

一种新型生物聚合物 Ss 的流变学性质及成胶特性

王 薇¹ 黄海东^{1,2} 张 禹³ 马 挺¹ 张国佩³ 梁凤来¹ 刘如林^{1*}

(1. 南开大学 生命科学学院 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

(2. 天津农学院 天津 300384)

(3. 鑫合生物化工有限公司 新河 055650)

摘 要: 本文对一种新型生物聚合物 Ss 的流变学性质及成胶特性进行了研究。该聚合物的流变学性质与黄原胶类似, 具有高粘性、假塑性及耐盐性。0.6% 以上的 Ss 溶液加热($\geq 75^{\circ}\text{C}$)并冷却至室温可形成凝胶, 加入金属离子可以改变其成胶所需的最低聚合物浓度及所成凝胶的性质。利用质构分析(TPA)方法, 研究了不同聚合物浓度和钙离子浓度下凝胶的质构性质。钙离子的加入能促进凝胶的形成, 凝胶的硬度、弹性、内聚性随聚合物浓度及钙离子浓度的增加而增大, 但大于最适钙离子浓度时, 硬度、弹性及内聚性均有所下降。

关键词: 生物聚合物, 流变学, 凝胶, TPA 测试

Rheological and Gelling Properties of a Novel Biopolymer Ss

WANG Wei¹ HUANG Hai-Dong^{1,2} ZHANG Yu³ MA Ting¹ ZHANG Guo-Pei³
LIANG Feng-Lai¹ LIU Ru-Lin^{1*}

(1. Key Laboratory of Molecular Microbiology Technology, Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)

(2. Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

(3. Xinhe Biochemical Co. Ltd, Xinhe 055650)

Abstract: The rheological and gelling properties of a novel biopolymer Ss have been investigated. Like Xanthan Gum, this polymer was distinguished by its high viscosity, pseudoplasticity and salt-tolerance. 0.6%(W/V) Ss concentration transformed to gel by heating ($\geq 75^{\circ}\text{C}$) and then cooling to room temperature. Adding metal ions changed the critical concentration of gelling as well as the textural characters of the gel forming. The effects of different polymer and calcium ion concentrations on the textural properties were examined using instrumental Texture Profile Analysis (TPA). Adding calcium ions enhanced sol-gel transition. Hardness, springiness and cohesiveness increased with increasing polymer and calcium ion concentration, but decreased when surpassed a critical calcium ion concentration.

Keywords: Biopolymer, Rheology, Gel, TPA test

在油田三次采油和钻井过程中, 经常使用聚合物作为流变控制剂, 已应用的聚合物有聚丙烯酰胺

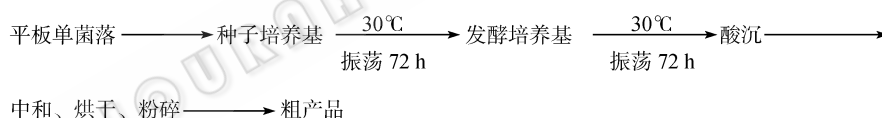
和生物聚合物黄原胶。黄原胶以其耐温、耐盐、耐酸碱性能好及抗剪切、难降解等优点, 已在采油、

食品、医药、印染及化妆品等很多行业应用^[1,2]。本室保藏的鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)TP-3 能在适宜的发酵条件下产生一种高粘性、可酸沉提取的聚合物Ss, Ss具有良好的增稠性、假塑性和形成凝胶的性能。在 75 °C 的高温条件下, Ss能够形成热可逆性凝胶, 这一点与黄原胶明显不同。更为可贵的是, 其产物提取不像黄原胶那样需用乙醇沉淀, 而只用酸调其等电点即可析出。酸沉特性大幅度降低了生产成本, 与黄原胶相比具有价格优势, 有着广阔的应用前景, 目前已在部分油田作为黄原胶的替代品用于三次采油。

