

氯化胆碱基低共熔溶剂对明胶溶液凝胶作用的影响

郭卜祯¹, 马宏瑞^{1*}, 徐 洋², 孔德懿¹, 郝永永³

(1. 陕西科技大学 环境科学与工程学院, 陕西 西安 710016; 2. 四川轻化工大学 生物工程学院, 四川 宜宾 643002; 3. 陕西科技大学 轻工科学与工程学院, 陕西 西安 710016)

摘要: 采用氯化胆碱基低共熔溶剂 (DES) 对明胶溶液中蛋白质构象进行调控。以明胶溶液为对照组, 引入 5 组不同酸碱性的氯化胆碱基 DES, 通过透射比、粒径、Zeta 电位测定, 以及 UV-Vis、FTIR、XPS、圆二色光谱仪表征和热性能测试, 考察了 DES 酸碱性对明胶溶液凝胶作用的影响。结果表明, 酸性 DES (氯化胆碱+草酸、氯化胆碱+对甲苯磺酸) 对明胶溶液的影响主要为 pH 效应, 改变化学环境能够使明胶化学结构强度降低, 稳定性下降; 中性 DES (氯化胆碱+甘油、氯化胆碱+山梨醇) 能够破坏明胶内部原有氢键, 形成新的氢键网络, 在氯化胆碱-甘油低共熔溶剂作用下, 明胶溶液中蛋白质二级结构的 α -螺旋与 β -折叠结构含量总和由 54.29% 增至 70.86%, 趋向更有序的刚性结构转变, 间接增加了蛋白三级结构中折叠构象含量, 改变空间交联网络, 促进明胶溶液的凝胶作用。

关键词: 明胶溶液; 低共熔溶剂; 蛋白质构象; 凝胶作用; 氢键; 疏水作用; 皮革化学品

中图分类号: O636.9; TQ431.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 07-1607-10

Effect of cholinyl chloride-based eutectic solvents on gelation performance of gelatin solution

GUO Buzhen¹, MA Hongrui^{1*}, XU Yang², KONG Deyi¹, HAO Yongyong³

(1. School of Environmental Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710016, Shaanxi, China; 2. School of Biological Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin 643002, Sichuan, China; 3. College of Bioresources Chemical & Materials Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710016, Shaanxi, China)

Abstract: The protein conformation in gelatin solution was regulated by choline chloride-based deep eutectic solvents (DES). Five different acidic and alkaline choline chloride-based DES were introduced into gelatin solution, with the influence of DES acidity on the gelling activity of gelatin solution evaluated through transmittance ratio, particle size and Zeta potential tests, UV-Vis, FTIR, XPS, circular dichroism spectroscopy characterization, and thermal performance test. The results indicated that acidic DES (choline chloride+oxalic acid, choline chloride+*p*-toluenesulfonic acid) changed the pH of gelatin solution, thus leading to change in chemical environment which could reduce the chemical structure strength and stability of gelatin, while neutral DES (choline chloride+glycerol, choline chloride+sorbitol) could disrupt the original hydrogen bonding network within gelatin and form new hydrogen bonds. Under the action of choline chloride-glycerol DES, the total content of α -helix and β -sheet structures of protein secondary structure in gelatin solution increased from 54.29% to 70.86%, which tended to be more orderly rigid structure transformation, indirectly increased the content of folded conformation in protein tertiary structure, changed the spatial cross-linking network, thereby enhancing the gelation of gelatin solution.

Key words: gelatin solution; deep eutectic solvents; protein conformations; gelation; hydrogen bonds; hydrophobic interaction; leather chemicals

收稿日期: 2024-08-07; 定用日期: 2024-09-10; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240621

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22076113)

作者简介: 郭卜祯 (1999—), 女, 硕士生, E-mail: 220311001@sust.edu.cn. 联系人: 马宏瑞 (1963—), 男, 教授, E-mail: mahr@sust.edu.cn.

明胶是胶原水解过程中形成的生物聚合物,在溶液中以柔性卷曲结构存在^[1]。当明胶溶液质量浓度极低($<0.5\text{ mg/L}$)时,卷曲-螺旋逆转主要发生在分子内部;当明胶溶液质量浓度 $>0.5\text{ mg/L}$ 后,卷曲-螺旋逆转从分子内延伸至分子间,三维网络结构逐渐稳定,实现凝胶化^[2]。明胶的凝胶特性被广泛应用于食品、医药、工业制造等领域。但在湿法纺丝中使用的液相明胶,存在着部分氨基酸含量低、相对分子质量分布差异大、凝胶性能较差的应用难点,阻碍了明胶的高效利用^[3-4]。因此,迫切需要对液相明胶空间交联程度的调控,以提高其凝胶性能^[5]。

YANG 等^[6]测试了加热处理对小麦粉中蛋白质理化性质的影响,结果发现,加热使可溶性蛋白质聚集成不溶性的高相对分子质量蛋白质聚集物,改变蛋白的空间交联结构。MINE^[7]研究发现,干热条件可使蛋白质形成空间结构膨胀,分子构象向部分未折叠状态移动,这一部分展开构象在凝胶化过程中发挥重要的作用。JOHNSTON-BANKS^[8]研究液相明胶体系时发现, α -螺旋和 β -折叠占比及它们的肽链数总和与凝胶强度具有相关性。GOUDIE 等^[9]研究表明,明胶的凝胶行为受到整个明胶分子中氨基酸侧链上电荷的影响,调控 pH 可以改变可电离侧链的存在和分布。上述相关研究中,对液相明胶的调控主要通过尿素或二甲基酰胺等破坏氢键与静电作用的方式来改变空间交联结构,存在不稳定性与毒性等缺点,因此其应用受到限制^[10]。

低共熔溶剂(DES)安全、无毒,具有生物降解性等优点,常被用于研究聚合物的解聚重组,其中氯化胆碱-尿素为典型的 DES。研究发现^[11],DES 可以改变皮革材料的溶胀特性,使蛋白质结构更具有柔性,并降低废金属元素含量。WU 等^[12]研究表明,DES 具有增塑作用,适量引入 DES 能够促进明胶分子链间羧基与聚乙烯醇(PVA)反应,实现对明胶分子链的调控。DES 的独特性质不仅为氢键的破坏与重组提供了理论基础,还极大地拓展了 DES 在多个领域的潜在应用,在大分子氢键网络结构的调控中表现出巨大潜力。

本文拟通过研究不同酸碱性氯化胆碱基 DES 对明胶溶液中蛋白质粒径分布、等电点、蛋白质二级结构和明胶热稳定性等的影响规律,探究 DES 对明胶溶液凝胶化效果的调控机制。以期为湿法纺丝等液相明胶资源化利用相关领域提供参考。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

明胶颗粒(胶强度约 200 g Bloom,生物级)、氯化胆碱、对甲苯磺酸、山梨醇(分析纯),上海麦

克林生化科技股份有限公司;尿素(质量分数 $\geq 99.5\%$),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;草酸(分析纯),天津市科密欧化学试剂有限公司;甘油(分析纯),天津市富宇精细化工有限公司。

UV-2800A 型紫外-可见分光光度计(UV-Vis),尤尼柯(上海)仪器有限公司;Nano-ZS90 型纳米粒度电位分析仪,英国 Malvern 公司;Litesizer 500 型纳米粒度及 Zeta 电位测试仪,奥地利 Anton Paar 公司;Vertex 70V 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR),德国 Bruker 公司;Chirascan V100 型圆二色光谱仪(CD),英国 Applied Photophysics 公司;K-Alpha 型 X 射线光电子能谱仪(XPS),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;STA 449 F3 Jupiter 型同步热分析仪(TG-DSC),德国 Netzsch 公司。

