

聚 γ -谷氨酸延缓磷酸钙沉淀及螯合钙离子的研究

夏 芳, 蔡 皓, 陈守文*

(农业微生物学国家重点实验室, 华中农业大学生命科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 研究表明聚 γ -谷氨酸(γ -PGA)有延缓磷酸钙沉淀形成的能力, 在 γ -PGA 添加量达到 200mg/L 的条件下, 体系中减少磷酸钙沉淀形成率达 83.4%, 延缓达到最大沉淀量所需时间 20min。同时还研究了 γ -PGA 与钙离子螯合形成螯合钙的条件, 结果显示在温度 37℃、pH 6、3% γ -PGA、羧钙比 2.5:1 的条件下螯合率最高, 螯合反应在 15min 完成; 螯合物的钙含量为 11.06%。 γ -PGA 能与钙离子形成可溶性钙, 可开发成一种新型的补钙剂。

关键词: 聚 γ -谷氨酸; 钙离子; 延缓磷酸钙沉淀; 螯合率

Effects of Poly- γ -glutamic Acid on Retarding Calcium Phosphate Depositing and It's Chelation with Calcium Ion

XIA Fang, CAI Hao, CHEN Shou-wen*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The ability of poly- γ -glutamic acid(γ -PGA) to retard calcium phosphate depositing was investigated in the study. When 200 mg/L γ -PGA was added, it remarkably reduced the calcium phosphate depositing by 83.4%, and retarded the time of achieving the highest depositing to 20 min. The chelation conditions of γ -PGA with calcium ion such as pH, temperature and the concentration of γ -PGA were studied. Results showed that the maximum yield of chelation was gained under the condition of temperature 37℃, pH 6.0, 3% γ -PGA and the molar ratio of carboxyl group of γ -PGA to calcium ion 2.5:1, then the chelation course was finished within 15 min and the content of calcium was 11.06% in the chelate complex. It illustrated that γ -PGA was able to chelate with calcium ion and worth exploiting as a new calcium supplemental agent.

Key words poly- γ -glutamic acid; calcium ion; retarding calcium phosphate depositing; yield of chelation

中图分类号: R151.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0056-04

聚 γ -谷氨酸(简称 γ -PGA)是从芽孢杆菌发酵产物中提取出来的一种阴离子型高分子氨基酸聚合物, 主要是由 L-谷氨酸和 D-谷氨酸单体之间通过 α -氨基和 γ -羧基之间形成肽键后形成的同聚酰胺。由于 γ -PGA 分子侧链含有大量的游离羧基, 使其具有很好的与金属离子螯合的特性。Robert 等^[1-2]报道地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) ATCC 9945 所产的荚膜(主要含 γ -PGA)有很强结合金属离子的特性。

补钙已成为人们备受关注的话题, 氨基酸螯合钙鉴于其良好的溶解性、易吸收和生物利用度, 应用越来越

广泛^[3-4]。Hiroyuki 等研究表明 γ -PGA 在大鼠体内具有促进肠道对钙离子的吸收功能^[5]; 有专利报道 γ -PGA 可以用来作为矿物质的吸收促进剂, 应用在养殖业可以促进动物骨骼的钙沉积, 提高蛋壳的硬度等^[6]。

本实验旨在研究 γ -PGA 延缓磷酸钙沉淀的体外实验, 以及 γ -PGA 与钙离子螯合生成聚 γ -谷氨酸钙的条件, 以期开发一种生物型补钙产品。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2007-02-07

基金项目: 湖北省科技攻关课题资助项目(2005AA401C13); 新世纪优秀人才支持计划资助项目

作者简介: 夏芳(1982-), 女, 助理工程师, 硕士研究生, 研究方向为微生物技术。E-mail: 2560521@sina.com

*通讯作者: 陈守文(1968-), 男, 教授, 博士, 研究方向为微生物工程。E-mail: chenshouwen@mail.hzau.edu.cn

1.1.1 试剂

氯化钙、磷酸二氢钠、乙二胺四乙酸二钠、丙三醇均为分析纯; 95% 乙醇、铬黑 T 指示剂。

1.1.2 γ -PGA 的制备

1.1.2.1 菌种

枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)ME714 农业微生物学国家重点实验室微生物工程研究室。

