

GB 28304-2012 中凝胶强度测定方法的优化

屠瀚超, 徐斌, 戴彦韵*

(上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘要: **目的** 优化检测方法, 探究可得然胶凝胶强度数据稳定, 相对标准偏差小的检测方法。**方法** 以可得然胶为材料, 对比制胶方法, 针对取样量、加热温度、冰水浴冷却时间、平行测定次数在单因素试验的基础上, 根据正交试验对各因素条件进行优化, 分析最优组合。**结果** 确定检测方法为取样量为 0.30~0.31 g, 加入 15 mL 现制的脱气水, 用微量取样药匙进行搅拌, 使悬浊液分散均匀, 沸水浴加热并维持其均匀度, 水浴加热 10 min 后, 取出在冰水浴中冷却 50 min, 做三次平行试验。**结论** 该方法相对标准偏差小, 数据稳定。且凝胶强度大于 $600 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的产品, 可用直径 0.4、0.5、0.6 cm 中任一款柱头进行测定。

关键词: 可得然胶; 凝胶强度; 正交试验; 相对标准偏差

Optimization of determination method of gel strength in GB 28304-2012

TU Han-Chao, XU Bin, DAI Yan-Yun*

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the detection method and explore the detection method with stable strength data and small relative standard deviation of Curdlan. **Method** Using Curdlan as the material, compare the glue making methods, optimize the sampling amount, heating temperature, ice water bath cooling time, and parallel measurement times based on single factor experiments, and analyze the optimal combination of each factor condition through orthogonal experiments. **Result** The determined detection method is to take a sample of 0.30-0.31 g, add 15 mL of freshly prepared degassed water, stir with a trace sampling spoon to evenly disperse the suspension, heat in a boiling water bath and maintain its uniformity, heat in a water bath for 10 minutes, then remove and cool in an ice water bath for 50 minutes, and conduct three parallel experiments. **Conclusion** This method has a small relative standard deviation and stable data. The column heads with diameters of 0.4 cm, 0.5 cm and 0.6 cm for products with gel strength greater than $600 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$ can be used for determination.

KEY WORDS: curdlan; gel strength; orthogonal experiment; relative standard deviation

0 引言

可得然胶是一种新型的微生物胞外多糖, 我国从 1999 年开始将可得然胶作为食品添加剂进行研究, 由于其 β -(1,3)-D 糖苷键连接形成的中性无支链胞外多糖, 具有三螺旋构象^[1-4], 使

得其独特的凝胶特性脱颖而出, 在 2006 年 5 月批准将可得然胶作为食品添加剂使用, 并制定了相关的标准以规范其质量发展。国内对可得然胶的研究起步较晚, 但是发展迅速, 因其抗冻融, 抗脱水等特性, 现已被广泛地使用于冷冻食品、肉制品中^[5-7]。但是近十年涌现出不同工艺生产的产品^[7-11]。在依据 GB

基金项目: 上海市质量监督检验技术研究院青年科技启明星项目 (QMX-2023-3-SP)

Fund: Shanghai Institute of Quality Supervision and Inspection Technology Youth Science and Technology Project (QMX-2023-3-SP)

*通信作者: 戴彦韵, 硕士, 高级工程师, 研究领域为食品添加剂检测技术、化妆品质量检测技术。E-mail: daiyy@sqi.org.cn

*Corresponding author: DAI Yan-Yun, Master, Senior Engineer, 381 Cangwu Road, Xuhui District, Shanghai 200233, China. Email: daiyy@sqi.org.cn

28304-2012 食品安全国家标准 食品添加剂 可得然胶》测定不同产品的凝胶强度项目时我们发现了以下几个问题：(1) 由于可得然胶不溶于水，在真空状态中爆完气后部分产品的胶体颗粒沉降，成胶后出现底部紧实而上部软烂的情况，使得检测结果偏高。(2) 胶体成型后仍有大气泡存在于胶体内部，影响其凝胶强度，使得检测结果偏低。(3) 不同厂家不同生产工艺的产品凝胶强度的结果平行性差，重复性较差。

本研究在现有的检测方法基础上对标准中的制备方法进行优化，旨在提高可得然胶凝胶强度检测方法的准确性，使标准的检测方法更好地适应新工艺生产的可得然胶产品，为市场监管提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

