



碱性蛋白酶改性大豆蛋白胶黏剂的研究

高 敏, 安丽平, 刘志罡

(内蒙古农业大学 理学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘 要:为解决大豆蛋白胶黏剂相对分子量高、黏度大以及改性剂用量多等问题,需要制备一种由碱性蛋白酶改性的新型大豆蛋白胶黏剂,使其满足室内使用胶合板及胶合制品的要求。本研究以脱脂大豆蛋白粉为主要研究对象,碱性蛋白酶作为改性剂,探究不同酶添加量、pH、酶解温度、酶解时间对大豆蛋白胶黏剂胶合强度的影响,并通过正交试验对其工艺条件进行优化。结果表明:大豆蛋白胶黏剂适宜反应条件为碱性蛋白酶添加量 $10\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 、pH9.5、酶解温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、酶解时间 100 min 。改性胶黏剂与未改性的大豆蛋白胶黏剂相比,黏度由 $2\,400\text{ s}$ 降低为 13 s ,胶合强度由 0.74 MPa 提高为 0.98 MPa ,符合国家标准 GB/T 9846—2004 II 类胶合板要求。试验表明碱性蛋白酶改性大豆蛋白胶黏剂在胶合板生产领域中具有良好的应用前景。

关键词:脱脂大豆蛋白粉;胶黏剂;碱性蛋白酶;绿色环保

Study on Alkaline Protease Modified Soybean Protein Adhesive

GAO Min, AN Liping, LIU Zhigang

(College of Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: In order to solve the problems of low bonding strength and high viscosity of soybean protein adhesive and toxic volatile substances such as formaldehyde in the adhesive, a new type of green soybean protein adhesive was prepared to meet the requirements of indoor use of plywood and glued products. In this study, defatted soybean protein powder was taken as the main research object, and alkaline protease was used as the modifier to explore the effects of different enzyme additions, pH, enzymolysis temperature, and enzymolysis time on the bonding strength of soybean protein adhesive. The optimum reaction conditions of soybean protein adhesive were obtained through orthogonal design experiment enzymolysis as follows: alkaline protease $10\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, pH9.5, temperature $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ and time 100 min . Compared with unmodified soybean protein adhesive, the viscosity of modified adhesive decreased from $2\,400\text{ s}$ to 13 s , and the bonding strength was increased from 0.74 to 0.98 MPa , meeting the requirements of the national standard GB/T 9846 – 2004 Class II plywood. The experiment shows that the alkaline protease modified soybean protein adhesive has a good application prospect in the field of plywood production.

Keywords: defatted soybean protein powder; adhesive; alkaline protease; green and environmental protection

大豆蛋白作为球形结构,很多疏水基团和活性基团都隐藏在其内部,通过降解可以破坏其球形结构,暴露出疏水基团和活性基团是其改性的关键所在^[1]。目前,蛋白质改性方法主要包括物理改性、化学改性和酶法改性^[2-3]。物理改性方法主要是利用热处理、超声、超高压、射线等改变蛋白质的空间结构或聚集方式,但物理改性往往只能改变分子链的柔顺性等特征,改性效果不明显^[4]。化学改性通过添加化学试剂使部分肽键断裂或引入新的功能基团,主要包括酰化、酯化、糖基化、氧化作用及共价交联作用等^[5]。化学改性可以对蛋白质分子结构进行有效地修饰,但是化学改性工艺相对复杂,所涉及到的化学试剂及其反应产物带来的安全问题,另外需要加入大量的变性剂和交联剂才能获得良好的粘合性能^[6-7]。

酶法改性又称酶促修饰,通过蛋白酶部分降解蛋白质,增加大豆蛋白分子内或分子间的基团活性基团,或连接特殊功能基团,可改变蛋白质的功能特性^[8]。蛋白酶是能够水解蛋白质中肽键结构,产生氨基酸或多肽的一类酶的总称,是一种重要的工业酶,在全球酶总产值中占 60% 左右,广泛应用于食品、医药、洗涤及饲料等领域^[9]。Xu 等^[10]受分子重组增强材料性能理论的启发,采用菠萝蛋白酶降解大豆蛋白分子,使其形成小分子多肽链;采用生物衍生的交联剂三缩水甘油胺 (TGA) 重组这些多肽链,以开发具有优异和稳定粘合性能的新型清洁的大豆蛋白基胶黏剂,结果表明,添加 0.4% 菠萝蛋白酶可使大豆蛋白的分子量从 $10\sim170\text{ kDa}$ 降低到 25 kDa 以下,加入 3% TGA 和 0.1% 菠萝蛋白酶,所得胶粘剂的粘度比未改性胶粘剂降低 95%,湿剪切

收稿日期:2023-01-17

第一作者:高敏(1997—),女,硕士研究生,主要从事生物质资源开发与利用研究。E-mail:2771378223@qq.com。

通讯作者:安丽平(1977—),副教授,硕导,主要从事生物质资源开发与利用研究。E-mail:shuijing_alp@126.com。

强度提高 76.2%,达到 1.11 MPa。同时,胶黏剂分布、粘接稳定性都有明显改善,与其他交联改性大豆蛋白胶黏剂相比,这种分子重组大豆蛋白胶黏剂减少了交联剂用量 50% 以上。与其他传统的商用胶粘剂相比,酶改性为木材工业提供了一种清洁木材胶黏剂和胶合板产品的新选择。朱劲^[11]在水解工艺为温度 37 ℃、pH1.8、胃蛋白酶酶添加量 14 000 U·g⁻¹,水解时间 3 h 时,水解度为 23.4% 条件下,大豆蛋白水解液中多肽混合物的分子量大多在 1 000 Da,疏水性基团也暴露得最多,适宜与其它化学药剂发生交联反应而制备出耐水性能较好的大豆蛋白胶黏剂。上述两位学者使用的蛋白酶为植物蛋白酶与动物蛋白酶,其价格昂贵,来源少等原因限制了其在胶合板行业的应用。

