(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119912710 A
(43)申请公布日 2025.05.02

(21)申请号 202510093485.1

(22)申请日 2020.03.06

(30)优先权数据
PCT/EP2019/064711 2019.06.05 EP
1903090.7 2019.03.07 GB

(62)分案原申请数据
202080018725.7 2020.03.06

(71)申请人 剑桥企业有限公司
地址 英国剑桥

(72)发明人 马克·罗德里格斯加西亚
图马斯·诺尔斯 阿维亚德·莱文
镰田彩花

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
专利代理师 王建秀 关越

(51)Int.Cl.
C08J 3/075(2006.01)
C08J 3/03(2006.01)
C08J 5/18(2006.01)
C08J 9/00(2006.01)
C08L 89/00(2006.01)
C08L 101/00(2006.01)

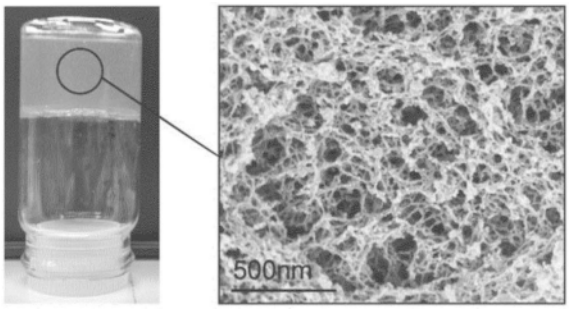
权利要求书3页 说明书23页 附图23页

(54)发明名称

植物基功能材料

(57)摘要

本发明涉及植物基功能材料。本发明涉及植物基材料、其制造方法和包含植物基材料的生物材料。



CN 119912710 A

1.一种植物基结构化材料,其中所述结构化材料是:膜,薄膜,微图案化膜(或薄膜),微米或纳米结构化薄膜,微凝胶,微胶囊,微珠,生物支架,生物支撑物,海绵,微型海绵,硬胶囊或功能涂层。

2.根据权利要求1所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料是微胶囊。

3.根据权利要求1所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料是微珠。

4.根据权利要求1所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料是生物支架或生物支撑物。

5.根据权利要求1所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料是海绵或微型海绵。

6.根据权利要求1所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料是硬胶囊。

7.根据权利要求1所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料是膜或薄膜。

8.根据权利要求1所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料是微图案化膜、微图案化薄膜或者微米或纳米结构化薄膜。

9.根据权利要求1所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料是微凝胶。

10.根据权利要求1所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料是功能涂层。

11.根据任一前述权利要求所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料包含植物蛋白β-折叠晶体。

12.根据权利要求11所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料包含至少40%的β-折叠晶体、至少50%的β-折叠晶体、至少60%的β-折叠晶体、至少70%的β-折叠晶体、至少80%的β-折叠晶体或至少90%的β-折叠晶体。

13.根据任一前述权利要求所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料包含具有二级结构的植物基蛋白质,所述二级结构具有至少40%的分子间β-折叠、至少50%的分子间β-折叠、至少60%的分子间β-折叠、至少70%的分子间β-折叠、至少80%的分子间β-折叠或至少90%的分子间β-折叠。

14.根据任一前述权利要求所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料在10rad/s的储能模量(G')为大于500Pa、大于1000Pa、大于2500Pa、大于3000Pa、大于4000Pa。

15.根据任一前述权利要求所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料的杨氏模量超过20MPa;优选超过50MPa,超过80MPa,超过100MPa,超过200MPa,超过300MPa,超过400MPa,超过500MPa或超过600MPa。

16.根据任一前述权利要求所述的植物基结构化材料,其中所述结构化材料包含蛋白聚集体,所述蛋白聚集体的平均尺寸为小于200nm,优选小于150nm、小于125nm、小于100nm、小于90nm、小于80nm、小于70nm、小于60nm、小于50nm、小于40nm或小于30nm。

17.根据任一前述权利要求所述的植物基结构化材料,其中所述植物基结构化材料能够热可逆地胶凝化。

18.根据权利要求17所述的植物基结构化材料,其中在升高的温度加热后和/或通过施加机械搅拌,所述植物基结构化材料将形成蛋白溶液,所述蛋白溶液的储能模量低于250Pa,优选低于100Pa、低于50Pa或低于10Pa。

19.根据任一前述权利要求所述的植物基结构化材料,其经由热可逆的冷固化胶凝化过程形成。

20.一种植物基热可逆水凝胶。

21.根据权利要求20所述的植物基热可逆水凝胶,其中所述水凝胶被模制为结构化形状、通过微流体装置形成为结构化形状或以其他方式形成为结构化形状;之后所述结构化水凝胶被任选地干燥。

22.一种复合材料,所述复合材料包含根据任一前述权利要求所述的植物基材料,以及一种或多种其他生物聚合物,例如蛋白质和/或多糖。

23.一种食品、化妆品、药物、医疗装置或生物材料,其包含根据权利要求1至19所述的植物基结构化材料、根据权利要求20或21所述的植物基热可逆水凝胶或者根据权利要求22所述的复合材料。

