

# 土壤杆菌sp. S-1231胞外多糖的流变学性能研究

俞南雄 史志敬 王先极

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从北京地区土样中分离到一株土壤杆菌 *Agrobacterium* sp. S-1231。在适宜条件下, 经4天培养, 它能以糖类为底物产生 24g/L胞外多糖。在相同浓度时, 该多糖能产生比黄单胞菌多糖Kelzan更高的粘度。0.2%、0.5%和1.0%该多糖的粘度分别是840、5200和15000 cp (Brookfield LVF粘度计, 6rpm)。除具有良好的剪切稀化性能及在广范pH内呈现极好的稳定性外, 它还可与高浓度盐溶液配伍并呈现与在淡水中相似的剪切稀化性能。特别是它还具有可与阳离子染料配伍而不生成沉淀的特性。与其他微生物多糖不同, 在65℃前, 该多糖的粘度维持恒定, 但升至很窄的温度范围70—75℃间, 粘度急剧下降。

**关键词** 胞外多糖; 土壤杆菌; 流变学性能

微生物多糖已发展成为一类新的发酵产品。一些微生物多糖之所以有用, 主要是由于它们具有一些独特的性能<sup>[1,2]</sup>。

我们在筛选适宜的微生物以产生具有特殊性能多糖的研究中, 从北京地区土样中分离到一株土壤杆菌, 它能利用糖类为底物产生大量的胞外多糖。流变学性能研究表明, 该多糖具有一些特殊性能。包括在低浓度和低剪切速率时呈现高粘度, 剪切稀化, 对pH变化的稳定性, 对高浓度的盐溶液特别是阳离子染料的可配伍性等。因而表明了该多糖在染料和许多其他工业上的应用潜能。本文主要报道该多糖的这些特性。

## 材料和方法

### (一) 菌株

菌株 S-1231 分离自北京地区采集的土样中。分类研究表明, 该菌株为土壤杆菌 (*Agrobacterium*)。

### (二) 培养基和培养条件

培养基组分(g/L): 蔗糖 40, 玉米浆 0.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.05, 和1ml盐溶液。盐溶液的成分如下 (mg/L):  $\text{CuSO}_4$  15,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  30,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  60,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  15,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  30, pH7.5。

500ml三角瓶装 100ml 培养基, 121℃ 灭菌30min。每瓶接入 5 ml 生长于相同培养基上的培养液, 于30℃、200r/min摇床上培养 4 天。

### (三) 多糖提取

发酵液用2体积水稀释, 于20000×g、10℃ 离心 40min 以除去细胞。于上清液中加入 1% NaCl, 边搅拌边加入 1.5 体积乙醇。过滤收集沉淀, 沉淀再用少量乙醇洗涤 2 次。干燥后称重, 得多糖制品 PS-1231, 此制品用于多糖的流变学性能研究。

### (四) 粘度测定

粘度测定采用Brookfield LVF旋转粘度计 (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., U.S.A), 分别用 转速 6、12、30和60rpm测定。

本文于1988年9月10日收到。

国家科委生物工程开发中心对本工作给予资助, 张钦同志参加部分工作, 特此致谢。

### (五) 黄单胞菌多糖

用于比较研究的黄单胞菌多 Kelzan (工业级) 为美国 Kelco 公司产品。

## 结 果 和 讨 论

### (一) 多糖的产生

按本文所述培养条件, 于产多糖培养基中接入生长于相同培养基上的 5 ml 培养液。在培养过程中培养液粘度迅速增加, 发酵终了时(4 天)培养液粘度高达 4700cp (60rpm), 甚至在倒拿摇瓶时液体亦不流动。用乙醇沉淀法提取多糖, 1 L 发酵液提得多糖 24g。该制品的元素分析结果如下: C: 38.3%, H: 5.6%, N: 0.5%。这与报道的纯化的黄单胞菌多糖的元素分析结果较为相似<sup>[8]</sup>。

