

引用格式:刘建国,苏石晶,姚传凯,等.鞘氨醇单胞杆菌 *Sphigomonas* sp. WG 产威兰胶的提取工艺研究[J].山东科技大学学报(自然科学版),2019,38(2):44-48.

LIU Jianguo, SU Shijing, YAO Chuankai, et al. Study on extraction of Welan gum from *Sphigomonas* sp. WG[J]. Journal of Shandong University of Science and Technology (Natural Science), 2019, 38(2): 44-48.

# 鞘氨醇单胞杆菌 *Sphigomonas* sp. WG 产威兰胶的提取工艺研究

刘建国, 苏石晶, 姚传凯, 朱 虎

(中国石油大学(华东)化学工程学院, 山东 青岛 266580)

**摘 要:** 选用乙醇作为沉淀剂, 对鞘氨醇单胞杆菌 *Sphigomonas* sp. WG 产威兰胶的提取工艺进行设计和优化。考察了发酵液加热处理、固液分离方式、乙醇用量、沉淀温度和沉淀时间对威兰胶提取量的影响, 同时研究了 3 种不同干燥方式对威兰胶溶液粘度的影响。优化后的威兰胶醇沉工艺为: 发酵液与乙醇的混合比例为 1 : 5.5 (体积比), 乙醇沉淀温度和时间分别为 20 °C 和 6 h, 威兰胶沉淀物采用过滤分离, 最后经真空冷冻干燥获得成品。

**关键词:** 威兰胶; *Sphigomonas* sp. WG; 提取; 乙醇; 沉淀

中图分类号: TQ929<sup>+</sup>.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-3767(2019)02-0044-05

DOI: 10.16452/j.cnki.sdkjzk.2019.02.005

## Study on extraction of Welan gum from *Sphigomonas* sp. WG

LIU Jianguo, SU Shijing, YAO Chuankai, ZHU Hu

(College of Chemical Engineering, China University of Petroleum, Qingdao, Shandong 266580, China)

**Abstract:** The extraction process of Welan gum from *Sphigomonas* sp. WG was designed and optimized with ethanol as a precipitator. The influences of fermentation liquor heating treatment, solid-liquid separation method, ethanol dosage, precipitation temperature and time on Welan gum yields were investigated. In addition, the effects of three drying methods on the viscosity of Welan gum were also examined. The optimized extraction process was set as follows. The mixing ratio between fermentation liquor and ethanol was 1 : 5.5 (volume ratio), the precipitation temperature and time were 20 °C and 6 h respectively. Welan gum precipitation was separated by filtration, and the finished product of Welan gum was obtained by vacuum freeze-drying the samples.

**Key words:** Welan gum; *Sphigomonas* sp. WG; extraction; alcohol; precipitation

威兰胶是由产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)发酵生产的一种微生物多聚糖,由 D-葡萄糖、D-葡糖醛酸、D-葡萄糖和 L-鼠李糖组合成四糖单元,再以四糖单元为重复单位形成分子量不同的微生物多聚糖<sup>[1-3]</sup>。威兰胶具有高稳定性、高粘度、剪切稀释性等理化性质,在建筑材料和石油开采领域有着广泛的应用,同时在医药、日用化工、油墨和食品等行业中也存在较大的应用潜力<sup>[4-6]</sup>。

20 世纪 80 年代,美国 C. P. Kelco 公司在继黄原胶和结冷胶之后,研发出了威兰胶,并成为全球唯一的生产供应商。在国内,威兰胶的研究目前仍处于菌种筛选、发酵过程优化等初始阶段,但对于下游的威兰胶

收稿日期:2018-07-16

基金项目:国家高技术研究发展计划(“863”计划)青年科学家专题项目(2015AA020925)