蛋白酶作为一种生物催化剂,可分为动物蛋白酶、植物蛋白酶和微生物蛋白酶,动物蛋白酶如胃蛋白酶、胰蛋白酶等价格昂贵、副反应多,植物蛋白酶来源少、根据酶最适反应 pH,微生物源蛋白酶可被分为酸性(pH3.8~5.6)、中性(pH5~8)和碱性(pH9~11)三类微生物蛋白酶,其分布广泛,种类繁多,来源于微生物的蛋白酶由于其能够被大规模发酵制备、易于纯化等特点而更受关注。来源于微生物的蛋白酶占全球商品蛋白酶的三分之二,与植物和动物源蛋白酶相比,微生物源蛋白酶更能满足工业生产所需^[12-13]。根据酶对底物的作用方式不同,可以将蛋白酶分为内肽酶与外肽酶。内切酶从蛋白质的内部切割肽键,产生小分子的蛋白胍或蛋白胨,外切酶则从蛋白质的-COOH 或-NH₂端逐个切割,产生游离氨基酸,用于工业生产的蛋白酶以内切酶为主^[14]。

碱性蛋白酶大多作为功能性成分在食品工业中应用广泛,在胶黏剂行业中鲜有研究。碱性蛋白酶用量少、催化活性高、条件温和、环保无污染,而且碱性蛋白酶改性从蛋白质的-COOH 或-NH₂端逐个切割,会一定程度地水解肽链中的肽键或酰胺键,增加大豆蛋白胶黏剂体系中官能团的数量,暴露更多的活性基团,增强大豆蛋白的胶合强度^[15-18]。故本研究首次使用碱性蛋白酶作为改性剂改性大豆蛋白胶黏剂,在改性过程中及改性后大豆胶黏剂的使用都环保无污染,旨在制备一种环保改性的大豆胶黏剂,是为绿色环保新型胶粘剂材料的尝试性使用。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

1.1.1 试剂 脱脂大豆蛋白粉(SPP),蛋白质质量百分含量 56%,上海鑫泰实业有限公司;氢氧化钠,天津市风船化学试剂科技有限公司;碱性蛋白酶(100 000 U·g⁻¹),仰韶生物科技有限公司。

1.1.2 仪器 增力电动搅拌器(JJ-1,金坛市医疗仪器厂);电子天平(JY2001,上海浦春计量仪器有限公司);微机控制万能力学试验机(SFL-50KNAG,岛津公司);分析天平(SQP,赛多利斯科学仪器有限公司);烘箱(101A-3B,北京普析通用仪器有限公司);傅里叶红外变换仪(Spectrum65,铂金埃尔默股份有限公司);平板硫化机(XLB-350 * 350,青岛光越橡胶机械制造有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 预热处理试验 向配有机机械搅拌棒的三颈瓶中加入蒸馏水和一定量的大豆蛋白粉,将配制好的大豆蛋白溶液放入 90 ℃ 的水浴锅中加热 15 min,加热过程中不断搅拌大豆蛋白溶液,加热完成后冷却至室温,进行下一步反应。

1.2.2 单因素试验 预热处理后的大豆蛋白溶液,在一定的底物浓度、酶解温度、pH、酶解时间和酶添加量下进行酶解反应,酶解过程中用 1 mol·L⁻¹的氢氧化钠调节 pH 为恒定值。待反应结束后在 90 ℃ 下水浴加热 15 min 钝化酶,3 次重复。

1.2.3 正交试验设计 在单因素试验的基础上,设计正交实验,制备胶合板样品,以胶合强度为指标,考察酶添加量、酶解温度、时间、pH 的影响,得到相应的试验结果,确定最优试验条件,3 次重复。

1.2.4 对照试验 按照正交试验所得的最佳试验条件制备酶改性大豆蛋白胶黏剂,并制备未改性的大豆蛋白胶黏剂。通过傅里叶变化红外光谱,热重表征、胶合性能测试、固体含量、黏度等因素的对比,确定碱性蛋白酶是否对胶黏剂的结构和胶合性能产生影响。

1.3 测试项目及方法

1.3.1 胶合板样品的制备 对杨木单板实行双面施胶,单面施胶量为 220 g·m⁻²,开放陈化 15 min 后放入平板硫化机,热压工艺条件:热压温度 120 ℃,热压压力为 1.0~1.2 MPa,热压时间为 8 min。胶合板在室温环境下放置 24 h 后进行锯制,样品的锯制尺寸如图 1 所示。

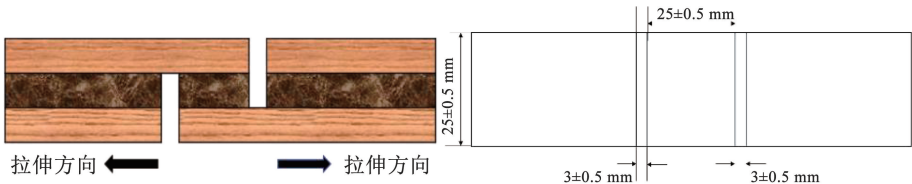


图 1 锯制尺寸

Fig. 1 Sawing dimensions

1.3.2 胶合强度的测量 将样品 (100 mm × 25 mm) 放入万能力学试验机测试^[19], 拉伸速度为 10 mm·min⁻¹, 每组至少重复 3 次。胶合强度计算公式为: $\sigma = \frac{P_{\max}}{S}$, $S = b \times l$; 式中, σ 为胶合强度, 单位 MPa; P_{\max} 为试件破坏时的最大载荷, 单位 N; S 为剪切面的面积, 单位 mm², 记为 625 mm²; b 为剪切面的宽度, 单位 mm, 记为 25 mm; l 为剪切面的长度, 单位 mm, 记为 25 mm。