1.2 方法

1.2.1 DES 制备

按表 1 配方,将不同物质的量比的氢键受体(HBA)与氢键供体(HBD)加入到锥形瓶中,搅拌下混合均匀后,在油浴加热下升温至 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$,搅拌至溶液澄清,然后冷却至室温,溶液状态不发生变化,即得到氯化胆碱基 DES,标记为 x -DES($x=1\sim 5$)。其中,1-DES 呈弱碱性,2-DES 与 3-DES 呈酸性,4-DES 与 5-DES 呈中性。

表 1 DES 配方
Table 1 Deep eutectic solvent formulation

样品名	HBD	HBA	$n(\text{HBA}):n(\text{HBD})$
1-DES	氯化胆碱	尿素	1:2
2-DES	氯化胆碱	草酸	1:1
3-DES	氯化胆碱	对甲苯磺酸	1:1
4-DES	氯化胆碱	甘油	1:2
5-DES	氯化胆碱	山梨醇	1:1

1.2.2 含 DES 明胶溶液样品的制备

首先,称取 1.00 g 明胶颗粒,将其加入到 95 mL 去离子水($\text{pH}=7$)中,升温至 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 搅拌 3 h 后,待明胶颗粒溶解,用去离子水定容至 100 mL,得到质量浓度为 10 g/L 的明胶溶液。然后,向 100 mL 明胶溶液中加入 2.50 g x -DES,磁力搅拌下分散均匀,充分反应至无油状分层,得到 DES 含量〔以每 mL 明胶溶液中加入的 DES 质量(g)计,下同〕为 0.025 g/mL 的明胶溶液,标记为 Gel+ x -DES。将其置于试剂保存瓶中,常温下保存不同时间(1、4 h)的样品记为样品组 I;置于 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存 48 h 的样品记为样品组 II;使用冷冻干燥机对样品组 II 进行冷冻干燥($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 h),得到的样品记为样品组 III。

首先,称取 6.67 g 明胶颗粒,将其加入到 95 mL 去离子水中,用去离子水定容至 100 mL,得到质量

浓度为 66.7 g/L 的明胶溶液。然后, 向其中加入 2.5 g x-DES, 按上述步骤得到的样品记为样品组 IV。

首先, 配制浓度均为 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液和盐酸。然后, 在各烧杯中分别加入 100 mL 保存时间为 1 h 的样品组 I, 逐滴加入 NaOH 溶液或盐酸中, 调至 pH 分别为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11, 常温下静置 24 h, 获得的样品记为样品组 V。

1.3 表征与测试

1.3.1 透射比测定

参照 GB 6783—2013《食品安全国家标准食品添加剂明胶》中透射比检测方法, 在 45 °C 下使用 UV-Vis 测定样品组 IV 在 450 和 620 nm 下的透射比。

1.3.2 Zeta 电位测定

用纳米粒度电位分析仪测定样品组 V 的 Zeta 电位, 然后绘制 pH(x) 与 Zeta 电位(y) 的关系曲线, 拟合得到标准曲线方程, 对其求得 $y=0$ 时的 x 值, 即为明胶溶液的等电点。

1.3.3 纳米粒度测定

用纳米粒度及 Zeta 电位测试仪于室温下测定保存时间为 1 h 的样品组 I 的等效粒子流体动力学直径和多分散性指数, 测试温度为 25 °C, 平衡时间为 10 s, 测定次数为 30 次。

1.3.4 UV-Vis 测定

测定保存时间为 1 h 的样品组 I 的 UV-Vis 吸收光谱, 测试波长范围 200~800 nm。

1.3.5 FTIR 测定

将干燥后的固体 KBr 在玛瑙研钵中研磨, 使用压片机将其压成薄片, 量取保存时间为 1 h 的样品组 I 滴至 KBr 薄片上, 使用配套烤灯将液体样品烘干。测试波数范围 4000~700 cm^{-1} , 分辨率 4 cm^{-1} , 扫描次数 32 次。使用 OMNIC 与 Peakfit 软件对 1700~1600 cm^{-1} 谱线进行分峰拟合, 根据各拟合单峰出峰位置与峰面积计算, 获得蛋白质二级结构含量。

1.3.6 CD 测定

用 CD 测定保存时间为 1 h 的样品组 I 的光谱数据, 控制狭缝宽 1 nm, 扫描速率 10 nm/min, 响应时间 1 s。使用 Dichr Web 网站中 CDSSTR 拟合程序进行数据计算拟合, 获得测定物质的二级结构含量。

1.3.7 XPS 测定

使用 XPS 对保存时间为 1 h 的样品组 I 的结构进行测试, 样品深度 5 nm, 工作电压 12 kV, 灯丝电流 6 mA, 全谱扫描通能为 150 eV; 窄谱扫描通能为 50 eV。标度参照脂肪碳的 C 1s (285 eV)。

1.3.8 TG-DSC 测定

使用同步热分析仪在氮气气氛、温度范围为 30~300 °C、升温速率为 5 °C/min 的条件下对样品组 III 的热性能进行测试。

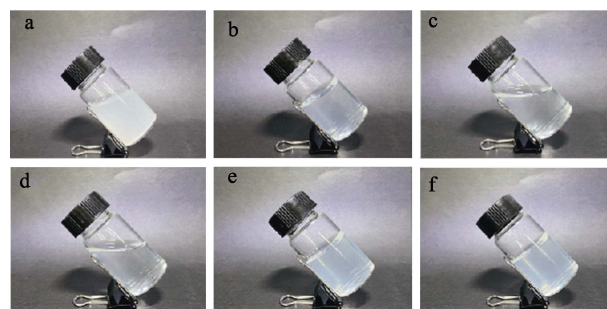
1.3.9 数据处理

使用 Windows 版 IBM SPSS Statistics 27 软件, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 对实验数据进行处理, 并使用 Duncan 多重比较法进行显著性差异分析, 结果表示为“平均值±标准差”; 讨论时使用平均值。

2 结果与讨论

2.1 DES 对明胶溶液中蛋白质凝胶化的作用效果

图 1 为样品组 II 的凝胶化作用效果图。



a—Gel; b—Gel+1-DES; c—Gel+2-DES; d—Gel+3-DES; e—Gel+4-DES; f—Gel+5-DES; Gel 代表明胶溶液, 下同

图 1 样品组 II 的凝胶化作用效果照片

Fig. 1 Gelation effect pictures of sample group II

从图 1 可以看出, 明胶溶液与不同 DES 作用后凝胶化效果不同。其中, 酸性的 Gel+2-DES (图 1c) 和 Gel+3-DES (图 1d) 与明胶作用后溶液的透明度最高, 溶液倾斜角最大, 即 2-DES 和 3-DES 的凝胶化作用最弱, 原因可能是 2-DES 和 3-DES 的酸性环境使明胶结构强度降低, 原本的凝胶网络松散, 稳定性下降; 中性的 Gel+4-DES (图 1e) 和 Gel+5-DES (图 1f) 与明胶作用后溶液的透明度明显升高, 且溶液倾斜角最小, 表明 4-DES 和 5-DES 的凝胶化作用显著增强; 弱碱性的 1-DES (图 1b) 与明胶作用后溶液倾斜角与透明度均高于 Gel+4-DES 和 Gel+5-DES, 表明 1-DES 的凝胶化作用弱于 4-DES 和 5-DES。

图 2 为样品组 IV 的透射比和 pH 变化测定结果。

从图 2 可以看出, 样品组 IV 在 450 和 620 nm 下的透射比与图 1 的透明度变化趋势一致。5 种 DES 的加入均使明胶溶液的透射比升高。酸性的 2-DES 和 3-DES 与明胶作用后溶液的透射比最高, 在 450 nm 下, 其透射比由 Gel 的 91.8% 增加至 Gel+2-DES 和 Gel+3-DES 的 98.9% 和 98.6%。且 Gel+2-DES 和 Gel+3-DES 的 pH 从 Gel 的 5.2 降至 1.5 和 1.6; Gel+4-DES 和 Gel+5-DES 的 pH 为 5.2 和 5.3, 与 Gel 比波动不大; 而 Gel+1-DES 的 pH 升至 6.1。在低 pH 环境中, 明胶表面带有净正电荷, 会抑制紧密螺

