

全水化无醇提取 γ -聚谷氨酸工艺的研究

乔长晟^{1,2}, 张苗苗¹, 刘晓晨³, 高明昊¹, 林虹秀¹, 楼鹏²

(1.天津科技大学工业微生物教育部重点实验室, 天津 300457;

2.天津北洋百川生物技术有限公司, 天津 300457;

3.食品营养与安全省部共建教育部重点实验室, 天津 300457)

摘要:为实现 γ -聚谷氨酸无醇提取, 利用板框除菌, 酶解除大分子多糖, 活性炭脱色, 超滤除小分子杂质, 最后冷冻干燥获得 γ -聚谷氨酸(γ -PGA)成品。确定了全水化无醇提取条件: 下罐调 pH6.0, 发酵液稀释 2 倍; 硅藻土和红土配比为 2:1 (m:m), 总添加量为 1.5% (w/v), 除菌率 97% 以上; 脱色条件: 活性炭添加量 1.5% (w/v)、温度 30℃、pH5、时间 60min。超滤选择 10ku 的膜包除杂并最终浓缩至原液的 1/9。冷冻干燥 18h 得到的 γ -聚谷氨酸纯度达 90%。无醇提取工艺的探索为工业生产提取 γ -PGA 提供了重要参考依据。

关键词: γ -PGA, 除菌, 无醇提取, 脱色, 纯化

Study on the separation and purification of poly- γ -glutamic acid without any organic solvents

QIAO Chang-sheng^{1,2}, ZHANG Miao-miao¹, LIU Xiao-chen³, GAO Ming-hao¹, LIN Hong-xiu¹, LOU Peng²

(1.Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2.Tianjin Beiyang Biotrans Co., Ltd, Tianjin 300457, China;

3.Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin 300457, China)

Abstract: For separating γ -PGA without any alcohol, a extractive method was developed to separate and purify γ -PGA from culture broth. The culture broth was filtrated with diatomite to remove cells, and the macromolecular polysaccharide was catabolized by enzymolysis. Then, active carbon was added as decoloring agent and the small molecular weight impurity was removed by ultrafiltration. Finally, purified γ -PGA was obtained by lyophilization. The optimum quantity of using mixed diatomite loading (ratio of coarse to small diatomite 2:1) was 1.5% (w/v) and over 97% of cells were removed from γ -PGA broth. The optimum conditions of decoloration were as follows: the addition of active carbon 1.5% (w/v), temperature 30℃, pH5, processing time 60min. The optimum membrane module of ultrafiltration was 10ku and the concentration rate of ultrafiltration was 9:1. The purity of γ -PGA was 90% after lyophilization for 18h. The study of separation and purification of poly- γ -glutamic acid without any organic solvents was imperative and it provided an important basis for Industrial production of γ -PGA.

Key words: γ -PGA; remove the bacteria; separation without organic solvents; decoloration; purification

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)13-0247-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.044

γ -聚谷氨酸(γ -PGA)是一种天然存在的聚合物,是由 L 型和 D 型谷氨酸(Glu),通过 γ -谷氨酰胺键聚合而成的均聚氨基酸,由于 γ -PGA 中的 Glu 有两个羧基,所以它有两种异构体: α -PGA 和 γ -PGA,生物合成的均为 γ -PGA,即 Glu 单体通过 α -氨基和 γ -羧基形成的酰胺键连接;而化学合成的聚谷氨酸则为 α -PGA。 γ -PGA 具有良好的吸水性能、生物相容性、生物降解性和无毒害性,可作为化妆品添加剂、保水剂、高吸水树脂、重金属吸附剂、食品添加

剂、医药载体、组织工程材料等广泛应用于化妆品、食品、农业、医药、合成纤维和涂膜等领域^[1-3]。

用芽孢杆菌发酵生产 γ -PGA 已成为 γ -PGA 商业化的主要方法,发酵生产多采用有机溶剂絮凝方法提取,在工业生产中提取费用很高并且提取环境危险。一般工艺中发酵液提取多聚合物的主要方法为多次醇析聚沉法,即醇析-复溶-醇析的方法将产物提取出来,有机溶剂的使用在工业提取上比较广泛,但人为添加的有机溶剂对产物有一定影响。目