### (二) 多糖浓度与粘度的关系

测定了 PS-1231 在蒸馏水中不同浓度时的粘度, 并与黄单胞菌多糖 Kelzan 进行了比较。结果示于图 1。如图所示, 在各

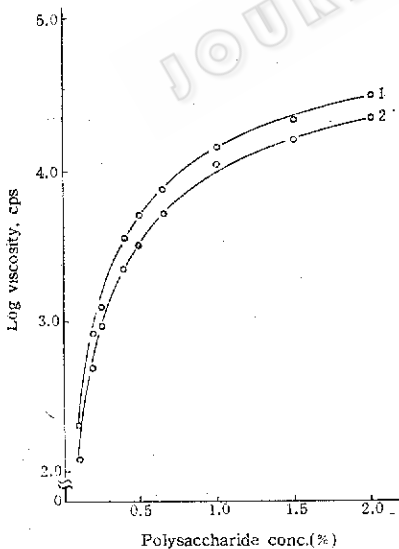


图 1 多糖浓度与粘度的关系

Fig.1 Viscosity vs. polysaccharide concentration  
粘度用 Brookfield LVF 粘度计在 6 rpm 下测得  
Viscosities were measured by a Brookfield LVF viscosimeter at a rotation speed 6 rpm  
1. PS-1231, 2. Kelzan

不同浓度 PS-1231 的粘度均高于 Kelzan。据 Slodki<sup>[1]</sup> 等, 评价黄单胞菌多糖性能的主要指标之一是其在低浓度 (不高于 0.25%) 时的粘度。在低浓度 0.1%、0.2% 和 0.25% 时, PS-1231 的粘度分别是 200、840 和 1290cp, 而 Kelzan 分别是 120、490 和 750cp。在粘度谱 (图 2) 中, 更清楚地表明了 PS-1231 有更好的增粘性和剪切稀化性能。

### (三) PS-1231 多糖的粘度谱

从 PS-1231 在不同浓度时的粘度谱 (图 2) 中可看出, 在相同浓度时, PS-1231 的稠度均高于 Kelzan; 在 0.5% 和 0.2% 时, 由于其直线斜率的绝对值大于 Kelzan, 表明 PS-1231 有比 Kelzan 更好的剪切稀化性能<sup>[4]</sup>。

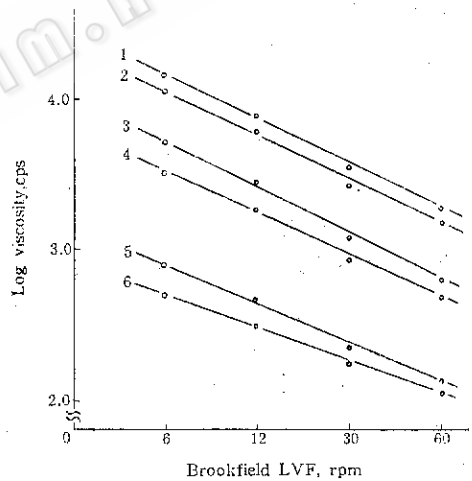


图 2 PS-1231 和 Kelzan 在蒸馏水中的粘度谱  
Fig.2 Viscograms of PS-1231 in distilled water, compared with Kelzan

1. 1.0% PS-1231, 2. 1.0% Kelzan, 3. 0.5% PS-1231, 4. 0.5% Kelzan, 5. 0.2% PS-1231, 6. 0.2% Kelzan