旋的形成,降低物理交联网络密度,促进明胶分子更有效地分散在水中,形成透明度较高的溶液。

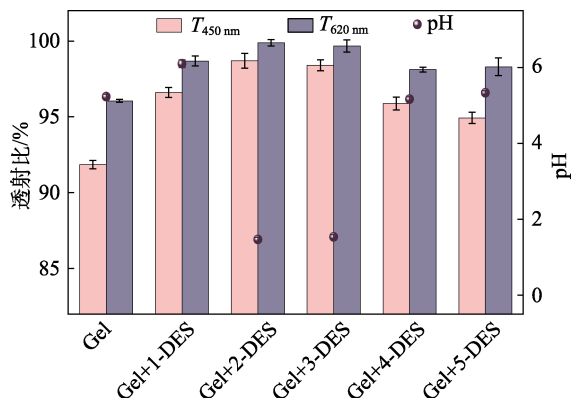
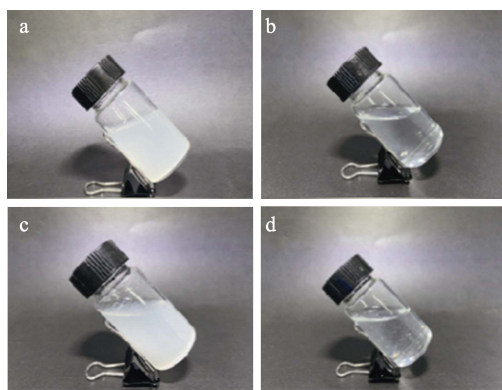


图 2 样品组 IV 的 450、620 nm 的透射比和 pH

Fig. 2 Transmittance ratios at 450 and 620 nm and pH of sample group IV

图 3 为样品组 IV 中经 pH 调节后的 Gel 和 Gel+5-DES 的凝胶化作用效果图。



b、d—pH=1.5; c—pH=5.3

图 3 Gel (a)、经 pH 调节后的 Gel (b、c) 和 Gel+5-DES (d) 的凝胶化作用效果照片

Fig. 3 Gelation effect pictures of Gel (a) as well as Gel (b, c) and Gel+5-DES (d) after pH adjusting

从图 3 可以看出, pH=1.5 的 Gel 溶液凝胶化效果与 Gel+2-DES (图 1c) 和 Gel+3-DES (图 1d) 相近,透明度升高,凝胶化效果较差,即酸性 DES 对明胶溶液的影响主要为 pH 效应; pH=5.3 的 Gel 溶液透明度与未调节 pH 的 Gel 溶液相近,但凝胶化效果弱于 Gel+4-DES (图 1e) 和 Gel+5-DES (图 1f),表明中性 DES 能够促进明胶溶液凝胶化作用; Gel 在中性 DES (5-DES) 与 pH=1.5 的酸性环境的共同作用下,透明度显著升高,凝胶化效果优于 Gel,但相较于 Gel+5-DES (图 1f),未改变 pH 环境下的 Gel 与 5-DES 作用的凝胶化效果更好,表明低 pH 与中性 DES 共同作用时, pH 效应强于 5-DES 对 Gel 溶液的作用,阻碍了 5-DES 对 Gel 溶液凝胶作用的

促进效果。

综合图 2 和图 3 表明,加入中性 DES 后,明胶溶液 pH 环境与其作用后的等电点相近,是影响凝胶行为的重要因素;此外,DES 在明胶溶液中解离水合, HBD 和 HBA 分别与明胶中两性基团形成新的氢键^[13],重建新的交联网络结构,能够促进明胶的凝胶行为。

2.2 DES 对明胶溶液等电点和粒径影响

2.2.1 DES 对明胶溶液 Zeta 电位的影响

图 4 为样品组 V 明胶溶液的 Zeta 电位测试结果。

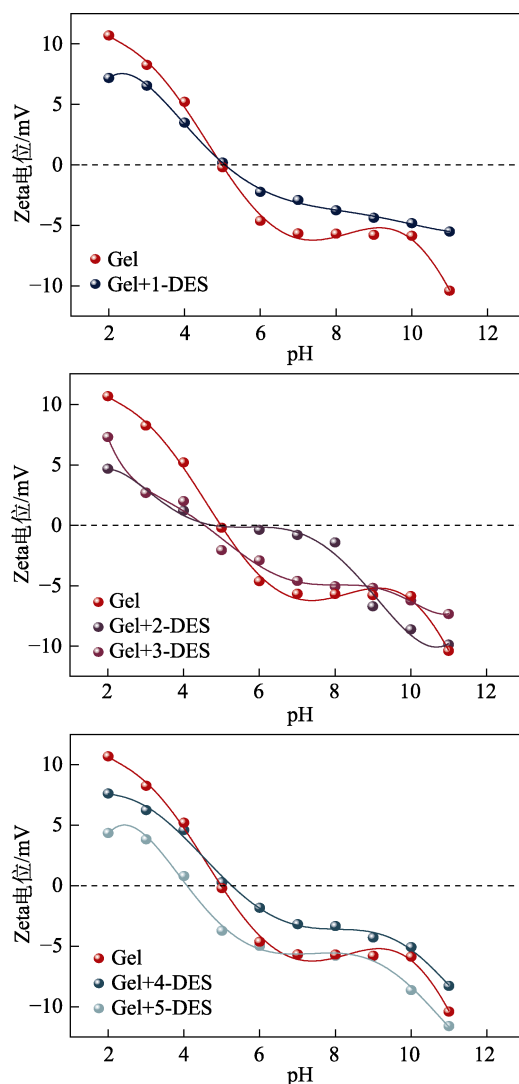


图 4 样品组 V 的 Zeta 电位

Fig. 4 Zeta potential of sample group V

从图 4 可以看出,不同 DES 与明胶溶液作用前后,Zeta 电位曲线变化趋势一致。当 Zeta 电位>0 mV 后, Gel+x-DES 的 Zeta 电位低于 Gel; 当 Zeta 电位<0 mV 时,随 pH 的升高, Gel+x-DES 的 Zeta 电位逐渐降低。

表 2 为样品组 V 明胶溶液的等电点计算结果。

表 2 样品组 V 的等电点
Table 2 Isoelectric point of sample group V

	Gel	Gel+ 1-DES	Gel+ 2-DES	Gel+ 3-DES	Gel+ 4-DES	Gel+ 5-DES
等电点	4.7	5.2	4.6	4.5	5.5	3.9

从表 2 可以看出, Gel 的等电点为 4.7, 属于碱法制得的明胶等电点范围。Gel+1-DES 的等电点为 5.2, 而 Gel+2-DES 和 Gel+3-DES 的等电点 (4.6 和 4.5) 较 Gel 略低。根据 SHIGEYO 等^[14]的研究, 当 pH 偏离等电点时, 由于排斥电荷的增加, 明胶表面电荷分布变化会抑制分子间螺旋结构的形成, 改变明胶空间网络结构。DES 进入明胶溶液后, 发生解离水反应生成胆碱阳离子与不同的阴离子, 碱性 DES (1-DES) 主要是由胆碱阳离子与明胶的酸性基团发生反应, 降低明胶阴离子基团的活性, 使其等电点升高; 酸性 DES (2-DES 和 3-DES) 主要是由各阴离子与明胶的碱性基团反应, 降低了明胶阳离子基团的活性, 使其等电点降低^[15]。