24.一种生产植物基材料的方法,所述方法包括:

a)在溶剂体系中形成包含一种或多种植物基蛋白质的溶液,其中所述溶剂体系包含可混溶的共溶剂;其中第一共溶剂增大所述一种或多种植物基蛋白质的溶解度,并且第二共溶剂减小所述一种或多种植物基蛋白质的溶解度;和

b)诱导所述溶液中的蛋白质发生溶胶-凝胶转变以形成植物基蛋白质水凝胶。

25.根据权利要求24所述的方法,所述方法包括:

c)将所述植物基蛋白质水凝胶形成为结构化材料。

26.根据权利要求25所述的方法,其中在所述溶胶-凝胶转变之前、期间或之后将所述植物基蛋白质水凝胶形成为结构化材料。

27.根据权利要求24至26中任一项所述的方法,其中将所述植物基蛋白质水凝胶模制成结构化材料或者其中使用微流体装置将所述植物基蛋白质水凝胶被形成为结构化材料。

28.根据权利要求24至27中任一项所述的方法,其中使用所述方法来生产结构化材料;例如,膜、薄膜、微图案化膜(或薄膜)、微米或纳米结构化薄膜、微凝胶、微胶囊、微珠、生物支架、生物支撑物、海绵、微型海绵、硬胶囊或功能涂层。

29.根据权利要求24至28中任一项所述的方法,其中所述一种或多种植物蛋白获自大豆、豌豆、稻米、马铃薯、小麦、玉米醇溶蛋白或高粱;优选所述一种或多种植物蛋白选自大豆蛋白、豌豆蛋白、马铃薯蛋白和/或稻米蛋白。

30.根据权利要求24至29中任一项所述的方法,其中所述第一共溶剂是有机酸;优选乙酸和/或α-羟基酸;其中所述α-羟基酸可以优选地选自乙醇酸、乳酸、苹果酸、柠檬酸和/或酒石酸;其中特别优选的有机酸是乙酸和/或乳酸。

31.根据权利要求24至30中任一项所述的方法,其中第二共溶剂或另外的一种或多种共溶剂是水性缓冲液;优选选自水、乙醇、甲醇、丙酮、乙腈、二甲亚砜、二甲基甲酰胺、甲酰胺、2-丙醇、1-丁醇、1-丙醇、己醇、叔丁醇、乙酸乙酯或六氟异丙醇,特别优选水和/或乙醇;进一步特别优选水。

32.根据权利要求24至31中任一项所述的方法,其中溶剂体系包含约20-80%v/v,优选约20-60%v/v、约25-55%v/v、约30-50%v/v、约20%、约30%、约40%、约50%或约60%v/v,最优选约30-50%v/v的共溶剂比率。

33.根据权利要求24至32中任一项所述的方法,所述方法还包括对包含一种或多种植物基蛋白质和溶剂体系的所述蛋白质溶液进行机械剪切,优选超声处理。

34.根据权利要求24至33中任一项所述的方法,其中将所述蛋白质溶液加热至高于所述一种或多种植物基蛋白质的溶胶-凝胶温度的第一温度,然后降低至低于所述一种或多

种植物基蛋白质的溶胶-凝胶温度的第二温度,以形成水凝胶。

35.一种植物基水凝胶,其利用权利要求24至33中任一项的方法形成。

36.一种用于获得植物基材料的热可逆方法,所述热可逆方法包括:

a)在溶剂体系中形成包含一种或多种植物基蛋白质的溶液,其中所述溶剂体系包含混溶性共溶剂;其中第一共溶剂增大所述一种或多种植物基蛋白质的溶解度,而第二共溶剂减小所述一种或多种植物基蛋白质的溶解度;和

b)诱导所述溶液中的所述蛋白质发生溶胶-凝胶转变以形成植物基蛋白质水凝胶。

37.根据权利要求36所述的热可逆方法,其中之后将所述溶剂体系除去,使得所述植物基蛋白质水凝胶不再具有热可逆特性。

植物基功能材料

[0001] 本申请是申请日为2020年3月6日,申请号为202080018725.7,发明名称为“植物基功能材料”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及植物基材料(基于植物的材料,plant based material)、其制造方法和包含根据本发明的植物基材料的生物材料。

背景技术

[0003] 合成聚合物如塑料表现出优异的机械和化学性能,并且在过去的60年期间已被广泛使用。然而,这些聚合物是不可生物降解的,并且能够在环境中积累,从而造成经济损害,并且可能通过食物链和空气影响人类健康。

[0004] 表现出高度功能性以及高度生物降解性和生物相容性的材料的开发是满足在从包装到药品等领域中社会对改善的材料性能的需求的关键目标。

[0005] 自组装作为朝向制造这样的材料的有吸引力的途径出现,但迄今为止开发的大多数结构单元都起源于合成。

[0006] 在可以用作生产新功能材料的结构单元的不同类型的生物聚合物中,蛋白质由于其自组装成功能结构的能力而成为令人感兴趣的候选物。

[0007] 目前,将这些材料在商业应用中的使用限于高度可溶的动物来源蛋白质。食品中常用的动物类蛋白质如乳清蛋白表现出良好的生物相容性、生物降解性、两亲性和功能特性如水溶性、乳化和起泡能力。然而,对于用植物基蛋白质代替动物来源蛋白质存在日益增加的需求,这不仅是因为它们对环境的影响较小,而且还因为它们的较低变应原性和降低的成本。