收稿日期:2014-09-02

作者简介:乔长晟(1969-),男,博士,教授,研究方向:氨基酸及有机酸发酵。

前,文献报道优化好的 γ -PGA 提取工艺提取步骤为: γ -PGA 发酵液——酸化稀释除菌——硅藻土过滤——超滤——盐析-醇析——真空干燥—— γ -PGA 成品^[4-5],其中,酸化除菌体会降解 γ -PGA,造成其降解损失,醇析步骤添加量为 4 倍溶液体积,使用乙醇较多,其他文献报道,用其他有机溶剂如异丙醇代替乙醇^[6],均未减少有机溶剂的使用。

本论文研究一种不添加有机溶剂提取 γ -PGA 的全水化提取工艺,结合粉末活性炭脱色技术和膜分离技术,为实现 γ -PGA 产业化提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜发酵液 γ -PGA,为黄褐色液体,浓度为 34g/L,pH7.2,由天津北洋百川生物技术有限公司通过 10L 发酵罐分批补料发酵得到并提供;白色硅藻土、红土 嵊州市华力硅藻土制品有限公司;活性炭 福建芝星炭业有限公司;糖化酶 诺维信(中国)生物技术有限公司;牛血清蛋白、硫酸、苯酚 国产分析纯。滤布 1100 目 天台华南滤布厂。

SBA-40E 生物传感仪 山东省科学院生物研究所;板框过滤装置 实验室自制;ML204 型电子分析天平 瑞士梅特勒-托利多集团;梅特勒 FE20K 型 PH 计 瑞士梅特勒-托利多集团;抽滤装置 实验室自制;电导率仪 瑞士梅特勒-托利多集团;超滤设备 合肥信达膜科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 除菌 下罐发酵液调 pH6.0,利用板框过滤装置进行除菌,操作压力 0.12MPa。测定除菌率和 γ -PGA 损失率,对发酵液稀释倍数(1.0、1.5、2.0、2.5 倍),白色硅藻土和红土的添加配比(2:0、1:1、1:2、2:1),以及硅藻土(白色硅藻土和红土)添加总量(质量 m 占发酵液体积 v 比重:1.0%、1.5%、2.0%、2.5%)进行优化,从而确定板框除菌最佳条件。

1.2.2 酶解及蛋白变性 选用诺维信糖化酶,按照酶的最适条件将大分子多糖酶解成小分子糖,酶解条件:pH5.5,55℃,酶添加量为:0.1mL 酶液/L 除菌上清液,酶解 40min。结束后,进行蛋白变性,迅速升温至 80℃,保温 30min。

1.2.3 脱色 选用亚甲基蓝吸附值 17.5 的活性炭进行脱色,对脱色条件进行优化:温度 20、30、40、50、60、70℃;活性炭添加量 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%;脱色最适 pH:2、3、4、5、6、7;脱色时间 30、40、50、60、80、100min。确定最优条件后,在此条件下,确定清液初始色素浓度(用 OD 值来反应色素浓度),使在此浓度下脱色率最高且 γ -PGA 得率最高。

1.2.4 超滤提纯 使用超滤装置对脱色后的清液进行除杂,同时对 γ -PGA 进行提纯,筛选膜包 10ku 和 30ku,条件为:常温,进口压 0.14MPa,出口压 0.07MPa。定义每 100mL 清液添加 100mL 蒸馏水进行循环超滤至 100mL,称为一次循环超滤。检测保留液谷氨酸含量、色素含量、电导率、 γ -PGA 浓度和总糖;检测透过液中的谷氨酸含量、色素含量、电导率和总糖。SBA 检测谷氨酸含量,苯酚硫酸法检测