图 3 为发酵原液及其稀释液的粘度谱。从图中可看出, 它们具有与提取多糖水溶液相似的剪切稀化性能, 因而在某些工业应用中可直接采用未提取的多糖发酵液。

### (四) 与高浓度盐溶液的可配伍性

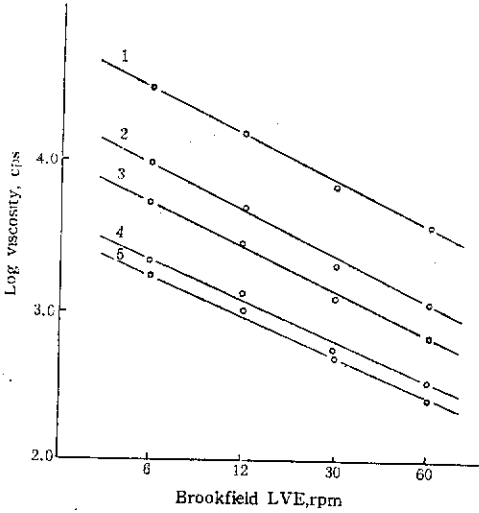


图3 发酵液及其稀释液的流变学性能

Fig.3 Rheology of fermentation broth and its dilutions

发酵液：水 Fermentation broth: water(v/v)

1. 1:0, 2. 1:1, 3. 1:2, 4. 1:3, 5. 1:4

为了更好地了解PS-1231的特性，我们以Kelzan为对照，分别测定了它们在蒸馏水、自来水、海水和高浓度盐溶液(36% NaCl, 26% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O及15% CaCl<sub>2</sub>)中的粘度。由表1的结果可看出，无论在低剪切速率(6 rpm)或高剪切速率(60rpm)时，PS-1231的粘度均高于Kelzan。在低

表1 PS-1231和Kelzan在不同水溶液中的粘度比较  
Table 1. Comparison of viscosities of PS-1231 and Kelzan in various aqueous solutions

溶剂 Solvents	PS-1231 粘度 Viscosity (cps)		Kelzan	
	6rpm	60rpm	6rpm	60rpm
Distilled water	4 800	580	2 500	360
Tap water	5 000	670	2 400	400
Sea water	5 300	700	2 300	400
36% NaCl	6 100	820	2 900	480
26% MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 700	760	2 500	410
15% CaCl	5 700	750	2 300	410

多糖浓度0.5%，所有样品均于相同条件下高速搅拌溶解

Polysaccharide concentration 0.5%. All samples were dissolved in same condition in a high speed mixer

剪切速率时，PS-1231在各种水溶液中的

粘度约为Kelzan的两倍。PS-1231溶于海水和高浓度盐溶液时，粘度不但没有降低反而有所增加，且其溶液呈现与在淡水中相似的剪切稀化性能(见图4)。另外，PS-1231在海水和高浓度盐水中能很好地溶胀，不象Kelzan，需要高速搅拌来促使其溶胀和分散。

PS-1231还可溶于其他多种高浓度盐溶液，表2列出了PS-1231能在其中很好溶解的一些高浓度盐溶液，表中所示的浓度并不表示PS-1231能在其中溶解的极限值。溶液于室温下放置一周均未观察到胶凝或沉淀现象，表明这些体系是稳定的。

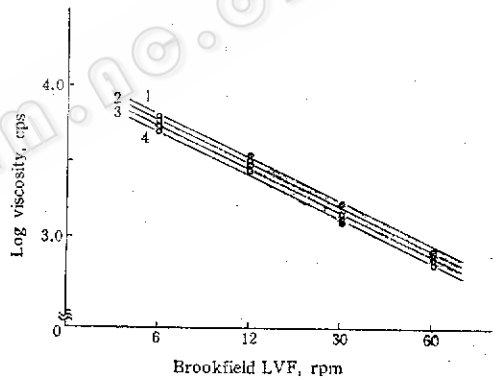


图4 PS-1231在高浓度盐水和海水中的流变学性能  
Fig.4 Rheology of PS-1231 in high level of salts and sea water

多糖浓度Polysaccharide conc. 0.5%

1. 36% NaCl, 2. 26% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 15% CaCl<sub>2</sub>, 3. Sea water, 4. Tap water

