

化学改性大豆蛋白凝胶溶胀过程规律的研究*

王飞镛^{1**} 柯晴瑾¹ 王凌伟¹ 奚红霞² 崔英德³

(¹ 广东工业大学轻工化工学院 广州 510006) (² 华南理工大学化工与能源学院 广州 510640)

(³ 仲恺农业工程学院化学与化工系 广州 510225)

摘 要 将大豆蛋白(SPI)经预热处理、EDTAD 酰化和戊二醛交联,制备出改性大豆蛋白凝胶.通过红外与化学法研究了改性大豆蛋白分子的结构变化,结果表明,经 EDTAD 改性,大豆蛋白分子的侧链基团和分子链构象均发生变化;侧链的游离氨基与 EDTAD 发生酰化反应,为蛋白质分子链引入羧基;基团分析数据显示,改性大豆蛋白分子中游离氨基数减少,羧基数增加,增加的羧基数与减少的氨基数之比约为 3:1.研究了改性大豆蛋白凝胶的溶胀率变化,并对溶胀数据进行数学处理,分析了不同 $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$ 的凝胶的溶胀过程规律,结果显示, $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$ 为 0,0.05,0.1 和 0.2 的改性大豆蛋白凝胶在水中的溶胀率为 24.2, 54.01, 87.27 和 95.87,说明分子链引入一定量的 EDTAD 使凝胶溶胀率增大;其溶胀特征指数为 0.5,表现为 Fickian 扩散.研究了改性凝胶在不同 pH 下的溶胀过程规律,结果显示,在 pH 4.30 和 6.08 时,凝胶溶胀特征指数 n 范围是 $0.5 < n < 1$,表现为 non-Fickian 扩散,而在碱性 pH 10.04,凝胶特征溶胀指数为 0.5,仍表现为 Fickian 扩散.改性大豆蛋白凝胶溶胀率对 pH 变化具有敏感性,其溶胀-消溶过程曲线呈“W”形,显示凝胶具形状记忆功能.

关键词 化学改性,凝胶,蛋白质,溶胀过程

凝胶是化学交联或物理作用力形成的三维网络结构的高分子^[1].吸水溶胀是凝胶最重要的性质.由于其良好的亲水性及对外界条件(如 pH 值、温度、电场等)变化的“响应性”,在组织工程、药物释放、吸水保水材料等领域获得了广泛的应用^[2~4].蛋白质凝胶具有低交联度的三维空间网络结构,纯蛋白质凝胶中,多肽链间及多肽链与水分子间多通过疏水键、静电力和氢键、二硫键等弱的相互作用力达到平衡^[5].大豆蛋白是亲水性的天然高分子材料,其分子侧链上分布着氨基、羧基和羟基等,依靠其亲水性和氢键的主要作用,大豆蛋白可吸附水分,形成凝胶^[6].但其溶胀率较低.由于溶胀的过程实际上是高分子链与水分子相互作用的过程,因此通过化学改性改变蛋白质链上的离子数或种类以及分子链的聚集分散状态等因素,可以提高蛋白质凝胶的溶胀性.作者以大豆蛋白为原料,以小分子改性剂乙二胺四乙酸二酐(EDTAD)对大豆蛋白进行酰化改性,再以戊二醛交联制成凝胶,研究了其吸水性及应用^[7];在此基础上,探讨凝胶在遇水后发生溶胀

的过程情况,通过对溶胀过程数据进行数学处理,了解 EDTAD 改性大豆蛋白凝胶在溶胀过程的一些规律;通过分析凝胶在不同 pH 值的溶胀规律,提出其在药物控释材料领域的应用潜力.

1 实验部分

1.1 原料

大豆分离蛋白(SPI)为食品级;乙二胺四乙酸二酐(EDTAD)、戊二醛、氢氧化钠为分析纯;聚乙二醇(10000,20000)为化学纯;透析袋,截留分子量 14000 ± 2000 ,规格 $\phi 27$ mm.

