



韩勇. 微生物胞外多糖提取纯化研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2019(5):159-161.

微生物胞外多糖提取纯化研究进展

韩 勇

(山西药科职业学院, 山西 太原 030031)

摘要:近年来,微生物胞外多糖以其众多的生物和药理作用引起人们的重视,研究和开发具有生物活性的胞外多糖已成为科学研究的热点,其提取纯化工艺是多糖研究与开发的重要组成部分。本文综述了近些年微生物胞外多糖的提取纯化方法,旨在为其进一步的开发利用提供参考。

关键词:微生物;胞外多糖;提取;纯化

多糖是一类天然大分子物质,不仅是生物体的组成成分,且具有重要的生物活性功能。胞外多糖是由微生物菌体产生的多糖,易与菌体分离,近些年通过液体深层发酵培养技术实现了许多胞外多糖的大规模工业化生产。到目前为止,已大量投产的微生物胞外多糖主要有黄原胶、结冷胶、热凝多糖等。采用液体深层发酵生产微生物胞外多糖具有生产周期短、产量大、提取率高,易于实现大规模工业化生产等优点,已逐渐成为获取胞外多糖的主要方法,具有广阔的开发应用前景。

在微生物胞外多糖的生产过程中,除采用特殊工艺控制发酵过程以外,胞外多糖的提取纯化工艺,同样是保证产品质量、降低生产成本的关键,已成为多糖生产的制约因素。本文就近年来微生物胞外多糖的提取、纯化方法进行了综述,以期微生物多糖进一步的研究提供参考。

1 微生物胞外多糖的提取

1.1 发酵液预处理

发酵液的预处理工艺主要是将培养液中的细胞、残糖、色素及其他代谢产物进行提前处理,尽可能并大量的除去对多糖分离提取有影响的杂质。而且,许多胞外多糖发酵液的粘稠度较高,不易进行液固分离。为改变发酵液的物理流变特性,有必要对发酵液进行预处理操作。预处理可采用的工艺方法包括物理法、化学法、酶处理法等。邓振山等^[1]对一株结皮真菌产胞外多糖的研究中,真菌经发酵培养,取其发酵液,布氏漏斗6层滤纸抽滤,5 g·100 mL⁻¹活性炭吸附5 min,过滤,取其滤液用旋转蒸发器浓缩至1/4体积。刘

晶等^[2]在对副干酪乳杆菌 VL8 产胞外多糖的研究中,将发酵液在 95 ℃ 水浴 5 min 去酶活,4 ℃, 8 000 r·min⁻¹ 条件下离心 15 min,得发酵上清液。

1.2 多糖的提取

从发酵液中提取多糖的工艺方法主要是根据多糖在发酵液中的性质来决定的。实际生产研究中,可采用一些使多糖在溶液中溶解度降低后分相、脱水、析出或加入能与多糖结合絮凝沉淀的溶剂,以达到沉淀分离多糖的目的。

1.2.1 有机溶剂法 有机溶剂沉淀是多糖分离纯化最常用的工艺方法。在多糖溶液中加入与水互溶的有机溶剂,可降低多糖的溶解度,从而引起多糖沉淀或凝聚,同时有助于脱色及脱去低分子量的杂质。甲醇、乙醇、异丙醇和丙酮等是多糖分离纯化较常用的有机溶剂,其中乙醇应用最为广泛。多糖水溶液中加入乙醇,随着溶液中乙醇浓度逐渐提高,多糖溶解度逐渐降低,形成沉淀析出。目前,醇沉法已广泛用于多糖的提取分离^[3-5]。韩蓓等^[6]将 *Pantoea ananatis* G-14 细菌发酵液离心取上清,上清液中加入 3 倍体积的 95% 预冷乙醇过夜沉淀,经离心收集多糖。

