

有机溶剂沉淀法提取乳酸链球菌素的效果

鲁吉珂¹, 黎业娟¹, 吴霄玥¹, 刘欣², 郝利民³

(1. 郑州大学生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 郑州奇泓生物科技有限公司, 河南 郑州 450066;

3. 总后勤部军需装备研究所, 北京 100010)

摘要: 利用水微溶性有机溶剂二氯甲烷、正丁醇, 采用沉淀法从发酵浓缩液中提取乳酸链球菌素。结果表明: 在有机溶剂和发酵浓缩液体积比 1:1 条件下, 丁醇提取乳酸链球菌素纯度可达到 63.32%, 单步沉淀收率 24.3%, 二氯甲烷提取产品纯度 39.96%, 沉淀收率 36.04%; 二氯甲烷和丁醇体积比 1:1 组成的复合溶剂, 提取效果优于单一有机溶剂, 产品纯度和单步收率分别为 45.94% 和 59.3%。该方法可克服现有乳酸链球菌素提取工艺产品纯度低、盐含量高的缺陷, 具有过程简便、产品纯度较高的优点, 具有较好的工业化应用前景。

关键词: 沉淀; 有机溶剂; 乳酸链球菌素; 发酵浓缩液; 分离

Separation of Nisin from Fermentation Broth Concentrate by Organic Solvent Precipitation

LU Ji-ke¹, LI Ye-juan¹, WU Xiao-yue¹, LIU Xin², HAO Li-min³

(1. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. Zhengzhou Qihong Biotechnology Co. Ltd., Zhengzhou 450066, China;

3. Quartermaster Equipment Institute of General Logistics Department of People's Liberation Army, Beijing 100010, China)

Abstract: To obtain high purity nisin product through simple process with low cost, nisin was precipitated from fermentation broth concentrated with organic solvents dichloromethane and *n*-butanol. Under 1:1 (V/V) conditions with butanol employed, the nisin purity was 63.32%, and the precipitation yield was 24.3%. While the purity and yield for dichloromethane was 39.96% and 36.04%, respectively. When a mixture of dichloromethane and butanol at a volume ratio of 1:1 was used, the nisin purity and the precipitation yield was 45.94% and 59.3%, respectively. This new method overcame many disadvantages of the existing method, such as low purity and high salt content. So it shows great potential for industrial applications.

Key words: precipitation; organic solvent; nisin; fermentation broth concentrate; separation

中图分类号: TQ465.92

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)10-0084-03

乳酸链球菌素(Nisin)又称乳链菌肽或乳链菌肽, 是乳酸链球菌(*Streptococcus lactis*)或乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)在代谢过程中产生的具有很强杀菌作用的多肽, 一级结构由 34 个氨基酸组成, 相对分子质量约为 3500, 通常以二聚体形式存在^[1]。Nisin 是一种天然食品防腐剂, 具有抗菌性强、无毒、水溶性好、热稳定性好等优点, 已被广泛应用于乳制品、罐头食品、肉制品和饮料的防腐保鲜^[2]。

目前, 工业上 Nisin 主要是采用发酵法生产。目前从发酵液中提取 Nisin 的方法主要有吸附法、盐析法、膜过滤法、有机溶剂法、泡沫分离法和双水相萃取法等^[3-7]。

吸附法是在发酵液中加入固体吸附剂如大孔树脂或者利用菌体细胞自身吸附乳酸链球菌素, 解吸后将解吸液盐析或喷雾干燥, 制成粉末状食品级 Nisin 产品^[8]; 膜过滤法首先用无机膜或管式膜从发酵液中除去菌体和固体等相对分子质量比乳酸链球菌素大的物质, 再采用卷式膜超滤从发酵液中除去相对分子质量比乳酸链球菌素小的物质, 得到发酵液浓缩物, 最后加入固体食盐, 经喷雾干燥制得食品级 Nisin, 产品中食盐含量为 10%~50%^[9]; 有机溶剂法主要采用正丙醇和丙酮, 将一定量正丙醇加入 NaCl 饱和的预处理后发酵液中, 离心, 上清液加入丙酮沉淀, 冷冻干燥即得 Nisin 粉末^[5]。也有