作者简介:刘建国(1976—),男,山东临清人,教授,博士,主要从事生物分离工程和酶工程研究. E-mail: jianguoliu@upc.edu.cn

提取工艺研究相对较少。分离提取工艺是工业上获得威兰胶成品的关键工序,也决定着威兰胶产品的质量和生产成本<sup>[7-9]</sup>。

本研究从胶州湾海域筛选得到鞘氨醇单胞杆菌 *Sphingomonas* sp. WG 作为威兰胶发酵生产菌株,经发酵获得威兰胶发酵液<sup>[10]</sup>,采用乙醇作为沉淀剂,对 *Sphingomonas* sp. WG 产威兰胶的提取工艺进行了设计和优化,以提高威兰胶的提取效率和最终产品质量。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

鞘氨醇单胞杆菌<sup>[11]</sup>由作者实验室在胶州湾海域筛选获得,已保藏于中国典型培养物保藏中心(北京),保藏号为:CCTCC No. M2013161。

### 1.2 试剂

乙醇(体积分数 95%,工业级)、葡萄糖、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾和无水硫酸镁等购买于国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯。

### 1.3 培养基

葡萄糖 40 g/L,酵母膏 2 g/L,磷酸氢二钾 4 g/L,磷酸二氢钾 2 g/L,无水硫酸镁 0.1 g/L,调节 pH 为 7.0~7.2。

### 1.4 培养方法

将鞘氨醇单胞杆菌种子液以体积分数 5%转接至培养基中,在 32.5 °C、175 r/min 搅拌条件下发酵 72 h 得到黄色粘稠状的威兰胶发酵液。

### 1.5 拟优化的威兰胶醇沉工艺流程

根据文献[12-15]报道的威兰胶醇沉工艺的差异,本研究设计了拟优化的威兰胶醇沉工艺流程(如图 1 所示)。其中,对发酵液加热处理与否、固液分离方式、乙醇用量、沉淀时间和沉淀温度的优化,以最终的威兰胶提取量为依据;而对于干燥方式的选择,以威兰胶的粘度作为衡量产品质量的依据。

