第 19 卷第 1 期
2000 年 1 月

无锡轻工大学学报
Journal of Wuxi University of Light Industry

Vol. 19, No. 1
Jan., 2000

文章编号：1009-038X(2000)01-0001-04

连续生产低聚果糖的最佳操作参数*

史 锋， 江 波， 王 璋
（无锡轻工大学食品学院，江苏无锡 214036）

摘 要：以海藻酸钙为载体包埋黑曲霉 AS0023 孢子，培养后得到固定化增殖细胞. 将此固定化增殖细胞填入填充床反应器中以用于连续化生产低聚果糖. 研究了连续操作时的最佳工艺参数. 结果表明，在 *D* 3.5 cm×50 cm 的小型夹套层析柱上，最佳操作参数为 pH 6.5，50 ℃，体积流量 1.3 mL/min 扩大到 *D* 5.5 cm×100 cm 中型填充床反应器中，确定其最佳操作参数为 pH 6.5，50 ℃，体积流量 6.0 mL/min 在此条件下所得产品中低聚果糖质量分数达 53%，并且连续反应 17 d 低聚果糖质量分数保持在 50% 以上.

关键词：填充床反应器 连续化生产 低聚果糖 最佳操作参数
中图分类号：Q533　　**文献标识码**：A

Optimal Operation Parameters for Continuous Production of Fructooligosaccharides

SHI Feng, JIANG Bo, WANG Zhang
(School of Food Science and Technology, WuXi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract: The spores of *Aspergillus niger* AS0023 were entrapped in calcium-alginate gels for growth to form immobilized growth cells(IGC). IGC were packed into a packed bed reactor for the continuous production of fructooligosaccharides (FOS). The optimal operation parameters of continuous production were studied. The results showed that the optimal experimental conditions were pH 6.5, 50 ℃ and 1.3 mL/min of flow rate for a small column (3.5 cm×50 cm) with a bed volume of 480 cm^3; the optimal operation parameters were pH 6.5, 50 ℃ and 6.0 mL/min of flow rate for a large column (5.5 cm×50 cm) with a bed volume of 2 360 cm^3. The FOS content of production was 53% in these conditions. The FOS content in the product could be maintained at a level higher than 50% for 17 d of continous production.

Key words: packed bed reactor; continuous production; fructooligosaccharides; optimal operation parameters

低聚果糖(FOS)是一种新的保健功能因子，具有促进双歧杆菌增殖、防治便秘等生理作用[2]，在国外已被开发利用[4~9]，而国内近 10 年在这方面的研究也有重大进展[1~3]. 低聚果糖既可用游离酶[1,8,9]、也可用固定化酶[2~7]由蔗糖转化而成，其生产步骤如下：

* 收稿日期：1999-05-07；修订日期：1999-11-02.
基金项目：国家科委“九五”攻关项目(96-C03-01-01).
万方数据
作者简介：史锋(1970 年 4 月生)，女，新疆乌鲁木齐人，食品科学博士研究生.

采用游离菌体：培养菌种→过滤→加入底物溶液反应→灭酶→活性碳吸附→分离.

采用固定化酶或细胞：

分批式：底物溶液→加入固定化酶反应→过滤分离产物溶液

连续化：底物溶液→经装有固定化酶的柱子→产物溶液

在3种方法中，连续化方法具有生产步骤简便、酶可循环使用且活力稳定、产物可直接得到等优越性，且体系中可溶性蛋白质少，利于脱色. 因此用填充床反应器进行低聚果糖的连续化生产具有良好的前景. 从国内外的研究来看，除日本、中国台湾学者用固定化方法得到低聚果糖产品外，其它所报道的连续化反应的规模均很小，仅处于实验室研究阶段，生产工艺参数也有待进一步确定. 作者试图通过研究，获得较大规模低聚果糖连续化生产的最佳操作参数，以利于进一步扩大至工业化生产.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 黑曲霉 AS0023，由本实验室从土壤中选育得到.

1.1.2 增殖培养基 蔗糖 175 g/L，酵母膏 5 g/L，蛋白胨 10 g/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L，K_2HPO_4 1 g/L，$CaCl_2$ 0.5 g/L.

1.2 实验方法

1.2.1 固定化增殖细胞的制备 取一管斜面孢子（孢子数为 10^{10}cfu），用 50 mL 无菌水洗下后，与 50 mL 4%海藻酸（预先经 121 ℃灭菌 15 min）混合均匀，经蠕动泵滴入 300 mL 无菌的 0.1 mol/L $CaCl_2$ 中，静置固化 1 h，得到直径为 3.7 mm 的均匀颗粒，无菌条件下移入含有 30 mL 培养基的 250 mL 容积锥形瓶中，经 30 ℃，210 r/min 摇瓶培养 30 h 即得.

