

发酵培养基对不同方法测量透明质酸结果的影响

Effects of different methods on determination of hyaluronic acid in fermentation media

赵兴秀 何义国 邹伟 张静 赵长青

ZHAO Xing-xiu HE Yi-guo ZOU Wei ZHANG Jing ZHAO Chang-qing

(四川理工学院, 四川 自贡 643000)

(Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, Sichuan 643000, China)

摘要:根据透明质酸(HA)发酵过程中基质的变化情况,对发酵培养基进行不同倍数的稀释,研究稀释后的发酵培养基对不同方法测定 HA 结果的影响。结果表明:发酵培养基对 Bitter-Muir 法、CTAB 浊度法和 CTAB 法的测定结果均有影响,其中对 CTAB 浊度法的影响最为显著,根据发酵培养基对 HA 测定的影响对结果进行校正,发现经过校正的试验数据更能真实反应发酵过程中 HA 的生成情况。

关键词:发酵培养基;透明质酸;测定方法;模拟发酵

Abstract:According to the change of the hyaluronic acid (HA) during fermentation process, the fermentation medium was diluted with different multiples. The hyaluronic acid in the diluted fermentation medium was determined by different methods. The result showed that, the measurement of the Bitter-Muir way, the CTAB turbidity way and the CTAB way were influenced by the fermentation medium, in which the CTAB turbidity method was influenced significantly. Then the data were adjusted according to the influence, and the adjusted data could more really respond to the HA production.

Keywords: fermentation medium; hyaluronic acid; determination; simulated fermentation

透明质酸(hyaluronic acid, HA),又名玻璃酸,是一种线性、无支链多糖,由 β -D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰基-D 氨基葡萄糖反复交替生成^[1]。HA 因为具有良好的保湿性和粘弹性,而被广泛应用于医疗保健、食品和高档化妆品等领域^[2-4]。目前,HA 可以通过微生物发酵法生产获得,对于其产量和质量的测定方法很多^[5],但都不够准确,普遍采用的测定方法为 Bitter-Muir 法。该法显色明显,准确度较高,但前处理时

间长,使用的试剂有潜在的危险性。陈永浩等^[6]根据 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)与 HA 反应产生混浊的特性,通过测定吸光值与浊度的关系来测定 HA 的含量,相对于 Bitter-Muir 法更加快速和安全。根据 CTAB 法预处理的不同,测定 HA 可分为 CTAB 浊度法和 CTAB 法。有研究^[5,7]表明,发酵培养基中的葡萄糖、蛋白质、酵母膏和无机盐等物质对两种方法的测量结果都有一定影响。葡萄糖作为一种单糖,不与 CTAB 反应,对 CTAB 浊度法和 CTAB 法的影响较小,相对误差在 2% 以内,但在 Bitter-Muir 法中加入的浓硫酸会使葡萄糖碳化,形成的色素对测定结果影响很大,在葡萄糖浓度较低(31.20 $\mu\text{g/mL}$)时,引起的相对误差可达 11.87%^[7];低浓度的蛋白质对 CTAB 浊度法的影响较小,而酵母膏所含的糖分和色素对 Bitter-Muir 法的影响较大,但对 CTAB 浊度法和 CTAB 法的测定误差影响相对较小。

就以上各单因素引起的误差比较容易定量,研究成果也较多,文程等^[8]利用改良 CTAB 浊度法测定了发酵液葡萄糖对结果的影响,刘屹然等^[7]研究了蛋白质、无机盐和酵母膏各成分对 Bitter-Muir 法和 CTAB 浊度法测量透明质酸的影响,但葡萄糖、蛋白和酵母膏等培养基成分对透明质酸测定结果的综合作用却未有报道。本研究拟以葡萄糖、蛋白胨、酵母膏和无机盐等配制成的发酵培养基作为一个整体进行研究,首先根据发酵过程中葡萄糖的变化情况对初始发酵培养基进行不同倍数的稀释,再以稀释后的发酵培养基为研究对象,研究发酵培养基对这 3 种测定方法的影响;再通过模拟发酵过程中基质的变化情况,就发酵培养基对 HA 测量结果的影响进行定量分析,并对发酵过程中 HA 含量的测定结果进行校正,使校正后的结果更能准确反映发酵过程中 HA 的产生情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

兽疫链球菌(*Streptococcus zooepidemicus*)原始菌株:四

基金项目:酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(编号: NJ2012-16);四川理工学院科研项目(编号:2012PY08, 2012RC10);四川省教育厅项目(编号:14ZA0206, 11ZB244);泸州老窖科研奖学金项目(编号:13ljzk05);绿色催化四川省重点实验室(编号:LYJ1304)

