

一种产碱杆菌胞外多糖动态粘弹性研究*

钟颜麟 彭志英** 李少霞 赵谋明

(华南理工大学生物科学与工程研究中心 广州 510641)

摘 要 对产碱杆菌 Q9415 胞外多糖(Curvielan)的动态粘弹性进行了研究.在角频率 $\omega = 0.01 \sim 100 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ 范围内,1.4% (W/V,下同)curvielan 的储能模量 G' 始终远远大于耗能模量 G'' 并且不依赖于频率,表明 curvielan 弹性极佳并相当稳定.0.5% 可能接近 curvielan 形成水凝胶的阈值浓度. Curvielan 易溶于冷水形成有粘弹性的弱凝胶,在 90℃ 左右保温 10min 左右,弱凝胶可形成粘弹性更高的凝胶,长时间的高温加热及冷冻-熔融处理会破坏 curvielan 的凝胶网络结构,酸碱均降低 curvielan 形成凝胶网络的能力.添加 1~18% NaCl,对 1% curvielan 的凝胶网络有一定的损害,添加 6% KCl、CaCl₂、MgCl₂、ZnCl₂、20% 和 40% 蔗糖有类似影响,但 6% 的 AlCl₃ 或 FeCl₃ 均使 1% curvielan 的粘弹性完全丧失.

关键词 产碱杆菌,胞外多糖,凝胶,动态粘弹性

微生物胞外多糖(Exopolysaccharide, EPS)具有增稠、稳定、乳化、胶凝、成膜、保湿、粘接等功能特性,为天然高分子功能材料,广泛应用于食品、日化、石油、农业、制药及生物工程等领域,迄今有多种由微生物生产的 EPS 已成功地投入工业化生产^[1~6]. 作者从土壤中筛选到一株产碱杆菌 (*Alcaligenes* sp.) Q9415,其所产胞外多糖 1% (W/V,除注明外,下同)水溶液常温下形成有粘弹性的弱凝胶,加热至 90℃ 左右、冷至常温则可形成弹性极好的热可逆透明凝胶,并在 pH3~10 范围内稳定.完全酸水解-HPLC 检测结果表明该多糖为两种单糖(葡萄糖和半乳糖,正在研究中)组成的异源多糖,FT-IR 显示为典型的多糖吸收峰,含有乙酰基. GPC 检测结果表明其 $\overline{M}_w = 2.07192 \times 10^5$ ($D = 1.14$), $\overline{M}_n = 1.82108 \times 10^5$,对理化特性的初步研究结果表明,该多糖不同于凝乳胶(Curdlan)^[7,8]和其它已报道的热凝类多糖,是一种新的微生物多糖,据其特性及国际通行的微生物胶命名方法,定名为 curvielan. Curvielan 易在冷水中分散,有良好的粘弹性,并在一定范围内具有耐高温、耐酸、碱、盐、耐渗透压、抗冻融及能与大多数食品胶共混合等优良特性,具有工业应用前景,可望成为新型食品胶一个极好来源而用于食品加工及用于日化、制药等相关领域,本文报道该多糖动态粘弹性的研究结果.有关 curvielan 的分子结构及与其它多糖的共混合特性另文后报.

1 实验部分

1.1 产碱杆菌 Q9415 胞外多糖(Curvielan)

生产菌 Q9415 为本中心自行筛选的产碱杆菌 (*Alcaligenes* sp.),用 Biostat B (B. Braun, Germany) 5L 自控发酵罐生产,装液量 3.2L,接种量 10% (V/V),温度 32~28℃,转速 200~400 r/min,通气量 3~9 L/min,流加蔗糖,发酵周期为 60h.将发酵液用等体积的蒸馏水稀释,10000 r/min 离心 30min 除菌体,上清液用 2 倍体积的 95% (V/V) 乙醇沉淀,沉淀物在 60℃ 烘干至恒重后粉碎过 40 目筛,真空干燥器保存备用.

1.2 试剂

KCl、NaCl、CaCl₂、MgCl₂、ZnCl₂、AlCl₃、FeCl₃、KOH、醋酸均为国产分析纯.

