号针头滴入 500mL 1.5%多聚磷酸钠溶液中(pH5.7),轻微搅拌 30min,倾去多聚磷酸钠溶液,用 pH7.0 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤壳聚糖小球,抽干,备用。

1.3.2 酶活的测定:本文以乳糖为底物测定酶活,具体方法见文献[4]。酶活力定义为:在 pH7.0、温度 55℃,每分钟分解乳糖产生 1μmol 的葡萄糖的酶量为 1 单位。

1.3.3 糖的测定:用高压液相色谱法,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 = 65:35(V/V),进样量 10μL。

1.3.4 核磁共振谱鉴定低聚半乳糖四糖的结构:反应产物经过活性炭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<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C,H-H cosy 和 C-H cosy 光谱。<sup>1</sup>H-NMR 在 400Hz,<sup>13</sup>C-NMR 在 200Hz,H-H cosy,C-H cosy 分别在 500Hz 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。

2 结果和讨论

2.1 固定化方法的比较

固定化细胞可采用包埋、吸附、共价结合等方法,以包埋法最为常用。本文以海藻酸钠、壳聚糖、明胶为载体进行细胞固定化,这些载体无毒性,可用于食品生产。表 1 比较了三种固定化细胞的活力回收、产物的得率、最适反应条件和机械强度。以海藻酸钠为载体,酶活回收率和产物得率都不高,这可能是底物分子较大,海藻酸钙凝胶结构比较致密,分子量较大的乳糖分子不易在其内部传递的缘故。以壳聚糖为载体,产物的得率比较高,但酶活回收率不好。明胶包埋固定化方法简单,而且产率和酶活力都比较高,固定化后在反应条件和热稳定性方面都比游离酶好,适合用于固定嗜热脂肪芽孢杆菌生产 GOS。

表 1 三种固定化细胞的比较  
Table 1 Comparison of three immobilized cells

	Alginate	Chitosan	Gelatin	Free enzyme
Activity recovery/%	26	32	63	- -
GOS yield/%	17	28.4	30.6	32
Optimal pH	6.8 ~ 7.2	7.0 ~ 7.5	7.0 ~ 8.5	6.5
Optimal temperature/℃	55	55 ~ 60	55 ~ 60	55
Thermostability/℃ 153	55	55	50	
Mechanical stability	good	good	good	- -

2.2 明胶固定化细胞条件优化

2.2.1 细胞负载量:取不同量细胞与 1g 明胶混匀,制成固定化细胞,测定固定化细胞的活力,结果见表 2。酶活力随细胞含量增大而提高,当细胞负载量达到 5g 时,酶活力略有下降,可能是细胞负载量过大,使得载体强度不够,细胞反而容易泄露的缘故。

表 2 细胞负载量对固定化细胞活力的影响

Table 2 Effect of cell loading on immobilized cell activity					
Cell loading/g	1	2	3	4	5
Relative activity/%	20	62	83	100	86

2.2.2 戊二醛浓度:戊二醛作为一种双功能交联剂,可以使明胶的蛋白质分子发生交联,同时也可使菌体交联在载体上,强化明胶的机械强度和固定化细胞的稳定性。表 3 是戊二醛浓度对酶活力的影响,从结果可知,在戊二醛浓度低于 0.25% 时,酶活力和载体的机械强度随浓度增加而增大,但进一步增加戊二醛浓度导致酶活力下降,这是因为酶分子活性基团被戊二醛过多地修饰。因此,确定最适戊二醛浓度为 0.25%。

表 3 戊二醛浓度对固定化细胞活力的影响

Table 3 Effect of Glutaraldehyde concentration on immobilized cell activity					
Glutaraldehyde concentration/%	0.05	0.1	0.25	0.4	0.5
Relative activity/%	72	89	100	70	64

2.3 pH 对 GOS 合成的影响

用不同 pH 的缓冲液配制 50% 乳糖溶液,于 52℃ 反应 8h,测定各种糖的浓度,结果如图 1。pH 对固定化细胞的水解活力和转糖苷活力有显著的影响,在偏酸性 pH 范围固定化细胞的活力低,生成单糖和 GOS 少。在 pH7.0 ~ 8.0 固定化细胞转糖苷活力明显提高,有利于 GOS 的合成。与游离酶相比,固定化细胞合成 GOS 的最适 pH 范围变宽,向碱性方向偏移 0.5 ~ 1.5 单位。说明经过固定化后,由于受到载体微环境的影响,固定化细胞的酶学性质也发生变化。