总糖含量,OD₄₄₀检测色素的含量。

1.2.5 真空冷冻干燥 取经提纯浓缩后 γ -PGA 的清液,铺于平板中,厚度约为 0.7cm,放于-80℃冰箱中预冻,过夜。然后将平板置于真空冷冻干燥设备中干燥,调定冷阱温度-65℃,真空度-0.09Mpa,干燥时间 18h,得到白色 γ -PGA 样品。

1.3 分析方法

1.3.1 谷氨酸检测 采用 SBA-40E 生物传感分析仪测定谷氨酸浓度^[6]。

1.3.2 γ -PGA 含量检测 取清液加入 4 倍体积的无水乙醇沉淀产物,弃上清加适量蒸馏水复溶沉淀至原体积,检测水解前后谷氨酸的含量,前后的差值即为 γ -PGA 含量^[7-10]。

1.3.3 色素浓度测定 利用紫外分光光度计在 440nm 测定吸光度^[11]。

1.3.4 电导率检测 每次均取相同体积(10mL)的待测液,利用电导率仪进行测定^[12]。

1.3.5 总糖测定 采用蒽酮-硫酸法进行测定^[13-14]。

1.3.6 蛋白测定 采用 Bradford 法进行测定^[15]。

1.3.7 菌体浓度测定 将待测液稀释适当浓度,利用紫外分光光度计在 660nm 测定吸光度^[16]。

1.3.8 除菌率的计算方法:

计算公式如下:

$$Y_1(\%) = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: Y_1 :除菌率; OD_1 :原液稀释 25 倍后 OD₆₆₀ 吸收值; OD_2 :处理后清液稀释 25 倍 OD₆₆₀ 吸收值。

1.3.9 γ -PGA 损失率和 γ -PGA 得率的计算方法

γ -PGA 损失率计算公式如下:

$$Y_2(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: Y_2 : γ -PGA 损失率,%; m_1 :处理前溶液中 γ -PGA 的浓度,(g/L); m_2 :处理后溶液中 γ -PGA 的浓度,(g/L)。

γ -PGA 得率的计算公式如下:

$$Y_3(\%) = \frac{c_0}{c} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: Y_3 : γ -PGA 得率,%; c_0 :处理后溶液中 γ -PGA 的浓度,(g/L); c :原溶液中 γ -PGA 的浓度,(g/L)。

1.3.10 脱色率计算方法 脱色率计算公式如下:

$$Y_4(\%) = \frac{A - A_0}{A} \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中: Y_4 : γ -PGA 发酵液的脱色率,%; A :脱色前 γ -PGA 发酵液的色素含量(OD 值); A_0 :脱色后 γ -PGA 发酵液的色素含量(OD 值)。

1.3.11 数据统计与分析 所有实验均重复三次,数据使用 SPSS 10.0 软件进行方差分析^[17]。

2 结果与讨论

2.1 除菌条件优化

2.1.1 发酵液稀释倍数对发酵液预处理的影响 首先考察了稀释倍数对发酵液预处理的影响,由图 1 可以清晰地看出,随着稀释倍数的增加,除菌率逐渐

降低,当发酵液稀释倍数小于 2.0 时,除菌率均在 97% 以上,其中,稀释倍数为 2.0 时,除菌率为 97.21%,而当稀释倍数大于 2.0 时,除菌率严重下降;观察 γ -PGA 损失率,随着稀释倍数的增加, γ -PGA 损失率呈下降趋势,当稀释倍数为 2.5 时,达到最低。综合考虑,选择除菌率较高, γ -PGA 损失率较低的稀释倍数,应选择稀释倍数为 2.0 进行除菌。