1.3.3 固体含量测试 根据 GB/T2793-1995 的要求, 使用烘箱干燥法确定固体含量 (X)。将约 1.0 g (重量 m) 的胶黏剂放入烘箱, 在 105 ± 2 °C 下干燥 180 ± 5 min, 直至获得恒定重量 (m_1)。每组至少重复 5 次, 并用公式计算固体含量^[19]:

$$X(\%) = \frac{m_1}{m} \times 100$$

1.3.4 黏度测试 根据 GB/T2793 - 1995 的要求, 将 50 mL 黏度杯垂直固定在支架上, 在黏度杯流出孔下放 50 mL 量筒, 流出孔距离量筒底 20 cm。将胶黏剂倒入黏度杯的同时用手堵住流出孔, 试样倒满黏度杯后, 记录手指移开流出孔至量筒中 50 mL 刻度线时的时间, 以流出时间 (s) 作为试样黏度, 每个试样重复两次, 取算数平均值作为实验结果^[20]。

1.3.5 FT-IR 测试 称取一定量的大豆蛋白胶黏剂样品, 在 120 °C 条件下加热 3 h 至完全固化, 研磨成颗粒后进行红外测试。扫描次数 32 次, 光谱范围为 500 ~ 4 000 cm⁻¹, 分辨率为 4 cm⁻¹。

1.3.6 TG 测试 称取一定量大豆蛋白胶黏剂样品, 在 120 °C 条件下加热 3 h 至完全固化, 研磨成颗粒后进行热重测试。测试在氮气氛围中进行, 样品量为 5 mg 左右, 测试温度范围为 30 ~ 600 °C, 升温速率为 10 °C·min⁻¹, 气体流量为 20 mL·min⁻¹。

1.4 数据分析

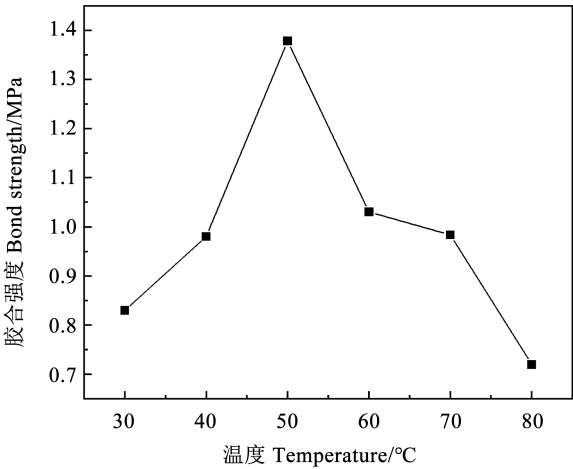
使用 Excel 2019 统计数据和图表制作, 运用 Origin 8 软件进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 碱性蛋白酶适宜水解的单因素试验

2.1.1 酶解温度 底物浓度 20%, pH 恒定 10.0,

酶添加量 10 000 U·g⁻¹, 酶解温度分别为 30, 40, 50, 60, 70 和 80 °C 的条件下酶解 2 h, 研究酶解温度对胶合强度的影响 (图 2)。在 30 ~ 50 °C 的范围内, 随着温度的升高, 胶合强度也随之升高, 这可能是由于适当的加热可使酶活性处于最佳状态, 而且也可使大豆蛋白的结构变松散, 从而暴露出更多与酶作用的活性位点, 提高蛋白的自交联反应, 从而提高胶黏剂的胶合强度。但当温度超过 50 °C 时, 胶合强度随着温度的上升而下降, 其原因是当温度过高时, 会使酶蛋白部分发生变性, 降低酶的反应活性, 影响酶解反应的速率。因此, 碱性蛋白酶适宜的酶解温度在 50 °C 左右。



注: 标准差均为 10%, 木破率均超过 95%。下同。

Note: The standard deviations are all 10%, and the wood breakage rate is over 95%. The same below.

图 2 酶解温度对胶合强度的影响

Fig. 2 Effects of enzymatic hydrolysis temperature on adhesive strength

2.1.2 底物浓度 pH10.0, 酶添加量 10 000 U·g⁻¹, 酶解温度 50 °C, 底物浓度分别为 14%, 16%, 18%, 20%, 22%, 24% 的条件下酶解 2 h, 研究底物浓度对胶合强度的影响 (图 3)。大豆蛋白易与酶发生酶解反应, 故随着底物浓度的增加, 可在一定程度上提高胶合强度, 但当底物浓度过高, 会增大体系粘稠度, 导致碱性蛋白酶的不良扩散, 从而产生底物抑制作用, 且蛋白质分子运动能力的降低, 也会在一定程度上降低酶解速率, 影响胶合强度^[21]。综合考

