

# 大豆分离蛋白胶骨粘合性能的研究

张逸婧, 陈海娟, 刘永祥, 张云璐, 汤晓智, 沈新春\*

南京财经大学食品科学与工程学院 江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心  
江苏高校粮油质量安全控制及深加工重点实验室, 南京 210023

**摘要:**以粘合强度为指标,研究了大豆分离蛋白(Soybean protein isolate, SPI)胶的 pH、浓度、固化时间对猪扇骨粘合性能的影响,并通过正交实验优化了其具有最佳粘合性能的工艺参数。结果表明:大豆分离蛋白胶的浓度、pH(仅 6.5 与 8.5 时)、固化时间(仅 12 h 与 36 h 时)对猪扇骨的粘合强度的影响有显著性差异( $P < 0.05$ )。进一步的研究表明大豆分离蛋白胶对猪扇骨具有最佳粘合性能的工艺参数为:浓度 10%, pH 6.5, 固化时间 48h, 此时的粘合强度达到 380KPa。本研究表明 SPI 胶具有潜在的医用黏合剂的应用价值。

**关键词:**大豆分离蛋白;骨;粘合强度

中图分类号: Q816

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.007

## Adhesive Strength of Soybean Protein Isolate onto Porcine Bones

ZHANG Yi-jing, CHEN Hai-juan, LIU Yong-xiang, ZHANG Yun-lu, TANG Xiao-zhi, SHEN Xin-chun\*

College of Food Science and Engineering/Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety/Key Laboratory of Grains and Oils Quality Control and Processing, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China

**Abstract:** The purpose of this study was to explore the influence of pH, concentration and curing time on the adhesive strength of soybean protein isolate (SPI) onto porcine bones. SPI adhesive was used to bond porcine bones and its bonding performance parameters were optimized through orthogonal experiments. The results of single factor test showed that SPI concentration, pH (at 6.5 and 8.5) and curing time (at 12 h and 36 h) had significant effects on the adhesive strength ( $P < 0.05$ ). The results of orthogonal experiments indicated that the optimal bonding performance of the adhesive was obtained at SPI concentration of 10%, pH of 6.5 and curing time of 48 h. Under the optimal condition the bonding strength of the SPI adhesive was 380 KPa, suggesting that SPI has a potential to be utilized as an adhesive in medical fields.

**Key words:** soybean protein isolate; bone; adhesive strength

大豆分离蛋白是以低温大豆粕为原料,通过碱溶酸沉得到的一种蛋白质含量在 90% 以上的高纯度大豆蛋白质<sup>[1]</sup>,因其蛋白含量高、氨基酸种类丰富,被当作奶粉代替品添加至乳制品中,也作为营养强化剂添加至肉类和面制品中<sup>[2]</sup>。作为粘合剂,大豆分离蛋白胶也是近年来大豆研究开发的热点之一,并显示出巨大的发展潜力。Mo 等<sup>[3-5]</sup>研究表明大豆分离蛋白及其亚基在樱桃木上均具有优良的粘合性能。李永辉等<sup>[6]</sup>发现经过十二烷基硫酸钠

(SDS)改性的大豆分离蛋白在胶合板上的粘合性能比未改性时提升许多,虽然大豆蛋白胶在木材上的应用已有诸多报道,但其作为新型生物粘合剂在医学领域的研究尚属空白。

临床医学中,医用粘合剂的出现代替传统骨折钢针固定、伤口缝线缝合,缩短手术时间的同时能够大大减轻病人的痛苦<sup>[7]</sup>。传统的化学粘合剂如使用最广泛的  $\alpha$ -氰基丙烯酸酯类粘合剂,具有粘合速度快,使用方便等优点,但其也有诸多弊端,如降解性能差、妨碍组织愈合等问题<sup>[8,9]</sup>,因此,具有良好生物相容性的生物粘合剂越来越受欢迎。目前研究较多的生物粘合剂是多糖类粘合剂,蔡真真等<sup>[10]</sup>将海藻酸钠为主体的混合胶应用于猪股骨,测试其拉伸力,结果表明骨折块固定一周后其粘合强度达到巅峰 33 KPa。郑江等<sup>[11]</sup>将海藻酸钠、羧甲基纤维素

