

降解大豆分离蛋白 AMPS 接枝共聚物的合成与表征

刘利新, 华菁, 任申玥, 刘燕, 陈明清, 杨成, 刘晓亚

(江南大学化学与材料工程学院, 无锡 214122)

摘要 利用酸性蛋白酶对大豆分离蛋白(SPI)进行降解,得到一系列降解大豆分离蛋白(HSPI)。以过硫酸铵为引发剂、2-巯基乙醇为蛋白质变性剂,在浓度为 8 mol/L 尿素溶液中进行 HSPI 与水性单体 2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸(AMPS)的接枝共聚,得到接枝产物(HSPI-g-PAMPS)。研究了水解度、引发剂用量、反应时间和单体用量对接枝率和接枝效率的影响,并对 HSPI 和 HSPI-g-PAMPS 的溶液性能进行了研究。结果表明:HSPI-g-PAMPS 的 Zeta 电位明显降低、在低剪切速率下 HSPI-g-PAMPS 的粘度最大。

关键词 大豆分离蛋白;降解;接枝共聚;2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸;溶液性能

中图分类号 Q816 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)04-0591-06

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF GRAFT COPOLYMERS OF HYDROLYTIC SOY PROTEIN ISOLATED AND AMPS

LIU Li-xin, HUA Jing, REN Shen-yue, LIU Yan, CHEN Ming-qing, YANG Cheng, LIU Xiao-ya

(Department of Chemical and Material Engineering of Southern Yangtze University, Wuxi 214122)

Abstract A series of the hydrolytic Soy Proteins Isolated (HIPS) were obtained by the enzymatic hydrolysis of Soybean Protein Isolated (SPI) using the acid proteolytic enzyme. The graft copolymers (HSPI-g-PAMPS) of the hydrolytic Soybean Protein Isolated (HSPI) and AMPS had been prepared in 8 mol/L urea aqueous solution under nitrogen atmosphere, using ammonium persulphate (APS) as an initiator, β -mercaptoethanol (ME) as a protein unfolding agent. Evidence of HSPI-g-PAMPS was obtained by comparison of IR Spectro of HSPI and HSPI-g-PAMPS. The effect of time, initiator concentration, degree of hydrolysis and monomer concentration on the graft copolymerization have been studied. The properties of HSPI-g-PAMPS have been characterized and it was shown that the Zeta-potential of HSPI-g-PAMPS was lowest than HSPI. Besides, the viscosity of HSPI-g-PAMPS was the highest under the low cut rate.

Key words Soy protein Isolated; Hydrolysis; Graft copolymerization; 2-Acrylamido-2-methyl propane sulfonic acid

大豆蛋白是富含氨基酸的一类天然蛋白质,是一种可生物降解的植物大分子。大豆资源极其丰富

收稿日期:2007-01-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(NSFC20374025)

作者简介:刘利新(1982-),男,硕士研究生,从事大豆分离蛋白接枝改性研究。Tel:013961798581;E-mail:liulixin821027@hotmail.com

通讯作者:刘晓亚,教授,博士生导师,Tel:0510-89880780,E-mail:lxysy@sytu.edu.cn

且再生速度快,因此,在石油和天然气等合成原料来源日益枯竭的今天,以大豆蛋白制备的可生物降解高分子材料将会有极其光明的应用前景。

纯大豆蛋白的一些性能难以满足日益增长的需要,须对其进行物理、化学或生物改性。化学改性主要包括蛋白质变性、交联、酶改性^[1-3]以及接枝改性等。大豆分离蛋白的降解产物在食品^[4]、化妆品^[5]以及胶粘剂^[6]中有广泛应用。大豆分离蛋白降解方法很多,如酶降解、酸变性、碱变性或是混合降解法。大豆分离蛋白的降解产物具有比原大豆分离蛋白更好的溶解性,提高了大豆分离蛋白的进一步改性能力,扩大了大豆分离蛋白的应用范围。对蛋白质接枝改性的研究大多集中在生物蛋白质方面,如将聚丙烯晴通过自由基共聚接枝到酪蛋白上,以提高它的溶解性和热性能^[7]。在胰凝乳蛋白酶上,利用原子转移自由基聚合,接枝丙烯酸甲酯^[8]。对大豆蛋白接枝改性方面的研究少有报道,尤其是大豆蛋白降解物的接枝改性方面几乎未见报道。本文在前期工作的基础上^[9,10],利用酸性蛋白酶对大豆分离蛋白进行降解,在降解大豆分离蛋白上接枝亲水性单体 2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸(AMPS),提高了大豆分离蛋白的溶解性,改变了其表面荷电性和溶液粘度,拓展了大豆分离蛋白这种可再生、可降解的绿色资源在各个领域的应用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

