

分类号

密级

# 硕士学位论文

题目：黄原胶应用——  
新型酶制剂稳定剂的研究

英文并列题目：Application of Xanthan Gum;  
Studies on new enzyme stabilizers

研究生：刘稼骏 专业：发酵工程

研究方向：微生物多糖应用与开发

导师：赵光鳌 副教授

学位授予日期：           年            月           

无锡轻工业学院

地址：无锡市青山湾

年 月 日

### Abstract

Solutions of Xanthan Gum (XG) have high apparent viscosity at low concentration and exhibit pseudoplastic properties. In enzyme solutions, data show that XG has dispersion stabilizing property and very small surface activity.

To neutral bacterial proteases, XG protects them against thermal denaturation, i. e., when protease solutions containing 0.4% by weight of XG are incubated for 20min. at 55°C water bath, their residual activity their residual activity is up to 50%. By contrast, the activity of solutions without XG is mostly lost. In addition, when adding XG to protease solutions with some ions, the product shows better heat stability.

Data show that neutral proteases in solutions lose their activity easily. For example, after 6 days at room temperature, their residual activity is about 25%. If 1% XG and a high concentration salt are added to these protease solutions, their activity remains 85% after 60 days at room temperature. However, when 0.3% XG with proper salt and polyol are added as stabilizing reagents, 90% of the activity is remained after 75 days at room temperature. The stabilizing effect of XG exhibits in early period of storage.

KEY WORDS: Polysaccharide Xanthan gum

1.398 Neutral proteases

Heat stability Stabilizer

## 摘 要

低浓度黄原胶在水溶液中具备高粘度和假塑性等特性。在酶溶液中，黄原胶有良好的均一性并兼有低表面活性来防止酶的表面失活。

在酶学性质上，黄原胶对1.398中性蛋白酶的热稳定性有一定的保护作用，使含0.4%黄原胶的酶液55℃处理20分钟残留酶活在50%以上，而对照酶则几乎完全失活。若黄原胶与某些离子协同作用，可得到更好热稳定效果。

经对液体中性蛋白酶稳定性的一些探索研究，结果表明该酶保存稳定性差，室温下6天，残留酶活在25%左右；若添加1%黄原胶与高浓度盐，室温下保存60天残留酶活可达85%以上；采用0.3%黄原胶与适量盐和醇类作为稳定剂，室温下保存75天，残留酶活可达90%以上，在此过程中，黄原胶主要在保存前期起稳定作用。

关键词：多糖 黄原胶 1.398中性蛋白酶

热稳定性 稳定剂

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

## 目 录

摘要 (英文)	29
(中文)	31
一. 前言	1
二. 材料与amp;方法	5
2.1 实验材料	5
2.2 实验方法	5
三. 结果与分析	11
3.1 黄原胶--酶蛋白体系理化性质分析	11
3.1.1 粘度变化	11
3.1.2 电解质对黄原胶粘度的影响	11
3.1.3 表面张力	12
3.1.4 均一稳定性	13
3.1.5 黄原胶与酶吸附性实验	15
3.1.6 电动现象	17
3.1.7 讨论分析	19
3.2 黄原胶对酶热稳定作用研究	21
3.2.1 不同温度下, 黄原胶的作用	21
3.2.2 黄原胶的含量与酶热稳定关系	21
3.2.3 多糖作用比较	22
3.2.4 热稳定初步分析	23
3.2.5 超滤分析	24
3.2.6 多糖协同实验	25
3.2.7 热分析 (DSC)	26
3.2.8 不同PH值的影响	28
3.2.9 最适热稳定PH	28

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

3.2.10 黄原胶与中性盐类对酶作用	29
3.2.11 显著性试验	31
3.2.12 讨论分析	33
3.3 黄原胶对酶保护作用探索	35
3.3.1 凝胶层分析	35
3.3.2 凝胶电泳分离	36
3.3.3 各种因素对酶保护作用	37
3.3.4 各因素RSA分析	40
3.3.5 综合试验	47
3.3.6 讨论分析	48
四. 结论	50
五. 存在问题与展望	51
六. 致谢	52
七. 参考文献	53



