

葡聚糖凝胶过滤层析分离低聚半乳糖

冯咏梅^{1,2} 常秀莲² 王文华² 马润宇^{1*}

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 烟台大学化学生物理工学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 采用葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 柱对低聚半乳糖混合物进行了分离提纯, 确定了适宜的洗脱流速和温度。结果表明, 操作温度 70℃, 洗脱流速 20 mL/h, 凝胶柱 90 cm×1 cm, 当进料量由 1 mL 增至 10 mL, 低聚半乳糖(GOS, 三糖及三糖以上的低聚糖组分)的产量提高了 4.62 倍, 整个洗脱过程只需 4.1 h, 可以有效地去除葡萄糖, 得到纯度为 85.03% 的含少量乳糖的 GOS 混合物。此混合物经过二次上柱后, 分离效果明显优于一次上柱, 得到的 GOS 质量分数达 89.39%。

关键词: 低聚半乳糖; 葡聚糖凝胶; Sephadex G-25; 柱层析

中图分类号: TS202.2

引言

低聚半乳糖(GOS)是牛乳和人乳中主要的低聚糖, 是很好的双歧杆菌增殖因子^[1]。GOS 是以高浓度乳糖做底物, 在半乳糖苷酶的作用下, 将乳糖水解的半乳糖转移到乳糖基上, 制得的低聚半乳糖是在乳糖的半乳糖基一侧结合 1~4 分子的半乳糖的混合物。反应得到的 GOS 的浓度和结构决定于酶源的性质等因素^[1], 目前酶法合成低聚半乳糖的收率为 24%~57%^[1-3], 溶液中还存在相当量的乳糖、少量葡萄糖和极少量的半乳糖, 因此, 分离提纯是制备高浓度低聚半乳糖的关键技术之一。目前低聚糖分离提纯的主要方法有膜分离法^[3-5]、色谱柱分离法^[6-9]、酶法^[10]和微生物发酵法^[11]。葡聚糖凝胶可以较好地分离提纯羊奶寡糖和肝素寡糖等低聚糖^[5-6], 本文尝试采用 Sephadex G-25 对 GOS 混合物进行分离提纯, 并确定了最佳分离条件。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

葡聚糖凝胶 Sephadex G-25, 上海君创科技有限公司; GOS 混合物由烟台华海生物制品有限公司提

供, 经 NF-3(美国 Sepro 公司)纳滤膜分离纯化浓缩后, HPLC 分析其质量浓度为 340 mg/mL, 组成为葡萄糖 7.12%, 乳糖 40.38%, GOS 52.50%。

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; 带夹套层析柱, 上海华美仪器有限公司; DGL-2002 型电热鼓风干燥箱, 龙口先科仪器有限公司; Sc-15 数控超级恒温槽, 宁波天恒仪器厂。

1.2 吸附分离

20 g Sephadex G-25 凝胶室温下溶胀 24 h, 倾出上层细小颗粒, 加热至沸腾脱气后自动沉降法装入 100 cm×1 cm 的层析柱中, 装填高度为 90 cm, 由超级恒温水浴控制洗脱温度, 由自动收集器收集洗脱液。在分离过程中, 采用加热至沸腾的去离子水为流动相, 进料量 1 mL, 洗脱速度 6~40 mL/h。

1.3 HPLC 分析方法

各种糖组分的含量采用 HPLC 进行分析测定。色谱条件: G1362A 示差折光检测器; Aichrom-NH2 色谱柱(4.6 mm×250 mm); 流动相为乙腈水混合液, 体积比为 77:23; 流速 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL, 柱温 25℃。

1.4 薄层层析法

采用自制的 GF 硅胶薄板。展开剂为 $V_{\text{正丁醇}}: V_{\text{乙醇}}: V_{\text{水}} = 5:3:2$, 显色剂: 1 g 二苯胺, 1 mL 苯胺, 50 mL 丙酮和 5 mL 85% 磷酸混合, 90℃ 显色 15 min。

2 结果与讨论

2.1 流速对分离效果的影响

温度为 15℃, 进料量为 1 mL, 洗脱液流速分

收稿日期: 2008-03-17

基金项目: 山东省自然科学基金(Y2005B06)

第一作者: 女, 1971 年生, 副教授, 在职博士

* 通讯联系人

E-mail: r.ma@mail.buct.edu.cn

别为 6, 10, 20 和 40 mL/h 时进行分离操作(常温下凝胶溶胀度小, 内孔隙小, 黏度较大, 洗脱流速达不到 40 mL/h, 为了在此流速下操作, 将实验温度升至 70 ℃), 每 2 mL 收集一管, 洗脱液经薄层层析确定 GOS 的出峰时间及总洗脱时间。将收集的富 GOS 组份经 0.45 μm 的微滤膜过滤后 HPLC 分析其组成, 结果见表 1。