大豆分离蛋白(SPI),纯度大于 90%(南通光合生物科技有限公司);酸性蛋白水解酶(AP),纯度 95%(无锡酶制剂厂);2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸(AMPS),纯度 98%(山东临邑威思化学有限公司);过硫酸铵(APS),分析纯(爱建德固赛引发剂有限公司生产);2-巯基乙醇(ME)、丙酮、氢氧化钠、盐酸、氯化钠、硼酸、氯化钾等,均为中国医药(集团)上海化学试剂公司生产;无水乙醇,上海振兴化工一厂生产;尿素,中国药集团化学试剂有限公司生产。以上药品无特殊说明,均为分析纯。

HJ-3 型磁力搅拌器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);SHZ-B 型恒温水浴振荡器(上海跃进医疗器械厂);TGL-16 型高速离心机(上海医药分析仪器厂);红外光谱仪(Nicolet Magna 公司);Zeta sizer 2000 型 Z-电位仪(英国 Malvern 公司);

UV-1100 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);精密数显酸度计(上海天达仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆分离蛋白的酸性酶水解 配制 4wt% SPI 溶液 250 mL,在 60℃ 油浴中搅拌 1 h。然后降温至 40℃,调 pH=3,加入 1.0 g 酸性水解酶(50 000 u/g)开始降解,降解过程中滴加 6 mol/L HCl 溶液,以保持 pH=3,水解至 pH 不变时水解结束,再调 pH=10 并保持 10 min 使酶失活。水解液在 4 000 r/min 下离心 15 min,取上清液以其 10 倍体积的丙酮沉淀,再在 2 000 r/min 下离心 15 min,取沉淀放入烘箱 50℃ 下干燥,得到降解大豆分离蛋白(HSPI)。

1.2.2 降解大豆分离蛋白接枝 AMPS 将 0.5 g,水解度(DH%)为 6.71%的 HSPI 缓慢溶于 15 mL, pH=8.5 的 8 mol/L 尿素缓冲溶液中,加入 0.24 g 的巯基乙醇(0.2 mol/L),15℃ 下搅拌 6 h,使蛋白质分子在溶液中充分伸展。在通氮气的条件下分别加入一定量的过硫酸铵和经过中和的 2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸(AMPS)单体水溶液(pH=8.5),在 100 r/min,55℃ 的恒温水浴振荡槽中反应 14 h。反应结束后,用 150 mL 丙酮充分沉淀反应物,离心分离得到沉淀物。再用无水乙醇在索氏萃取器中抽提 24 h,以除去均聚物 PAMPS、未反应的单体及过量的巯基乙醇,真空干燥至恒重,得到降解大豆分离蛋白接枝产物 HSPI-g-PAMPS。用如下公式分别计算接枝率(GP%)和接枝效率(GE%):

$$GP\% = \frac{M_1 - M_0}{M_0} \times 100\%$$

$$GE\% = \frac{M_1 - M_0}{M_2} \times 100\%$$

式中 M_0 , M_1 , M_2 分别代表 SPI、SPI-g-PAMPS 和 AMPS 的质量。

1.2.3 HSPI 和 HSPI-g-PAMPS 的 FTIR 表征

将 HSPI、HSPI-g-PAMPS 充分研磨,以 KBr 研磨压片的方法,用傅里叶变换红外光谱仪在 500~4000 cm^{-1} 的波数范围内进行红外吸收扫描,得到各自的红外谱图。

1.2.4 水解度的测定 在水解过程中,每 10 min 取样 2 mL,在 100℃ 油浴中保持 10 min 使酶失活。然后取 0.5 mL 稀释至 10 mL,并调节 pH=