图1-1 黄原胶的分子结构

黄原胶是由D-葡萄糖、D-甘露糖和D-葡萄糖胺构成。葡萄糖胺通常以酮基、醇基和钙盐的形式存在。其化学结构如图1-1。主链由D-葡萄糖以1,3-糖苷键而成。侧链由两个甘露糖和一个葡萄糖胺连接而成。侧链末端的D-甘露糖C-2位上和丙酮酸形成酯键，侧链的

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

## 一. 前 言

微生物多糖工业是60年代后期崛起的一个新型的发酵工业领域，虽然微生物多糖的基础研究、工艺过程、生产装置和应用领域都还有不少问题有待探索，但是，由于它本身所固有特殊性能，使得它在食品工业、医药工业、石油工业、化学工业和其它工业上具有很大的应用潜力。

黄单胞菌多糖是微生物多糖中工业产量最大，目前最具代表性的一种胞外多糖。黄单胞多糖 (Xanthan Gum) 简称黄原胶或汉生胶。最早开始研究的是美国农业部研究所 (NRRL) 的研究者。他们分离筛选出了产生黄原胶能力较强的菌株--野油菜黄单胞菌NRRLB-1459。1960年开始进行中试，1964年正式投入工业化生产，制成了工业级黄原胶，1969年，食品级的多糖产品获得了美国食品药物局 (FDA) 的批准。现在世界上黄原胶的产品有工业级和食品级两种<sup>[6]</sup>。

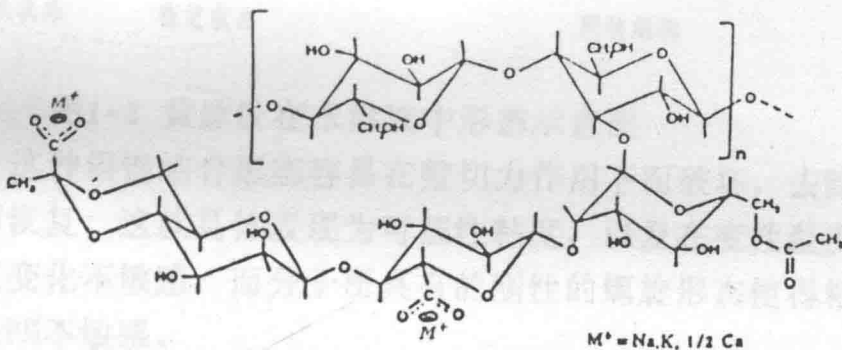


图1-1 黄原胶的分子结构

黄原胶是由D-葡萄糖、D-甘露糖和D-葡萄糖酸构成。葡萄糖酸通常以钾盐、钠盐和钙盐的形式存在。其化学结构如图1-1。主链由D-葡萄糖以 $\beta$ -1,4链连接而成。侧链由两个甘露糖和一个葡糖醛酸连接而成，侧链末端的D-甘露糖C<sub>4</sub>和C<sub>6</sub>位上和丙酮酸形成酮缩醇，侧链的



# 无锡轻工业学院研究生论文纸

另一个甘露糖C<sub>6</sub>位常被乙酰化<sup>[1][2]</sup>。分子量为 $2 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ 道尔顿，它具有极好的水溶性。

黄原胶分子在水溶液中具有高级立体结构，并以单股螺旋和双股螺旋并存于溶液之中<sup>[8]</sup>。它可在一定条件下，由随机线团状态转变成螺旋形的规则、稳定状态(主要靠氢键)并可通过多糖分子支链之间氢键连接使分子与分子间形成一种复杂的相互纠缠的网状结构，见示意图1-2。