脱气水（实验室现制现用），可得然胶（市面上常见的五家不同生产厂家依次编号为 A-E）。

1.2 仪器与设备

均质机；真空干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）；电子天平（梅特勒-托利多集团）；水浴锅（JULABO）；微量药匙；组织分析仪（BROOKFIELD）。

1.3 方法

1.3.1 制胶方法比较

国标法：参照《GB 28304-2012 食品安全国家标准 食品添加剂 可得然胶》附录 A 中 A.3 的方法^[12]：取 0.3 g 样品于 15 mL 水中，用均质机在 3500 r/min 的转速下搅拌 5 min，将悬浮液转移至 18 mm×180 mm 的试管中，在真空状态下曝气 3 min，将试管迅速放入沸水浴中 10 min，在冷水中冷却 30 min，做三平行。

改进方法：将蒸馏水加热煮沸 5 分钟后，放入冰水浴中快速冷却（脱气水临用现制），取样至 18 mm×180 mm 的试管中，

加入 15 mL 现制的脱气水，用微量取样药匙进行搅拌，每搅拌 10 圈后向上抽提一次，使试管中的悬浊液上下分散均匀，搅拌 5 min，然后将试管放入水浴中，重复搅拌的操作至搅拌中明显感到黏滞感（搅拌有阻力）后，抽出药匙，计时水浴 10 min，取出在冰水浴中冷却做三平行。

1.3.2 凝胶强度测定

取胶体后切下距离底部 20-30 mm 处的一段 10 mm 的凝胶，用质构仪测定，测试触发点负载 4 g，距离为 9 mm，速度为 4 mm/min 读取凝胶破裂时的拐点（峰）值 F。

结果计算：

$$x = \frac{F}{\pi r^2}$$

1.3.3 制胶单因素实验

分别考察取样量（0.28、0.29、0.30、0.31、0.32 g），加热温度（80、85、90、95、100℃），冰水浴冷却时间（20、30、40、50、60 min）及平行次数（2、3、4、5、6 次）对凝胶强度及实验数据相对标准偏差的影响。

1.3.4 正交试验

在单因素试验的基础上选择 A（称样量），B（加热温度），C（冷却时间）和 D（平行次数）为考察因素，以相对标准偏差为考察指标，按照正交设计表安排实验，因素水平如表 1 所示，共进行 9 组试验。

1.3.5 不同规格柱头对凝胶强度测定的影响

选用三种常见的不同柱头规格（0.4、0.5、0.6 cm）对不同凝胶强度的可得然胶产品进行测定，研究其对凝胶强度和相对标准偏差的影响。

1.3.6 数据处理与分析

采用 SPSS22 数据分析软件对变化显著性分析。使用 Excel 2010 软件对数据进行统计分析并绘制图表。

表 1 正交试验因素水平设计
Table 1 Orthogonal experimental factor level design

水平	A 称样量 (g)	B 加热温度 (°C)	C 冷却时间 (min)	D 平行次数 (次)
1	0.30	90	40	3
2	0.31	95	50	4
3	0.32	100	60	5

2 结果与分析

2.1 制胶方法对凝胶强度的影响

在实际检测中我们发现，如图 1 所示。使用国标法制备胶体，因可得然胶试样在水中形成的是悬浮液，在曝气 3 min 后，不同产品胶粒都出现了一定程度的沉降，制成的胶体上下不均匀，部分产品甚至出现了断裂等现象，导致凝胶强度无法测定，同

产品间的凝胶强度数据差异较大。在使用改进方法制胶后，得到的胶体上下均匀。在截取的胶体横截面上，国标法制得的胶体中含有较大的气孔，对凝胶强度测定影响较大，改进方法制得的胶体几乎无气孔，对凝胶强度测定影响小。由图 2 和表 2 可得，改进后的方法使得成胶更均匀，防止了胶粒沉降导致的数据偏高，同时相对标准偏差明显减小，减少了因制胶方法带来的检测误差，后续实验选择改进方法制胶并进一步进行优化。

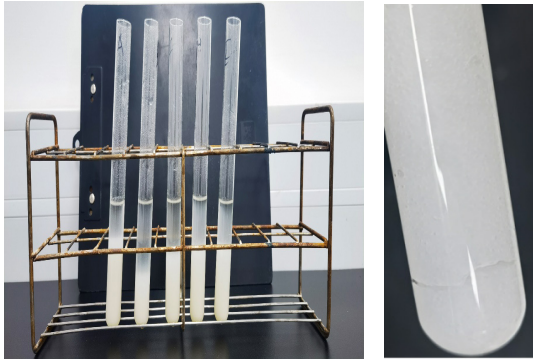


图 1 国标法制备可得然胶时出现的问题

Fig.1 Problems encountered during the preparation of Curdlan using the national standard method