质构分析(Texture profile analysis, TPA)最早应用于对食品的物理性质进行客观分析, 质构参数于 1963 年由Szczeniak定义并使用^[3]。由于TPA测试所得参数与食品质构性质的感官评价具有良好的相关性, 目前已广泛应用于实验室及生产过程中, 并成为食品及凝胶类物质质构性质的常规分析^[4]。国内有关TPA测试的报道很少, 而且主要针对面制品和果蔬。

本文对聚合物 Ss 粗产物的流变学性质、成凝胶特性及凝胶的质构性质进行了研究, 并对其成胶机理进行了初步探索。

发酵流程:



1.3.2 生物聚合物 Ss 的纯化: 将发酵液于 100 °C 加热 30 min, 用去离子水稀释 10 倍, 10000 r/min 离心 40 min 除菌体, 收集上清液, 重复几次至镜检无菌体, 合并上清液, 调节 pH 值至 3.0 左右, 使产物沉淀, 真空冷冻干燥得 Ss 粗品。取适量粗品配制成 0.1% 浓度的 Ss 溶液, 调解 pH 至中性使其溶解, 使用 Sevag 法除蛋白, 调 pH 至 3.0 左右沉淀 Ss, 透析至 pH 中性, 冷冻干燥得 Ss 产物纯品, 过 Sephadex G150 柱验证纯度。

1.3.3 聚合物 Ss 的分子组成: 样品的水解: 取 5 mg 纯化后的生物聚合物 Ss 样品, 加 2 mol/L 三氟乙酸, 置 120 °C 封管水解 12 h, 减压浓缩至干, 备用。

气相色谱分析: 按文献[5]的方法制备糖腈乙酰酯衍生物, 色谱条件: Agilent 6820 型气相色谱仪, FID检测器, 温度 280 °C, 载气N₂, 进样温度 280 °C,

1 材料与方法

1.1 菌种

鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)TP-3, 由本室保藏。

1.2 试剂与仪器

黄原胶样品均由河北鑫合化工有限公司提供; 所用金属盐类, 如NaCl、KCl、CaCl₂·2H₂O、MgSO₄·7H₂O、ZnSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O、CuSO₄·5H₂O、MnSO₄·7H₂O、CoCl₂·6H₂O等均作为分析纯试剂; 乳酸钙为化学纯试剂。

LVDV- +RPO 粘度计: 美国 Brookfield 公司制造; TA.XT2i 质构仪: 英国 Stable microsys 公司制造; PHS-3C 型数字酸度计: 上海鹏顺科学仪器有限公司;

1.3 实验方法

1.3.1 种子、发酵培养基及发酵流程: 种子培养基(g/L): 蔗糖 10, 蛋白胨 2, 牛肉膏 1, pH7.2~7.5; 发酵培养基(g/L): 蔗糖 40, 豆饼粉 2.5, 酵母粉 0.15, K₂HPO₄ 1.6, MgSO₄ 0.3, NaCl 0.5, MnCl₂ 0.004, FeSO₄ 0.005, CaCO₃ 1.0, pH7.2~7.5。

程序升温: 120 °C (5 min) 10 °C/min升温至 250 °C (5 min), 根据标准单糖与样品的保留时间, 确定样品的单糖组成。

葡萄糖醛酸分析: 用硫酸-咔唑法定量测定^[5]。

氨基酸组成分析: 取 500 mg Ss 产物纯品于水解管中, 加入 5 mL 6 mol/L 的盐酸, 抽真空封管, 在 110 °C 水解 24 h, 取 0.5 mL 蒸干, 加入 0.02 mol/L 的盐酸溶解, 用 HITACHI L-8800 型氨基酸自动分析仪进行氨基酸组成分析。

1.3.4 新型微生物聚合物 Ss 的流变性质及其影响因素: 1) Ss 溶液的制备: 称取一定量的 Ss 粉末, 溶解于适量的去离子水中, 搅拌使之分散均匀, 4 °C 溶胀过夜, 恢复至室温待测;

2) 聚合物浓度与其溶液粘度的关系: 按方法 1) 配制 0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、