1.1.2.2 发酵培养基(g/L)

葡萄糖 80.0, 谷氨酸钠 40.0, 柠檬酸钠 20.0, 硫酸铵 8.0, 硫酸锌 0.1, 七水硫酸镁 1.0, 一水硫酸锰 0.05, 磷酸氢二钾 1.0, 六水氯化铁 0.02, pH7.0~7.2。

1.1.2.3 发酵条件

种子培养: 从斜面挑菌, 接入装有 20ml LB 培养基的三角瓶 37℃ 活化 8~10h。

发酵培养: 液体培养基 100ml (500ml 三角瓶), 接种量 1%, 转速为 200r/min, 37℃ 的恒温摇床上发酵培养 36h。

1.1.2.4 γ -PGA 的提取

37℃、200r/min 的转速下发酵 36h。发酵结束后, 将发酵液在转速为 12000r/min 的条件下离心去菌体, 用 2~4 倍体积的酒精进行沉淀, 取沉淀物用去离子水进行透析过夜, 然后再将产物进行冷冻干燥, 得到纯度大于 90% 的 γ -PGA 产品。

1.1.3 仪器

水浴锅 江苏省金坛市新航仪器厂; 干燥箱 恒丰医疗器械厂; 2D-3A 自动电位滴定仪上海市安亭电子仪器厂; CR-21G 高速冷冻离心机 日立公司。

1.2 方法

1.2.1 钙离子的测定

采用 EDTA-Na 测定法^[7]。

1.2.2 γ -PGA 与钙离子的螯合实验^[8]

配制一定浓度的 γ -PGA 溶液, 加入饱和氯化钙溶液, 置于一定的温度和 pH 条件下, 静止放置一定时间, 让其充分反应形成螯合物, 后加入 3 倍体积的酒精, 10000r/min 下离心收集沉淀物, 再用蒸馏水反复洗涤沉淀物, 溶解之后, 再用乙醇沉淀, 最后烘干收集。

1.2.3 钙螯合率的测定

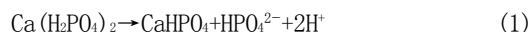
$$\text{钙的螯合率}(\%) = \frac{W_1}{W_2} \times 100$$

式中, W_1 为螯合物中钙的总量(g); W_2 为反应体系中钙的总量(g)。

1.2.4 PGA 阻止磷酸钙沉淀的效果检测

γ -PGA 阻止磷酸钙沉淀形成的效果采用 pH-Stat 法

检测^[9-10]。其原理是在有 CaCl_2 和 NaH_2PO_4 存在的溶液体系中, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的自发生成涉及以下反应:



两步反应均有 H^+ 释放出来, 所以可用 pH-Stat 法检测 γ -PGA 对这些反应的影响, 加入 NaOH 的速度较小时, 可认为 γ -PGA 阻止磷酸钙形成的效果较好。

在 500ml 反应体系里面, NaH_2PO_4 和 CaCl_2 的浓度均为 8mmol/L, γ -PGA 的添加浓度分别为 0、10、50、100 和 200mg/L。溶液保持在 37℃ 温度下, 先用 0.1mol/L 的 NaOH 溶液将体系 pH 值调节到 7.2, 这个过程需要 1min, 1min 后用 0.1mol/L NaOH 溶液不断滴加到体系中, 通过电位滴定仪维持 pH 值不变, 并开始计时。从 1min 后开始连续记录 0.1mol/L 的 NaOH 溶液的消耗量, 以时间为横坐标, 0.1mol/L NaOH 溶液的消耗量为纵坐标作图。

2 结果与分析

2.1 γ -PGA 阻止磷酸钙沉淀的效果

通过电位滴定仪使各体系 pH 控制在 7.2, 并保温在 37℃ 一段时间后测定了各体系在 30min 内消耗 0.1mol/L NaOH 溶液的情况, 结果见图 1。