考虑底物浓度用量与改性胶黏剂胶合强度之间的关系和胶黏剂成本,底物浓度宜为 20%。

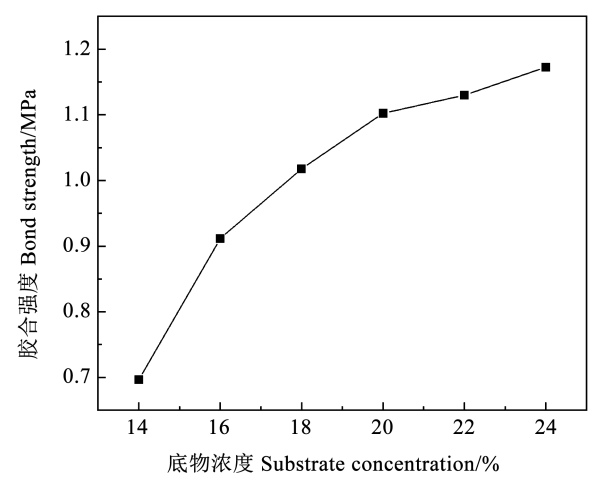


图3 底物浓度对胶合强度的影响

Fig.3 Effects of substrate concentration on adhesive strength

2.1.3 酶添加量 pH 恒定 10.0,底物浓度 20%,酶解温度 50 ℃,酶添加量分别为 5 000,10 000,15 000,20 000,25 000,30 000,35 000 和 40 000 U·g⁻¹的条件下酶解 2 h,研究酶添加量对胶合强度的影响(图 4)。酶添加量在 5 000~15 000 U·g⁻¹的范围时,胶合强度的变化和酶添加量的变化成正比例关系,是由于此时大豆蛋白可供酶进行酶解反应,有助于大豆球蛋白的解聚,暴露蛋白内部的一些极性和非极性基团,所以能在一定程度上增强胶合强度。但当酶添加量超过 15 000 U·g⁻¹以后,胶合强度开始下降,这是由于当酶添加量达到一定程度时,大部分底物已反应完毕,且碱性蛋白酶可能出现相互水解(自溶)现象^[22]。因此,碱性蛋白酶适宜的酶添加量在 15 000 U·g⁻¹左右。

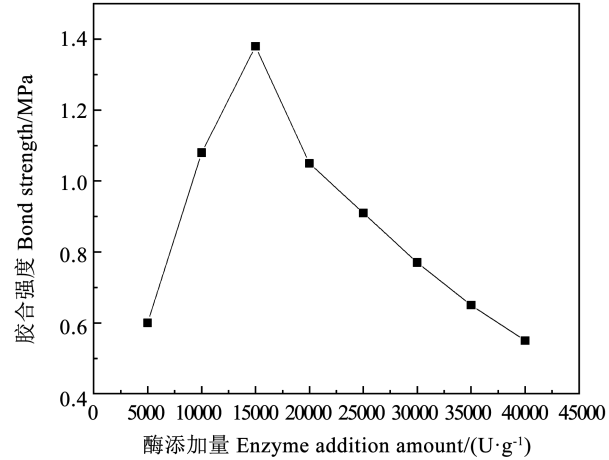


图4 酶添加量对胶合强度的影响

Fig.4 Effects of enzyme addition on adhesive strength

2.1.4 pH 底物浓度 20%,pH 恒定 10.0,酶添加量 100 000 U·g⁻¹,酶解温度 50 ℃,pH 分别为 7.0,8.0,9.0,10.0,11.0 和 11.5 的条件下酶解 2 h,研究 pH 对胶合强度的影响(图 5)。随着 pH 的增加,胶合强度呈先升高后降低的变化趋势,并在 pH 为 11.5 时达最大值。碱性蛋白酶在适宜的碱性环境下,有助于增加酶解反应速率,暴露出更多的活性基团,提高胶合强度,但过碱的环境会改变碱性蛋白酶的空间构象,使酶活性降低或失活,造成不可逆变性^[23];另外,过碱的环境下会改变大豆蛋白的解离状态,影响其与酶的结合,且随着 NaOH 溶液的加入,使体系体积增大,也会降低其胶合强度。因此,碱性蛋白酶适宜的 pH 为 11 左右。

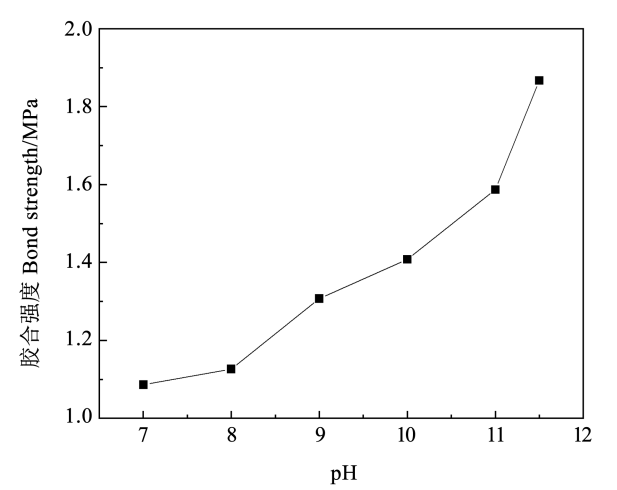


图5 pH 对胶合强度的影响

Fig.5 Effects of pH on bond strength

2.1.5 酶解时间 底物浓度 20%,pH 恒定 10.0,酶添加量 10 000 U·g⁻¹,酶解温度 50 ℃,酶解时间分别为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 和 3.0 h 的条件下酶解,研究酶解时间对胶合强度的影响(图 6)。酶解前期,酶解反应迅速,胶合强度随之迅速增强,是由于碱性蛋白酶与大豆蛋白粉结合位点较为充足,碱性蛋白酶对大豆蛋白肽链上的肽键进行切割,暴露出更多蛋白质内部的活性基团,酶解后的大豆蛋白基胶黏剂形成自交联结构,增强其胶合强度^[24]。但当酶解时间增加到一定程度,由于酶添加量及底物浓度有限,碱性蛋白酶可酶解的肽键逐渐减少,同时碱性蛋白酶的活力慢慢下降,故胶合强度下降。因此,碱性蛋白酶适宜的酶解时间在 1 h 左右。