表 1 流速对 GOS 分离效果的影响
Table 1 Effect of flow rate on the separation of the GOS mixture

流速/ $\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$	GOS 出峰 时间/h	总洗脱 时间/h	$w(\text{GOS})/\%$	GOS 收率/ %
6	8	12	88.57	73.30
10	4.5	7	79.63	69.97
20	2.3	3.4	74.75	71.81
40	2.1	3.2	68.17	59.48

由表 1 可见, 洗脱流速越小分离效果越好, 但同时洗脱的时间也越长, 单位凝胶的生产能力也越低; 若洗脱流速加快, 则洗脱时间减少, 但洗脱效果不好, 产品中 GOS 质量分数及收率降低。从工业化的角度考虑, 洗脱液流速为 20 mL/h 时出峰时间较早, 总洗脱时间只需 3.4 h, 与流速为 40 mL/h 的洗脱时间相差甚微; 同时, 其洗脱效果与流速 10 mL/h 的相差不大, 因此, 在后面的实验中洗脱液流速均采用 20 mL/h。

GOS 原样及流速 20 mL/h 的富 GOS 收集组份(未经浓缩)的 HPLC 谱图见图 1, 谱图中按照时间顺序依次出峰的为葡萄糖、乳糖、三糖、四糖和五糖。

在决定收集的管号时发现, 得到的富 GOS 的质

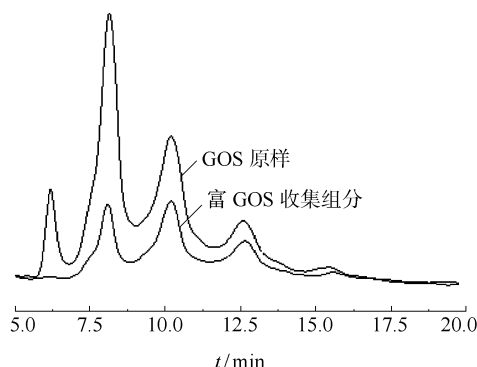


图 1 GOS 产品原样及富 GOS 组分的 HPLC 谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of the original GOS sample and after enrichment with a flow rate 20 mL/h

量分数和收率实际上是互相制约的, 要想提高混合物中 GOS 的收率, 得到的 GOS 含量就较低, 本文欲提高 GOS 的质量分数, 故只能以降低其收率为代价。收集的标准: 乳糖含量低于 50%, 则收集于富 GOS 组分中, 否则, 收集于富乳糖组分中。

2.2 温度对分离效果的影响

GOS 热稳定性非常好, 180 ℃ 下长时间加热不会发生分解^[12]。故取待分离的 GOS 混合物 1 mL, 在流速为 20 mL/h 的条件下, 水浴温度分别为 40, 60, 70 和 80 ℃ 进行分离操作, 每 2 mL 收集一管。80 ℃ 时凝胶柱对 GOS 混合物的分离效果见图 2, 图中 GOS 的质量浓度为三糖、四糖和五糖的总质量浓度。

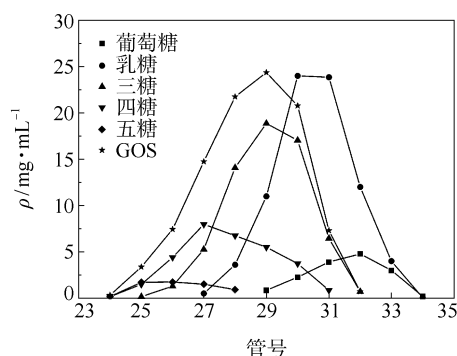


图 2 80 ℃ 时 GOS 混合物的分离效果
Fig. 2 Separation results for the GOS mixture at 80 ℃

将分离的组分经薄板和 HPLC 分析, 与常温 15 ℃ 的分离效果进行比较发现, 常温下分离, 低聚糖较分散, 明显不如升温时集中, 这是因为随着温度的升高, 流动相和物料的粘度都随之降低, 具有更好的流动性, 因而分离度提高。黏度测定发现, 温度由 15 ℃ 升至 40 ℃ 时, 原料黏度由 7.0 mPa·s 快速降为 2.4 mPa·s, 而后随温度的升高缓慢降低。因而在 40~80 ℃ 之间操作, 不同温度下 GOS 的出峰时间及总洗脱时间基本一致, GOS 含量和收率也相差不大, 分离效果基本稳定, 不同温度下层析得到的 GOS 的含量及收率见表 2。

实验同时测定了 5, 10, 15 mL 进料量的适宜操作温度, 发现与 1 mL 进料量有相同的规律。但随进料量增加, 柱中物料粘度增加, 因而允许的最低操作温度(洗脱液流速能达到 20 mL/h)需提高到 40 ℃, 50 ℃ 和 60 ℃。而进料量为 5 和 10 mL 时, GOS 达到最佳分离效果的温度为 70 ℃, 进料量 15 mL 的最佳分离温度为 80 ℃。