[0008] 已经报道了由植物基蛋白质形成自组装的材料,其中可以在一系列实验条件下由大豆和豌豆蛋白获得水凝胶。然而,与由动物来源材料获得的机械性能相比,由结构化植物基材料获得的机械性能通常更低;并且植物蛋白更难加工,至少部分是由于它们固有的在水中的低溶解度。

[0009] 因此,迄今为止,植物基蛋白质尚未成功地用作生物材料,并且从可再生和成本有效的来源以及利用环境可持续的方法来生产结构化蛋白质材料仍然是一种挑战。

发明内容

[0010] 根据本发明的一个方面,提供了一种用于生产植物基材料的方法,其包括:

[0011] a)在溶剂体系中形成包含一种或多种植物基蛋白质的溶液,其中该溶剂体系包含可混溶的共溶剂;其中第一共溶剂增大所述一种或多种植物基蛋白质的溶解度,并且第二共溶剂减小所述一种或多种植物基蛋白质的溶解度;和

[0012] b)诱导溶液中的蛋白质发生溶胶-凝胶转变以形成植物基蛋白质水凝胶。

[0013] 在另一个实施方案中,所述方法包括步骤:

[0014] c)将植物基蛋白质水凝胶形成为结构化材料(structured material)。

[0015] 将植物基蛋白质水凝胶形成为结构化材料允许形成结构化材料,如凝胶、膜、微凝胶、微胶囊等。在一个优选的实施方案中,蛋白质水凝胶可以通过模制而形成为规定的形状。在另一个优选的实施方案中,可以使用微流体装置将蛋白质水凝胶形成为规定的形状。

[0016] 本发明已经确定了一种用于由植物基蛋白质来制造功能材料的新方法。通过利用共溶剂混合物,可以对溶胶-凝胶转变施加控制,从而允许由可再生的植物蛋白源形成结构坚固的材料。该方法允许生成许多结构化材料,这包括水凝胶、膜、微胶囊、微凝胶、微型海绵等。在无需交联剂或任何其他危害性材料的情况下,可以可靠地形成结构化材料,从而使其适合与人体接触。这些材料也来源于可再生源,因此相对于合成类似物减少了环境影响。

[0017] 在另一个方面,提供了共溶剂混合物的用途,其用于调节溶液中的植物基蛋白质的性质以控制溶胶-凝胶条件并由此形成植物基材料。

[0018] 通过选择溶剂体系包含可混溶的共溶剂,其中第一共溶剂增大一种或多种植物基蛋白质的溶解度,并且第二共溶剂减小所述一种或多种植物基蛋白质的溶解度,可以控制溶胶-凝胶条件。

[0019] 第一共溶剂与第二共溶剂的比率可以在约20-80%v/v、约20-60%v/v、约25-55%v/v、约30-50%v/v、约20%、约30%、约40%、约50%或约60%v/v,最优选约30-50%v/v变化。这样的比率导致功能上有用的材料。

[0020] 溶剂体系可以含有一种或多种第一共溶剂和/或一种或多种第二共溶剂。

[0021] 首次地,可以使用可规模化的方法来可靠且可再现地形成植物基材料。通过能够控制溶胶-凝胶条件,可以调整所得材料的性质和/或调整制造过程以允许生产有用的生物材料。

[0022] 根据本发明的方法允许形成经由热可逆的冷-凝固胶凝化(thermoreversible cold-set gelation process)过程形成的植物基结构化材料。植物基结构化材料可以是植物基蛋白质超分子结构;或者可以是聚集和缠结的植物基蛋白质超分子结构的3-维网络。

[0023] 热可逆的冷-凝固胶凝化过程可以认为是这样一种过程:其中可以将植物基蛋白质分子加热到高于某个温度以形成液体溶液,该液体溶液可以被加工成所需的构造,然后冷却该液体溶液以能够实现溶胶-凝胶转变,从而形成由非共价分子间相互作用保持的自组装蛋白质聚集体的网络。因此,根据本发明的胶凝化过程不需要共价化学交联,并且因此是可逆的。本发明包括热可逆的冷胶凝化过程。

[0024] 因此,在另一个方面,提供了一种经由热可逆的冷-凝固胶凝化过程形成的植物基结构化材料;其中该结构化材料可以任选地是膜、薄膜、微图案化膜(或薄膜)、微米或纳米结构化薄膜、微凝胶、微胶囊、微珠、生物支架、生物支撑物、海绵、微型海绵、硬胶囊或功能涂层。