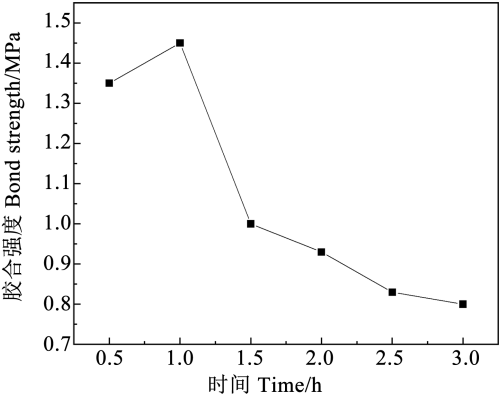


图 6 酶解时间对胶合强度的影响

Fig. 6 Effects of enzymatic hydrolysis time on adhesive strength

2.2 碱性蛋白酶正交试验

根据单因素试验结果,在底物浓度为 20% 的条件下,以酶添加量、酶解温度、酶解时间和 pH 为因素,胶合强度作为考察指标,设计 $L_{16}(4^4)$ 正交试验,确定最佳反应条件。由表 1 和表 2 可知:极差 $R_A > R_B > R_D > R_C$,所以酶添加量是影响胶合强度的主要因素,然后为 pH、温度和酶解时间;碱性蛋白酶改性大豆蛋白胶黏剂的最优组合为 $A_2B_4C_4D_1$,即酶添加量 $10\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,温度 $60\text{ }^\circ\text{C}$,酶解时间 100 min ,pH9.5。

表 1 正交试验方案及结果
Table 1 Orthogonal test scheme and results

试验号 Test number	A	B	C	D	干态胶合强度 Dry bonding strength/MPa	湿态胶合强度 Wet bonding strength/MPa	固体含量 Solid content/%
	酶添加量 Enzyme addition amount/($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)	温度 Temperature/ $^\circ\text{C}$	时间 Time/min	pH			
1	1(5000)	1(45)	1(40)	1(9.5)	1.07	0.106	18.35
2	1	2(50)	2(60)	2(10.0)	0.93	0.022	19.11
3	1	3(55)	3(80)	3(10.5)	0.89	0.151	18.67
4	1	4(60)	4(100)	4(11.0)	1.21	0.116	19.44
5	2(10000)	1	2	3	0.98	0.067	18.62
6	2	2	1	4	1.11	0.185	19.87
7	2	3	4	1	1.46	0.021	20.13
8	2	4	3	2	1.58	0.169	19.31
9	3(15000)	1	3	4	0.79	0.130	18.89
10	3	2	4	3	0.93	0.058	18.47
11	3	3	1	2	0.83	0.038	19.40
12	3	4	2	1	1.05	0.032	19.24
13	4(20000)	1	4	2	0.77	0.06	18.78
14	4	2	3	1	1.03	0.012	17.69
15	4	3	2	4	1.04	0.173	20.22
16	4	4	1	3	1.25	0.238	19.77
K_1	4.10	3.62	4.26	4.62			
K_2	5.13	3.99	4.00	4.10			
K_3	3.61	4.23	4.29	4.05			
K_4	4.09	5.08	4.37	4.14			
k_1	1.03	0.90	1.06	1.15			
k_2	1.28	1.00	1.00	1.03			
k_3	0.90	1.06	1.07	1.01			
k_4	1.02	1.27	1.09	1.04			
R	0.38	0.37	0.09	0.14			
主次因素 Primary and secondary factors	酶添加量 > 温度 > pH > 酶解时间						
最优组合 Optimal combination	$A_2B_4C_4D_1$ 酶添加量 = 0.1, 温度 = 60, 酶解时间 = 100, pH = 9.5						

注:标准差均为 10%,木破率均超过 95%。
Note:The standard deviations are all 10%, and the wood breakage rate is over 95%.

表2 方差分析
Table 2 Variance analysis

因素 Factor	偏差平方和 DEVSQ	自由度 DF	F 比 F ratio	F 临界点 F critical point	显著性 Significance
A	0.311	3	1.848	3.49	显著
B	0.294	3	1.747	3.49	显著
C	0.019	3	0.113	3.49	不显著
D	0.049	3	0.291	3.49	不显著
误差 Error	0.310	12			

2.3 对照试验结果分析

2.3.1 胶合性能 将正交试验结果得到最佳酶改性胶黏剂与空白试验所得胶黏剂的固体含量、黏度和胶合强度进行对比。固体含量高的胶黏剂会导致黏度过大,引起施胶困难,不利于胶黏剂渗入木材内部,从而影响胶合强度的改善^[25]。经过碱性蛋白酶处理后的胶黏剂与未改性的大豆蛋白胶黏剂相比,固体含量有所下降。碱性蛋白酶将大豆蛋白酶解为相对分子质量较低的多肽链,使胶黏剂的黏

度明显降低,相对分子质量的降低,流动性能越好,对后期施胶和热压工艺有良好的作用(表3)。

碱性蛋白酶有助于大豆球蛋白的解聚,提高大豆蛋白质的溶解度,暴露一些极性和非极性基团,能在一定程度上增强胶合强度,且酶改性后的大豆蛋白胶黏剂之间可形成自交联结构,也可增强胶合强度。优化条件后的胶黏剂胶合强度明显大于未添加改性剂的胶黏剂的胶合强度,大于国家Ⅱ类胶合板的标准要求($\geq 0.7\text{ MPa}$)^[26]。

