

微生物发酵-膜分离法制备褐藻胶寡糖及其产物分析

欧昌荣^{1*} 薛长湖^{1,2} 汤海青¹ 徐大伦¹

(¹ 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

(² 中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

摘 要 比较褐藻胶裂解酶产生菌 *Alteromonas* sp. 在摇瓶和发酵罐培养过程中生物量、褐藻胶寡糖含量以及褐藻胶裂解酶活性的变化, 根据其变化确立了通过微生物发酵-膜分离技术结合制备褐藻胶寡糖的条件, 并对寡糖进行凝胶过滤色谱和薄层色谱分析。用组成为每升含酵母粉 5g、蛋白胨 10g、FeSO₄ 0.1g、褐藻酸钠 12g、NaCl 1.5g、pH 为 7.5 的培养基, 在 28℃ 培养褐藻胶裂解酶产生菌, 结果表明, 发酵罐培养 30h, 发酵液寡糖含量达到最大。发酵液通过超滤-纳滤两级膜分离, 得到褐藻胶寡糖, 寡糖的回收率和脱盐率分别为 94.0% 和 93.3%。通过凝胶柱分离和 TLC 分析, 得到 5 个褐藻胶寡糖组分。

关键词 褐藻胶, 寡糖, 纳滤, *Alteromonas* sp., 薄层色谱

中图分类号: Q815 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)02-0309-03

褐藻胶作为稳定剂、增稠剂、凝胶剂被广泛地应用于食品饮料、造纸印染、生物材料、医药卫生、科学研究等各个方面^[1]。最近几年, 褐藻胶寡糖因具有调节植物生长、诱导植物抗病能力的产生等生理活性而越来越受到关注^[2,3], 这些研究主要包括褐藻胶寡糖的制备、分析及其生物活性研究等各个方面, 但都限于实验室水平, 实际应用受到限制。本文把微生物发酵和膜分离技术结合起来制备褐藻胶寡糖, 以期实现褐藻胶寡糖的大规模制备, 为褐藻胶找到新的应用途径。

1 材料和方法

1.1 材料和菌种

实验用褐藻胶 (Sodium alginate SA) 购于明月海藻有限公司, 中等粘度。 *Alteromonas* sp. 购于 Institute of Applied Microbiology, Tokyo University Japan。半乳糖醛酸标准品购于 Sigma 公司。发酵罐为上海国佳生化工程技术研究中心有限公司生产的 FMB-5L 型多参数发酵罐。反渗透、纳滤膜评价系统购于国家海洋局杭州水处理中心。分光光度计为 UV751 GD UV/VIS (岛津)。纳滤膜 S-371 购于厦门三达膜技术有限公司。中空纤维超滤膜购于天津膜天膜工程技术有限公司, 截流分子量 (MW) 为 5000。

1.2 产酶菌的培养

经过优化实验确立的培养基配方为每升含酵母粉 5g、蛋白胨 10g、FeSO₄ 0.1g、SA 12g、NaCl 1.5g, 用 1mol/L NaOH 将所配溶液调 pH7.5。接种后于 28℃ 培养, 在指定的时间取出适量的发酵液, 测定培养液中生物量 (OD_{620} : 发酵液直接在 620nm 波长测吸光值) 产物浓度 (OD_{235} : 发酵液离心后在 235nm 波长测定吸光值) 及酶活性的变化。

1.3 褐藻胶裂解酶活性的测定

用改良的 Tsujino-Saito 法^[4], 反应体系 2.4mL Tris-HCl 缓冲溶液 (0.1mol/L, pH7.5), 0.1% 的 SA 溶液 0.3mL, 发酵液 0.3mL, 迅速混匀后在 30℃ 下反应 30min, 于 235nm 波长下测量吸光值的增加。酶活单位定义为: 使上述反应液在 1min 内吸光值增加 0.01 所需酶量为一个酶活单位 (A_e, U)。

1.4 发酵法制备褐藻胶寡糖

在 5L 的发酵罐中加入 3L 配制好的培养基, 灭菌后, 接种事先培养好的种子液 300mL, 在通气、搅拌条件 (通气量: 2.5L/min, 搅拌速度 220r/min) 下于 28℃ 培养 30h。发酵停止后, 发酵液以 3000r/min 离心 30min, 除去菌体, 上清液用 MW5000 的中空纤维膜超滤。滤过液再用 MW325 的纳滤膜进行纳滤, 将滤液浓缩后冷冻干燥得产品。

