

# *Aspergillus niger* CGMCC No. 6640 全细胞生物转化制备蔗果低聚糖

周康, 刘冬梅, 范梦珂, 叶嘉伦

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 蔗果低聚糖 (FOS) 作为一种益生元物质, 由于其具有极好的生物和功能性质, 受到人们极大的关注。具有独立知识产权的菌株 *Aspergillus niger* CGMCC No. 6640 被发现能利用蔗糖制备 FOS。为利用 *A. niger* 6640 的全细胞制备 FOS, 以蔗糖为底物, 利用高效液相法对该菌株的全细胞生物转化参数进行了研究。利用色谱柱 Rezex RCM-Monosaccharife Cat 的高效液相法能同时检测催化产物中蔗果四糖 (或蔗果五糖)、蔗果三糖、蔗糖、葡萄糖和果糖的浓度, 其保留时间分别为 8.403 min, 8.853 min, 9.705 min, 11.473 min 和 14.683 min。全细胞生物催化剂浓度和底物浓度对 FOS 产量有正面的影响。而  $\text{CaCl}_2$  浓度对 FOS 含量有负面影响。当全细胞生物催化剂浓度, 初始反应 pH、反应温度、反应时间、蔗糖浓度分别为 60 g/L、7.0、33 °C、40 h 和 600 g/L 的最佳条件下, FOS 含量为 314.60 g/L。总之, *Aspergillus niger* CGMCC No. 6640 全细胞生物催化剂能有效地制备 FOS, 为其工业化提供依据。

**关键词:** 蔗果低聚糖; 黑曲霉;  $\beta$ -呋喃果糖基转移酶; 全细胞生物催化剂; 生物转化

文章编号: 1673-9078(2013)8-1967-1972

## Production of Fructooligosaccharides using Free-whole-cell Biotransformation by *Aspergillus niger* CGMCC No. 6640

ZHOU Kang, LIU Dong-mei, FAN Meng-ke, YE Jia-lun

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Fructooligosaccharides (FOS) have received particular interest because of their excellent biological and functional properties for using as a prebiotic compound. The strain *Aspergillus niger* CGMCC No. 6640 with independent intellectual property rights was found capable of producing FOS using sucrose as the substrate. To produce FOS using free-whole-cell biotransformation by *A. niger* 6640, the effects of production parameters on the biotransformation of sucrose were investigated by HPLC with the column of Rezex RCM-Monosaccharife Cat. The catalysate concentration of the Nystose (or  $1^F$ -Fructofuranosyl-nystose), kestose, sucrose, glucose and fructose were simultaneously detected, and their retention time was 8.403 min, 8.853 min, 9.705 min, 11.473 min and 14.683 min, respectively. The free-whole-cell concentration and substrate concentration positively affected the maximum FOS yield. However  $\text{CaCl}_2$  concentration negatively affected the FOS yield. The free-whole-cell concentration, the initial reaction pH, the temperature for catalysis, biotransformation time and sucrose concentration were 60 g/L, 7.0, 33 °C, 40 h and 600 g/L, respectively. Under the optimal conditions were as follows, the FOS contents reached 314.60 g/L. In summary, the free-whole-cell biocatalyst of *A. niger* 6640 can effectively produce FOS indicating a potential for industrial production.

**Key words:** fructooligosaccharides; *aspergillus niger*;  $\beta$ -fructosyltransferase; the biocatalyst of free-whole-cell; biotransformation

蔗果低聚糖 (Fructooligosaccharides, 缩写为 FOS), 是由 1~3 个果糖基通过  $\beta$ -1,2 糖苷键与蔗糖中的果糖基结合生成的蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖等的混合物<sup>[1-2]</sup>, 是低聚果糖中的一种, 因此又称为低

收稿日期: 2013-05-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31101254); 广东省自然科学基金资助项目

(No. S2011010005679)

作者简介: 周康 (1991-), 男, 本科, 食品科学与工程专业

通讯作者: 刘冬梅 (1972-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向为食品微生物控制与利用

聚果糖。近几年, 作为益生元之一的 FOS 迅速成为食品行业保健品的重要成分, 因为 FOS 有许多良好的功能性质, 例如有调节肠道菌群平衡, 使益生菌增殖, 缓解便秘, 改善脂质代谢, 不被消化道吸收利用以及提高人体免疫力等优异性能, 现被广泛应用于保健食品配料中<sup>[3-5]</sup>。