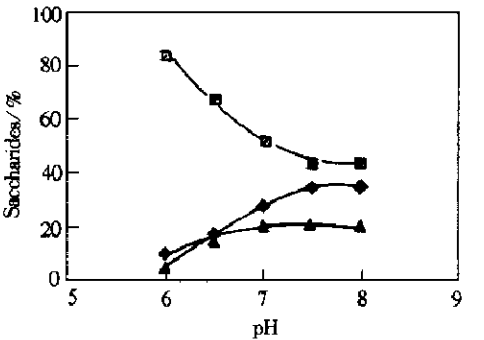


图 1 pH 对 GOS 合成的影响

Fig.1 Effect of pH on GOS synthesis

◆ Monosaccharide; ◇ Lactose; ▲ GOS.

2.4 温度对 GOS 合成的影响

分别在不同温度水解 50%乳糖溶液(pH7.0),研究温度对 GOS 合成的影响,结果见图 2。从图可知,细胞经过固定化后,能在 50℃ ~ 60℃ 保持较高的催化活力。固定化细胞的活力随温度提高而增大,较高的反应温度有利于 GOS 的合成,这主要是 GOS 合成所有的活化能比水解的活化能高;另外,高温会增加乳糖的溶解度,降低乳糖溶液的粘度,有利于加快底物向固定化细胞传递。

2.5 乳糖浓度对 GOS 合成的影响

初始乳糖浓度对 GOS 合成的影响见图 3。从图可知,GOS 的得率随着乳糖浓度的升高而增大,在乳糖浓度低于 30% 时,主要发生水解反应,乳糖被固定化细胞水解成单糖,GOS 得率很低。当乳糖浓度高于 50%,固定化细胞的转糖苷反应增强,这可能是:(1)当

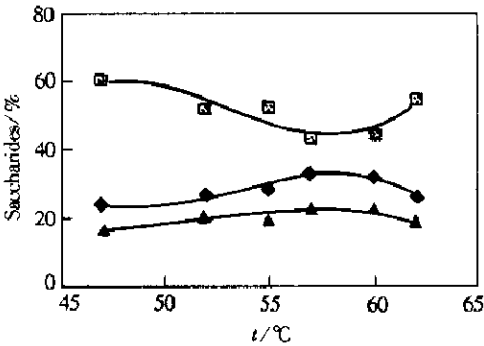


图2 温度对 GOS 合成的影响

Fig.2 Effect of temperature on GOS synthesis

◆ Monosaccharide; ◻ Lactose; ▲ GOS.

$\beta$ -半乳糖苷酶的转糖苷反应是把半乳糖苷基转移给其它糖基,反应体系存在有适量的半乳糖是合成 GOS 的前提。固定化细胞首先水解乳糖变为半乳糖和葡萄糖,然后再发生转糖苷反应。因此乳糖的水解率会影响 GOS 合成(图 4),在水解率低于 50% 时, GOS 得率较小;乳糖转化率达到 70% ~ 80%, GOS 得率最大,进一步反应,由于 GOS 会被酶水解反而使得得率降低。

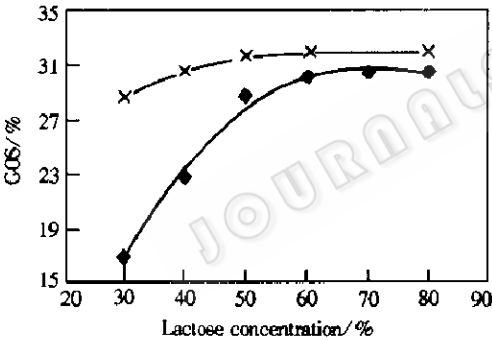


图3 乳糖浓度对 GOS 合成的影响

Fig.3 Effect of lactose concentration on GOS synthesis

◆ Immobilized cell; × Free enzyme.