表 2 温度对分离效果的影响

Table 2 Effect of temperature on separation

温度/℃	$w(\text{GOS})/\%$	GOS 收率/%
15	74.75	71.81
40	81.43	72.67
60	83.03	69.24
70	85.09	70.55
80	84.57	71.34

利用离子交换树脂分离低聚糖^[7-8],需要的柱长往往超过 4 m,得到的低聚糖中仍含有相当量的其他组分;利用聚丙烯酰胺凝胶 Bio Gel P-4 分离木低聚糖^[9]效果比本研究稍好,但分离时间需要 27 h,低聚糖产量也很低。

2.3 进料量对分离效果的影响

进料量分别为 1, 5, 10 和 15 mL 时进行分离操作,洗脱温度采用 70℃ (15 mL 采用 80℃)。将各个条件下收集的富 GOS 组份经薄层层析、HPLC 分析其 GOS 的质量、质量分数及收率见表 3。

表 3 进料量对 GOS 分离效果的影响

Table 3 Effect of injection volume on separation of the GOS mixture

进料量/ mL	洗脱温 度/℃	$m(\text{GOS})/mg$	$w(\text{GOS})/\%$	GOS 收率/%	总洗脱 时间/h
1	70	127.48	85.09	70.55	3.4
5	70	330.84	87.43	36.75	3.8
10	70	589.56	85.03	32.75	4.1
15	80	705.24	84.58	26.12	4.5

由表 3 可以看出,实验条件下,随着进料量的增加 GOS 的收率明显降低,但得到的 GOS 的总质量却大大增加了,而且不同的进料量所需要的总洗脱时间及富 GOS 组分中 GOS 的含量相差不大。薄层层析图可见,所有的富 GOS 组分基本都集中在大约 10~16 mL 的溶液中,而富乳糖组分也集中在 14~30 mL 溶液中,这部分溶液经浓缩后可以二次上柱分离,因此,进料量增加对葡聚糖凝胶分离 GOS 混合物更有利,可以大大提高分离能力。从得到的 GOS 总质量看,5, 10, 15 mL 的进料量得到的 GOS 的总质量分别为 1 mL 进料量的 2.59, 4.62, 5.53 倍,而总洗脱时间相差不大。但实验发现,若进料量增加到 15 mL,经过几次进料后,凝胶明显被压实,柱子无法正常工作,这可能是由于 GOS 粘度和密度较大,随进料量的增加,流动阻力增加,柱压

升高,引起部分凝胶的糖苷键水解或凝胶交联结构受损^[13],从而导致凝胶逐渐被压实。同时,虽然在中性条件下葡聚糖凝胶能耐受长时间蒸煮,但研究者^[13]发现沸腾可能造成部分凝结颗粒结构破坏,所以尽量不要选择太高的层析温度。因此,较适宜的进料量为 10 mL,洗脱温度为 70℃。

100 mL 原料分 10 次进料,每次进料量 10 mL,将收集的富乳糖组分浓缩后二次上柱,得到的富 GOS 组份中 GOS 含量为 85.34%,收率为 31.70%,二次上柱的富乳糖组分浓缩后三次上柱,得到的富 GOS 组份中 GOS 含量为 84.98%,收率为 30.48%,经过三次上柱所得的 GOS 总收率达 68.07%,所用总时间为仅需 86.1 h。而若 100 mL 原料分 100 次进料,每次进料量 1 mL, GOS 要达到 70% 的收率则需要 340 h。

2.4 进料质量浓度对分离效果的影响

进料质量浓度对柱层析结果的影响表现为:质量浓度太小,料液被稀释而降低效率;质量浓度太大,层析分辨率降低;而若质量浓度适宜且进料量不变,则对分辨率没有影响^[7]。为了考察本实验条件下最适宜的进料质量浓度,测定了 70℃ 下原料质量浓度分别为 200, 340, 550, 750 mg/mL 的最大进料量。结果发现,能在需要的流速下正常操作且达到较好分离效果的前提下,各个质量浓度的最大进料量分别为 15, 10, 3, 1 mL,即实际处理的物料干重分别为:3, 3.4, 1.65, 0.75 g。因此本研究条件下,最佳进料质量浓度和进料量确定为 340 mg/mL, 10 mL。

2.5 富 GOS 组分重复上柱对分离效果的影响

将数次经一次层析分离所得到的富 GOS 组分混匀,用 HPLC 分析其组成,然后加热浓缩,取 1 mL 该产品进行二次上柱,流速为 20 mL/h,温度为 70℃,将得的富 GOS 收集组份预处理后用 HPLC 分析其组成,两次上柱分离后富 GOS 组分的比较如表 4 所示。