表2 PS-1231能溶于其中的高浓度盐溶液  
Table 2 Solutions of high level of salts soluble for PS-1231

盐类 Salts	盐浓度 Salt conc. (%)	盐类 Salts	盐浓度 Salt conc. (%)
NaCl	36	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22
NaN <sub>3</sub>	40	CaCl <sub>2</sub>	32
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	55
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	20	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	26
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10	MgCl <sub>2</sub>	36
NH <sub>4</sub> Cl	30	ZnCl <sub>2</sub>	40
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	65	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	20

(五) 粘度不受pH影响

测定了广泛pH范围内PS-1231多糖的粘度。如图5所示, PS-1231多糖的粘度几乎不受pH的影响。

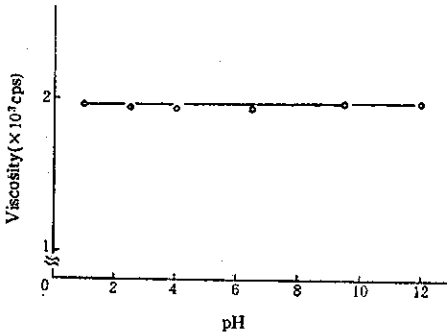


图5 pH对PS-1231粘度的影响  
Fig.5 Effect of pH on viscosity of PS-1231 solution

多糖浓度Polysaccharide conc. 1.0%, 于1.0%NaCl溶液中in presence of 1% NaCl

(六) 温度对粘度的影响

测定了1%多糖溶液(溶于1%NaCl溶液中)在4—95℃范围内的粘度变化情况。溶液温度分步上升,同时用Brookfield LVF粘度计测定粘度。如图6结果所示,在65℃以前溶液的粘度几乎恒定不变,当温度升至70—75℃时,粘度急剧下降,就象到达了“熔点”突然“熔化”了一样。到80℃时,溶液粘度接近于零。此后,该低粘度一直继续到95℃。我们知道,一些多糖如黄单胞菌多糖<sup>[5]</sup>、PS-7<sup>[6]</sup>和S-194在相当高的温度范围内,溶液粘度基本不受温度的影响,另一些多糖如Zanflo<sup>[7]</sup>和Succinoglucan其粘度随温度的升高而逐渐下降。PS-1231多糖的粘温度在很窄的温度范围内急剧下降的特性是十分有趣的。

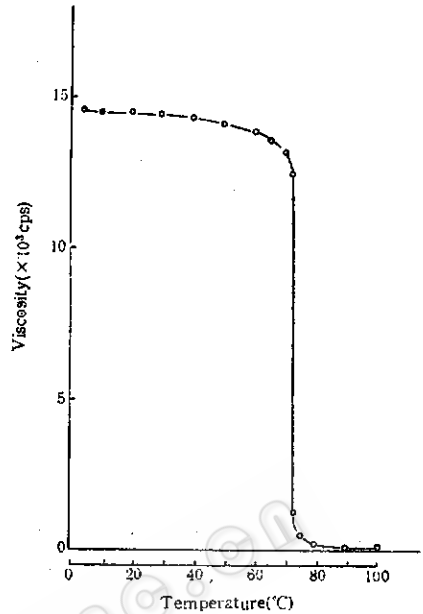


图6 温度对PS-1231溶液粘度的影响  
Fig.6 Effect of temperature on viscosity of PS-1231 solution