作者简介:赵兴秀(1977—),女,四川理工学院副教授,硕士。

E-mail:623545277@qq.com

收稿日期:2015-12-11

川理工学院生物工程学院保藏菌种。

1.1.2 主要仪器与试剂

紫外分光光度计:T6 型,北京普析通用仪器有限责任公司;

聚醚砜一次性针头式微滤膜:0.45 μm,天津市津腾实验设备有限公司;

DNS:CP 级,成都市科龙化工试剂厂;

咪唑:AR 级,北京化学试剂公司;

CTAB:AR 级,成都市科龙化工试剂厂;

透明质酸钠:外用级,山东福瑞达生物化工有限公司;

D-葡萄糖醛酸:AR 级,国药集团化学试剂有限公司;

其它试剂均为 AR 级。

1.2 方法

1.2.1 配制试剂 DNS 试剂,0.2%的葡萄糖标准溶液,200 mg/L的葡萄糖醛酸标准溶液,200 μg/mL 的 HA 标准溶液,0.125% (m/V) 的咪唑试剂,25 mg/mL 的 CTAB 试剂。

1.2.2 发酵培养基 葡萄糖 2%,蛋白胨 1%,酵母膏 0.5%,KH₂PO₄ 0.2%,MgSO₄ · 7H₂O 0.05%,调 pH 值为 7.5。

1.2.3 葡萄糖的测定 DNS 法^[9-10]。

1.2.4 样品预处理 发酵液在 5 000 r/min 下离心 10 min,得上清液,将上清液适当稀释后,取样加入 2.5 倍的无水乙醇,沉淀 30 min,于 5 000 r/min 离心 10 min,用蒸馏水溶解沉淀物,取沉淀物溶解定容待测液。

1.2.5 HA 的测定

(1) Bitter-Muir 法^[11]:取 5 mL 浓硫酸置于试管中并冷却至 4 ℃,将 1 mL 待测液小心地置于浓硫酸层上,轻轻振摇 3 min,剧烈振摇 3 min,并使之在冰浴中不断冷却,然后沸水浴 10 min,冷却至室温,加入 0.2 mL 咪唑试液,再次摇匀,沸水浴 15 min,冷却至室温,于 530 nm 测定吸光值(A₅₃₀),以未经接种的培养基经相应处理后作为空白。

(2) CTAB 浊度法^[6]:取待测液 1 mL,准确加入 2 mL CTAB 试液,轻轻振摇 30 min 后,静置 10 min,测定其在 400 nm 时的吸光值(A₄₀₀),以未经接种的培养基经相应处理后作为空白。

(3) CTAB 法^[6]:将预处理样品第 1 次离心的上清液用 0.45 μm 的滤膜过滤,稀释至 5 倍体积,调节 pH 为 6.5,加入 1 mL 的 CTAB 试液,振荡,于 5 000 r/min 离心 10 min,用 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液解离沉淀 30 h,往解离液中加入过量乙醇,得 HA 沉淀,将沉淀用水稀释,测定其在 400 nm 处的吸光值(A₄₀₀)。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

2.1.1 葡萄糖标准曲线 配制葡萄糖标准溶液,以蒸馏水作空白,采用 DNS 法测定各样品在 540 nm 下的吸光值。以吸光值为纵坐标,葡萄糖含量为横坐标,绘制标准曲线,见图 1。

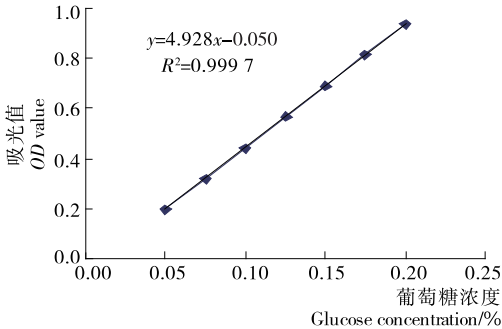


图 1 葡萄糖标准曲线
Figure 1 The standard curve of glucose

由图 1 可知,葡萄糖浓度与吸光值的线性回归方程为: $Y=4.928X-0.050, R^2=0.9997$,线性关系良好,能较好地反应吸光值与葡萄糖浓度的正比关系。