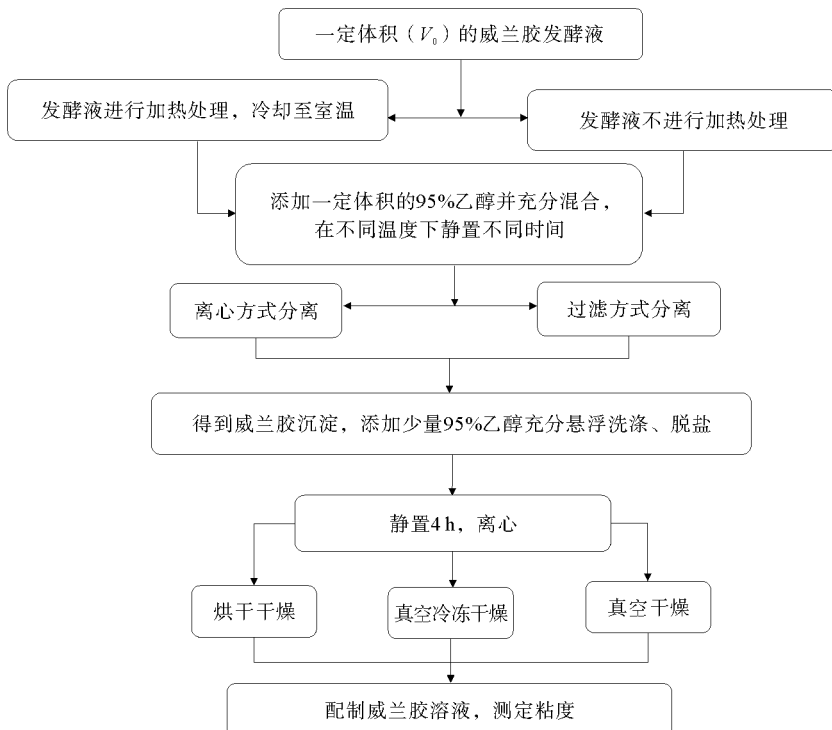


图 1 拟优化的威兰胶醇沉工艺流程

Fig. 1 Welan gum alcohol precipitation process to be optimized

### 1.6 威兰胶粘度测定

将干燥后的威兰胶产品进行粉碎研磨,收集可以通过 50 目(297  $\mu\text{m}$ )孔筛的威兰胶干粉,使用 SK-2 型分析天平准确称量 1.000 0 g 威兰胶,加入 199 mL 去离子水溶解,配制成质量浓度为 0.5% 的威兰胶溶液,使用 DV-E 型粘度计(4 号转子,30 r/min,25  $^{\circ}\text{C}$ )测定威兰胶溶液的表现粘度。

### 1.7 威兰胶提取量的计算方法

威兰胶提取量(g/L)=威兰胶干质量/发酵液的体积。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵液加热处理对威兰胶提取量的影响

能耗是工业生产成本的主要组成部分,降低能耗不仅可以使威兰胶的提取成本降低,同时也有利于威兰胶的进一步推广应用。另外,热激处理有可能改变发酵液中威兰胶分子的存在状态,对威兰胶的分离提取产生影响。因此,本实验首先考察了发酵液加热处理(85  $^{\circ}\text{C}$  加热 20 min)对威兰胶提取量的影响,实验结果如图 2 所示。

实验结果表明,在所考察的乙醇用量范围内,对发酵液进行加热和不加热处理所获得的威兰胶提取量基本相同,这说明对发酵液进行热激处理对威兰胶的提取量没有明显影响。考虑到对发酵液进行加热需要大量热能,增加了分离过程的能耗,因此取消对发酵液进行热激处理的环节,直接对发酵液进行乙醇沉淀。

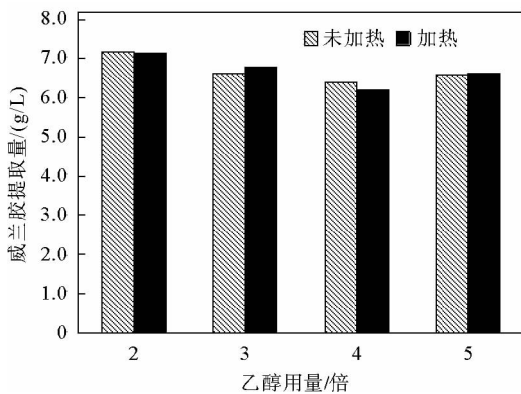


图 2 发酵液加热处理对威兰胶提取量的影响

Fig. 2 Influence of fermentation liquor heating treatment on Welan gum yield

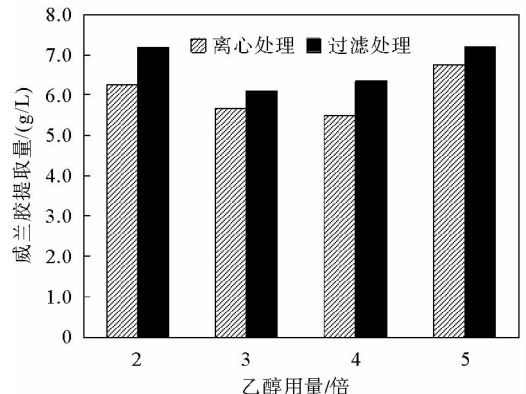


图 3 固液分离方式对威兰胶提取量的影响

Fig. 3 Influence of solid-liquid separation method on Welan gum yield

### 2.2 固液分离方式对威兰胶提取量的影响

离心和过滤是工业生产中两种常用的固液分离方法。其中,过滤法的能耗较低,但速度较慢;而离心法的能耗偏高,但处理速度较快。为寻找一种较为合适的沉淀分离方式,本实验比较了过滤和离心两种方法对威兰胶提取量的影响,结果如图 3 所示。

