

# 副干酪乳杆菌对甘薯浆液中淀粉絮凝机理研究

李新华<sup>1</sup>, 赵晓阳<sup>1</sup>, 张荔力<sup>2</sup>

(1.沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161; 2.辽宁医学院食品科学与工程学院, 辽宁 锦州 121001)

**摘要:**为探讨酸浆法分离甘薯淀粉传统工艺中的淀粉沉降分离机理, 进一步制备高效生物絮凝剂。本实验采用 Zeta 电位测定、粒度分析及离子键检测研究副干酪乳杆菌对甘薯淀粉絮凝沉淀的作用。结果表明: 絮凝过程基于“架桥”机理, 淀粉颗粒与菌体间靠离子键结合, 絮凝作用使悬浊液中淀粉平均粒径减小, 密度增大, 导致淀粉颗粒凝聚沉降; 通过热处理和酶处理实验分析菌体起絮凝作用的活性成分组成, 表明副干酪乳杆菌活性成分为蛋白类物质。

**关键词:**副干酪乳杆菌; 甘薯淀粉; 絮凝机理

## Flocculation Mechanism of Sweet Potato Starch by Addition of *Lactobacillus paracasei*-fermented Sweet Potato Slurry

LI Xin-hua<sup>1</sup>, ZHAO Xiao-yang<sup>1</sup>, ZHANG Li-li<sup>2</sup>

(1. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. College of Food Science and Engineering, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

**Abstract:** The goal of this work was to explore the mechanism of sedimentation separation of starch by acidic steeping liquor method so as to provide experimental guidance for the development of highly efficient bioflocculant. The *Lactobacillus paracasei*-fermented sweet potato slurry and its centrifugation supernatant and resuspended precipitate were separately added with sweet potato starch, and the flocculation of sweet potato starch in the three liquors was studied by the determination of Zeta potential, granular size and ionic bond. The flocculation of sweet potato starch was based on the bridging mechanism, and starch granules were conjugated with bacterial cells through ionic bond, and after flocculation, mean starch granular size decreased and granular density increased, resulting in the aggregation and sedimentation of starch granules. Moreover, from the results of experiments on the thermal and enzymatic stability of substances with flocculating activity, proteins were the active components in *Lactobacillus paracasei* responsible for flocculation.

**Key words:** *Lactobacillus paracasei*; sweet potato starch; bridging mechanism

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)19-0273-04

絮凝作用是用以沉淀分离混合乳液中淀粉、蛋白质以及污水治理中提取分离有机物的主要方法<sup>[1]</sup>。微生物絮凝剂(microbial flocculant, MBF)是由微生物产生的一类具有一定絮凝活性的生物高分子化合物。与传统化学絮凝剂铝盐、铁盐和聚丙烯酰胺相比, 它具有高效、无毒、无二次污染的优点, 是化学絮凝剂理想的替代产品<sup>[2-3]</sup>。絮凝机理的研究对微生物絮凝剂的开发应用有着重要的意义, 在机理的研究中已取得重要进展, 提出了如 Butterfield 黏质假说、吸附架桥和电中和作用等学说<sup>[4-5]</sup>, 而传统酸浆法沉降分离甘薯淀粉的机理尚未明确。本实验对甘薯淀粉中副干酪乳杆菌絮凝机理进行深入的研究, 揭示其对淀粉高效絮凝活性的原因, 为进一步在甘薯淀粉生产中应用, 改变甘薯淀粉传统的生产

工艺, 提高甘薯淀粉质量及产量提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及试剂

副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)由辽宁医学院食品学院微生物实验室提供, 本实验室保存。

胰蛋白酶 国药集团化学试剂有限公司;  $\alpha$ -淀粉酶 北京奥博星生物技术有限公司; EDTA、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、尿素 沈阳沈一精细化学品有限公司。

### 1.2 甘薯浆液体培养基

酵母粉 5g、乳糖 5g、 $K_2HPO_4$  2g、吐温-80 1mL、甘薯浆 1000mL, 调 pH6.2~6.4, 121℃ 高压蒸汽灭菌 30min。