1.2.2 连续化反应方法

1）*D* 3.5 cm×50 cm 夹套层析柱连续化反应方法：将制备好的固定化增殖细胞装入夹套层析柱内管至一定体积（420 mL），再加入适量底物溶液至 450 mL 处，旋紧上下端，平衡数小时后将夹套层析柱外夹套与超级恒温水浴仪相连，内管上端连进料液，内管下端连出料液，如图 1 所示. 进料液调至一定 pH 值后，开启超级恒温水浴至所需温度（50 ℃），同时开启恒流泵调节至一定体积流量后开始反应，当流出液体积超过两个床体积后，从出口端取样，稀释至 5%固形物质量分数，微孔过滤，作高压液相色谱（HPLC）分析.

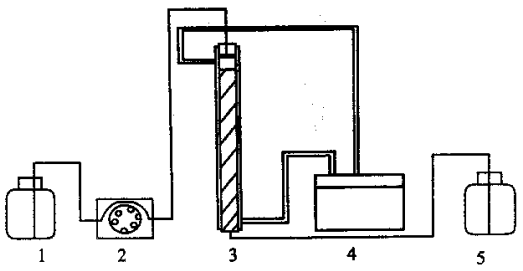


图 1 实验流程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of continuous production of FOS

2）*D* 5.5 cm×100 cm 夹套层析柱连续化反应方法：与 *D* 3.5 cm×50 cm 夹套层析柱连续化反应方法基本相同，但内管采用逆流式[7]，即内管下端通过 HL-I 型恒流泵与进料液相连，内管上端连出料液.

1.3 分析方法

采用高压液相色谱法分析产物中的糖质量分数[2].

2 结果与讨论

2.1 *D* 3.5 cm×50 cm 小柱最佳操作参数的确定 为了探索用固定化方法进行低聚果糖连续化生产的最佳操作参数，并确定其可行性，首先在 *D* 3.5 cm×50 cm 的小型夹套层析柱上试验，以得到最佳的反应 pH 值、温度及体积流量.

2.1.1 最佳体积流量的确定 在 pH 6.0，45 ℃条件下以 0.5～2.5 mL/min 体积流量进行试验，以确定最佳体积流量，结果见图 2. 可见，在 pH 6.0，45 ℃条件下最佳体积流量为 1.3 mL/min，此时所得低聚果糖质量分数为 45.58%.

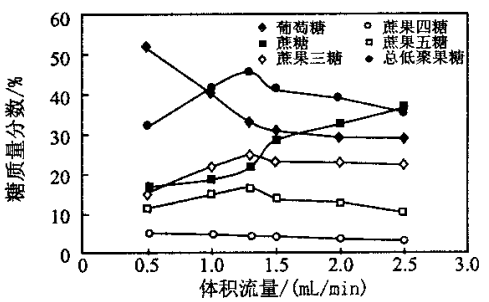


图 2 不同体积流量对糖质量分数的影响

Fig. 1 Effect of flow rate on product composition

2.1.2 最佳 pH 值和温度的确定 对于 *D* 3.5 cm×50 cm 填充床反应器，最佳体积流量为 1.3 mL/min，在此体积流量下通过两因素三水平全面试验，获得最佳反应 pH 值及温度，选定的 pH 值为 5.5，

万方数据

6.0,6.5 选定的温度为 45 ℃,50 ℃,55 ℃.结果见表 1.可见在 50 ℃、pH 6.5 下低聚果糖质量分数最高,达 47.61%;而据方差分析,50 ℃、pH 5.5 为最佳反应条件,但此时低聚果糖质量分数只有 46.01%,低于 50 ℃、pH 6.5 时的情况.这是由于温度升到 55 ℃酶开始失活,于是在第 8、9 次试验中低聚果糖质量分数明显降低,影响到 pH 6.0,pH 6.5 时的整体结果.因此在低聚果糖连续化酶促生产时,反应温度不能超过 55 ℃,以防止酶失活速度加快.总的来说,对于 D 3.5 cm×50 cm 的小型填充床反应器,最佳的操作参数为 50 ℃,pH 6.5,体积流量 1.3 mL/min.由于不同型号的填充床反应器其最佳反应速度是不同的,而最佳反应温度没有变化,最佳 pH 值还需进一步确定,因此在扩大到 D 5.5 cm×100 cm 的中型填充床反应器时,温度均控制在 50 ℃,通过考察不同 pH 值及体积流量下的反应情况,获得最佳的操作条件.