图 3 表明,在乙醇用量相同的情况下,过滤操作获得的威兰胶提取量均大于离心处理所得的量。其原因可能是在离心过程中由于离心力的限制,导致少量威兰胶未能从上清液中沉淀下来,进而造成一定量的损失。为了尽可能多地提取威兰胶产品,最好用过滤方式进行固液分离操作。但考虑生产效率和成本,工业上仍建议采用离心分离工艺。

### 2.3 乙醇用量对威兰胶提取量的影响

乙醇沉淀法是微生物多糖分离提取的常用方法,其用量与发酵液本身的性质有关。不同菌株发酵生产的发酵液在微生物多糖的含量、粘度、理化性质等方面存在差异,这些因素都会影响乙醇的最佳用量。因此,本实验分别考察了乙醇用量为发酵液体积 1~6 倍时的威兰胶提取情况,结果如图 4 所示。

图 4 表明,当乙醇用量较少时,威兰胶的提取量随乙醇用量的增加而逐渐上升,在乙醇用量达到 5.5 倍时,威兰胶的提取量获得最大值,继续增加乙醇用量,威兰胶的提取量出现下降。在实验过程中我们还发现,当乙醇用量为发酵液体积的 2 倍以下(1 倍、1.5 倍)时,混合溶液会呈现浑浊状态,威兰胶很难形成有效的絮状沉淀。当乙醇用量超过发酵液体积 5.5 倍后,溶液的极性可能使威兰胶分子的结构发生变化,使其无法进行有效的沉淀,导致提取量呈现下降趋势。因此确定 95%乙醇的用量为发酵液体积的 5.5 倍。

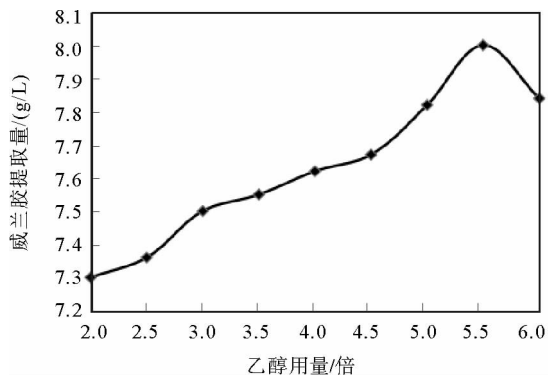


图 4 乙醇用量对威兰胶提取量的影响

Fig. 4 Influence of ethanol dosage on Welan gum yield

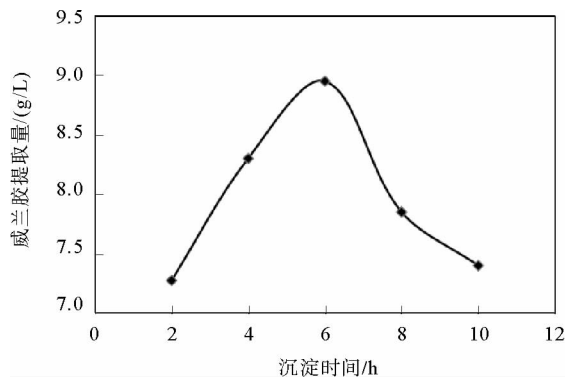


图 5 沉淀时间对威兰胶提取量的影响

Fig. 5 Influence of precipitation time on Welan gum yield

## 2.4 沉淀时间对威兰胶提取量的影响

乙醇沉淀威兰胶是威兰胶分子间相互作用聚集的过程,该过程需要一定的时间。本实验在乙醇用量为 5.5 倍发酵液体积的条件下,分别静置 2、4、6、8 和 10 h 进行沉淀,考察了沉淀时间对威兰胶提取量的影响,实验结果见图 5。