1.3 样品制备

精确称取一定量的 curvielan,置于 25mL 小烧杯中,用蒸馏水溶胀,在一定温度的水浴中保温,按测定需要改变溶剂、水浴温度和保温时间.除特别说明外,浓度均为 1% (W/V),蒸馏水溶胀,90℃ 水浴保温 30min.

1.4 动态粘弹性测定

用 Fluids Spectrometer RFS II (Rheometrics, USA) 测定,锥板 $\phi = 25 \text{ mm}$ 、 $\alpha = 4^\circ$, $T = 15^\circ \text{C}$.

1.5 pH 测定

用 pH S-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂)测定, $T = 20^\circ \text{C}$.

2 结果与讨论

2.1 Curvian 的动态粘弹性

用 0.6% 和 1.4% curvian 进行应变扫描, 其复合模量 G^* 在应变 $\gamma = 1\% \sim 30\%$ 范围内不受影响. 本研究在应变 $\gamma = 30\%$ 的条件下进行.

2.1.1 Curvian 的频率扫描 在角频率 $\omega = 0.01 \sim 100 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ 范围内进行扫描, 0.6% 和 1.4% curvian 的储能模量 G' 和耗能模量 G'' 呈近似线性增大(图 1), 1.4% curvian G' 的频率响应曲线斜率小于 0.6% 的斜率, 表明高浓度下多糖分子交联密度更大, 形成了更强的凝胶网络. G' 始终远远大于 G'' , 特别是在较高的浓度下, 说明 curvian 凝胶弹性极佳并且相当稳定.

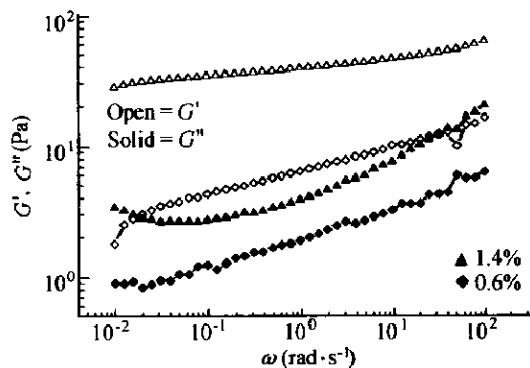


Fig. 1 Frequency sweep of curvian

2.1.2 不同浓度 curvian 的动态粘弹性 图 2 表明, 随 curvian 浓度增大, G' 和 G'' 相应增大. 0.5% 可能接近 curvian 形成凝胶的阈值浓度. 实验中观察到 0.2% curvian 也能形成粘弹性较高的粘弹体. 对浓度小于 0.5% 和大于 2.5% curvian 的流变学行为有待进一步研究.

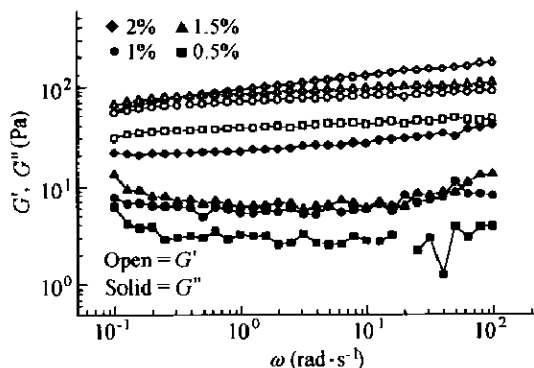


Fig. 2 Concentration dependence of storage modulus (G') and loss modulus (G'') of curvian

2.2 温度对 curvian 动态粘弹性的影响

2.2.1 加热温度对 curvian 动态粘弹性的影响

Curvian 易在冷、热水中分散, 用 40℃ 温水溶胀 2% curvian 可形成有粘弹性的凝胶, 相同浓度 curvian 在 90℃ 左右保温 10min 左右, 可形成粘弹性更高的凝胶(图 3).