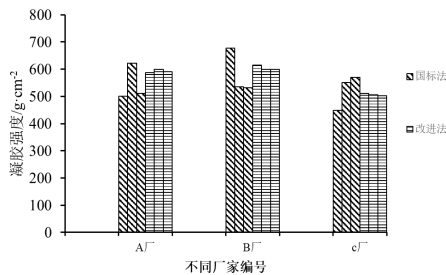


图 2 不同制胶方法测定不同产品的结果

Fig.2 Results of different adhesive methods for measuring different products

表 2 不同制胶方法对凝胶强度测定的影响

Table 2 Influence of different gel making methods on gel strength determination

厂家	A 厂		B 厂		C 厂	
制胶方法	国标法	改进法	国标法	改进法	国标法	改进法
凝胶强度平均值 (g·cm ⁻²)	545	593	581	605	522	507
相对标准偏差 RSD (%)	12.3	1.1	14.3	1.5	12.5	0.8

2.2 单因素实验结果

2.2.1 称样量对凝胶强度的影响

无论是 GB 28304-2012 还是 QB/T 4322-2012 的附录中均规定取样量为 0.3 g, 加入 15 mL 水, 其目的都是配制成 2% 的悬浮液。但在实际操作中我们很难准确地达到称样量 0.3000 g。本实验通过改变称样量, 实验结果如图 3 所示。随着称样量增大, 可得然胶的凝胶强度显著增强; 当称样量超过 0.31 g 后凝胶强度增强趋势变缓, 0.30~0.31 g 之间存在一个“平台期”, 在该取样量的范围内, 凝胶强度基本稳定。不同厂家生产工艺的可得然胶产品在 0.30 g 附近存在一个“跃迁位点”, 结合可得然胶其他质量指标考虑, 该现象可能与产品中可得然胶的含量差异有关, 含量越高则配制得到的悬浮液浓度越接近 2%, 测得的强度也越能反映产品的质量, 日常检测中只取 0.30 g 就会使得部分产品的实际悬浮液浓度低于 2%。而在标准中仅规定了称样量 0.3 g, 并未规定精密度, 这就使得检验员在测定类似于 B

厂的产品时, 测得的数据偏低, 甚至可能出现误判为不合格品。从相对标准偏差上来看, 选取的三家产品平行性较好, 在称样量超过 0.30 g 后相对标准偏差明显下降。综合考虑凝胶强度和相对标准偏差, 后续实验选择 C 家生产的可得然胶作为试验对象, 固定称样量为 0.3050 g。

2.2.2 加热温度对凝胶强度的影响

可得然胶根据加热温度可以形成两种类型的凝胶。在 55~80°C 下形成的是地热可逆凝胶, 经过加热后会液化。而在加热至 80°C 以上时, 才形成高热不可逆凝胶^[3-4,11,13-14]。由图 4 可以看出, 在 90°C 以上的温度时凝胶强度逐渐趋于稳定, 在固定的 10 min 加热时间里, 水浴温度越高, 传递至胶体中心的热量越多, 中心的温度越高, 越能使所有悬浮的可得然胶有效成分形成牢固的棒状三螺旋结构, 而不是低温下的单链结构^[4,13,15-16]。所以在检测过程应当选择在 90°C 以上的水浴中进行制胶。另一方面应当选取玻璃较薄的试管进行制备, 防止因玻璃太厚使得热量不能及时传递, 而导致凝胶强度偏低。