收稿日期: 2015-09-07 接收日期: 2015-12-28

基金项目: 国家自然科学基金(21476103); 江苏省高校自然科学基金重大项目(14KJA550002); 江苏省自然科学基金(BK20141484); 2015 江苏省高校优秀科技创新团队资助项目; 江苏省高校优势学科建设工程资助项目; 南京财经大学研究生科技创新计划

\* 通讯作者 Tel: 86-013675121836; E-mail: shenxinchun@njue.edu.cn

钠、瓜尔胶三种胶体及其复合物作为骨粘合剂应用于断骨,结果表明三种胶体在饱和浓度时粘合强度最大,最大粘合强度为 10 KPa。除多糖类粘合剂外,蛋白类粘合剂是近年来热门的一类新型生物粘合剂,蛋白类粘合剂包括动物蛋白和植物蛋白,动物蛋白粘合剂已有报道,蒋臻等<sup>[12]</sup>将翡翠贻贝足蛋白作为生物粘合剂,其在猪股骨上的抗拉强度在 100 KPa 以上,艾宇飞等<sup>[13]</sup>模仿贻贝中具有超强粘性的多巴,合成聚乙二醇-多巴胺,以明胶模拟人体组织,测试聚乙二醇-多巴胺在明胶上的粘合强度,粘合强度达到 1 MPa 以上。与动物血液源的动物蛋白粘合剂相比,植物蛋白粘合剂具有更低的免疫原性<sup>[14,15]</sup>,因此大豆蛋白胶有很好的医学临床应用前景。本研究以粘合强度为指标,研究了大豆分离蛋白胶的 pH、浓度、固化时间对猪扇骨粘合性能的影响,并通过正交实验优化了其具有最佳粘合性能的工艺参数,为临床医用粘合剂的制备提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与设备

材料:市售含羞草黑大豆,产自江苏昆山;市售新鲜猪扇骨。

试剂:乙醚,上海生物工程股份有限公司;氯化钙,国药集团化学试剂有限公司;PBS 磷酸盐缓冲液,北京索莱宝科技有限公司。所有实验试剂均为分析纯。

设备:HY-0580 微机控制电子万能材料试验机,上海横翼精密仪器有限公司;T504 医疗电锯,天津市津东希翼医疗器械厂;P-500-3 微型电钻组,陕西施力特机电设备技术工程有限公司。

### 1.2 大豆分离蛋白胶的制备

#### 1.2.1 脱脂大豆粉的制备

脱脂大豆粉的制备参照陈振家<sup>[16]</sup>的方法,大豆磨粉后过 80 目筛,与脱脂溶剂乙醚按 1:8(W/V, g/mL)于 25 ℃、110 rpm 条件下在恒温振荡器中震荡 8 h,取出后弃去上清液,保留下层豆粉,以上步骤重复三次,将脱脂豆粉风干备用。

#### 1.2.2 大豆分离蛋白的制备

大豆分离蛋白的制备参照宋鹏<sup>[17]</sup>的方法,脱脂豆粉与去离子水按 1:15(W/V, g/mL)混合,调 pH 为 8.5,40 ℃ 搅拌提取 20 min;4 ℃、3100 × g 离心 20 min;取上清液调 pH 为 4.5 使蛋白析出;4 ℃、3100 × g 离心 5 min,沉淀为 SPI,脱盐冻干后;20 ℃ 保存

备用。

#### 1.2.3 大豆分离蛋白胶的制备

将冻干的 SPI 溶于 0.01 mol/L PBS 缓冲液,调节 pH,室温下搅拌 30 min,待 SPI 完全溶解后静置 30 min,制备成大豆分离蛋白胶。