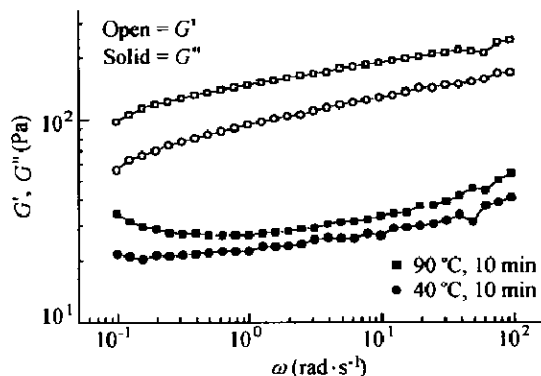


Fig. 3 Storage modulus (G') and loss modulus (G'') of 2% curvian heated for 10min at 90°C and 40°C, respectively

2.2.2 加热时间对 curvian 动态粘弹性的影响

长时间高温加热会降低 curvian 的粘弹性. 1% curvian 100℃ 水浴 60min 后凝胶网络遭到破坏(图 4). 121℃ 蒸煮 30min 后, 粘弹性丧失, 不能形成凝胶, 说明 curvian 只能在一定的范围内耐热, 与 curdlan 不同^[7].

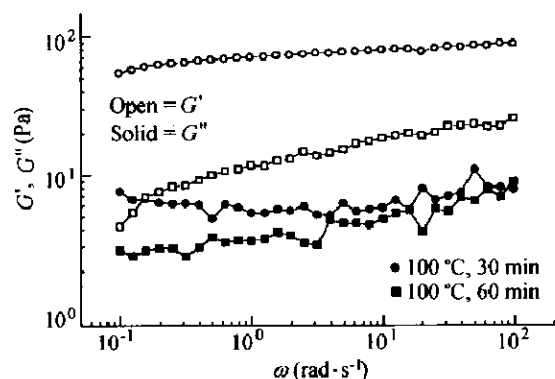


Fig. 4 Storage modulus (G') and loss modulus (G'') of 1% curvian heated at 100°C for 30min and 60min, respectively

2.2.3 冻融对 curvian 动态粘弹性的影响

分别对常温下(25℃)溶胀和经 90℃ 水浴保温 30min 的 1% curvian 进行冷冻-解冻处理 1 次和 3 次, 将频率扫描的结果与参照样比较. Curvian 经 3 次冻融后对凝胶网络有一定的损害, 而常温下溶胀的 curvian 凝胶的网络结构更易遭冰晶的破坏, G' 和 G'' 均降低(图 5).

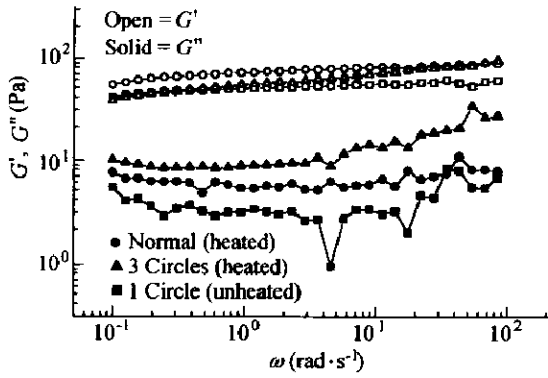


Fig. 5 Effects of freezing-thawing circles on the storage modulus(G') and loss modulus (G'') of 1% curvianan

2.3 pH 值对 curvianan 动态粘弹性的影响

以醋酸和 KOH 调 pH, 100℃ 水浴 30min 配制 1% curvianan 凝胶, 以 pH7 为参照, 结果见(图 6). pH 为 3 时, G'' 大幅增加, 粘性损耗上升, 说明网络结构受损较大; pH 为 10 时, G' 大幅降低, 交联密度下降, 表明偏酸、偏碱对凝胶网络的形成均有一定的副效应.