1.2.2 超滤 超滤是一种新型膜分离技术,是利用不同截留分子质量的微孔滤膜,将溶液中具有不同分子质量组成的组分高效分离。超滤具有条件温和、操作简单、分离效率高、极少破坏多糖的生物活性、可防止生物热敏性物质失活等优点,且没有有机溶剂法的试剂残留,现已成为多糖提取分离研究的重要方法,正在向大规模工业化方向发展。

武忠伟等^[7]采用切向流超滤系统,分别使用 0.1 μm 和 100 ku 膜组件,将蝙蝠蛾拟青霉发酵液中的胞外多糖分为分子质量 > 2 000 ku, 100 ~ 2 000 ku 和 < 100 ku 三部分。与传统的分离方法相比,超滤膜法分离发酵液中胞外多糖具有快速、

收稿日期:2018-11-19

基金项目:山西药科职业学院科研资助项目(2016106)。

作者简介:韩勇(1978-),男,硕士,讲师,从事微生物发酵工程研究。E-mail:swxyhy@163.com。

能耗低和损失率低等优点。

1.2.3 喷雾干燥法 喷雾干燥法具有传热快、水分蒸发迅速、干燥时间短的特点,目前已用于多种生物活性物质的提取分离。张俐娜等^[8]将40 L茯苓菌丝体培养液用喷雾干燥机干燥得到51.8 g胞外粗多糖,喷雾干燥机的入口温度250℃,出口温度70~80℃。

1.2.4 冷冻干燥法 冷冻干燥法是通过冻结后升华原理去除物料中的水分,获得干燥制品的技术。与其他干燥方法相比,具有制品不变质、易长期储存、利于热敏性物质保持生物活性等优点。

徐晓芬等^[9]采用冷冻干燥,-80℃预冻12 h,冷阱温度-50℃,真空度 10^{-3} mBar,冻干48 h,得类芽孢杆菌BD3526的胞外多糖粗品。

2 微生物胞外多糖的脱蛋白

在胞外多糖的纯化过程中,多糖中的蛋白质常常影响多糖纯度,因此多糖脱除蛋白质是多糖纯化精制的关键。一般选择使多糖不沉淀而使蛋白质沉淀的试剂来处理,但处理操作要求时间短,温度低,防止多糖降解。常用的多糖除蛋白的方法有:Sevag法、三氯乙酸法、三氟三氯乙烷法和酶法等。

2.1 Sevag法

多糖脱蛋白较好的方法是Sevag法,蛋白质在氯仿等有机溶剂中变性,形成胶状,可经离心后除去。Sevag法的优点是工艺条件温和,缺点是蛋白质脱除效率较低,需要经过多次操作才能除净蛋白质,并且Sevag法有机试剂用量大,容易造成有毒溶剂残留。

杨晨璐等^[10]将植物乳杆菌胞外多糖溶液中加入1/3体积的Sevag试剂,震荡30 min后,4 000 r·min⁻¹离心15 min,收集上层水相溶液,重复以上操作至两相之间无蛋白质层为止。

2.2 三氯乙酸法

三氯乙酸法是在粗多糖溶液中加入三氯乙酸,应用三氯乙酸是一种强酸,使蛋白质变性沉淀而去除,但同时会使多糖链水解,造成多糖损失和多糖组分发生变化,此外也会造成有机试剂残留。

王金玲等^[11]采用三氯乙酸法对桦褐孔菌胞外多糖进行脱蛋白操作,最佳工艺为三氯乙酸0.5 mol·L⁻¹,加入量15%,振荡时间20 min,静止时间40 min。芦红云等^[12]将灰树花胞外粗多糖用体积分数3%三氯乙酸脱蛋白。

2.3 三氟三氯乙烷法

将多糖溶液与三氟三氯乙烷等体积混合,低

温下搅拌10 min,离心后得上层水层,水层相继续用此方法处理多次,即得无蛋白质的多糖溶液。此方法的原理是三氟三氯乙烷可将蛋白质沉淀。本方法效率较高,但所用溶剂易挥发,不宜大规模工业化应用。

