

一种新型生物聚合物的分子组成及特性研究

黄海东^{1,2}, 王 薇¹, 马 挺¹, 李召雨¹, 梁凤来¹, 刘如林¹

(1. 南开大学生命科学学院, 分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071;

2. 天津农学院农学系, 天津 300384)

摘要 由鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.) NX02 合成了一种具有增稠性、假塑性、成凝胶特性和乳化活性的新型生物聚合物. 定性分析表明, 聚合物由糖类、脂类和多肽构成, 其所占比例分别为 34.8%, 63.1% 和 1.5%. 用凝胶渗透色谱-多角度激光光散射联用法测得聚合物的重均分子量和数均分子量分别为 408000 和 382000, 分子量分布 M_w/M_n 为 1.07. 该聚合物的单糖组成为葡萄糖、甘露糖、鼠李糖和葡萄糖醛酸, 脂类由十六碳及十八碳脂肪酸组成. 由于在聚合物的氨基酸组成中天冬氨酸和谷氨酸两种酸性氨基酸占 23.3%, 因此可以采用酸沉法提取, 从而大幅度降低其生产成本.

关键词 生物聚合物; 分子组成; 鞘氨醇单胞菌

中图分类号 O629

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)02-0324-04

自从 Yabuuchi 等^[1] 提出鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.) 以来, 不断发现该菌属的新菌株^[2]. 鞘氨醇单胞菌在自然界中的分布极其广泛, 具有降解复杂有机物、耐受贫营养环境的能力. 某些菌株还能够合成由多糖组成的一类生物高分子聚合物, 被称为鞘多糖, 这些聚合物的单糖组成类似, 都为葡萄糖、葡萄糖醛酸、鼠李糖和(或)甘露糖, 包括 S-60(结冷胶), S-130(沃仑胶), S-194(鼠李胶), S-88, S-198, S-657 和 NW-11 等^[3]. 鞘多糖在石油开采和食品等行业中应用广泛, 例如结冷胶形成热可逆凝胶的能力使其作为胶凝剂在食品生产和培养基制备中广泛应用; 而沃仑胶和鼠李胶的高黏度特性使这两种聚合物被用作增稠剂和稳定剂.

菌株 NX02 为革兰氏阴性杆菌, 16S rRNA 序列分析表明, 该菌株与鞘氨醇单胞菌属的最高同源性为 95.9%, 分类鉴定表明 NX02 为鞘氨醇单胞菌属的一个新种. 鞘氨醇单胞菌 NX02 能够大量合成一种未见报道的新型生物聚合物. 该种聚合物在乙醇中不沉淀, 可在酸中沉淀提取. 本文对该聚合物的分子组成和特性进行了研究.

1 实验部分

1.1 材料、仪器与试剂

鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.) NX02 由本室鉴定并保藏.

Brookfield 公司 LVDV-II + RPO 型流变仪; Stable Microsys 公司 TA.XT2i 质构仪; Nicolet-560E. S. P 红外光谱仪; Heraeus Vanio-EL 元素分析仪; Agilent 1100 液相色谱, TSK4000 色谱柱, Wyatt OPTIL 示差折光检测器; Dawn EOS 十八角激光散射检测器; Optilab DSP 示差折射仪; Agilent 6820 型气相色谱仪; HP G1800A 型质谱仪; Hitachi L-8800 型氨基酸自动分析仪.

硅胶板为天津思利达公司产品; 201 × 4 离子交换树脂为南开大学化工厂产品; Sephacryl S-400 为 Amersham 公司产品; 其它试剂均为分析纯.

1.2 实验过程

1.2.1 培养基和培养条件 液体发酵培养基: 蔗糖 40 g/L, 蛋白胨 2 g/L, 牛肉膏 1 g/L, pH = 7.0 ~ 7.5, 250 mL 三角瓶装 100 mL 培养基, 接种后置于旋转式摇床上 180 r/min, 30 °C 培养 72 h.

收稿时间: 2008-05-05.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 50674058)资助.

联系人简介: 马 挺, 男, 博士, 副教授, 主要从事资源细菌及工程研究. E-mail: meor@nankai.edu.cn

1.2.2 生物聚合物的提取和纯化 将发酵液于 100 °C 加热 30 min, 用去离子水稀释 10 倍, 10000 r/min 离心 40 min 除菌体. 收集上清液, 重复几次至镜检无菌体. 合并上清液, 调节 pH 值至 3.0 左右, 使产物沉淀, 真空冷冻干燥得聚合物粗品. 取适量粗品配制成质量分数为 0.1% 的聚合物溶液, 调解 pH 至中性使其溶解, 使用 Sevag 法除去蛋白. 调节 pH 至 3.0 左右, 沉淀聚合物, 透析至 pH 中性, 冷冻干燥. 用 Sephacryl S-400 (2.6 cm × 40 cm) 凝胶色谱柱进一步纯化, 去离子水洗脱, 蒽酮-硫酸法示踪检测. 收集主峰, 反复层析后合并收集液, 透析冻干得聚合物纯品.