Gel+4-DES 和 Gel+5-DES 的等电点 (5.5 和 3.9) 较 Gel 出现不同的变化趋势。这是因为, 4-DES 中单个甘油分子中的羟基数量少于 5-DES 组分中单个山梨醇分子中的羟基数量, 而实验中所使用的碱性水解胶原在生产过程中脱酰胺作用显著, 具有较多的游离羧酸基团。因此, 4-DES 分子羟基可能与酸性基团发生反应, 而 5-DES 中山梨醇分子中较多的羟基官能团除了与酸性基团反应之外, 还能够与蛋白质中的碱性基团作用, 使其等电点降低。

2.2.2 DES 对明胶溶液粒径的影响

图 5 为样品组 I 溶液的粒径测试结果。

从图 5 可以看出, 不同 DES 的加入使 Gel 的粒径分布峰两侧出现平缓的扩展。同时, 粒径分布峰的峰值变钝。但 Gel+2-DES、Gel+3-DES 和 Gel+1-DES 的特征峰数量未发生改变。而 Gel+4-DES 和 Gel+5-DES 的粒径分布峰在 <10 nm 侧出现明显的第 3 个特征峰。同时, 最大粒径增大到 1000 nm 以上, 分布范围扩大。粒径较小的粒子具有更大的比表面积, 更高的表面活性; 粒径较大的粒子内部原子或分子之间的结合力更强、更稳定, 这与中性 DES 作用后 Gel 表现出更稳定的凝胶作用结果相一致 (图 1e、f)。这是因为, 液相明胶中的蛋白质相较于固体明胶, 空间结构聚集度较低。DES 具有较强的氢键破坏能力, 能够破坏蛋白质内部交联网络中原有的氢键, 使其形成新的聚合物。已有研究^[16]表明, 将 DES 应用于蛋白质的提取, 提取后的 DES 相显示出比蛋白质溶液更大的颗粒尺寸, 表明形成了蛋白质-DES 聚合物。

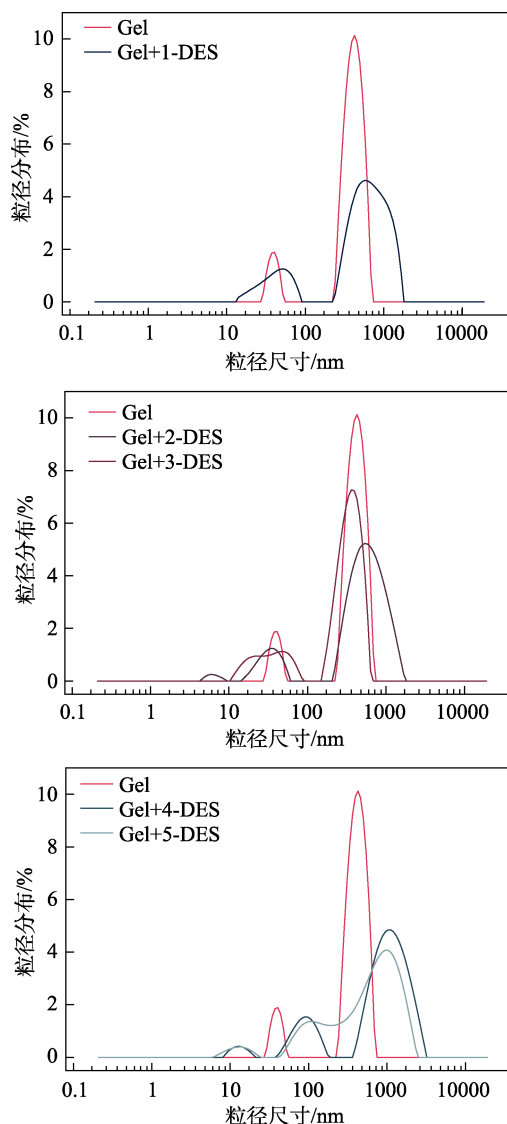


图 5 样品组 I 明胶溶液的粒径分布曲线

Fig. 5 Particle size distribution curves of gelatin solution in sample group I

图 6 为样品组 I 保存不同时间的粒径分布图。

从图 6 可以看出, 加入不同 DES 后, Gel 溶液的粒径随时间的变化均发生不同程度的收敛, 相同酸碱性 DES 作用后, 分布峰收敛趋势相近, 表明酸碱性相同的 DES 溶液对 Gel 的作用机制一致。作用时间由 1 h 增长至 4 h 时, Gel+2-DES、Gel+3-DES 的粒径分布峰明显收敛, 但分布峰峰值仍小于 Gel, 表明酸性 DES 作用于 Gel 溶液稳定性较弱。Gel+4-DES 和 Gel+5-DES、Gel+1-DES, 在氢键重组致使粒径峰发生收敛后, 仍存在 <10 nm 与 >1000 nm 的粒子, 表明中性和弱碱性 DES 与 Gel 作用的稳定性较强。已有研究^[17]表明, 酸性 DES 生成氢键的能力更强, 但其氢键数量少, 破坏效率低; 中性和碱性 DES 的极性大于酸性 DES, 更适合用于提取蛋白, 这与粒径分布图中所观察到的结果相一致。

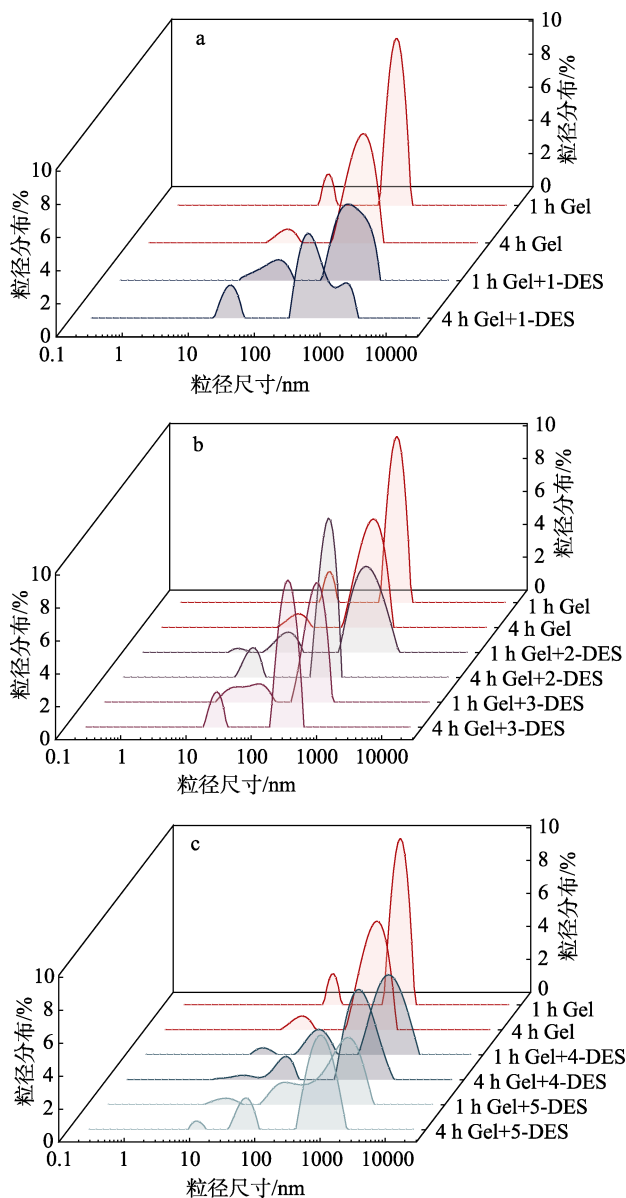


图 6 不同时间下 DES 作用于明胶溶液的等效粒径分布曲线

Fig. 6 Equivalent particle size distribution curves of gelatin solution treated with DES at different times