2.4 酶法

酶法是在多糖溶液中加入一定浓度的蛋白酶,在最佳的酶反应条件下水解去除蛋白质的方法。蛋白质水解酶类可以去除多糖的结合蛋白质,常用的酶有胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶等。酶法具有条件温和,多糖损失率低等特点。缺点是酶法不能完全去除多糖中的蛋白质。

3 微生物胞外多糖的纯化

从发酵液中获得的多糖经除去杂质后,仍是含有多种不同相对分子质量级的混合物,要得到相对分子质量分布均一的组分,仍需对其进行进一步的纯化。

3.1 脱色

有些胞外多糖含有大量色素,影响成品的质量,因此粗多糖必须脱色。多糖脱色常常采用吸附法、氧化法、离子交换法。

戴世华等^[13]对秀珍菇胞外多糖活性炭脱色工艺进行了研究,确定最佳的脱色工艺条件为:活性炭用量1.6%,脱色时间70 min,脱色温度70℃,pH 3。在此条件下,色素的脱除率为80.5%,多糖的保留率为84.8%。

彭期定等^[14]采用30% H₂O₂脱色木蹄层孔菌胞外多糖,H₂O₂用量为粗多糖溶液体积的1/10。

芦红云等^[12]采用大孔吸附树脂D303对灰树花胞外粗多糖脱色。

3.2 透析法

透析法是利用一定大小孔目的透析袋,使多糖中的无机盐或其他小分子杂质透过从而达到分离纯化的目的。徐健等^[15]采用截留分子量为3 500的透析袋透析厚藤共生真菌胞外多糖,袋内透析液减压浓缩,冷冻干燥得胞外多糖粗品。彭期定等^[14]将预处理后的木蹄层孔菌胞外多糖溶液浓缩后于透析袋(截留量13 000 u中),自来水流动透析48 h,浓缩后真空冷冻干燥得粗品。

3.3 大孔吸附树脂纯化

大孔吸附树脂是一类不含交换基团,具有大孔结构的高分子吸附剂,其多孔性网状空穴可较好地吸附多糖中的杂质,主要用于分离、脱无机盐、浓缩及除去有机杂质。徐增龙等^[16]采用D101大孔吸附树脂分离冬虫夏草菌丝体发酵液

中的多糖,结果表明,在上样量和树脂比例为1:10时,多糖的纯化效果最佳,树脂的使用效率最大。大孔吸附树脂具有吸附量大、选择性好、吸附速度快、易于解吸附、机械强度高、再生处理简便等优点,尤其适用于从水溶液中分离低极性或非极性的化合物。

3.4 柱层析法

向玉玲等^[17]依次采用 DEAE-52 柱层析, Sephadex G-200 柱层析,将桦褐孔菌胞外多糖进行分级纯化。李辉等^[18]采用 Sepharose CL-6B 凝胶柱层析纯化双歧杆菌 RH 胞外多糖,收集糖峰洗脱液,经透析、冷冻干燥,得胞外多糖纯品。曹永强等^[19]将植物乳杆菌粗多糖依次采用 DE-AE-Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析, Sepharose CL-6B 凝胶柱层析纯化,得多糖纯品。

4 结语

近年来,众多研究结果表明,多糖是一种能够增强人体免疫功能的生物活性物质,可作药物和保健品的有效成分,目前已经成为分子生物学、药学、食品科学等领域中的热点研究内容之一。其中,活性多糖的提取纯化直接影响多糖产品的质量及产量,已成为多糖研究的主要方向。

参考文献:

- [1] 邓振山,崔凡,李军,等. 1 株结皮真菌胞外多糖的初步研究[J]. 微生物学杂志,2017,37(2):62-68.
- [2] 刘晶,杨森,陈杨杨,等. 副干酪乳杆菌 VL8 产胞外多糖条件优化及其抗氧化性质[J]. 中国食品学报,2017,17(5):82-89.
- [3] 陈丽华,张清华,管咏梅,等. 虫草发酵液胞外多糖的醇沉工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(18):20-22.
- [4] 韩丽荣,程代,孟梦,等. 灰树花胞外多糖的分离纯化及免疫调节作用[J]. 天津科技大学学报,2016,31(4):25-29.
- [5] 贾红倩,刘嵬,梁立,等. 红曲霉菌胞外多糖的分离纯化、结

构鉴定及抗氧化活性测定[J]. 食品工业科技,2017,38(12):92-96.