表 1　不同条件下采用固定化增殖细胞连续化生产低聚果糖产品中低聚果糖(FOS)质量分数

Tab. 1　The fructooligosaccharides content of products when using immobilized growth cells to produce fructooligosaccharides continuously at different conditions

次数	温度/℃	pH 值	FOS 质量分数/(%)
1	45(1)	5.5(1)	45.06
2	45(1)	6.0(2)	45.58
3	45(1)	6.5(3)	42.45
4	50(2)	5.5(1)	46.01
5	50(2)	6.0(3)	47.61
6	50(2)	6.5(3)	47.61
7	55(3)	6.0(2)	46.36
8	55(3)	6.0(2)	37.19
9	55(3)	6.5(3)	31.96
K_1	133.09	137.42	
K_2	138.99	128.14	
K_3	115.52	122.03	
R	7.82	5.13	

2.2　D5.5 cm×100 cm 大柱最佳操作参数的确定

把体积流量选在 10 mL/min 左右进行试验,并分别研究 pH 6.0,pH 6.5,pH 7.5 时的反应情况.采用逆流式操作,以防止固定化增殖细胞受力压缩导致体积流量变化.

2.2.1　pH 6.0 下体积流量的确定　在 50 ℃,pH 6.0 条件下以不同体积流量进行连续化反应,其结果见图 3.可见,在 6.1 mL/min 体积流量时低聚果糖质量分数最高,达到 51.99%;在 9.39 mL/min 体积流量时低聚果糖质量分数也接近 50%.

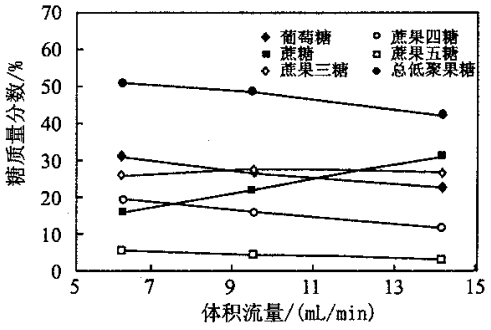


图 3　体积流量对糖质量分数的影响(pH 6.0)

Fig.3　Effect of flow rate on product composition(pH 6.0)

2.2.2　pH 6.5 条件下体积流量的确定　在 50 ℃,pH 6.5 条件下以不同体积流量进行连续化反应,其结果见图 4.在 6.0 mL/min 体积流量时低聚果糖质量分数最高,达 53.07%,此时蔗糖质量分数虽说已降到 17.06%,但葡萄糖质量分数还未达到 30%,因而其抑制作用较弱.对比 pH 6.0 与 pH 6.5 时的反应情况,可见 pH 6.5 时低聚果糖质量分数要略高一些,后者更利于低聚果糖的生产,但它们相差不大.

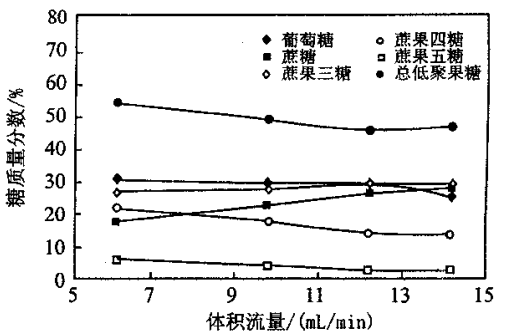


图 4　体积流量对糖质量分数的影响(pH 6.5)

Fig.4　Effect of flow rate on product composition(pH 6.5)

2.2.3　pH 7.5 条件下体积流量的确定　在 50 ℃,pH 7.5 条件下以不同体积流量进行连续化反应,其结果见图 5.

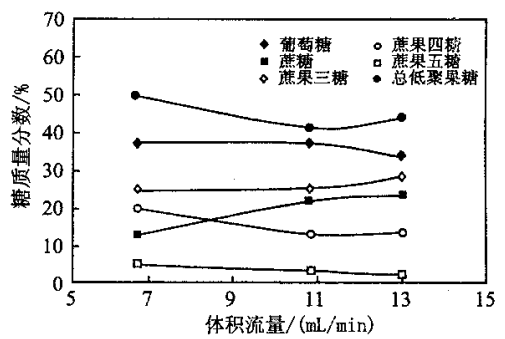


图 5　体积流量对糖质量分数的影响(pH 7.5)

Fig.5　Effect of flow rate on product composition (pH 7.5)

万方数据

在此pH值下,葡萄糖质量分数较高,在整个流速范围内均超过30%,抑制作用较强,不利于低聚果糖的生产;在6.6 mL/min时低聚果糖质量分数最高,但尚未达到50%.将3种pH值时低聚果糖的生产情况绘于图6.