收稿日期: 2010-01-22

作者简介: 李新华(1955—), 男, 教授, 硕士, 主要从事粮油深加工与转化研究。E-mail: lixh.syau@163.com

### 1.3 仪器与设备

Nano-ZS 型 Zeta 电位分析仪 英国 Malvern 公司; Microtrac S3500 激光衍射式粒度分布测定仪 美国麦奇克公司; TU-1810 紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; DNP-9082 型电热恒温培养箱 上海精宏实验设备有限公司; CR-21G 高速冷冻离心机 日本日立公司; Sartorius 标准型 PB-10 pH 计 上海摩速科学器材有限公司; SW-CJ-1FD 型单人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 副干酪乳杆菌发酵液的制备

取菌种按体积分数 1% 接种于甘薯浆液体培养基中, 置 25℃ 静置培养 48h, 保存待用。

#### 1.4.2 絮凝活性测定

将鲜甘薯与水按 1:4(m/V) 比例在组织捣碎机中打碎 10min, 80 目筛子过滤。取滤液 100mL 加入 10mL 发酵液, 混合搅拌使之充分混合, 静置 5min 后于 550nm 波长处测定吸光度( $A_1$ ), 以空白培养基代替发酵液作对照实验, 550nm 波长处测定吸光度( $A_2$ )。絮凝活性(以絮凝率表示)按式(1)计算。

$$\text{絮凝率}/\% = \frac{A_2 - A_1}{A_2} \times 100 \quad (1)$$

#### 1.4.3 副干酪乳杆菌发酵液絮凝活性的分布实验

取 10mL 发酵液, 5000r/min 离心 20min, 留上清液备用。沉淀物用蒸馏水洗涤两次后, 加入 10mL 蒸馏水制成悬浊液, 分别测定发酵原液、上清液以及沉淀物悬浊液的絮凝活性。

#### 1.4.4 絮凝过程 Zeta ( $\zeta$ ) 电位的测定

##### 1.4.4.1 pH 值对 Zeta 电位的影响

称取 100mL 的甘薯淀粉, 其中加入 10mL 发酵液, 将 pH 值调节到 4.0~6.0, 摇匀, 静置一段时间后, 测定絮凝前后淀粉乳的  $\zeta$  电位。

##### 1.4.4.2 盐溶液对 Zeta 电位的影响

称取 100mL 的甘薯淀粉, 其中加入 10mL 发酵液, 将 pH 值调至 4.5, 添加质量浓度为 1g/100mL 的不同种类的盐溶液和 10mL 发酵液, 摇匀, 静置一段时间后, 测定絮凝前后淀粉乳的  $\zeta$  电位。

#### 1.4.5 絮凝前后淀粉颗粒粒度的变化

将最佳条件下絮凝后静置 10min 的淀粉乳上清液、沉淀以及原淀粉乳溶液, 通过 Microtrac S3500 激光衍射式粒度分布测定仪, 测定淀粉絮凝前后颗粒粒度分布变化。

#### 1.4.6 菌体与淀粉颗粒之间结合键的检测

分别用 2mol/L EDTA、3mol/L HCl 溶液和 5mol/L 尿素处理絮凝沉淀, 轻轻摇匀, 静置一段时间后观察现象。

#### 1.4.7 副干酪乳杆菌絮凝活性物质成分的初步测定

##### 1.4.7.1 热稳定性实验

将副干酪乳杆菌发酵液分别在 30、40、50、60、70、80、90℃ 水浴中加热 30min, 然后分别测定加热后的发酵液对淀粉乳的絮凝率。

##### 1.4.7.2 酶稳定性实验

用 250mmol/L EDTA 及蒸馏水各洗两次菌体, 洗过的菌体细胞重新悬于分别加有蛋白酶、糖化酶的 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液中, 30℃ 保温, 在不同时间取样, 测定絮凝水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同絮凝剂对甘薯淀粉絮凝活性的比较