### 1.3 骨片的制备

市售新鲜猪扇骨,剔除表面的组织,用电锯切割成约 35 mm × 10 mm × 5 mm 的骨片,在骨片顶部穿孔,方便测试拉伸力。将骨片完全浸泡入 PBS 缓冲液中在 37 ℃ 恒温培养箱中放置 1 h,溶出血水,室温下晾晒 3 h。

### 1.4 大豆分离蛋白胶粘合强度影响因素的实验

#### 1.4.1 大豆分离蛋白胶的 pH 对其粘合强度的影响

选择大豆分离蛋白胶浓度为 5%,分别调配成 pH6.5、7.0、7.5、8.0、8.5,每组设置 12 个平行,均匀涂至骨片表面,绑牢后放入饱和氯化钙浸泡,恒温培养箱固化 36 h 后测定粘合强度。

#### 1.4.2 大豆分离蛋白胶的浓度对其粘合强度的影响

选择大豆分离蛋白胶 pH 为 7.0,分别调配成浓度 2%、5%、8%、10%、15%,每组设置 12 个平行,均匀涂至骨片表面,绑牢后放入饱和氯化钙浸泡,恒温培养箱固化 36 h 后测定粘合强度。

#### 1.4.3 大豆分离蛋白胶的固化时间对其粘合强度的影响

选择大豆分离蛋白胶 pH 为 7.0,浓度 5%,均匀涂至骨片表面,绑牢后放入饱和氯化钙浸泡,恒温培养箱分别固化 12、24、36、48 h 后测定粘合强度,每组设置 12 个平行。

### 1.5 大豆分离蛋白胶粘合性能工艺参数的优化实验

在单因素实验的基础上,以 pH、浓度、固化时间为因素,选取各因素下的 3 个水平,以粘合强度为指标,设计 3 因素 3 水平正交实验,正交表见表 1。

### 1.6 粘合强度测定

粘合强度的测定参照张建新等<sup>[18]</sup>的方法,将大小、形状相当的两块骨片分成一组,室温下在粘接部位涂上实验大豆胶,粘接面积约 10 mm × 10 mm,用橡皮筋将粘接部位固定绑实,在饱和氯化钙中浸泡 15 min。将粘好的骨块在 25 ℃ 恒温培养箱放置一段时间固化,待胶完全固化好后解除橡皮筋,在万能材料试验机上测试其拉伸力 F,拉伸速度为 50 mm/

min, 记录粘接面积  $S$ , 粘合强度  $\sigma = F/S$ 。每组 12 个平行, 取平均值为该组粘合强度。

表 1 因素与水平表

Table 1 Factors and levels

水平 Level	因素 Factor		
	(A) pH	(B) 浓度 Concentration	(C) 固化时间 Curing time
1	6.5	5%	24 h
2	7.0	8%	36 h
3	7.5	10%	48 h

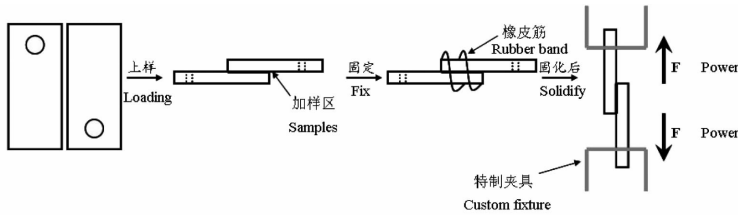


图 1 粘合强度测试示意图

Fig. 1 A diagram of the shear strength test

## 1.7 数理统计分析

实验所得数据表示为平均值  $\pm$  标准偏差, 采用 Excel、JMP 对数据进行方差分析, 当  $P < 0.05$  时差异具有显著性意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆分离蛋白胶粘合强度影响因素的实验