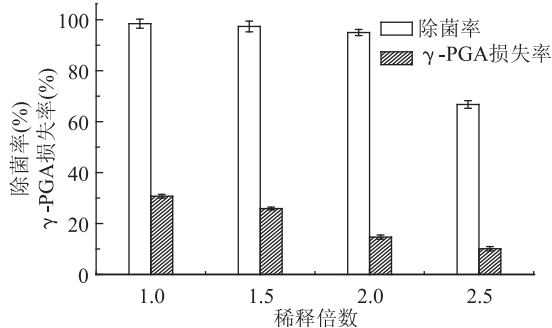


图1 稀释倍数对发酵液预处理的影响

Fig.1 Effect of dilution on pretreatment fermentation liquor

2.1.2 白色硅藻土和红土的配比对发酵液预处理的影响 在板框过滤除菌的过程中,设定硅藻土总添加量为 1.5% (w/v) 时,对白色硅藻土和红土配比进行优化,结果发现红土目数较白色硅藻土细,并且吸附效果优于硅藻土,在白色硅藻土与红土配比为 2:1 时,除菌率达最高值,之后除菌率没有明显变化,但 γ -PGA 损失率升高,故选择白色硅藻土与红土配比为 2:1,此时除菌率达 96.35%, γ -PGA 损失率较低。

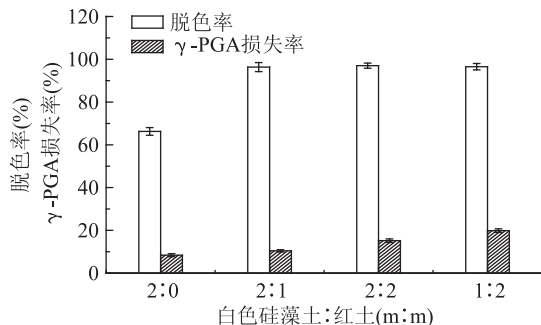


图2 硅藻土红土的配比对发酵液预处理的影响

Fig.2 Effect of different ratio of diatomite added on pretreatment fermentation liquor

2.1.3 硅藻土总添加量对发酵液预处理的影响 选定白色硅藻土与红土配比为 2:1 时进行除菌实验,由图 3 可知,当助滤剂总添加量为 1.5% (w/v) 时,菌体的去除率较高,达 97.27%,总添加量再增加时,除菌率变化不大,但 γ -PGA 损失率也逐渐升高,这是由于过量的硅藻土形成的滤饼层比较致密,增大了 γ -PGA 损失率。