[0025] 在另一个方面,提供了一种植物基热可逆凝胶。

[0026] 在另一个方面,提供了一种植物基热可逆水凝胶。

[0027] 在另一个方面,提供了一种复合材料,其包含根据本发明的植物基材料,以及一种或多种其他生物聚合物,例如蛋白质、多糖等。

[0028] 在另一个方面,提供了根据本发明的方法制备的材料。

[0029] 本发明的植物基材料和用于制造它们的方法允许精确控制溶胶-凝胶转变,从而

开启植物基蛋白质用于形成生物材料的用途,该生物材料迄今为止仅使用动物来源蛋白质成功地制造。合适的生物材料包括膜、微珠、微胶囊、支架、凝胶、海绵等。

[0030] 在另一个方面,提供了一种包含根据本发明的植物基材料的微珠。

[0031] 在另一个方面,提供了一种包含根据本发明的植物基材料的微胶囊。

[0032] 在另一个方面,提供了一种包含根据本发明的植物基材料的硬胶囊。

[0033] 在另一个方面,提供了一种包含根据本发明的植物基材料的海绵或微型海绵。

[0034] 在另一个方面,提供了一种包含根据本发明的植物基材料的膜,优选薄膜。

[0035] 在另一个方面,提供了一种包含根据本发明的植物基材料的纳图案化或微图案化的膜。

[0036] 在另一个方面,提供了一种包含根据本发明的植物基水凝胶的生物支架。

[0037] 在另一个方面,提供了一种包含根据本发明的植物基水凝胶的功能涂层。

[0038] 在另一个方面,提供了一种包含根据本发明的植物基材料的食品、化妆品、药物或医疗装置。

[0039] 在另一个方面,提供了一种用于获得植物基材料的热可逆方法,其包括:

[0040] a)在溶剂体系中形成包含一种或多种植物基蛋白质的溶液,该溶剂体系包含可混溶的共溶剂;其中第一共溶剂增大所述一种或多种植物基蛋白质的溶解度,并且第二共溶剂减小所述一种或多种植物基蛋白质的溶解度;和

[0041] b)诱导溶液中的蛋白质发生溶胶-凝胶转变以形成植物基蛋白质水凝胶。

[0042] 在获得了所述材料后,可以移除所述材料的热可逆性质。

附图说明

[0043] 图1示出了在改变乙酸/DI水的共溶剂比率下形成的大豆蛋白分离物(SPI)水凝胶;

[0044] 图2示出了使用30%v/v共溶剂比率生产的水凝胶的SEM(扫描电子显微镜)图像;

[0045] 图3示出了对于在水(a)、在pH10 NaOH(b)、在pH2 HCl(c)和在30%乙酸(d)中的SPI分散体通过动态光散射(DLS)估算的SPI粒子的尺寸分布。对于每种溶剂,通过在95C下加热30分钟(记为加热的)或超声处理30分钟(记为超声处理的)来制备样品。所有测量均在0.1%蛋白质浓度下进行并重复两次。插图示出了每种条件的原始相关图;

[0046] 图4a示出了作为H2O:乙酸共溶剂比率的函数的SPI水凝胶的流变特性;图4b示出了以不同浓度制备的SPI水凝胶的剪切稀化行为;图4c示出了SPI水凝胶在不同温度下的热可逆流变行为;

[0047] 图5a和5b示出了在不同H2O:乙酸共溶剂比率下SPI水凝胶二级结构的结构变化,其由FTIR光谱中的酰胺I谱带计算得到;图5c示出了在不同温度下SPI水凝胶二级结构的结构变化,其由FTIR中的酰胺I谱带计算得到;

[0048] 图6示出了SDS-PAGE电泳图,其显示在增加乙酸的量后,蛋白质水解的程度增大;

[0049] 图7示出了使用本发明的水凝胶形成的微珠。其中,图7的a示出了微珠形成的示意图;图7的b示出了悬浮在水溶液(pH=2)中的稳定微珠;图7的c示出了通过超临界点干燥制备的微珠的SEM图;并且图7的d示出了在微珠的表面上的凝胶网络的SEM图;

[0050] 图8a示出了用于生成具有亲脂性和亲水性核的核-壳微胶囊的多层3D微流体液滴

发生器的示意图,图8b示出了含有悬浮在水溶液中的亲脂性核的核-壳微胶囊;

[0051] 图9示出了含有亲水性核的核-壳微胶囊,该亲水性核含有可溶性活性成分(核黄素)的悬浮液;

[0052] 图10a-图10c示出了模拟降解的结果,其中图10a示出了水溶液中的微胶囊;图10b示出了在SGF(模拟胃液)中60分钟后的微胶囊;并且图10c示出了在SIF(模拟肠液)中120分钟后的微胶囊;

[0053] 图11a示出了含有核的核-壳微胶囊,该核由在1%(w/w)HMP果胶中的核黄素溶液组成;图11b示出了两阶段体外消化率研究跟随HPLC分析的结果,显示在模拟条件下核黄素的累积释放;

[0054] 图12a示出了香料油加载的植物基蛋白质微型海绵的分布。图12b示出了在更高放大率(20x)下的单一香料加载的植物基蛋白质微型海绵,其中可以很容易地观察到蛋白质微凝胶壳;

[0055] 图13示出了生成稳定蛋白质膜的一个实例的示意图;

[0056] 图14a示出了根据本发明制备的膜的应力-应变曲线;图14b示出了杨氏模量并且图14c示出了断裂伸长率%;和

[0057] 图15示出了在没有使用甘油的情况下制备的SPI膜的FTIR光谱,以及商业SPI干燥样品的光谱;

[0058] 图16的a示出了在TEM网格上干燥的稀SPI溶液的TEM图像,证实存在大量β-折叠晶体(比例尺:5nm)。图16的b示出了SPI膜β-折叠晶体的特写图像(比例尺:2nm);