2.1.2 葡萄糖醛酸标准曲线的绘制 配制葡萄糖醛酸标准溶液,采用 Bitter-Muir 法测 530 nm 处的吸光值。以吸光值为纵坐标,以葡萄糖醛酸浓度为横坐标,绘制标准曲线,见图 2。

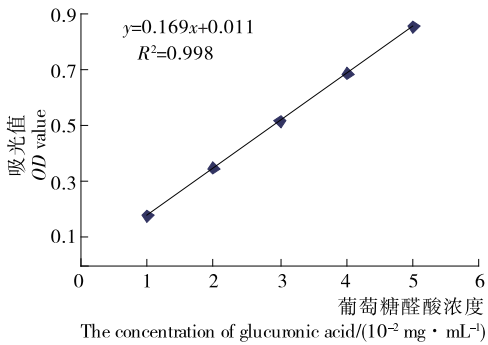


图 2 葡萄糖醛酸标准曲线
Figure 2 The standard curve of glucuronic acid

由图 2 可知,葡萄糖醛酸与吸光值的线性回归方程为: $Y=0.169X+0.011, R^2=0.998$,线性关系较好,能很好地反应吸光值与葡萄糖醛酸的正比关系,Bitter-Muir 法测出的 HA 浓度可以用式(1)表示:

$$C_1 = \frac{m_1}{m_2} \times n \tag{1}$$

式中:

C_1 ——HA 浓度,mg/100 mL;

m_1 ——标准曲线查出的葡萄糖醛酸浓度,mg/100 mL;

m_2 ——0.463;

n ——稀释倍数。

2.1.3 HA 标准曲线的绘制 配制不同浓度的 HA 标准溶液,采用 CTAB 法测定在波长 400 nm 处的吸光值,以 HA 浓度对吸光度作标准曲线,见图 3。

由图 3 可知,HA 与吸光值的线性回归方程为: $Y=0.058X+0.030, R^2=0.997$,线性关系良好,能很好地反应吸光值与 HA 的关系。CTAB 浊度法和 CTAB 法测出的 HA 浓度可以用式(2)表示:

$$C_2 = m_3 \times n \tag{2}$$

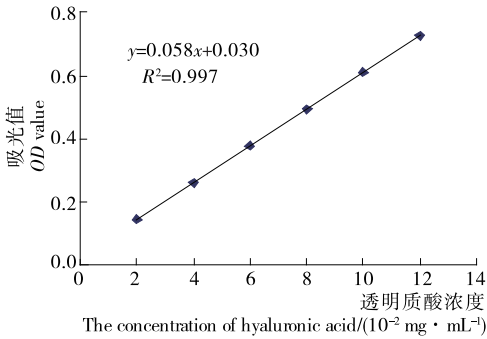


图 3 透明质酸标准曲线

Figure 3 The standard curve of hyaluronic acid

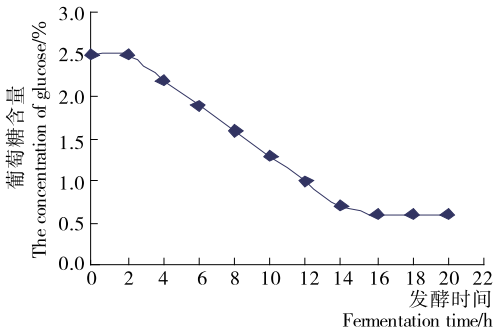


图 4 HA 发酵过程中葡萄糖含量变化

Figure 4 The glucose levels during hyaluronic acid fermentation

式中：
 C_2 ——HA 浓度，mg/100 mL；
 m_3 ——标准曲线对应的 HA 浓度，mg/100 mL；
 n ——稀释倍数。

2.2 透明质酸发酵过程中葡萄糖含量的变化

将 70 mL 发酵液置入 500 mL 摇瓶中，接种 1.5 mL 种子液，在 200 r/min、36 ℃ 下培养，每隔 2 h 取样，预处理得上清液，用 DNS 法测定其中的葡萄糖含量，发酵过程中葡萄糖的变化见图 4。

葡萄糖是 HA 发酵过程中主要的碳源，本试验通过葡萄糖的变化情况来描述 HA 发酵过程中基质的变化。由图 4 可

知，所配制的发酵培养基中葡萄糖的实际含量为 2.5%，略高于 2.0%，说明在酵母膏、蛋白胨中也含有糖分。随着发酵的进行，葡萄糖的含量经过短暂的延迟期后，进入快速消耗阶段，发酵进行到 16 h 时，发酵进入稳定期，葡萄糖的含量趋于稳定，这时葡萄糖的含量仅为 0.6%。随着发酵的进行，基质被消耗，培养基对 HA 测定的影响也有所不同。根据发酵培养基中葡萄糖含量的变化趋势，将初始发酵培养基按照对应葡萄糖浓度进行稀释，模拟发酵过程中基质的变化情况，研究发酵培养基对 HA 含量测定的影响。将发酵时间 0 h 的葡萄糖浓度定义为 100%，根据图 4 对发酵培养基进行稀释，结果见表 1。