1.5 褐藻胶寡糖的分离和 TLC 分析

取寡糖 40mg 溶解于 3mL 重蒸水中, 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤后上 P6 凝胶柱分离 (Bio-Rad P6, 2.5cm \times 100cm), 流动相 0.05mol/L NaCl, 流速 0.45mL/min, 235nm 紫外在线检测, 每管收集 10min。将寡糖配制成 10mg/mL 溶液, 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 取滤过液 5 μ L 上样。TLC 分析采用 Aluminium sheets 20 \times 20 Silica Gel 60 层析板 (Merck), 展开剂: 正丁醇: 乙酸: 水 = 2: 1: 1, 显色剂: 苯胺-二苯胺显色剂^[5]。

2 结果

图 1 是褐藻胶裂解酶产生菌在摇瓶和发酵罐放大培养过程中生物量、产物浓度和褐藻胶裂解酶活性变化曲线。实验表明, 该菌株在本文条件下摇瓶培养时, 在 6 ~ 24h 内为对数增长期, 24 ~ 42h 是稳定期, 随后进入衰退期。而在发酵

基金项目: 宁波大学博士基金资助项目 (2003496); 宁波科技局博士基金资助项目 (2004A610014)

作者简介: 欧昌荣 (1974 -) 男, 湖北天门人, 博士, 主要从事海洋生物活性物质制备、分析、水产加工保鲜方面研究。Tel: 86-574-87600549;

Fax: 86-574-87608368; E-mail: ouchangrong@nbu.edu.cn

收稿日期: 2004-07-19, 修回日期: 2004-11-22

罐放大培养时,对数增长期推迟了 6h 左右,稳定期持续时间、最大生物量比摇瓶培养都相对小。并且发酵罐中培养时,菌株的衰退也要迅速。

褐藻胶在 235nm 处没有紫外吸收,褐藻胶裂解酶降解褐藻胶时,在糖环的非还原末端产生双键,在 235nm 光线作用下有特征紫外吸收,因此本文通过发酵液中紫外吸收的增加代表褐藻胶寡糖含量变化。图 1 表明,摇瓶培养时,发酵液中寡糖含量从 6h 开始增加,在 18h 时最大,达到 7.5,随后开始降低,直到一个比较低的稳定值。而发酵罐培养时,发酵液中寡糖的浓度在 12h 时开始增加,并在 30h 左右达到最大值 10.9,随后在 48h 降低到一个稳定值。

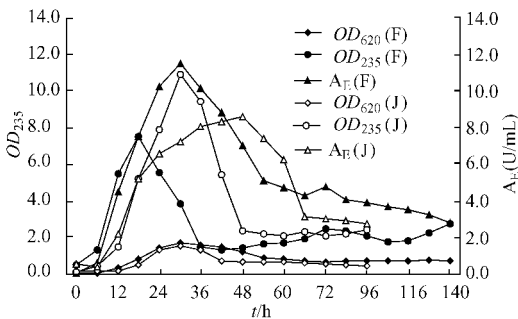


图 1 褐藻胶裂解酶产生菌培养过程中生物量、寡糖含量和酶活性的变化。

Fig.1 Changes of biomass, oligoalginic acid content and enzyme activity during incubating of alginate lyase-producing bacteria

F: Incubating in shaking flask J: Incubating in fermentation jar.

图 1 还表明 *Alteromonas* sp. 在摇瓶培养过程中产酶活性也是从 6h 开始增加,在 30h 达到最大值 11.5U/mL,随后迅速下降。在发酵罐中培养时,酶活增加也相对滞后,酶活最大值比摇瓶培养要小,且培养过程中酶活上升、下降时变化速度都比摇瓶培养时小。

根据图 1 结果,确定发酵罐培养时的发酵时间为 30h,这时发酵液中寡糖浓度最大,将发酵液经过离心、超滤、纳滤处理。发酵液经过纳滤处理后,滤过液的 OD_{235} 仅为 0.081,浓缩液 OD_{235} 为 33.46(表 1)。说明大部分寡糖不能通过纳滤膜,而留在浓缩液中。发酵液经过纳滤后电导率从 494.5 降低到 16.0,说明纳滤除去了发酵液中大部分盐离子导致浓缩液电导率降低,NaCl 含量的变化也说明这一点。

将纳滤后得到的褐藻胶寡糖经过 P6 凝胶柱分离,得到洗脱曲线(图略),所制备的寡糖经过 P6 柱分离可以得到 5 个峰,每个峰对应的组分收集后,和没经分离的混合样品一同进行 TLC 分析,P2~P5(P1 因含量较小,没做 TLC 分析)在 TLC 谱图均出现单一的斑点(图 2),并且和混合物中相应的斑点可以对应。这说明通过 P6 凝胶柱和 TLC 分析,均可得到单一聚合度的褐藻胶寡糖。在 TLC 谱图上,P3,P4 点轻微带有其它组分的斑点,这可能主要是在分部收集过程中不同的峰收集时有所交叉引起的,可以通过收集前 TLC 分析确认来消除。通过和标准品比较,并考虑纳滤膜的截留分子量,初步认为得到的寡糖是由 $DP \geq 2$ 的几个组分组成。