收稿日期: 2011-11-07

基金项目: 郑州大学引进人才项目; 郑州大学全国大学生创新创业训练计划项目(121045943);

河南省教育厅科学技术研究重点项目(12B530005)

作者简介: 鲁吉珂(1982—), 男, 讲师, 博士, 主要从事功能食品开发研究。E-mail: lj002004@163.com

文献^[10-11]报道采用层析的方法纯化 Nisin, 采用 G50 介质的凝胶过滤层析, 或者采用阳离子交换树脂 D113 的离子交换层析。

综上所述, 目前 Nisin 的提取工艺主要采用的是盐析和喷雾干燥的方式, 产品中以粉末状食品级 Nisin 为主, 质量标准参照 GB 2394—2007《食品添加剂: 乳酸链球菌素》, 产品效价不低于 900IU/mg, NaCl 含量不低于 50%。由于盐含量高、纯度较低, 并且提取步骤繁琐, 纯化过程复杂, 提取成本较高。Nisin 层析工艺得到的产品纯度较高, 但目前仍处于实验室研究阶段, 成本和放大问题成为制约其工业化应用的主要瓶颈^[12]。

传统有机溶剂法分离 Nisin 采用水溶性的正丙醇和丙酮, 本研究提出的有机溶剂沉淀法利用微溶于水的有机溶剂回收高纯度 Nisin, 以发酵浓缩液为原料, 制备含盐量低的高纯度 Nisin 制品, 该方法目前尚未见文献报道。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Nisin 发酵浓缩液(效价为 51.8×10^4 IU/mL) 郑州奇泓生物科技有限公司; Nisin 标准品 美国 Sigma 公司; 丁醇、二氯甲烷、丙酮、乙酸乙酯、乙醇、丙醇、四氯化碳、正己烷均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 有机溶剂沉淀

取一定体积有机溶剂(或者一定比例混合的两种有机溶剂), 和一定体积 Nisin 发酵浓缩液置于分液漏斗中, 混合均匀, 3500r/min 离心分层, 水层和有机溶剂相分离, 分别测量清液体积及效价, 沉淀置于 50℃ 真空干燥, 测定质量及效价。

1.2.2 Nisin 效价测定

琼脂扩散法测定效价(GB 2394—2007)^[13]。

$$\text{单步沉淀收率}(R)/\% = \frac{\text{沉淀质量} \times \text{沉淀效价}}{\text{发酵浓缩液体积} \times \text{发酵浓缩液效价}} \times 100$$

2 结果与分析

有机溶剂沉淀法是向蛋白质溶液中加入丙酮或乙醇等水溶性有机溶剂, 水的活度降低, 水对蛋白表面荷电基团或亲水基团的水化程度降低, 溶液介电常数下降, 蛋白质分子间静电引力增加, 从而凝聚和沉淀^[14]。Nisin 是两性分子, 具有倾向于膜蛋白的性质, 可在有机相和水相的交界处富集浓缩^[15]。本研究所选用的有机溶剂从疏水性较强的正己烷(疏水常数 $\log P$ 为 3.5), 到亲水性较强的乙醇($\log P$ 为 -0.24), 一共 8 种, 见表 1。

表 1 不同有机溶剂疏水常数 $\log P$ 值^[16]

Table 1 Hydrophobic constant ($\log P$ values) of different organic solvents

| 有机溶剂 | 正己烷 | 四氯化碳 | 二氯甲烷 | 丁醇 | 乙酸乙酯 | 丙酮 | 丙醇 | 乙醇 |
|----------|-----|------|------|-----|------|------|-------|-------|
| $\log P$ | 3.5 | 3 | 0.93 | 0.8 | 0.68 | 0.28 | -0.23 | -0.24 |