多糖浓度Polysaccharide conc.1.0%, 于1.0% NaCl溶液中in presence of 1% NaCl

(七) 与阳离子染料的可配伍性

PS-1231另一个显著的特点是与阳离子染料的可配伍性。阴离子多糖如黄单胞菌多糖和其他含糖醛酸的酸性多糖极易与阳离子染料如亚甲基蓝反应而生成絮状沉

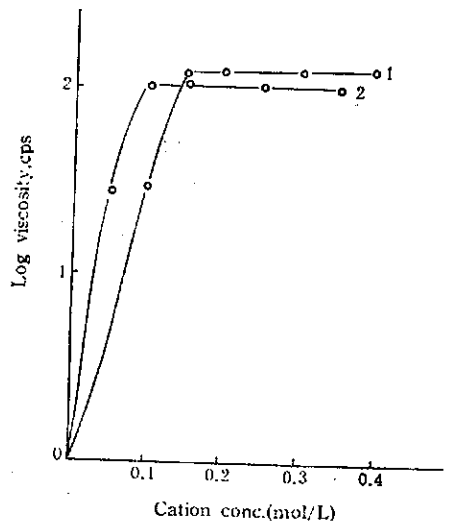


图7 一价、二价金属离子对恢复PS-1231-亚甲基蓝溶液粘度的影响

Fig.7 Effect of monovalent and divalent cations on restoring viscosity to PS-1231-methylene Blue solutions  
1. Na<sup>+</sup> 2. Mg<sup>2+</sup>

淀, 因而限制了其在某些工业中的应用。但PS-1231能在很广泛的pH范围内与阳离子染料配伍而不生成沉淀。

PS-1231的无离子水溶液同样与阳离子染料生成沉淀, 但在沉淀体系中加入少量盐类如NaCl就能使沉淀溶解而恢复溶液的粘度。图7反映了一、二价金属离子对恢复PS-1231—亚甲基蓝溶液粘度的影响。随着金属离子浓度的增加, 溶液逐渐

恢复了粘度, 这可能是金属离子浓度的增加增强了亚甲基蓝对多糖反应中心的竞争, 从而恢复了溶液的粘度。PS-1231的这一特性十分类似于著名的细菌杂多糖Zanflo<sup>[7]</sup>。Zanflo已在涂料工业中建立了突出的应用, 并在其他应用领域里显示极好的应用前景。PS-1231的开发也将在相应的领域里建立起重要的应用。

### 参 考 文 献

- [1] Slodki, M.E. and Cadmus, M.C.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 23: 19—54, 1987.
- [2] Paul, F. et al.: *Biotech. Adv.*, 4: 245—259, 1986.
- [3] Kennedy, I.F. et al.: *Carbohydrate Polymers*, 1: 56—66, 1981.
- [4] Whitcomb, P.J. et al.: In "Extracellular Microbial Polysaccharides", Sandford, P.A. & Laskin, A. eds., ACS symp. Ser., No. 45, American Chemical Society, D.C., pp. 160—173, 1977.
- [5] Cottrell, I.W. and Kang, K.S.: *Develop. Ind. Microbiol.*, 19: 117—131, 1978.
- [6] Kang, K.S. et al.: Ref. 7, pp. 220—230, 1977.
- [7] Kang, K.S. et al.: *ibid.* pp. 211—219, 1977.

## RHEOLOGICAL PROPERTIES OF THE EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE FROM AGROBACTERIUM SP. S-1231

Yu Nanxiong Shi Zhijin Wang Xianji

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A strain of *Agrobacterium* sp. S-1231 was isolated from specimen of soil of Beijing area. It was found to produce about 24 grams of extracellular polysaccharide per liter from sugar-containing substrate in 4 days' cultivation. At same concentrations, the polymer produced higher viscosity than that of xanthan gum (Kelzan). Viscosities of 0.2%, 0.5% and 1.0% of the polymer were 840, 5200 and 15000 cp respectively, measured with a Brookfield LVF viscosimeter at 6 rpm. Besides having pseudoplastic rheological properties and the excellent stability towards pH, it had unusual compatibility with high levels of salts and provided sheart-hinning properties similar with that in fresh water. Moreover, it was also compatible with cationic dyes without precipitation. Unlike other microbial polysaccharides, viscosities of the polymer kept constant before 65°C, and decreased sharply in a narrow range of temperature between 70—75°C.

### Key words

Extracellular polysaccharide; *Agrobacterium*; rheological properties