目前生产 FOS 主要有两种方法: (1) 微生物液体深层发酵法; (2) 传统固定化酶法。其中得到广泛应用的是微生物液体深层发酵法, 是指利用能分泌  $\beta$ -呋喃果糖基转移酶的微生物, 将其投入到含蔗糖、蛋白

质、无机盐的复杂转化溶液中,在一定的条件下转化为含有FOS的糖浆。此法在前期要投入大量的发酵设备及其附属设备,所生产出来的产品成分复杂,还易发生美拉德褐变,给后期的分离纯化带来诸多的困难;而固定化酶的方法,此法中酶在固定化过程中易失活,固定后的酶易游离,且底物和产物要不断穿过载体屏障,使转化率低,另外,酶的分离纯化过程复杂,且此过程中酶易失活等缺点,造成传统固定化酶法转化成本较高,这些方面均严重制约其工业化应用。

针对现有FOS制备工艺上的不足,本研究探讨利用黑曲霉CGMCC No. 6640全细胞生物转化制备FOS的可行性,全细胞酶制剂制备方法简单,不涉及酶分离纯化,菌丝体可作为 $\beta$ -呋喃果糖基转移酶<sup>[6~7]</sup>的天然载体,以求尽大可能的保持酶活,而且作为底物—蔗糖很容易穿过细胞膜,并进行酶反应,其产物FOS容易释放。利用黑曲霉全细胞生物转化制备FOS未见报道,本研究以黑曲霉CGMCC No. 6640全细胞作为生物催化剂,以蔗糖为反应底物,探讨了全细胞生物催化剂浓度、反应初始pH、底物浓度、CaCl<sub>2</sub>浓度、反应温度、反应时间对FOS含量的影响规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

黑曲霉*Aspergillus niger* CGMCC No. 6640(简称为*A. niger* 6640,以下同),由笔者实验室筛选并保存在中国普通微生物菌种保藏管理中心(简称CGMCC)。

#### 1.1.2 主要试剂

蔗糖,分析纯,广州市化学试剂厂;酵母浸膏(生化试剂),广东环凯生物科技有限公司;磷酸氢二钠、柠檬酸(分析纯),广州市化学试剂厂;蔗果三糖(1-Kestose)、蔗果四糖(Nystose)、蔗果五糖(1<sup>F</sup>-Fructofuranosylnystose)(Wako pure Chemical Industries, Ltd.);果糖、葡萄糖、蔗糖标准品,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

#### 1.1.3 主要仪器

PYX2190S2A 恒温培养箱,科力电器公司;高效液相色谱仪系统, Waters 1525 Binary HPLC Pump, 2487 Dual  $\lambda$  absorbance, Waters 717 plus Autosampler 自动进样器,美国 Waters 公司;立式高压蒸汽灭菌锅,上海博讯实业有限公司; SW-CJ-1F 无菌台,上海博讯实业有限公司。

### 1.2 培养基

以质量体积百分比计, *A. niger* 6640 种子培养基配方为蔗糖 5.00%, 麦芽汁粉 2.00%, 蛋白胨 1.00%; 以质量体积百分比计, *A. niger* 6640 活化培养基配方为蔗糖 15.00%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1.50%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.30%, 酵母浸膏 5.0%。各培养基成分混合均匀后,在 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min 后冷却备用。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 *A. niger* 6640 全细胞生物催化剂的制备

从菌种 *A. niger* 6640 斜面上取一环孢子接种到装有 200 mL 的 *A. niger* 6640 种子培养基的 500 mL 锥形瓶中,于 33 °C 和转速 130 r/min 的条件下培养 24 h 后,为 *A. niger* 6640 种子液;按体积比将 *A. niger* 6640 种子液以 1/20~1/40 的比例接种到 *A. niger* 6640 活化培养基中,于 33 °C 和转速 130 r/min 的条件下培养 48 h 后,为 *A. niger* 6640 活化液;将 *A. niger* 6640 活化液用 400 目无菌滤袋过滤得到菌丝体后置于 -18 °C 下预冻 24 h,再进行真空冷冻干燥 24 h 后,即为 *A. niger* 6640 全细胞生物催化剂。

