

荷正电大豆蛋白和丙烯酸的复合体系研究

张 翠¹, 白绘宇², 曲春波¹, 李 博¹

(1. 上海城建职业学院, 上海 200000; 2. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要:通过酶解大豆蛋白获得荷正电大豆蛋白, 采用 HPLC、Zeta 电位、TEM 对其酶解行为进行了追踪, 进一步将酶解得到的大豆蛋白与丙烯酸复合, 对复合物的溶液行为和微结构进行考察研究。结果显示: 酶解大豆蛋白后得到荷正电的球形粒子, 其能够与丙烯酸通过静电作用形成球形的复合物 SPI-AA 纳米粒子, 该球形粒子在加入引发剂引发聚合反应后粒径变小, 在加入交联剂交联后粒径也随之变小。该纳米颗粒在药物负载、生物传感、水处理等领域有较好的应用前景。

关键词:荷正电大豆蛋白(PCSPI); 丙烯酸(AA); 酶解

中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2018. 01. 0136

Study on Composite System of Positively Charged Soy Protein Isolate and Acrylic Acid

ZHANG Cui¹, BAI Hui-yu², QU Chun-bo¹, LI Bo¹

(1. Shanghai Urban Construction Vocational College, Shanghai 200000, China; 2. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Positively charged soy protein isolate(PCSPI) was prepared via the enzymatic hydrolysis of soy protein and the enzymatic hydrolysis process was traced by HPLC, Zeta and TEM. Then the composite of the positively charged soy protein isolate and acrylic acid(AA) was prepared, further the solution behavior and microstructure of the composite were studied. The result showed that the positively charged spherical particles were obtained after the enzymatic hydrolysis of soy protein. These particles could form spherical complex particles with AA through electrostatic interaction. The size of the complex particles became smaller with the addition of initiator or by crosslinking. Such nano-particles could be potentially used in the fields of drug loading, biosensor and water treatment.

Keywords: Positively charged soy protein isolate(PCSPI); Acrylic acid(AA); Enzymatic hydrolysis

大豆蛋白 SPI 是一种来源广泛、环境友好的天然高分子, 其具有可再生、无毒、成本低、可生物降解的优点^[1-5]。一直以来, 许多研究工作聚焦于大豆蛋白的改性和材料化研究, 拓展了大豆蛋白在乳化剂、生物医用材料、包装材料等诸多领域的应用^[6-10]。

聚电解质 - 小分子化合物的复合体系近年来一直是胶体化学及物理化学领域研究的热点。一方面, 聚电解质与荷电的小分子化合物之间通过静电作用, 能够诱导形态各异的聚集体的生成, 被超分子化学及纳米科学领域的研究者所聚焦^[11-14]; 另一方面, 聚电解质 - 小分子化合物的复合体系作为化妆品配方中的基础体系, 其粘度、浊度等宏观性质常常被研究^[15-16]。

SPI 结构中存在大量的羧基和氨基^[17], 在不同的酸碱性环境中表现不同的荷电性质, 因此其本身是一种两性离子型聚电解质。本文通过乙醇处理制备荷

正电大豆蛋白(PCSPI), 再进行常规的酶水解反应, 得到富集正电荷的水解大豆蛋白产品(PCSPI), 该产品与丙烯酸复合, 进一步通过引发剂引发丙烯酸聚合, 以及加入交联剂对其进行调控, 得到 SPI-AA 纳米粒子。该纳米颗粒制备方法简单, 原料来源广泛, 成本低廉, 且在药物负载释放、生物传感、水处理等领域有较好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆蛋白(SPI): 蛋白质含量大于 90%, 南通光合生物科技有限公司; 中性蛋白酶, 上海斯丹赛生物技术有限公司; 丙烯酸, 过硫酸钾, 戊二醛, 乙醇(分析纯 AR), 均购自国药集团化学试剂有限公司。

FTLA2000-104 型傅里叶红外光谱仪 FTIR, 加拿大; 纳米粒度仪, Zetasizer Nano ZS90, 英国 malvern 公

司;VERTEX VI500 型高效液相色谱仪,上海禾工科学仪器有限公司;Zetasizer2000 型电位仪,英国 Malvern 公司;JEOLJEM-2100 型透射电镜(TEM),日本 JEOL 电子株式会社。

