

大豆蛋白多孔水凝胶机械性能的研究

金郁葱, 杨晓泉, 郭健

(华南理工大学轻工与食品学院食物蛋白工程研究中心, 广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室, 广东广州 510640)

摘要: 本研究以大豆分离蛋白为原料, 通过微生物转谷氨酰胺酶交联结合高速均质制备了大豆蛋白多孔凝胶, 采用 X 射线断层扫描技术对所成凝胶的微结构进行观察, 并考察了不同制备条件对制得凝胶机械性能的影响。结果表明, 通过对凝胶的制备条件-酶添加量、蛋白热变性温度及均质速度进行调控, 可制得具有不同孔隙度及机械性能的多孔凝胶。当对分离蛋白溶液在 95 °C 热处理 30 min, 添加 6.67 U MTGase/g SPI, 在 8000 r/min 均质 30 s, 可制得空隙大小分布均匀, 具有较好应变、较强应力以及杨氏模量的大豆蛋白多孔凝胶。

关键词: 大豆蛋白; 多孔凝胶; X 射线断层扫描; 机械性能

文章编号: 1673-9078(2013)5-957-960

Preparation and Mechanical Property of Soy Protein Porous Hydrogel

JIN Yu-cong, YANG Xiao-quan, GUO Jian

(Research and Development Center of Food Proteins, College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangdong Province Key Laboratory for Green Processing of Natural Products and Product Safety, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Soy protein porous hydrogel was prepared by microbial transglutaminase (MTGase) induced cross-linking and high speed homogenizing in this work. Computed microtomography was used to observe the microstructure of the porous hydrogel. The effects of the preparation conditions on the mechanical properties of the hydrogel were also evaluated. The results indicated that porous hydrogels with different porosity and textures could be obtained by regulating the dosage of MTGase, homogenizing speed and soy protein isolates (SPI) dispersion pre-heating temperature. When SPI dispersion was pre-heated at 95 °C for 30 min, added with 6.67 U MTGase/g SPI, and then homogenized at 8000 r/min for 30 s, porous hydrogel can be achieved with uniform distribution of pore, better strain, highest stress and Young's modulus.

Key words: soy protein; porous hydrogel; computed microtomography; mechanical property

水凝胶 (hydrogels) 是一种通过物理或化学作用交联形成的亲水性三维网络, 在水中不溶解但具有高溶胀性能^[1]。由于其独特的物理和化学性能, 水凝胶近年在食品加工、材料及医药领域均得到了广泛的应用^[2]。随着水凝胶应用前景的拓展, 需要有不同结构的水凝胶来满足不同产品的要求。作为一种新型材料, 具有多孔结构的水凝胶最近被广泛研究。与传统方法制备的水凝胶相比, 该水凝胶内部具有大量孔隙、更大的内部表面积、更好的溶胀性能、更快的溶胀动力学以及对外部刺激的快速响应^[3-4]。这些优良的性能使

得该凝胶可应用于制备生物支架、荷载营养功能因子及风味物质等。

大豆蛋白是一种优质的食物蛋白质资源, 具有很高的营养价值, 具有易吸收、低胆固醇以及容易成胶的特点^[5]。大豆蛋白不仅可通过加热形成凝胶, 也可以对低于临界凝胶浓度的蛋白溶液进行热处理, 使蛋白质分子部分去折叠、疏水基团和酶作用位点暴露, 然后添加盐离子、酸化剂或酶交联剂, 诱导形成冷致凝胶^[6]。微生物转谷氨酰胺酶 (Microbial transglutaminase, MTGase) 是一种无毒、安全的酶交联剂。MTGase 不依赖于电荷的作用, 可诱导蛋白质分子间形成共价交联, 强度可达到氢键的 20 倍, 从而使蛋白形成有序的网络结构^[7]。在食品工业中也可用于酶促豆腐的制作和生产^[8]。

本研究以大豆分离蛋白 (Soy protein isolate, SPI) 为原料, 采用高速均质结合 MTGase 交联的方法制备

收稿日期: 2013-01-08

基金项目: 教育部高校博士点基金 (20100172110021), 国家自然科学基金基金项目资助 (31130124)