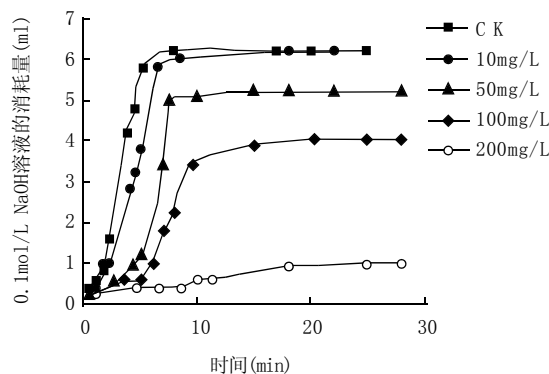


图1 37℃、pH7.2 时 γ -PGA 阻止磷酸钙沉淀的效果

Fig.1 Effects of different concentrations of γ -PGA on retarding calcium phosphate depositing under condition of 37 °C and pH 7.2

图 1 曲线中的横向和纵向切线的相交点所对应的时间即为沉淀达到最大值所需的时间。将各体系消耗 NaOH 溶液的量 and 形成最大量沉淀所需时间的数据列于表 1 中。从表 1 可见, 在 γ -PGA 的添加量达到 200mg/L 时, 体系中消耗 0.1mol/L NaOH 溶液的量比对照减少了 83.4%, 形成最大沉淀量的时间比对照组也推后了 20min。 γ -PGA 阻止磷酸钙沉淀的效果与酪蛋白磷酸肽(CPP)相比, 在均为 100mg/L 的浓度下, 其阻止磷酸钙沉淀率更高, 在均为 200mg/L 浓度下, 阻止效率差不多, 但在延缓时间上不及 CPP。

表1 不同浓度 γ -PGA 对阻止磷酸钙沉淀的效果Table 1 Effects of γ -PGA concentration on retarding calcium phosphate depositing

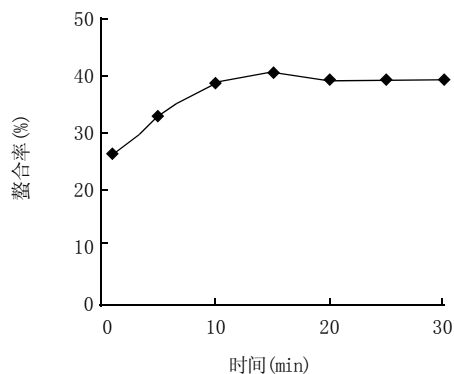
γ -PGA 浓度 (mg/L)	C K	10	50	100	200
形成最大沉淀时间 (min)	8.0	8.5	10.6	20.3	28.0
NaOH 的消耗量 (ml)	6.2	6.0	5.2	4.0	1.0
阻止磷酸钙形成的提高率 (%)	0	3.2	16.1	35.5	83.4

2.2 γ -PGA 与钙离子螯合条件的研究

配制一定浓度的 γ -PGA 溶液, 加入过量的饱和氯化钙, 研究不同 pH、温度、时间、 γ -PGA 溶液浓度及其羧基与钙离子的羧钙比对钙螯合率的影响。

2.2.1 γ -PGA 与钙离子充分螯合所需的时间

在 26℃、pH 5.8 条件下, 测定不同时间段下的螯合率。由图 2 可以看出, 在 15min 左右螯合率开始维持不变, 说明螯合反应在 15min 左右完成。

图2 γ -PGA 与钙离子螯合的时间进程曲线Fig.2 Chelation graph of γ -PGA with calcium ion

2.2.2 pH 对钙螯合率的影响

在温度 26℃、反应 30min 的条件下, 研究了不同 pH 值对钙螯合率的影响, 结果见图 3。pH 值在 1.5~6.0 之间, 螯合率随着 pH 值的增加而增加; pH 值超过 6 以后, 螯合率逐步下降, pH 超过 10.3 就会有 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 沉淀生成, 不在研究范围之内。原因可解释为在酸性条件下, γ -PGA 呈螺旋状, 分子内的作用力较大, 不利于钙离子的螯合, 并且溶液中有多余的 H^+ 和 Ca^{2+} 竞争 COO^- , 所以在低酸条件 (pH 1.5) 下的螯合率较低; 随着 pH 值的增加, γ -PGA 逐渐向伸展状态过渡, 有利于与钙离子的螯合, 并且与钙离子竞争的 H^+ 在减少, 所以螯合率会随着 pH 的增加而逐渐增加; pH 值超过 6 以后, γ -PGA 在中偏碱性环境中呈紧密的球状^[11], 所以螯合率开始逐渐下降。因此 pH 值在 6 左右的时候, γ -PGA 与钙离子螯合的钙螯合率最好。