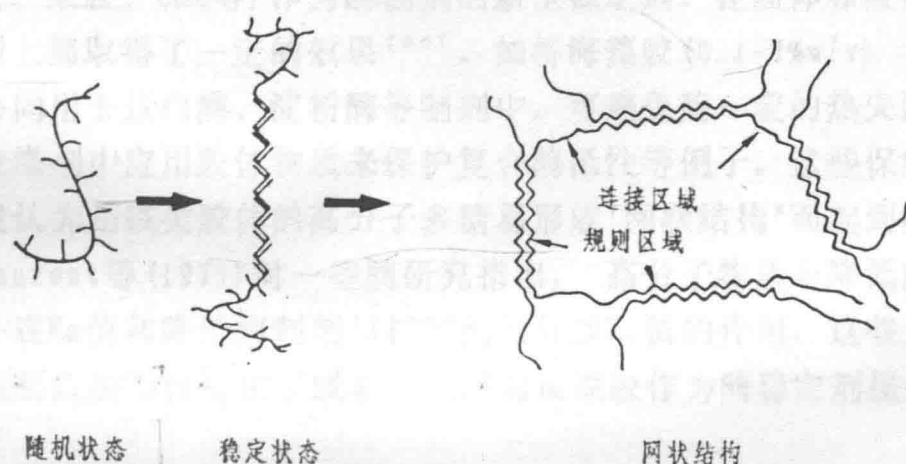


图1-2 黄原胶在水溶液中形态示意图

但是，这种弱键结合形态容易在剪切力作用下而破坏，去除剪切力，便立即恢复；这就具体表现为可塑性粘度，以及在变性温度下，粘度与温度变化不敏感，而分子所具有的刚性的螺旋形态使得粘度对离子强度和PH不敏感。

黄原胶优良性能的主要表现为：

1. 耐酸碱，抗高温(100℃)。
2. 有良好的分散作用和优异的悬浮能力。
3. 在低盐存在下、很宽的PH值范围内(PH1.5-13)具有极好的稳定性。
4. 对高浓度盐(K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>、)有良好的耐受性

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

5. 对酸、碱、盐、还原剂、表面活性剂和防腐剂在同一溶液体系中有良好的兼容性。

6. 一般常见的食品加工酶如蛋白酶、淀粉酶、果胶酶、纤维素酶和半纤维素酶在溶液中都不能分解黄原胶。

正是因为黄原胶具这些优良的性能。使其可用于食品、饲料、农药、造纸、陶瓷、化妆品、卷烟等方面。<sup>[6]</sup>

据文献资料查阅,在70年代,国外着重研究将胶体物质(阿拉伯胶、海藻胶、果胶、CMC等)作为酶制剂的新型稳定剂。在固体和液体两种酶制剂上都取得了一定的效果<sup>[25]</sup>,如将海藻胶(0.1-7%w/v)与有机溶剂协同用于蛋白酶、淀粉酶等制剂中,可避免酶一定的热失活;还有在洗涤剂中应用胶体物质来保护复合酶活性等例子。这些保护作用一般认为是该类胶体的高分子多糖易形成“网状结构”而起到筛孔效应。Laurent等(1971)对一些酶研究指出,高分子物质有降低酶对底物的外观 $K_m$ 值和降低酶制剂与抑制剂的外观 $K_i$ 值的作用。这些为多糖为何能稳定酶活性提供了线索。同时为黄原胶作为酶稳定剂提供参考依据。

对于酶制剂稳定剂的配方而言,由于商业竞争,一般都属于各个公司保密内容之一。尽管在80年代后期,有一些黄原胶在固定化方面的专利报道。如用黄原胶来固定化植物细胞<sup>[21]</sup>。或将黄原胶与 $Fe^{3+}$ 凝胶素固定化脂肪酶等。但对于酶制剂稳定作用的详细报道几乎没有,而且在国内这方面工作也尚属空白。