综上所述,确定了板框过滤除菌的最优条件:发酵液稀释倍数 2.0,白色硅藻土:红土配比 2:1,其总添加量 1.5% (w/v),除菌率 97% 以上。

2.2 活性炭脱色条件优化

2.2.1 脱色条件对脱色效果的影响 由图 4a 可知,当温度在 30℃ 时,脱色率达最高点,随着温度继续升高,脱色率明显下降;由图 4b 可知,脱色率随着活性

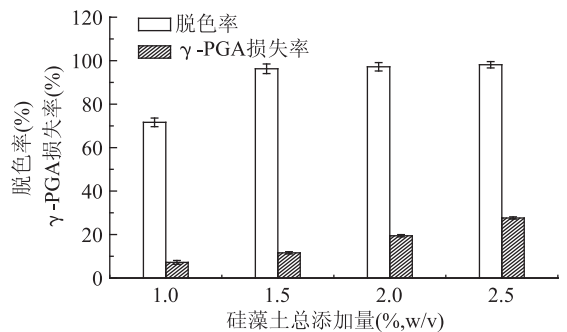


图3 硅藻土总添加量对发酵液预处理的影响

Fig.3 Effect of diatomite added on pretreatment fermentation liquor

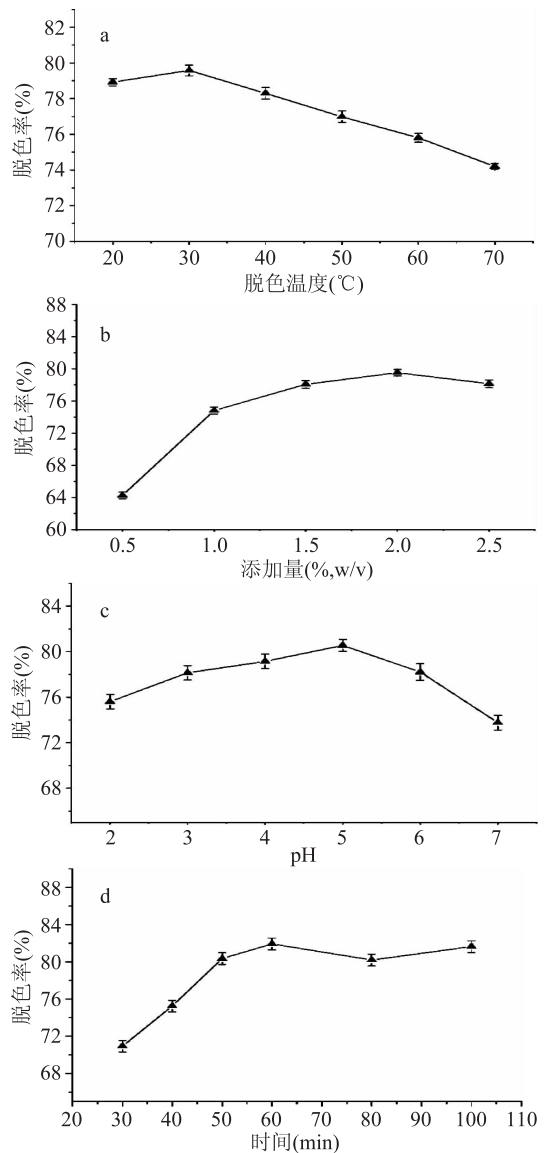


图4 脱色温度、添加量、pH 和时间对脱色率的影响

Fig.4 Effect of temperature, adding quantity, pH, and time on the decolorization ratio

注:a:脱色温度对脱色率的影响;
b:活性炭添加量对脱色率的影响;
c:清液 pH 对脱色率的影响;
d:脱色时间对脱色率的影响。

炭添加量的升高而升高,当添加量到达 1.5% (w/v) 时,脱色率为 78.72%,当添加量到达 2.0% (w/v) 时,脱色率为 79.19%,脱色率升高趋势不明显,之后略有下降;由图 4c 可知,pH 为 5.0 时,具有最佳的脱色效果,pH > 5.0 或 pH < 5.0 脱色率均会降低;由图 4d 可知,随着脱色时间延长脱色率的变化趋势为先升高后略有降低后又升高,说明在时间为 60min 时,脱色率达到饱和点,当时间大于 60min 后,随着时间的延长,脱色率略有细微的变化,推测原因为活性炭吸附饱和后将处于一定程度内的动态平衡,造成脱色率略有差别。

综上所述,最优的脱色条件为:活性炭添加量 1.5% (w/v)、温度 30℃、pH5.0、时间 60min。

2.2.2 初始上清颜色对脱色效果的影响 粉末活性炭吸附原理既有物理吸附也有化学吸附,活性炭多孔结构提供了大量的表面积,达到吸附杂质的目的,活性炭孔壁上的大量分子也可以产生强大的引力,使杂质被吸引到孔径中,通过改变原材料和活化条件来使活性炭有不同孔径结构,从而适用于不同杂质吸收^[17]。选用的亚甲基蓝吸附值 17.5 的活性炭可以吸附清液中大量色素、蛋白和多糖,同时也会吸附少量的 γ -PGA。为了得到较好的脱色效果,同时兼顾 γ -PGA 得率,因此本实验在最佳脱色条件下对初始色素浓度进行筛选。

如图 5 显示,当清液初始 OD₄₄₀ 为 0.344 时,脱色率最高,达 83.38%,此时, γ -PGA 得率为 90.37%,脱色后清液 γ -PGA 的含量为 6.1g/L,此时脱色后 OD₄₄₀ 为 0.064,脱色效果最佳, γ -PGA 得率最高。