1.2.3 生物聚合物性能的测定 以流变仪控制软件 RHEOCALC 编辑程序, 采用 4 号转子测定不同条件下的聚合物的溶液流变学特性. 按文献[4]方法处理聚合物样品, 观察其胶凝特性, 并用质构仪测定凝胶的硬度.

参照文献[5]方法进行薄层定性分析. 聚合物样品用溴化钾压片, 进行红外光谱扫描, 扫描波长: 4000 ~ 400 cm^{-1} .

以凝胶渗透色谱(GPC)-多角度激光光散射(MALLS)联用技术测定聚合物的分子量, 用 TSK4000 色谱柱进行聚合物的分离, 缓冲液为超纯水, 流速 0.5 mL/min, 样品浓度 1 mg/mL, 进样量 100 μL . 用示差折光光检测器和十八角激光散射检测器测定分子量分布情况, 以 GPC-MALLS 专用 ASTRA 软件进行数据采集和处理计算.

用苯酚-硫酸法测定聚合物的糖含量, 用硫酸-吡啶法测定糖醛酸含量^[6]. 取 5 mg 聚合物样品, 加入 2 mol/L 三氟乙酸, 置于 120 °C 封管中水解 12 h. 减压浓缩至干, 制备糖腈乙酰酯衍生物. 色谱条件: HP-5MS 石英毛细管色谱柱 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm), 载气 N_2 (流速 5 mL/min), 进样温度 280 °C, 程序升温: 120 °C (5 min) → 10 °C/min 升温至 250 °C → 250 °C (5 min), FID 检测器 (温度 280 °C). 根据标准单糖与样品的保留时间确定样品的单糖组成. 参考文献[7]的方法测定糖醛酸的种类.

用 1 mol/L NaOH 调节聚合物水溶液的 pH 值为 10, 于 45 °C 水解 2 h, 然后采用氯仿/甲醇法测定聚合物的脂类含量, 参考 So 等^[8]方法进行脂组分的甲酯化和质谱分析. 色谱条件: HP-5 石英毛细管色谱柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 载气流速 3 mL/min, 进样温度 260 °C, 程序升温: 100 °C (5 min) → 10 °C/min 升温至 250 °C → 250 °C (5 min), FID 检测器 (温度 280 °C). 质谱条件: 电子轰击 (EI) 离子源, 离子源温度 230 °C, 电离能量 70 eV, 四极杆温度 150 °C, 质量扫描范围 m/z 10 ~ 400.

将聚合物样品置于水解管中, 加入 5 mL 6 mol/L 的盐酸, 抽真空封管, 在 110 °C 下水解 24 h. 取 0.5 mL 蒸干, 加入 0.02 mol/L 的盐酸溶解, 进行氨基酸组成分析.

2 结果与讨论

2.1 聚合物水溶液的特性

2.1.1 聚合物的流变学性质 配制质量分数为 0.4% ~ 1.0% 的聚合物溶液 (溶解于质量分数为 1% 的 KCl 中), 搅拌使之分散均匀, 于 4 °C 溶胀过夜, 恢复至室温后测定其流变学特性. 聚合物浓度与剪切速率对其水溶液表观黏度的影响如图 1 所示. 聚合物溶液的黏度随其浓度的增大而增大, 较高浓度时黏度增幅尤其显著. 1% 的聚合物溶液在 6 r/min 的条件下的黏度为 11200 $\text{mPa} \cdot \text{s}$, 说明菌株 NX02 合成的生物聚合物具有良好的增稠效果. 聚合物水溶液黏度随着剪切速率的增大而降低, 呈现出典型的假塑流体特性, 且一定浓度的聚合物溶液在恒定转速下, 黏度不随测定时间长短而变化, 即没有时间相关性, 因此不属于触变性流体.

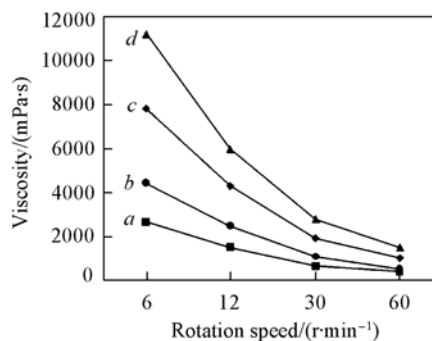


Fig. 1 Relationship between polymer solution viscosity and rotation speed at different mass fraction of polymer
Polymer mass fraction (%): a. 0.4; b. 0.6; c. 0.8; d. 1.