本课题是据国家“八五”科技项目《生物技术实用化研究》(专题名称编号85-2-08-04.微生物多糖的应用与开发试验)的要求。初步研究了黄原胶对蛋白酶的稳定作用,为黄原胶在酶工业上的应用打开了一条新路子。

本课题采用实验酶为中性蛋白酶(来源于1.398枯草杆菌 B. Subtilis)理由是:



# 无锡轻工业学院研究生论文纸

1. 该酶属于微生物蛋白酶中最不稳定的酶之一，很易失活<sup>[6]</sup>。
2. 该酶热稳定性差，PH7，60℃处理15分钟，失活90%<sup>[7]</sup>
3. 酶产量较大，运用面广，来源充足。
4. 对该酶已有一定程度的研究了解，酶活测定重复性好，稳定性高。

目前，市场上销售的1.398中性蛋白酶几乎都是固体型，其稳定性相对于液体型的要好的多。但由于目前固体型蛋白酶多数以粉末状形式生产，这对操作和使用人员的过敏组织器官如鼻子，呼吸系统和眼睛等容易引起危害。随着社会的发展，人们将越来越重视环境污染和安全性等问题。必然考虑一措施去改善它<sup>[8,9]</sup>，如改变固体形酶制剂的颗粒形状，生产液体型或半固体型酶制剂等。这些措施大都可以利用黄原胶或其它多糖物质优良性质作稳定剂，载体、定型剂以及保护剂。这也是今后酶工业发展的一个方向。

通过对文献资料的综合分析，考虑到时间及实验条件的限制，本文着重研究黄原胶在液体条件下对1.398中性蛋白酶的稳定作用。在研究黄原胶与酶制剂一些理化性质及现象的基础上，初步研究黄原胶对中性蛋白酶热稳定性的影响以及与其它胶体物质的热稳定性效果进行对比。并对黄原胶与中性盐、有机溶剂协同作用下保护酶活性的效果及显著性进行初步探讨。

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

## 二. 材料与方法

### 2.1 实验材料

黄原胶: 工业级黄原胶; 美国Kelco公司产品

食品级黄原胶; 美国Kelco公司产品

实验酶: 1. 398枯草杆菌中性蛋白酶(工业级)

1. 398枯草杆菌中性蛋白酶(食品级)

无锡酶制厂产品

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 各种PH缓冲液配制<sup>[11]</sup>

#### 2.2.2 粘度测定

使用NDJ-79型旋转式粘度计。恒温水浴温度为25℃, 更换转筒与使用减速器来改变剪切速率。以这些条件来测非牛顿型液体的流变特性。

#### 2.2.3 表面张力测定

吊环法测定, 使用JZHY-180界面张力仪。

#### 2.2.4 总蛋白质含量测定

微量凯氏定氮法<sup>[17]</sup>

#### 2.2.5 纸上电泳<sup>[11]</sup>

使用DYY-III 4电泳仪。新华滤纸(30cm×2.5cm)

缓冲液分别为0.02M pH4磷酸氢钠--柠檬酸缓冲液和0.02M pH8.7硼酸-硼砂缓冲液。

采用湿点样法, 并通过考马斯亮蓝R-250染色。

区间酶活测定: 在pH8.7条件下。在平行实验的两条滤纸上用铅笔画出等距离(约2.5cm)衡线。然后点样。电泳完毕后一条滤纸用于显色。另一条自然风干后按所画线剪下并将其剪碎后分别用0.02M pH7.5

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

磷酸缓冲液10ml浸泡半小时。过滤最后测定滤液酶活。各区段酶活与总酶活比值为相对酶活。

## 2.2.6 均一性测定<sup>[10]</sup>

浊度法:使用721分光光度计比色。波长580nm.将配成的需测样品振荡均匀.放置12小时后比色,测得 $OD_1$ 值。再将样品经3500转/分离心后.将上清液再比色测得 $OD_2$ 值。以样品含量为横坐标。 $\log \frac{OD_2}{OD_1}$ 为纵坐标绘制曲线图.其中 $\log \frac{OD_2}{OD_1}$ 接近于零.表示所测样品越是均一。

