

文章编号:1009-038X(2004)02-0012-05

微生物胞外多糖——热凝胶的酶法提取

傅强¹, JINWOO Lee², 詹晓北¹, 彭冬兵¹

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. Dong-A University, Pusan Korea 604-714)

摘要: 采用中性蛋白酶处理热凝胶胞外多糖发酵液, 降解其中的菌体, 实验证明, 与传统的酸碱法相比, 中性蛋白酶法更能有效地对热凝胶多糖发酵液提纯, 而且保持了其主要性能——热成胶性. 进一步确定了酶法提取纯化热凝胶的最优条件, 获得的多糖产品为纯一的 β -(1,3) 葡聚糖, 且有效地去除了蛋白质等杂质.

关键词: 微生物胞外多糖; 热凝胶; 中性蛋白酶; 提取

中图分类号: Q 539

文献标识码: A

Enzyme Processing of Extracted Microbial Exopolysaccharide-Curdlan

FU Qiang¹, JINWOO Lee², ZHAN Xiao-bei¹, PENG Dong-bin¹

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Dong-A University, Pusan Korea 604-714)

Abstract: Curdlan has abroad application in food field for its unique thermo-gelling property. Traditionally, curdlan was recovered from the fermentation broth by base-acid processing. However, this method could change the conformation of curdlan, and greatly decrease the thermo-gelling capacity of the extracted curdlan. To enhance the thermo-gelling capacity, neutral proteinase was chosen to process curdlan fermentation broth. The results showed that, extracting curdlan with neutral proteinase was more efficient than the base-acid processing method. Further research determined the optimal enzyme processing conditions. The extracted polysaccharide by neutral proteinase was identified as β -(1,3)-glucosan. The protein in production was removed, and its thermo-gelling property was remained.

Key words: microbial exopolysaccharide; curdlan; neutral proteinase; extracting

热凝胶^[1] (Curdlan), 又叫凝结多糖、热凝多糖, 它是一种微生物胞外多糖, 不溶于水, 完全由 β -1,3-葡萄糖残基线性连接组成, 相对分子质量约为 44 000~80 000. 由于其在水中分散加热可以形

成凝胶的特性, 使它在食品生产领域被广泛应用^[1]. 热凝胶是继黄原胶、结冷胶之后新的微生物发酵生产的多糖. 这种食品添加剂由日本武田药品有限公司 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 生

收稿日期: 2003-06-30; 修回日期: 2003-12-29.

基金项目: 江苏省国际合作基金项目 (BS99719) 资助课题.

作者简介: 傅强 (1976-), 男, 湖南长沙人, 发酵工程硕士研究生.

产,并以 Pureglucan™ 为商品名,从 1989 年起在日本、韩国、台湾广泛使用^[2]。美国 FDA 于 1996 年准许将其作为食品的稳定剂、增稠剂用于食品配料中。

相对于其它微生物多糖来说,热凝胶在国内研究较少,特别是关于提取方面的研究论文几乎没有。热凝胶发酵液与其它微生物多糖发酵液不同,它不溶于水,在发酵结束后与菌体一块沉在反应器底部,不容易与菌体分离,且由于其独特的热成胶性,不能采用常规的有机溶剂沉淀、高速离心、微孔滤膜过滤、硅藻土吸附过滤等分离方法^[3],查阅关于热凝胶的提取和纯化的外文资料,涉及到的仅是酸碱化学法提取^[4]。基于热凝胶溶于 NaOH 溶液的物理性质,此法简便易行,且提取所用试剂为实验室常用的酸碱,成本低廉,但据日本 kyoto 大学的 TOSHIO Tada, TAKAYOSHI Matsumoto, TOSHIRO Masuda 研究发现,热凝胶在 NaOH 溶液中,其空间结构会发生变化,从而造成其热成胶性大大下降^[5]。根据实验室实际提取效果来看,用酸碱法提取的热凝胶,其凝胶性能的确与热凝胶发酵液成胶性差别较大,无法得到成胶性好的成品,由此考虑采用其它方法。有人用混合酶处理虫草菌菌丝体进行破壁溶菌研究,且效果较好,有人曾用蛋白酶对谷氨酸菌进行破壁提取的研究^[6],还有人用木瓜蛋白酶脱蛋白技术用于螺旋藻多糖提取工艺中^[7]。根据热凝胶生产菌的结构特点,本实验采用细菌中性蛋白酶降解菌体。实践证明该法能较完全地降解发酵液中菌体,得到较好热成胶性的热凝胶多糖,有较好的提纯效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 作者所在实验室保藏的粪产碱杆菌 WX-C12(*Alcaligenes faecalis* var. *myxogene*)