1.2 实验方法

1.2.1 改性大豆蛋白凝胶的制备 称取适量 SPI 调为 2% (g/mL) 的溶液, pH 值调为 12, 置于 65℃ 水浴预热 30 min 后冷至室温;搅拌下分批加入已称量好的 EDTAD,并滴加氢氧化钠溶液保持 pH 稳定;3 h 后停止搅拌,将反应物透析至中性,浓缩成 15% 的蛋白质溶液.改性蛋白质液取部分干燥用于测试,其他在搅拌下用 NaOH 液调 pH 至 9,滴加 25% 的戊二醛,使生成凝胶并于

* 2009-11-05 收稿,2010-02-22 修稿;广东省绿色化学产品技术重点实验室研究基金(基金号 GC200702)资助项目;** 通讯联系人,
E-mail: hgxwang@163.com

40℃干燥至恒重,得改性大豆蛋白凝胶样品。

1.2.2 红外测试 将经真空干燥的大豆蛋白和改性大豆蛋白用 KBr 压片,取适量样品送入 Bruker Vector 33 型红外光谱仪进行测定。扫描范围 4000~400 cm⁻¹,分辨率为 4 cm⁻¹。

1.2.3 蛋白质中氨基与羧基含量的测定 氨基含量用 TNBS 法^[8]测定;羧基含量用电位滴定法^[9]测定。

1.2.4 溶胀性能的测试 称取一定量(W_d)干凝胶,于自制尼龙底胶杯中,浸泡于水中一定时间;将胶杯取出悬挂,滤掉凝胶表面水分,再称重,记为 W_t ;多次浸泡,直到凝胶湿重恒定不变,记为 W_s ,以下式计算 t 时刻溶胀率(SR_t)、平衡溶胀率(SR)。

$$SR_t = \frac{(W_t - W_d)}{W_d}$$

(1)

$$SR = \frac{(W_s - W_d)}{W_d}$$

(2)

1.2.5 pH 敏感性和溶胀-消溶性能测试 用邻苯二甲酸氢钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠配制不同 pH 的缓冲溶液,按 1.2.4 节方法进行不同 pH 值下凝胶溶胀性能的测试;进行溶胀-消溶测试时,将凝胶杯置于 pH 为 10.04 的缓冲液,按 1.2.4 节方法测出该 pH 值下的溶胀率(SR 和 SR_t),取出凝胶,置于 pH 为 4.30 的缓冲液,按相同方法测出该 pH 下的溶胀率。

2 结果与讨论

2.1 EDTAD 改性大豆蛋白的结构

蛋白质是由一条或数条多肽链构成的聚集体,经过适当的预处理,用化学方法(试剂)使蛋白质分子中氨基酸残基(侧链基团)引入新的基团,导致蛋白质分子空间结构、物化性质和功能性发生改变^[10]。EDTAD(乙二胺四乙酸二酐)通过酸酐基与大豆蛋白(SPI)分子侧链上的游离氨基发生酰化反应,生成改性大豆蛋白。

从红外谱(图 1)看,与未改性 SPI(图 1a)相比,改性 SPI(b 和 c 分别表示 $m_{EDTAD}:m_{SPI}$ 为 0.1 和 0.3)的特征峰发生了变化。图 1(a)中 422 cm⁻¹处为酰胺键和羟基的伸缩振动,由于蛋白质中存在分子内和分子间氢键,因而峰形宽大;经过反应后,改性 SPI 中相应峰移至 3275 cm⁻¹,且峰形变尖,振动强度增大。分析认为应是改性 SPI 分子中更多羟基发生分子内或分子间缔合,说明

经酰化反应后蛋白质分子链间的作用力发生变化。图 1(a)中 1656、1547 cm⁻¹的峰为蛋白质酰胺 I 和 II 带特征峰,1244 cm⁻¹小峰为酰胺 III 带特征峰,还可表征蛋白质的二级结构,如 α -螺旋结构^[11];而在改性蛋白中(图 1b、c)酰胺 I 和 II 带特征峰移至 1630 和 1538 cm⁻¹,且峰形变尖,振动强度增大,显示改性物中酰胺键增加;酰胺 III 带特征峰略为变小,反映改性蛋白 α -螺旋结构有所减少,说明反应后蛋白质的二级构象发生了变化。