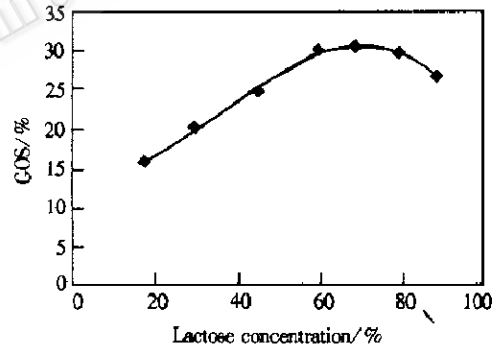


图4 乳糖转化率对 GOS 合成的影响

Fig.4 Effect of lactose conversion rate on GOS synthesis

## 2.6 固定化细胞间歇式反应器中 GOS 的合成

在 pH7.0, 温度 50°C 条件下, 搅拌式反应器中水解 60% 乳糖溶液进行固定化细胞合成 GOS 实验, 每次反应结束后, 倾去反应液, 加入新配制乳糖溶液进行下一批反应, 结果见图 5。共进行八批反应(总时间 96h), GOS 最大得率为 31.2%, 单糖和乳糖的含量分别为 35% 和 33.8%。反应结束后 GOS 的得率为初始的 88%, 说明该固定化细胞的稳定性较好。

## 2.7 填充式反应器中连续合成 GOS

把固定化细胞装入填充床反应器中, 在 pH7.0, 温度 50°C 条件下连续水解 60% 乳糖溶液, 测定不同空速(体积流量/反应器体积)对 GOS 合成的影响, 结果见图 6。从图可知,

乳糖浓度高时, 有比水分子更多的乳糖作为转糖的受体, 与水解反应生成的半乳糖结合生成 GOS, 这有利于提高 GOS 的得率; (2) 高浓度乳糖的存在, 会抑制 GOS 的逆向水解。文献报道的其它来源的  $\beta$ -半乳糖苷酶合成 GOS 也有类似结果<sup>[5-7]</sup>。

底物浓度对游离酶合成 GOS 也有影响, 但与固定化细胞相比较, 乳糖浓度对固定化细胞合成 GOS 的影响更大, 而且固定化细胞的 GOS 得率比游离酶小。这是底物在固定化载体内部存在扩散阻力, 乳糖在载体内部形成浓度逐渐减小的浓度梯度, 低浓度乳糖导致局部转糖苷能力的下降。

当空速太大时,乳糖的水解率较低,所生成 GOS 得率也低;但是空速太小时,反应生成的 GOS 会被酶水解成单糖。合成 GOS 最适的空速为  $0.09\text{h}^{-1}$ ,这时 GOS 得率为 31.5%。从反应器生产能力来看,它与产物的产量和反应时间两者有关,最大产物得率和最大的生产能力所需的反应时间不一致,如果兼顾两者的差别,可选择 9~11h 为最佳反应时间。在反应器连续反应 140h,GOS 得率下降 20%,如果要提高 GOS 得率,可以通过提高停留时间来实现。

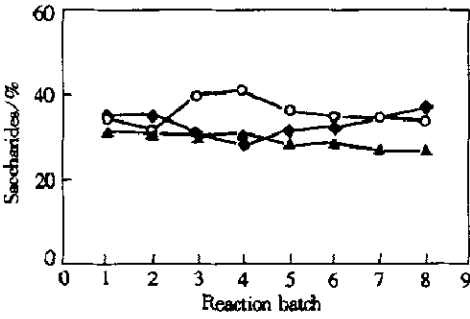


图 5 搅拌反应器中批式合成 GOS

Fig. 5 Production of GOS by batch reaction in a stirred tank reactor.

—◆—Lactose; —○—Monosaccharide; —▲—GOS.

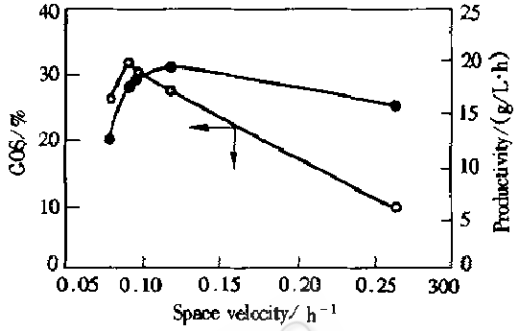


图 6 空速对 GOS 得率和生产能力的影响

Fig. 6 Effect of Space velocity on GOS yield and productivity.

