

产碱杆菌 NX-3 胞外多糖的结构与性能*

李 莎 徐 虹** 姜 岷

(南京工业大学制药与生命科学学院 南京 210009)

摘要:一株产碱杆菌 NX-3 分泌的可溶性胞外多糖 (PS-238) 经醇析、Sevag 法脱蛋白、透析、冷冻干燥得分析样品, 酸水解后经 TLC、GC 以及化学法、IR 和高碘酸氧化分析测得 PS-238 是由葡萄糖、甘露糖、鼠李糖和葡萄糖醛酸组成的杂多糖, 糖苷键类型主要为 (1→3) 和 (1→4)。此外考察多糖溶液粘度与剪切速率、溶液浓度、温度、酸碱度以及盐离子种类和浓度等因素之间的关系, 结果表明多糖水溶液的流体特征表现为假塑型, 25℃ 时 1% 的水溶液粘度可达 3,300cp, 耐酸碱, 在 pH2~13 的范围内粘度稳定; 耐高温, 在 150℃ 内不发生明显降解; 部分盐类对 PS-238 的增稠性有协同效应。

关键词: 结构, 性能, 多糖, 产碱杆菌

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0037-05

Structural and Characteristics of Exopolysaccharide Produced by *Alcaligenes* sp. NX-3*

Li Sha XU Hong** JIANG Min

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009)

Abstract: The structure and characteristics of the soluble exopolysaccharide (PS-238) produced by *Alcaligenes* sp. NX-3 were studied. The analytic sample was prepared by ethanol precipitation then proteins were removed by the Sevag method. The components of polysaccharide were identified by TLC, GC and chemical method after acid hydrolysis as: glucose, mannose, rhamnose and glucuronic acid. By means of IR and periodate oxidation, it showed that the polysaccharide was mainly consisting of (1→3) and (1→4) glucosidic linkages. The relation between viscosity and shear rate, concentration, temperature, pH and salts was investigated. The results showed that the solution of PS-238 is a typical pseudoplastic liquid, having high viscosity at low concentrations. The viscosity of 1% PS-238 water solution could reach 3,300cp at 25℃. It has the excellent stability towards pH2~13, also has outstanding property of viscosity retention even at temperatures up to 150℃. Some kinds of salts were cooperated with PS-238 as a thickening agent.

Key words: Structure, Characteristic, Polysaccharide, *Alcaligenes* sp.

近年来微生物多糖以其出色的性质和巨大的商业应用潜力, 受到国际上的广泛关注, 此类研究也颇为热门, 新的产品层出不穷。本实验室保藏的一株产碱杆菌 NX-3 分泌一种胞外多糖 PS-238 该多糖具有良好的流变学特性, 几乎具备黄原胶的一切优点, 热稳定性优于黄原胶, 是高温高盐油藏十分理想的注水井调剖剂。另外, 工业中可作为增稠剂、乳化剂、悬浮剂、粘合剂等^[1]。为了更好的将这种新型多糖应用于工农业

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2002AA327020)

江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK2004122)

教育部优秀青年教师资助计划

** 通讯作者 Tel: 025-83587332, E-mail: xuh@njut.edu.cn

收稿日期: 2005-01-24, 修回日期: 2005-03-09

生产中,对其结构和溶液性能的研究是十分必要的。本文对发酵法制备的 PS-238 多糖的结构和性能进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

产碱杆菌 (*Alcaligenes* sp.) NX-3, 本实验室保藏, 产胞外多糖水平见文献 [2]。

1.2 样品制备

接种优化后的发酵培养基, 于 30℃、200r/min 摇床震荡培养 72h, 置 80℃ 水浴灭活 20min, 用去离子水等体积稀释, 8,000r/min 离心 30min 除菌体, 收集上清液, 重复几次, 合并上清液, 浓缩后用 95% 乙醇 4℃ 沉淀过夜, 真空干燥得多糖粗品。取适量的粗品溶于 100mL 去离子水中, 加热搅拌使其溶解, sevag 法除蛋白后, 上清液流水透析 48h, 聚乙二醇浓缩, 冷冻干燥得多糖分析样品。