7,作为样品液。准确称取 40mg 的邻苯二甲醛(OPA)溶解于 1 mL 的甲醇中,分别加入 20wt%的 SDS 2.5 mL,0.1 mol/L 的硼砂 25 mL 及 100 μ L β -巯基乙醇,最后用蒸馏水定容到 50 mL,此为 OPA 试剂,且使用前即时配制。测定时,取 OPA 试剂 4 mL 于试管中,注入 200 μ L 样品液,混匀后于 35℃ 水浴中反应 2 min,在 340 nm 下测其吸光值 A_{340} ,以在 OPA 试剂中加入 200 μ L 水为空白。以赖氨酸作出标准曲线,根据 A_{340} 计算样品中自由氨基的含量 C。然后利用如下公式计算水解度(DH%):

$$DH\% = \frac{(C_t - C_0) \times V}{m \times h} \times 100\%$$

式中 C_t , C_0 , V , m , h 分别代表酶解时间 t 时水解液的氨基含量、水解开始时水解液的氨基含量、溶液的体积、大豆分离蛋白质量、每克蛋白底物具有肽键的 mmol 数。

1.2.5 Zeta 电位的测定 Zeta 电位即带电颗粒表面滑移面上与溶液无穷远处的电位差。众所周知,大豆分离蛋白是典型的两性聚电解质,在大分子的侧链上含有许多的极性基团(如羧基、羟基和氨基)和非极性基团,这些亲水性的极性基团在水溶液中暴露在大豆分离蛋白球的表面,使蛋白球表面带电,所以测定大豆分离蛋白溶液的 Zeta 电位对其溶液性质的表征十分有意义。

将 SPI, HSPI 及 HSPI-g-PAMPS 配成 $C=1 \times 10^{-4}$ g/mL 的水溶液,搅拌 12 h 后用 pH 计调节所需 pH 值,然后再搅拌 2 h 后用 Zeta-电位仪测定溶液的 Zeta 电位。

1.2.6 粘度的测定 将 SPI, HSPI 及 HSPI-g-PAMPS 配成 $C=0.05$ g/mL 的水溶液,搅拌 12 h 后用 pH 计调节 pH=7,然后再搅拌 2 h 后用数字流变仪测定粘度。

2 结果与讨论

2.1 酶解时间对大豆分离蛋白水解度的影响

由图 1 可知,酶解开始的最初 20 min 内为快速水解阶段,水解度增长较快,然后趋于缓和,150 min 之后水解度基本不变,说明水解已经停止。水解过程中,酸性蛋白酶使大豆蛋白球中的肽键断裂,大豆蛋白球被打开,水解产物中亲水性和疏水性侧链基团的存在状态及分布会出现变化。水解使大豆蛋白

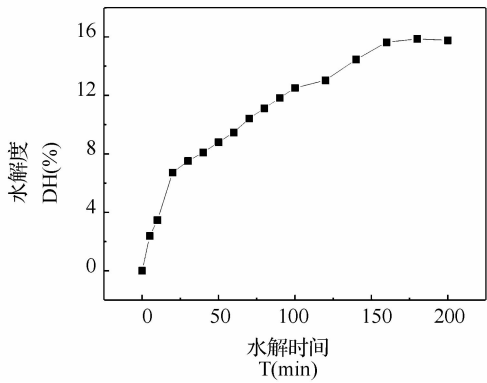


图 1 SP 水解度随水解时间的变化

Fig. 1 The effect of time on degree of hydrolysis of SPI 内部更多的亲水基团暴露出来,蛋白表面的亲水基团增加,从而提高大豆蛋白分子的亲水性,达到改善溶解性之目的,为下一步的接枝共聚提供了更多的活性点。

2.2 HSPI-g-PAMPS 的合成及单因素分析

2.2.1 红外光谱分析 HSPI、HSPI-g-PAMPS 的红外谱图如图 2 所示,与 HSPI 相比,HSPI-g-PAMPS 在 1138 cm^{-1} 、 620 cm^{-1} 处出现了较强的新吸收峰,可以分别归属于 S=O 伸缩振动、和 S-O 的伸缩振动,而 S=O, S-O 来自于 PAMPS 接枝链上的磺酸基团,因此可以初步判断 AMPS 成功接枝到大豆分离蛋白分子链上。