#### 2.1.1 pH 对大豆分离蛋白胶粘合强度的影响

pH 对大豆分离蛋白胶粘合强度的影响如图 2 所示。经显著性差异分析, pH 6.5 和 8.5 的大豆胶之间粘合强度差异显著 ( $P < 0.05$ ), 其余 pH 的大豆胶之间粘合强度的差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。考虑

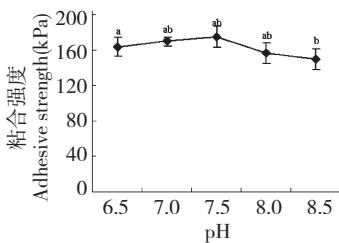


图 2 pH 对大豆分离蛋白胶粘合强度的影响

Fig. 2 Effect of pH on the adhesive strength of SPI

注: 同一曲线中标有不同小写字母者表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 标有相同小写字母者表示组间差异不显著 ( $P > 0.05$ )

Note: Different letters indicated significant difference ( $P < 0.05$ ), same letters indicated not significant difference ( $P > 0.05$ )

到本研究作用对象是动物骨骼, 大豆胶 pH 范围宜接近中性, 此时的大豆胶与骨骼组织能够更好的相容, 因此选取最适 pH 为 7.0。

#### 2.1.2 浓度对大豆分离蛋白胶粘合强度的影响

郑江等<sup>[19]</sup>将海藻酸钠和瓜儿胶作为骨骼粘合剂比较其粘性能, 选择的胶体浓度范围为 0 ~ 6%, 艾宇飞等<sup>[13]</sup>将光聚合仿贻贝生物粘合剂应用于明胶模拟的人体组织, 选择的胶体浓度为 40%, 细胞毒性实验结果证实该胶体对细胞的生物毒性较小。本研究选择的大豆蛋白胶浓度 2%、5%、8%、10%、15%, 浓度对大豆胶粘合强度的影响如图 3。

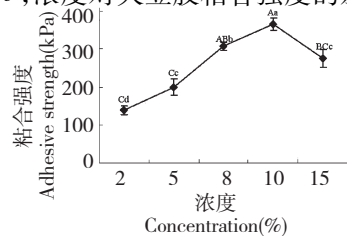


图 3 浓度对大豆分离蛋白胶粘合强度的影响

Fig. 3 Effect of concentration on the adhesive strength of SPI

注: 同一曲线中标有不同大写字母、小写字母者分别表示组间差异极显著 ( $P < 0.01$ ) 和显著 ( $P < 0.05$ ), 标有相同小写字母者表示组间差异不显著 ( $P > 0.05$ )

Note: Different uppercase letters and lowercase letters represented significant difference at  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$  respectively, the same lowercase letters represented not significant difference ( $P > 0.05$ )

经显著性差异分析,浓度 5% 与 15% 的大豆胶之间粘合强度差异不显著 ( $P > 0.05$ ),其余浓度的大豆胶之间粘合强度的差异均显著 ( $P < 0.05$ )。随着浓度升高,大豆胶粘合强度增大,当浓度从 5% 升至 8% 时,粘合强度增加幅度最大,由 200 KPa 升至 307 KPa,浓度 10% 时粘合强度达到最大值 366 KPa,当浓度超过 10% 时,粘合强度出现下降趋势,因此选取最适浓度为 10%。

### 2.1.3 固化时间对大豆分离蛋白胶粘合强度的影响

张建新等<sup>[18]</sup>将海藻酸钠为主体的胶黏剂粘合猪股骨,体外研究表明,胶体粘合力在固定后一周内达到巅峰,之后逐渐下降。余雪松等<sup>[20]</sup>将从甘薯中提取并加工而成的植物性胶黏剂粘合家兔肾脏表面,伤口愈合情况良好,在术后 1 d 手术区有少量胶黏剂颗粒,术后 3 d 植物性胶黏剂完全溶解,被组织吸收。本研究选择的固化时间为 12、24、36、48 h,固化时间对大豆蛋白胶粘合强度的影响如图 4。经显著性差异分析,固化时间 12 h 与 36 h 的大豆胶粘合强度之间的差异显著 ( $P < 0.05$ ),其余固化时间的大豆胶之间粘合强度的差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。选取最适固化时间为 36 h。