## 2.2.7 酶蛋白热变性温度测定

使用美国PE公司DSC7.差热扫描分析仪.测定扫描速率为20°C/min。

## 2.2.8 SX-40电子扫描电镜观察

在本院电镜室拍摄照片。

## 2.2.9 实验酶配制

中性蛋白酶粉(工业级):酶活40,000单位/克

比活力120单位/毫克蛋白

中性蛋白酶粉(食品级):酶活55,000单位/克

比活力260单位/毫克蛋白

蛋白酶I:取食品级酶粉40克.加0.02MPH6.5磷酸盐缓冲液100ML搅拌浸泡四小时.在低温下用滤纸过滤,过夜,可得约45毫升酶液,加入1%苯甲酸钠。使用时按实验需要稀释。(二日内使用)

蛋白酶II:取工业级酶粉20g加0.02MPH6.5磷酸盐缓冲液100ml,搅拌浸泡四小时,再经SephadexG-25脱盐后用BS-100部分收集仪收集前段蛋白峰.稀释后立即实验。

## 2.2.10 凝胶过滤<sup>[11][14][18]</sup>

脱盐:选用Sephadox-25.凝胶柱50cm×Φ2.5cm

层析条件:加样量20ml.流速2ml/min

洗脱液:0.02MPH6.5磷酸盐缓冲液

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

使用核酸蛋白质检测仪与BS-1000部分收集仪检测并收集蛋白峰。并且使用DDS-11A电导率仪检测流出液的电导变化情况以确定离子峰。

酶蛋白分离: 选用SephadoxG-75 凝胶柱100cm×Φ1.5cm

层析条件: 加样量3ml. 流速0.5ml/min.

洗脱液: 0.02M pH6.5磷酸盐缓冲液。

选用核酸蛋白质检测仪, 部分收集仪和绘图仪定收集并绘出图谱。

## 2.2.11 凝胶电泳分离<sup>[11][15]</sup>

采用聚丙烯酰胺凝胶平板电泳

样品处理: 将蛋白质样品溶解在含 1%SDS, 1%巯基乙醇的0.01M PH7.2的磷酸YAN6缓冲液中在100℃加热2-5min。蛋白质最后浓度控制在0.05mg-1.0mg/ml。在加样前加入溴酚兰作指示剂以及10%甘油

凝胶的准备: 按下表的浓度配好贮液

表2-1

A 凝胶贮液	Acr30g. Bis0.8g用蒸馏水配制100ml
B 凝胶缓冲液	SDS 0.2g加0.2mph下磷酸盐缓冲液至100ml
C 1%TEMED	TEMED 1ml用蒸馏水至100ml
D 蒸馏水	
E 10%过硫酸铵	过硫酸铵1g加蒸馏水至10ml

表中 Acr: 丙烯酰胺; Bis: 甲叉双丙烯酰胺

TEMED: N, N, N', N' -四甲基乙二胺

按体积比: A: B: C: D=5: 1.25: 0.5: 3.2配成溶液抽气十分钟后, 加入0.5毫升/100毫升体积比的10%过梳酸铵溶液, 摇匀, 在凝胶膜中反应成型。电泳条件: 加样约40微升 恒流20毫安。

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

表2-2 标准蛋白带

序号	名称	分子量
1	Phosphorylase	94000
2	Albumin	67000
3	Actin	43000
4	Carbonic Anhydrase	30000
5	TMV外壳蛋白	17500