[0059] 图17a示出了在大豆蛋白膜表面上的均匀微柱阵列的微图案化,其与非-微米图案化的对照样品相比显著增大了水滴的接触角(99°)。图17b示出了通过在DVD光盘上流延大豆蛋白膜所获得的均匀纳通道阵列的纳米图案化。大豆蛋白膜上的纳米结构化图案表现出光子特性(米氏散射(Mie scattering));

[0060] 图18示出了用于在纸板基材上生产大豆蛋白膜涂层的示意过程。与未涂覆的对照样品相比,大豆蛋白膜涂覆的基底显示出50%的吸水率降低;

[0061] 图19a示出了在2-ml Eppendorf管基底周围形成薄的3-维水凝胶层。图19b示出了在对模制的3-维水凝胶进行干燥并将其从基底上移除后获得的大豆蛋白硬胶囊;

[0062] 图20的a示出了使用30%v/v共溶剂比率生产的豌豆蛋白水凝胶;图20的b示出了使用30%v/v共溶剂比率生产的豌豆蛋白水凝胶的SEM(扫描电子显微镜)图像;图20的c示出了豌豆蛋白分离膜。图20的d示出了悬浮在水溶液(pH=2)中的稳定豌豆蛋白微凝胶;

[0063] 图21示出了由在30%(v/v)乙酸水溶液中的100mg/ml马铃薯蛋白分离物溶液制备的马铃薯蛋白水凝胶;

[0064] 图22a-图22b示出了根据本发明制备的其他膜的应力-应变曲线;

[0065] 图23示出了根据本发明使用乙酸以及HCl或NaOH的胶凝化的光学图像。

具体实施方式

[0066] 以下特征适用于本发明的所有方面。

[0067] 任何合适的植物基蛋白质均可用于本发明。合适的植物来源包括大豆、豌豆、稻米、马铃薯、小麦、玉米醇溶蛋白、高粱等。特别的植物蛋白包括大豆蛋白和豌豆蛋白。

[0068] 合适的植物基蛋白质还包括:

[0069] -芸苔属(Brassicas):包括Brassica balearica:马略卡卷心菜(Mallorca cabbage),埃塞俄比亚芥菜(Brassica carinata):阿比西尼亚芥菜(Abyssinian mustard)或阿比西尼亚卷心菜(Abyssinian cabbage),长芥(Brassica elongate):细长芥菜(elongated mustard),Brassica fruticulosa:地中海卷心菜(Mediterranean cabbage),Brassica hilarionis:St Hilarion卷心菜(St Hilarion cabbage),芥菜(Brassica juncea):印度芥菜(Indian mustard),黑芥和叶芥菜(brown and leaf mustards),萨雷普塔芥菜(Sarepta mustard),甘蓝型油菜(Brassica napus):油菜籽(rapeseed)、油菜(canola)、芜菁甘蓝(rutabaga)、乌塌菜(Brassica narinosa):阔喙芥菜(broadbeaked mustard),黑芥(Brassica nigra):黑芥菜(black mustard),中国芥菜(Brassica oleracea):羽衣甘蓝(kale),卷心菜(cabbage),绿甘蓝(collard greens),西兰花(broccoli),花椰菜(cauliflower),开兰菜(kai-lan),抱子甘蓝(Brussels sprouts),大头菜(kohlrabi),小松菜(Brassica perviridis):菜远(tender green),芥末菠菜(mustard spinach)、鸡毛菜(Brassica rapa)(同义词,白菜类蔬菜(B.campestris)):大白菜(Chinese cabbage),萝卜(turnip),西洋菜台(rapini),冬菜(komatsuna),Brassica rupestris:棕色芥菜(brown mustard),亚非芥(Brassica tournefortii):亚洲芥菜(Asian mustard);

[0070] -茄科:包括西红柿、马铃薯、茄子、甜椒和辣椒;

[0071] -谷物:包括玉米、稻米、小麦、大麦、高粱、小米、燕麦、黑麦、黑小麦、福尼奥米(fonio);

[0072] -假谷物(pseudocereals):包括苋菜(千穗谷(love-lies-bleeding)、红苋菜(red amaranth)、老枪谷(prince-of-Wales-feather))、面包坚果(breadnut)、苦荞(buckwheat)、奇亚籽(chia)、鸡冠花(cockscomb)(也称为鹌鹑草(quail grass)或三叶草(soko))、pitseed Goosefoot、qañiwa、藜麦(quinoa)和金合欢籽(wattleseed)(也称为金合欢种子(acacia seed));