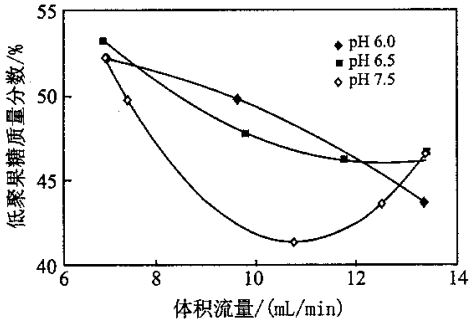


图6 不同pH值下体积流量对低聚果糖质量分数的影响

Fig.6 Effect of flow rate on fructooligosaccharides content at different pH value

可以看出,在3种pH值下,pH 6.5与pH 6.0时的低聚果糖质量分数较高,其中pH 6.5略优于pH 6.0,而pH 7.5时含量太低,未达到50%.最佳的反应条件为pH 6.5,体积流量6.0 mL/min,此时达到反应的最高点,即将转入葡萄糖的抑制阶段,低聚果糖质量分数为53.07%.因此不再降低体积流量进行试验,而接着在pH 6.5, 50 ℃,6.0 mL/min体积流量下连续运行,以观察产品中低聚果糖质量分数的变化.

2.2.4 连续反应17 d产品中低聚果糖质量分数的变化 以pH 6.5,50 ℃,6.0~6.4 mL/min体积流量连续反应17 d,每天平均反应9 h,其余时间固定化增殖细胞于室温下(约为22 ℃)放置,其结果见图7.在17 d内低聚果糖质量分数保持在50%以上,基本没有降低.

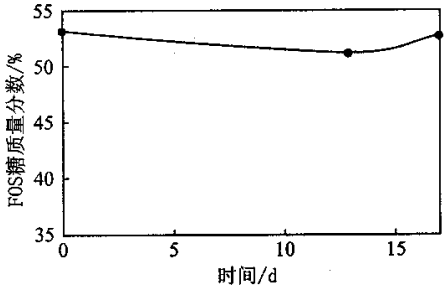


图7 固定化酶长期连续反应的时间曲线

Fig.7 Time curve of continuous long-term reaction for immobilized enzyme

3 结 论

研究了用固定化方法,连续化生产低聚果糖的最佳工艺参数.在D 3.5 cm×50 cm的小型夹套层析柱上,最佳操作参数为pH 6.5,50 ℃,体积流量1.3 mL/min扩大到D 5.5 cm×100 cm中型填充床反应器,则为pH 6.5, 50 ℃,体积流量6.0 mL/min在此条件下产品中低聚果糖质量分数达53%,连续反应17 d低聚果糖质量分数保持在50%以上.

参考文献

[1] 林伟峰,赵谋明.酶法生产低聚果糖技术的探讨[J].食品与发酵工业,1996(4):76~80

[2] 江波.固定化黑曲霉生产低聚果糖的研究[D].无锡:无锡轻工业学院,1992.

[3] 魏远安,马丽,杨海等.固定化酶法合成蔗果低聚糖的研究[J].食品与发酵工业,1995(4):12~16

[4] HAYASHI S, KINOSHITA J M, Nonoguchi Y. Continuous production of 1~kestose by β~fructofuranosidase immobilized on shirasu porous glass[J]. **Biotechnol Lett**, 1991, 13:395~398

[5] HAYASHI S, SASAO S, Takasaki Y. Immobilization of β~fructofuranosidase from Aureobasidium on DEAE~cellulose[J]. **J Indus Microbiol**, 1994, 13:103~105

[6] YUN J W, KANG S C, SONG S K. Continuous production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized fructosyltransferase[J]. **Biotech Techniques**, 1995, 9(11):805~808

[7] YUN J W, JUNG K H, OH J W. Semibatch production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized cells of Aureobasidium pullulans[J]. **Applied Bioche and Biotechnol**, 1990, 24/25:299~308

[8] YUN J W, SONG S K, The production of high~content fructooligosaccharides from sucrose by the mixed~enzyme system of fructosyltransferase and glucooxidase[J]. **Biotechnol Lett**, 1993, 15(6):573~576

[9] JUNG K H, KIM J H, JEON Y J. Production of high fructooligosaccharides with two enzyme system of fructosyltransferase and glucooxidase[J]. **Biotechnol Lett**, 1993, 15(1):65~70

万方数据

(责任编辑:秦和平)