1.2 方法

1.2.1 荷正电大豆蛋白(PCSPI)的制备 取大豆分离蛋白粉,加入质量浓度为 65% 的乙醇水溶液,固液比为 1:5,搅拌均匀后放入温度为 50℃ 的水浴中加热 1 h,冷却至室温后离心分离去除上清液,沉淀物在室温下放置 24 h 后再在 80℃ 烘箱中去除残余乙醇。经乙醇处理的物料粉碎后加入 15 倍的去离子水,室温下搅拌 1 h 后,1 500 r·min⁻¹ 离心分离。离心所得的沉淀物中加入适量的水,将固形物含量调节到 6%,加少量的 NaOH 至 pH7,加入中性蛋白酶在 50℃ 下水解,用 pH-stat 法控制水解度为 20%,加 Cl 调节体系 pH4.5 终止酶水解。1 500 r·min⁻¹ 离心分离,上清液微孔膜过滤,得到富含正电荷的大豆蛋白(PCSPI)。

1.2.2 荷正电大豆蛋白(PCSPI)的表征

HPLC 表征:测定在不同酶解时间下样品分子量及分布。

Zeta 电位表征:将制得的大豆分离蛋白溶液稀释到浓度为 1 mg·mL⁻¹ 然后进行电位测定,每个样品测 4 次,然后取其平均值,确定溶液的带电性。

TEM 表征:将大豆分离蛋白溶液稀释到 0.1 mg·mL⁻¹,然后将样品溶液滴到铜网上,干燥一段时间后,通过透射电镜观察其结构。

1.2.3 荷正电大豆蛋白与丙烯酸复合物(PCSPI/AA)的制备 称取 0.6 g 丙烯酸配制成 50 mL 丙烯酸溶液,然后将 20 mL 带正电荷的大豆分离蛋白溶液加入到丙烯酸溶液中;以 0.02 g 过硫酸钾为引发剂,在 80℃、氮气和磁搅拌器的条件下进行复合反应,反应进行 3 h 时终止反应;称取 0.01 g 的戊二醛作为交联剂,然后将戊二醛加入到上述样品中,在 40℃ 下反应 2 h。