1.3 组分分析

1.3.1 薄层色谱: 参照文献 [1]。

1.3.2 气相色谱分析: 参照文献 [3] 制备糖腈乙酸酯衍生物, 色谱条件: HP-5 型气相色谱仪, FID 检测器, 温度 300℃, 载气 N₂, 进样温度 260℃, 程序升温: 150℃ (4min) → 250℃ (10min) → 280℃ (1min) 根据标准单糖与样品的保留时间, 确定组分单糖的种类。

1.3.3 葡萄糖醛酸分析: 采用硫酸-咔唑法^[3]定量测定。

1.4 结构初步分析

1.4.1 高碘酸氧化: 参照文献 [4]。

1.4.2 红外光谱分析: 2mg 多糖样品与 KBr 一起研磨压片, 用 Nicolet 170 SX 型红外光谱仪测其红外吸收。

1.5 粘度的测定

NDJ-1 型旋转粘度计于 25℃, 4 号转子测定不同条件下的多糖溶液流变学特性^[5]。

2 结果与讨论

2.1 单糖组分分析

2.1.1 薄层色谱和气相色谱: 薄层层析如图 1 所示: 未检出其他斑点, 证明多糖是由葡萄糖、鼠李糖和甘露糖组成的。

气相色谱图如图 1 右图所示 (标准单糖气相色谱图略), 相对保留时间为 7.924 的峰为溶剂峰, 其余依次为鼠李糖、甘露糖、葡萄糖和内标物肌醇峰, 故可证明多糖是由 3 种单糖组成的, 根据各组分峰面积, 由内标法计算得多糖中甘露糖、葡萄糖、鼠李糖的比例为 1:1.35:2.11。

2.1.2 硫酸-咔唑法测定多糖中葡萄糖醛酸的含量: 以标准曲线方程计算得多糖中葡萄糖醛酸的含量为 15.98%。

2.2 高碘酸氧化

PS-238 经高碘酸钠氧化 6d 后其消耗量达稳定值, 每摩尔葡萄糖基消耗高碘酸钠量为 0.6660mol, 甲酸释放量为 0.0495mol, 计算得平均每摩尔糖基中以 1→6 位键和、1→4 位键和, 1→3 位键和的摩尔比大致为 1:10:7。

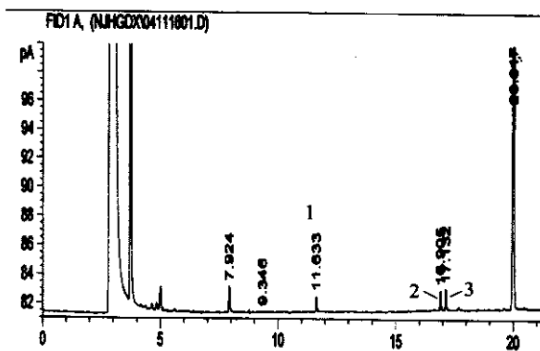
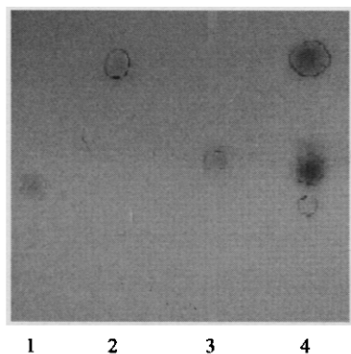


图1 PS-238 的单糖组分分析

1 葡萄糖, 2 鼠李糖, 3 甘露糖, 4 多糖酸水解液

1 鼠李糖, 2 甘露糖, 3 葡萄糖

2.3 红外光谱

由红外光谱显示多糖在 $3,400 \sim 3,200\text{cm}^{-1}$ 的宽峰为 O-H 的伸缩振动, $3,100 \sim 2,800\text{cm}^{-1}$ 的峰为糖类 C-H 的伸缩震动, 这两组峰是糖类的特征吸收峰, $1,457\text{cm}^{-1}$ 为羧酸 O-H 的弯曲振动吸收峰, $1,738\text{cm}^{-1}$ 为羧酸 C=O 的伸缩振动吸收峰, $1,647\text{cm}^{-1}$ 为酮的吸收峰, $1,116\text{cm}^{-1}$ 为羟基 C-O 的伸缩振动吸收峰 (图略)。