1.1.2 酶制剂 液态细菌中性蛋白酶,无锡杰能科酶制剂有限公司提供,测得酶活为 1.7×10^5 U/mL。

1.1.3 化学试剂 1 mol/L NaOH 溶液,3 mol/L HCl,体积分数 95% 的乙醇。

1.1.4 主要仪器 高速冷冻离心机(CF702 型):日本日立公司制造;水浴恒温振荡器(SHZ-22 型):太仓市医疗机械厂生产;水分分析仪(MA40 型):德国 SARTORIUS 公司生产;红外光谱仪(5DXB FT-IR 型):Nicolet Spectrometer 产品;紫外光谱分析仪(UV3000 型):日本 HITACHI 公司生产;物

性测试仪(TA. xTzi 型):采用英国 Stable Micro system 产品。

1.2 方法

1.2.1 酸碱法提取热凝胶工艺流程 综合所查资料和本实验室研究的结果,酸碱法提取工艺如下:

WX-C12 发酵得到的发酵液 $\xrightarrow[\text{弃去上清液}]{\text{离心}}$ 沉淀
 $\xrightarrow[\text{充分溶解}]{\text{加入 1 mol/L NaOH}}$ 粘稠的糊状液 $\xrightarrow[\text{除去沉淀}]{\text{离心}}$ 热凝胶的碱溶液
 $\xrightarrow[\text{调 pH 值至 7.0}]{\text{加入 3 mol/L HCl}}$ 无色半透明的胶状沉淀
 $\xrightarrow[\text{冷冻干燥}]{\text{透析除盐}}$ 热凝胶成品

1.2.2 中性蛋白酶法提取热凝胶的工艺流程 中性蛋白酶提取工艺如下:

WX-C12 发酵得到的发酵液 $\xrightarrow[\text{调温度}]{\text{调 pH 值}}$ 酶解罐
 $\xrightarrow[\text{控制 pH 值、温度}]{\text{加入一定比例的酶液}}$ 酶解液 $\xrightarrow[\text{除去上清液}]{\text{离心}}$ 热凝胶沉淀
 $\xrightarrow[\text{冷冻干燥}]{\text{加入 2~3 倍体积的乙醇}}$ 凝结沉淀 $\xrightarrow[\text{冷冻干燥}]{\text{透析除盐}}$ 热凝胶成品

1.2.3 分析方法

1) 不溶性固形物的测定:将一定量的样品液经 8 000 r/min 离心 10 min,倾出上清液,将剩余的固形物烘干至恒重,称重,计算样品溶液中不溶性固形物的含量^[8]。

2) 镜检:将酶解液制成干燥玻片(结晶紫染色),油镜检查细胞破碎情况。

3) 微生物检测:平板计数法。

4) 总氮测定:凯氏定氮法。

5) 酶活测定:福林-酚法。

6) 红外光谱分析:将提取后的样品用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液溶解,离心除去不溶物,上清液用 Seavage 法除去蛋白质后,将清液置入截留相对分子质量 10 000~20 000 层析袋中,透析 3 d,每天换水 4~5 次,并将层析后的样品冷冻干燥。取干燥样品 2 mg 左右,与 100~200 mg 经干燥的 KBr 粉末在玛瑙研钵中轻轻研磨均匀,压片机压成薄片,用红外光谱仪作全波段扫描^[9,10]。

7) 紫外光谱分析:多糖样品配成质量浓度 2 g/L 的溶液,用 U-3000 型紫外分光光度计在 190~400 nm 范围内扫描,检查有无核酸和蛋白质。

8) 凝胶断裂强度测定:用英国的 TA. xTzi Texture Analyser 测定断裂强度。方式 (Mode): Force;探头 (Probe): A/TG;探头移动距离 (Distance): 15 mm;移动速度 (Speed): 1 mm/s。

2 结果与讨论

2.1 酶法提取热凝胶的工艺条件

2.1.1 作用时间对酶解效果的影响 取一定量的发酵液在 55 ℃, pH 7.0, 体积分数 1% 的酶加量下, 分别取酶解时间为 0, 2, 4, 6, 8 h 的发酵液进行不溶性固形物测定(见图 1)。随着酶解时间延长, 不溶性固形物的含量不断下降, 直到 6 h 以后, 降到最低点。这说明发酵液中的菌体被降解成小分子物质和碎片, 易进入上清液而被除去, 使发酵液中不溶性固形物减少。这时从镜检中可以看到视野中大多数被染成紫色的菌体边缘模糊, 且出现了大量的细片状物。在 6 h 以后, 不溶性固形物的含量降低幅度不大。综合考虑酶解时间、对生产周期、设备利用率的影响, 故选择最佳酶解时间为 6 h。