0.6%、0.8%、1.0%及1.2%的Ss溶液。采用4号转子,转速250 r/min,室温下测定溶液粘度值。

3) 转速回环测试:按方法1)配制0.5%的Ss溶液。应用DV- +PRO控制软件RHEOCALC编辑程序,采用4号转子,设定转速从5 r/min连续增加到250 r/min,之后立即从250 r/min连续降低到5 r/min,室温下测定粘度的变化值。

4) 温度变化对聚合物溶液粘度的影响:按方法1)配制1.0%的Ss溶液。应用DV- +PRO控制软件RHEOCALC编辑程序,采用5号转子,转速250 r/min,测定温度为20、30、40、50、60、70及80时聚合物溶液的粘度值。

5) pH值变化对聚合物溶液粘度的影响:按方法1)配制0.1%的Ss溶液。用HCl或NaOH调节溶液pH为4、5、6、7、8、9、及10,采用2号转子、转速250 r/min,室温下测定溶液的粘度值。

6) 不同金属离子对聚合物溶液粘度的影响:按方法1)配制Ss溶液,称取适量药品,溶于去离子水中并搅拌,待其充分溶解后与Ss溶液混合(终浓度:聚合物0.25%,离子0.1 mol/L),用磁力搅拌器搅拌均匀并静置4 h~6 h,使溶液充分平衡。采用3号转子,转速250 r/min,于室温下测定溶液的粘度值。

1.3.5 生物聚合物Ss的成胶特性:1) 凝胶的制备:将预先制备的Ss溶液置于80℃水浴,保温15 min,期间摇动容器使溶液受热均匀,加入适量乳酸钙粉末并立即搅拌1 min~2 min,室温静置24 h待测。

2) Ss凝胶的TPA测试:TPA测试是通过往复运动对样品进行两次穿冲完成的,所得质构参数包括硬度(Hardness)、弹性(Springiness)、内聚性(Cohesiveness)、粘附性(Adhesiveness)、脆性(Fracturability)、胶粘性(Gumminess)、咀嚼性(Chewiness)及回复性(Resilience)。探头采用0.5英寸柱形探头(P/0.5R);数据采集频率200 pps; TPA测试的程序设置为:

Option Mode:	TPA Test
Pre-Test Speed:	2.00 mm/s
Test Speed:	1.00 mm/s
Post-Test Speed:	1.00 mm/s
Target Mode:	Distance
Distance:	5.000 mm
Time:	1.00 s

Trigger Type: Auto (Force)
Trigger Force: 5.0 g

每项测试重复5次,室温测定。

2 结果与讨论

2.1 发酵产物

按1.3.1的发酵流程得到发酵产物为聚合物Ss粗品(32 g/L),白色粉末状物质,溶于水后形成具有黏性的溶液。调节pH至3以下,Ss形成团块状沉淀。0.6%以上的该溶液加热并冷却至室温可形成凝胶。

2.2 聚合物Ss的分子组成

用气相色谱测定单糖组成,结果显示组分为鼠李糖、甘露糖和葡萄糖,比例6:1.5:1。硫酸咔唑法测定样品中葡萄糖醛酸的含量,按标准曲线方程计算得Ss样品中葡萄糖醛酸含量为20.4%。氨基酸组成分析结果表明,Ss中含有1.49%的氨基酸,由16种氨基酸组成,其中酸性氨基酸Asp和Glu的含量最高,分别占氨基酸含量的11.6%和11.7%。

2.3 聚合物Ss的流变学性质及其影响因素

基于该产品溶于水后形成具有一定粘度的溶液,本文对Ss发酵粗产物的流变学性质及影响因素进行了初步研究。已测定,1%的Ss溶液(在1% KCl溶液中)60 r/min测定时粘度为1538 mPa·s,而黄原胶在相同浓度及测定条件下的粘度为2014 mPa·s。尽管Ss溶液与黄原胶相比粘度稍低,却具有与黄原胶类似的流变学性质^[2]。