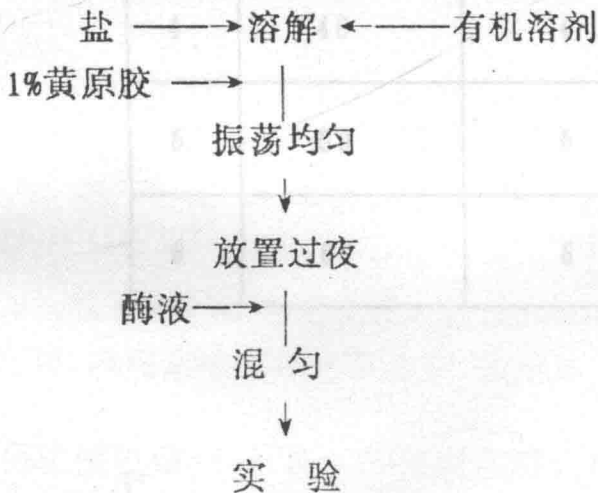
## 2.2.12 超滤膜过滤

采用SS-14A超(微)过滤器,用氮气加压 $1.5\text{kg}/\text{cm}^2$

## 2.2.13 1%黄原胶配制

称1.00g黄原胶粉,放入100ml容量瓶中,用去离子稀释约80ml,振荡,放置过夜,然后定容,振荡,放置过夜然后可稀释使用。

## 2.2.14 黄原胶添加方法



注:各添加剂量与酶量据具体实验而定

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

## 2.2.15 福林试剂<sup>[6]</sup>

使用时以1分原福林溶液与2份去离子水混匀

## 2.2.16 蛋白酶沉淀测定<sup>[6]</sup>

标准曲线绘制

将100微克/毫升标准酪氨酸溶液按表2-3 稀释取各浓度稀释酪氨酸溶液1毫升, 分别显色反应, 测得OD值为纵坐标, 酪氨酸的浓度为横坐标, 绘制标准曲线见图2-1。

表2-3

管号	酪氨酸浓度 ug/ml	标准酪氨酸 ml数	去离子水
对照	0	0	10
1	10	1	9
2	20	2	8
3	30	3	7
4	40	4	6
5	50	5	5
6	60	6	4

空白对照: 2ml酪氨酸中先加三氯乙酸, 然后加入样品  
计算:

酶活性单位 = (O<sub>1</sub>/O<sub>6</sub>) × 90 × 相应酪氨酸浓度 × 稀释倍数

一个活性单位表示: 1毫升酪氨酸40℃, pH7.5条件下, 每分钟水解酪氨酸  
产生1微克酪氨酸的量(ug/ml)