通过对絮凝率的检测, 得知发酵原液、上清液以及沉淀物悬浊液的絮凝率分别为 72.30%、23.41%、72.37%。沉淀物悬浊液的絮凝率很高, 而上清液絮凝的效果较差, 表明絮凝活性物质主要存在于菌体中, 而不是菌体细胞的胞外代谢产物。因此, 在后续的实验中以菌体为对象, 分析其絮凝机理。

### 2.2 絮凝过程 Zeta 电位的测定

#### 2.2.1 pH 值对 $\zeta$ 电位的影响

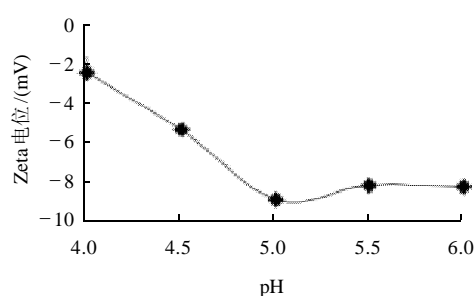


图1 pH 值对 Zeta 电位的影响  
Fig.1 Effect of pH value on Zeta potential

经测定, 絮凝前淀粉颗粒  $\zeta$  电位是 -13.7mV, 菌体  $\zeta$  电位是 -0.49mV。由图 1 可见, 菌体絮凝沉淀淀粉, 当 pH 值为 4.0 时, 淀粉乳  $\zeta$  电位最低(绝对值), 为 -2.29mV, 随着 pH 值的升高,  $\zeta$  电位(绝对值)逐渐增大。pH 值为 5.0~6.0 时, 体系  $\zeta$  电位(绝对值)较高, 相应分散稳定性好。

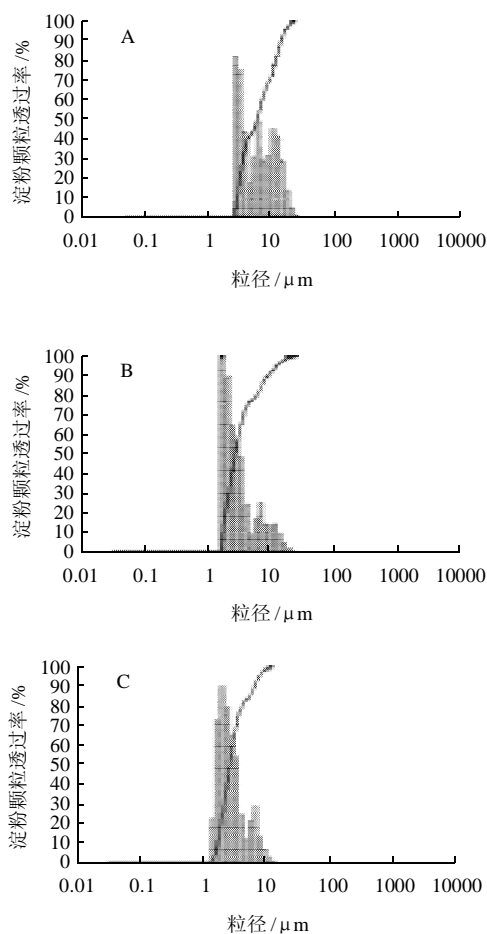
#### 2.2.2 盐溶液对 $\zeta$ 电位的影响

当分别加入 1g/100mL 的 NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub> 3 种盐溶液, pH 值为 4.5 时, 絮凝后淀粉颗粒电位分别为

-2.47、-8.19、-10.40。当 $\text{Na}^+$ 与絮凝剂共同作用时， $\zeta$ 电位(绝对值)小于pH4.5不加盐溶液的淀粉乳 $\zeta$ 电位，对淀粉颗粒的絮凝能力远远高于单独使用絮凝剂，由此说明 $\text{Na}^+$ 起到助凝剂的作用。