表3 正交试验最佳酶改性与空白试验胶合性能对比

Table 3 Comparison of the adhesive properties of the best enzyme modification in the orthogonal experiment and blank experiment

试验 Experiment	固体含量 Solid content/%	黏度 Viscosity/s	胶合强度 Bond strength/MPa
酶改性 Enzyme modification	19.24	13	0.98
空白 Blank	16.92	2400	0.74

2.3.2 FT-IR 测试分析 红外光谱对应的波数和官能团如表4和图7所示,与纯SPI胶相比,红外光谱在 $3\,400\text{ cm}^{-1}$ 左右的特征峰变宽,是由于内部大量活性基团外露, $-\text{OH}$ 和 $-\text{NH}_2$ 等亲水基团增加所致;与纯SPI胶相比,M-SPI胶在酰胺Ⅱ键呈现红移,可能是因为酶解作用大豆蛋白分子降解,暴露出更多的官能团,大豆蛋白分子由有序状态变为无序状态,官能团的振动需要的能量减少;与纯SPI胶相比,M-SPI胶黏剂在酰胺Ⅰ带,酰胺Ⅱ带特征吸收峰的峰强度变化明显增大说明在碱性蛋白酶的作用下,大豆蛋白的空间球状结构发生了明显的变化,球蛋白中的多肽链被解离开来,使蛋白质分子中的中的 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 含量有明显提高。在酰胺Ⅰ带,改性后的大豆蛋白胶黏剂吸收峰比改性前吸收峰宽,说明改性后的蛋白分子二级结构发生了变化;与纯SPI胶相比,M-SPI在 $3\,268$ 和 $2\,926\text{ cm}^{-1}$ 附近吸收峰增强,原因是经过酶解后的蛋白质暴露出更多的 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2$ 等极性基团,该类基团可以在蛋白质分子间交联形成化学键,增加胶黏剂的内聚力,也可以与木材中羟基等极性基团形成次价键作用力,

表现为胶合强度的提升。 $1\,329\text{ cm}^{-1}$ 形成了1个新的键,此键的形成有利于大豆蛋白形成三维体系结构,提高胶黏剂的胶合强度。

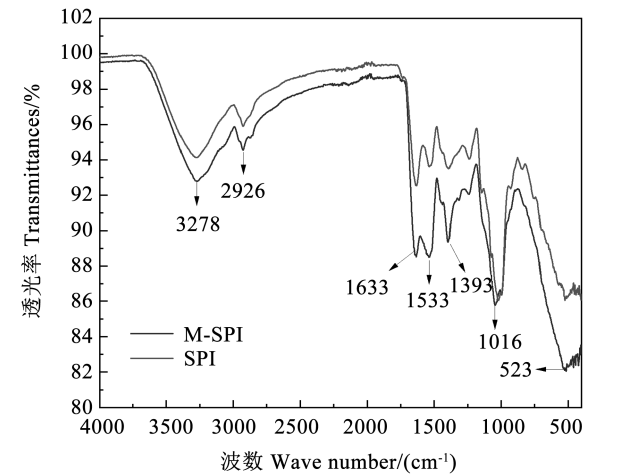
表4 大豆蛋白红外波长及官能团

Table 4 Infrared wavelengths and functional groups of soybean protein

波长 Wavelength/(cm^{-1})	官能团 Functional group
3278	N-H和O-H基团伸缩振动峰
2900	C-H基团伸缩振动峰
酰胺Ⅰ区 $1600\sim 1700$ 酰胺Ⅱ区 $1500\sim 1600$ 酰胺Ⅲ区 1250	酰胺键上的C=O伸缩振动峰
	酰胺键上N-H弯曲振动峰和C-N伸缩振动峰的偶合峰
	酰胺键上的C-N伸缩振动峰
	$-\text{COOH}$ 的特征峰
1394	C-O的伸缩振动峰
1045	

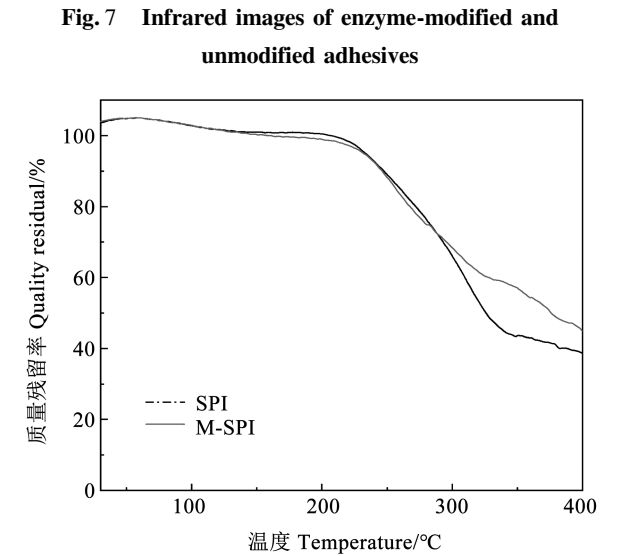
2.3.3 TG 测试分析 对酶改性的大豆蛋白胶黏剂与空白胶黏剂进行热重分析,结果如图8所示。改

性大豆蛋白胶黏剂在 380 ℃ 左右出现最大降解速率,未改性大豆胶黏剂在 310 ℃ 左右出现最大降解速率,当温度达到 400 ℃ 时,酶改性大豆胶黏剂的质量残留率为 45.69%,未改性大豆胶黏剂的质量残余率为 39.95%。热重曲线中酶改性大豆蛋白胶黏剂的热分解质量残留率及最大降解速率温度都高于未改性的大豆蛋白胶黏剂。这一结果主要是因为碱性蛋白酶改变了大豆蛋白的结构,胶黏剂体系变得更均匀,使其在热降解过程不易被破坏,胶黏剂的热稳定性得到一定提升。



注:1. M-SPI(酶改性大豆蛋白胶黏剂);2. SPI(未改性大豆蛋白胶黏剂)。
Note: 1. M-SPI (Enzyme modified soy protein adhesive); 2. SPI (Unmodified soy protein adhesive).