2.1 单一有机溶剂沉淀 Nisin

首先采用单一有机溶剂沉淀法(表 1), 对 Nisin 发酵浓缩液进行提纯, 结果见表 2。由表 2 可知, 在有机溶剂与发酵浓缩液体积比为 1:1 的条件下, 二氯甲烷和丁醇的提取效果较好; 丁醇提取沉淀 Nisin 纯度可达 63.32%, 单步沉淀收率为 24.3%, 二氯甲烷提取沉淀纯度虽仅为 39.96%, 但沉淀收率为 36.04%; 四氯化碳沉淀 Nisin 收率较低, 不到 10%(表 2); 将发酵浓缩液与丙酮、乙醇、丙醇、乙酸乙酯和正己烷按照体积 1:1 的比例分别混合均匀, 均没有沉淀生成。综合沉淀收率和 Nisin 纯度两项指标, 二氯甲烷和丁醇两种溶剂对 Nisin 的沉淀提取效果较好, 而与其疏水常数相近的乙酸乙酯对 Nisin 没有沉淀作用; 正己烷虽可与发酵浓缩液形成明显分层, 但其对 Nisin 的沉淀效果不太理想(没有沉淀生成)。上述结果表明: 溶剂疏水性差异可能不是决定 Nisin 分离提取的主要因素, 而 Nisin 在有机相和水相的交界处富集浓缩存在溶剂特异性。

表 2 单一有机溶剂沉淀 Nisin 实验结果

Table 2 Nisin precipitation results with single organic solvent

| 有机溶剂 | 实验现象 | 沉淀效价/(IU/mg) | Nisin 纯度/% | 沉淀收率/% |
|------|----------------|--------------|------------|--------|
| 丁醇 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 25328 | 63.32 | 24.3 |
| 二氯甲烷 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 15902 | 39.76 | 36.04 |
| 四氯化碳 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 13093 | 32.73 | 9.2 |
| 丙酮 | 不分层, 无沉淀 | — | — | — |
| 乙醇 | 不分层, 无沉淀 | — | — | — |
| 丙醇 | 不分层, 无沉淀 | — | — | — |
| 乙酸乙酯 | 分层无沉淀 | — | — | — |
| 正己烷 | 分层无沉淀 | — | — | — |

注: “—”表示无沉淀生成。实验条件: 有机溶剂和 Nisin 发酵浓缩液体积比 1:1 置于分液漏斗中, 混合均匀, 3500r/min 离心分层, 水层和有机溶剂相分离, 分别测量清液体积及效价, 沉淀 50℃ 真空烘干, 测定质量及效价。

2.2 增加有机溶剂用量沉淀 Nisin

根据单一有机溶剂的实验结果, 选取二氯甲烷和丁醇为沉淀溶剂, 增加其用量进行 Nisin 提取实验, 结果见表 3。对二氯甲烷沉淀体系, 增加二氯甲烷用量至发酵浓缩液体积 2 倍时, 沉淀 Nisin 纯度为 42.95%, 此时单步沉淀收率为 47.7%; 和二氯甲烷与 Nisin 浓缩液体积比为 1:1 时相比, 产品纯度略有提高; 而增加丁醇用量

至发酵浓缩液体积 2 倍时, Nisin 纯度反而降低, 由 63.32% 降至 54.42%, 但单步沉淀收率由 24.3% 升至 43.5%。考虑到实际应用中增加溶剂用量会增加后续溶剂回收成本, 因此选用有机溶剂与发酵浓缩液体积比为 1:1 的比例进行 Nisin 沉淀提取。