作者简介: 金郁葱 (1988-), 男, 硕士, 研究方向为蛋白质化学与工程

通讯作者: 杨晓泉 (1955-), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物蛋白的开发利用

大豆蛋白多孔水凝胶,并采用了X射线断层扫描技术(computed microtomography, μ CT)对其微结构进行无损研究。本研究对制备大豆蛋白多孔水凝胶的酶添加量、蛋白热变性温度及均质转速进行调控,研究了制备条件对其结构及机械性能的影响,以期获得结构可控的大豆蛋白多孔凝胶。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料:低温脱脂大豆粕,山东新嘉华股份有限公司;MTGase,日本Ajinomoto公司。

仪器:T 25 digital ULTRA-TURRAX 高速均质机,德国IKA公司;X-Tek XT V 160H X射线断层扫描仪,比利时Nikon Metrology NV公司;TA-XT2i质构仪,英国SMS公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆分离蛋白(SPI)的制备

低温脱脂大豆粕粉碎后以1:10的料液比加入去离子水,用2 N NaOH调节pH值至8.0,并于室温下搅拌使豆粕中的蛋白质溶出。经过碱溶后的提取液以8000 g离心30 min,弃去沉淀。上清液用2 N盐酸调节pH值至4.5,4℃静置30 min至蛋白析出,以8000 g对料液离心30 min。弃上清液,取出该沉淀,以1:7的量加入去离子水使其悬浮,调节pH至7.5,慢速搅拌待其充分溶解后4℃下透析48 h,透析液冻干后得到SPI蛋白粉末,备用。

1.2.2 大豆蛋白多孔凝胶的制备

配制8% (m/V)的SPI溶液,将该溶液置于一定温度下的水浴中加热30 min,使大豆蛋白变性;冷却至室温后,调节溶液的pH至7.0,加入一定量的MTGase,然后对其进行一定转速的均质使其成胶。

1.2.3 大豆蛋白多孔凝胶的微结构分析

本研究采用X射线断层扫描仪对大豆蛋白多孔凝胶的微观结构及孔隙分布情况进行分析。把在4℃储存12 h的多孔凝胶切成边长为8 mm的立方体,并将其固定于载物台上。凝胶样品在扫描过程中进行360度的旋转,扫描参数如下:电压51 kV,电流102 μ A,进行720次的轴向扫描,扫描厚度为14.8 μ m。通过模拟软件对扫描的照片进行三维重建,可得到样品的三维立体图像。

1.2.4 大豆蛋白多孔凝胶的机械性能测试^[9]

本研究采用质构仪对多孔凝胶的机械性能进行测试,选用直径20 mm的平底主星探头P/20 a,以穿刺的方式运行程序,测试条件如下:测前和测后速度均为1 mm/s,测试速度为0.2 mm/s,凝胶压缩程度为80%,

触发力1.0 g。用于测试的多孔凝胶在4℃储存12 h后切成边长为10 mm的立方体。

形变过程中凝胶的相对形变表示为Hencky应变(ϵ_h), $\epsilon_h = \ln[h(t)/h_0]$,其中 h_0 为凝胶的原始高度, $h(t)$ 为凝胶经过时间 t 后的高度。通过记录凝胶破裂时的高度便可计算得到凝胶的最大应变 ϵ ,以此表示凝胶的形变能力。

形变过程中凝胶的平均应力可以表示为 $\sigma(t)$, $\sigma(t) = F(t)/A(t)$,其中 $F(t)$ 为形变过程中相应面积 $A(t)$ 上的作用力。 $A(t)$ 可通过公式 $A(t) = h_0 \times A_0/h(t)$ 求得,其中 A_0 为凝胶与质构仪探头的原始接触面积。形变过程中凝胶最大的应力表示为 σ ,用以表示凝胶的强度。

以 $\sigma(t)$ 为横坐标, ϵ_h 为纵坐标,作应力-应变曲线,计算该曲线当 ϵ_h 趋近于零时的斜率,可求得杨氏模量(Young's moduli, E), $E = (d\sigma/d\epsilon)_{\epsilon \rightarrow 0}$ 。该模量用以表示凝胶的刚性。

