

酶法提取可德兰多糖的研究

李卫旗 李志昂 浙江大学生命科学院 310012

何国庆 浙江大学农业工程与食品学院 310027

TS24 A

摘 要 经正交试验确定了用中性蛋白酶处理发酵液提取可德兰多糖的最优工艺条件。测定结果证明,该法较传统的多糖提取方式可更有效地去除菌体中的氨基氮、核酸和其它杂质类多糖,所获可德兰产品为纯一的 β -(1,3)葡聚糖,并保持了正常的分子构型。

关键词 可德兰 蛋白酶 提纯 色谱

Abstract As the result of orthogonal test, the most rational technological factors for extracting Curdian from ferment liquid by means of the neutral proteinase was determined. It confirmed that this extracting way was more efficient than the other ways. The amino acids and nucleic acids of the bacteria were thoroughly removed in the product. The polysaccharine was identified to be the β -(1,3) polyglucosan with proper molecular structure.

Key words Curdian Proteinase Extracting Chromatograph

可德兰多糖(Curdian)又称热胶凝多糖,是由产碱杆菌 *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 的变异菌株代谢产生的一种微生物多糖,它是由400~500个D-葡萄糖以 β -(1-3)糖苷键线性连接的葡聚糖,其分子量约为70000~80000。Curdian的悬浮液经加热后能形成无色无味的凝胶,其凝胶强度大,在冷冻或高温灭菌条件下、pH2~11的范围内,凝胶性能基本不变。可用于改善食品的粘弹性、悬浮性或凝胶性,是一种不可多得的食物添加剂。此外,它还是一种抗肿瘤与病毒的生物活性多糖,在医药界已引起人们重视。目前,Curdian已被美国FDA推荐为食品添加剂,产品在日本、美国和中国台湾等地已有上市,而国内关于Curdian的研究论文尚十分罕见,也未见有关产品的报道。我们在获取了一株多糖产量高、性能好的Curdian生产菌株C125后,进行了Curdian发酵实验,并对Curdian提取回收进行了研究。

Curdian发酵液与其它微生物多糖发酵液一样,粘度高、稳定性好,这给多糖提纯带来了较大的困难,其中去除菌体是最大的障碍。在对发酵液的预处理中,可选择离心法、微孔滤膜过滤法、硅藻土吸附法、次氯酸盐漂白法等。在Curdian提取过程中,实验证明使用这些传统的机械、化学方法或不适于工业化生产,或菌体去除不完全,或对产物的分子结构产生了破坏,均不理想。最后我们选择以中性蛋白酶来降解发酵液中的菌体,发现能较完全

地去除多糖中的含氮物质与核酸,具有良好的提纯效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 由中科院微生物所提供的产碱杆菌诱变筛选而得的产Curdian突变株C-125。

1.1.2 酶制剂 中性蛋白酶,无锡酶制剂厂生产,福林-酚法测酶活。

1.1.3 有机溶剂 95%乙醇,丙酮(化学纯)

1.1.4 标准品 葡萄糖,甘露糖,Curdian制剂,美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 Curdian提取工艺流程。

酶粉→溶解浸出→纱布过滤→澄清酶解

↓

发酵液→灭菌→调pH、温度→

反应器内酶解→加入乙醇2~3倍(v/v)→

凝结沉淀→纱布过滤→丙酮洗涤→抽滤风干→测定

1.2.2 多糖得率计量 以每升发酵液提取获得多糖量(干重)计(g/L)。

1.2.3 Curdian多糖纯度测定 二甲基亚砷溶解,紫外分光光度法。

1.2.4 单糖组分分析 多糖样品50mg加入10.5mol/L的H₂SO₄封管,100℃水解2h。BaCO₃中和,过滤浓缩后作纸层析,展开剂为正丁醇:乙酸:

水 = 4:1:5 (v/v), 苯胺-邻苯二甲酸显色, 105℃ 烘干 5min。

1.2.5 总氮测定 凯氏定氮法。

1.2.6 分子结构分析 红外光谱, Specord 红外光谱仪, KBr 压片法。

2 结果与讨论

2.1 酶法提取 Curdlan 工艺条件的优化

本实验设定四个工艺条件因素: A 因素(加酶量, $\mu\text{g/g}$)、B 因素(加醇倍数, v/v)、C 因素(酶解时间, h)、D 因素(酶解温度, $^{\circ}\text{C}$)。各因素设置三个工艺水平, 采用四因素三水平的 $L_9(3^4)$ 正交表, 设计因素水平表列于表 1:

表 1 酶解操作工艺因素水平表

因素	A	B	C	D
水 1	100	1.5	3.0	35
2	300	2.0	4.0	40
平 3	500	3.0	5.0	45

以多糖得率为目标测定值, 经过 9 种工艺条件组合方式的实验, 结果表明 B 因素(加醇倍数)的极差值最大。可见, 它对多糖得率影响最大, 而 A 因素(酶用量)对多糖得率影响最小。在 9 种处理工艺中以第四种方式组合 $A_2B_3C_2D_1$ 所获多糖得率最高, 为 26.7g/L。故酶法提取 Curdlan 的最佳工艺为: 中性蛋白酶用量为 300 $\mu\text{g/g}$, 加乙醇量为: 乙醇量/酶解液量 = 3/1 (v/v), 酶解时间为 4h, 酶解温度为 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 Curdlan 多糖提取物的性能分析

2.2.1 物理性能

该多糖为白色粉末, 难溶于水, 其 1% 悬浊液在加热至 80 $^{\circ}\text{C}$ 后开始形成无色、半透明固体凝胶, 凝胶特性在 5~100 $^{\circ}\text{C}$ 、pH2~12 范围内性能稳定, 与 Sigma 公司标准品性能接近。

2.2.2 去蛋白效果分析 在使用酶解法提纯之前, 我们曾用直接乙醇沉淀法、高速离心法、硅藻土过滤法等方式进行了 Curdlan 分离提取试验, 现将酶法获得 Curdlan 多糖的含氮量与经上述各方法获得的 Curdlan 多糖含氮量对照如图 1。

图 1 结果说明, 用酶法提取的 Curdlan 多糖中含氮量显著低于其它分离方法所获的 Curdlan 产品的含氮量, 仅为 0.16%, 已达到 FDA 标准(含氮量 $\leq 0.2\%$)。