# 无锡轻工业学院研究生论文纸

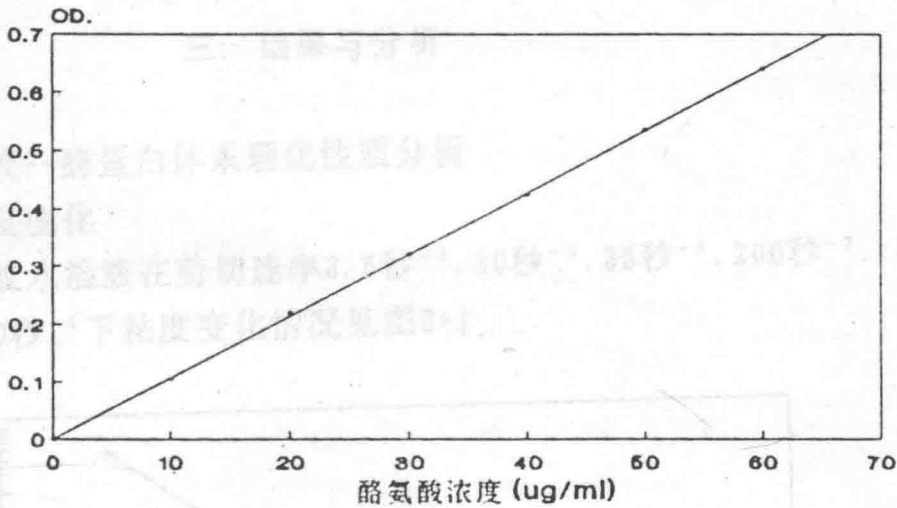


图2-1 标准曲线

酶活测定：将蛋白酶用0.01M PH7.5磷酸盐缓冲液稀至测得OD.值在0.2-0.4的范围内

步骤：2%酪素溶液1ml 40℃，5分钟

+

酶液 记录反应时间

↓ 10分钟

加入0.4M 三氯乙酸2ml 摇匀

↓

静置后过滤

↓

取1ml滤液

↓

加入0.4M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5ml, 福林试剂1ml

↓

40℃、20分钟后比色，波长680nm

空白对照：2%酪素中先加三氯乙酸. 然后加入样品

计算：

酶活性单位 =  $(4/10) \times \text{OD值对应酪氨酸浓度} \times \text{稀释倍数}$

一个活性单位表示：1毫升酶液40℃. PH7.5条件下，每分钟水解酪蛋白产生1微克酪氨酸的酶量 (u/ml)

## 三. 结果与分析

### 3.1 黄原胶--酶蛋白体系理化性质分析

#### 3.1.1 粘度变化

黄原胶水溶液在剪切速率 $3.5\text{秒}^{-1}$ 、 $20\text{秒}^{-1}$ 、 $35\text{秒}^{-1}$ 、 $200\text{秒}^{-1}$ 、 $350\text{秒}^{-1}$ 、 $2000\text{秒}^{-1}$ 下粘度变化情况见图3-1

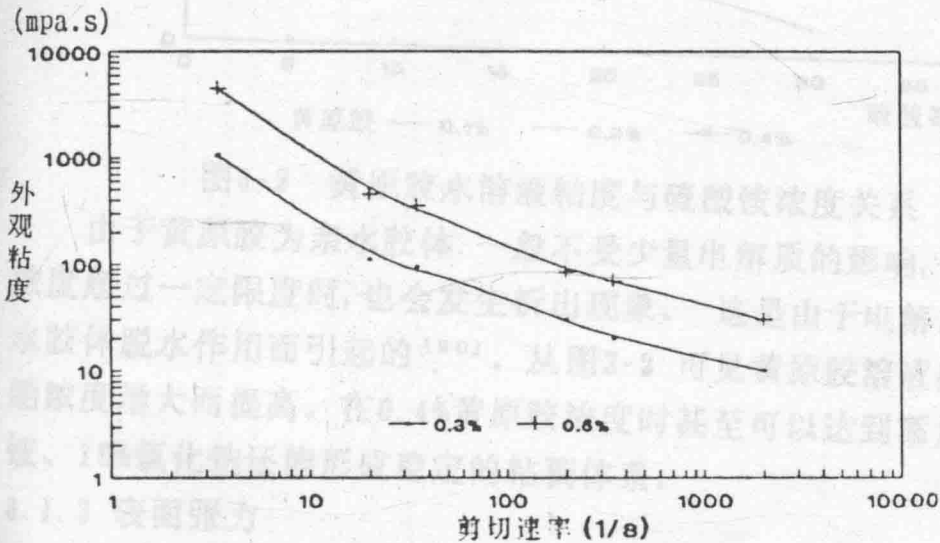


图3-1 黄原胶水溶液粘度与剪切速率关系

从图中看出,随着剪切力的增加黄原胶水溶液表现粘度急剧下降。一旦剪切力去除,便立即恢复原来的粘度。这一现象在流变学上称为假塑性。产生假塑性在于分子与分子间形成的弱键有关<sup>[8]</sup>。这一性质为使用黄原胶的工艺操作。促进溶质分散均一,稳定溶质提供了方便。