1.2.4 荷正电大豆蛋白与丙烯酸复合物(PCSPI/AA)的表征

Zeta 电位表征:将制得的大豆蛋白与丙烯酸复合物溶液稀释到浓度为 1 mg·mL⁻¹ 然后进行电位测定,每个样品测 4 次,然后取其平均值,确定溶液的带电性。

纳米粒度测定:将制得的大豆蛋白与丙烯酸复合

物溶液稀释到浓度为 1 mg·mL⁻¹,用纳米粒度仪测试其粒径。

TEM 表征:将大豆蛋白与丙烯酸复合物溶液稀释到 0.1 mg·mL⁻¹,然后将样品溶液滴到铜网上,干燥一段时间后,通过透射电镜观察其结构。

FTIR 表征:将样品烘干后,磨碎制成盐片,然后放在红外光谱仪上进行测定。

1.3 数据分析

应用 Origin 8.1 绘图。

2 结果与分析

2.1 大豆蛋白的酶解行为

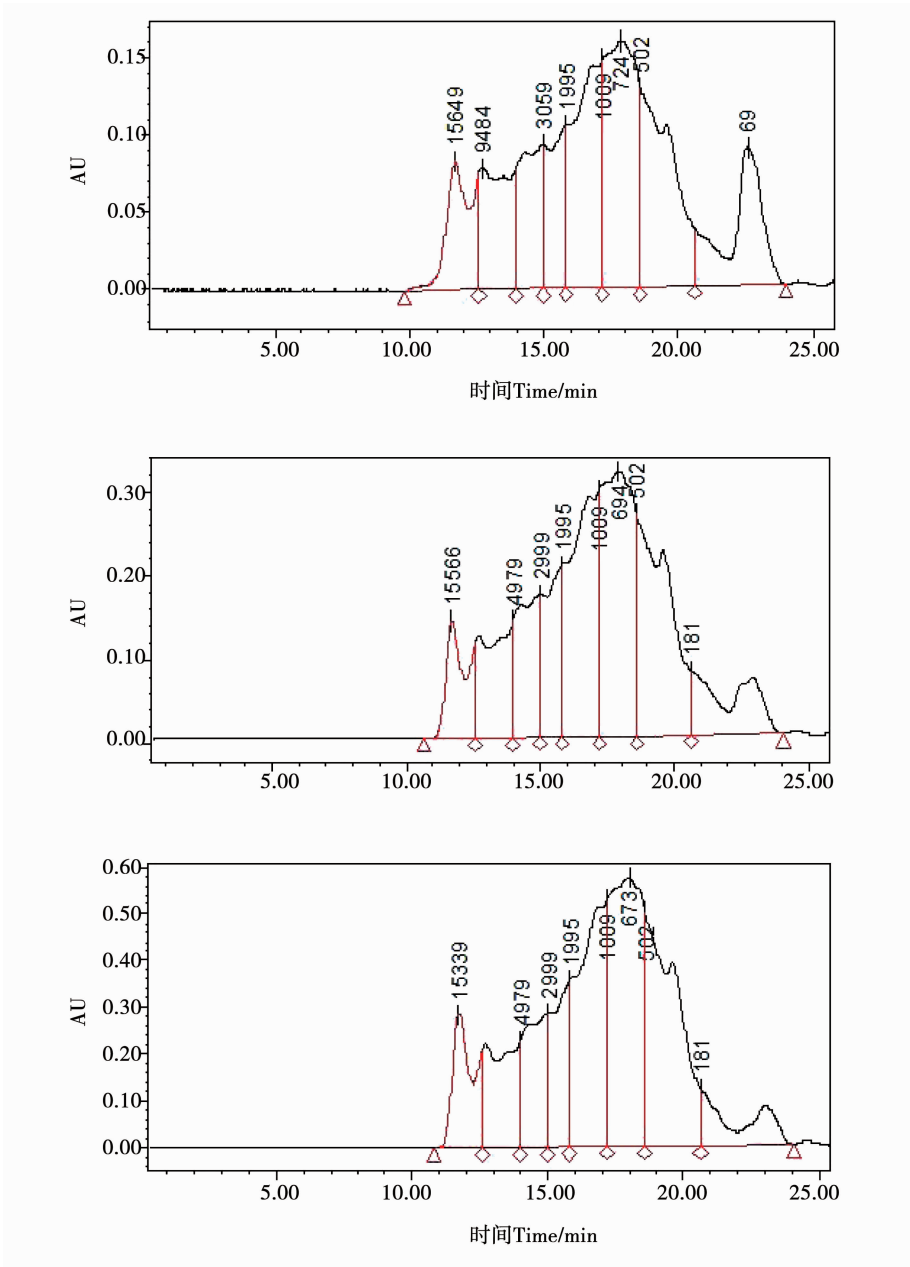
2.1.1 HPLC 表征 不同酶解时间的大豆分离蛋白的高效液相色谱图如图 1(a-c)所示。大豆蛋白经酶法水解后得到的酶解物中存在着各种分子量大小不等的肽分子且呈连续分布。由图 1 可知,当酶解时间为 20 min 时,分子量在 724 Da 吸光度最大(图 1a);当酶解时间为 30 min 时,分子量在 694 Da 吸光度最大(图 1b);当酶解时间为 40min 时,分子量在 673 Da 吸光度最大(图 1c)。

2.1.2 Zeta 电位表征 图 2 为随酶解时间的延长,大豆蛋白溶液的 Zeta 电位变化结果。可见,酶解进行之前,SPI 呈电负性,随着酶解的不断进行,Zeta 电位值逐渐上升,当酶解时间达到 20 min 后,溶液的 Zeta 电位基本不再变化。最终在酶解 50 min 时测得 Zeta 电位值为 24.32 mV。

2.1.3 TEM 表征 将酶解后的大豆分离蛋白制样进行了 TEM 的测试,测试结果如图 3 所示,酶解后的产物呈球形,其粒径在 200~400 nm 左右。经过 Zeta 电位和 TEM 表征后,可以推断,SPI 酶解产物的表面聚集了正电荷且其结构为球形的。

2.2 荷正电大豆蛋白与丙烯酸复合物(PCSPI/AA)的溶液行为

表 1 为荷正电大豆蛋白与丙烯酸复合前后,以及聚合反应发生前后,交联后的 Zeta 电位。由表 1 可以看出,酶解后的大豆分离蛋白溶液与丙烯酸复合之后,带正电荷的大豆蛋白(PCSPI)和丙烯酸(AA)发生静电作用,丙烯酸中的羧酸根吸附在荷正电大豆蛋白表面,中和了部分正电荷,因而 Zeta 电位由 24.32 mV 变为 -7.27 mV。



a: t = 20 min; b: t = 30 min; c: t = 40 min

图 1 不同酶解时间的大豆分离蛋白高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC image of soy protein isolated with different enzymatic hydrolysis time