从基团数的变化看(表 1),经过与 EDTAD 反应(以 $m_{EDTAD}:m_{SPI}$ 为 0.3 为例),SPI 分子中氨基酸残基(氨基)的含量从 38 mol/10⁵g SPI 减至 4 mol/10⁵g SPI,而羧基含量从 144 mol/10⁵g SPI 增至 256 mol/10⁵g SPI,计算得改性 SPI 分子中引入羧基的量与消耗氨基的量之比为 3.29:1(约为 3:1),即 SPI 与 EDTAD 反应,每消耗 1 个侧链氨基,平均引入了 3 个羧基。红外谱和蛋白质基团数分析结果说明经 EDTAD 改性,大豆蛋白分子的侧链基团和分子链构象均发生变化;侧链的游离氨基与 EDTAD 发生酰化反应,使蛋白质分子链增加羧基。

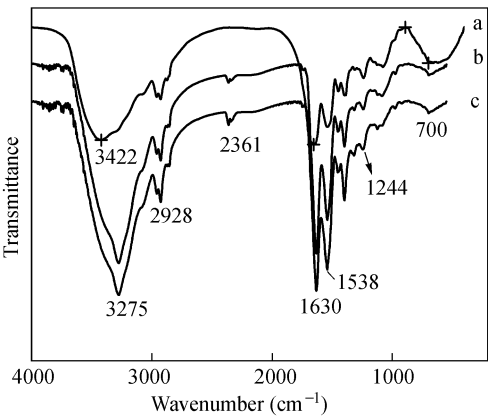


Fig. 1 IR Spectrum of SPI and EDTAD-SPI
a) Represents SPI; b), c) Represent EDTAD modified SPI at $m_{EDTAD}:m_{SPI} = 0.1$ and $m_{EDTAD}:m_{SPI} = 0.3$ respectively

Table 1 The content of amino and carboxyl group in SPI			
Samples	The content of groups		$\Delta n_c : \Delta n_a$
	(mol/10 ⁵ g SPI)		
	—NH ₂	—COOH	
SPI	38	144	—
Acylated SPI	4	256	3.29:1

Note: Δn_c and Δn_a represent the added amount of carboxyl group and the lost amount of amino group in side chain of SPI molecules after acylation with EDTAD respectively.

2.2 不同 $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$ 的改性大豆蛋白凝胶溶胀过程的讨论

图 2 为改性大豆蛋白凝胶在不同 $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$ 下的溶胀率对时间的关系曲线. 图中数据显示, $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$ 分别为 0, 0.05, 0.1 和 0.2 的凝胶, 平衡溶胀率分别为 24.2, 54.01, 87.27 和 95.87, 说明 $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$ 值一定的增加, 即蛋白质分子链引入一定量的 EDTAD 有利于凝胶平衡溶胀率的增加.

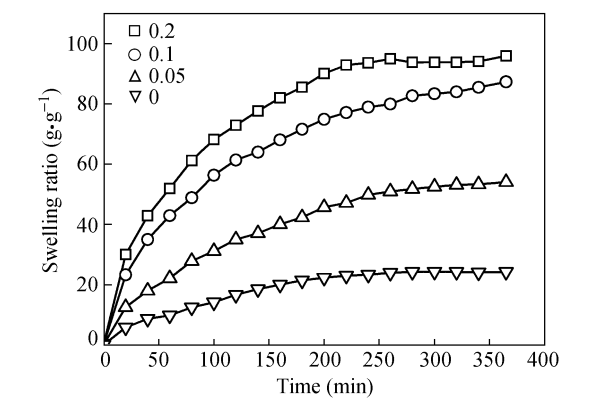


Fig. 2 Swelling ratios of modified soy protein gels versus time at different $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$