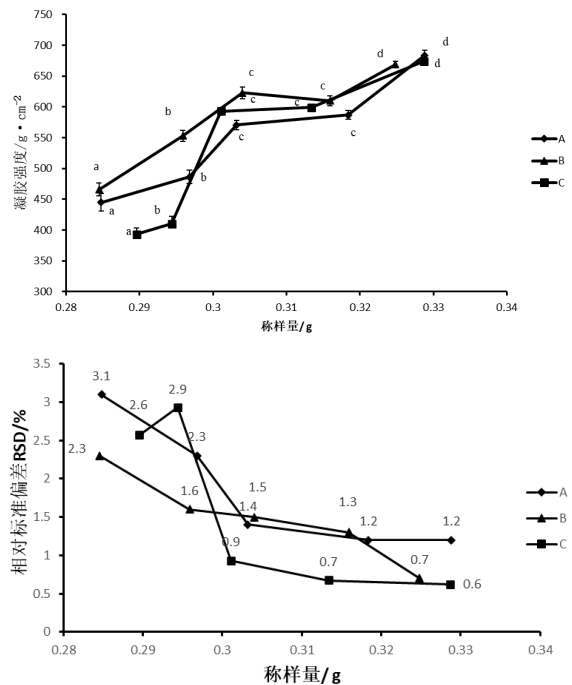
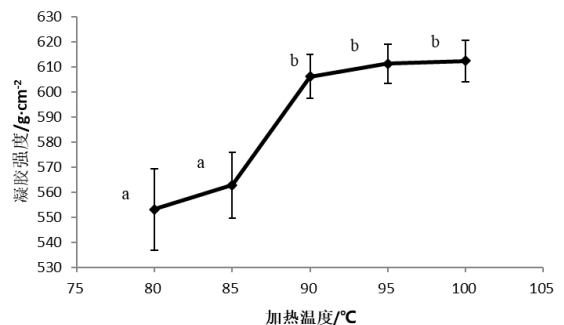


图 3 不同称样量对凝胶强度的影响

Fig.3 Effect of different sample weights on gel strength



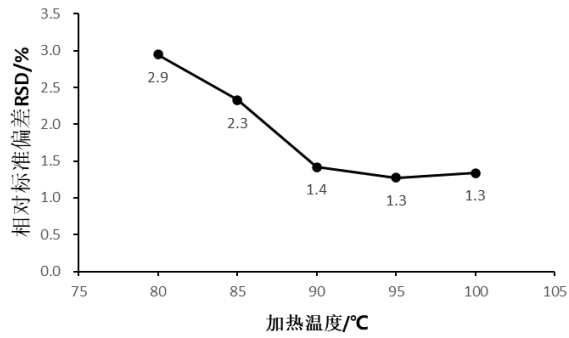


图4 不同加热温度对凝胶强度的影响

Fig.4 Effect of different heating temperatures on gel strength

2.2.3 冰水浴冷却时间对凝胶强度的影响

由图5可知，凝胶强度随着冷却时间的增加而逐渐增大最后趋于稳定，在冷却40 min以后凝胶性能逐步稳定。这可能是由于冷却时间低于40 min时凝胶中心温度尚未完全下降，紧密的三螺旋结构未能构成，此时上机测定得到的数据偏低，且各平行间的差异较大，不利于反映产品真实的质量情况。

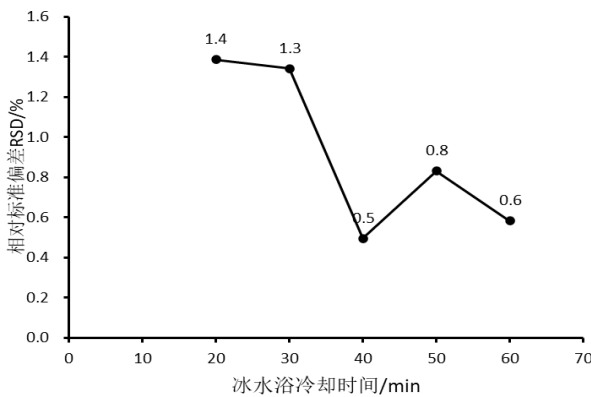
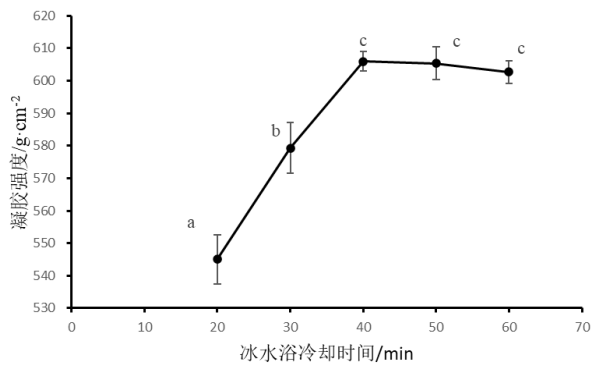