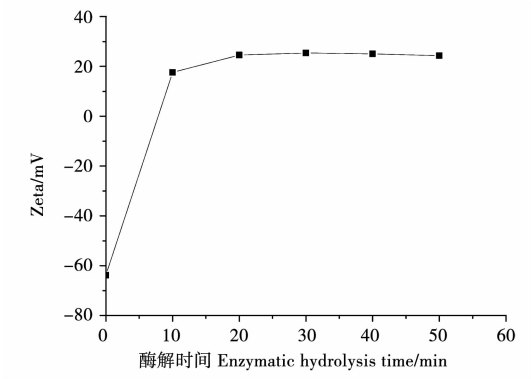


图 2 SPI 的 Zeta 电位随着酶解时间的变化

Fig. 2 Zeta potential of soy protein isolate with different enzymatic hydrolysis time

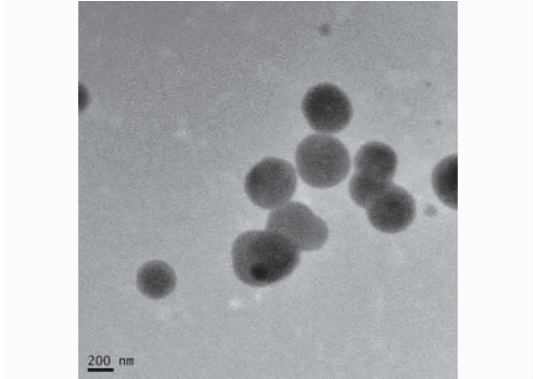


图 3 酶解后的大豆蛋白的透射电镜图

Fig. 3 TEM of soy protein isolate after enzymatic hydrolysis

表 1 大豆分离蛋白与丙烯酸复合物的 Zeta 电位

Table 1 Zeta potential of complex of SPI and AA

样品 Sample	Zeta 电位 Zeta potential /mv
酶解后 SPI	24. 32
SPI after enzymatic hydrolysis	
SPI 和 AA 复合(聚合反应前)	-7. 27
Complex of SPI and AA (Before polymerization)	
SPI 和 AA 复合(聚合反应后)	-10. 17
Complex of SPI and AA (After polymerization)	
SPI 和 AA 复合(交联后)	-20. 16
Complex of SPI and AA (after crosslinking)	

加入引发剂后,引发丙烯酸发生聚合反应,Zeta 电位变为 -10. 17 mV,推测认为形成的聚丙烯酸通过氢键和静电作用,组装在 SPI 的表面,而且聚合的发生导致 SPI 球形粒子变得紧密,进而 SPI 表面的正电荷不能被充分暴露,导致 Zeta 电位值有所下降。加入交联剂戊二醛后,交联反应进一步固定了酶解后的大豆分离蛋白,使得 SPI 球形粒子更加紧密,因此暴露在 SPI 表面的正电荷会随之减少,导致 Zeta 电位值的进一步降低。

表 2 为荷正电大豆蛋白与丙烯酸复合前后,以及聚合反应发生前后,交联后的粒径变化。从表 2 可以看出,酶解后的大豆分离蛋白与丙烯酸溶液复合后平

均粒径显著变大,由 300 nm 增加为 535 nm,这是由丙烯酸吸附在荷正电大豆蛋白表面得到的松散结构所致。加入引发剂之后,复合物的粒径变小,这是因为丙烯酸发生聚合反应,使得复合体系从宽松的结构逐渐变成紧密的结构,表现在复合物的粒径变小;当加入交联剂后,体系的结构更加密实,粒径更小。

表 2 大豆分离蛋白与丙烯酸复合物的粒径

Table 2 Diameter of complex of SPI and AA

样品 Sample	平均粒径 Mean diameter /nm
酶解后 SPI	300
SPI after enzymatic hydrolysis	
SPI 和 AA 复合(聚合反应前)	535
Complex of SPI and AA (Before polymerization)	
SPI 和 AA 复合(聚合反应后)	436
Complex of SPI and AA (After polymerization)	
SPI 和 AA 复合(交联后)	345
Complex of SPI and AA (after crosslinking)	