2.2.3 温度对钙螯合率的影响

温度也是影响螯合的一个重要参数, 在 pH 值 6.0、反应 30min 条件下, 其影响见图 4。在 37℃ 下, 螯合

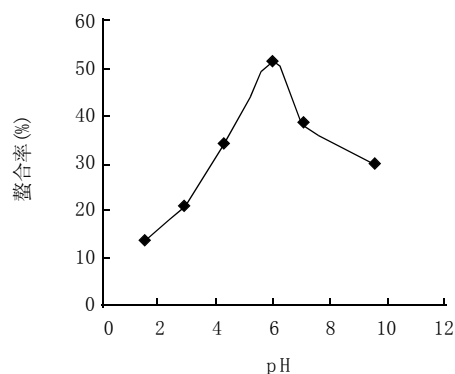


图3 pH 对钙螯合率的影响

Fig.3 Effects of pH value on calcium ion chelation yield

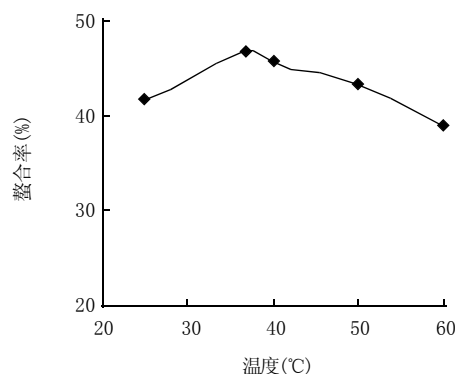


图4 温度对钙螯合率的影响

Fig.4 Effects of temperature on calcium ion chelation yield

率最高, 温度升高到 60℃ 时, 螯合率开始明显下降。因为体系升高温度能加快钙离子的运动, 有利于促进螯合反应, 但同时螯合是个放热过程, 温度升高不利于螯合反应的进行, 这两方面的影响在 37℃ 时达到一个动态平衡, 使螯合率在 37℃ 达到最大值。

2.2.4 γ -PGA 浓度和羧钙比对钙螯合率的影响

γ -PGA 所含羧基与钙离子的理论摩尔结合比是 2:1, 实验设置五个不同的羧基与钙离子的摩尔比 (羧钙比) 1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1, 所测得的钙螯合率越高说明选择的羧钙比就越好。

配制了 2%、3%、4% 的 γ -PGA 溶液, 调节 pH 到 5.8~6.2 之间, 保持温度在 37℃, 反应 30min, 比较不同羧钙比条件下的钙螯合率, 结果见图 5。显然, 在摩尔比 2.5:1 条件下, 钙螯合率最高, 同时 γ -PGA 的浓度为 3% 时, 其螯合率可达到 84.2%。因为羧钙比为 1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1 下钙的理论螯合率分别为 50%、75%、100%、100% 和 100%, 所以如图 5 所示羧钙比为 1:1 时测得的钙螯合率最低; 而羧钙比为 2.5:1 时的螯合率比在 2:1 时的要高, 因为理论的羧钙螯合比 2:1, 但由于 γ -PGA 分子存在有 β 折叠构型结构, 同时还有部分的螺旋结构存在, 这些空间构型妨碍了羧基与

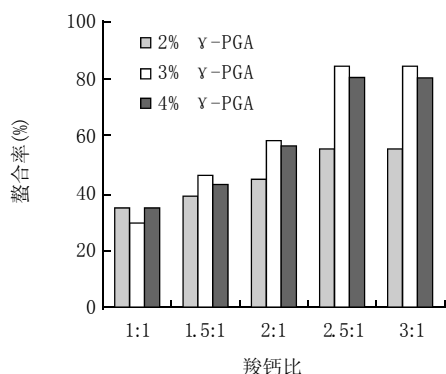


图5 羧钙比和 γ -PGA浓度对钙螯合率的影响

Fig.5 Effects of molar ratio of carboxyl group to calcium ion and concentration of γ -PGA on chelation yield