淀粉颗粒与菌体在水中都带负电，它们之间存在较大的静电斥力。要克服菌体与淀粉颗粒之间的静电排斥力，就一定存在某种特殊的作用力。数值显示，当淀粉颗粒表面电位降低到一定低点时，此淀粉颗粒的稳定性降到某个程度，颗粒将很快聚沉。因此，在絮凝过程中，每个菌体可以和多个淀粉颗粒结合，这样便形成了“架桥”作用，从而形成大颗粒迅速沉降下来。而在同一pH值下， $\zeta$ 电位随着 $\text{Na}^+$ 的添加，向零电点处靠近，这说明 $\text{Na}^+$ 所带正电荷与淀粉颗粒表面所带负电荷发生了电中和作用。由此得出， $\text{Na}^+$ 的加入导致电中和作用压缩双电层，使菌体对淀粉颗粒的吸附凝聚量增加。

### 2.3 絮凝前后淀粉颗粒粒度的变化



A. 絮凝前淀粉乳的粒径; B. 絮凝后沉淀下来的淀粉乳粒径; C. 絮凝后上清液中的淀粉乳粒径。

图2 絮凝前后淀粉颗粒粒度的变化

Fig.2 Change in starch granular size before and after flocculation

为考察发酵液作用后淀粉粒径变化情况，经粒度分析仪测定得到的结果见图2。经发酵液处理前后，甘薯淀粉溶液中颗粒粒径分布发生明显变化，处理后的甘薯浆液中的淀粉颗粒粒径变小。说明经发酵液处理，淀粉颗粒被菌体吸附，由于淀粉颗粒自身的双电层在吸附过程中被破坏，使得粒径变小，颗粒密度增大，同时淀粉颗粒间产生“架桥”现象，形成较大的絮凝体并由重力作用在浆液中迅速下沉。该结果直观上显示了发酵液的作用机理为菌体与淀粉颗粒间的吸附和“架桥”作用。

### 2.4 菌体与淀粉颗粒之间结合键的检测

加入EDTA和HCl的絮凝沉淀中絮块大量分解，加入尿素的絮凝沉淀无明显的解絮现象。由此现象可知，絮凝沉淀对EDTA和HCl敏感，而对尿素不敏感，因为EDTA和HCl能与淀粉颗粒结合，破坏离子键，从而发生解絮现象。而尿素和淀粉颗粒之间可形成氢键。因此可以推测絮凝剂与甘薯淀粉之间的结合可能是靠离子键结合的。

### 2.5 絮凝活性物质成分测定

据资料<sup>[6-7]</sup>报道，菌体絮凝作用的主要活性成分可能是蛋白质类或糖类物质。为了分析副干酪乳杆菌主要起絮凝作用的活性成分，本研究进行酶解和热作用实验，进一步了解絮凝作用机理。

#### 2.5.1 絮凝活性物质的热稳定性

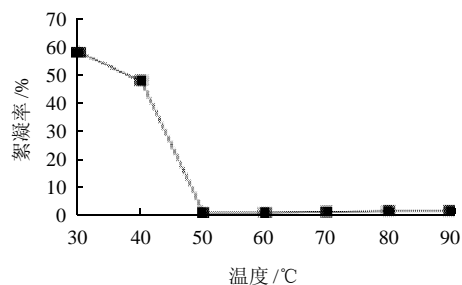


图3 温度对絮凝活性物质的影响

Fig.3 Effect of temperature on flocculating activity

某些由多糖构成的絮凝剂基本不受温度的影响<sup>[8-9]</sup>，而以蛋白质为主要成分的微生物絮凝剂的活性受温度影响很大，高温时变性，丧失部分絮凝能力<sup>[10]</sup>。由图3可知，其絮凝率随着温度的升高而迅速降低。在50℃以后，副干酪乳杆菌发酵液几乎没有絮凝活性。说明絮凝活性物质不具有热稳定性，絮凝活性受温度的影响较大。这一结果也进一步说明该絮凝活性物质的絮凝作用是由菌体细胞本身产生的，它的主要有效成分是蛋白质类物质。