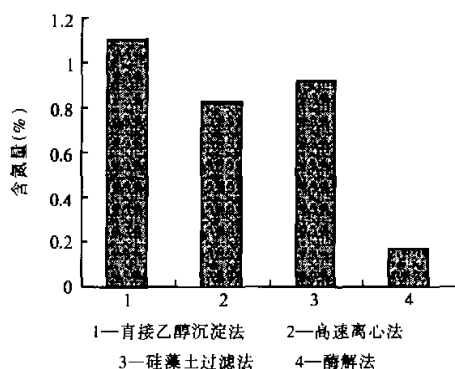


图 1 多种提取方法所获的 Curdlan 含氮量比较

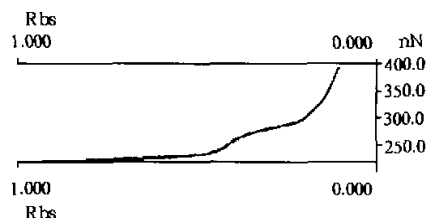


图 2 Curdlan 多糖的紫外光谱

2.2.3 紫外光谱分析 将 Curdlan 多糖经二甲基亚砷溶解后作紫外光谱分析, 图谱见图 2。

图 2 表明, 在 260nm 与 280nm 波长处均无显著吸收峰, 说明产品中已基本去除蛋白质、核酸类物

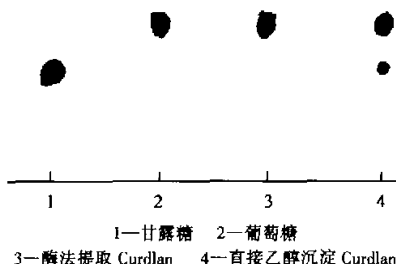


图 3 Curdlan 多糖的纸层析图谱

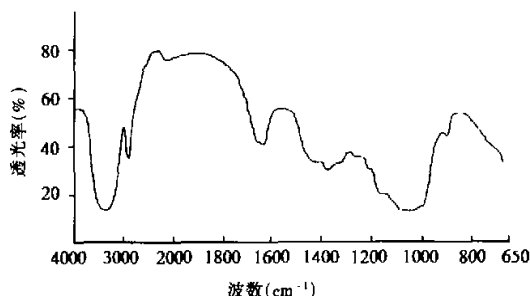


图 4 Curdlan 标准品的红外光谱

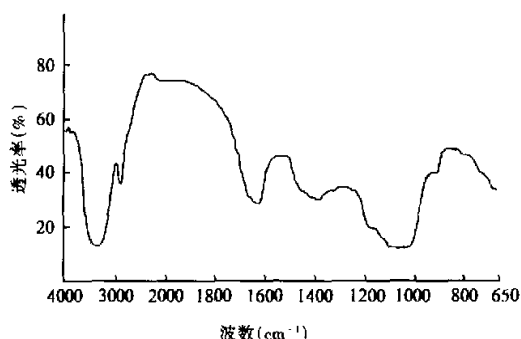


图5 酶法提取 Curdlan 的红外光谱

质。

2.2.4 多糖的单糖组成分析 将 Curdlan 酸解后进行纸层析,与标准品及经直接醇提法获取的产品进行对照,获层析结果如图3。

由图3可见,直接乙醇沉淀提取的 Curdlan 水解物含葡萄糖及少量甘露糖,而酶法提取 Curdlan 的水解物为单一葡萄糖,说明该多糖为葡聚糖,不含甘露聚糖类杂质。

2.2.5 红外光谱分析 Curdlan 产品与标准品的红外图谱见图4、5。

图4、5表明,酶法提取的 Curdlan 红外图谱与标准品一致:890cm⁻¹处的特征峰表示了该多糖的糖

苷键为β构型,1370、2920cm⁻¹处的特征峰表示了它是具有β-(1,3)糖苷键的葡聚糖,870cm⁻¹处无吸收峰,证明了无甘露聚糖存在,1650~1550cm⁻¹之间无吸收峰,证明了无明显氨基酸。红外图谱的分析进一步说明,中性蛋白酶在去除菌体细胞的同时,并未对 Curdlan 的分子结构产生破坏,所获的 Curdlan 样品为分子结构完整、高纯度的β-(1,3)葡聚糖。

参考文献

- 1 张惟杰.糖类复合物生化研究技术.杭州:浙江大学出版社,1994.
- 2 徐建祥等.酶法脱蛋白技术用于螺旋藻多糖提取工艺的研究.食品与发酵工业,1998,24(3):24~27.
- 3 刘如林,赵大健.微生物多糖的产品回收.食品与发酵工业,1990(5):58~62.
- 4 刘晓惠,张翼伸.海带中褐藻糖胶的分级纯化与结构研究.生物化学与生物物理学报,1992,24(4):297~302.
- 5 Thierry fontaine et al., Purification and characterization of endo-1,3-β glucan from *Aspergillus fumigatus*, Eur. J. Biochem., 243, 315~321.
- 6 Sutherland I W., Biotechnology of Microbial Polysaccharides, Cambridge, UK. Cambridge University Press, 1990.

方便薯粉生产工艺及配套设备研究

陈平 湖南果蔬科技有限公司 长沙 410125

陈绍光 湖南省农业科学院 长沙 410125

T52 | A

摘 要 本文报道了班产1t方便薯粉的生产工艺及其配套设备。

关键词 方便薯粉 马铃薯粉 工艺设备

Abstract This paper reported the processing method and equipments to make 1 ton per shift instant noodles.

Key words Instant noodles Potato noodles Processing equipments

在方便面供过于求、市场疲软的今天,方便薯粉却以其口味新、口感好而异军突起,受到市场的青睐。我国是世界上薯粉资源最丰富的国家,而薯类(红薯、马铃薯)的主产区又多为贫困的干旱地山区,也是各级政府扶贫的攻坚地区,因而,方便薯粉生产项目,符合国家产业政策的导向,也是农业产业化工程中较理想的龙头项目。为了满足中、小企业开发方便薯粉

的需要,我们研制了设备投资10万元、班产1t方便薯粉的成套设备及其相应的生产工艺,在湖南省郴州市裕湘面业有限公司投产后,起到了良好的示范作用。现将研究结果,报告于下。

1 原料、辅料

1.1 原料:方便薯粉以红薯、马铃薯、木薯及玉米的