2.3 DES 对明胶溶液空间结构光谱的影响

图 7 为样品组 I 的 UV-Vis 吸收光谱。

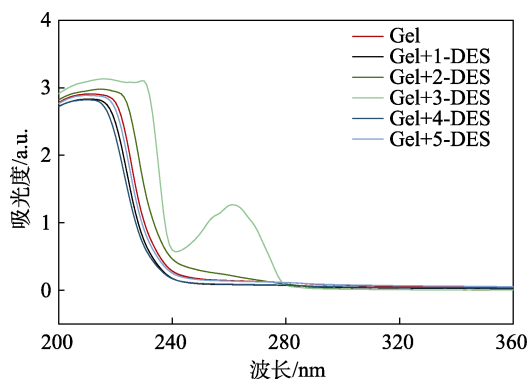


图 7 样品组 I 的 UV-Vis 吸收光谱

Fig. 7 UV-Vis adsorption spectra of sample group I

从图 7 可以看出, 样品组 I 各样品在 210 nm 左右具有强吸收峰, 这是因为, 明胶中存在 $C=O$ 、 $CO-NH_2$ 、 $-COOH$ 等发色基团^[18-19]。Gel+3-DES 在 270 nm 处的强吸收峰是由 3-DES 组分中对甲苯磺酸内的苯环引起的。Gel+2-DES、Gel+3-DES 的紫外吸收峰明显红移且增强, 这是因为, Gel 中蛋白质由于酸性 DES 的加入, 其疏水性降低, 肽链延长^[20-21]。Gel+1-DES 和 Gel+4-DES、Gel+5-DES 在 210 nm 处的吸收峰轻微蓝移, 这是因为, 中性和碱性 DES 对明胶溶液中蛋白质生色团产生影响, 相互作用导致蛋白质肽链伸展, 结构发生变化^[22]。

图 8 为样品组 I 的 FTIR 谱图。

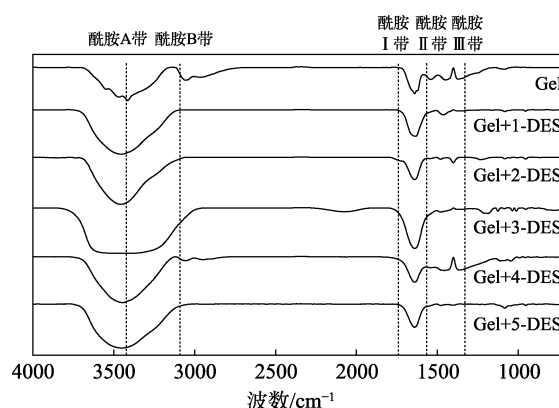


图 8 样品组 I 的 FTIR 谱图

Fig. 8 FTIR spectra of sample group I

从图 8 可以看出, 3433 cm^{-1} 处峰为酰胺 A 带的 N—H 键的伸缩振动, 其与氢键的缔合程度密切相关, 酰胺 A 带峰红移, 表明分子中氢键被轻微破坏。 1628 cm^{-1} 处峰为酰胺 I 带的 C—O 键的伸缩振动, 1436 cm^{-1} 处为酰胺 II 带的 N—H 键的面内弯曲振动和 C—N 键的伸缩振动^[23], 蛋白质的酰胺键变化会导致二级结构发生变化^[24]。样品组 I 的 N—H 键吸收峰蓝移, 即明胶与 DES 中官能团形成新的氢键; N—H 键的面内弯曲振动和 C—N 键的伸缩振动吸收峰发生蓝移, 即明胶的蛋白质二级结构及蛋白质骨架发生变化^[25]。

表 3 为 FTIR 谱图中 $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 范围数据的高斯拟合所得明胶内二级结构含量^[26]的变化结果。

α -螺旋 ($1664\sim 1646\text{ cm}^{-1}$ 内单峰)、 β -折叠 ($1637\sim 1610\text{ cm}^{-1}$ 内单峰) 与无规则卷曲 ($1645\sim 1637\text{ cm}^{-1}$ 内单峰) 和 β -转角 ($1670\sim 1664\text{ cm}^{-1}$ 内单峰) 相比, 是刚性更强、更有序的结构形式。从表 3 可以看出, Gel+2-DES、Gel+3-DES 的 β -折叠含量 (17.94%、27.28%) 较 Gel (33.40%) 降低, α -螺旋含量 (26.85%、35.81%) 较 Gel (20.89%) 增加。Gel+2-DES 刚性结构 (α -螺旋+ β -折叠) 含量 (44.79%) 与 Gel (54.29%) 相比明显降低; 3-DES 由于苯环存在, 易形成新的

环状结构,故增加了 Gel+3-DES 的刚性结构含量 (63.09%)。Gel+4-DES 和 Gel+5-DES 的无规则卷曲含量 (0.86%和 0.17%)与 Gel (16.75%)相比,大幅减少,表明无规则卷曲形式中的氢键被破坏,DES 与其形成新的氢键,使刚性二级结构 β -折叠与

α -螺旋含量增加至 70.86%和 70.67%,其中 β -折叠含量的增幅较大。结合样品组 I 的 UV-Vis 谱图 (图 7)表明,中性 DES 能够使明胶溶液中无规则卷曲结构伸展转变为更有序的刚性结构^[27]。
图 9 为样品组 I 的 CD 光谱。

表 3 样品组 I 的蛋白质二级结构含量
Table 3 Protein secondary structure contents of sample group I

样品组 I	蛋白质二级结构含量/%				
	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲	α -螺旋+ β -折叠
Gel	20.89±0.62 ^d	33.40±0.16 ^e	28.96±0.54 ^{ab}	16.75±0.09 ^a	54.29±0.07 ^d
Gel+1-DES	19.36±0.84 ^d	34.94±0.24 ^e	23.60±0.32 ^d	22.10±0.76 ^b	54.30±0.52 ^e
Gel+2-DES	26.85±1.05 ^e	17.94±0.52 ^f	28.17±0.10 ^e	27.04±0.42 ^a	44.79±1.14 ^{bc}
Gel+3-DES	35.81±0.47 ^a	27.28±0.08 ^d	17.99±0.35 ^e	18.92±0.91 ^c	63.09±0.82 ^c
Gel+4-DES	28.87±0.24 ^b	41.99±0.92 ^b	28.28±0.06 ^{bc}	0.86±1.22 ^d	70.86±0.30 ^a
Gel+5-DES	27.25±0.23 ^c	43.42±0.14 ^a	29.16±0.13 ^a	0.17±0.24 ^d	70.67±0.10 ^{ab}

注:表中同一列数据不同小写字母代表显著性差异 ($P<0.05$)。

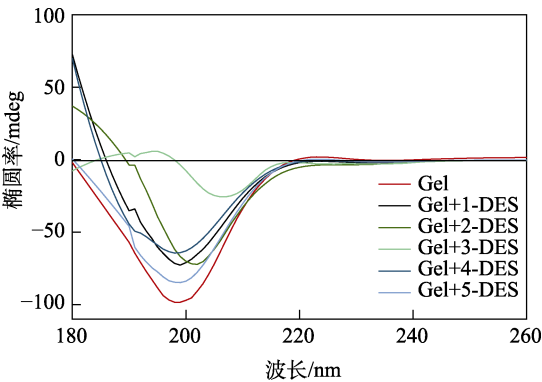


图 9 样品组 I 的 CD 光谱
Fig. 9 CD spectra of sample group I

从图 9 可以看出,185~245 nm 为远紫外 CD 光谱,是肽链的吸收峰波长,主要反映蛋白质分子主链的构象信息,222 和 208 nm 处两个负峰对应于 α -螺旋结构特征区域;217 nm 处一个正峰对应于 β -折叠结构特征区域;200 nm 处一个负峰对应于无规卷曲结构特征区域^[28]。样品组 I 中蛋白质的化学环境发生变化,导致 α -螺旋与 β -折叠结构特征区域均发生蓝移,表明蛋白质内氢键结构发生变化,影响二级结构的稳定性,使 α -螺旋结构减少, β -折叠或无规卷曲的比例增加。