钙离子的充分接触,所以羧钙比为2.5:1时的钙螯合率最高。

2.2.5 螯合物中的钙含量

在3%浓度的 γ -PGA溶液中,按羧钙比为2.5:1的量加入饱和氯化钙溶液,在pH值为6.0、温度37℃条件下让 γ -PGA与钙离子螯合30min,收集制取的螯合物。经测定螯合物钙含量在11.06%。

3 结 论

实验结果显示, γ -PGA在中偏碱性条件下能减少磷酸钙沉淀形成量,并延缓形成最大沉淀量的时间,在 γ -PGA的添加量达到200mg/L时,体系中消耗0.1mol/L NaOH溶液的量比对照减少了83.4%,形成最大沉淀量的时间比对照组也推后了20min。造成人体内钙流失的一个很重要的原因是在pH呈弱碱性的小肠远端,钙离子往往与一些阴离子(磷酸根等)形成不溶性的盐,阻止钙的吸收和利用^[12]。实验结果表明, γ -PGA在弱碱性条件能减少磷酸钙的形成量,因此 γ -PGA可以作为一种钙吸收的促进物质来开发。

单因素分析发现, γ -PGA与钙形成氨基酸螯合钙的适合条件是:温度37℃,pH为6,时间15min, γ -PGA溶液浓度为3%,羧钙比为2.5:1,制得的螯合物的钙含量为11.06%。

γ -PGA作为一种新型制备聚氨基酸螯合钙的材料,对人体无毒副作用,在体内降解成的氨基酸同时还能被人体吸收,可弥补无机钙和有机酸钙对肠道刺激性较大的弊端,其与钙离子形成的螯合物有望开发出一种新型的氨基酸螯合钙补钙剂。

参考文献:

- [1] ROBERT J C, DIANE B, TERRY J B. Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945+ [J]. Appl. Environ Microbiol, 1990, 56(10): 3671-3677.
- [2] ROBERT J C, DIANE B, TERRY J B. Influence of oxidation state on iron binding by *Bacillus licheniformis* capsule [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(1): 405-408.
- [3] 曾敏莉, 周远大. 钙制剂的现状与发展趋势 [J]. 儿童药学杂志, 2004, 10(3): 16-18.
- [4] 陈睿妍, 黄雨菡. 氨基酸螯合钙的研制 [J]. 制剂技术, 2004, 13(10): 51.
- [5] HIROYUKI T, MASATO M, MASATO M, et al. Natto mucilage containing poly- γ -glutamic acid increase soluble calcium in the rat small intestine [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(3): 516-521.
- [6] TANIMOTO H, SATO H. Feed composition containing poly- γ -glutamic acid: Japanese, 96913723.1 [P]. 1998-04-03.
- [7] GB/T 12398—1990 食物中钙的测定方法 [S].
- [8] 许立和. 复合氨基酸螯合物的研究 [J]. 科研与开发, 2002, 25(12): 32-34.
- [9] 王瑛瑶, 胡俊刚, 杜东平, 等. 酪蛋白磷酸肽体外功能试验 [J]. 无锡轻工业大学学报, 2001, 20(3): 243-247.
- [10] 胡志和, 庞广昌, 陈庆森. 防龋齿口香糖中糖醇类成分对CPPs延缓磷酸钙沉淀性能的影响 [J]. 食品科学, 2006, 27(4): 55-58.
- [11] CRESCENZI V D, ALAGNI M, DENTINI M, et al. Aqueous solution properties of bacterial poly- γ -D-glutamate [J]. ACS Symp Ser, 1996, 627: 233-242.
- [12] 黄金明, 王根林, 杭苏琴. 钙的吸收和转运机制及其影响因素 [J]. 动物医学进展, 2001, 22(4): 8-12.