表 3 增加有机溶剂用量沉淀 Nisin 实验结果

Table 3 Nisin precipitation results with increased organic solvent amount

| 有机溶剂与 浓缩液体积比 | 实验现象 | 沉淀效价/ (IU/mg) | Nisin 纯度/% | 沉淀 收率/% |
|-----------------|----------------|------------------|---------------|------------|
| 二氯甲烷:浓缩液=1:1 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 15902 | 39.76 | 36.04 |
| 二氯甲烷:浓缩液=2:1 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 17181 | 42.95 | 47.7 |
| 二氯甲烷:浓缩液=3:1 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 7592 | 18.98 | 45.0 |
| 丁醇:浓缩液=1:1 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 25328 | 63.32 | 24.3 |
| 丁醇:浓缩液=2:1 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 21767 | 54.42 | 43.5 |

注: 实验条件: 有机溶剂和 Nisin 发酵浓缩液一定体积比置于分液漏斗中, 混合均匀, 3500r/min 离心分层, 水层和有机溶剂相分离, 分别测量清液体积及效价, 沉淀 50℃ 真空烘干, 测定质量及效价。

2.3 复合有机溶剂沉淀

表 4 复合有机溶剂沉淀 Nisin 结果

Table 4 Nisin precipitation results with complex organic solvents

| 有机溶剂 | 实验现象 | 沉淀效价/ (IU/mg) | Nisin 纯 度/% | 沉淀收 率/% |
|-----------|-----------------|------------------|----------------|------------|
| 二氯甲烷-甲醇 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 11862 | 29.66 | 26 |
| 二氯甲烷-乙醇 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 31796 | 79.49 | 14.4 |
| 二氯甲烷-丙醇 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 22011 | 55.03 | 24.6 |
| 二氯甲烷-丁醇 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 18375 | 45.94 | 59.3 |
| 二氯甲烷-丙酮 | 分 3 层, 中间少量褐色沉淀 | 16099 | 40.25 | 5.7 |
| 二氯甲烷-乙酸乙酯 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 10983 | 27.46 | 11.7 |
| 丁醇-甲醇 | 不分层, 无沉淀 | — | — | — |
| 丁醇-乙醇 | 不分层, 无沉淀 | — | — | — |
| 丁醇-丙醇 | 微量沉淀 | — | — | — |
| 丁醇-丙酮 | 不分层, 无沉淀 | — | — | — |
| 丁醇-乙酸乙酯 | 分 3 层, 中间层褐色沉淀 | 21856 | 54.64 | 45.7 |

注: “—” 表示无沉淀或者只有微量沉淀而未取样。实验条件: 两种有机溶剂和 Nisin 发酵浓缩液体积比 1:1:1 置于分液漏斗中, 混合均匀, 3500r/min 离心分层, 水层和有机溶剂相分离, 分别测量清液体积及效价, 沉淀 50℃ 真空烘干, 测定质量及效价。

根据单一有机溶剂实验结果, 选取二氯甲烷和丁醇为基础溶剂, 分别将其与短链醇类、丙酮和乙酸乙酯组成体积比 1:1 的复合溶剂, 再进行 Nisin 沉淀提取实验, 结果见表 4。其中二氯甲烷的上述复合溶剂, 同 Nisin 发酵浓缩液混合离心后均分为 3 层, 中间层为褐色沉淀: 二氯甲烷和乙醇复合溶剂提取 Nisin 纯度最高, 可达 79.49%, 但单步沉淀 Nisin 收率较低, 仅为 14.4%; 结合收率和产品纯度两项指标综合考察, 二氯甲烷和丁

醇复合溶剂提取效果较好, 产品纯度和单步收率分别为 45.94% 和 59.3%。丁醇同甲醇、乙醇和丙酮组成的复合溶剂, 同 Nisin 发酵浓缩液混合后不分层也无沉淀; 丁醇和丙醇混合溶剂仅有微量沉淀; 丁醇和乙酸乙酯混合溶剂提取 Nisin 对应的产品纯度和单步收率分别为 54.64% 和 45.7%。上述实验结果说明: 选用合适的复合有机溶剂会得到比单一溶剂更优的 Nisin 分离提纯效果; 采用简单的有机溶剂沉淀方法可以得到纯度较高的 Nisin 产品 (接近 80%); 有机溶剂及其复合有机溶剂的选用对 Nisin 产品的纯度和收率均有显著影响。