#### 1.3.2 高效液相色谱法测定 FOS 含量

高效液相色谱系统, waters 1525 泵多通道输送系统; waters 717 自动进样器; waters 2414 示差检测器; 色谱柱为 Phenomene 公司的 Rezex RCM-Monosaccharife Cat 7 mm×D 300 mm。流动相为双蒸水,使用前经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤,超声脱气,流速 0.6 mL/min,柱温 80 °C;标准品和样品均经过 8000 r/min 离心 10 min,样品稀释 12 倍后,0.22  $\mu$ m 过滤后进样,进样量为 10  $\mu$ L;用 Breeze 软件处理数据。

蔗果三糖(1-Kestose)标准浓度分别为 1.33 g/L、2.67 g/L、3.56 g/L、5.33 g/L;蔗果四糖(Nystose)标准液浓度分别为 1.33 g/L、2.67 g/L、3.56 g/L、5.33 g/L;蔗果五糖(1<sup>F</sup>-Fructofuranosylnystose)标准液浓度分别为 1.33 g/L、2.67 g/L、3.56 g/L、5.33 g/L;葡萄糖标准液浓度分别为 1.33 g/L、2.67 g/L、3.56 g/L、5.33 g/L,果糖标准液浓度分别为 1.33 g/L、2.67 g/L、3.56 g/L、5.33 g/L,蔗糖标准液浓度分别为 1.33 g/L、3.33 g/L、4.67 g/L、6.67 g/L。

FOS 含量为蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖绝对含量的总和,单位为 g/L;FOS 含量、蔗糖含量、葡萄糖含量和果糖含量总和为总糖量;FOS 相对百分比指在高效液相图中总 FOS 所占面积百分比,单位为%。

#### 1.3.3 *A. niger* 6640 全细胞生物催化剂的制备

## FOS 的转化参数

1.3.3.1 *A. niger* 6640 全细胞生物催化剂浓度对生物转化制备 FOS 的影响

在 30 mL 的 500 g/L 蔗糖溶液的反应体系中, 分别加入 50 g/L、60 g/L、70 g/L、80 g/L、90 g/L、100 g/L 的全细胞生物催化剂, 在反应初始 pH 5.2, 反应温度 33 °C 的条件下静止反应 24 h 后, 按照 1.3.2 的方法测定 FOS 含量, 各做三个平行。

1.3.3.2 反应初始 pH 对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 的影响

在 30 mL 的 500 g/L 蔗糖溶液的反应体系中, 用柠檬酸缓冲液调节反应体系的初始反应 pH 分别为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 加入全细胞生物催化剂 60 g/L, 在反应温度 33 °C 和转速 130 r/min 的条件下反应 24 h 后, 按照 1.3.2 的方法测定 FOS 含量, 各做三个平行。

1.3.3.3 底物浓度对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 的影响

蔗糖为生物转化制备中的底物(以下统称为底物), 在底物浓度分别为 100 g/L、200 g/L、300 g/L、400 g/L、500 g/L、600 g/L 的 30 mL 反应体系中, 加入全细胞生物催化剂 60 g/L, 在反应初始 pH 5.2、反应温度 33 °C、转速 130 r/min 的条件下反应 24 h 后, 按照 1.3.2 的方法测定 FOS 含量, 各做三个平行。

1.3.3.4  $\text{CaCl}_2$  浓度对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 的影响

在 30 mL 的 500 g/L 蔗糖溶液的反应体系中, 加入无机盐  $\text{CaCl}_2$  至浓度分别为 1%、2%、3%, 加入全细胞生物催化剂 60 g/L, 在反应初始 pH 5.2、反应温度 33 °C、转速 130 r/min 的条件下反应 24 h 后, 按照 1.3.2 的方法测定 FOS 含量, 各做三个平行。

1.3.3.5 反应温度 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 的影响

在 30 mL 的 500 g/L 蔗糖溶液的反应体系中, 加入全细胞生物催化剂 60 g/L, 在反应初始 pH 5.2、反应温度分别为 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、转速 130 r/min 的条件下反应 24 h 后, 按照 1.3.2 的方法测定 FOS 含量, 各做三个平行。

1.3.3.6 反应时间对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 的影响

在 30 mL 的 600 g/L 蔗糖溶液的反应体系中, 加入全细胞生物催化剂 60 g/L, 在反应初始 pH 7.0、反应温度为 33 °C、转速 130 r/min 的条件下分别反应 4 h、8 h、12 h、16 h、24 h、32 h、40 h、48 h 后, 按照 1.3.2 的方法测定 FOS 含量, 各做三个平行。