2.3.1 聚合物Ss浓度与其溶液粘度的关系:由图1可知,Ss溶液的粘度随Ss浓度的增大而增大,较高浓度时粘度增幅尤其显著。

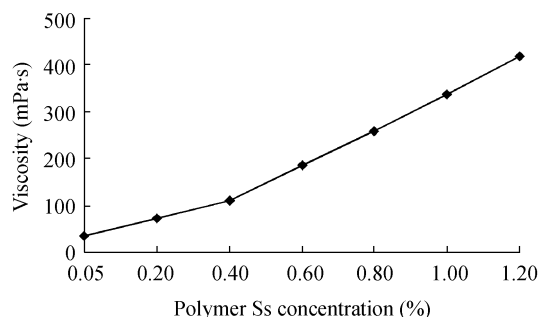


图1 不同浓度Ss溶液的粘度

Fig. 1 Viscosity of different polymer Ss concentration

2.3.2 聚合物溶液的剪切稀释性: 随着剪切速率的增加, 黄原胶溶液粘度下降, 为典型的假塑性流体^[6]。一定浓度的Ss溶液在恒定转速下, 粘度不随测定时间长短而变化, 即没有时间相关性, 因此不属于触变性流体。为了测定Ss溶液的剪切稀释性能, 设计了转速回环测试。

由图 2 可知, Ss 溶液粘度随转速增加而降低, 60 r/min 后下降趋势平缓, 说明该溶液具有剪切稀释性能; 转速降低过程中, 粘度逐渐增大, 最后恢复到测试开始时的状态。曲线于 x 轴 100 r/min 的垂线作为分界线, 左右两边对称, 表明该溶液粘度恢复时无滞后性。

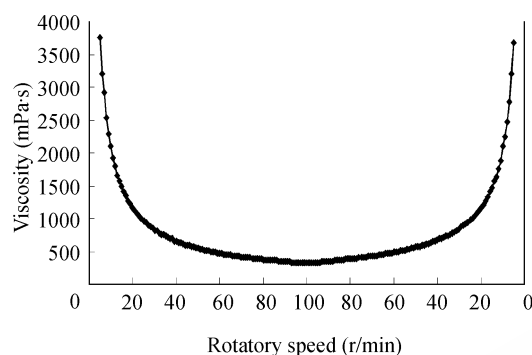


图 2 转速对聚合物 Ss 溶液粘度的影响
Fig. 2 Rotatory speed-viscosity curve

2.3.3 温度对聚合物溶液粘度的影响: 图 3 表示 Ss 溶液的粘度随温度变化的结果。可以看出, 在小于 70 条件下, 溶液粘度变化不大; 升温至 80 , 粘度略有降低, 表明聚合物 Ss 具有良好的耐温性。

2.3.4 pH 值对聚合物溶液粘度的影响: pH 值的变化对 Ss 溶液粘度的影响见图 4。由于 Ss 聚合物在酸性条件下形成沉淀, 所以选择 pH 4.0~11.0 作为测定

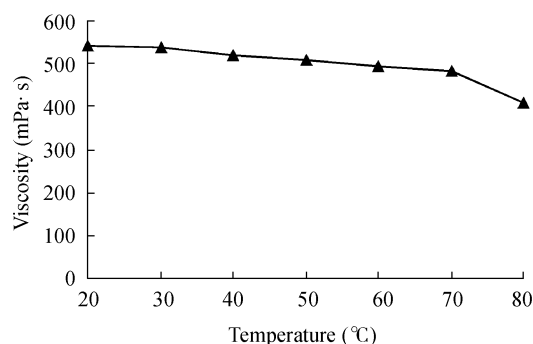


图 3 温度对聚合物 Ss 溶液粘度的影响
Fig. 3 Temperature-viscosity curve

范围。从 pH 4.0 到高碱性条件下, 溶液粘度略有增加, 表明 pH 4.0 以上的酸碱性对 Ss 溶液粘度影响不大(见图 4)。聚合物 Ss 具有良好的耐酸性。