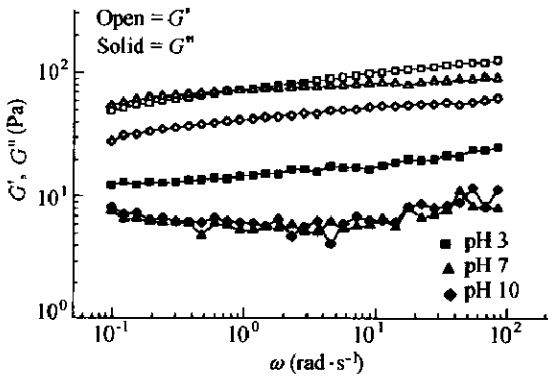


Fig. 6 Effects of pH values on the storage modulus (G') and loss modulus (G'') of 1% curvianan heated at 100℃ for 30min

2.4 金属盐对 curvianan 动态粘弹性的影响

2.4.1 NaCl 的影响 分别以不同浓度 NaCl 溶液溶胀 1% curvianan, 90℃ 水浴 30min. 可见添加 1%~18% NaCl 后, G' 在低频区降低, 高频区变化小; G'' 均大幅增加. 表明较高浓度 NaCl 对凝胶网络有破坏作用(图 7). 与添加 6% NaCl 比较, 添加 6% KCl 对 curvianan 的粘弹性损害稍大.

2.4.2 CaCl_2 、 MgCl_2 和 ZnCl_2 的影响 分别以 1%、6% CaCl_2 (图 8)、6% MgCl_2 、6% ZnCl_2 (图 9) 溶液溶胀 1% curvianan, 90℃ 水浴 30min. G' 和 G'' 的变化与 NaCl 有类似的趋势.

2.4.3 AlCl_3 和 FeCl_3 的影响 6% 的 AlCl_3 或

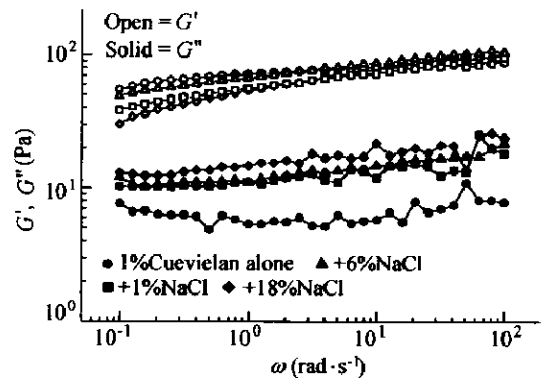


Fig. 7 Effects of various concentrations of NaCl on the storage modulus (G') and loss modulus (G'') of 1% curvianan

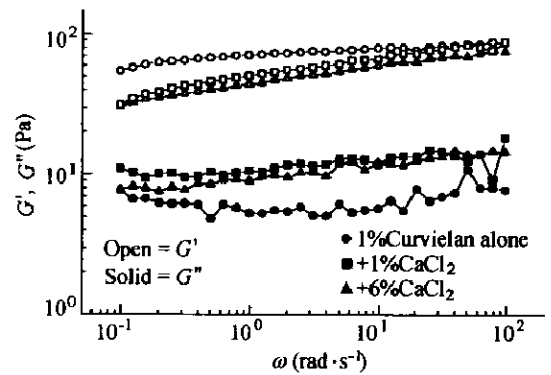


Fig. 8 Effects of CaCl_2 on the storage modulus (G') and loss modulus (G'') of 1% curvianan

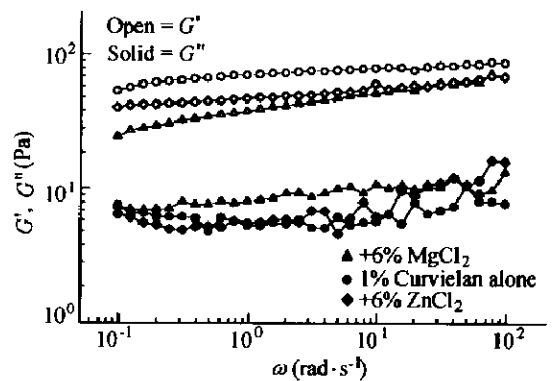


Fig. 9 Effects of MgCl_2 and ZnCl_2 on the storage modulus (G') and loss modulus (G'') of 1% curvianan

FeCl_3 均使 curvianan 的粘弹性完全丧失.

2.5 蔗糖对 curvianan 动态粘弹性的影响

分别以 20%、40% 蔗糖溶液溶胀 1% curvianan, 90℃ 水浴 30min. 结果表明随蔗糖浓度提高, 对 curvianan 的粘弹性损害增大, 妨碍 curvianan 形成凝胶网络(图 10).