表 2 正交试验设计  $L_9(3^3)$  表

Table 2  $L_9(3^3)$  orthogonal design

试验数 No.	因素 Factor			粘合强度 Adhesive strength (KPa)
	A	B	C	
1	1	1	1	120
2	1	2	2	260
3	1	3	3	380
4	2	1	2	210
5	2	2	3	160
6	2	3	1	340
7	3	1	3	170
8	3	2	1	210
9	3	3	2	240
K1	760	500	670	
K2	710	630	580	
K3	620	960	710	
k1	253	167	223	
k2	237	210	237	
k3	207	320	237	
R	46	153	14	
优水平 Optimal level	A <sub>1</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	
优组合 Optimal combination	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub>			

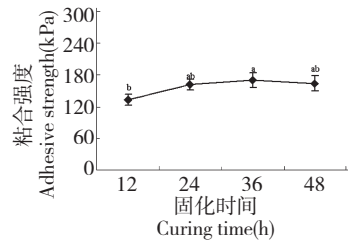


图 4 固化时间对大豆分离蛋白胶粘合强度的影响

Fig. 4 Effect of curing time on the adhesive strength of SPI  
注:同一曲线中标有不同小写字母者表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ),标有相同小写字母者表示组间差异不显著 ( $P > 0.05$ )

Note: Different letters indicated significant difference ( $P < 0.05$ ), same letters indicated not significant difference ( $P > 0.05$ ).

### 2.3 大豆分离蛋白胶粘合性能工艺参数的优化实验

根据表 1 的因素与水平表设计 3 因素 3 水平正交表,实验结果如表 2 和表 3。由表 3 方差分析表中数据可知,浓度的 3 水平:5%、8%、10% 对骨骼黏合应力的影响极显著 ( $P < 0.01$ ),pH 的 3 水平:6.5、7.0、7.5 和固化时间的 3 水平:24、36、48 h 对粘合强度影响不显著 ( $P > 0.05$ )。由表 2 正交试验设计表中数据可知,大豆胶粘合猪扇骨的最佳因素配比为  $A_1B_3C_3$ ,即大豆胶 pH6.5,浓度 10%,固化时间 48 h,此条件下粘合强度为 380 KPa。

表3 方差分析表

Table 3 analysis of variance table

因素 Factor	自由度 Degree of freedom	离均差平方和 Sum of squares of deviation from mean	均方 Mean square	F	Sig
A pH	2	23773.390	11886.695	1.349	0.275
B 浓度 Concentration	2	119910.390	59955.195	6.805	0.004
C 固化时间 Curing time	2	1309.060	654.530	0.074	0.929
e	27	170531.000	6315.963		

### 3 结论

本研究首次表明了 SPI 胶具有潜在的医用黏合剂的应用价值,并且确定了 SPI 胶的过程参数。结果表明:大豆分离蛋白胶的浓度、pH(6.5 与 8.5 时)、固化时间(12 h 与 36 h 时)对猪扇骨的粘合强度的影响有显著性差异( $P < 0.05$ )。进一步的研究表明大豆分离蛋白胶对猪扇骨具有最佳粘合性能的工艺参数为:浓度 10%,pH 6.5,固化时间 48 h,此时的粘合强度达到 380KPa。大豆分离蛋白胶具有粘合强度大、原料来源广、良好的生物相容性等优点,有潜力作为骨粘合剂应用于临床医学领域。但胶体与骨骼的构效关系以及粘合作用机理尚不清楚,因此进一步阐述粘合机理以及通过改性获得高粘合强度的大豆胶将是下一阶段研究的主要方向。

