

细菌聚 γ -谷氨酸溶液流变性能的研究*

杨革^{1,2} 陈坚^{1**} 曲音波² 伦世仪¹

(¹江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

(²山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要 采用动态实验方法研究了聚 γ -谷氨酸(γ -PGA)水溶液的流变性能.在该体系中 γ -PGA 溶液是非牛顿剪切变稀流体,属于假塑性流体,具有典型的幂律性,其稠度为 $0.01 \sim 0.18 \text{ Pa}\cdot\text{s}$,幂律指数为 $0.93 \sim 0.81$. γ -PGA 溶液的粘度随温度的升高而呈现出下降态势.在角频率 $\omega = 0.01 \sim 100 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ 范围内,5% γ -PGA 的储能模量 G' 始终大于耗能模量 G'' ,且不依赖于频率,表明聚 γ -谷氨酸弹性极佳并相当稳定.1%可能接近聚 γ -谷氨酸形成水凝胶的阈值浓度. γ -PGA 易溶于水形成有粘弹性的弱凝胶,长时间的高温加热处理会破坏 γ -PGA 形成的凝胶网络结构,酸、碱均降低 γ -PGA 形成的凝胶网络的能力,添加 1% ~ 10% NaCl 对 2% 的凝胶网络有一定的损害,添加 7% KCl、 MgSO_4 、 ZnSO_4 、 CaCl_2 有类似影响,但 1.7% 的 PbNO_3 和 AgNO_3 均使 γ -PGA 的粘弹性完全丧失.

关键词 地衣芽孢杆菌, 聚 γ -谷氨酸, 流变性能, 动态粘弹性

聚 γ -谷氨酸 [γ -Poly(glutamic acid), γ -PGA] 是由微生物发酵合成的一种胞外异形肽. γ -PGA 具有增稠、乳化、凝胶、成膜、保湿和粘接等功能特性,是一种生物相容性和可完全降解的新型天然高分子材料,在食品、日化、石油、农业、制药及生物工程等领域具有广泛的应用前景^[1~5]. 作者利用 He-Ne 激光诱变筛选到一株高产 γ -PGA 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) WBL-3,其所产胞外异形肽 2% (W/V) 水溶液可形成有粘弹性的弱凝胶,并在 pH 4 ~ 12 范围内稳定,完全酸水解后,经氨基酸分析仪和 D-谷氨酸氧化酶法^[6] 检测,结果表明该异形肽为 L-谷氨酸、D-谷氨酸组成的氨基酸高聚物,FT-IR 和 ^{13}C -NMR 显示为典型的多肽吸收峰和化学位移,含有 γ -谷氨酰胺结构.利用粘度外推法检测结果表明其 M_w 为 2.48×10^5 . 进一步对其理化性质的初步研究发现,该异形肽不同于一般的氨基酸聚合物,是一种新型的微生物高聚物.由于 γ -PGA 易在冷水中分散,可制成水凝胶,有良好的粘弹性,并在一定范围内具有耐高温,耐酸、碱、盐,耐渗透压、抗冻融等优良特性,因此, γ -PGA 可望成为新型水溶性功能高分子材料的一个极好来源.为开发 γ -PGA 更广泛的应用潜力,研究其溶液的流变性质非常重要.本文采用动态实验方法对 γ -PGA 水溶液的流变性能进行了研究.

1 实验部分

1.1 样品的制备

样品制备采用文献[4]的方法.

1.2 流变性能的测定

用 Haake 公司的 RS75 型应力流变仪,转子为 Z41 同轴圆筒系统,测定温度为 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$.

1.3 pH 测定

用 PHS-P₁ 型酸度计(上海大中分析仪器厂)测定.