## 2 结果与讨论

2.1 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 的

## 高效液相色谱图

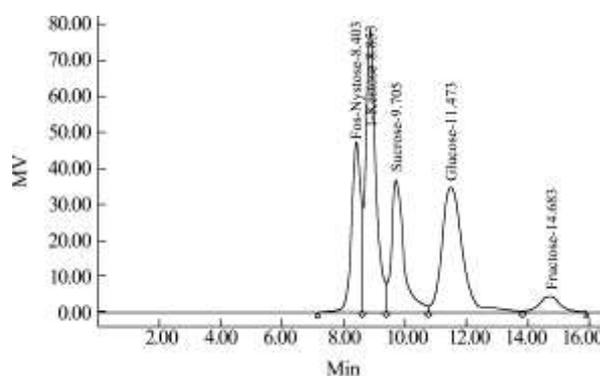


图1 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 中蔗果三糖, 蔗果四糖, 蔗果五糖, 蔗糖, 葡萄糖和果糖的 HPLC 图

Fig.1. HPLC profile of 1-Kestose, Nystose, 1<sup>F</sup>-Fructofuranosyl nystose, sucrose, glucose and fructose catalyzed by free-whole-cell of *A. niger* 6640

*A. niger* 6640 全细胞生物转化制备后样品中的蔗果三糖, 蔗果四糖, 蔗果五糖, 蔗糖, 葡萄糖和果糖的 HPLC 图谱如图 1 所示, 其中蔗果四糖和蔗果五糖难以分开, 出峰时间同为 8.403 min, 蔗果三糖, 蔗糖, 葡萄糖和果糖的出峰时间分别为 8.853 min, 9.705 min, 11.473 min 和 14.683 min。根据蔗果低聚糖标准品浓度和出峰面积积分, 得蔗果四糖和蔗果五糖标准曲线方程为  $Y=108871.67X$ , 回归系数  $R^2=0.999$ ; 蔗果三糖的标准曲线  $Y=145858.95X$ , 回归系数  $R^2=0.999$ , 式中 X 蔗果三糖的体积质量浓度, 单位为 g/L, Y 为对应的峰面积。根据标准曲线方程和图 1 的出峰时间与峰面积, 可计算糖的绝对含量和相对含量, 因此利用色谱柱 Rezex RCM-Monosaccharife Cat 的高效液相法能同时检测催化产物中蔗果四糖(或蔗果五糖)、蔗果三糖、蔗糖、葡萄糖和果糖的浓度。

2.2 *A. niger* 6640 全细胞生物催化剂浓度对生物转化制备 FOS 的影响

全细胞生物催化剂浓度对 *A. niger* 6640 制备 FOS 的影响如图 2 所示, 可以看出随生物催化剂浓度的增加, FOS 的含量逐渐提高, 当生物催化剂浓度达到 60 g/L 时 FOS 含量为  $116.31 \pm 4.36$  g/L, 90 g/L 时含量达到最高为  $142.39 \pm 3.70$  g/L, 但是当生物催化剂浓度达到 100 g/L 时, FOS 的含量略有下降。生物催化剂浓

度高低直接影响全细胞生物催化剂密度，从而影响 FOS 含量。当生物催化剂浓度太低时，即酶浓度低，无法最大限度的利用营养物质，在相等的反应时间内转化少，导致 FOS 含量较低；增加全细胞生物催化剂浓度，可增加有效酶浓度，可能会造成大量 FOS 滞留在全细胞中，从而影响 FOS 含量。从经济上考虑，推荐接种量为 60 g/L，这与高放等人的研究<sup>[8]</sup>采用 75 g/L 的接种量有少许出入，造成差距的可能原因：（1）高放等人采用海藻酸钠和氯化钙进行细胞的包埋，使得蔗糖进入较慢且受阻。更多的生物催化剂浓度让蔗糖反应更充分；（2）本实验采用多次重复活化，使菌株处于最好的状态，先经过 24 h 种子的培养，再经过 48 h 活化培养后才进行后续的催化制备，所有操作中菌种的稳定性是一致的。因此，采用 60 g/L 的接种量是比较合适的，如没有特别指明，其它实验组都采用此浓度。