2.4 PS-238 水溶液的流变学特性

1.0% 的 PS-238 水溶液粘度随着剪切速率的增大而降低 (图 2), 当转速降低时粘度又可回升, 呈现典型的假塑流体特征^[6]。在相同的剪切速率下, 表观粘度与溶液浓度正相关, 表现出良好的增稠效果。且剪切速率越小, 这种趋势越显著。可能是由于随着多糖浓度增加溶液剪切稀化程度加剧造成的 (图 3)。

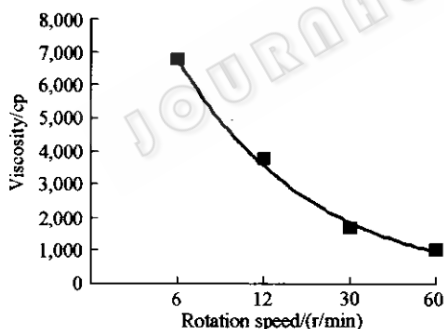


图2 剪切速率对 PS-238 水溶液表观粘度的影响

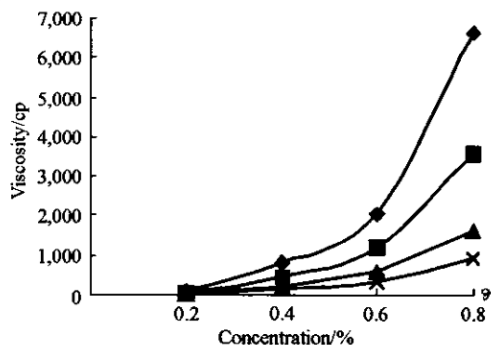


图3 PS-238 浓度对表观粘度的影响

◆ 6r/min, ■ 12r/min,
▲ 30r/min, × 60r/min

2.5 PS-238 水溶液的特性

2.5.1 温度对 PS-238 溶液表观粘度的影响: 不同水浴温度下 ($20^{\circ}\text{C} \sim 100^{\circ}\text{C}$) 测得其表观粘度, 如图 4, 在 150°C 以内多糖溶液的粘度值基本稳定, 冷却后, 溶液粘度仍能恢复, 表明在高温下多糖溶液不会降解。它的结构类似物结冷胶的水溶液对温度敏感, 在高温和低温下均能形成性能不同的凝胶^[7], 而相比于黄原胶而言, 耐温极限值提高了近 30°C , 这一特征对于石油开采中作为采油驱动剂的使用是难能可贵的。

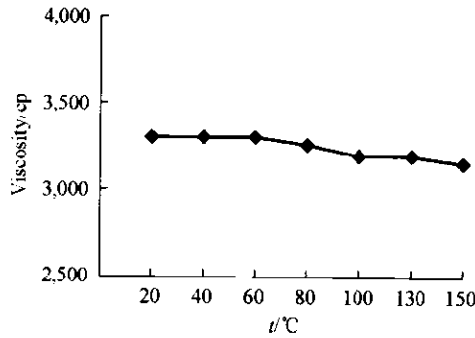


图 4 温度对 PS-238 溶液表观粘度的影响

2.5.2 pH 对 PS-238 溶液表观粘度的影响: 如图 5 所示, 在 pH2.0 ~ 13.0 的范围内, 多糖溶液的粘度基本不随 pH 的变化而变化, 在偏碱环境下, 表观粘度略有下降。因此, 多糖溶液有很好的耐酸碱性。在同一 pH 值条件下, 1% 的多糖溶液在 25℃ 放置不同的时间, 测定其表观粘度, 如图 6 所示, 无论在偏酸还是偏碱的环境中, 多糖溶液表观粘度受放置时间的影响都很小。作为增稠剂, 它的增稠效果不受环境本身酸碱度的影响, 表现出优良的品质。相比于结冷胶的应用 pH 范围 3.5 ~ 8.0^[7], PS-238 具有更强的耐酸碱性。