2 结果与讨论

2.1 剪切应力与剪切速率的拟合关系

图 1 给出了浓度分别为 1%、2%、5% 和 10% 的 γ -PGA 水溶液在不同剪切速率($\dot{\gamma}$)下的剪切应力(τ),显然 $\dot{\gamma}$ 越高,相应 τ 越大.采用 Ostwald-dewaele 幂律模型^[7] $\tau = k\dot{\gamma}^n$ 对相关实验数据进行回归分析,发现所有数据的拟合关系良好,并由此求得稠度 k 为 $0.01 \sim 0.18 \text{ Pa}\cdot\text{s}$,流型指数 n 为 $0.93 \sim 0.8148$. τ - $\dot{\gamma}$ 能较好地符合幂律模型且 n 小于 1,表明在实验浓度范围内, γ -PGA 水溶液表现出假塑性非牛顿流变行为,具有剪切变稀特性.

2.2 粘度与剪切速率的关系

图 2 表明了粘度随着剪切速率的变化情况.

* 2001-07-11 收稿,2001-09-04 修稿;教育部高等学校重点实验室访问学者基金资助(基金号 Y66002);** 通讯联系人

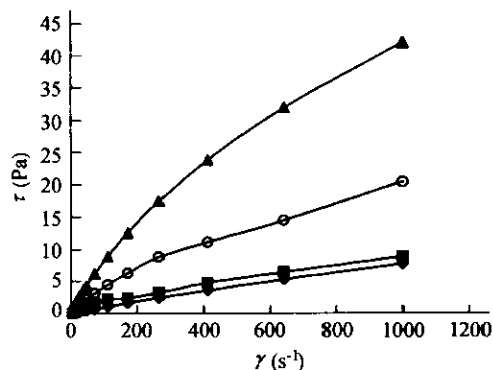


Fig. 1 Shear stress (τ) and related shear rates (γ) at different concentrations of γ -PGA

◆ 1% γ -PGA; ■ 2% γ -PGA; ○ 5% γ -PGA; ▲ 10% γ -PGA

在非常低的剪切速率下,由于分子能够保持它的无规律定向,所以此时粘度较高,大约为 112 mPa·s,在较高的剪切速率时进行测定,粘度却只有 42.1 mPa·s,并且粘度随着剪切速率的增加继续减少.这是因为在较高的剪切速率下, γ -PGA 的分子来不及取向或者已经充分取向,布朗运动的影响可以忽略,分子按照流线方向排列得很整齐,因此,表现出较少的阻力.同时 γ -PGA 作为一个大分子物质还要考虑分子缠结的影响.在静置的溶液中, γ -PGA 的大分子链为无规则的线团,彼此之间相互缠结,所以为流动产生较大的阻力,表现出较大的粘度,但是在高剪切速率时,溶液受到较大的剪切作用,卷曲缠结的分子结构被拉直,分子定向排列,所以粘度下降.

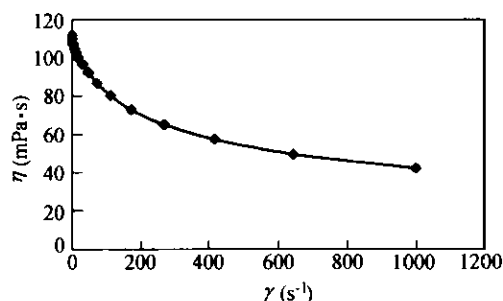


Fig. 2 The relation between viscosity (η) and shear rates (γ)

2.3 粘度与温度的关系

为了研究温度对 γ -PGA 流变特性和粘度影响,在一定剪切速度下测量粘度的变化.图 3 是浓度为 2% 的 γ -PGA 粘度在不同温度下的变化情况.从图中可以看出,在不同的温度范围内,粘度

变化程度是不均一的,即在 10 ~ 45℃ 之间,粘度随温度的升高呈指数递减;在 45 ~ 70℃ 之间,随着温度的升高而粘度递减程度减弱;在 70 ~ 80℃,粘度随温度的变化保持为一恒定的值.从总体趋势上看, γ -PGA 溶液粘度随温度的升高而下降,这是因为升高温度使分子热运动加强,分子间相互作用减弱所致.