从图 5 可以看出,在乙醇加入的初始阶段,威兰胶的提取量随着沉淀时间的延长而增加。当沉淀时间达到 6 h 时,威兰胶的提取量获得最大值,继续延长沉淀时间,威兰胶的提取量开始下降。此现象说明如果沉淀时间过短,威兰胶分子无法充分聚集、导致沉淀不完全;反之,如果沉淀时间过长,可能会使得少量已经聚集的威兰胶分子从沉淀状态重新溶解,同样导致提取量降低。由此可见,威兰胶提取过程中的沉淀时间应在 6 h 左右为宜。

## 2.5 沉淀温度对威兰胶提取量的影响

沉淀温度是影响威兰胶分子间相互作用并最终影响其提取量的又一因素,因此本实验考察了沉淀温度分别为 4、10、20、30、40 和 50 °C 时的威兰胶提取量,实验结果如图 6 所示。

实验结果表明,在所考察的沉淀温度范围内(4~50 °C),威兰胶提取量随沉淀温度的增加先增加后降低,并在沉淀温度为 20 °C 时获得最大值。作者推测,温度过高可能使威兰胶在乙醇中的溶解度增大,致使威兰胶的提取量降低。因此,威兰胶的最佳沉淀温度为 20 °C。

## 2.6 干燥方式对威兰胶溶液粘度的影响

干燥是提取威兰胶产品的最后一个环节,其目的是脱除沉淀物中含有的乙醇和水分,不同干燥方式脱除水分的程度不同,对威兰胶分子结构造成的损害程度也有差异。因此,本实验考察了通风加热干燥(即烘干干

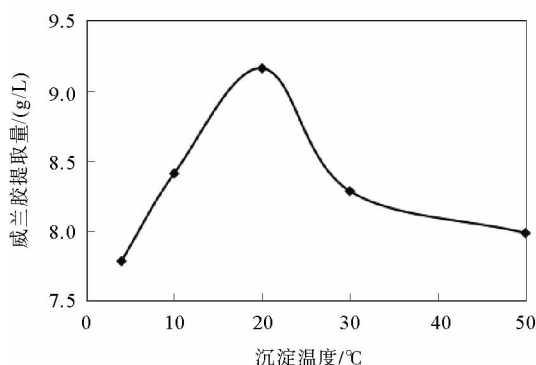


图 6 沉淀温度对威兰胶提取量的影响

Fig. 6 Influence of precipitation temperature on Welan gum yield

燥)、真空干燥和真空冷冻干燥对威兰胶溶液粘度的影响,实验结果列于表1。

表1 干燥方式对威兰胶溶液表观粘度的比较

Tab.1 Comparison of drying methods on the apparent viscosity of Welan gum solution

干燥方式	通风加热干燥	真空干燥	真空冷冻干燥
粘度/(mPa·s)	3 288±23	3 267±25	4 783±28

由表1可以看出,通风加热干燥和真空干燥得到的威兰胶溶液粘度基本相同,而真空冷冻干燥获得的威兰胶溶液的粘度比二者高出约45%。其可能原因是,在通风加热干燥和真空干燥过程中,水分损失较快、较多,甚至包括部分维持分子结构的结合水分子,导致威兰胶分子结构出现损伤,而在真空冷冻干燥过程中水分子升华缓慢,威兰胶分子结构受到的损伤较小。