图 10 为 CD 光谱数据经 Dichr Web 网站计算拟合明胶的二级结构含量结果。从图 10 可以看出,Gel+2-DES、Gel+3-DES 的 α -螺旋含量显著增加;Gel+1-DES 和 Gel+4-DES、Gel+5-DES 的刚性结构 (α -螺旋+ β -折叠)含量显著增加。由于 FTIR 与 CD 在测试原理、测量范围和灵敏度方面存在差异,因而导致测试结果不完全一致^[29],但两种测试方法均能

得到刚性结构 (α -螺旋+ β -折叠)含量显著增加,表明 α -螺旋和 β -折叠结构在促进明胶溶液凝胶化过程中发挥着重要作用。

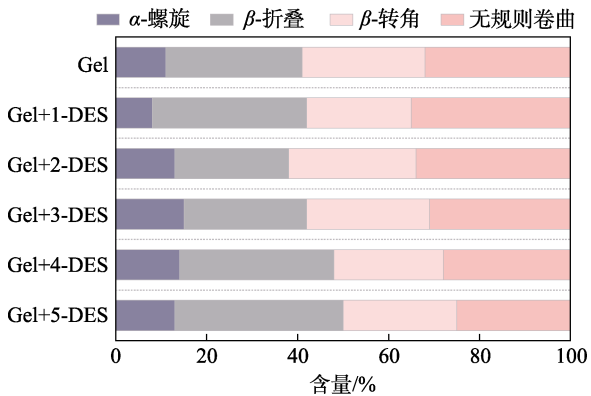


图 10 样品组 I 的蛋白质二级结构含量
Fig. 10 Protein secondary structure contents of sample group I

α -螺旋和 β -折叠结构通过氢键维持构象,其含量增加意味着更多的氢键形成,因此增强了蛋白质结构的刚性和稳定性^[30]。其中, α -螺旋通常将疏水性残基包裹在内,因此, α -螺旋增加能够形成更紧密的疏水核心,是三级结构稳定的关键因素; β -折叠结构的增加有助于保护疏水核心,当这两种结构的含量之和增加时,对蛋白质三级结构,尤其是折叠的影响显著,更有助于维护三级结构的完整性。综上所述,Gel+4-DES 与 Gel+5-DES 的 α -螺旋与 β -折叠结构含量大幅增加,是加强蛋白质三级结构中折叠构象含量的关键因素,间接促进了疏水作用,强化了蛋白质空间交联网络,增强了明胶溶液凝胶作用。

Gel+2-DES、Gel+3-DES 的环境 pH 降低使带负电的酸性氨基酸的侧链获得质子,减少了表面负电

荷, 削弱了同种电荷之间的排斥, 促进了氨基酸残基间氢键的形成, 有利于稳定 α -螺旋结构^[31]。但大量增加的 α -螺旋使蛋白质内疏水侧链包裹更加严

密, 减少了疏水侧链的暴露, 减弱了疏水作用驱动的聚集^[32], 抑制了明胶溶液的凝胶化。

图 11 为样品组 I 的高分辨 XPS 谱图。

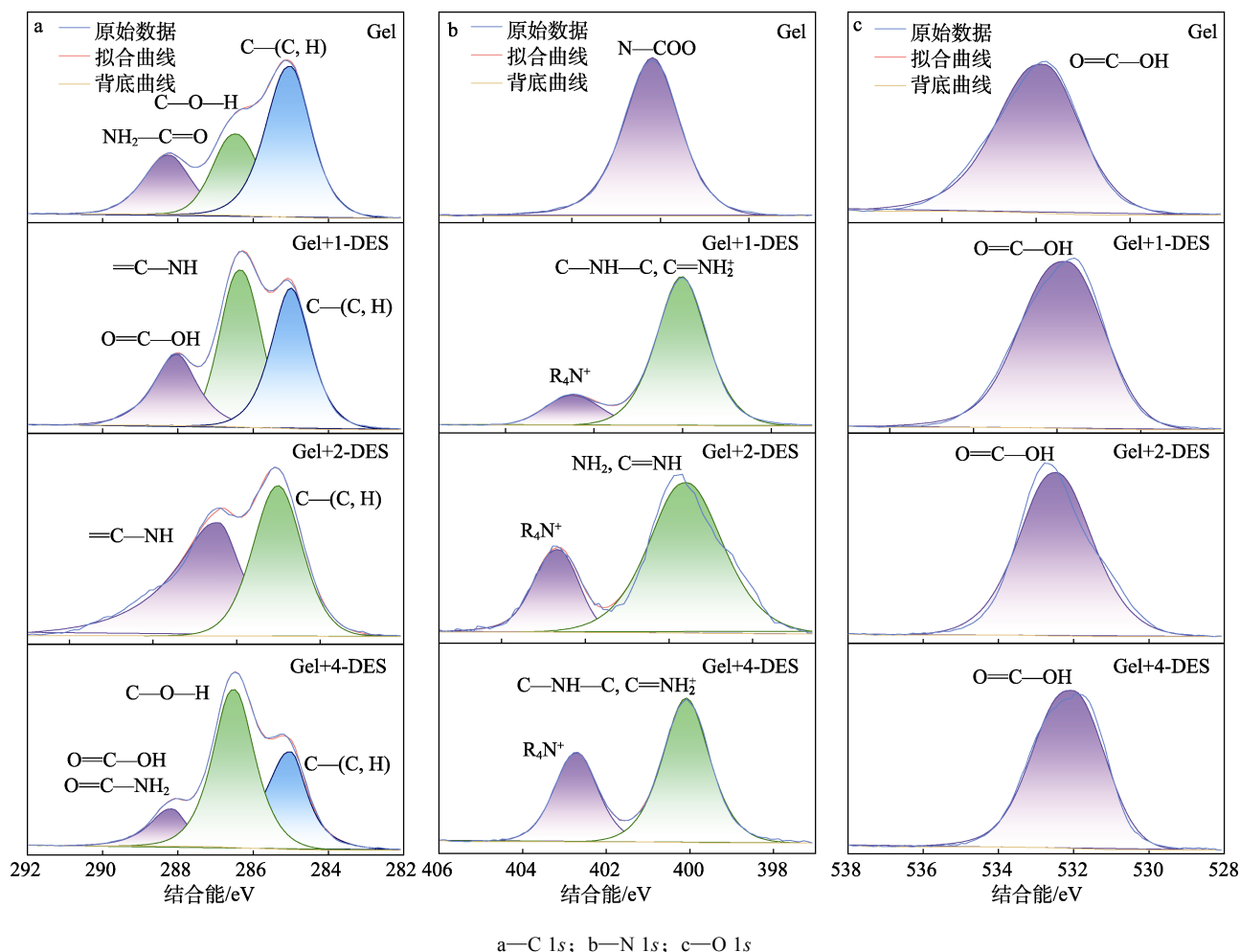


图 11 样品组 I 部分样品的高分辨 XPS 谱图

Fig. 11 High-resolution XPS spectra of some samples in sample group I

从图 11a 的 C 1s 高分辨 XPS 谱图可以看出, Gel 在结合能 288.25 eV 处峰对应酰胺碳^[33]; Gel+2-DES 未出现酰胺碳特征峰, 结合能 286.43 eV 处峰对应 sp^2 碳单独与氮结合形成的 $=C-NH$, 表明酸性 DES 作用后, 明胶内酰胺键断裂, 蛋白质结构被破坏。Gel+1-DES 和 Gel+4-DES 在结合能 288.25 eV 处峰对应酰胺碳, 288.10 eV 处峰对应于“羧基型” $O=C-OH$ 和 $NH_2-C=O$ 中的碳。结合 CD 色谱 (图 9) 与 FTIR 谱图 (图 8) 分析结果, 酰胺键是 β -折叠结构的基础, 表明中性与碱性 DES 能够影响酰胺键, 形成肽链间的氢键^[34], 促进 β -折叠结构的形成。已有研究^[35]表明, 胆碱阳离子能够增加蛋白质骨架周围的水密度, 帮助蛋白质保留折叠结构。

