

齐整小核菌胞外多糖的研究*

刘洪灿 任永娥 陈吉榛 淡家林

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 鉴定了一株产胞外多糖的齐整小核菌, 经纸层析、旋光度和红外光谱研究表明, 该菌产生的多糖是由葡萄糖按 β -键形成的多聚糖, 可耐受高温、高盐和较广范围的pH, 具良好的增粘性和剪切稀释性能。

关键词 齐整小核菌; 胞外多糖

小核菌多糖是由某些半知菌类, 主要是小核菌属的某些种产生的胞外多糖^[1], 该多糖具有在低浓度下呈现高粘度及特殊的流变学性能而被开发成工业产品, 主要用于三次采油及清洗石油管道等^[2-4]。有报道称该多糖在高温高盐条件下用于促进三次采油效果优于黄单胞菌多糖, 在石油工业市场上有一定竞争能力^[5]。我们分离到一株齐整小核菌, 在适宜条件下可产生大量胞外多糖。本文报道该菌菌种鉴定、多糖组份及流变学性质的研究结果。

材料与方 法

1. 菌种: 由分离自茉莉花白绢病的小核核移植在PDA斜面上, 30℃培养萌发菌丝。

2. 培养基与发酵条件

(1) 菌株保存在PDA(pH5.0)斜面上。

(2) 发酵培养基(%): 葡萄糖 3.0; NaNO₃ 0.3, K₂HPO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.05, KCl 0.05, 酵母膏 0.5, pH4.7 ± 0.2。

(3) 发酵条件: 在16L NBC自控罐中, 装液量10L, 加0.015%豆油作消泡剂, 接种量5%, 28℃ 0.1MPa罐压, 350r/min搅拌, 培养4日。

3. 多糖提取: 发酵液 → 稀释 → 调pH7.0 → 80℃水浴30min → 匀浆2min → 1.5000r/min离心40min → 向上清液中加入1.0%KCl及1:1异丙醇, 沉淀 → 异丙醇洗二次 → 60℃真空干燥 → 样品。

以上样品用于流变学性质测定, 上述多糖再溶解 → 对无离子水透析2日 → 冷冻干燥 → 分析样品。

4. 分析方法

(1) 元素分析: Haratus CH快速分析仪。

(2) 组份分析: 用1mol/L H₂SO₄水解10小时, 中和后作纸层析, 用正丁醇: 吡啶: 水(6:4:3)展开, 氨性硝酸银显色^[6]。

(3) 红外光谱: 用Carlzeiss JENA Specord 751R红外光谱仪测定。

(4) 旋光度: Perkin-Elmer 241旋光仪测定。

(5) 粘度: Brookfield LVT粘度计测定。

结 果 与 讨 论

(一) 菌种鉴定

在平皿内培养基中心接种一个成熟菌核, 30℃培养。镜检菌落外围新生菌丝, 宽为4.5—9μm, 有隔、透明; 在隔处具有明显锁状联合, 常在隔的一侧伸出; 第二次分枝与原菌丝较贴近(角度小); 第三、四次分枝宽仅1.5—2.5μm, 分枝角度大, 没有锁状联合。根据Stevens(1931)^[7], West(1961)^[8], CMI(1974)^[9]等描述, 该菌株属无孢目(Mycelia sterila)小核菌属(*Sclerotium* Tode ex Fr.)将该菌株(01)与Stevens描述的*Sclerotium rolfsii*进行了比较, 结果见表1。

* 国家“七五”攻关项目

表 1 菌株 01 与齐整小核菌特征比较

菌丝	01 菌株	齐整小核菌
	细丝束状及疏絮状	被卷丛毛状, 致密, 非绳束状
菌核	深褐色, 数量较多, 平均每皿有较小菌核 30.3 个; 表面光, 偶有小坑, 直径 $0.5-1 \times 2-2.5\text{mm}$, 在培养基表面散生或丛生	浅粉黄-橄榄褐-丁香褐; 数量多, 表面光, 较小
发芽	自菌核向外伸出细丝束或菌丝	自菌核向外伸出菌丝

据此, 可将菌株 01 定为: *Sclerotium rolfsii* Sacc., 即齐整小核菌。

(二) 理化性质

1. 元素分析: 结果表明 C 44.07%, H 6.14%, N 小于 0.3%, 符合六碳糖 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ 中 C, H 比率, 说明该多糖由单个六碳糖组成。