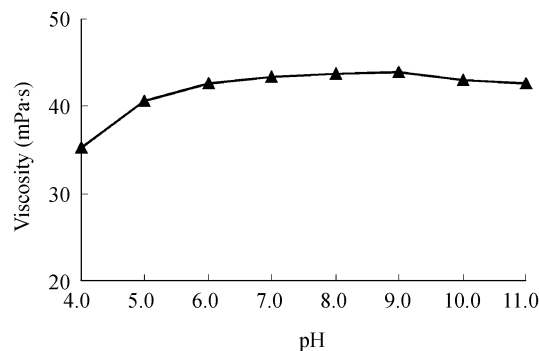


图 4 pH 对聚合物 Ss 溶液粘度的影响
Fig. 4 pH-viscosity curve

2.3.5 不同金属离子对聚合物溶液粘度的影响: 由图 5 可知, 离子对聚合物 Ss 溶液的粘度影响不明显。另外, 1% 的 Ss 聚合物在 10% KCl 溶液中的粘度为 1520 mPa·s, 这与之在 1% KCl 溶液中的粘度(1538 mPa·s)极为接近, 表明该聚合物具有良好的耐盐性, 可在矿化度较高的油田应用。

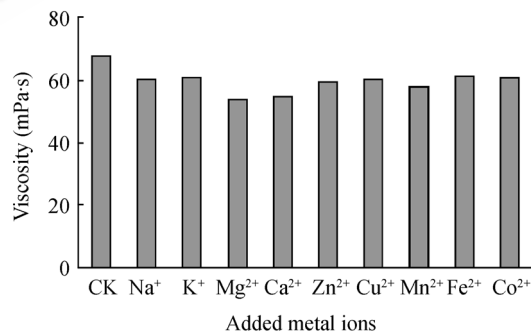


图 5 不同金属离子对聚合物溶液粘度的影响
Fig. 5 Effect of different ions on viscosity

2.4 聚合物 Ss 的成胶特性

Ss 粗产物溶液除了具有较高粘度外, 加热到 75 以上冷却至室温还可形成凝胶(图 6), 成胶条件与 *Sphingomonas paucimobilis* 所产的结冷胶(Gellan)类似^[7]。在不加金属离子的条件下, 形成凝胶所需聚合物浓度 0.6%; 加入金属离子, 0.2% 的聚合物即可形成凝胶。常见的一价离子如 K⁺、Na⁺, 二价离子除 Cu²⁺、Fe²⁺ 外, Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺ 和 Mn²⁺ 均可使 Ss 溶液形成凝胶; 三价离子如 Fe³⁺ 和 Al³⁺, 可使 Ss 形成团块状沉淀。不论是否加入离子, 所形成的凝胶均为热可逆性凝胶, 这一点与结冷胶有明显不同^[7]。



图6 0.8%的聚合物 Ss 形成的凝胶
Fig. 6 Gel of 0.8% Polymer Ss

2.5 Ss 凝胶的质构分析

利用 TPA 测试, 初步研究了 Ss 粗产物形成凝胶的质构性质。Ss 浓度与添加的钙离子浓度作为影响 Ss 凝胶质构性质的因素, 确定形成特性凝胶的条件, 探讨结构与性质之间的关系。

2.5.1 硬度: 硬度是第一次压缩过程中的峰值, 表示使样品达到一定形变所需要的力。由图 7 可知, 凝胶硬度随 Ss 浓度的增加而增大; 随着 Ca^{2+} 浓度的增加, 凝胶硬度先增大后基本保持不变; 不同 Ss 浓度, 达到最大硬度值时所需 Ca^{2+} 加入量不同, Ss 浓度越高, 所需 Ca^{2+} 的量越大, 具体为: Ss 浓度 0.2%~0.4%, 所需 Ca^{2+} 10 mmol/L~15 mmol/L; Ss 浓度 0.6%~1.2%, 所需 Ca^{2+} 20 mmol/L~25 mmol/L; 加入过量离子 (25 mmol/L) 凝胶硬度有所下降。该性质与结冷胶很相似, 即过量离子的存在占据了分子的阳性位点, 因此阻止了与临近高级螺旋结构之间形成连接^[8-11]。推测 Ss 凝胶也具有一定形状的高级