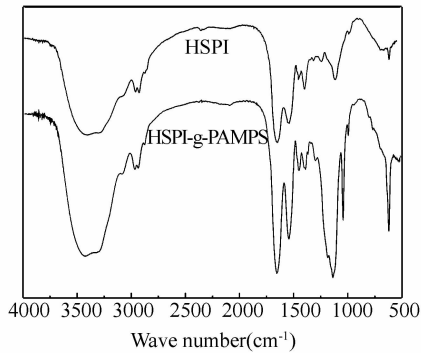


图 2 HSPI(DH=6.71%)和 HSPI-g-PAMPS (DH=6.71%, GP=88%) 的红外谱图

Fig. 2 IR spectra of HSPI(DH=6.71%) and HSPI-g-PAMPS(DH=6.71%, GP=88%)

2.2.2 大豆分离蛋白水解度对接枝率(GP%)和接枝效率(GE%)的影响 图 3 是 SPI 接枝率和接枝效率随水解度的变化图。随着 SPI 水解度的升高,接枝率和接枝效率都呈增大趋势。水解度小于 7% 时,接枝率和接枝效率上升的趋势比较明显,这是因为 AMPS 接枝到大豆蛋白球上,主要是通过打

开大豆蛋白球中的二硫键生成活性种,在其上引发 AMPS 单体的自由基聚合,随着大豆蛋白球的水解,更多的二硫键暴露出来,易形成更多的活性种,因此接枝率和接枝效率显著升高,但大豆蛋白球中所含二硫键的数目是有限的,故水解度大于 8%后,这种增长趋势变的缓和。

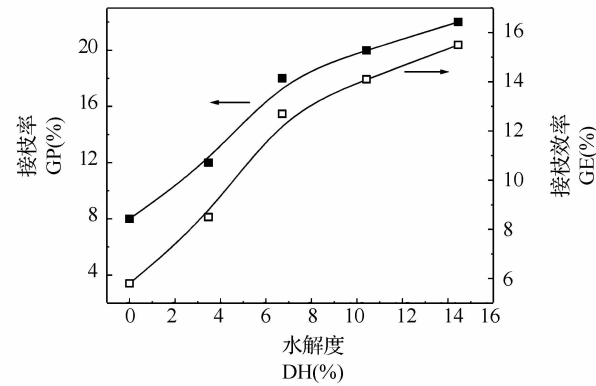


图 3 SPI 水解度对 GP%和 GE%的影响

Fig. 3 The effect of degree of hydrolysis of SPI on GP% and GE% (reaction conditions: SPI=0.5 g, [AMPS]=0.71 g, [APS]=0.040 mol/L, [ME]=0.2 mol/L, 55℃, 14 h)

2.2.3 引发剂浓度对接枝率和接枝效率的影响

图 4 给出了 SPI 接枝率和接枝效率随引发剂浓度的变化趋势,随着接枝共聚反应的引发剂(APS)用量的增加,接枝率和接枝效率呈现先升高再下降的趋势。这是因为反应初期增加引发剂的用量,会使蛋白球上的活性接枝点相应增加,使得接枝率和接

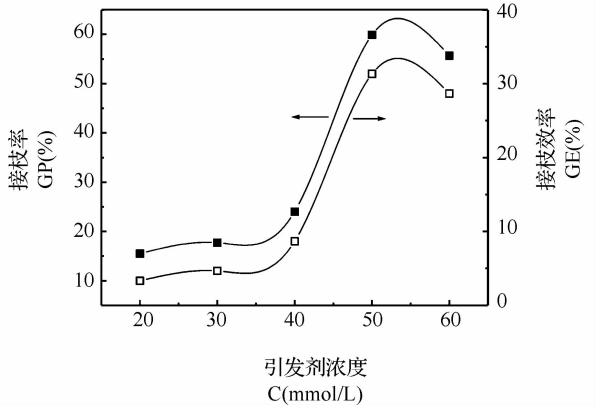


图 4 引发剂浓度对 GP%和 GE%的影响

Fig. 4 The effect of initiator concentration on GP% and GE% (reaction conditions: HSPI=0.5 g, DH=6.71%, [AMPS]=0.71 g, [ME]=0.2 mol/L, 55℃, 14 h)