[0073] -豆科植物:包括金合欢(Acacia alata)(Winged Wattle)、Acacia decipiens、伞树(Acacia saligna)(通常已知有多种名称,包括coojong、金环荆(golden wreath wattle)、橙荆(orange wattle)、蓝叶荆(blue-leafed wattle))、落花生(Arachis hypogaea)(花生(peanut))、黄芪(Astragalus galegiformis)、Cytisus labournum(常见的金链花(laburnum)、金链(golden chain)或金雨(golden rain))、大花金雀儿(Cytisus supinus)、Dolichios lablab(常见名称包括风信子豆(hyacinth bean)、lablab-bean bonaviist bean/pea、牛豆(dolichos bean)、seim bean、lablab bean、埃及芸豆(Egyptian kidney bean)、印度扁豆(Indian bean)、bataw和澳大利亚豌豆(Australian pea)、Ervum lens(Lentil)、Genista tinctorial(常见名称包括Dyder's whin、染料木(waxen woad)和蜡木(waxen wood))、菜用大豆(Glycine max)(大豆)、Lathyrus clymenum(豌豆或vetchlings)、Lathyrus odoratus(peavines或vetchlings)、Lathyrus staivus(peavines或vetchlings)、Lathyrus Silvetris(peavines或vetchlings)、Lotus tetragonolobus(asparagus-pea或winged pea)、Lupinus albus(Lupin)、Lupinus angustifolius(lupin)、Lupinus luteus(Lupin)、Lupinus polyphyllus(Lupin)、苜蓿

(Medicago sativa)(Alfalfa)、Phaseolus aureus(绿豆(Mung bean))、Phaseolus coccineus(刀豆(Runner bean))、Phaseolus nanus(绿豆/法国豆)、Phaseolus vulgaris(四季豆(Green bean)/法国菜豆(French bean))、Pisum sativum(豌豆)、杂三叶(Trifolium hybridum)(秣草(Clover))、Trifolium pretense(红色三叶草(Red clover))、Vicia faba(蚕豆(Broad bean))、野菜豆(Vicia sativa)(Vetch)、Vigna unguiculate(豇豆(cowpea));

[0074] -非豆科植物:包括:Acanshosicyos horrida(Acanshosicyos horrida)、Aesculus hyppocastanum(七叶树(Conker tree)/马栗树(Horsechestnut))、Anacardium occidentale(腰果树(Cashew tree))、比妥树(Balanites aegyptica)、Bertholletia excels(巴西坚果(Brazil nut))、Beta vulgaris(甜菜(Sugar beet))、Brassica napus(油菜籽(Rapeseed))、芥菜(Brassica juncea)、Brassica juncea(棕芥(Brown mustard))、Brassica nigra(黑芥(Black mustard))、Brassica hirta(欧亚芥菜(Eurasian mustard))、Cannabis sativa((marijuana))、Citrullus vulgaris(西瓜种)、Citrus aurantiaca(柑橘(Citrus))、Cucurbita maxima(西葫芦)(squash)、Fagopyrum esculentum(虎杖(knotweed))、Gossypium barbadense(超长绒棉(Extra long staple cotton))、Heianthus annuus(向日葵(sunflower))、Nicotiana sp.(烟草植物(Tobacco plant))、Prunus avium(樱桃(cherry))、Prunus cerasus(酸樱桃(Sour cherry))、Prunusdomestica(李子(plum)、Prunus amygdalus(杏仁(almond))、Rricinus community(蓖麻/蓖麻油植物)、Sasamumindicum(芝麻(Sesame))、Sinapis alba(白芥(White mustard)),Terlfalrea pedata(牡蛎坚果(Oyster nut))。

[0075] 为了避免疑义,根据本发明的植物基结构化材料不涵盖处于其天然状态的植物。例如,天然形成的植物细胞、细胞器或囊泡不是本发明的植物基结构化材料。

[0076] 植物来源的蛋白质的一个特征是它们固有的在水中的较差溶解性。迄今为止,这限制了它们在生产生物材料方面的用途。然而,本发明克服了与这样的蛋白质相关的先前限制。

[0077] 在根据本发明的方法中,通过将植物基蛋白质添加到溶剂体系中来形成材料,其中溶剂体系包含两种或更多种如本文所定义的可混溶的共溶剂。

[0078] 第一共溶剂增大所述一种或多种植物基蛋白质的溶解度。第一助溶剂可以被认为是增溶性共溶剂。可以存在一种或多种增溶性共溶剂并且该一种或多种增溶性共溶剂可以全部或部分地使一种或多种植物基蛋白质增溶。

[0079] 增溶性助溶剂的实例是有机酸。有机酸是具有酸性性质的有机化合物。合适的有机酸包括乙酸或α-羟基酸。合适的α-羟基酸包括乙醇酸、乳酸、苹果酸、柠檬酸和酒石酸。优选的有机酸是乙酸和乳酸。使用有机酸能够实现植物蛋白的溶解,并且还允许蛋白质的温和水解。例如,不希望受理论束缚,植物基蛋白质在有机酸中的溶解度由于以下方面而是可能的:i)蛋白质的质子化和ii)存在有助于减少疏水相互作用的阴离子溶剂化层。一旦最初溶解在有机酸中,则植物基蛋白质的质子化就可以有助于使它们在非溶剂(例如水)中稳定。