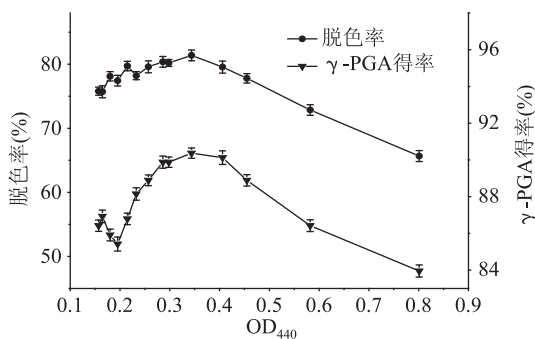


图5 脱色率和 γ -PGA 得率与 OD₄₄₀ 分析图

Fig.5 The analysis of the relationship of decolourization ratio and receiving rate

2.3 超滤提纯条件优化

通过实验室制备的 γ -PGA 分子量在 300ku 以上,经过上述步骤处理后,含有小分子杂质,如小分子蛋白、多糖、无机盐、色素及其他小分子可溶物。利用超滤中不同分子量膜包截留作用,将这些杂质除掉,并达到浓缩的目的。选用 10ku 膜包和 30ku 膜包循环超滤进行除杂效果对比,结果如图 6~9。

分析保留液,图 6 中结果显示,选用 10ku 膜包对清液进行超滤,在第 4 次超滤时,总糖和电导率的下降趋势减小,OD₄₄₀ 和谷氨酸 (Glu) 为 0,说明小分子杂质已全部被洗出,且 γ -PGA 损失较小,在第 5 次超滤时, γ -PGA 损失了 9.83%,但第 6 次时 γ -PGA 损

失较第 4 次并没有明显增加,可推断第 5 次 γ -PGA 浓度下降是检测误差导致,并非损失。 γ -PGA 在第 2、3、4 次超滤时损失没有增加,趋于较稳定状态,说明有发酵中产生的分子量较小的 γ -PGA 被洗出。对比透过液(图 7)中各项指标检测,第 4 次超滤后,洗出的色素、离子和总糖的检测指标变化不大,趋于稳定,说明超滤除杂已经完成。

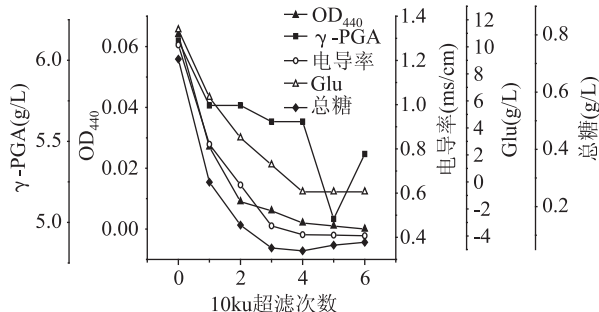


图6 10ku 超滤时超滤次数对保留液的影响

Fig.6 Effect of ultrafiltrated times on intercepted liquid with 10ku ultrafiltration