2 结果与讨论

2.1 多孔凝胶的形成

本研究首先把8% (m/V)的SPI溶液置于95℃的水浴中使蛋白质变性30 min,待其冷却至室温后调节pH至7.0,并加入6.67 U MTGase/g SPI,分别以常规方法(45℃孵育4 h)或均质方法(8000 r/min均质30 s)使其成胶;然后采用X射线断层扫描仪分别对两者的微结构进行观察。图1及图2为以两种方法制得凝胶的三维(3D)及二维(2D)图片。图1的3D及2D图片均显示,由常规方法制得的大豆蛋白凝胶结构均匀,并无明显的孔隙出现。而图2的3D及2D图则表明,由均质方法制备的大豆蛋白凝胶中存在大量致密、分布均匀的孔洞,说明该法可制备得到多孔凝胶。

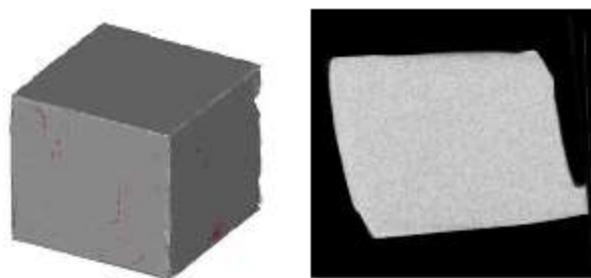


图1 常规方法制得大豆蛋白凝胶的3D重构图和2D图

Fig.1 Three-dimensional (3D) reconstruction and two-dimensional (2D) photo of the soy protein hydrogel prepared by common method

均质方法可制备多孔凝胶的原因在于蛋白液在高速均质的过程中产生大量气泡;另一方面,蛋白质在高速剪切及MTGase作用下迅速交联,蛋白液中的气泡结构得以快速固定,从而形成具有大量孔隙的

凝胶。

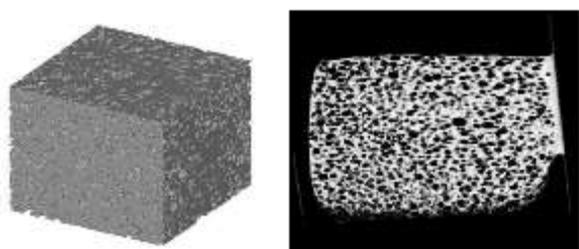


图2 均质方法制得多孔大豆蛋白凝胶的3D图和2D图

Fig.2 3D reconstruction and 2D photo of the soy protein hydrogel prepared by homogenizing method

2.2 加工条件对大豆蛋白多孔凝胶机械性能的影响

2.2.1 酶添加量的影响

本研究把SPI溶液置于95℃水浴中处理30 min,以8000 r/min对其均质30 s,改变酶的添加量,考察MTGase添加量对多孔凝胶机械性能的影响。从表1可以看出,7.33和8.00 U MTGase/g SPI所形成凝胶的应变值较高,表明其形变能力比其它样品更强。反映凝胶强度的应力和凝胶刚性的杨氏模量则是以添加了6.67 U MTGase /g SPI的凝胶最大。

表1 MTGase添加量对大豆蛋白多孔凝胶机械性能的影响

Table 1 Mechanical properties of the porous hydrogels prepared with different additions of MTGase

| 酶添加量 (U MTGase/g SPI) | ϵ /- | σ /kPa | E/kPa |
|--------------------------|---------------|---------------|-----------|
| 5.33 | 0.72±0.03 | 12.2±1.0 | 5.4±0.28 |
| 6 | 0.63±0.01 | 13.4±1.0 | 6.9±0.33 |
| 6.67 | 0.65±0.04 | 15.8±0.7 | 10.3±0.42 |
| 7.33 | 1.40±0.04 | 15.1±1.1 | 8.2±0.28 |
| 8 | 1.33±0.17 | 13.0±1.3 | 8.2±0.28 |