蛋白质分子经改性制成的凝胶溶胀率增大可归因于离子化基团及其亲水性^[3]. 水分子是极性分子, 大豆蛋白的主要极性基团是羧基和氨基, 它们通过氢键或其他化学键与水分子键合. 通过 EDTAD 酰化, 肽链上引入更多的羧基, 增强了凝胶的溶胀性. 改性大豆蛋白凝胶溶胀率的增加还与蛋白质链离子化基团及其导致的渗透压的改变有关^[12,13]. 经 EDTAD 酰化的大豆蛋白, 分子上净负电荷增强了, 使凝胶网络的渗透压高于周围介质, 即与周围介质间产生渗透压差, 为平衡这种渗透压差, 水分子大量进入凝胶网络. 水分子不断进入, 使肽链上离解的离子数目增加, 肽链间斥力增加, 为减小斥力, 肽链逐渐伸展; 又随着网络内部水分子数目继续增加, 其离子浓度逐渐降低, 使网络内外渗透压差减小; 加上网络伸展, 凝胶网络的弹性收缩力也在增加, 与肽链上净负电荷增加引起的斥力相抵消, 最终达到溶胀平衡.

为了更好地了解蛋白质凝胶分子在水中的状况, 对 EDTAD 改性大豆蛋白凝胶溶胀的过程进行了研究. 高分子凝胶的溶胀包含以下过程^[12]: (1) 水分子进入凝胶内部; (2) 高分子链上的亲水基团与水分子发生水化作用, 高分子链之间失

去稳定作用, 发生松弛, 使高分子链在水中伸展, 凝胶网络溶胀, 凝胶的吸水溶胀率达到平衡. 为了准确地探讨有关凝胶的溶胀动力学机理, 分析凝胶在水中的扩散行为, 将原始数据进行处理: 当 $0 < M_t/M_\infty \leq 0.6$ 时, 按下面 Fickian 公式^[14,15]进行分析:

$$M_t/M_\infty = Kt^n \tag{3}$$

式中 M_t 代表 t 时刻凝胶所吸收水分的质量; M_∞ 代表溶胀平衡时凝胶中吸收水分的质量; K 为凝胶的溶胀速率常数, 代表网络与体系的体系特征; n 为特征指数, 决定着凝胶的溶胀类型. 当 $n = 0.5$ 时, 为 I 扩散 (即 Fickian 扩散), 此时小分子的扩散速率小于分子链的弛豫速率, 小分子扩散起决定作用; $n = 1$ 时, 为 II 型扩散, 小分子的扩散速率大于链段的弛豫速率, 链段松弛运动起决定作用; 当 $0.5 < n < 1$ 时, 为 non-Fickian 扩散, 小分子的扩散速率与链段弛豫相当.

以 $\ln(M_t/M_\infty)$ 对 $\ln t$ 作图, 如图 3 所示, n 和 K 成为曲线的斜率和截距; 计算出拟合曲线的相关系数 R , 结果如表 2 所示.

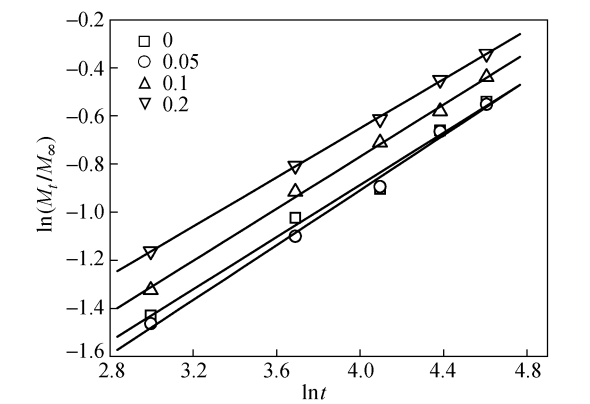


Fig. 3 Plots of $\ln(M_t/M_\infty)$ versus $\ln t$ at different $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$

表 2 的数据显示, 4 种大豆蛋白凝胶样品的 n 值均在 0.5 的范围, 其相关系数亦在 0.99 以上, 属于 Fickian 扩散过程. 数据结果说明, 大豆蛋白凝胶在遇水溶胀的过程中, 水分子的扩散速率要小于肽链弛豫速率, 水分子的扩散起决定的

Table 2 Kinetic exponent of modified soy protein gels		
$m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$	n	R
0	0.54166	0.99330
0.05	0.56985	0.99727
0.1	0.54074	0.99892
0.2	0.50975	0.99981

作用;或者说,水分子进入凝胶网络后,肽链的亲水基使之能较快地水化,凝胶在水中的溶胀扩散过程表现为 Fickian 扩散.