### 2.7 优化后的威兰胶提取工艺

根据上述实验结果,获得的鞘氨醇单孢杆菌 *Sphingomonas* sp. WG 产威兰胶的最佳醇沉工艺如图7所示。

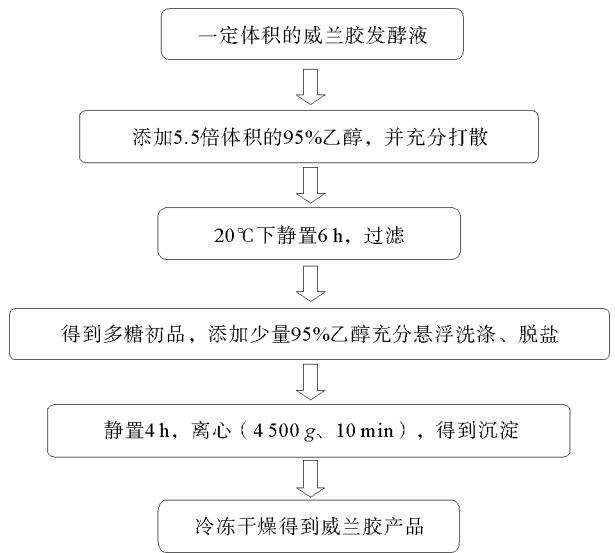


图7 优化后的威兰胶醇沉工艺

Fig.7 The optimized Welan gum alcohol precipitation process

### 3 结论

对鞘氨醇单孢杆菌 *Sphingomonas* sp. WG 发酵液中提取威兰胶的醇沉工艺进行了系统优化,考察了发酵液加热处理、固液分离方式、乙醇用量、沉淀时间及沉淀温度对威兰胶提取量的影响,同时研究了3种干燥方式对威兰胶溶液粘度的影响。研究表明:对发酵液进行加热处理不会增加威兰胶的提取量;相对于离心操作而言,过滤能够获得更高的威兰胶提取量;最佳的乙醇用量、沉淀时间和沉淀温度分别为发酵液体积的5.5倍(95%乙醇)、6h和20℃;真空冷冻干燥获得的威兰胶溶液的粘度比烘干干燥和真空干燥高出约45%。

### 参考文献:

[1]LI H,XU H,XU H,et al. Biosynthetic pathway of sugar nucleotides essential for Welan gum production in *Alcaligenes* sp. CGMCC2428[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2010,86(1):295-303.

[2]TAKO M,KIRAKI M. Rheological properties of Welan gum in aqueous media[J]. Agricultural & Biological Chemistry, 1990,54(12):771-776.

[3]ASUBIARO A,SHAH S N. Rheological and hydraulic properties of Welan gum fluids in straight and coiled tubings[J]. Journal of Fluids Engineering Transactions of the ASME,2008,130(8):920-926.

[4]许晓鹏,郑志永,朱莉,等. *Sphingomonas* sp. 生产威兰胶分批发酵动力学[J]. 食品与生物技术学报,2015,34(5):507-511. XU Xiaopeng,ZHENG Zhiyong,ZHU Li,et al. Study on Welan gum fermentation dynamics of *Sphingomonas* sp. [J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2015,34(5):507-511.

[5]CAMPANA S,ANDRADE C,MILAS M,et al. Polyelectrolyte and rheological studies on the polysaccharide Welan[J]. International Journal of Biological Macromolecules,1991,12(6):379-384.

[6]FIALHO A M,MOREIRA L M,GRANJA A T,et al. Occurrence,production,and applications of gellan:Current state and perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2008,79(6):889-900.

[7]曹花. 微生物多糖威兰胶的提取工艺研究[D]. 无锡:江南大学,2010:4-6.