枝效率都随之上升。但引发剂用量过多时,AMPS 单体的均聚趋势也随之上升,使得接枝率和接枝效率有所下降。

2.2.4 单体 AMPS 用量对 SPI 接枝率和接枝效率的影响

图 5 所示为 SPI 接枝率和接枝效率随单体用量的变化曲线,初期随着单体用量的增加,接枝率的增大比较显著,但接枝效率的增加却比较缓和,因为接枝单体用量的增加,HSPI-g-PAMPS 和均聚物 PAMPS 都会增大,而均聚物的增加会降低接枝效率。故接枝率增加显著,而接枝效率则增加缓慢。

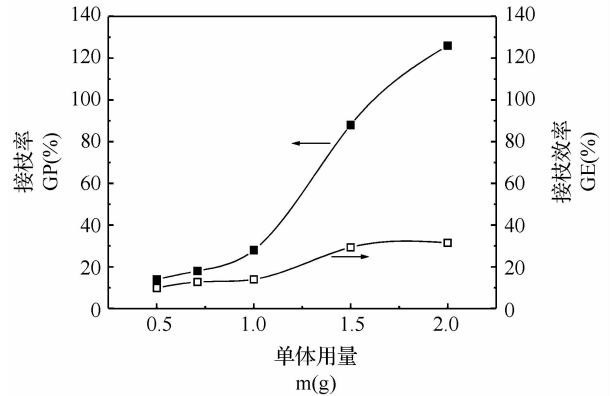


图 5 单体用量对 GP%和 GE%的影响

Fig. 5 The effect of monomer mass on GP% and GE% (reaction conditions: HSPI = 0.5 g, DH = 6.71%, [APS] = 0.040 mol/L, [ME] = 0.2 mol/L, 55℃, 14 h)

2.2.5 接枝反应时间对接枝率和接枝效率的影响

图 6 是 SPI 接枝率和接枝效率随接枝反应时间的变化图,从图中可以看出反应时间 10 h 之前,随着时间的增长,接枝率和接枝效率都显著上升,但超过 10 h 后,反应基本结束,故再延长反应时间,对接枝率和接枝效率的变化影响不大。

2.3 水解大豆分离蛋白接枝产物 (HSPI-g-PAMPS)溶液性质的表征

2.3.1 HSPI-g-PAMPS 的接枝率对其 Zeta 电位的影响

图 7 是 pH=6 时,HSPI-g-PAMPS 水溶液的 Zeta 电位随接枝率的变化。随着接枝率的增加,HSPI-g-PAMPS 蛋白球表面的 Zeta 电位显著下降。AMPS 单体上带有磺酸基团,在水中易电离而荷负电,接枝率的升高,HSPI-g-PAMPS 蛋白球表面所带的磺酸基团增加,会荷更多的负电荷,导致 Zeta 电位下降。

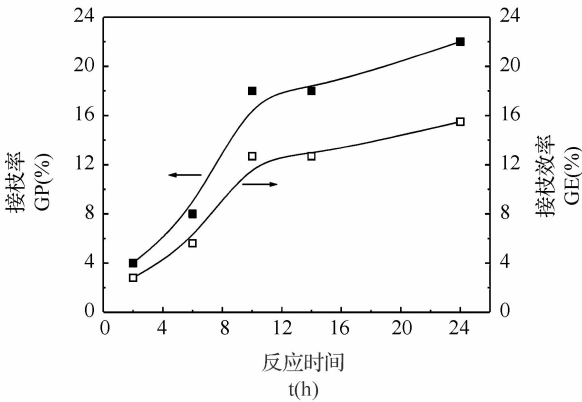


图 6 反应时间对 GP%和 GE%的影响

Fig. 6 The effect of monomer mass on GP% and GE% (reaction conditions: HSPI = 0.5 g, DH = 6.71%, [AMPS]=0.71 g, [APS]=0.040mol/L, [ME]=0.2 mol/L, 55℃)