[0080] 在一个优选的实施方案中,第一共溶剂是有机酸。

[0081] 与第一共溶剂相比,第二共溶剂对于一种或多种植物基蛋白质的溶解度降低。第

二共溶剂可以被认为是脱溶性(desolubilising)共溶剂。可以存在一种或多种脱溶性共溶剂。

[0082] 一种或多种脱溶性第二共溶剂的实例是水性缓冲溶液。在另一个实施方案中,第二共溶剂可以是乙醇、甲醇、丙酮、乙腈、二甲亚砜、二甲基甲酰胺、甲酰胺、2-丙醇、1-丁醇、1-丙醇、已醇、叔丁醇、乙酸乙酯或六氟异丙醇。在一个特别优选的实施方案中,第二共溶剂是水和乙醇。在另一个特别优选的实施方案中,第二共溶剂是水。

[0083] 在一个优选的实施方案中,溶剂体系中的一种或多种植物基蛋白质的浓度为25-200mg/ml,优选50-150mg/ml。有机酸的比率可以根据蛋白质浓度而变化,例如,随着蛋白质浓度增加而使用更高的有机酸比率。

[0084] 在一个优选的实施方案中,对蛋白质水解的程度进行控制以改变所得水凝胶的性质。例如,增大在形成期间存在的酸浓度将会增加蛋白质水解的程度。较高程度的蛋白质水解导致形成较低刚性的水凝胶。

[0085] 为了形成包含一种或多种植物基蛋白质的溶液,可能需要对蛋白质/溶剂体系混合物施加物理刺激以使得蛋白质能够溶解。合适的物理刺激包括超声处理、搅拌、高剪切混合或其他物理技术。优选的技术是超声处理。

[0086] 在一个实施方案中,溶液经受超声处理的时间为约5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟或大于30分钟。优选的超声处理时间为约30分钟。

[0087] 加热蛋白质溶液,以使得液体溶液保持在一种或多种蛋白质的溶胶-凝胶转变之上。通过改变溶剂体系(例如通过选择有机酸、有机酸与其它溶剂的比率的选择或通过其它方式),可以改变一种或多种蛋白质的溶胶-凝胶转变温度。通过条件的适当选择,可以小心地控制蛋白质的溶胶-凝胶转变,从而控制水凝胶的形成。

[0088] 在一个实施方案中,将蛋白质溶液加热至约或高于70℃。在另一个实施方案中,将蛋白质加热至约或高于75℃、约或高于80℃、约或高于85℃或约90℃。在一个优选的实施方案中,将蛋白质加热至85℃。

[0089] 可以将蛋白质溶液在升高的温度下保持约5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、45分钟或1小时的时间段。优选的时间段是至少30分钟以使蛋白质能够完全溶解。可以将蛋白质溶液在高温下保持更长的时间段。这可能对于商业间歇工艺或对于流体加工步骤(其中需要将蛋白质溶液以液体形式保留较长的时间)中的使用是有用的。

[0090] 已将蛋白质溶液加热至蛋白质的溶胶-凝胶转变温度以上后,可以将蛋白质溶液的温度降低至低于溶胶-凝胶转变温度的第二温度,以促进水凝胶的形成。第二温度可以是室温。蛋白质溶液可以在降低的温度下保持约5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟或约30分钟的时间段。特别的减少的时间段是约5分钟。然而,本发明的方法允许蛋白质在溶液中保持长时间段。因此,取决于需求,蛋白质溶液可以保持在溶胶-凝胶转变温度之上,持续时间为将蛋白质保持液体形式所需要的那么长的时间。这可能是几小时、几天或更长时间。此外,由于反应是可逆的,所以可以例如将溶液保持在其中将形成水凝胶的较低温度(例如室温)下,但随后加热至溶胶-凝胶转变温度之上,以使溶液恢复到液态以进一步加工。由于水凝胶长时间保持稳定,所以以这种方式蛋白质水凝胶可以储存数小时、数天、数周、数月或数年。

[0091] 特别的温度将取决于蛋白质源的特性、所用的溶剂条件以及因此的溶胶-凝胶转

变温度。备选地,升高和降低的温度可以是相对固定的(例如约85℃,然后约室温),并且调节共溶剂混合物条件以确保对于选定的植物基蛋白质的合适溶胶-凝胶转变温度。

[0092] 因此,在一个实施方案中,提供了一种用于形成植物基材料的方法,包括:

[0093] a)形成包含一种或多种植物基蛋白质和溶剂体系的蛋白质溶液,其中该溶剂体系包含可混溶的共溶剂;其中第一种共溶剂增加所述一种或多种植物基蛋白质的溶解度,而第二种共溶剂降低一种或多种植物基蛋白质的溶解度;

[0094] b)对蛋白质溶液进行机械搅拌持续一段时间,例如超声处理;

[0095] c)将蛋白质溶液的温度升高至高于溶胶-凝胶转变温度的第一升高温度持续一段时间。所述温度升高可能由b)中的机械搅拌引起或者可能来自外部热源;

[0096] d)将蛋白质溶液的温度降低至溶胶-凝胶转变温度以下,使得植物基蛋白质自聚集成水凝胶;和,任选地

[0097] e)将水凝胶形成为所限定的形状,例如微凝胶、微胶囊、微海绵、膜等。该形成步骤可以是模制步骤,即将水凝胶模制为限定的形状。该形成步骤可以使用微流体装置。