2.3 pH 对改性大豆蛋白凝胶溶胀过程的影响

图 4 为 $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$ 为 0.2 的改性大豆蛋白凝胶在不同 pH 下的溶胀率与时间的关系曲线. 凝胶在 pH 为 4.30、6.08 和 10.04 的平衡溶胀率分别为 11.05、25.04 和 81.32. 4 个数据相比,凝胶在 pH 为 4.3 即大豆蛋白的等电点附近溶胀率最小,原因是在等电点附近,蛋白质分子间几乎不存在静电斥力,大部分极性基团参与蛋白-蛋白相互作用,而无法结合水;另外,蛋白质分子间吸引力增加也使肽链结合紧密,凝胶网络的空隙率降低,不利于水分子向凝胶网络内部扩散. 当 pH 从 4.30 增至 10.04,凝胶溶胀率从 11.05 增至 81.32,主要原因是随着 pH 值从酸性过渡至碱性,羧基的离子化增加,增加网络内外渗透压,有利于水分子进入凝胶网络. 此外, pH 值对凝胶溶胀速率亦有影响,数据显示,到 30 min 时, pH 为 4.30、6.08 和 10.04 的溶胀率分别上升至平衡溶胀率的 48%、59% 和 71%,即等电点附近溶胀速率最小,数据说明在凝胶网络中肽链的收缩既抑制水分子进入凝胶网络的量,亦抑制水进入凝胶的速率.

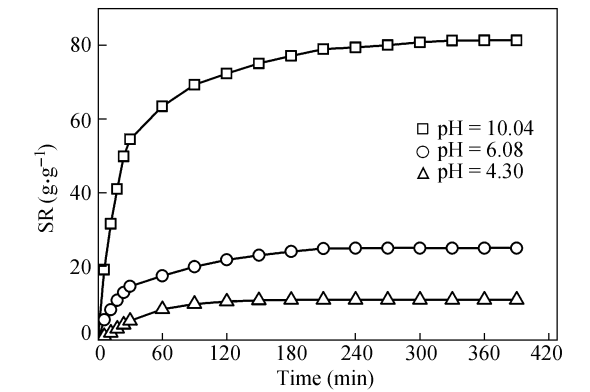


Fig. 4 Swelling ratios of modified soy protein gel versus time at different pH value

为了了解不同 pH 下凝胶的溶胀行为,将溶胀数据与 2.2 节进行了相同的处理,结果见图 5 和表 3. 数据显示,按 Fickian 溶胀机理,改性大豆蛋白凝胶在酸性 pH 条件下的特征溶胀指数 n 大于 0.5,表现为 non-Fickian 溶胀,即链段松弛速率慢于水分子扩散速率,说明溶液酸性增加使凝胶网络分子链排列更紧密,在大豆蛋白等电

点,肽链松弛运动变得更为缓慢,聚合物网络在溶剂中的扩散成为凝胶溶胀速率的主要因素. 不过在碱性 pH 条件下,分子链上基团的离子化加速了溶剂化和凝胶网络的扩散,使凝胶的溶胀仍表现为 Fickian 扩散特征.

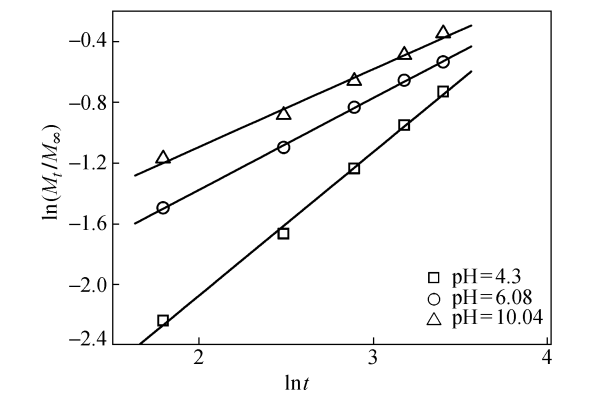


Fig. 5 Plots of $\ln(M_t/M_\infty)$ of modified soy protein gel versus $\ln t$ at different pH value