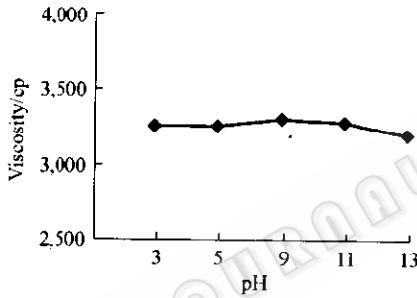


图 5 pH 对 PS-238 溶液表观粘度的影响

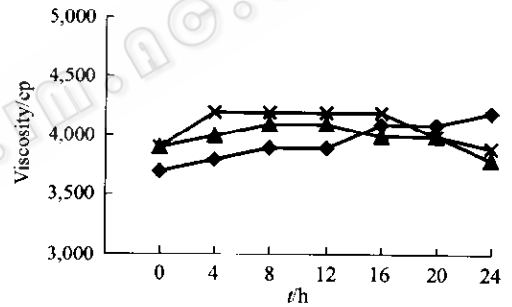


图 6 PS-238 溶液表观粘度与放置时间的关系
—◆— pH=3, —×— pH=8, —▲— pH=11

2.5.3 盐离子种类和浓度对 PS-238 溶液表观粘度的影响: 室温下, 考察 KCl、NaCl、CaCl₂、MgCl₂ 和 FeCl₃ 及其浓度对 1% PS-238 溶液表观粘度的影响, 结果如表 1 所示 K⁺、Na⁺ 的加入对增大粘度有协同效应, 其中 K⁺ 的效果更为明显, 随着加入量的增加, 多糖溶液粘度稍有下降; Ca²⁺、Mg²⁺ 的加入降低了多糖溶液的粘度, 且随着离子浓度的增加, 粘度逐渐下降; Fe³⁺ 则对多糖溶液的粘度影响较大, 随着离子强度的增加, 粘度明显下降。推测是由于不同的金属离子对多糖分子之间的静电引力影响不同造成的^[8], 一价离子能增强这种引力作用, 二价、三价离子减弱静电引力作用, 导致粘度的下降, 详细的机理还有待于进一步的研究。

表 1 金属离子种类和浓度对 PS-238 溶液表观粘度的影响

粘度/cp	0	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%	1.0%
KCl	3,300	5,400	5,300	5,100	5,100	5,000
NaCl	3,300	3,500	3,300	3,200	3,200	3,000

续表 1

CaCl ₂	3, 300	3, 000	2, 800	2, 600	2, 500	2, 500
MgCl ₂	3, 300	3, 100	3, 000	2, 900	2, 800	2, 600
FeCl ₃	3, 300	2, 900	2, 400	2, 300	2, 100	2, 000

3 结论

PS-238 是由葡萄糖、甘露糖、鼠李糖和葡萄糖醛酸主要通过 (1→3) 和 (1→4) 糖苷键连接的杂多糖。其溶液具有良好的流变学性能, 抗高温、耐酸碱, 流体呈非牛顿假塑性; K⁺、Na⁺ 对多糖溶液的粘度有促进作用, Ca²⁺、Mg²⁺ 则有负面影响, Fe³⁺ 影响较大。基于以上的优越性能, 使它具有应用于石油钻井工业中的泥浆控制的潜力^[1]; 同时它的悬浮、增稠功能有望作为新型添加剂应用于混凝土工业中, 改善水泥的可塑性, 悬浮量以及流动特性^[9]。

参考文献

- [1] Kang K S, Veeder G T. US4342866.
- [2] 李 莎, 徐 虹, 石宁宁. 食品与发酵工业, 2004, 30 (12): 6~9.
- [3] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科技出版社, 1987.
- [4] 徐佩弦. 高聚物流变学及其应用. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [5] 文 一, 赵国华. 中国食品添加剂, 2003, (3): 49~52.
- [6] 冀颢之, 杜连祥. 微生物学通报, 2003, 30 (5): 15~19.
- [7] 乔 敏, 刘士清. 云南大学学报, 1998, 20 (4): 116~118.
- [8] Tako M, Kiriaki M. Agric Biol Chem, 1990, 54 (12): 3079~3084.
- [9] Allen F L, Best G H, Lindroth T A. EP0290198B1.