—●—Productivity; —○—GOS.

2.8 GOS 结构鉴定

反应产物通过活性炭层析柱,以 10%~30% 的乙醇进行梯度洗脱,得到各种糖的纯品。利用核磁共振鉴定低聚四糖的化学结构,其化学结构为  $\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{3)-D-Gal-(1}\rightarrow\text{6)-D-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glu}$ ,由于四糖是由  $\beta$ -半乳糖苷酶转移一分子半乳糖到三糖得到的,因此可以推测出三糖的结构是  $\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{6)-D-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glu}$ ,这些结构与文献报道的 GOS 化学结构一致<sup>[4]</sup>。明确 GOS 的化学结构,有助于进一步研究 GOS 结构与功能的关系。

参 考 文 献

[ 1 ] Prenosil J E, Stuker E, Bourne J R. *Biotechnol Bioeng*, 1987, **30**:1019~1025.  
[ 2 ] Onishi, Tanaka T. *Letter Appl Microbiol*, 1996, **23**:253~256.  
[ 3 ] Zatale S, Lopez-Leiva M H. *J Food Protection*, 1990, **53**(3):262~268.  
[ 4 ] Prenosil J E, Stuker E, Bourne J R. *Biotechnol Bioeng*, 1987, **30**:1026~1031.  
[ 5 ] Dey-Chyi Shen, Shin-Yi Li, Kow-Jen Duan, et al. *Biotechnol Technique*, 1998, **12**(4):273~276.)  
[ 6 ] Mozaffar Z R, Nakanishi, Matsuno R. *J Food Sci*, 1985, **50**:1602~1606.  
[ 7 ] Ken-Ichi I, Mitsutoshi N, Shin-Ichi N. *Process Biochem*, 1996, **31**(1):69~76.

## SYNTHESIS OF GALACTO-OLIGOSACCHARIDES BY IMMOBILIZED *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS*

Chen Shaoxin Wei Dongzhi Hu Zhenhua

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

**Abstract:** *Bacillus stearothermophilus* was embedded in sodium alginate, chitosan, gelatin respectively and utilized for galacto-oligosaccharides (GOS) production. By comparing with each other in the enzyme recovery, optimal reaction conditions, yields of GOS and mechanical strength of the carriers, the gelatin was selected as better carrier for immobilization. pH, temperature, lactose concentration, lactose conversion and mass transfer resistance of carrier significantly influenced the Yield of GOS. The maximum yield of GOS was 31.2% in a stirred reactor with lactose concentration at 60%. It remained about 88% after 96h (8 batches) reaction. A packed bed was employed for a continuous reaction at space velocity  $0.09\text{h}^{-1}$ , where GOS yield and reactor productivity was 31.5% and 17.4% respectively. It lost about 20% of its original yield of GOS after 140h reaction. Products were separated by active charcoal column. The chemical structure of tetrasaccharide identified by  $^{13}\text{C}$ -NMR was  $\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{3)-D-Gal-(1}\rightarrow\text{6)-Dal-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glu}$ .

**Key words:** Immobilized cell, *Bacillus stearothermophilus*, Galacto-oligosacchrides

### 《微生物学报》承接广告业务

《微生物学报》创刊于1953年,双月刊,双月4日出版,由中国微生物学会和中科院微生物研究所主办。他是我国微生物学领域唯一的综合性学报级刊物。主要报道我国普通微生物学,工业、农业、医学、兽医微生物学,病毒学,免疫学和生物工程等方面的研究论文、研究简报和短篇综述等。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,深受国内外科研工作者、高等院校师生和企事业科研管理人员的欢迎。他是我国自然科学核心期刊,被国内外一些重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。

凡与微生物学及其各分支学科有关的试剂、药品、仪器、设备,以及与微生物有关的信息等均欢迎在本刊刊登广告。本刊服务热情,信守协议,保证质量,价格合理,竭诚为广大用户服务。

联系电话:(010)62630422 邮编:100080

E-mail: gesg @ sun.im.ac.cn

通讯地址:北京市海淀区中关村北一条13号《微生物学报》编辑部