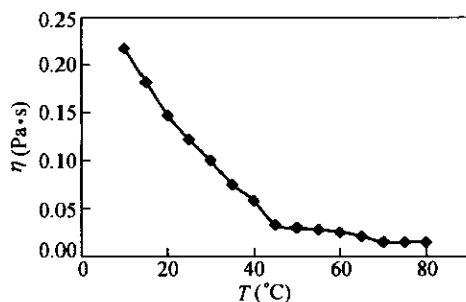


Fig. 3 The relation between viscosity (η) and temperature (T)

2.4 γ -PGA 的动态粘弹性

采用动态实验测试液体的粘弹性时,一般先进行应变扫描,确定线性粘弹区,再进行频率扫描.根据动态模量随频率的变化趋势可以区分液体是否真正具有固体的弹性行为,如果液体仅在短时间内表现出弹性行为而作用时间延长却发生流动,储能模量则随低频区频率的增加而增加^[8,9].图 4 表明,5% γ -PGA 液体的应变扫描曲线可以分为三个区域,当应变小于 0.03 时,储能模量比耗能模量高出一个数量级以上,而且与应变无关,液体表现出固体行为,因此可以将液体的线性粘弹区定为应变小于 0.03;当应变增大至 0.15 附近时,储能模量急剧降低,而耗能模量经最大值后也表现出降低的趋势,该区域称为“固液”两相区;应变增大至 0.7 以上,耗能模量超过储能模量,流体进入液相区,总之,其复合模量 G^* 在应变 $\gamma = 1\% \sim 3\%$ 范围内不受影响.本研究在应变 $\gamma = 3\%$ 的条件下进行.

2.4.1 γ -PGA 的频率扫描 在角频率 $\omega = 0.01 \sim 100 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ 范围内对 2% 和 5% γ -PGA 进行扫描,结果如图 5.图 5 表明 2% 和 5% γ -PGA 的储能模量 G' 和耗能模量 G'' 呈近似线性增大,5% 的 γ -PGA 的 G' 频率响应曲线斜率小于 2% 的斜率,表明高浓度下高聚物分子交联密度更大,形成了更强的凝胶网络. G' 始终远远大于 G'' ,特别在较高的浓度下,说明 γ -PGA 凝胶弹性极佳并且相当稳定.

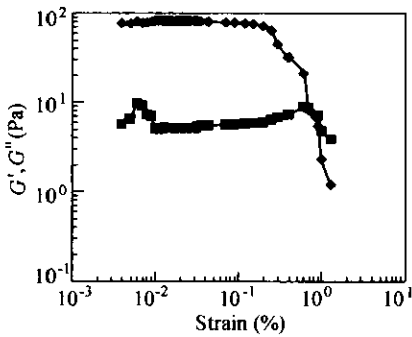


Fig. 4 Strain sweep plots of G' and G'' at constant frequency for a 5% γ -PGA solution

◆ G' ; ■ G''

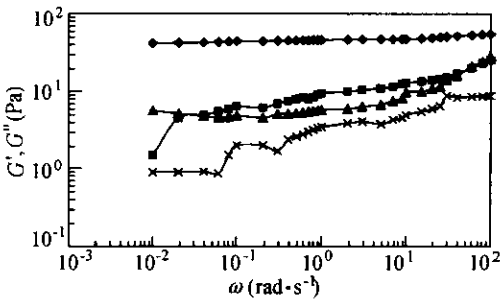


Fig. 5 Frequency sweep of γ -PGA

◆ 5% G' ; △ 5% G'' ; ■ 2% G' ; × 2% G''

2.4.2 不同浓度 γ -PGA 的动态粘弹性 图 6 表明,随 γ -PGA 浓度增大, G' 和 G'' 相应增大,1% 可能接近 γ -PGA 形成凝胶的阈值浓度.实验中观察到 0.7% γ -PGA 也能形成粘弹性较高的粘弹体.

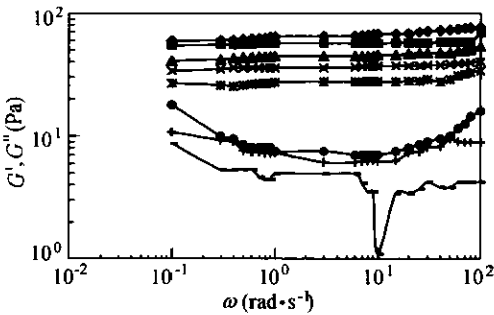


Fig. 6 Storage modulus (G') and loss modulus (G'') of γ -PGA at different concentration.