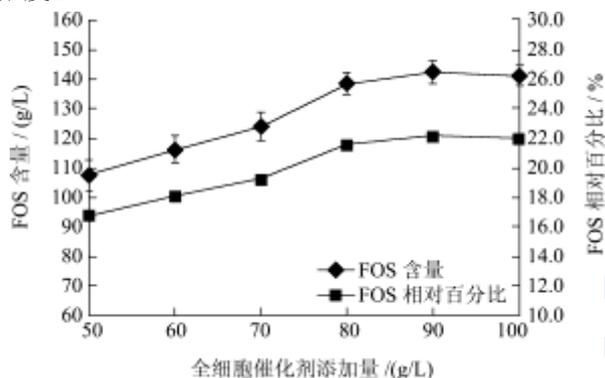


图2 生物催化剂浓度对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 含量影响

Fig.2 Effect of biocatalyst concentration on the content of FOS catalyzed by free-whole-cell of *A. niger* 6640

### 2.3 反应初始 pH 对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 的影响

不同反应初始 pH 对 *A. niger* 6640 生物转化制备 FOS 的影响如图 3 所示，从图中可以看出随着 pH 增加，FOS 的含量逐渐提高。pH 6.5，FOS 含量为 194.76±6.92 g/L，pH 7.0，FOS 含量最高为 217.58±7.34 g/L，而当 pH 8.0 时，含量下降到 164.95±6.33 g/L，pH 过低或过高都会影响酶的活力，从而影响 FOS 含量。关于最适 pH 与高放等人的研究<sup>[8]</sup>相似，与 Chen 等人的研究<sup>[9]</sup>pH 5.5 不一致。可能原因有：（1）用于调节 pH 的缓冲液不同。我们采用柠檬酸缓冲液，而文献<sup>[9]</sup>中没采用任何缓冲液；（2）Chen 等人采用红发夫酵母<sup>[9]</sup>进行发酵，我们采用黑曲霉全细胞进行生物转化制备，微生物种的不同可能导致酶的分子结构、酶的

活性部位都不完全相同，以致各自最适初始反应 pH 不同。

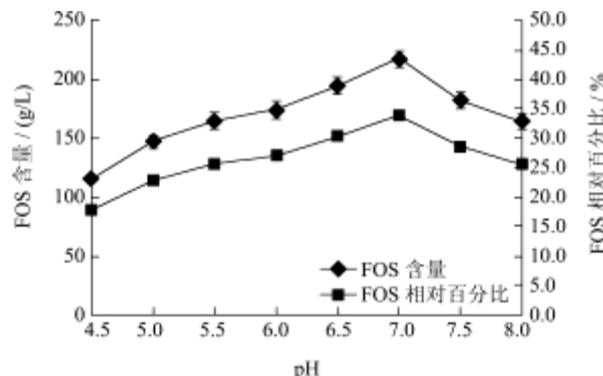


图3 初始反应 pH 对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 含量影响

Fig.3 Effect of the initial reaction pH on the content of FOS catalyzed by free-whole-cell of *A. niger* 6640

### 2.4 底物浓度对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 的影响

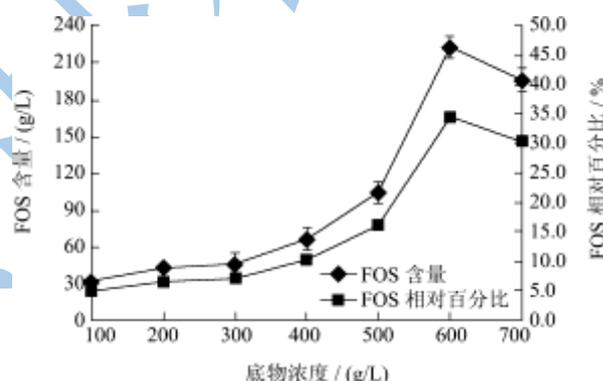


图4 底物浓度对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 含量影响

Fig.4 Effect of substrate concentration on on the content of FOS catalyzed by free-whole-cell of *A. niger* 6640

不同底物浓度对 *A. niger* 6640 生物转化制备 FOS 的影响如图 4 所示，从图中可以看出，随着底物浓度增加，FOS 含量逐渐提高，当底物浓度为 600 g/L，FOS 含量最大为 222.27±8.52 g/L，与底物浓度为 100 g/L、200 g/L、300 g/L、400 g/L、500 g/L 对比，FOS 含量具有显著性增加 ( $p \leq 0.01$ )。从文献可知，全细胞生物催化剂对底物蔗糖的作用分为两步，第一步为水解酶对蔗糖的水解，第二步是  $\beta$ -呋喃果糖基转移酶对水解产物之一的果糖进行转移反应。当浓度较低时，水解酶的活性较高，但转移酶活性较低，导致溶液中存在大量游离葡萄糖和果糖。随着蔗糖浓度的增高，水解酶活性会下降，但转移酶的活性不断上升，使溶液中的果糖不断转移到蔗糖上，从而提高 FOS 的含量