表 1 发酵液纳滤前后各指标的变化

Table 1 Changes of fermentation solution before and after nano-filtration treatment

Fraction	OD_{235}	Recovery rate/%	Conductivity/ ($\mu S/cm$)	NaCl/ (mol/L)	Desalting rate/%
F1	35.58		494.5	0.26	
F2	0.081		114.6	0.59	
F2	33.46	94.0	16.0	0.02	92.3

F1, Broth before nano-filtration; F2, Permeated solution after nano-filtration; F3, F1 was diluted 4 times and then concentrated to the same volume by nano-filtration.

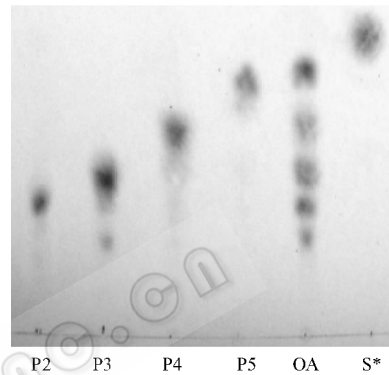


图 2 褐藻胶寡糖的 TLC 谱图

Fig.2 TLC chromatography of oligosaccharides from alginate

P2~P5: Four fractions of OA obtained by gel separation with P6 column; OA: Oligoalginic acid prepared by fermenting and nano-filtrating; S* (Standard): Galacturonic acid (Sigma).

3 讨论

褐藻胶寡糖的制备主要有盐酸水解等化学方法^[6]和褐藻胶裂解酶水解等生物方法^[7]。但目前这些方法都限于实验研究目的,没有实际应用价值。近年来,一方面因为褐藻胶寡糖的生理活性研究受到重视,另一方面,褐藻胶裂解酶产生菌的筛选、基因克隆也取得较大进展,因此通过生物方法大量制备褐藻胶寡糖,对于扩展褐藻胶的应用有重要意义^[8]。以往用酶法制备褐藻胶寡糖,多是先分离纯化得到褐藻胶裂解酶后再制备寡糖系列产物^[9],但酶的分离纯化比较繁琐,且在这一过程中酶也容易失活,因此本文直接通过微生物发酵,以褐藻胶为唯一碳源诱导褐藻胶裂解酶的产生来制备寡糖。通过摇瓶培养确立培养条件后,比较了 *Alteromonas* sp. 在摇瓶培养和发酵罐放大培养过程中生物量、产物浓度和褐藻胶裂解酶活性的变化。摇瓶培养时这 3 个指标均在 6h 开始增加,褐藻胶裂解酶活性与生物量变化一致,在 30h 时达到最大值。发酵液中酶活性增加导致褐藻胶迅速降解,褐藻胶寡糖的含量在 18h 即达到最大值,随后因微生物大量繁殖,需利用产生的寡糖从而导致其含量很快降低。随着微生物进入衰退期,发酵液中营养成分消耗,生物量、酶活性和寡糖含量先后降低到较低水平。比较而言,因微生物在发酵罐中比在摇瓶中扩增时需要较长的适应期,利用发酵罐培养时生物量、产物浓度和酶活增加的时间比摇瓶培养时均滞后 6h 左右,且其最大值与摇瓶培养有所差别。

这可能是因为发酵罐培养采用通气的缘故。总的来说,发酵罐培养的 *Alteromonas* sp. 和摇瓶培养时的生长特性基本是一致,本研究用的摇瓶培养确立的条件适合放大生产,但在通过补充培养基进行连续发酵,或改变发酵条件从而控制产物聚合度方面值得进一步研究。

通过微生物发酵制备生物活性成分已经在医药、食品方面有广泛应用。但是通过发酵方法产物浓度一般较低,且含有大量盐分,不易分离。以前主要采用调节 pH, 旋转蒸发浓缩-乙醇沉淀得到寡糖,通过凝胶柱或乙醇分步沉淀法脱盐^[9] 操作繁琐,需要大量有机溶剂,并会造成寡糖的损失,用凝胶柱脱盐处理量小,只适合分析用。因此本研究利用膜分离技术高效节能、利于保持生物活性、适合放大、连续化生产等特点,采用两级膜分离处理,通过超滤除去发酵液中蛋白质、未反应的褐藻胶等大分子物质,通过纳滤除去酵液中的盐分,不仅对寡糖有较大回收率,且脱盐、浓缩同时进行,步骤少,操作简单,可以用于褐藻胶寡糖的大量生产。