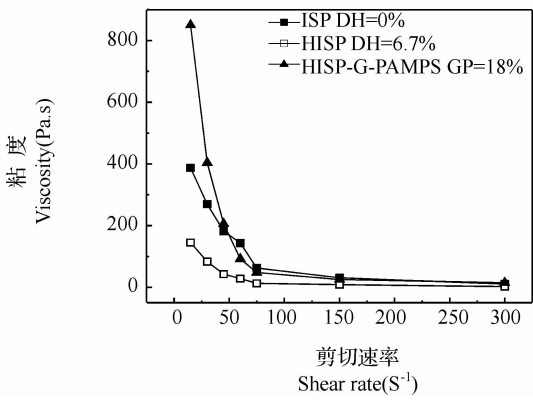


图 8 剪切速率对 SPI、HSPI 和 HSPI-g-PAMPS 溶液粘度的影响

Fig. 8 The effect of shear rate on viscosity of SPI, HSPI and HSPI-g-PAMPS (pH=7, C=0.05g/mL, T=25℃)

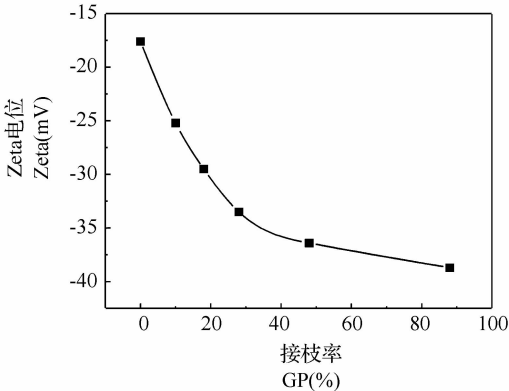


图 7 pH=6 时, HSPI-g-PAMPS 接枝率对 Zeta 电位的影响

Fig. 7 The effect of GP% of HSPI-g-PAMPS on Zeta potential of HSPI-g-PAMPS (pH=6, DH=6.71%, C=1×10⁻⁴ g/mL)

3 结论

利用酸性蛋白酶对大豆分离蛋白进行酶降解, 酶解产物 HSPI 表面所带负电荷增加, 在水溶液中溶解性明显增大, 更有利于接枝共聚反应的进行。以水性单体 2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸 (AMPS) 对酶解产物 HSPI 进行接枝共聚, 得到了接枝共聚物 HSPI-g-PAMPS。对接枝共聚反应中 HSPI 水解度、引发剂浓度、单体用量和反应时间等对接枝共聚反应的影响进行了研究。确定了比较好的反应条件为: HSPI 水解度为 14.45%, 引发剂浓度 0.05 mol/L, 单体用量 2.0 g, 反应时间 10 h。在低剪切速率下 HSPI-g-PAMPS 体系粘度最大, HSPI 次之, SPI 最小。相对于 SPI、HSPI 而言, HSPI-g-PAMPS 体系的 Zeta 电位最低。

2.3.2 剪切速率对 SPI、HSPI、HSPI-g-PAMPS 溶液粘度的影响 图 8 是 pH=7 时, SPI、HSPI、HSPI-g-PAMPS 水溶液的粘度随剪切速率的变化, SPI、HSPI、HSPI-g-PAMPS 水溶液在低剪切速率下均表现为假塑性流体行为, 而在高剪切速率下, 又都表现为牛顿型流体行为。结果表明在低剪切速率下接枝共聚物 HSPI-g-PAMPS 溶液粘度最大, 这是由于亲水 PAMPS 支链的引入, 蛋白质分子的分子质量和溶解性增加, 蛋白质分子所带电荷数增加, 分子相互间的作用力增加, 在溶液中呈较松散状态, 故粘度增加。

参 考 文 献

[1] Kalapathy U, Hettiarachchy NS, Rhee KC. Effect of drying methods on molecular properties and functionalities of disulfidebond 2 cleaved soy proteins [J]. Journal of American Oil Chem Society, 1997, 74: 195-199.

[2] Barman BG. Modification of physical properties of soy protein isolate by acetylation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 25: 618-641.

[3] Kim SH, Kinsella JE. Surface active properties of food proteins; effect s of reduction of disulfide bonds on film properties and foam stability of glycinin [J]. Journal of Food Sci-

ence,1987,52:128—131.

[4] 唐传核,彭志英. 大豆蛋白水解物的苦肽以及脱出方法进展[J]. 中国油脂,2000,25(6):1673.

[5] 陈海敏,华欲飞. 大豆蛋白产品的功能及在化妆品中的应用[J]. 日用化学工业,2000,12(6):626.