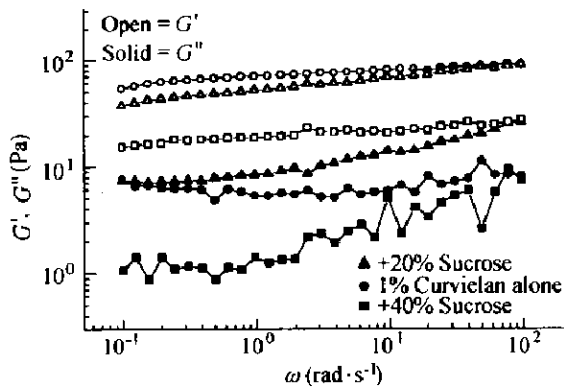


Fig. 10 Effects of sucrose on the storage modulus (G') and loss modulus (G'') of 1% curvialan

综上所述,本文主要研究了 1% curvialan 的动态粘弹性及其影响因素,结果表明该微生物胶具有极好的粘弹性,并在一定范围内具有耐热、pH 适应范围宽、耐盐、抗冻融、耐渗透压的良好性能,低浓度及高浓度 curvialan 及其在食品等多相体系中的流变学特性有待进一步探讨。

致谢 华南理工大学材料科学与工程学院钱莉颖硕士帮助测定了样品的动态粘弹性,童真教授对本文给予了指导,特此表示感谢。

REFERENCES

1 Crescenzi V. *Biotechnology Progress*, 1995, 11: 251 ~ 259
2 Sutherland I W. *Biotechnology of Microbial Polysaccharides*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 20 ~ 37
3 Pszczola D E. *Food Technology*, 1993, 47(9): 94 ~ 96
4 Morris V J. Bacterial polysaccharides. In: *Food Polysaccharides and Their Applications*. Alistair M S, ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1995. 341 ~ 367
5 Li Jingwei(里景伟). Production and Application of Microbial Polysaccharide-Xanthan(微生物多聚糖黄原胶的生产与应用). Beijing(北京): China Agricultural Science and Technology Press(中国农业科技出版社), 1995. 1 ~ 5
6 Peng Zhiying(彭志英), Zhao Mouming(赵谋明), Liu Tongxun(刘通讯). *Food Biotechnology(食品生物技术)*. Beijing(北京): China Light Industry Press(中国轻工业出版社), 1999. 140 ~ 160
7 Harada T. *Arch Biochem Biophys*, 1965, 112: 65 ~ 69
8 Pszczola D E. *Food Technology*, 1997, 51(4): 30

STUDIES ON THE DYNAMIC VISCOELASTICITY OF CURVIELAN, A NOVEL GEL-FORMING EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCED BY *ALCALIGENES* sp.

ZHONG Yanlin, PENG Zhiying, LI Shaoxia, ZHAO Mouming

(Research Center of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract Dynamic viscoelasticity of curvialan, a novel gel-forming exopolysaccharide produced by soil bacterium *Alcaligenes* sp. Q9415 was studied. Over the angular frequency (ω) range $0.01 \sim 100 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, the storage modulus (G') of 1.4% (W/W) curvialan gels was much higher than its loss modulus (G'') and less dependent on frequency which showed that curvialan had fine elasticity. 0.5% was close to the threshold concentration needed for gelation. Curvialan was dispersible in cold water to form weak gel which could become much strong viscoelastic gel at about 90°C for 10min. Continuous heating at high temperature and freezing-thawing treatment damaged the network of curvialan gel. Similar results were observed for curvialan gels prepared under pH 3 and 10. Addition of 1% ~ 18% NaCl, 6% KCl, CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 and 20% sucrose decreased the G' of 1% curvialan gel at low frequency and increased G'' over the frequency range $0.01 \sim 100 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ which indicated that the formation of elastic network was hindered. However, addition of 6% AlCl_3 or FeCl_3 made total loss of viscoelasticity of the 1% curvialan system.

Key words *Alcaligenes* sp., Exopolysaccharide (EPS), Gel, Curvialan, Dynamic viscoelasticity