- ing & Application, 2010, 39(3): 18-22.
- [7] DURRIEU F, FARCAS F, MOUILLET V. The influence of UV aging of a styrene/butadiene/styrene modified bitumen: Comparison between laboratory and on site aging[J]. Fuel, 2007, 86(10/11): 1446-1451.
- [8] NAVARRO F J, PARTAL P, MARTINEZ-BOZA F, et al. Thermo-rheological behaviour and storage stability of ground tire rubber-modified bitumens[J]. Fuel, 2004, 83(14): 2041-2049.
- [9] XIANG L, CHENG J, QUE G. Microstructure and performance of crumb rubber modified asphalt[J]. Construction & Building Materials, 2009, 23(12): 3586-3590.
- [10] 李廷刚, 李金钟, 李伟. 橡胶沥青微观机理研究及其公路工程应用[J]. 公路交通科技, 2011, 28(1): 25-30.  
LI Tinggang, LI Jinzhong, LI Wei. Micro-mechanism study and road engineering application of rubber asphalt[J]. Journal of Highway and Transportation Research and Development, 2011, 28(1): 25-30.
- [11] 朱浩然, 蔡海泉, 李峰, 等. 活性橡胶沥青胶结料微观结构分析[J]. 重庆交通大学学报(自然科学版), 2016, 35(4): 35-39.  
ZHU Haoran, CAI Haiquan, LI Feng, et al. Microstructure analysis of the reacted and activated rubber asphalt binder[J]. Journal of Chongqing Jiaotong University (Natural Sciences), 2016, 35(4): 35-39.
- [12] AL-MANSOB R A, ISMAIL A, YUSOFF N M, et al. Rheological characteristics of unaged and aged epoxidised natural rubber modified asphalt[J]. Construction and Building Materials, 2016, 102(1): 190-199.
- [13] 李波, 王静, 曹贵, 等. 废旧胶粉特性对橡胶沥青高温性能的影响机理[J]. 应用基础与工程科学学报, 2017, 25(2): 347-355.  
LI Bo, WANG Jing, CAO Gui, et al. Influence mechanism of crumb rubber characteristics on high-temperature performance for rubber modified asphalt binder[J]. Journal of Basic Science & Engineering, 2017, 25(2): 347-355.
- [14] 程培峰, 李艺铭, 李吉庭, 等. 橡胶沥青老化性能的试验研究[J]. 新型建筑材料, 2017, 44(3): 144-147.  
CHENG Peifeng, LI Yiming, LI Jiting, et al. Experimental research on aging properties of rubber asphalt[J]. New Building Materials, 2017, 44(3): 144-147.
- [15] WONG C C, WONG W. Effect of crumb rubber modifiers on high temperature susceptibility of wearing course mixtures [J]. Construction and Building Materials, 2007, 21(8): 1741-1745.
- [16] XIAO F, AMIRKHANIAN S N, SHEN J, et al. Influences of crumb rubber size and type on reclaimed asphalt pavement (RAP) mixtures[J]. Construction and Building Materials, 2009, 23(2): 1028-1034.
- [17] KÖK B V, ÇOLAK H. Laboratory comparison of the crumb-rubber and SBS modified bitumen and hot mix asphalt[J]. Construction and Building Materials, 2011, 25(8): 3204-3212.
- [18] DANTAS-NETO S A, FARIAS M M, PAIS J C, et al. Dense graded hot mixes using asphalt-rubber binders with high rubber contents[J]. Road Materials & Pavement Design, 2006, 7(1): 29-46.

(责任编辑:吕海亮)

## (上接第 48 页)

- [8] JASSON PE, WIDMALM G. Welan gum(S-130) contains repeating units with randomly distributed L-mannose and L-rhamnosyl terminal groups as determined by FABMS[J]. Carbohydrate Research, 1994, 256(2): 327-330.
- [9] MWN H, MORRIS E R. Solubility, solution rheology and salt-induced gelation of Welan polysaccharide in organic solvents [J]. Carbohydrate Polymers, 1995, 27(1): 23-36.
- [10] LI H, JIAO X, SUN Y W, et al. The preparation and characterization of a novel sphingon WL from marine *Sphingomonas* sp. WG[J/OL]. Scientific Reports, 2016, 6: 37899.
- [11] LI H, FENG Z M, SUN Y J, et al. Draft genome sequence of *Sphingomonas* sp. WG, a Weilan gum-producing strain [J/OL]. Genome Announcements, 2016, 4(1): e01709-15.
- [12] LOPES L, MILAS M, RINAUDO M. Influence of the method of purification on some solution properties of Weilan gum [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1994, 16(5): 253-258.
- [13] 刘莎. 微生物多糖的制备和应用研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2010: 3-5.
- [14] 周浩然. 微生物多糖威兰胶生产工艺的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009: 9-15.
- [15] 陈芳. 威兰胶生产工艺初探及流变特性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2007: 15-27.

(责任编辑:吕海亮)