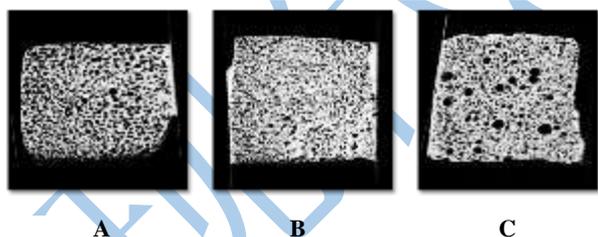


图3 不同MTGase添加量制得大豆蛋白多孔凝胶的2D图

Fig.3 2D photos of the soy protein porous hydrogel prepared with different additions of MTGase

注: A: 5.33 U MTGase/g SPI, B: 6.67 U MTGase/g SPI;

C: 8.00 U MTGase/g SPI。

以不同 MTGase 添加量所形成大豆蛋白多孔凝胶的 2D 图表明 (图 3), 凝胶孔隙大小分布的均匀性并不随 MTGase 添加量的提高而提高。当 MTGase 添加量较低时 (5.33 U MTGase/g SPI), 所形成凝胶的孔隙较大; 随着 MTGase 添加量的提高 (6.67 U MTGase/g

SPI), 孔隙变小; 同时由于蛋白交联度的增加, 导致凝胶的应变下降和应力、杨氏模量的上升。但当 MTGase 添加量进一步提高时 (8.00 U MTGase/g SPI), 凝胶内部形成不规则的大孔, 从而造成其应变上升以及应力和杨氏模量的下降。

2.2.2 蛋白热变性温度的影响

本研究以MTGase作为交联剂使大豆蛋白形成多孔凝胶。为此, 本研究对大豆蛋白进行交联反应前对其进行热处理, 以期使大豆蛋白分子结构展开, 提供更多可参与交联反应的侧链基团。本研究以不同的水浴温度对SPI溶液处理30 min, 固定酶添加量为6.67 U MTGase/g SPI, 以8000 r/min对SPI溶液均质30 s, 考察热变性温度对所形成多孔凝胶微结构的影响。从表2可以看出, 随着热处理温度的升高, 所成凝胶的应变、应力和杨氏模量都呈上升的趋势。

表2 不同热变性温度对大豆蛋白多孔凝胶机械性能的影响

Table 2 Mechanical properties of the porous hydrogels with different heat denaturation temperatures

| 热变性温度/℃ | ϵ /- | σ /kPa | E/kPa |
|---------|---------------|---------------|----------|
| - | 0.27±0.02 | 2.4±0.2 | 4.1±0.5 |
| 60 | 0.30±0.02 | 3.4±0.4 | 5.0±0.1 |
| 80 | 0.62±0.06 | 12.1±1.6 | 7.0±0.9 |
| 95 | 0.65±0.04 | 15.8±0.7 | 10.3±0.4 |

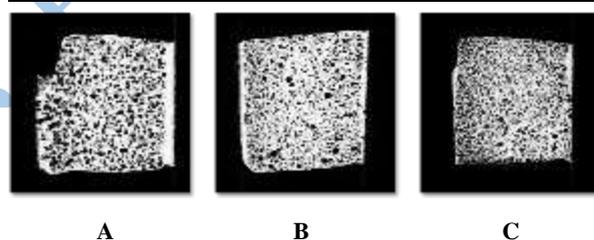


图4 不同蛋白热变性温度制得大豆蛋白多孔凝胶的2D图

Fig.4 2D photos of the soy protein porous hydrogel prepared with different heat denaturation temperatures

注: A: 60℃; B: 80℃; C: 95℃。

图4结果显示, 随着热变性温度提高, 所形成凝胶的孔隙更致密、大小分布更均匀。这表明, 提高热变性温度可使所形成凝胶的孔隙大小分布更均匀, 从而提高其应力及杨氏模量。另一方面, 大豆蛋白的变性程度随热处理温度的提高而提高, 参与 MTGase 诱导交联反应侧链基团的增加, 也是所形成凝胶应变、应力及杨氏模量提高的原因。

2.2.3 均质速度的影响

本研究以95℃热处理30 min对大豆蛋白进行变性, 固定酶的添加量为6.67 U MTGase/g SPI, 以不同的速度对SPI溶液均质30 s, 以考察均质速度对所形成凝胶结构的影响。表3结果表明, 大豆蛋白多孔凝胶的