表 1 模拟不同发酵阶段培养基稀释液的配制

Table 1 The preparation of medium dilutions during simulate fermentation

编号	发酵过程			模拟发酵过程		
	发酵时间/ h	葡萄糖实际 浓度/%	定义葡萄糖 浓度/%	上清液/ mL	蒸馏水/ mL	葡萄糖浓度/ %
1	0	2.5	100	10.0	0.0	2.5
2	2	2.5	100	10.0	0.0	2.5
3	4	2.2	90	9.0	1.0	2.2
4	6	1.9	74	7.4	2.6	1.9
5	8	1.6	62	6.2	3.8	1.6
6	10	1.3	52	5.2	4.8	1.3
7	12	1.0	40	4.0	6.0	1.0
8	14	0.7	28	2.8	7.2	0.7
9	16	0.6	25	2.5	7.5	0.6
10	18	0.6	25	2.5	7.5	0.6
11	20	0.6	25	2.5	7.5	0.6

2.3 发酵培养基对不同方法测定 HA 结果的影响

取表 1 中不同编号的稀释液分别采用 Bitter-Muir 法、CTAB 浊度法和 CTAB 法测值。将测得的发酵培养基的吸光值代入标准曲线，计算出发酵培养基中的蛋白、糖类等因素相当于 HA 的浓度，结果见图 5。这种将吸光值代入标准曲线求 HA 含量的方法，不仅能统一指标对 Bitter-Muir 法、CTAB 浊度法和 CTAB 法进行比较，而且可以对发酵液中的 HA 含量进行定量的校正。

由图 5 可知，在发酵过程的前期，10 h 前，培养基的浓度较大，影响显著，对于过程研究的试验，需要消除这部分影

响，所得结果才能准确地反应发酵过程中目的产物的产生情况；随着发酵的进行，基质含量降低，影响越来越小，16 h 后的影响几乎可以忽略。虽然发酵培养基对这 3 种测定方法的影响趋势相同，但显著性有差异，其中对 Bitter-Muir 法的影响最小，对 CTAB 浊度法的影响最为显著。通过 CTAB 浊度法和 CTAB 法的比较可知，样品经过 0.45 μm 的滤膜过滤，可有效降低发酵培养基对 HA 测定的影响，而且试验表明用 0.45 μm 的滤膜处理标准品不会对 HA 产生影响。

2.4 HA 发酵过程中测定结果校正

将 70 mL 培养基置于 500 mL 摇瓶中，接种 1.5 mL 种

子液,在 200 r/min,36 ℃下培养 20 h,其中每隔 2 h 取样,分别采用 Bitter-Muir 法、CTAB 浊度法和 CTAB 法测定发酵液中的 HA 浓度,并根据图 5 的数据对 HA 发酵过程中不同方法测得的试验结果进行校正,结果见图 6。

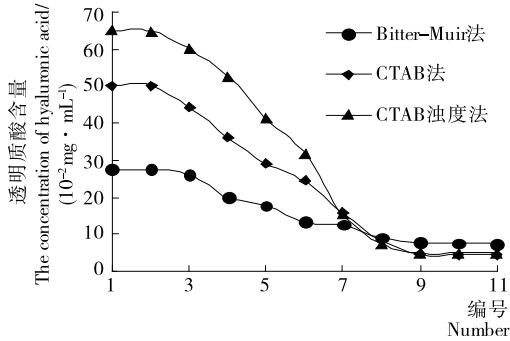


图 5 模拟发酵培养基对 HA 测定结果的影响

Figure 5 The effect of different methods during simulate fermentation fermentation