◆ 4% G' ; ■ 3% G' ; △ 2% G' ; × 1% G' ; * 4% G'' ; ● 3% G'' ; + 2% G'' ; = 1% G''

2.4.3 加热时间对 γ -PGA 动态粘弹性的影响 将 γ -PGA 加热,分别测定 30 min 和 60 min 的

γ -PGA 的 G' 和 G'' ,结果如图 7.图 7 表明,长时间高温加热会降低 γ -PGA 的 G' 和 G'' .2% γ -PGA100℃ 水浴 60 min 后凝胶网络遭到破坏,120℃ 蒸煮 10 min 后,粘弹性丧失,不能形成凝胶,说明 γ -PGA 只能在一定的范围内耐热.

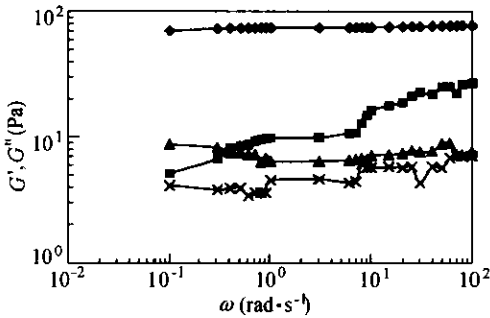


Fig. 7 Storage modulus (G') and loss modulus (G'') of 2% γ -PGA heat at 100℃ for 30 min and 60 min, respectively

◆ 100℃, 30 min G' ; △ 100℃, 30 min G'' ; ■ 100℃, 60 min G' ; × 100℃, 60 min G''

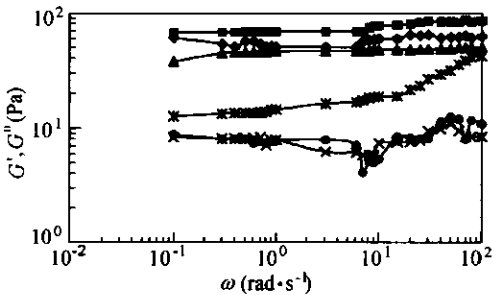


Fig. 8 Effects of pH values on the storage modulus (G') and loss modulus (G'') of 2% γ -PGA heated at 80℃ for 20 min

■ pH 7 G' ; ◆ pH 4 G' ; △ pH 12 G' ; * pH 4 G'' ; ● pH 12 G'' ; × pH 7 G''

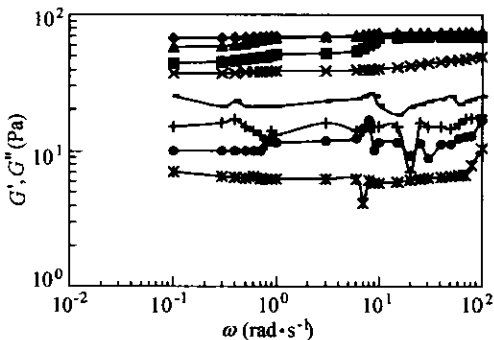


Fig. 9 Effects of various concentrations of NaCl on the storage modulus (G') and loss modulus (G'') of 2% γ -PGA

◆ 2% PGA G' ; △ + 5% NaCl G' ; ■ + 1% NaCl G' ; × + 10% NaCl G' ; ● + 10% NaCl G'' ; + + 5% NaCl G'' ; * + 2% PGA G'' ; + + 1% NaCl G''

2.4.4 pH 值对 γ -PGA 动态粘弹性的影响 以 NaOH 和乙酸调 pH, 80℃ 水浴 20 min 配制 2% PGA 溶液, 以 pH 7 为参照, 改变不同 pH 值, 测定 γ -PGA 的 G' 和 G'' , 结果如图 8. 图 8 表明, pH 为 4 时, G'' 增加幅度较大, 粘性损耗上升, 说明网络结构受损较大; pH 为 12 时, G' 大幅降低, 交联密度下降, 表明偏酸、偏碱对凝胶网络的形成均有一定的负效应.