3 结 论

针对现有 Nisin 提取工艺存在的成品盐含量高、提取工艺复杂、提取成本偏高的问题, 提出了采用有机溶剂沉淀法提纯 Nisin 的新工艺。利用水微溶性有机溶剂二氯甲烷和丁醇, 从 Nisin 发酵浓缩液中提取纯度较高的 Nisin 制品, 具有过程简便、产品纯度较高等优点。在二氯甲烷和乙醇体积比 1:1 混合为复合溶剂条件下, 提取 Nisin 沉淀纯度可达 79.49%。尽管单步沉淀收率不高, 但下一步可采用多步沉淀的方式来提高分离纯化的总收率。该课题的进一步研究开发, 将具有较好的工业化应用前景。

参考文献:

- [1] 吉玉强, 吴兆亮, 郭雅楠, 等. 微生物发酵生产乳链菌肽的分离技术研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 369-372.
- [2] 蒋昱, 张朝晖, 周晓云. 乳链菌肽研究进展[J]. 科技通报, 2010, 26(3): 358-361.
- [3] 王晖, 胡滨, 吴兆亮, 等. 大孔吸附树脂分离发酵液中乳链菌肽的工艺研究[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(9): 572-574.
- [4] ZHANG Fang, WU Zhaoliang, WU Zengjiang, et al. Effect of ionic strength on the foam separation of nisin from the fermentation broth[J]. Separation and Purification Technology, 2011, 78(1): 42-48.
- [5] 吴疆, 班立桐, 童应凯. 乳酸链球菌素分离条件的研究[J]. 中国酿造, 2008(8): 20-22.
- [6] 赵艳丽, 殷昊, 吉玉强, 等. 氯化钠盐析分离发酵液中的乳链菌肽工艺研究[J]. 食品工业科技, 2008(2): 226-227.
- [7] 李厚, 蔡昭铃, 丛威, 等. 温度诱导双水相分离纯化细菌素工艺条件的选取与优化[J]. 过程工程学报, 2001, 1(4): 412-415.
- [8] 还连栋, 陈秀珠, 王明华, 等. 从发酵液中分离提取乳链菌肽的方法: 中国, 00129928.X[P]. 2001-05-02.
- [9] 沈颜新, 范悠然. 从乳酸乳球菌发酵液中分离乳酸链球菌素的方法: 中国, 200510066481.7[P]. 2007-01-03.
- [10] 吴红艳, 陈飞, 桓明辉, 等. 乳酸菌肽分离纯化研究[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(2): 104-106.
- [11] 胡滨, 王晖, 赵艳丽, 等. 离子交换树脂分离发酵液中乳链菌肽工艺[J]. 离子交换与吸附, 2008, 24(4): 313-329.
- [12] XIAO Dan, DAVIDSON P M, D'SOUZA D H, et al. Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and methanol from a 2.5% preparation[J]. Journal of Food Engineering, 2010, 100(2): 194-200.
- [13] 吴琼, 生英涛, 唐名山, 等. 乳酸乳球菌发酵液中乳链菌肽的分离纯化[J]. 食品科学, 2003, 24(9): 103-106.
- [14] 孙彦. 生物分离工程[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [15] 罗晓蕾, 施碧红, 邢佩佩, 等. 细菌素粗提方法的比较[J]. 安徽农学通报, 2010, 16(4): 45-46.
- [16] 何平, 黄家乐, 史清翠, 等. 不同疏水参数有机溶剂中木瓜蛋白酶及其固定化酶活性的变化[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(3): 223-229.