表 4 一次上柱和二次上柱分离结果的比较

Table 4 Comparison of the effect of the first and second separations

上柱 次数	$w/\%$					GOS 收率/%
	乳糖	三糖	四糖	五糖	GOS	
一次	15.32	45.81	33.71	5.16	84.68	70.28
二次	10.61	47.85	35.04	6.51	89.39	71.86

由表 4 可以看出,二次分离的效果明显优于一

次分离的效果,二次分离得到的富 GOS 组分中二糖的含量明显降低,各种低聚糖的含量都有所提高,GOS 的百分含量及收率也都有所提高,可见重复分离对于 GOS 混合物的分离提纯有重要的意义。

3 结论

采用葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 可初步分离 GOS 混合物。凝胶柱 1 cm×90 cm,进料量 1 mL,操作温度 40~80℃,洗脱流速 20 mL/h 时得到的富 GOS 组分中 GOS 的平均质量分数为 84.59%,平均收率为 70.9%,洗脱时间 3.4 h。实验条件下最佳进料量为 10 mL, GOS 的产量为 1 mL 进料量的 4.62 倍, GOS 质量分数为 85.03%,收率为 32.75%,洗脱时间 4.1 h。

富 GOS 组分经二次上柱分离后, GOS 的质量分数比仅经过一次上柱分离有显著的提高,一次分离的质量分数为 84.68%,二次分离的质量分数为 89.39%,收率分别为 70.28% 和 71.86%。

参考文献:

- [1] Shin H J, Park J M, Yang J W. Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by Bullera singularis β -galactosidase immobilized in chitosan beads[J]. Process Biochemistry, 1998, 33(8): 787-792.
- [2] Iwasaki K, Nakajima M, Nakao S. Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymic batch reaction using β -galactosidase[J]. Process Biochemistry, 1996, 31(1): 69-76.
- [3] Goulas A K, Kapasakalidis P G, Sinclair H R, et al. Purification of oligosaccharides by nanofiltration[J]. Journal of Membrane Science, 2002, 209 (1): 321-335.
- [4] Xu L, Wang S Y, Zeng X Y. The maltitol purification and concentration by nanofiltration [J]. Desalination, 2005, 184: 295-303.
- [5] Martinez-Ferez A, Guadix A, Guadix E M. Recovery of caprine milk oligosaccharides with ceramic membranes [J]. Journal of Membrane Science, 2006, 276(1): 23-30.
- [6] Chuang W L, McAllister H, Rabenstein D L. Chromatographic methods for product-profile analysis and isolation of oligosaccharides produced by heparinase-catalyzed depolymerization of heparin [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 932: 65-74.
- [7] 彭红, 林鹿, 孙勇, 等. 阳离子交换树脂分离纤维低聚糖的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 128(1): 4-8.
- [8] 姜守霞, 励雯波. 异麦芽低聚糖浆的分离与测定[J]. 理化检验: 化学分册, 2005, 41(12): 897-899.
- [9] 洪枫, 勇强, 赵林果, 等. 木低聚糖的分离提纯和定性分析[J]. 食品与发酵工业, 1998, 25(2): 35-38.
- [10] Hocine L L, 江波, 王璋. 双酶法生产高纯度低聚果糖的研究[J]. 食品科学, 1997, 18(9): 24-27.
- [11] 袁其朋, 马润宇, 张鑫. 发酵法精制大豆低聚糖的研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 56-59.
- [12] 郑建仙, 李璇. 发展前景广阔的乳糖深加工产品——低聚半乳糖[J]. 中国食品工业, 1998, 15(12): 26-28.
- [13] 王璞, 林红, 朱滨. 凝胶过滤层析实验中 Sephadex 的溶胀与回收保存[J]. 实验技术与管理, 2006, 23(2): 24-25.

Isolation of galacto-oligosaccharide by filtration

FENG YongMei^{1,2} CHANG XiuLian² WANG WenHua² MA RunYu¹

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. College of Chemistry and Biology, Yantai University, Yantai Shandong 264005, China)

Abstract: A Sephadex G-25 gel filtration chromatographic column (90 cm×1 cm) has been used for the isolation of a galacto-oligosaccharide (GOS) mixture, and a suitable elution flow-rate and temperature were determined. The results show that when the sample volume was increased from 1 mL to 10 mL, the amount of GOS (sum of tri-, tetra- and pentasaccharides) obtained increased 4.62 times, with a purity of 85.03% after only 4.1 h elution at under 70℃ with an elution flow rate of 20 mL/h. After a second chromatographic separation of the initial separated fraction, the purity of GOS approached 89.39%, significantly better than after the first chromatographic separation.

Key words: galacto-oligosaccharide; dextran gel; Sephadex G-25; column chromatograph