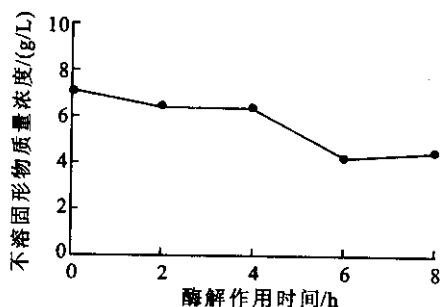


图 1 酶解时间对发酵液酶解的影响

Fig. 1 The effect of time on proteinase treatment

2.1.2 温度对酶解效果的影响 根据厂家提供的中性蛋白酶说明, 其温度范围是在 40~60 ℃ 之间最有效, 所以取 40, 45, 50, 55, 60 ℃ 等条件, 酶解 6 h 后取出, 检测其中不溶性固形物含量(见图 2)。随着酶解温度的提高, 其不溶性固形物的含量持续下降, 当温度为 55 ℃ 时, 不溶性固形物的含量降至最低, 再升高温度, 不溶性固形物的含量反而升高。这可能是由于温度再升高, 引起酶蛋白变性失活, 导致酶解不彻底所致, 故选择最适酶解温度为 55 ℃。

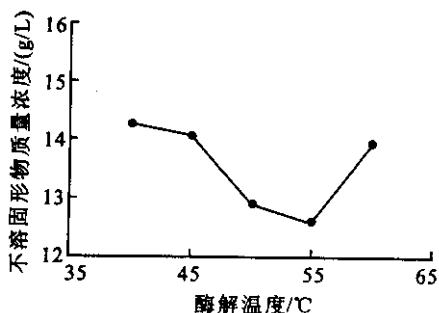


图 2 酶解温度对发酵液酶解的影响

Fig. 2 The effect of temperature on proteinase treatment

2.1.3 不同的加酶量对酶解效果的影响 在 55 ℃, 水浴摇床振荡 6 h 的条件下, 按照发酵液的体积百分比添加液体中性蛋白酶, 研究最适酶的添加比例(见图 3)。在本实验条件下, 随着加酶量的增加, 不溶性固形物的含量下降; 当酶的添加量超过体积分数 1% 时, 不溶性固形物的含量下降不明显。为了节省酶的用量, 并考虑综合生产成本和酶解最大效果, 故选用酶的最适用量为体积分数 1%。

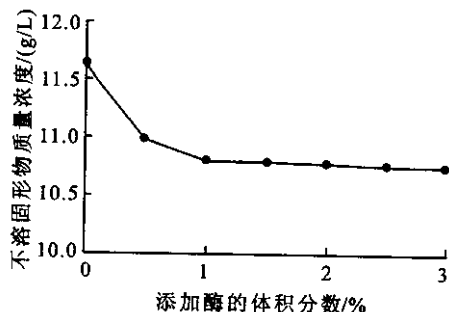


图 3 酶添加量对发酵液酶解的影响

Fig. 3 The effect of enzyme concentration on proteinase treatment

综上所述, 酶法提取热凝胶的最佳酶解工艺条件为体积分数 1% 的酶添加量, 温度为 55 ℃, 水浴振荡 6 h, 可以获得最佳酶解效果。

2.2 热凝胶提取物的性能分析

2.2.1 物理性能 热凝胶多糖冷冻干燥的产品为白色粉末, 不溶于水, 2 g/dL 的悬浊液均质后在 100 ℃ 加热 10 min, 形成弹性较好的固体凝胶, 冷却后, 弹性不变, 并有少量水析出, 在 pH 值 2~12 的范围内稳定, 与商品级热凝胶较为接近。

2.2.2 微生物指标 提取产品涂布平板, 菌落计数 < 1000 个/g。

2.2.3 纯度分析 经酶法提取和用酸碱法提取的热凝胶, 用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液溶解成 1 g/dL 的溶液, 离心, 取上清液, 紫外扫描检查 2 种方法提取的热凝胶是否有核酸和蛋白质特征吸收(见图 4, 5)。比较两图可以看出, 两者都在 221 nm 处有紫外吸收峰, 但是酸碱法提取的 Curdlan 没有核酸的吸收峰, 而酶法提取的 Curdlan 在 260 nm 处有核酸吸收峰。两者均无蛋白质吸收峰, 说明酶法提取的热凝胶有核酸存在, 而酸碱法提取的产品无核酸存在, 两者基本已去除蛋白质类杂质。