应变随均质速度的提高而降低；各样品的应力和杨氏模量以经过8000 r/min均质30 s制得的凝胶最大。

表 3 不同均质速度对大豆蛋白多孔凝胶机械性能的影响

Table 3 Mechanical properties of the porous hydrogels prepared by different homogenizing speed

| 均质速度/(r/min) | ε /- | σ /kPa | E/kPa |
|--------------|------------------|---------------|----------|
| 4000 | 0.72±0.02 | 10.4±0.4 | 6.0±0.2 |
| 6000 | 0.69±0.06 | 11.6±2.8 | 6.9±0.8 |
| 8000 | 0.65±0.04 | 15.8±0.7 | 10.3±0.4 |
| 10000 | 0.49±0.02 | 8.5±0.2 | 7.7±0.3 |
| 12000 | 0.50±0.02 | 6.4±0.1 | 6.0±0.1 |

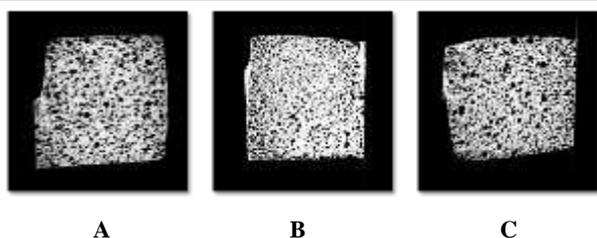


图5 以不同均质速度制得大豆蛋白多孔凝胶的2D图

Fig. 5 2D photos of the soy protein porous hydrogel prepared by different homogenizing speed

注：A：4000 r/min；B：8000 r/min；C：12000 r/min。

图5结果显示，以较低均质速度（4000 r/min）制得凝胶，其内部形成的孔隙较大且数量有限。随着均质速度的提高（8000 r/min），凝胶的孔隙变得更细密，大小分布更均匀，从而导致凝胶的应力和杨氏模量的上升。但当均质速度进一步提高后（12000 r/min），凝胶内形成了不规则的大孔，其应变、应力和杨氏模量均随之下降。

3 结论

本研究以 MTGase 交联结合高速均质制备得到大豆蛋白多孔凝胶。通过对凝胶的制备条件：MTGase 添加量、蛋白热变性温度及均质速度进行调控，可制

得具有不同孔隙度及机械性能的多孔凝胶。对 SPI 溶液进行 95 °C 变性 30 min，添加 6.67 U MTGase/g SPI，以 8000 r/min 均质 30 s，可制备得到孔隙大小分布均匀、具有较好的应变及较强应力和杨氏模量的大豆蛋白多孔凝胶。

参考文献

- [1] Chen S C, Wu Y C, Mi F L, et al. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N, O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery [J]. Journal of Controlled Release, 2004, 96: 285-300
- [2] Knuth K. Hydrogel controlled release drug delivery system [J]. Foreign Medical Sciences of Pharmacy, 1994, 21(5): 297-300.
- [3] Dorkoosh F A, Brussee J, Verhoef J C, et al. Preparation and NMR characterization of superporous hydrogels (SPH) and SPH composites [J]. Polymer, 2000, 41(23): 8213-8220
- [4] Gotoh T, Nakatani Y, Sakohara S. Novel Synthesis of Thermosensitive Porous Hydrogels [J]. Journal of Applied Polymer Science, 1998, 69(5): 895-906
- [5] 卢义伯,潘超.大豆功能因子的研究进展[J].现代食品科技, 2007,23(2):105-108
- [6] Ikeda S, Foegeding E A, Hagiwara T. Rheological study on the fractal nature of the protein gel structure [J]. Langmuir, 1999, 15(25): 8584-8589
- [7] 张焯,郭健,杨晓泉,等.MTG 酶诱导大豆 11S 球蛋白透明冷致凝胶的制备[J].化工学报,2011,62(12):3560-3568
- [8] 王君立,唐传核,周志红,等.加工条件对微生物转谷氨酰胺酶(MTGase)酶促豆腐凝胶质构性质的影响[J].现代食品科技,2006,22(2):1-3
- [9] Renkema J M S, Knabben J H M, van Vliet T. Gel formation of β -conglycinin and glycinin and their mixtures [J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15(4-6): 407-414