2.1.2 聚合物的凝胶特性 对聚合物样品进行脱乙酰基处理后,在无乳酸钙存在的条件下,0.6%的聚合物可以形成凝胶.加入 Ca^{2+} 后,将0.2%的聚合物溶液加热至 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并维持 10 min,冷却后成凝胶.随聚合物浓度的提高,凝胶硬度明显增大.随着 Ca^{2+} 浓度的增加,凝胶硬度增大;对于不同聚合物浓度,达到最大硬度值时所需 Ca^{2+} 的量不同,聚合物浓度越高,所需 Ca^{2+} 的量越大.0.2%~0.4% 聚合物需 Ca^{2+} 离子的浓度在 $10\sim 15\text{ mmol/L}$ 范围;0.6%~1.2% 聚合物需 Ca^{2+} 离子的浓度在 $20\sim 25\text{ mmol/L}$ 范围;加入过量离子 ($>25\text{ mmol/L}$),凝胶硬度有所下降.该性质与鞘多糖类物质中的结冷胶很相似,即过量离子的存在占据了分子的阳性位点,因此阻止了临近高级螺旋结构之间形成连接,而适量钙离子的加入有利于分子聚集^[9].

2.1.3 聚合物的乳化性能 将不同浓度的聚合物水溶液与 0#柴油混合,涡旋振荡 2 min 静置 24 h 后测量乳化层高度,以乳化指数(Emulsification index, EI₂₄)表示聚合物的乳化性能,结果表明:随聚合物浓度的增加,乳化性能提高.0.1% 聚合物的 EI₂₄ 为 72%,0.2% 聚合物的 EI₂₄ 达 100%,说明菌株 NX02 合成的聚合物具有良好的乳化性能,可将石油烃完全乳化,并形成稳定的乳状液.

2.2 聚合物的定性分析

鞘氨醇单胞菌属许多菌株均能合成鞘多糖类物质,且都采用乙醇沉淀法提取.鞘氨醇单胞菌 NX02 合成的聚合物遇酸沉淀,但不能被乙醇沉淀,说明该聚合物不仅由多糖组成,还有其它化学成分.通过特异性显色的薄层定性分析表明,菌株 NX02 合成的聚合物是由糖类、脂类及多肽 3 部分的化学成分结合而成.

2.3 乳化剂的红外光谱和元素组成分析

将聚合物样品在 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 区间内进行红外扫描,在 3441 cm^{-1} 附近有羟基 O—H 伸缩振动的强吸收峰, 2934 cm^{-1} 为 C—H 的伸缩振动, 1604 cm^{-1} 附近有一级氨基的 N—H 变角振动; 1414 cm^{-1} 附近有羧基 C—O 的伸缩振动, $1400\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 有羧基的 C—H 的变角振动吸收峰, 1081 cm^{-1} 附近有 C—O 的伸缩振动, 1037 cm^{-1} 附近有 O—H 变角振动, 904 cm^{-1} 附近有吡喃环的非对称伸缩振动.元素分析表明,聚合物的碳、氮、氢元素分别占 30.38%,0.48% 和 6.12%.

2.4 聚合物的分子量测定

GPC-MALLS 联用技术兼具了 GPC 法和光散射法的特点,能快速、准确地测定出聚合物的绝对分子量及分子量分布,结果不依赖于标准品,是一种绝对分子量的检测方法.由图 2 可见,纯化的聚合物样品仅有一个对称的单峰,Optilab DSP 示差折光仪测定聚合物的折光指数增量 dn/dc 值为 0.135,ASTRA 软件计算出聚合物的重均分子量 (M_w) 为 408000,数均分子量 (M_n) 为 382000,分子量分布 (M_w/M_n) 为 1.07,而 M_w/M_n 在 1.02~1.10 范围内属于单分散样品.

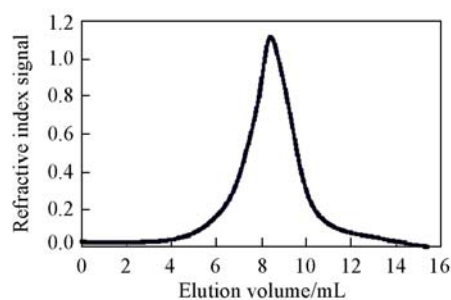


Fig. 2 GPC-MALLS analysis of biopolymer

2.5 聚合物的糖组分分析

苯酚-硫酸法测定表明,聚合物中的糖含量为 34.8%,用硫酸-咔唑法对糖醛酸进行定量测定,结果表明,葡萄糖醛酸占糖组分的 20.4%.聚合物样品经过三氟乙酸水解后,利用气相色谱法测定单糖组成为鼠李糖、甘露糖和葡萄糖,根据各组峰面积,由内标法计算可知样品中葡萄糖、鼠李糖和甘露糖的比例为 6:1.5:1.聚合物水解时糖醛酸发生内酯化,无法直接检测.为检测糖醛酸的种类,将水解后单糖和糖醛酸还原为糖醇和糖醇酸,用强碱性阴离子交换树脂 201×4 分离糖醇酸,NaBH₄ 还原后乙酰化衍生,气相色谱检测到葡萄糖,说明聚合物的糖醛酸类型为葡萄糖醛酸.实验结果表明,菌株 NX02 合成聚合物的糖组分与鞘氨醇单胞菌属合成的鞘多糖类物质的单糖组成相同.