对荷正电大豆蛋白与丙烯酸复合物(PCSPI/AA)聚合反应前后进行 TEM 测试,如图 4 所示。结果显示:聚合前表现出较为松散的球形结构,聚合反应后使得球形粒子表面发生作用,进一步压缩了球形粒子,导致其结构变为不规则。

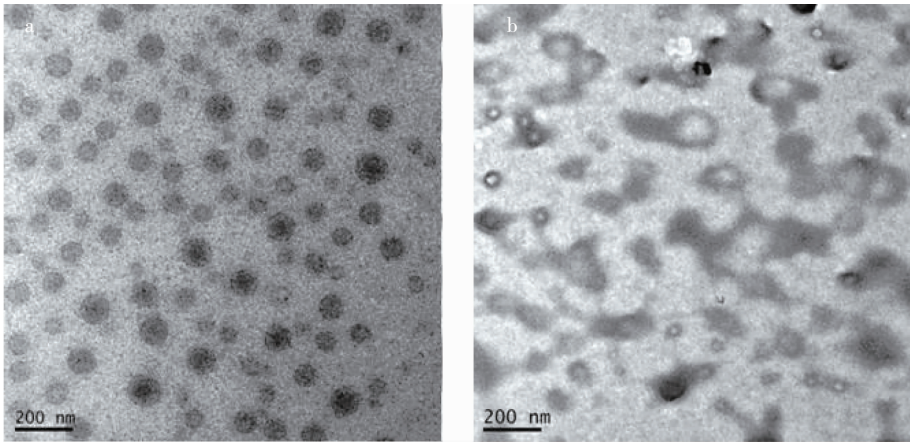


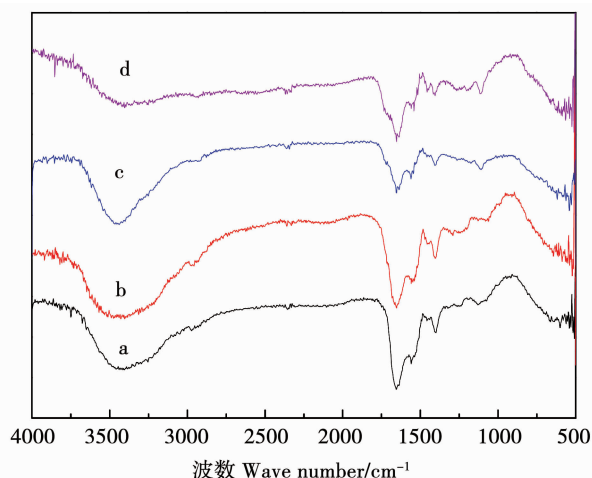
图 4 荷正电大豆蛋白与丙烯酸复合物聚合反应前(a)与聚合反应后(b)的透射电镜图

Fig. 4 TEM of PCSPI/AA complex before polymerization(a)
and after polymerization(b)

2.3 荷正电大豆蛋白与丙烯酸复合物(PCSPI/AA)的结构

对酶解后的大豆分离蛋白及荷正电大豆蛋白与丙烯酸复合物进行红外光谱分析(图 5),结果表面:酶解后的大豆分离蛋白在1 680 cm⁻¹出峰为 C = O 特征吸收,在3 480 cm⁻¹出峰为大豆蛋白结构中氨基的特征吸收。可以看出,从 a ~ d 分析,1 680 cm⁻¹处的

特征吸收未发生任何变化,但是 3 480 cm⁻¹处的特征吸收存在显著的变化。这是由于大豆蛋白结构中的作用位点来源于其结构中的氨基,其能够与丙烯酸中的羧基形成静电作用,因而在进一步的聚合以及交联后,PCSPI/AA 微结构也发生了变化,进而该峰发生了明显变化。



a: 酶解后的 SPI; b: SPI 与 AA 复合(聚合反应前); c: SPI 与 AA 复合(聚合反应后); d: SPI 与 AA 复合(交联后)

a. SPI after enzymatic hydrolysis; b. PCSPI/AA complex before polymerization; c. After polymerization; d. PCSPI/AA complex after crosslinking.