2.2.4 红外光谱分析 酶法提取样品的红外光谱见图 6。

由图 6 可见, 在 3400 cm^{-1} 左右处有一宽而强的吸收峰, 它是羟基伸缩振动的典型吸收; 2938 cm^{-1} 处的吸收为 $-\text{CH}_2-$ 的典型吸收; 在 1082 cm^{-1}

有较强的吡喃糖环的醚键(C—O—C)和羟基的吸收峰,是多糖的糖苷键的吸收;在 875 cm^{-1} 左右有明显的 β -构型的特征吸收. 这与资料上的结果完全相符,由此也说明了酶法提取产品的结构未发生改变.

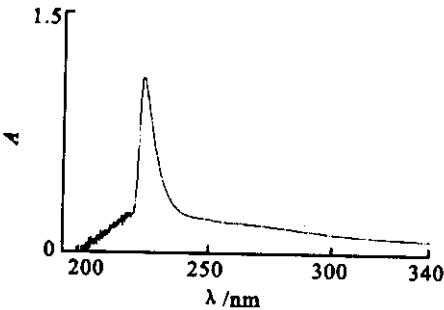


图 4 酸碱法提取的热凝胶紫外扫描图
Fig. 4 The UV scan spectra of curdlan after acid-base treatment

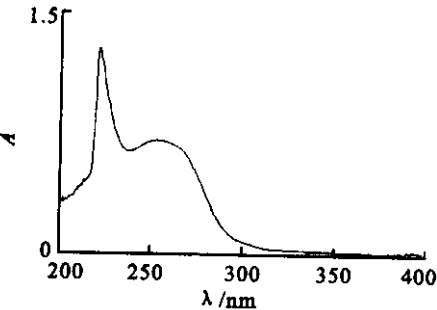


图 5 酶法提取的热凝胶紫外扫描图
Fig. 5 The UV scan spectra of curdlan after proteinase treatment

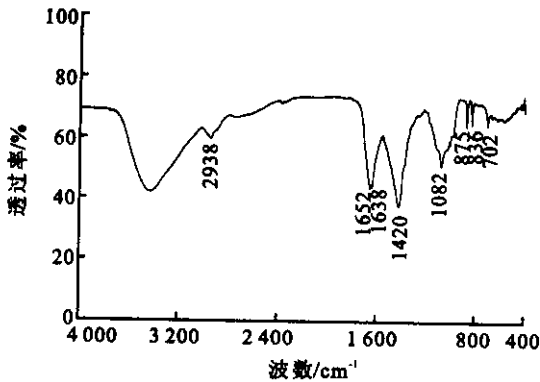


图 6 酶法提取热凝胶的红外光谱图
Fig. 6 The infrared spectra of curdlan after proteinase treatment

2.2.5 凝胶断裂强度测定 热凝胶加热成胶的具体机理是:加热后分子链发生重排,依靠氢键等次价键结合形成凝胶.而凝胶强度则是衡量成胶性好坏的重要标准之一.所以有必要对凝胶强度进行测

定.采用英国的 Micro Stable System 的 Texture Analyzer 质构分析仪测定 2 g/dL Curdlan 的凝胶强度,图 7,8 是质构分析仪测得的不同提取法所得的 Curdlan 的凝胶强度图.

由图 8 可见,热凝胶是典型的塑性断裂形式.显示酶法提取的热凝胶具有良好的抗压能力,以 1 mm/s 的速度使探头移动 15 mm 所用压力的峰值达 3.151 N ,而相同浓度的酸碱法提取的热凝胶的压力峰值仅为 0.372 N .作为热凝胶的最重要的质量指标,酶法提取比酸碱法提取的产品有更高的凝胶强度.