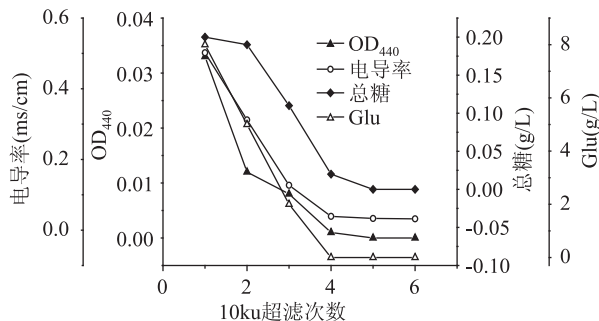


图7 10ku 超滤时超滤次数对透过液的影响

Fig.7 Effect of ultrafiltrated times on permeabled liquid 10ku ultrafiltration

分析 30ku 超滤后保留液的检测结果(图 8),在第 3 次超滤后,总糖、色素和电导率趋于 0,但 γ -PGA 仍在下降,说明 30ku 膜包能洗出较多 γ -PGA,损失较大,对比透过液(图 9),在第 4 次超滤时,虽然显示有多糖、离子和色素被洗出,但量都很小,说明用 30ku 膜超滤,在第 3 次就已经基本完成洗涤,但此时 γ -PGA 含量已降到 4.5g/L,损失较多,故应选用 10ku 膜进行超滤纯化,超滤次数为 4 次。用 10ku 循环超滤浓缩,考察不同浓缩倍数下渗透通量和

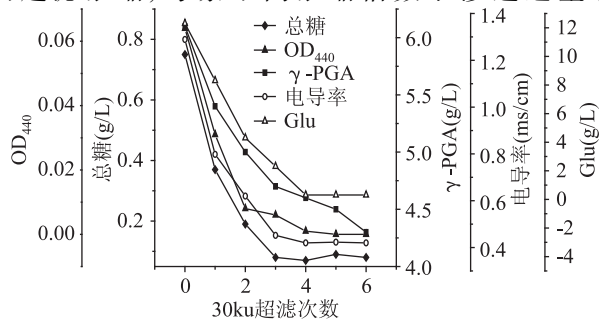


图8 30ku 超滤时超滤次数对保留液的影响

Fig.8 Effect of ultrafiltrated times on intercepted liquid with 30ku ultrafiltration

γ -PGA得率的变化,确定最终浓缩倍数(图10)。

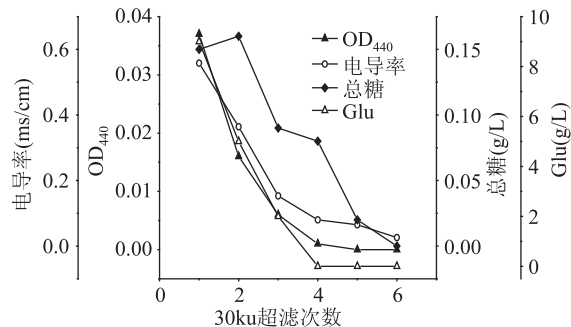


图9 30ku超滤时超滤次数对透过液的影响

Fig.9 Effect of ultrafiltrated times on permeable liquid 30kDa ultrafiltration

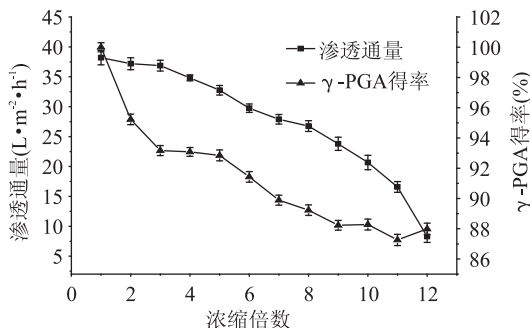


图10 超滤浓缩倍数对渗透通量和得率的影响

Fig.10 The influence of ultrafiltration concentration ratio to permeate flux and receiving rate

由图10可知,随着浓缩倍数增加,渗透通量逐渐降低,且降低的幅度逐渐增大, γ -PGA得率随着浓缩倍数增高而降低,在第9次后趋于平缓,之后 γ -PGA得率随浓缩倍数的增加而变化很小,故最终确定将清液浓缩至1/9。

综上,选择10ku进行超滤,超滤4次后,将清液浓缩至1/9,之后进行冷冻干燥18h,得到白色 γ -PGA样品,纯度最低为90%,灰分4.3%,蛋白质0.01%,总糖含量0.05%,谷氨酸(Glu)含量0%。