2.4.5 金属盐对 γ -PGA 动态粘弹性的影响 分别以不同浓度 NaCl 溶液溶胀 2% γ -PGA, 80℃ 水浴 20 min 测定 γ -PGA 的 G' 和 G'' , 结果如图 9.

图 9 显示添加 1% ~ 10% NaCl 后, G' 均在低频区降低, 高频区变化小; G'' 均大幅增加. 表明较高浓度的金属盐对凝胶网络有一定的破坏作用. 实验中观察到 7% KCl、MgSO₄、ZnSO₄、CaCl₂ 对 G' 、 G'' 的影响与 NaCl 有类似的趋势. 但 1.7% 的 PbNO₃ 和 AgNO₃ 均使 γ -PGA 的粘弹性完全丧失.

综上所述, γ -PGA 水溶液属于假塑性流体, 该体系具有良好的粘弹性, 并在一定范围内具有耐热、耐盐和在酸性、碱性条件下具有可溶性、稳定性等良好性能. 这些理论研究将有助于 γ -PGA 的加工、改性及在工业上的广泛应用.

REFERENCES

- 1 Graciela P, Francisco C, Jordi J B, Sebastian M. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 63(1): 110 ~ 115
- 2 Shen W C, Ryser H J P. *Biochem and Biophy Res Commun*, 1981, 102: 1048 ~ 1055
- 3 Xu Fenghua(徐凤华), Jiang Xuetao(蒋雪涛). *Acta Pharmaceutica Sinica(药学报)*, 1996, 31(8): 6321 ~ 636
- 4 Atsuo G, Masao K. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56(7): 1031 ~ 1035
- 5 Masata M, Akinori M J. *Agric Food Chem*, 1998, 46: 891 ~ 895
- 6 Birrer G A, Cromwick A M, Gross P A. *Int J Biol Macromol*, 1994, 16: 265 ~ 275
- 7 Chen Zongqi(陈宗淇), Dai Mingguang(戴闽光), *Colloid Chemistry(胶体化学)*, Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社), 1984. 363 ~ 364
- 8 Wierenga A, Philopse A P Langmair, 1998, 14: 55 ~ 56
- 9 Jiang Tiquan(江体乾). *Industry Rheology(工业流变学)*. Beijing(北京): China Chemical Industry Press(化学工业出版社), 1995. 72 ~ 78

STUDIES ON RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF γ -POLY(GLUTAMIC ACID) PRODUCED BY BACTERIA

YANG Ge^{1,2}, CHEN Jian¹, QU YinBo², LUN ShiYi¹

(¹ Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

(² State Key of Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract The rheological characteristics γ -poly(glutamic acid) (γ -PGA) solution have been investigated. The solution is a typical non-Newtonian shear-thinning fluid with a characteristic n -parameter lower than 1. With temperature raised, the viscosity of γ -PGA solution shows the trend of decreasing. Over the angular frequency (ω) range 0.01 ~ 100 rad·s⁻¹, the storage modulus (G') of 5% (W/V) γ -PGA gels is much higher than its loss modulus (G'') and loss dependent on frequency which showed that γ -PGA has fine elasticity. 1% is close to the threshold concentration needed for gelation. γ -PGA is dispersible in cold water to form weak gel. Continuous heating at high temperature treatment changed the network of γ -PGA gel. Similar results are observed for γ -PGA gels prepared under pH 4 and 12. Addition of 1% ~ 10% NaCl, 7% KCl, MgSO₄, ZnSO₄ and CaCl₂ decrease the G' of 2% γ -PGA gel at low frequency and increased G'' over the frequency rang 0.01 ~ 100 rad·s⁻¹ which indicated that the formation of elastic network is hindered. However, addition of 1.7% PbNO₃ of 1.7% AgNO₃ makes total loss of viscoelasticity of the 2% γ -PGA system.

Key words *Bacillus licheniformis*, γ -Poly(glutamic acid), Rheological characteristics, Dynamic viscoelasticity