[6] 刘玉环,蒋启海. 耐水性大豆基木材胶粘剂两步法工艺研究[J]. 大豆科学,2006,3:259—264.

[7] Dong QZ, You—Lo Hsieh. Acrylonitrile graft copolymerization of casein proteins for enhanced solubility and thermal properties [J]. Journal of Applied Polymer Science,2000,77: 2543—2551.

[8] Bhalchandra S, Lele, Hironobu Murata, Krzysztof Matyjaszewski. Synthesis of uniform protein—polymer conjugates [J]. Biomacromolecules,2005,6:3380—3387.

[9] Dong LX, Yang C, Liu XY. Graft polymerization of styrene on soy protein isolate [J]. Journal of Applied Polymer Science,2005, 98:1457.

[10] 徐玉兰,杨成,刘晓亚,等. 大豆分离蛋白的酶水解[J]. 应用化学,2005,22:557—559.

(上接 590 页)

少,从而发酵豆制品总异黄酮相对含量增加。大豆中总异黄酮具有增强免疫、抗氧化、延缓衰老、改善心功能状态、抗癌等广泛的药理作用。所以加强对大豆发酵制品的开发与研究,有较强的现实意义。

参 考 文 献

[1] 牛丽颖,王鑫国,葛喜珍,等. 淡豆豉提取物降糖有效部位研究[J]. 中药药理与临床,2002,20(5):21—22.

[2] 王鑫国,葛喜珍,白霞,等. 淡豆豉对去卵巢大鼠脂代谢的影响[J]. 中药材,26(9),652—654.

[3] C. Lee Holder, Mona I. Churchwell, Daniel R. Doerge. Quantification of Soy Isoflavones, Genistein and Conjugates in Rat Blood Using LC/ES—MS[J]. Agric Food Chem., 1999,47:3764—3770.

[4] 崔力剑,黄芸,杜淑娟,等. 紫外分光光度法测定淡豆豉中异黄酮的含量[J]. 河北中医药学报,2004,19(3):32—33.

[5] 袁金斌,卢建中. 紫外分光光度法测定大豆总异黄酮的含量[J]. 大豆科学,2004,23 (2):147—150.

[6] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:230.

[7] 窦玉红,崔力剑,黄芸,等. 正交设计优选淡豆豉中总异黄酮的提取工艺[J]. 河北中医药学报,2006,21(2):33—35.

中国农技推广网.cn 重点推荐技术

黑龙江、吉林省和高寒地区,大豆收获可提早 20 日以上
防病虫,抗低温、干旱、水涝、抗早衰,无瘪荚虫荚

增强大豆授粉受精超常规增产

用奇农素 1 袋(10 克)+赤霉素 1/4 袋(0.25 克)+硼肥 100 克(二两)或硼砂 50 克(一两)+尿素 50 克(一两),加水 15 公斤左右(约一喷雾器)喷苗。同时应加杀虫药。该混合液应从初开花期开始,每 10 天左右一次,连喷 2—3 次,喷时要将枝梢花朵全喷到,不能只喷上部叶面。使荚果饱满肥大,无干枯荚,无瘪荚,无虫荚,无虫粒。能抗御高温干旱和低温冷害对授粉的影响,大豆荚无瘪荚虫荚,籽粒饱满,产量可翻番,甚至更多。在黑龙江省、吉林省和高寒地区,显著促早熟,早收获 20 天以上。

玉米、水稻和土豆

增强抗干旱、低温、水涝,增强授粉受精,可提早收获 15 日以上。玉米几乎无秃尖,水稻、小麦几乎无秕壳,增产 100~150 公斤/667 m²。土豆产量可翻番,个大且均匀。

轻松防治各种病害、虫害和草害

轻松解除肥料、农药和除草剂的残毒

可节约肥料、农药和人工 60%以上

感兴趣者来电话或来信,本公司免费赠送少量试验样品和技术资料,以验证其效果,希望合作愉快。

重庆神农科技开发有限公司

地址:重庆市高新区渝州路 50 号 邮编:400039

电话:023—68636321 68699972 技术咨询电话:0916—5515214(晚上)

节假日电话:023—68601660 网址:重庆神农.cn 或 www.cqsnt.com