[8-9]。从图中可以看出，600 g/L 为最适底物浓度。当底物浓度继续增大时，水解酶的活力受到了较大的抑制，所以仅有较少的蔗糖被水解，溶液中游离的葡萄糖和果糖较少，即使转移酶活力较高也难以生成 FOS。

### 2.5 CaCl<sub>2</sub> 浓度对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 的影响

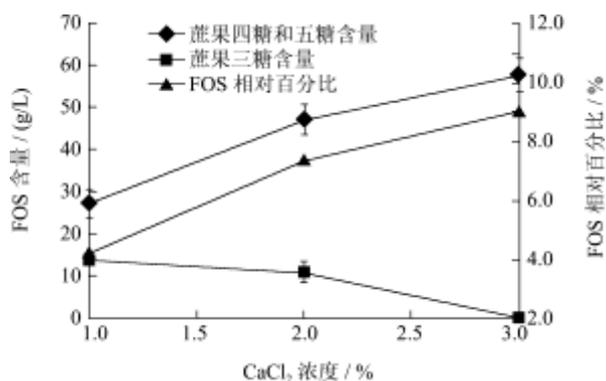


图5 CaCl<sub>2</sub>浓度对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 含量影响

Fig.5 Effect of CaCl<sub>2</sub> concentration on the content of FOS catalyzed by free-whole-cell of *A. niger* 6640

不同的 CaCl<sub>2</sub> 浓度对 *A. niger* 6640 生物转化制备 FOS 的影响如图 5 所示。从图中可以看出，随着 CaCl<sub>2</sub> 浓度不断升高，蔗糖五糖和四糖的含量不断升高，与此相反蔗糖三糖含量不断下降。FOS 含量在 CaCl<sub>2</sub> 浓度为 3.00% 时最高，达到 57.98±3.84 g/L。我们在研究了一些无机盐对生物转化反应的影响，表明无机盐对反应没有促进作用，相反有些无机盐还阻碍反应进行。研究了 0.10%、0.15% 和 0.20% 三个 Mg<sup>2+</sup> 浓度梯度对 FOS 含量的影响，发现 FOS 含量由 114.30±3.22 g/L 下降到 62.40±4.23 g/L。当 CaCl<sub>2</sub> 浓度为 3.00% 时，产物中只有蔗糖四糖和蔗糖五糖，没有蔗糖三糖。对此现象，没有相关的文献给予论述。与对照组相比，添加 CaCl<sub>2</sub> 对总 FOS 含量没有提高的作用，但是对提高蔗糖四糖和五糖的含量有正向作用。从总 FOS 含量考虑，在反应体系中不添加任何无机盐。

### 2.6 反应温度 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 的影响

不同反应温度对 *A. niger* 6640 生物转化制备 FOS 的影响如图 6 所示，从图中可知反应温度在 30~40 °C，FOS 含量达到最大值 263.78±8.88 g/L，因而选择 33 °C 为最适反应温度，这与江波等人研究<sup>[10]</sup>的最适反应温度 50 °C 不一致。原因可能是：反应温度对酶促反应

的影响有两方面：一方面是当反应温度升高时，与一般化学反应一样，反应速度也加快；另一方面，随反应温度升高而使酶变性，从而降低酶的活性。酶促反应的最适反应温度，它受许多实验条件的影响，例如反应时间较短，酶最适反应温度会升高，反之如果反应时间较长，酶的最适反应温度会降低。所以酶的最适反应温度与因其他条件的不同而异。我们在实验中进行该 FOS 转移酶浓缩时发现，用 50 °C 浓缩酶液，该转移酶还有保留有 65% 的活性，因而推断该 FOS 转移酶比较耐热。