从图 11b 的 N 1s 高分辨 XPS 谱图可以看出, 各样品在结合能 402.50 eV 处峰对应季铵盐中季氮结构, Gel+1-DES 和 Gel+4-DES 出现 $C-NH-C$ 键

以及 $C=NH$ 质子化的 $C=NH_2^+$ 基团, 这是因为, DES 在明胶溶液中解离水合, 增加了溶液的离子强度, 影响蛋白质的电荷分布和构象, 使 $C=NH$ 基团发生质子化。

从图 11c 的 O 1s 高分辨率 XPS 谱图可以看出, 各样品在结合能 531.9 eV 附近特征峰对应蛋白质中羧基结构, DES 的加入使羧基中氧的电子云密度增加, 结合能降低约 0.5 eV, 但仍保持羧基的结构。

2.4 DES 对明胶热性质的影响

表 4 为样品组 III 的熔融温度 (T_m) 及相应熔融焓 (ΔH)。

从表 4 可以看出, 与 DES 作用后 Gel 的 ΔH 均明显增长, Gel+2-DES 的 T_m (183.4 °C) 下降, Gel+1-DES 和 Gel+4-DES 的 T_m (259.3 和 267.2 °C) 均升高。 T_m 的降低表明, 明胶内部氢键和疏水作用被破坏^[36], 即 2-DES 使 Gel 内部交联结构分散。此外,

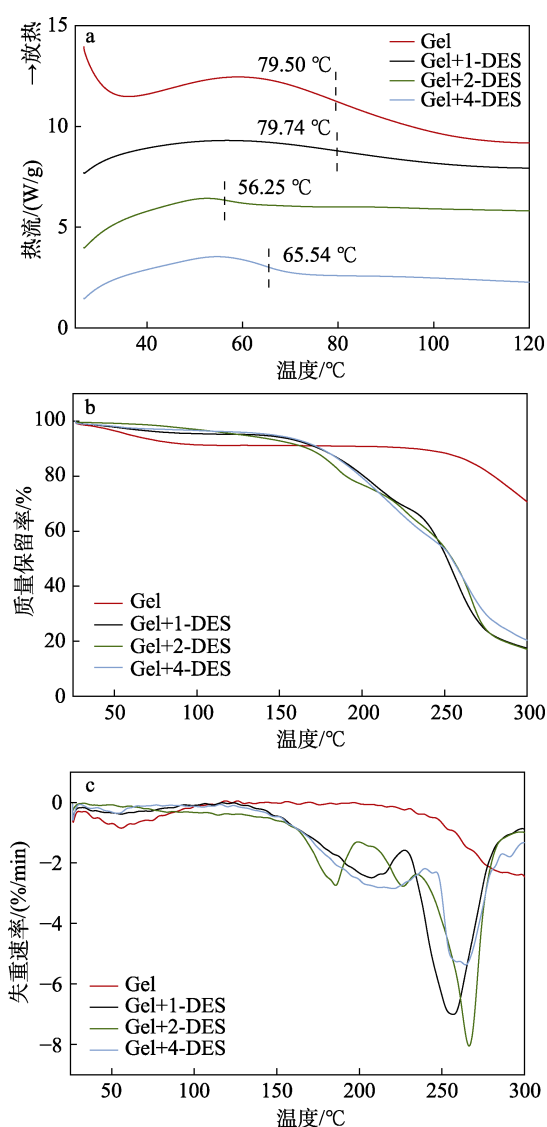
已有研究^[37]表明, 明胶凝胶强度与其焓变值之间存在显著关系, 凝胶强度越高, 焓变值越大。因此, 4-DES 对 Gel 凝胶强度的增强效果最佳。

表 4 样品组Ⅲ的熔融温度及相应熔融焓

Table 4 Melting temperature and corresponding melting enthalpy of sample group Ⅲ

项目	样品组Ⅲ热参数			
	Gel	Gel+1-DES	Gel+2-DES	Gel+4-DES
$T_m/^\circ\text{C}$	229.2	259.3	183.4	267.2
$\Delta H/(\text{J/g})$	43.44	1364.00	128.90	1899.00

图 12 为样品组Ⅲ的热分析曲线。



a—DSC 曲线; b—TG 曲线; c—DTG 曲线

图 12 样品组Ⅲ的热分析曲线

Fig. 12 Thermal analysis curves of sample group Ⅲ

从图 12a 的 DSC 曲线可以看出, Gel+2-DES 和 Gel+4-DES 的玻璃化转变温度 (56.25、65.54 °C) 显著降低。在材料科学中, 疏水性增强会导致材料

内部分子间的相互作用发生变化, 分子间的结合力增强, 会削弱分子链的运动能力, 降低玻璃化转变温度^[38]。DES 中 HBD 和 HBA 均能与明胶中—NH—上的 H 原子和—C—O—上的 O 原子相互作用形成氢键^[39], 改变明胶二级结构含量, 间接影响三级结构, 改变疏水作用。Gel+2-DES 由于酸性条件对蛋白质的破坏导致结构松散, 增加了系统的自由体积, 使分子间相互作用减弱, 致使玻璃化转变温度大幅降低。Gel+4-DES 疏水作用增强, 影响分子链的柔性, 导致了玻璃化转变温度的降低。

热重分析用于评估不同条件下明胶的热稳定性, 较小的质量损失和较高的残余质量代表着更好的热稳定性^[40]。由图 12b、c 可见, 在 300 °C 时, Gel+4-DES 的残余质量略高, 质量损失略少, 表明 4-DES 与 Gel 形成了新的氢键网络结构, 减少了质量损失, 提高了热稳定性, 这与明胶空间结构变化结果一致。

3 结论

(1) 不同酸碱性的 DES 的加入影响明胶溶液的凝胶作用。中性 DES 对明胶溶液凝胶化具有明显的调控作用, 能从蛋白质二级结构、分子构象与疏水作用多方面改变明胶溶液的凝胶程度。

(2) 酸性 DES 的加入, 能够显著改变明胶溶液的化学环境。通过提供强酸性环境, 酸性 DES 可以使明胶溶液的 pH 远低于蛋白质等电点, 由此破坏了明胶化学结构, 使无规则卷曲含量增加, 凝胶网络结构松散, 失去凝胶特性。

(3) 中性 DES 的加入对明胶溶液化学环境的影响较小, 可以保持明胶溶液 pH 环境处于等电点附近, 促进凝胶化作用, 并由 DES 的 HBD 和 HBA 发挥主要作用。DES 的 HBD 和 HBA 破坏了蛋白质内部原有氢键, 增加了蛋白质二级结构中刚性结构 (α -螺旋+ β -折叠) 的含量, 间接增加了蛋白三级结构中折叠构象含量, 增强了疏水作用及热稳定性, 形成新的空间交联网络, 实现对明胶溶液凝胶作用的调控。

参考文献:

- [1] PEI Y, ZHENG Y R, LI Z J, *et al.* Ethanol-induced coacervation in aqueous gelatin solution for constructing nanospheres and networks: Morphology, dynamics and thermal sensitivity[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2021, 582: 610-618.
- [2] GUO L, COLBY R H, LUSIGNAN C P, *et al.* Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions[J]. *Macromolecules*, 2003, 36: 9999-10008.
- [3] HUANG T, TU Z C, SHANGGUAN X C, *et al.* Fish gelatin modifications: A comprehensive review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 86: 260-269.
- [4] YANG H J, WANG H F, HUANG M, *et al.* Repurposing fish waste into gelatin as a potential alternative for mammalian sources: A