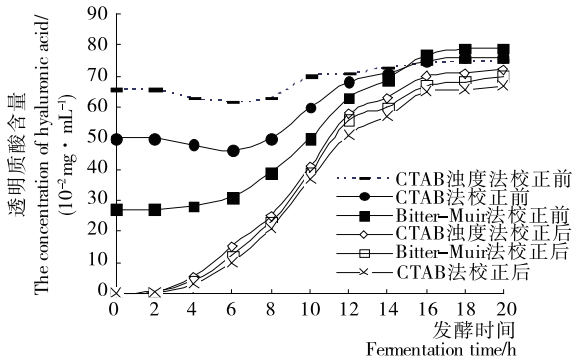


图 6 校正前后 HA 的含量

Figure 6 HA levels before and after correction fermentation

由图 6 可知,CTAB 浊度法和 CTAB 法校正前的曲线不能正确地反应发酵过程中 HA 的生成情况,Bitter-Muir 法校正前虽能反映大体趋势,但发酵前期的结果偏大,与实际情况明显不符。将不同方法测得的发酵过程中 HA 的含量根据图 5 进行校正,校正后的曲线比较接近,而且结果能更有效地反应发酵过程中 HA 的生成情况。

3 讨论

大多液体发酵培养基都要求基质丰富,以满足微生物的生长需求。这种复杂的组成可能会对目的产物的测定有所影响,影响因素不仅包括蛋白和糖类物质,还有无机盐等。在一些纵向比较的试验中,如果培养基的消耗一致,引起的误差相同,就不会影响对结果的分析。而在一些过程研究的试验中,由于不同阶段基质的消耗情况不同,引起的误差也会不同,如果不对测量结果进行校正,就不能对试验结果进行正确的分析。本试验根据发酵培养基中葡萄糖的变化来近似模拟基质的变化,是因为葡萄糖是主要的碳源物质,跟基质变化有一定的相关性。

本试验通过研究测定 HA 的 3 种常用方法,并对由培养基引起的误差进行了定量分析。结果表明,校正后的试验数据更能准确真实地反应在发酵过程中 HA 的生成情况。

参考文献

[1] 凌沛学. 透明质酸[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 25-27.

[2] 皮钰珍, 李佳音, 贺亮. 双酶复合法提取蛋壳膜中透明质酸的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(4): 40-47.

[3] Fong Chong B, Nielsen L K. Amplifying the cellular reduction potential of Streptococcus zooepidemicus[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 100(2): 33-41.

[4] 黄小忠, 高大响, 张雪松. 透明质酸摇瓶发酵条件的优化[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(2): 311-313.

[5] 周荣清, 王琳, 胡松青. 发酵液中 HA 含量分析方法的研究[J]. 华南理工大学: 自然科学版, 2001, 29(11): 55-58.

[6] 陈永浩, 王强. 发酵液中透明质酸含量快速检测方法研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(1): 135-139.

[7] 刘屹然, 陈林海, 李宗伟. 发酵液中透明质酸含量测定方法的比较研究[J]. 河南师范大学: 自然科学版, 2006, 34(1): 102-105.

[8] 文程, 于慧敏, 孙云鹏, 等. 高效测定发酵液中透明质酸含量的改良 CTAB 浊度法[J]. 中国生物工程杂志, 2010(2): 89-93.

[9] 赵凯, 许鹏举, 谷广辉. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534-536.

[10] 宋占午, 王莱, 刘艳玲, 等. 3,5-二硝基水杨酸测定还原糖含量的条件探讨[J]. 西北师范大学: 自然科学版, 1997, 33(2): 52-55.

[11] 李薇, 佟爱东, 邓兆勇. 透明质酸化学定量分析方法的研究[J]. 中国生化药物杂志, 1994, 15(2): 96-99.

信息窗

研究:常吃梨还有助于提高减肥效果

美国《营养与食品科学》杂志刊登一项新研究发现,常吃梨还有助于提高减肥效果。

新研究中,美国路易斯安那州立大学农业研究中心研究员卡罗尔·奥尼尔对美国“2001~2010 年全国健康与营养调查”的相关数据包括:饮食结构、营养摄入、饮食质量、心血管疾病风险因素、每日饮食摄入总热量、运动习惯等进行了分析。被选中的参试者在运动量和饮食摄入总量方面几乎没有差别,但结果显示,经常吃梨的人腰围更小。与不吃梨的人相比,每天吃一个梨的参试者罹患肥胖的风险降低了 35%,且维生素 C、膳食纤维、镁、铜、钾摄入量总量都相对更高。

奥尼尔博士表示,“经常吃梨有助减肥”这一研究结果令人兴奋。吃一个中等大小的梨就可满足成年人每日纤维素推荐摄入量的 24%,其热量仅为 100 千卡。另外,新研究还发现,经常吃梨的参试者总脂肪、单不饱和脂肪酸、饱和脂肪以及添加糖的摄入量也相对更低。

(来源:www.foodmate.net)