图 7 酶改性与未改性胶黏剂红外图



注:1. M-SPI(酶改性大豆蛋白胶黏剂);2. SPI(未改性大豆蛋白胶黏剂)。
Note:1. M-SPI (Enzyme modified soy protein adhesive); 2. SPI (Unmodified soy protein adhesive).

图 8 酶改性与未改性胶黏剂红外图

Fig. 8 Infrared images of enzyme-modified and unmodified adhesives

3 讨论

胶合强度作为胶黏剂重要的性能指标,胶合强度既可检验胶合板的胶合质量,又可衡量胶合板的耐久性。由于大豆蛋白质分子量较大,其制备的胶黏剂黏度较高,粘接性能不稳定,限制了其在胶合板制造中的应用。朱劲等^[27]的研究表明添加胃蛋白酶水解豆粕溶液的最佳工艺条件是温度 37 ℃、pH1.8、酶添加量 14 000 U·g⁻¹,水解时间 3 h 时,水解度为 23.4%,这时的大豆蛋白水解液中多肽混合物的分子量大都在 1 000 Da,疏水性基团也暴露得最多,生成分子量更小的小分子肽,使溶液的粘度急剧降低。本研究结果表明碱性蛋白酶改性会一定程度地水解肽链中的肽键或酰胺键,增加大豆蛋白胶黏剂体系中官能团的数量,显著降低胶黏剂黏度,这与前人研究结果一致。

Xu 等^[10]的研究中在加入 3% 三缩水甘油胺和 0.1% 菠萝蛋白酶的条件下,所得胶黏剂的粘度比未改性胶黏剂降低 95%,湿剪切强度提高 76.2%,达到 1.11 MPa。同时,胶黏剂分布、粘接稳定性都有明显改善,与其他交联改性大豆蛋白胶黏剂相比,这种分子重组大豆蛋白胶黏剂减少了交联剂用量 50% 以上,本研究后续可加入环氧基团、丙烯酸酯、聚乙烯醇等疏水交联剂进行交联反应,并对该种大豆蛋白胶黏剂的湿态效果进行进一步研究。

4 结论

不同酶添加量、酶解温度、酶解时间和 pH 对大豆蛋白胶黏剂的胶合强度的影响程度存在差异,其中酶添加量 > pH > 酶解温度 > 酶解时间,碱性蛋白酶改性大豆蛋白胶黏剂的最优组合为酶添加量 10 000 U·g⁻¹,温度 60 ℃,酶解时间 100 min, pH9.5。碱性蛋白酶作为一种绿色、高效环保的改性方式,其改性过程中可以做到无污染,故碱性蛋白酶改性大豆蛋白胶黏剂具有很大的潜力。

参考文献

[1] 罗晶,周莹,曾国栋,等. 大豆蛋白胶黏剂改性及其胶合板应用研究进展[J]. 热固性树脂,2022,37(6):48-53. (LUO J, ZHOU Y, ZENG G D, et al. Research progress on modification of soybean protein adhesive and its application in polywood [J]. Thermosetting Resin, 2022,37(6):48-53.)
[2] CHEN S, SHI S Q, ZHOU W, et al. Developments in bio-based soy protein adhesives: a review[J]. Macromolecular Materials and Engineering, 2022, 307(10): 2200277.
[3] 江连洲,田甜,朱建宇,等. 植物蛋白加工科技研究进展与展望[J]. 中国食品学报,2022,22(6):6-20. (JIANG L Z, TIAN T,