2. 组份分析: 完全酸水解样品经纸层析, 结果表明只有一个斑点, 与标准葡萄糖的 R_f 值相同。证明该多糖是由单个葡萄糖聚合而成。

3. 旋光度: 在水溶液中 $[\alpha]_D^{25}=0.9$, 在 1mol/L NaOH 溶液中 $[\alpha]_D^{25}=1.4$, 如此低的旋光度表明多糖结构中配键型主要是 β -键型。

4. 红外光谱(图 1)测定表明该多糖在 3400cm^{-1} , 2900cm^{-1} , 1650cm^{-1} 及 $1000-1100\text{cm}^{-1}$ 处有特征性吸收峰, 与国外报道相似, 也表明在其结构中多为 β -键连接。

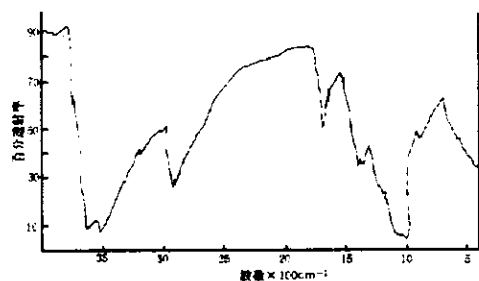


图 1 小核菌多糖的红外吸收光谱图

5. 多糖的流变学性质

(1) 浓度与粘度的关系: 小核菌多糖在低浓度下, 呈现出较高的粘度, 并表现出与黄单胞菌多糖相似的性质(图 2)。

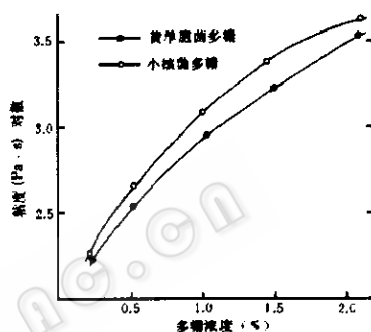


图 2 多糖浓度与粘度的关系

(2) 假塑性: 该多糖溶液在不同的剪切速率下表现出较好的剪切稀释性能(图 3)。

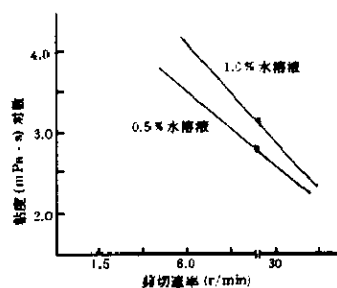


图 3 剪切速率对多糖粘度的影响

(3) 对 pH 及热的耐受性: 1% 多糖溶液分别调 pH 至 2—13, 然后在 30r/min 测定粘度(图 4), 表明在 pH 2—12 范围内, 多糖水溶液粘度不受影响。pH 超过 12, 则溶液粘度急剧下降。因强碱破坏多糖在水溶液中构象, 导致粘度下降。多糖溶液分别加热到不同温度 ($20-90^\circ\text{C}$) 并降至 25°C , 测定粘度, 发现溶液粘度并无明显下降, 说明该多糖水溶液具有相当大的耐热性。

(4) 在各种水溶液中的粘度特征: 将 0.5% 多糖分别溶解在蒸馏水、自来水、海水及 4% NaCl

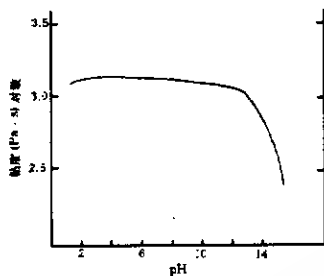


图 4 pH 对多糖水溶液粘度的影响

水溶液中,测定粘度。结果表明,在各种水溶液中,其增粘行为相差不大,而黄单胞菌多糖在海水中粘度下降。小核菌多糖在不同溶液体系中

也表现出较好的剪切稀释性能。该多糖具有诸多优良的理化性质,有可能应用于工业。

参 考 文 献

1. Halleck F E: US patent, 3301848, 1967.
2. Lecacheux D et al.: *Carbohydrate Polymers*, 6:477—492, 1986.
3. Heyraud A et al.: *Carbohydrate Research*, 107:123, 1982.
4. Rinaudo M et al.: *Carbohydrate Polymer*, 2:135, 1982.
5. Davision P et al.: *SPEJ* June, 353—362, 1982.
6. Trevelyan W E et al.: *Nature*, 166:444, 1950.
7. Stevens F L: *Mycologia*, 23: 204—222, 1931.
8. West E: *Phytopathology*, 51:108—109, 1961.
9. CMI: *Description of Pathogenic Fungi & Bacteria*, No. 410, 1974.

(1992-5-15 收稿)