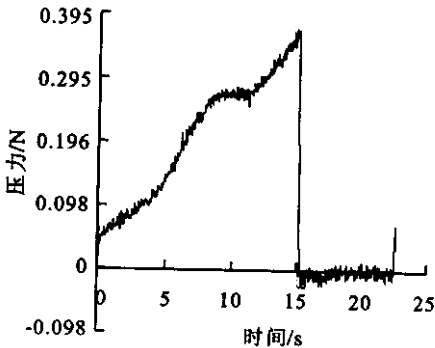


图 7 酸碱法提取的热凝胶的凝胶强度
Fig. 7 Force-compression curve of 2 g/dL curdlan after acid-base treatment

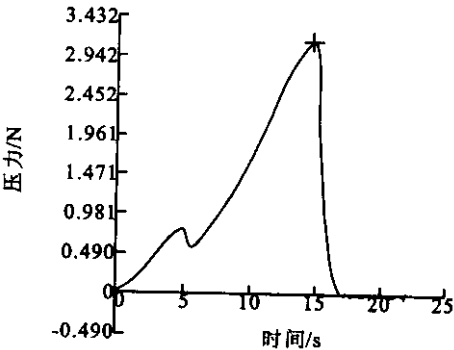


图 8 酶法提取的热凝胶的凝胶强度
Fig. 8 Force-compression curve of 2 g/dL curdlan after proteinase treatment

3 结 论

对本实验室保藏的粪产碱杆菌 WX-C12 发酵得到的热凝胶发酵液进行酸碱法和酶法提取的研究,结果表明,虽然酶法提取得到的热凝胶含有核酸类物质,但在加热成胶性方面,酶法提取的产品却优于酸碱法提取的产品.综合各项指标,对于热凝胶的提取来说,酶法提取优于传统的酸碱法提取,核酸物质的存在并不影响产品的质量.对中性蛋白酶提取工艺的研究,得到以下结论:在体积分数 1% 的酶添加量,温度为 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$,酶解 6 h 的条件

下,可以获得最佳酶解效果. 在此条件下产品经结构分析,确定所获得的多糖产品为纯一的 β -1,3 葡聚糖,且有效地去除了蛋白质等杂质.

参考文献:

[1] Tokuya Harada, Akira Misaki, Hirose Saito. Curdlan; a bacterial gel-forming β -1,3-Glucan[J]. **Archive of Biochemistry and Biophysics**, 1968,124:292—298.

[2] TAKEDA Chemical industry Ltd. Japan. Preparation of segregation-reducing agent for hydraulic compositio[P]. EP: 588665,1994.

[3] 刘如林,赵大健. 微生物多糖的产品回收[J]. **食品与发酵工业**,1990,5:58—63.

[4] Donald E Renn. Purified curdlan and its hydroxyalkyl derivatives;preparation, properties and applications[J]. **Carbohydrate polymers**, 1997,33:219—225.

[5] Toshio Tada, Takayoshi Matsumoto, Toshiro Masuda. Structure of molecular association of curdlan at dilute regime in alkaline aqueous systems[J]. **Chemical Physics**,1998,228:157—166.

[6] 王霜,吴振强,余若黔,等. 谷氨酸菌体破碎条件的优化研究[J]. **生物技术**,1997,7(5):26—30.

[7] 徐建祥,晏志云,赵谋明,等. 酶法脱蛋白技术用于螺旋藻多糖提取工艺的研究[J]. **食品与发酵工业**,24(3):2002,24—27.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 7 页)

参考文献:

[1] 孙同庆,石鸿昌. *dl*-麻黄碱和 *dl*-伪麻黄碱的合成[J]. **中国医药工业杂志**, 2000, 31(12):534—535.

[2] 梁卯生. 伪麻黄碱的发展概况及建议[J]. **化学医药工业信息**, 1993,(4):14—16.

[3] 胥秀英,郑一敏,温寿祯,等. 左旋麻黄素半生物合成的研究(I)L—苯基乙酰基甲醇生物合成条件研究[J]. **生物学杂志**,2001, 18(1):18—21.

[4] 李继珩,尚广东. 高产苯基乙酰基甲醇菌株选育[J]. **氨基酸和生物资源**, 2001, 23(1):16—21.

[5] Bettina R , Vanessa S , Michael B, *et al.* Enzymatic (R)-phenylacetylcarbinol production in benzaldehyde emulsions[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2002, 60(1-2):94—100.

[6] Rosche B , Sandford V, Breuer M, *et al.* Enhanced production of R-phenylacetylcarbinol (R-PAC) through enzymatic biotransformation[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2002,(19-20): 109—115.

[7] Shin H S, Rogers P L. Biotransformation of benzeldehyde to *l*-phenylacetylcarbinol, an intermediate in *l*-ephedrine production by immobilized *Candida utilis*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1995,44 : 7—14.

[8] 张梁,石贵阳,董世建. 薄层扫描法检测生物转化液中麻黄碱的含量[J]. **无锡轻工大学学报**, 2002,23 (2):179—182.

(责任编辑:李春丽)