结构, 适量钙离子的加入有利于分子聚集, 过量则起到相反的作用。

2.5.2 弹性: 弹性是第一次压缩结束与第二次压缩开始之间样品能恢复的高度, 弹性反映样品在外力作用下的形变及恢复能力。0.2% 和 0.4% 的 Ss 溶液在不加入 Ca^{2+} 时不能形成凝胶; 凝胶弹性随 Ss 浓度的增加而增大; 不同浓度的凝胶, 达到最大弹性值所需的 Ca^{2+} 浓度不同: Ss 浓度 0.2%~0.4%, 所需 Ca^{2+} 5 mmol/L~10 mmol/L; Ss 浓度 0.6%~1.2%, 所需 Ca^{2+} 15 mmol/L~20 mmol/L; 加入过量离子 (25 mmol/L), Ss 浓度 0.6% 以上的凝胶弹性有所下降。推测原因, 可能由于 Ss 浓度增大, 分子之间的作用力加强, 相应凝胶的变形恢复能力增强, 表现为弹性增强; 过量离子的加入使分子之间斥力增大, 导致弹性减弱。

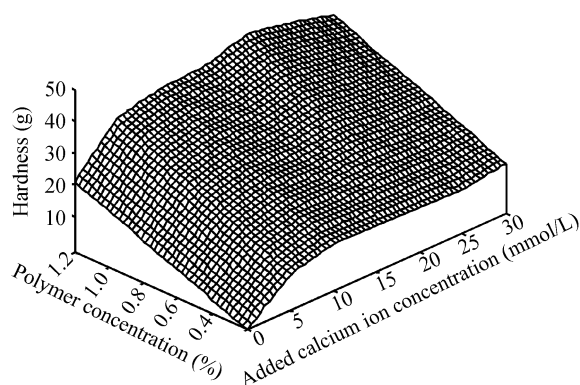


图7 不同聚合物浓度及钙离子浓度对凝胶硬度的影响
Fig. 7 Hardness of Ss gel as a function of Ss concentration and calcium ion level

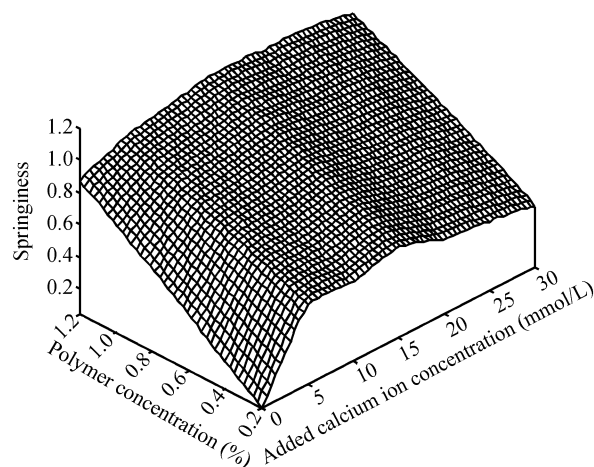


图8 不同聚合物浓度及钙离子浓度对凝胶弹性的影响
Fig. 8 Springiness of Ss gel as a function of Ss concentration and calcium ion level

2.5.3 内聚性: 内聚性指第二次压缩出现的峰面积与第一次峰面积的比值, 内聚性反映的是样品的抗拉能力。如图 9 所示, Ss 凝胶的内聚性随 Ss 浓度的增大而增加; 不同浓度的 Ss 凝胶, 达到最大内聚性所需的 Ca^{2+} 浓度不同: Ss 浓度为 0.2%~0.4% 时, 最适 Ca^{2+} 浓度为 5 mmol/L, 继续增加钙离子浓度, 凝胶内聚性逐渐降低; Ss 浓度为 0.6%~1.2% 时, 内聚性随 Ca^{2+} 浓度的增大而增大。推测原因可能是 Ca^{2+} 提供了形成凝胶所需的“核”, 使 Ss 分子在其周围聚集, 维持了分子之间结构的稳定; 但过多的 Ca^{2+} 使基团之间相互排斥, 凝胶内部的不稳定直接导致内聚性下降^[9-13]。