图5 不同冷却时间对凝胶强度的影响

Fig.5 Effect of different cooling time on gel strength

2.2.4 平行测定次数对凝胶强度的影响

由图6可知，凝胶强度数据在三次平行后逐渐趋于稳定，但随着测定次数增多，更多误差的带入使得该项目的相对标准偏差逐渐增大，而做三平时数据间的差异最小。因此选择平行测定3、4、5次进行后续正交实验。

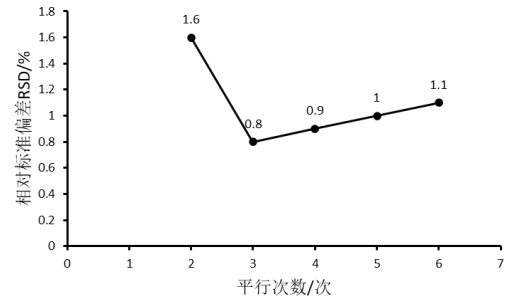
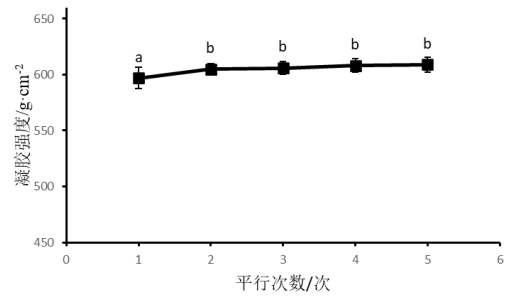


图6 测定次数对凝胶强度的影响

Fig.6 Effect of measurement times on gel strength

2.3 正交实验结果与分析

制胶的改进方法条件确定后，还需要考察该方法测得的数据的精密度，即相对标准偏差(RSD)。由表3的极差分析可知，影响相对标准偏差的不同因素主次顺序为A称样量>C冷却时间>D平行次数>B加热温度，称样量的影响最大，为日常检测实验中需要重点关注的因素。通过对各个因素k值和极差进行直观分析，各因素依次为A2<A1<A3，B3<B1<B2，C2<C1<C3，D1<D2<D3。正交试验法得出的最优方案为A2B3C2D1，即称样量0.31 g，加热温度100°C，冰水浴冷却50 min，平行3次。最后以最优方案进行试验，测得凝胶强度为621 g·cm⁻²，相对标准偏差为0.89%。

表3 正交实验结果与分析

Table 3 Results and analysis of orthogonal experiments

序号	A 称样量 (g)	B 加热温度 (°C)	C 冷却时间 (min)	D 平行次数 (次)	相对标准偏差 RSD (%)
1	1	1	1	1	1.75
2	1	2	3	2	2.62
3	1	3	2	3	1.22
4	2	1	3	3	1.66
5	2	2	2	1	0.89
6	2	3	1	2	1.35
7	3	1	2	2	2.55
8	3	2	1	3	2.78
9	3	3	3	1	2.96
K ₁	5.59	5.96	5.88	5.60	-
K ₂	3.90	6.29	4.66	6.52	-
K ₃	8.29	5.53	7.24	5.66	-
k ₁	1.86	1.99	1.96	1.87	-
k ₂	1.30	2.10	1.55	2.17	-
k ₃	2.76	1.84	2.41	1.89	-
R	0.90	0.25	0.86	0.31	-

2.4 不同尺寸柱头对测定结果的影响

GB 28304-2012 中规定测定的柱头尺寸为 0.5 cm, 需要定制, 而实际购买的仪器配件中常见的为 0.4 cm 和 0.6 cm, 故而将柱头更换, 自动调零后对不同凝胶强度的产品进行试验, 结果如表 4 所示。对于凝胶强度低于 $600 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的 1 号、2 号产品使用 0.4 cm 和 0.6 cm 的柱头测得的数据低于 0.5 cm 柱头测定的数据, 而当凝胶强度高于 $600 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 时各柱头测得的数据基本一致, 在日常检测中可以考虑使用 0.4 cm 和 0.6 cm 柱头进行替换测定。

表 4 不同尺寸柱头对凝胶强度的影响

Table 4 Effect of different size column heads on gel strength

产品编号	0.4 cm 柱头测得的凝胶强度 ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	0.5 cm 柱头测得的凝胶强度 ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	0.6 cm 柱头测得的凝胶强度 ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)
A	404±8.8	488±5.8	458±5.5
B	578±3.8	592±5.2	588±6.9
C	613±5.8	621±5.5	620±5.9
D	866±4.2	860±3.7	858±4.4
E	937±5.5	941±4.1	952±6.2