#### 参考文献

- Han M, Yang G, Lu JC. Progress of studies on soy protein adhesive. *Appl Chem Ind*, 2014, 43:1320-1323.
- Qi GY, Sun XZ. Peel adhesion properties of modified soy protein adhesive on a glass panel. *Ind Crops Prod*, 2010, 32: 208-212.
- Mo XQ, Sun XZ. Soy proteins as plywood adhesives: formulation and characterization. *J Adhesion Sci Technol*, 2012, 27: 2014-2026.
- Mo XQ, Wang DH, Sun XZ. Physicochemical properties of  $\beta$  and  $\alpha$  subunits isolated from soybean  $\beta$ -conglycinin. *J Agric Food Chem*, 2011, 59:1217-1222.
- Mo XQ, Zhong ZK, Wang DH, et al. Soybean glycinin subunits: characterization of physicochemical and adhesion properties. *J Agric Food Chem*, 2006, 54:7589-7593.
- Li YH (李永辉), Fang K (方坤), Sheng KC (盛奎川). Study on the properties of SDS modified soy protein adhesive. *Cereals Oils Proc (粮油加工)*, 2007, 8:90-93.
- Zhou K, Shi Z. Research advances on medical adhesive in emergency medicine. *Progr Mod Biomed*, 2007, 9:1408-1410.

- Liu WZ, Zhang ZX. Recent situation and development of  $\alpha$ -cyanoacrylate adhesive. *China Adhesives*, 2004, 13(2):40-45.
- Nie C, Liu J, Huang HJ. Study on humidity-heat aging resistance of  $\alpha$ -cyanoacrylate adhesive. *China Adhesives*, 2013, 22(1):9-11.
- Cai ZZ (蔡真真). Biomechanical experimental study of seaweed mixed adhesive on bone. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine (福建中医药大学), MSc. 2010.
- Zheng J (郑江), Chen Y (陈怡), Gao YH (高亚辉), et al. Comparative study on adhesive strength of three colloid materials and their complexes as bone adhesives. *Chin J Marine Drugs (中国海洋药物)*, 2009, 1:26-28.
- Jiang Z (蒋臻), Liu JP (刘加鹏), Jin LH (金利华), et al. Extraction and application of pernaviridis foot protein as bioadhesive. *J Biomed Eng (生物医学工程学杂志)*, 2010, 27:1266-1273.
- Ai YF (艾宇飞), Yang DZ (杨冬芝), Nie J (聂俊). Synthesis and characterization of photopolymerizable mussel-mimetic adhesive. *Adhesion (粘接)*, 2015, 1:31-36.
- Zhao H, Sagert J, Hwang DS, et al. Glycosylated hydroxytryptophan in a mussel adhesive protein from *Perna viridis*. *J Biol Chem*, 2009, 284:23344-23352.
- Wang T, Tan Z, Sun Z. Low immunoreactive glycosylated soybean antigen proteins production: system-wide analysis of their immunogenicity *in vitro* and *in vivo*. *Food Agric Immunol*, 2015, 26:703-716.
- Chen ZJ (陈振家), Hao LP (郝利平). The extraction and subunit analysis of storage protein of different soybean cultivars in shanxi province. *J Shanxi Agric Univ (山西农业大学学报, 自科版)*, 2007, 27(1):76-78.
- Song P (宋鹏), Wei AC (魏安池), Zhou RB (周瑞宝), et al. Effects of different process on the yield of soybean protein isolate. *China Oils Fats (中国油脂)*, 2011, 36(2):16-19.
- Zhang JX (张建新), Gao YH (高亚辉), Pan ZZ (潘壮壮), et al. *In vitro* study of bone adhesive mainly composed of sodium alginate. *Chin J Tissue Eng Res (中国组织工程研究与临床康复)*, 2010, 14:7037-7040.