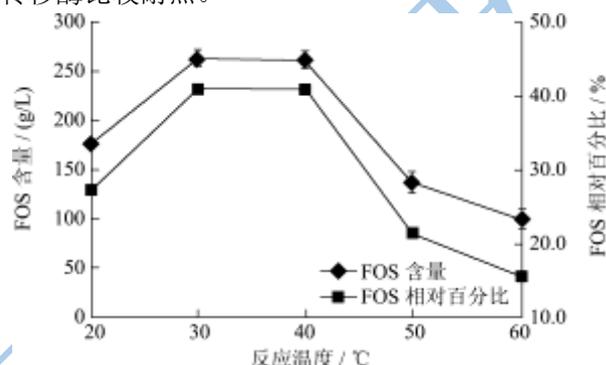


图6 反应温度对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 含量影响

Fig.6 Effect of reaction temperature on the content of FOS catalyzed by free-whole-cell of *A. niger* 6640

### 2.7 反应时间对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 的影响

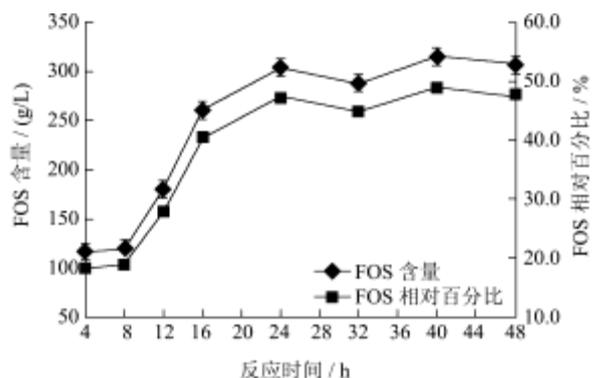


图7 反应时间对 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备 FOS 含量影响

Fig.7 Effect of reaction time on the content of FOS catalyzed by free-whole-cell of *A. niger* 6640

不同的反应时间对 *A. niger* 6640 生物转化制备 FOS 的影响如图 7 所示，可以看出当反应时间为 40 h 含量最高，达到 314.61±9.56 g/L。从经济上考虑，可以选择反应时间 24 h，FOS 含量为 303.23±8.47 g/L，保证 FOS 含量不低的情况下，节省更多生产时间。从

实验角度来看, 40 h 反应后 FOS 含量不仅达到最高, 而且蔗果三糖, 蔗果四糖, 蔗果五糖的含量同时达到最大值。从图中还发现反应 24 h 后, FOS 含量略有降低, 可能的原因为: 全细胞生物催化剂开始将 FOS 水解成蔗糖和果糖, 然后又将蔗糖水解成单糖。因此, 全细胞此时表现出较强的水解活力, 其他单糖浓度开始升高而 FOS 含量有少许下降, 之后在渗透压力升高的情况下, 全细胞的生物转化能力再次加强, 所以在 36 h 后 FOS 含量再次升高, 这个结果与 Shin 等人发现的结果类似<sup>[1]</sup>。

通过上述单因素条件, 可知 *A. niger* 6640 全细胞

表 1 在最有优条件下 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备蔗果三糖、蔗果四糖-五糖、蔗糖、葡萄糖和果糖含量

Table 1 The content of 1-Kestose, Nystose, 1<sup>F</sup>-Fructofuranosylhystose, sucrose, glucose and fructose catalyzed by free-whole-cell of *A. niger* 6640 under the optimal reaction conditions

名称	蔗果五糖-四糖 (1 <sup>F</sup> -FOS-Nystose)	蔗果三糖 (1-Kestose)	蔗糖	葡萄糖	果糖	总 FOS	总 SGF
含量/(g/L)	134.30	180.30	116.10	164.20	20.60	314.60	300.90
相对百分比/%	21.82	29.29	18.86	26.88	3.35	51.11	48.89

注: 含量为绝对含量, 相对百分比为液相色谱中峰面积的百分比含量; 总 FOS 即为蔗果三糖、四糖、五糖及大于五糖的总和; 总 SGF 即为蔗糖、葡萄糖和果糖的总和。1<sup>F</sup>-FOS 指蔗果五糖, Nystose 指蔗果四糖。