#### 3.1.2 电解质对黄原胶粘度的影响

以不同浓度的硫酸铵和氯化钠作为电解质对黄原胶水溶液外观粘度影响。结果见图3-2

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

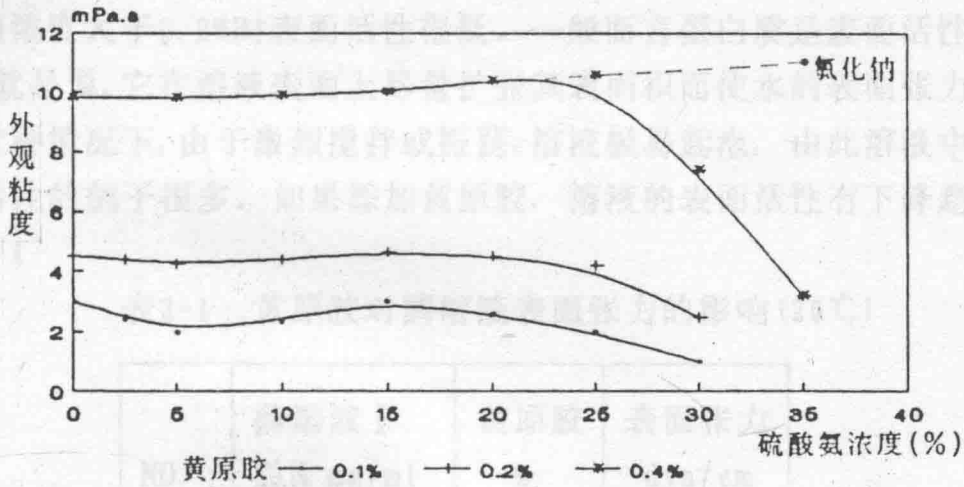


图3-2 黄原胶水溶液粘度与硫酸铵浓度关系

由于黄原胶为亲水胶体，一般不受少量电解质的影响，但当电解质浓度超过一定限度时，也会发生析出现象。这是由于电解质离子使亲水胶体脱水作用而引起的<sup>[20]</sup>。从图3-2可见黄原胶溶液抗电解质性随浓度增大而提高。在0.4%黄原胶浓度时甚至可以达到添加25%硫酸铵、10%氯化钠还能形成稳定的粘稠体系。

### 3.1.3 表面张力

不同浓度黄原胶水溶液在25℃测得表面张力结果见图3-3

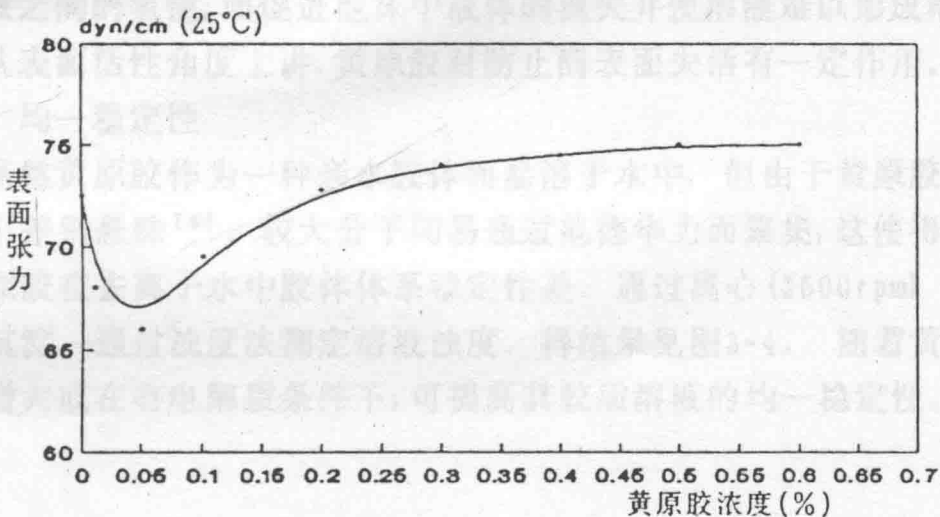


图3-3 黄原胶水溶液表面张力 (25℃)