#### 2.5.2 絮凝活性物质的酶稳定性

由图4可知，在胰蛋白酶催化水解作用下，絮凝活性物质的絮凝水平迅速下降，在20min时，絮凝活性

降低到低于10%。因此,该絮凝活性物质对胰蛋白酶的作用是敏感的,在胰蛋白酶的作用下其絮凝活性显著下降,这是因为絮凝活性物质在酶的作用下水解,从而引起多聚物分子质量降低。证明该絮凝活性物质絮凝作用主要来自蛋白质。而 $\alpha$ -淀粉酶对絮凝活性影响较小,糖类不起主要絮凝作用。

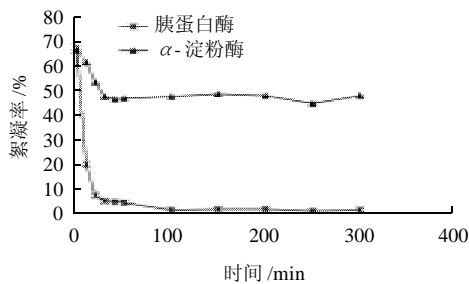


图4 酶对絮凝活性物质的影响

Fig.4 Effect of enzyme on flocculating activity

### 3 结 论

副干酪乳杆菌发酵液在甘薯浆液中对淀粉具有明显的絮凝活性,实验证明起絮凝作用活性物质主要存在于菌体中,而不是菌体细胞的胞外代谢产物。甘薯浆液中的淀粉颗粒在絮凝后粒径变小,颗粒密度增大,菌体大分子通过离子键作用与多个淀粉颗粒结合,并在淀粉颗粒间产生“架桥”现象,形成较大的淀粉絮凝体沉淀下来,同时 $\text{Na}^+$ 作为助凝剂起到电中和作用。絮凝活性物质的主要有效成分是蛋白质类物质。

本研究虽然初步证明絮凝活性成分是蛋白质类物

质,但这类物质究竟出于哪种蛋白,是简单蛋白质还是复合蛋白质,在菌体上是如何分布的,以及从菌体上分离出来还能否具有絮凝活性,都还有待于进一步研究。副干酪乳杆菌对于其他成分的絮凝作用如何,能否在污水治理等过程中作为生物絮凝剂,也有待于进一步实验证明。

### 参考文献:

- [1] 卢文玉,张通,张冬艳,等.天然碱泥分离用微生物絮凝剂产生菌的筛选[J].微生物学通报,2002,29(2):17-21.
- [2] 张永波,杨开,周毅.微生物絮凝剂普鲁兰絮凝机理初探[J].上海环境科学,2001,20(9):448-462.
- [3] 叶晶菁,谭天伟.微生物絮凝剂的研制:菌种选育、絮凝效果及提取工艺[J].微生物学通报,2001,28(4):31-35.
- [4] NAKAURA J, MIYGEYSHI S, HIROSE Y. Modes of flocculation of yeast cells with flocculant produced by *Aspergillus sojae* AJ7002[J]. Agric Biol Chem, 1976, 40(8): 1565-1571.
- [5] RAICHUR A M, MISRA M, BUKKA K, et al. Flocculation and flotation of coal by adhesion of hydrophobic *Mycobacterium phlei*[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1996, 8(1/2): 13-24.
- [6] NAKAMURA J, MIYASHIRO S, HIROSA Y. Purification and chemical analysis of microbial cell flocculant produced by *Aspergillus sojae* AJ-7002[J]. Agric Biol Chem, 1976c, 40(3): 619-624.
- [7] 李素清,柯水洲,袁辉洲,等.微生物絮凝剂的研究进展[J].净水技术,2008,27(1):5-8.
- [8] TAKAGI H, KADOWAKI K. Flocculant produced by *Paecilomyces* sp. taxonomic studies and culture conditions for production[J]. Agric Biol Chem, 1985, 49(1): 13151-13157.
- [9] KURANE R, TOEDA K, TAKEDA K, et al. Culture condition for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*[J]. Agric Biol Chem, 1986, 50(9): 2309-2313.
- [10] JANDA J M, ABBOTT S L. Bacterial identification for publication: When is enough enough[J]. Clin Microbiol, 2002, 40(6): 1887-1891.