图 5 酶解后的大豆分离蛋白及荷正电大豆蛋白与丙烯酸复合物的红外吸收谱

Fig. 5 Infrared absorption spectrum of SPI after enzymatic hydrolysis and PCSPI with AA

3 结 论

通过乙醇处理大豆分离蛋白,使其中的可溶性蛋白质变性为不溶性蛋白质,其中带正电荷的氨基酸残基富集在不溶性的蛋白质中,而带负电荷的氨基酸残基富集在可溶性蛋白质中,不溶性大豆蛋白经过研磨后,再进行常规的酶水解反应,HPLC、Zeta 电位、TEM 表征得到富集正电荷的水解大豆蛋白产品(PCSPI)。其次,将得到的荷正电的 SPI 与丙烯酸复合,通过静电作用形成 SPI-AA 纳米粒子,进一步加入引发剂引发丙烯酸聚合,以及加入交联剂对纳米粒子进行交联调控,并对该纳米粒子的形貌、电位、粒径等进行了表征,纳米粒子粒径发生改变,体系的结构更加密实,粒径更小。这样的纳米颗粒有望应用于生物传感、药物负载释放、水处理等领域。

参考文献

- [1] Graiver D, Waikul L H, Berger C, et al. Biodegradable Soy protein-polyester blends by reactive extrusion process[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2010, 92(5): 3231-3239.
- [2] Liu D G, Tian H F, Jia X W. Effects of calcium carbonate polymorph on the structure and properties of soy protein-based nanocomposites[J]. Macromolecular Bioscience, 2010, 8(5): 401-409.
- [3] Macdonald R S, Pryzbyszewski J, Hsieh F H. Soy protein isolate extruded with high moisture retains high nutritional quality[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(9):

3550-3555.

- [4] Canabadyrochelle L S, Sanchez C, Mellema M, et al. Study of calcium-soy protein interactions by isothermal titration calorimetry and pH cycle[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(13): 5939-5947.
- [5] Wang G H, Zhou A N, Hu X, et al. Effect of coal filler on the properties of soy protein plastics[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2010, 102(4): 3134-3143.
- [6] Jiang J, Chen J, Xiong X L, et al. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(16): 7576-7583.
- [7] Wang E Y, Sanjeeva G, et al. Identification and characterization of topoisomerase II inhibitory peptides from soy protein hydrolysates[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2008, 56, 6267-6277.
- [8] Xu K K, Yao P. Stable oil-in-water emulsions prepared from soy protein-dextran conjugates[J]. Langmuir, 2009, 25(17): 9714-9720.
- [9] Huiyu B, Rakesh K, Yang C, et al. Effect of salicylic acid on the mechanical properties and water resistance of soy protein isolate films[J]. Smithers Rapra Technology, 2010, 18(4): 197-203.
- [10] 张翠, 徐晶, 白绘宇, 等. SPI/HA/CMC 三元复合膜的制备及其性能研究[J]. 大豆科学, 2015, 34(4): 690-694. (Cui Z, Jing X, Bai H Y, et al. Preparation and study of SPI/HA/CMC ternary composite film[J]. Soybean Science, 2015, 34(4): 690-694.
- [11] Lam V D, Walker L M. A pH-induced transition of surfactant-polyelectrolyte aggregates from cylindrical to string-of-pearls structure[J]. Langmuir, 2010, 26(13): 10489-10496.
- [12] Hu Z, Jonas A M, Varshney S K, et al. Dilution-induced spheres-to-vesicles morphological transition in micelles from block copolymer/surfactant complexes[J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(18): 6526-6527.
- [13] Wang X Y, Li Y J, Li J X, et al. Salt effect on the complex formation between polyelectrolyte and oppositely charged surfactant in aqueous solution[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2005, 109(21): 10807-10812.
- [14] Annaka M, Morishita K, Okabe S. Electrostatic self-assembly of neutral and polyelectrolyte block copolymers and oppositely charged surfactant[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2007, 111(40): 11700-11707.
- [15] Yang J, Chen S, Fang Y. Viscosity study of interactions between sodium alginate and CTAB in dilute solutions at different pH values[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 75(2): 333-337.
- [16] Karlberg M, Piculell L, Huang L. Solubility of amylose/ionic surfactant complexes in dilute aqueous solutions: Dependence on surfactant concentration[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 70(3): 350-354.
- [17] 白绘宇, 徐晶, 屈海军, 等. 大豆蛋白光敏接枝物 SPI-g-P(VM-co-AMPS)的合成及溶液行为研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(3): 475-479. (Bai H Y, Xu J, et al. Synthesis and solution behavior of photo-sensitive graft copolymers based on soy protein isolate[J]. Soybean Science, 2011, 30(3): 475-479.