2.6 聚合物的脂组分分析

用氯仿/甲醇法测定聚合物中的脂类含量为 63.1%.将聚合物样品经甲酯化后进行 GC-MS 分析,结果表明,存在十六酸甲酯和十八酸甲酯,且两者的比例为 1:15.

2.7 聚合物的氨基酸组分分析

定性分析表明, 聚合物包含多肽组分, 6 mol/L 盐酸水解后进行氨基酸组成分析表明, 聚合物中的氨基酸组分为 1.5%, 由 16 种氨基酸组成(见表 1), 其中酸性氨基酸 Asp 和 Glu 的含量最高, 分别占氨基酸总量的 11.6% 和 11.7%。因此调节发酵液的 pH 至 3.0 可以将聚合物沉淀出来。与目前黄原胶、鞘多糖等生物聚合物的醇沉提取相比, 酸沉提取可以大幅度降低生产成本, 从而使菌株 NX02 合成的生物聚合物具有极高的生产应用价值。

Table 1 Composition and relative content of amino acid in biopolymer

Type of amino acid	Relative content(%)	Type of amino acid	Relative content(%)	Type of amino acid	Relative content(%)	Type of amino acid	Relative content(%)
Asp	11.6	Gly	6.7	Ile	4.6	Lys	3.1
Thr	6.1	Ala	9.8	Leu	9.8	His	1.3
Ser	4.8	Val	6.7	Tyr	3.4	Arg	7.6
Glu	11.7	Met	1.8	Phe	5.9	Pro	5.2

参 考 文 献

- [1] Yabuuchi E., Yano I., Oyaizu H. . Microbiol. Immunol. [J], 1990, **34**: 99—119
- [2] Yabuuchi E., Kosak Y., Fujiwar N. , *et al.* . Int. J. Syst. Evol. Microbiol. [J], 2002, **52**: 1485—1496
- [3] Banik R. M. , Kanari B. , Upadhyay S. , *et al.* . World J. Microbiol. Biotechnol. [J], 2000, **16**: 407—414
- [4] Kenneth S. K. , George T. V. , Peter J. M. . Appl. Environ. Microbiol. [J], 1982, **43**: 1086
- [5] ZHAI Yong-Xin(翟永信), LU Bing-Zhen(陆冰真). The Application of TLC in Food Analysis(薄层层析法在食品分析中的应用) [M], Beijing: Peking University Press, 1991: 217—234
- [6] JIANG Rui-Zhi(姜瑞芝), WANG Ying(王颖), CHEN Ying-Hong(陈英红), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2007, **28**(7): 1313—1315
- [7] Thomas M. , Peter A. . Plant Physiol. [J], 1972, **49**: 926—936
- [8] So C. M. , Young L. Y. . Appl. Environ. Microbiol. [J], 1999, **65**: 5532—5540
- [9] Tang J. , Tung M. A. , Zeng. Y. . Carbohydrate Polymers [J], 1996, **29**: 11—16

Analysis of Molecular Composition and Properties of a Novel Biopolymer

HUANG Hai-Dong^{1,2}, WANG Wei¹, MA Ting^{1*}, LI Zhao-Yu¹, LIANG Feng-Lai¹, LIU Ru-Lin¹

(1. Key Laboratory of Molecular Microbiology Technology, Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2. Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract According to the characteristics of morphology, physiology and biochemistry and the comparison of 16S rDNA sequence, strain NX02 was identified as a new species of the genus *Sphingomonas*. A novel biopolymer synthesized by *Sphingomonas* sp. strain NX02 with thickening, pseudoplastic, gelling and emulsification. The results of qualitative analysis show that biopolymer is consisted of carbohydrates, lipids and peptides, the proportion is 34.8%, 63.1% and 1.5%, respectively. The weight average molar mass and number average molar mass of biopolymer was measured to be 408000 and 382000 by GPC-MALLS, and the polydiversity (M_w/M_n) was calculated to be 1.07. The monosaccharide compositions were glucose, mannose, rhamnose and glucuronic acid; the lipid portion was hexadecanoic acid and stearic acid; the proportion of glutamic acid and aspartic acid was 23.3% of the total amino acid content, so the polymer could be precipitated with acid, which reduced the production cost significantly.

Keywords Biopolymer; Molecular composition; *Sphingomonas* sp.

(Ed. : H, J, Z)