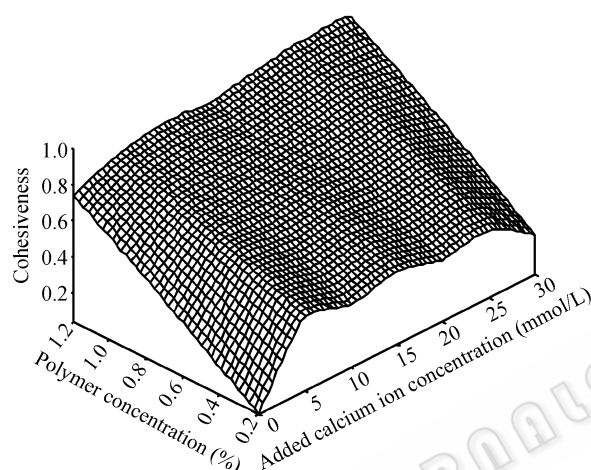


图 9 不同聚合物浓度及钙离子浓度对凝胶内聚性的影响

Fig. 9 Cohesiveness of Ss gel as a function of Ss concentration and calcium ion level

3 结论

生物聚合物 Ss 是由微生物发酵得到的胞外产物, 已对其分子结构进行了初步分析(另文发表), 其单糖组分与鞘多糖类似, 但分子中含有 1.49% 的氨基酸, 其中酸性氨基酸占 23.3%。由于其分子组成的特点, 使 Ss 溶液具有酸沉、高粘和形成凝胶等诸多特性。

Ss 溶液具有与黄原胶类似的性质, 如剪切稀释性能(假塑性)、耐盐耐酸碱性等; 耐温性良好; pH 值 (4) 对溶液粘度的影响不大; 0.6% 以上的 Ss 溶液加热到 75 以上, 冷却至室温可形成凝胶, 加入金属

离子可以改变成胶所需聚合物浓度, 钾、钠及二价金属离子(除铜、铁外), 钙、镁、锌、锰均可促使凝胶的形成; 溶液浓度及所加钙离子浓度对凝胶的硬度、弹性、内聚性等质构性质均有影响, 一般 Ss 浓度越大, 凝胶的硬度、弹性及内聚性越高; 不同浓度的 Ss 凝胶, 达到最高硬度、弹性及内聚性所需钙离子量不同, 浓度越高, 所需钙离子越多; 但超过最适钙离子浓度, 质构性质有所下降。

参 考 文 献

- [1] Baviere M. Basic concepts in enhanced oil recovery processes. London and New York: Published by ELSEVIER APPLIED SCIENCE, 1991, pp. 5-45.
- [2] Barbara Katzbauer. Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, **59**: 81-84.
- [3] Bourne MC. Food Texture and viscosity. New York: Academic Press, 1982, pp. 44-117.
- [4] Garca-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, *et al.* Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 2000, **18**(7): 549-579.
- [5] Baird JK, Sandford PA, Cottrell IW. Industrial application of some new microbial polysaccharides. *Biotechnology*, 1983, **1**: 778-783.
- [6] 张维杰. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987, pp. 3-39.
- [7] 徐佩弦. 高聚物流变学及其应用. 北京: 化学工业出版社, 2003, pp. 36-328.
- [8] Sanderson GR. Food gels. New York: Elsevier Science Publishing Co Inc, 1990, pp. 201-232.
- [9] Tang J, Lelievre J, Tung MA, *et al.* Polymer and ion concentration effects on gellan gel strength and strain. *Journal of Food Science*, 1994, **59**: 216-220.
- [10] Tang J, Tung MA, Zeng Y. Mechanical properties of gellan gels in relation to divalent cations. *Journal of Food Science*, 1994, **60**: 748-752.
- [11] Tang J, Tung MA, Zeng Y. Compression strength and deformation of gellan gels formed with mono- and divalent cations. *Carbohydrate Polymers*, 1996, **29**(1): 11-16.
- [12] Lau MH, Tang J, Paulson AT. Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. *Food Research International*, 2000, **33**: 665-671.
- [13] Yoko Nitta, Shinya Ikeda, Katsuyoshi Nishinari. The reinforcement of gellan gel network by the immersion into salt solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2006, **38**(2): 145-147.