- ZHU J Y, et al. Research progress and prospect of plant protein processing technology [J]. Journal of China Foods Limited, 2022, 22 (6): 6-20.)
- [4] 赵飞. 物理预处理对大豆分离蛋白结构和理化性质的影响机制[D]. 泰安: 山东农业大学, 2019: 20-25. (ZHAO F. Effect mechanism of physical pretreatment on structure and physicochemical properties of soy protein isolate [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2019: 20-25.)
- [5] 闫高阳. 大豆基木材环保胶黏剂的结构与性能分析[D]. 太原: 山西大学, 2021: 40-43. (YAN G Y. Structure and performance analysis of soybean based wood environmental adhesive [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2021: 40-43.)
- [6] RAYDAN N D V, LEROYER L, CHARRIER B, et al. Recent advances on the development of protein-based adhesives for wood composite materials-a review[J]. Molecules, 2021, 26(24):75-77.
- [7] 张冰寒. 大豆胶用脱脂豆粉的改性、应用与作用机制[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019: 54-57. (ZHANG B H. Modification, application and mechanism of defatted soybean flour for soybean gum [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2019: 54-57.)
- [8] 任为聪, 程建军, 张智宇, 等. 不同改性方法对蛋白质溶解性的影响研究进展[J]. 中国粮油学报, 2011, 26 (8): 123-128. (REN W C, CHENG J J, ZHANG Z Y, et al. Research progress on the effect of different modification methods on protein solubility [J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2011, 26 (8): 123-128.)
- [9] DENT T, CAMPANELLA O, MALEKY F. Enzymatic hydrolysis of soy and chickpea protein with alcalase and flavourzyme and formation of hydrogen bond mediated insoluble aggregates [J]. Current Research in Food Science, 2023: 100487-100493.
- [10] XU Y T, HAN Y F, SHI S Q. Preparation of a moderate viscosity, high performance and adequately-stabilized soy protein-based adhesive via recombination of protein molecules[J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 255(6):120303.
- [11] 朱劲. 生化改性大豆蛋白胶黏剂的研制及应用研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2014: 20-23. (ZHU J. Research on the development and application of biochemical modified soybean protein adhesive [D]. Hangzhou: Zhejiang Agricultural and Forestry University, 2014: 20-23.)
- [12] 张明赞, 王京. 微生物蛋白酶的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2018, 24 (8): 15-16. (ZHANG M Z, WANG J. Research progress on microbial proteases [J]. Anhui Agricultural Bulletin, 2018, 24 (8): 15-16.)
- [13] 艾雨晴, 陈松骏, 秦娟, 等. 微生物产蛋白酶的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19):451-458. (AI Y Q, CHEN S J, QIN J, et al. Research progress on microbial protease production [J]. Food Industry Technology, 2021, 42 (19): 451-458.)
- [14] 董鹏. 酶解豆粕生产大豆肽的工艺优化[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019: 36-39. (DONG P. Process optimization of enzymatic hydrolysis of soybean meal to produce soybean peptide [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019: 36-39.)
- [15] 李丽娟, 孟鹏. 碱性蛋白酶水解大豆分离蛋白制备大豆多肽的工艺条件优化[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(4):62-66. (LI L J, MENG P. Optimization of technological conditions for the preparation of soybean polypeptide by alkaline protease hydrolysis of soybean protein isolate [J]. Journal of Microbiology, 2014, 34 (4): 62-66.)
- [16] 臧学丽. 大豆分离蛋白酶法改性研究进展[J]. 食品安全导刊, 2019(20):27. (ZANG X L. Research progress on modification of soybean protein isolate by protease method [J]. Journal of Food Safety, 2019 (20): 27.)
- [17] 张毅方, 胡春林, 马永强, 等. Alcalase 2. 4L 碱性内切蛋白酶改性大豆蛋白的工艺研究[J]. 大豆科技, 2010 (3): 28-30. (ZHANG Y F, HU C L, MA Y Q, et al. Study on the process of alcalase 2. 4L alkaline endoproteases modified soybean protein [J]. Soybean Science and Technology, 2010 (3): 28-30.)
- [18] ZHANG X J, LI Y, YUANG G, et al. Covalent immobilization of alkaline proteinase on amino-functionalized magnetic nanoparticles and application in soy protein hydrolysis [J]. Biotechnology progress, 2019, 35(2): 26-30.
- [19] 石红锦, 王势博, 肖健, 等. 环保型大豆蛋白胶黏剂的制备[J]. 橡塑技术与装备, 2021, 47(23):28-32. (SHI H J, WANG S B, XIAO J, et al. Preparation of environmentally friendly soybean protein adhesive [J]. Rubber and Plastic Technology and Equipment, 2021, 47 (23): 28-32.)
- [20] 王晨曦. 合成树脂改性植物蛋白胶黏剂的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022: 21-26. (WANG C X Research on synthetic resin modified vegetable protein adhesive [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2022: 21-26.)
- [21] 屠春燕, 袁艳娟, 徐娟, 等. Alcalase 碱性蛋白酶酶解绿豆分离蛋白制备小分子肽的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30 (2):23-27. (TU C Y, YUAN Y J, XU J, et al. Study on the preparation of small molecular peptides from mung bean protein isolate by alcalase alkaline protease [J]. Food studies and Development, 2009, 30 (2): 23-27.)
- [22] CHEN N, ZHENG P, ZENG Q, et al. Characterization and performance of soy-based adhesives cured with epoxy resin [J]. Polymers, 2017, 9(10): 81-87.
- [23] 宋明洋, 刘晓兰. 双酶法制备豌豆肽及其抗氧化活性[J]. 食品工业, 2020, 41 (4): 108-112. (SONG M Y, LIU X L. Preparation of pea peptide by double enzyme method and its antioxidant activity [J]. Food Industry, 2020, 41 (4): 108-112.)
- [24] 李婧婧. 蛋白基胶黏剂制备、性能表征及增强机制研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2016: 37-42. (LI J J. Study on preparation, performance characterization and strengthening mechanism of protein based adhesive [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2016: 37-42.)
- [25] MO J, WANG F, XU Z, et al. Characterization and performance of soybean protein modified by tyrosinase[J]. International Journal of Adhesion and Adhesives, 2019, 92:111-118.
- [26] 陈奶荣, 林十佳. 豆胶改性机理分析及在胶合板中的应用研究[C]//福州: 第9届博士生学术年会. (CHEN N R, LIN Q J. Analysis of the mechanism of bean glue modification and research on its application in plywood [C]//Fuzhou: 9th Annual Doctoral Student Academic Conference.)
- [27] 朱劲, 单人为, 李琴, 等. 豆胶用大豆蛋白水解液的制备[J]. 大豆科学, 2014, 33(1):107-109, 118. (ZHU J, SHAN W, LI Q, et al. Preparation of soybean protein hydrolysate for soybean glue [J]. Soybean Science, 2014, 33 (1): 107-109, 118.)