### 3 结论

为提高 *A. niger* 6640 全细胞生物转化制备蔗果低聚糖的含量, 对该全细胞生物催化剂的生物转化制备参数进行了研究。利用色谱柱 Rezex RCM-Monosaccharife Cat 的高效液相法能同时检测催化产物中蔗果四糖(或蔗果五糖)、蔗果三糖、蔗糖、葡萄糖和果糖的浓度。全细胞生物催化剂浓度和底物浓度对 FOS 产量有正面的影响。而 CaCl<sub>2</sub> 浓度对 FOS 含量有负面影响。以蔗糖为反应底物, 当全细胞生物催化剂浓度为 60 g/L, 反应初始 pH 为 7.0, 底物浓度为 600 g/L, 反应时间为 40 h, 反应温度为 33 °C 时, FOS 的绝对含量最高为 314.60±9.56 g/L, 相对百分比为 51.11%。为了以较低的成本和简单技术进行生物转化制备高含量 FOS, 冻干处理全细胞 *A. niger* 6640 不仅解决了微生物自身蛋白酶将β-呋喃果糖基转移酶水解的问题, 解决了酶制剂运输和保存问题, 还解决了 FOS 的分离纯化的难题; 另外, 在后续研究中, 将利用凝胶层析的方法、电泳等技术对 *A. niger* 6640 中的β-呋喃果糖基转移酶进行提纯和酶学性质研究, 为 FOS 的工业化生产奠定基础。

### 参考文献

[1] Cuskin F, Flint J E, Gloster T M, et al. How nature can exploit nonspecific catalytic and carbohydrate binding

生物转化参数分别为全细胞生物催化剂浓度为 60 g/L, 反应初始 pH 7.0, 底物浓度 600 g/L, 发酵时间 40 h, 反应温度 33 °C 时, 在此条件下 FOS 含量最高为 314.60 g/L, 各种糖的具体含量如表 1 所示。在国家标准 GBT 23528-2009 中要求液态 FOS 中干物质含量大于 70 %, FOS 的含量占干物质 50% 以上。本研究 FOS 产物中干物质的含量为 66.67%, 由表 1 可知, 样品的 FOS 含量占干物质 51.11%。由于干物质小于 70%, 需经过进一步浓缩后方可达到国家标准对于干物质的要求。

modules to create enzymatic specificity [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(51): 20889-20894

[2] 刘冬梅, 于淑娟, 李国基, 等. 一种新型的功能性低聚糖-蔗果低聚糖及其生产方法[J]. 食品工业, 1998, 3: 14-16

Liu D M, Yu S J, Li G J, et al. A New Type Functional Oligosaccharides-Fructo-oligosaccharides and ways of Production [J]. Food Industries, 1998, 3: 14-16

[3] Pereira D I, Gibson G R. Effect of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans [J]. Critical Reviews in Biochemistry and Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 37(4): 259-281

[4] Bornet F R, Brouns F. Immune-simulating and gut health-promoting properties of short-chain fructo-oligosaccharides [J]. Nutrition Review, 2002, 60(10): 326-334

[5] 梁莹, 庞振国, 崔炳群, 等. 无糖食品甜味剂的应用及其安全性[J]. 现代食品科技, 2009, 25(8): 964-966

Liang Y, Pan Z G, Cui B Q, et al. Application Status and Safety of Sweeteners in Sugar-free Foods [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(8): 964-966

[6] Takako H, Toru W, Sumire I, et al. Synthesis of b-D-fructofuranosyl(2→1)-2-acetamido-2-deoxy-a-D-glucopyranoside (N-acetylsucrosamine) using β-fructofuranosidase-containing *Aspergillus oryzae* mycelia as a whole-cell

- catalyst [J]. Carbohydrate Research, 2012, 353: 27-32
- [7] Ning Y W, Wang J P, Chen J, et al. Production of neo-fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous* [J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 7472-7478
- [8] 高放,秦克亮,赵玉秀,等.固定化黑曲霉细胞与固定化葡萄糖异构酶生产高含量低聚果糖[J].中国生化药物杂志, 2000,21(6):286-288
- Gao F, Qin K L, Zhao Y X, et al. Production of High-content Fructooligosaccharides with Immobilized *Aspergillus Niger* and Glucose Isomerase [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2000, 21(6): 286-288
- [9] Chen J, Chen X M, Xu X M, et al. Biochemical characterization of an intracellular 6G-fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its use in production of neo-fructooligosaccharides(neo-FOSs) [J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 1715-1721
- [10] 江波,王璋,丁霄霖.共固定化生产高含量低聚果糖的研究[J].食品与发酵工业,1996,1:1-6
- Jian B, Wang Z, Ding X L. Production of High-purity Fructo-oligosaccharides with Co-immobilized *Aspergillus Niger* and Enzyme [J]. Food and Fermentation Industries, 1996, 1: 1-6
- [11] Shin H T, Baig S Y, Lee S W, et al. Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells [J]. Bioresource Technology, 2004, 93: 59-62