褐藻胶寡糖是由甘露糖醛酸和古罗糖醛酸 2 种差相异构体组成酸性寡糖,对其分离分析比较困难,目前大都采用 HPLC、高效离子色谱配合脉冲安培检测器(HPEC-PAD)、毛细管电泳(CE)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)等方法,但是这些方法大多只能分析,不能制备,且有的方法需要衍生化而比较繁琐,或者设备昂贵。本研究通过凝胶柱色谱分离得到了不同的组分,并且通过 TLC 分析得到清晰的斑点证明这些组分为单一聚合度。寡糖的生理活性和其聚合度密切相关,通过凝胶柱分离,可以制备单一聚合度的褐藻胶寡糖,这将促进其生物活性以及其标准品制备等相关领域研究。

综上所述,本研究把微生物发酵和膜分离技术最新发展结合,确立了具有工业应用前景的褐藻胶寡糖制备方法,并

研究了简单、高效的褐藻胶寡糖分析方法,一方面有利于褐藻胶寡糖结构、生理活性方面的基础研究,另一方面也为褐藻胶的应用及海洋资源的高值化找到新途径。

参 考 文 献

- [1] Gacesa P. Alginate. *Carbohydr Polym*, 1988, **8**: 161 - 182.
- [2] Akimoto C, Aoyagi H, Tanaka H. Endogenous elicitor-like effects of alginate on physiological activities of plant calls. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 429 - 436.
- [3] Iwasaki K-I, Matsubara Y. Purification of alginate oligosaccharides with root growth-promoting activity toward Lettuce. *Biosci Biotechnol*, 2000, **64**(5): 1067 - 1070.
- [4] Tsujino I, Satio T. Studies on alginase IV. Investigation of reactivities. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1963, **29**: 58 - 65.
- [5] 张惟杰. 糖复合化合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1994, 33.
- [6] Haug A, Larsen B, Smidsrod O. Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydr Res*, 1974, **32**: 217 - 225.
- [7] Heyraud A, Colin-Morel P, Gey C, et al. An enzymatic method for preparation of homopolymannuronate blocks and strictly alternating sequences of mannuronic and guluronic units. *Carbohydr Res*, 1998, **308**: 417 - 422.
- [8] Chavagnat F, Duez C, Guinand M, et al. Cloning, sequencing and overexpression in *Escherichia coli* of the alginate-lyase-encoding *aly* gene of *Pseudomonas alginovora*: identification of three classes of alginate lyases. *Biochem J*, 1996, **319**: 575 - 583.
- [9] Liu Y, Jiang X-L, Cui H, et al. Analysis of oligomannuronic acids and oligoguluronic acids by high-performance anion-exchange chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 2000, **884**: 105 - 111.

Preparation of oligosaccharides from alginate by fermenting combined with membrane separation method and analysis of the oligomers

OU Chang-rong¹ XUE Chang-hu^{1,2} TANG Hai-qing¹ XU Da-lun¹

(¹ Faculty of Life Science and Bio-engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

(² Faculty of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Changes in biomass, oligosaccharides content and alginate lyase activity in broth of *Alteromonas* sp. incubated in shaking flask and fermentation jar were studied. According to those changes, parameters were established for preparing oligosaccharides from alginate by fermentation combined with nano-filtration membrane separation method. Resulting oligosaccharides were analyzed by gel permeation chromatography and thin layer chromatography. One liter culture medium (pH 7.5) contains 5g yeast extract, 10g peptone, 0.1g FeSO₄, 12g sodium alginate and 1.5g NaCl. When incubating at 28°C, the result showed that the optimal fermentation time was 30 h to obtain the highest production of oligosaccharides in the broth. After ultra-filtration and nano-filtration, 94.0% of the total oligosaccharides was recovered from the broth, and meanwhile 93.3% of the salt was removed. Gel permeation chromatography and TLC analyses indicated that the resulting oligosaccharides were composed of five fractions with different degree of polymerization.

Key words: Alginate, Oligosaccharides, Nano-filtration, *Alteromonas* sp., TLC

Foundation item: Doctoral Program of Ningbo University (2003496); Doctoral Program of Ningbo Science and Technology Bureau (2004A610014)

* Corresponding author. Tel: 86-574-87600549; Fax: 86-574-87608368; E-mail: ouchangrong@nbu.edu.cn

Received date: 07-19-2004