- [6] 韩蓓,罗文娟,于燕,等. Pantoea ananatis G-14 细菌胞外多糖的体外抗氧化活性及抗肿瘤活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2013(25):1494-1498.
- [7] 武忠伟,张明霞,陆隽雯,等. 超滤分离蝙蝠蛾拟青霉胞外多糖工艺优化[J]. 中国食品学报,2015,15(12):115-121.
- [8] 张俐娜,金勇,陈莉,等. 一种具有抗肿瘤活性的茯苓菌丝胞外多糖的制备方法: 200410060650.1 [P]. 2003-06-25.
- [9] 徐晓芬. 类芽孢杆菌 BD3526 在无氮固体培养基上产胞外多糖的研究[J]. 食品工业科技,2017,38(16):95-100.
- [10] 杨晨璐,马林,周蕊,等. 植物乳杆菌胞外多糖的分离纯化及其抗氧化性研究[J]. 中国乳品工业,2018,46(5):9-13.
- [11] 王金玲,杜文婧,王琦. 桦褐孔菌胞外多糖脱蛋白工艺比较研究[J]. 吉林农业大学学报,2010,32(6):633-638.
- [12] 芦红云,吴天祥,汤庆莉,等. 大麻醇提取物对灰树花胞外多糖单糖组成和生物活性的影响[J]. 食品科学技术学报,2018,36(3):40-47.
- [13] 戴世华,孙玉军,宋玉铃,等. 秀珍菇胞外多糖活性炭脱色工艺研究[J]. 安徽科技学院学报,2014(4):25-29.
- [14] 彭期定,梅小飞,徐茹玉,等. 木蹄层孔菌胞外多糖的深层培养工艺优化及体外抗氧化研究[J]. 食品科技,2017,42(3):26-31.
- [15] 徐健,陶洪文,陈荫,等. 厚藤共生真菌(*Fusarium oxysporum* Y24-2)胞外多糖的化学组成和结构研究[J]. 中国海洋大学学报,2011,41(10):87-92.
- [16] 徐增龙,张如松. 冬虫夏草菌丝体发酵液中多糖的分离纯化与含量测定[J]. 浙江中医药大学学报,2007,31(3):376-377.
- [17] 向玉玲,李娟,徐向群. 桦褐孔菌胞外多糖级份的化学性质和抗氧化活性研究[J]. 浙江理工大学学报,2012,29(6):863-867.
- [18] 李辉,宋居易,刘蕾,等. 双歧杆菌 RH 胞外多糖提取纯化及体外抗凝血活性评价[J]. 食品科学,2014,35(23):129-133.
- [19] 曹永强,张健,赵雯,等. 植物乳杆菌胞外多糖的分离纯化及其乳化特性[J]. 食品科学,2016,37(17):7-13.

Research Progress on Extraction and Purification of Microbial Exopolysaccharide

HAN Yong

(Shanxi Pharmaceutical Vocational College, Taiyuan 030031, China)

Abstract: In recent years, microbial extracellular polysaccharides have attracted much attention due to their numerous biological and pharmacological effects. The research and development of bioactive extracellular polysaccharides has become a hotspot in scientific research. The extraction and purification process of microbial extracellular polysaccharides is an important part of the research and development of polysaccharides. In this paper, the extraction and purification methods of microbial extracellular polysaccharides in recent years were reviewed to provide reference for their further development and utilization.

Keywords: microbe; exopolysaccharide; extraction; purification