- review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2022, 21: 942-963.
- [5] YANG J Y, CHEN Y, ZHAO L, *et al.* Constructions and properties of physically cross-linked hydrogels based on natural polymers[J]. *Polymer Reviews*, 2022, 63: 574-612.
 - [6] YANG T, WANG P, ZHOU Q, *et al.* Investigation on the molecular and physicochemical changes of protein and starch of wheat flour during heating[J]. *Foods*, 2021, 10: 1419.
 - [7] MINE Y. Effect of pH during the dry heating on the gelling properties of egg white proteins[J]. *Food Research International*, 1996, 29: 155-161.
 - [8] JOHNSTON-BANKS F A. Gelatin[M]. New York: Elsevier Science Publishing Co. 1990.
 - [9] GOUDIE K J, MCCREATH S J, PARKINSON J A, *et al.* Investigation of the influence of pH on the properties and morphology of gelatin hydrogels[J]. *Journal of Polymer Science*, 2023, 61: 2316-2332.
 - [10] QIAO C D, LI T D, ZHANG L, *et al.* Rheology and viscosity scaling of gelatin/1-allyl-3-methylimidazolium chloride solution[J]. *Korea-Australia Rheology Journal*, 2014, 26: 169-175.
 - [11] ABBOTT A P, ALAYSUY O, ANTUNES A P M, *et al.* Processing of leather using deep eutectic solvents[J]. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2015, 3: 1241-1247.
 - [12] WU T, DAI R, SHAN Z H, *et al.* High efficient crosslinking of gelatin and preparation of its excellent flexible composite film using deep eutectic solvent[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 118: 32-40.
 - [13] GABRIELE F, CHIARINI M, GERMANI R, *et al.* Effect of water addition on choline chloride/glycol deep eutectic solvents: Characterization of their structural and physicochemical properties [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 291: 111301.
 - [14] SHIGEYO T, TAKASHI O, NORIE N, *et al.* Effect of concentration and pH on sol-gel transition of gelatin[J]. *Journal of the Society of Photographic Science and Technology of Japan*, 2002, 65: 49-54.
 - [15] CHENG H M (程海明), CHEN M (陈敏), LI Z Q (李志强). Characterization methods of collagen and leather isoelectric points [J]. *Leather Science and Engineering (皮革科学与工程)*, 2012, 22(4): 20-24.
 - [16] LI N, WANG Y Z, XU K J, *et al.* Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein[J]. *Talanta*, 2016, 152: 23-32.
 - [17] LIU Y S (刘屹首), LI R P (李瑞鹏), QIN D E (秦大恩), *et al.* Process and hydrogen bonding mechanism of keratin dissolution in weakly alkaline eutectic solvent[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2024, 41(8): 1780-1787, 1839.
 - [18] ABD EL-KADER F H, GAFER S A, BASHA A F, *et al.* Thermal and optical properties of gelatin/poly(vinyl alcohol) blends[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, 118: 413-420.
 - [19] HAN S (韩霜), MA L (马良), YANG H (杨晖), *et al.* Physicochemical properties and structural analysis of bigeye tuna skin gelatin[J]. *Food Science (食品科学)*, 2018, 39(10): 40-45.
 - [20] SHEN L L, XU H, HUANG F W, *et al.* Investigation on interaction between ligupurpuroside A and pepsin by spectroscopic and docking methods[J]. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, 135: 256-263.
 - [21] YAN Y Z (鄢雨中), CHEN L (陈蕾), ZHANG G W (张国文). Study on interaction between apigenin and soybean protein isolate based on spectroscopy and molecular simulation[J]. *Journal of Nanchang University (Science Edition) (南昌大学学报: 理科版)*, 2019, 45(5): 477-484.
 - [22] YUE X (岳鑫), BAO Y H (包怡红). Study on the interaction between polyphenols and whey protein of red pine seed scale by fluorescence and ultraviolet spectroscopy[J]. *Modern Food Science and Technology (现代食品科技)*, 2019, 35(7): 114-120.
 - [23] ZHOU Z B, HE X, ZHOU M H, *et al.* Chemically induced alterations in the characteristics of fouling-causing bio-macromolecules-implications for the chemical cleaning of fouled membranes[J]. *Water Research*, 2017, 108: 115-123.
 - [24] ARFAT Y A, AHMED J, HIREMATH N, *et al.* Thermo-mechanical, rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 62: 191-202.
 - [25] ZHOU Z J, LI S, ZOU Y Y, *et al.* Coating peanut shell lignin nanospheres with gelatin via non-covalent adsorption: Key parameters, consequences, and underlying interactions[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 233: 123607.
 - [26] ZHAO X Y, CHEN F S, XUE W T, *et al.* FTIR spectra studies on the secondary structures of 7S and 11S globulins from soybean proteins using AOT reverse micellar extraction[J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22: 568-575.
 - [27] WANG C (王策), LI X (李侠), DENG S Y (邓少颖), *et al.* Effects of hydroxyl radical oxidation on structure and hydration properties of bovine serum albumin[J]. *Chinese Journal of Agricultural Sciences (中国农业科学)*, 2017, 50(15): 3013-3023.
 - [28] MOZAFARPOUR R, KOOCHEKI A, NICOLAI T. Modification of grass pea protein isolate (*Lathyrus sativus* L.) using high intensity ultrasound treatment: Structure and functional properties[J]. *Food Research International*, 2022, 158: 111520.
 - [29] BROWNING K R, SMITH R. Comparative study of protein secondary structure determination by CD and FTIR spectroscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2009, 96(5): 1762-1769.
 - [30] MACDONALD B, MCCARLEY S, NOEEN S, *et al.* Protein-protein interactions affect alpha helix stability in crowded environments[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2015, 119: 2956-2967.
 - [31] YAN J, LI S Q, CHEN G P, *et al.* Formation, physicochemical properties, and comparison of heat- and enzyme-induced whey protein-gelatin composite hydrogels[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 137: 108384.
 - [32] GUO W B, ZHAO Y, XU M S, *et al.* Recent progress in understanding the relationship between protein structure change and *in vitro* digestibility after different treatments[J]. *Food Science*, 2019, 40(1): 327-333.
 - [33] ARTEMENKO A, SHCHUKAREV A, ŠTENČLOVÁ P, *et al.* Reference XPS spectra of amino acids[C]//IOP Conference Series Materials Science and Engineering, 2021, 1050: 012001.
 - [34] CAI Z X, ZHANG F, WEI Y, *et al.* Freeze-thaw-induced gelation of hyaluronan: Physical cryostructure correlated with intermolecular associations and molecular conformation[J]. *Macromolecules*, 2017, 50(17): 6647-6658.
 - [35] MAITY A, SARKAR S, THEEYANCHERI L, *et al.* Choline chloride as a nano-crowder protects HP-36 from urea-induced denaturation: Insights from solvent dynamics and protein-solvent interactions[J]. *Chemphyschem*, 2020, 21: 552-567.
 - [36] QIAO C D, ZHANG J L, MA X G, *et al.* Effect of salt on the coil-helix transition of gelatin at early stages: Optical rotation, rheology and DSC studies[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107: 1074-1079.
 - [37] LIU H Y (刘海英), HE L (何磊), GUO S D (过世东). A new assay method on quality of gelatin with small sample size using DSC[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology (食品与生物技术学报)*, 2011, 30(5): 675-678.
 - [38] DI W S, GAO X, HUANG W M, *et al.* Direct measurement of length scale dependence of the hydrophobic free energy of a single collapsed polymer nanosphere[J]. *Physical Review Letters*, 2019, 122(4): 047801.
 - [39] ABBOTT A P, ABOLIBDA T Z, QU W, *et al.* Thermoplastic starch-polyethylene blends homogenised using deep eutectic solvents[J]. *RSC Advances*, 2017, 7: 7268-7273.
 - [40] ZHAO L, REN Z J, LIU X, *et al.* A multifunctional, self-healing, self-adhesive, and conductive sodium alginate/poly(vinyl alcohol) composite hydrogel as a flexible strain sensor[J]. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2021, 13: 11344-11355.