3 结论

γ -PGA发酵液有一定粘度,稀释后板框过滤除菌,助滤剂选择硅藻土和红土搭配,配比为2:1,起到助滤除菌的作用,除菌效果与离心相同,除菌率达97%以上, γ -PGA未降解。发酵生产 γ -PGA时,会产生多糖,用酶解法去除大分子多糖,在经过后续超滤去除小分子糖,可达到有效去除多糖的结果。确定初始的色素浓度对脱色有一定的意义,实验证明此方法在脱色上有显著效果, γ -PGA发酵液中,色素多为水溶性色素,且大分子量的色素居多,活性炭在吸附色素的同时,对 γ -PGA也有一定的影响,将清液稀释到 OD_{440} 0.344后再进行脱色,脱色效果明显提高,且 γ -PGA得率较高。采用循环超滤浓缩的方法去除小分子杂质如无机盐、小分子色素、谷氨酸和小分子糖等。选择截留分子量为10ku的膜组件,循环定容超滤4次除掉小分子杂质后,将清液浓缩

至1/9。浓缩液真空冷冻干燥,得到白色 γ -PGA样品,纯度90%以上,灰分4.3%,蛋白质0.01%,总糖含量0.05%,谷氨酸含量0%。

参考文献

- [1] Shih, I L, Van Y T. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications [J]. Bioresour Technol, 2001(79): 207-225.
- [2] Sung M H, Park C, Kim C J, et al. Natural and edible biopolymer poly - γ - glutamic acid: synthesis, production, and applications [J]. The Chemical Record, 2005(5): 352-366.
- [3] Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, et al. EphA2 - derived peptide vaccine with amphiphilic poly (γ - glutamic acid) nanoparticles elicits an anti - tumor effect against mouse liver tumor [J]. Cancer immunology, immunotherapy, 2010(59): 759-767.
- [4] Wei X, Ji Z, Chen S. Isolation of halotolerant Bacillus licheniformis WX-02 and regulatory effects of sodium chloride on yield and molecular sizes of poly- γ -glutamic acid [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010(160): 1332-1340.
- [5] 鞠蕾, 马霞. γ -聚谷氨酸的提取方法改进 [J]. 现代化工, 2011(31): 267-270.
- [6] 杨树峰, 楼鹏, 李振海, 等. γ -PGA发酵液菌体去除工艺研究 [J]. 食品与发酵科技, 2013(49): 13-16.
- [7] 陈泽宪, 徐辉碧. 蛋白质水解阶段对氨基酸组成分析的影响. 分析科学学报 [J], 2002(18): 80-85.
- [8] 刘晓鸥, 乔长晟, 李睿颖, 等. 枯草芽孢杆菌 TKPG011 聚谷氨酸发酵培养基的优化 [J]. 现代食品科技, 2010(26): 253-255.
- [9] Kunioka M. Biodegradable water absorbent synthesized from bacterial poly(amino acid)s [J]. Macromolecular bioscience, 2004(4): 324-329.
- [10] 张轶, 卢珂, 孟杰, 等. 谷氨酸分析仪测定发酵液中 γ -聚谷氨酸的实验条件研究 [J]. 食品研究与开发, 2008(28): 132-135.
- [11] 吕忠良. γ -多聚谷氨酸(γ -PGA)的分离纯化研究 [D]. 无锡: 浙江大学, 2008.
- [12] 熊宁, 李琦, 刘利, 等. 稻谷电导率测定方法的研究 [J]. 粮油食品科技, 2013(21): 68-71.
- [13] 邓长江, 李长清, 朱希强, 等. 蕙酮-硫酸法测定出芽短梗霉发酵液残糖和总糖含量的研究 [J]. 食品与药品, 2006(8): 54-56.
- [14] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical chemistry, 1959(31): 426-428.
- [15] 刘海顺, 张志航, 胡瑞丰, 等. 大豆水溶性蛋白测定方法探讨 [J]. 粮食储藏, 2011(40): 48-49.
- [16] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002, 223-224.
- [17] 王运生, 李志伟, 杨秀, 等. 活性炭脱色中 pH 的影响研究 [J]. 发酵科技与通讯, 2007, 36(3): 7-8.