3 讨论与结论

通过单因素试验, 确定了取样量、加热温度、冰水浴冷却时间、平行测定次数各因素在单一因素变化的情况下的最优情况。在单因素试验的基础上, 用正交试验对可得然胶的凝胶强度测定方法进行优化。得到改进后的测定方法为: 取样量为 0.30~0.31 g (根据产品的可得然胶含量做适当的增减, 尽量不要超过 0.31 g) 至 18 mm×180 mm 的试管中, 精确至 0.0001 g, 将蒸馏水加热煮沸 5 分钟后, 放入冰水浴中快速冷却 (脱气水临用现制), 加入 15 mL 现制的脱气水, 用微量取样药匙进行搅拌, 每搅拌 10 圈后向上抽提一次, 使试管中的悬浊液上下分散均匀, 搅拌 5 min, 然后将试管放入沸水浴中, 重复搅拌的操作至搅拌中明显感到黏滞感 (搅拌有阻力) 后, 抽出药匙, 计时水浴加热 10 min, 取出在冰水浴中冷却 50 min, 每份做三次平行, 取平行测定结果的算术平均数为测定结果, 每次平行测定的结果差值不大于平均值的 10%。改进后的方法更适用于市场上的各种工艺生产的可得然胶产品。对于凝胶强度高于 $600 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的产品可以考虑使用 0.4、0.6 cm 的柱头代替 0.5 cm 柱头进行测定, 柱头面积需进行相应的换算。

参考文献

- [1] 刘霄莹, 张润峰, 潘玉雪, 等. 可得然胶基水凝胶及其应用研究进展 [J]. 食品科学, 2023, 44(17): 248-257.
- [2] SATO F, NAKAMURA Y, KATSUKI A, *et al.* Curdlan, a microbial beta-glucan, has contrasting effects on autoimmune

and viral models of multiple sclerosis [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 805302.

- [3] 俞珊, 段孟霞, 童彩玲, 等. 可得然胶功能性质及其在食品中的应用研究进展 [J]. 食品科学, 2022, 43(19): 277-284.
- [4] PARAG S, REKHA S. Fermentative Production of Curdlan [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology. Part A, Enzyme Engineering and Biotechnology*, 2004, 118(1/3): 21-31
- [5] 曹云刚, 胡春杰, 李远征, 等. 可得然胶功能特性及在肉及肉制品中的应用进展 [J]. 精细化工, 2024, 41(03): 491-498, 587.
- [6] 李才明, 陈荻, 陆瑞琪, 等. 可得然胶对米粉加工及食用品质的影响 [J]. 食品科学, 2021, 42(16): 23-28.
- [7] 丁丽丽, 郭宏明, 吴俊, 等. 可得然胶在淡水鱼糜制品中的应用研究 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(17): 262-264, 274.
- [8] 董学前. 微生物发酵生产可得然胶的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2011: 14-15.
- [9] 傅强, LEE J, 詹晓北, 等. 微生物胞外多糖——热凝胶的酶法提取 [J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(02): 12-16.
- [10] 王宏千, 戴勤宇, 朱芮, 等. 超声、红外耦合热风干制可得然胶传质模型构建及品质分析 [J/OL]. 食品工业科技, 2024, 1-14.
- [11] 于婷婷, 韩鸿宇, 张永刚, 等. 高凝胶强度可得然胶生产菌的构建筛选与发酵工艺优化研究 [J/OL]. 食品与发酵工业, 2024, 1-12.
- [12] 中华人民共和国卫生部. GB 28304-2012 食品安全国家标准食品添加剂 可得然胶 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [13] 李辉, 周燕燕. 盐酸处理对可得然胶品质提升试验研究 [J]. 辽宁化工, 2023, 52(09): 1299-1302.
- [14] 吉武科, 张永刚, 武琳, 等. 国产化可得然胶的应用现状与展望 [J]. 中国食品添加剂, 2013, (S1): 244-251.
- [15] 袁方. 可得然胶发酵条件的研究 [D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2014.
- [16] 袁方, 赵双枝, 苏理, 等. 响应面法优化可得然胶发酵培养基 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(24): 150-154.

作者简介



屠瀚超, 硕士, 研究方向为食品添加剂检测技术、植物蛋白资源开发。



戴彦韵, 硕士, 研究方向为食品添加剂检测技术、化妆品质量检测技术。