Table 3 Kinetic exponent of modified soy protein gel at different pH values

pH	n	R
4.30	0.94294	0.99859
6.08	0.60713	0.99967
10.04	0.50200	0.99555

2.4 改性大豆蛋白凝胶的溶胀-消溶性能

$m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$ 为 0.2 的改性大豆蛋白凝胶在 pH 10.04 的缓冲液达到平衡溶胀率 81.32 后,即转至 pH 4.30 溶液中,凝胶溶胀率迅速下降,至达到平衡溶胀率 11.04,再返回 pH 10.04 的缓冲液,凝胶溶胀率又上升(图 6)凝胶在 pH 10.04 和 pH 4.30 显示出 pH 敏感性. 如 2.3 节所述,这与蛋白质在不同 pH 下羧基的离子化程度对凝

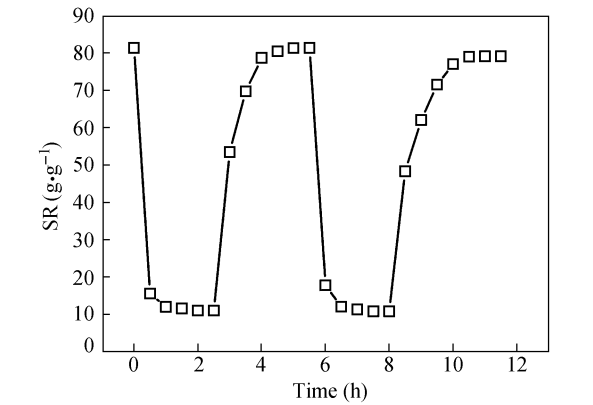


Fig. 6 Swelling-deswelling curve of modified SPI gel in response to sequential exposure to pH 10.04 and pH 4.30

胶网络的渗透压的影响有关:与酸性 pH(4.30)相比,碱性 pH(10.04)下蛋白质链上羧基离子化程度要大,网络渗透压要大,更有利于水分子的进入;此外,在接近等电点的 pH 附近,蛋白质链存在的极性基团间的相互作用既使极性基团无法结合水,也使肽链结合紧密,凝胶收缩,表现出脱水.图 6 还显示,凝胶在第二轮的消溶-溶胀过程中所经过的达到平衡溶胀时间略长于第一轮,即溶胀速率略减慢,第二轮的两个平衡溶胀率为 10.89 和 79.08,低于第一轮的平衡溶胀率(11.05 和 81.31),因凝胶网络在缓冲液中,发生离子交换,凝胶网络内保持一定量游离离子,而网络外部为缓冲液带来的离子,使凝胶网络内外渗透压降低,降低吸水速率,减少对水分子的吸引.其他 $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$ 值的改性凝胶亦有相似的规律.改性大豆蛋白凝胶的溶胀-消溶过程曲线呈“W”形,显示凝胶具形状记忆功能,这类凝胶在药物控释方面具有应用潜力.

3 结论

通过预处理、EDTAD 酰化和戊二醛交联,将大豆蛋白制成改性大豆蛋白凝胶.

大豆蛋白经预处理和 EDTAD 酰化,结构发生变化,分子中酰胺键增加;分子侧链的氨基数减少,羧基数增加,增加的羧基数与减少的氨基数之比为 3:1.改性大豆蛋白凝胶随着 $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$ 一定量的增加,凝胶溶胀率增加,反映了 EDTAD 分子的引入对蛋白质凝胶网络离子数和渗透压等结构因素的影响. $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$ 为 0,0.05,0.1 和 0.2 大豆蛋白凝胶在水中的溶胀表现为 Fickian 扩散;在酸性 pH 条件,凝胶表现出 non-Fickian 扩散,在碱性 pH 仍为 Fickian 扩散.凝胶溶胀率对 pH 具敏感性,其溶胀-消溶曲线呈“W”形,显示具有形状记忆功能,在药物控释材料领域具应用潜力.

REFERENCES

- 1 Li Wenbo(李文波),Xue Feng(薛锋),Cheng Rongshi(程镨时). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2006,(5):671~675
- 2 Yang H,Kao W J. Pharma Research,2006,23(1):205~214
- 3 Rathna G V. J Mater Sci:Mater Med,2008,(19):2351~2358
- 4 Gyenes T,Torma V,Gyarnati B,Zrinyi M. Acta Biomaterialia,2008,(4):733~744
- 5 Damodaran S. J Agric Food Chem,1988,36:262~269
- 6 Guan Bin(管斌),Lin Hong(林洪),Wang Guangce(王广策). Protein Chemistry in Food(食品蛋白质化学). Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社),2005.5~6
- 7 Wang Feidi(王飞镒),Li Pingao(李品高),Yang Guyi(杨谷毅),Cui Yingde(崔英德). Technology of Water Treatment(China)(水处理技术),2007,33(12):38~41
- 8 Hall R J,Trinder N,Givens D I. Analyst,1973,(98):673~686
- 9 Nozaki Y,Tanford C. J Am Chem Soc,1967,4(89):736~742
- 10 Mo Zhongwen(莫重文). Chemistry and Technology of Proteins(蛋白质化学与工艺学). Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社),2007.91~95
- 11 Cai R,Singh B R. Biochemistry,2004,43:2541~2549
- 12 Wu Jihuai(吴季怀),Lin Jianming(林建明),Wei Yuelin(魏月琳). Materilas of High Water-Absorption and Retention(高吸水保水材料). Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社),2005.117~118
- 13 Tanaka T,Fillmore D,Sun S T,Nishio I,Swislow G,Shah A. Physical Rev Lett,1980,45(20):1636~1639
- 14 Franson N M,Peppas N A. J Appl Polym Sci,1983,28:1299~1310
- 15 Korsemeyer N M,Merrwall E M,Peppas N A. J Polym Sci:Polym Phys Ed,1986,24:409~434

SWELLING BEHAVIOR OF CHEMICAL MODIFIED SOY PROTEIN GELS

WANG Feidi¹, KE Qingjin¹, WANG Lingwei¹, XI Hongxia², CUI Yingde³

(¹ Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006)

(² School of Chemical and Energy Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

(³ Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225)

Abstract A chemically modified soy protein gel was prepared by first preheating and then acylating the soy protein with ethylenediaminetetraacetic dianhydride (EDTAD), followed by crosslinking with glutaraldehyde. The variation of molecular structure of modified soy protein and the variation of swelling ratio of gels were investigated; moreover, the swelling behavior of modified soy protein gels at different $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$ and different pH was analyzed by treating the swelling data with mathematical method. The results showed that the free amimo groups of soy protein side chain reacted with EDTAD, which incorporated carboxyl groups into soy protein molecule chain; the ratio of the amount of added carboxyl group and lost amino group was about 3:1 in soy protein molecules. The swelling ratio of soy protein-based gels was 24.2, 54.07, 87.27 and 95.87 when $m_{\text{EDTAD}}:m_{\text{SPI}}$ was 0, 0.05, 0.1 and 0.2, respectively, which showed that increasing the amount of EDTAD incorporating into the protein molecular chain resulted in the increasing of swelling ratio of gels. The swelling characteristic exponent (n) of the above gels was about 0.5, which meant that the protein-based gels appeared Fickian's diffusion behavior in water, the same behavior appeared to the modified soy protein gels at pH 10.04; but at pH 4.30 and pH 6.08, the range of n was $0.5 < n < 1$, which meant a non-Fickian's diffusion behavior. The mechanism of swelling behavior of gels was discussed. The swelling ratio of gels appeared pH-sensitivity, the “W”—shaped curve of swelling—deswelling process appeared, which meant the function of “shape memory” of gels.

Keywords Chemical modification, Gels, Protein, Swelling behavior