[0098] 蛋白质溶液可以在步骤c)中保持在升高的温度,同时使溶液符合所需的最终形状。例如,在微流体装置内,可以将蛋白质溶液在装置储器内保持在升高的温度c),但是随着溶液从装置排出,其温度降低,由此形成微凝胶或微胶囊壳。备选地,可以将蛋白质溶液保持在升高的温度下,同时将其在合适的模具中成型,其中在温度降低后,允许蛋白质形成为水凝胶。

[0099] 不希望受理论束缚,据信当将植物蛋白质加入到溶剂体系中时,植物蛋白质形成不溶性胶体蛋白质聚集体的高粘性分散体

[0100] 此外,据信机械搅拌(例如超声处理)的施加将大的胶体蛋白质聚集体破坏成较小的聚集体,以及破坏蛋白质分子间相互作用。利用这种方式,蛋白质聚集体的大小可以显著降低至低于100nm的粒度。在一个实施方案中,本发明包括平均尺寸小于200nm、优选小于150nm、小于125nm、小于100nm、小于90nm、小于80nm、小于70nm、小于60nm、小于50nm、小于40nm或小于30nm的蛋白质聚集体。

[0101] 此外,据信在共溶剂体系的存在下将蛋白质溶液加热至高于溶胶-凝胶温度时,植物蛋白质部分展开,导致最初掩埋在蛋白质天然结构中的疏水性氨基酸暴露。一旦部分展开,共溶剂就能够与展开的蛋白质分子相互作用。例如,有机酸更容易接近以使氨基酸残基质子化,并且能够形成使疏水相互作用稳定的阴离子盐桥。此外,在升高的温度下加热后,蛋白质-蛋白质非共价分子间接触被破坏。此外,据信在将蛋白质溶液冷却至低于溶胶-凝胶温度时,能够实现蛋白质-蛋白质非共价分子间接触,从而促进植物蛋白质分子自组装成超分子聚集体的网络。

[0102] 据信,本发明的方法允许植物蛋白质聚集成由分子间氢键相互作用保持的超分子结构,并且特别是在β-链之间。

[0103] 本发明的方法能够形成其中存在高水平β-折叠分子间相互作用的材料。这导致了以前没有制成过的新材料。

[0104] 在一个实施方案中,根据本发明的植物基材料具有这样的蛋白质二级结构,该蛋白质二级结构具有至少40%的分子间β-折叠、至少50%的分子间β-折叠、至少60%的分子间β-折叠、至少70%的分子间β-折叠、至少80%的分子间β-折叠或至少90%的分子间β-折

叠。在一个实施方案中,植物基材料是膜。在一个实施方案中,植物基材料是经干燥的材料,例如经干燥的水凝胶。在一个实施方案中,植物基材料是水凝胶或本文描述的其他材料。据信,由植物基蛋白质源制备的先前凝胶在二级结构中可能具有较低量的分子间β-折叠,从而导致现有技术不利的性质。

[0105] 根据本发明的植物基材料包含β-折叠晶体。根据本发明的植物基材料可以展现出高度的β-折叠晶体结构。植物基材料可以包含至少40%的β-折叠晶体、至少50%的β-折叠晶体、至少60%的β-折叠晶体、至少70%的β-折叠晶体、至少80%的β-折叠晶体或至少90%的β-折叠晶体。在一个实施方案中,植物基材料是膜。在一个实施方案中,植物基材料是经干燥的材料,例如经干燥的水凝胶。在一个实施方案中,植物基材料是水凝胶或本文描述的其他材料。

[0106] 具有所述高分子间β-折叠二级结构的植物基材料和包含β-折叠晶体的所述植物基材料可以是本发明中描述的材料中的任一种,这包括结构化材料,如微胶囊、微珠、生物支架、生物支撑物、海绵、微型海绵、硬胶囊或功能涂层等。它们也可以是膜、薄膜、微图案化膜(或薄膜)、微米或纳米结构化薄膜或微凝胶等。

[0107] 因此,本发明涵盖例如具有蛋白质二级结构的植物基膜,该蛋白质二级结构具有至少40%的分子间β-折叠、至少50%的分子间β-折叠、至少60%的分子间β-折叠、至少70%的分子间β-折叠、至少80%的分子间β-折叠或至少90%的分子间β-折叠。这同样适用于根据本发明的其他材料。

[0108] 此外,本发明涵盖例如植物基膜,其包含植物基β-折叠晶体,包含至少40%的β-折叠晶体、至少50%的β-折叠晶体、至少60%的β-折叠晶体、至少70%的β-折叠晶体、至少80%的β-折叠晶体或至少90%的β-折叠晶体。这同样适用于根据本发明的其他材料。

[0109] 本发明提供了一种植物基结构化材料,其包括膜、薄膜、微图案化膜(或薄膜)、微米或纳米结构化薄膜、微凝胶、微胶囊、微珠、生物支架、生物支撑物、海绵、微型海绵、硬胶囊或功能涂层。

[0110] 根据本发明的材料具有有利的机械性能。例如,在温度变化时可逆地从凝胶改变为液体的能力能够实现有利的制造能力。

[0111] 在一个实施方案中,根据本发明生产的水凝胶在10rad/s的储能模量(G')为大于500Pa、大于1000Pa、大于2500Pa、大于3000Pa、大于4000Pa。

[0112] 在一个实施方案中,水凝胶表现出剪切稀化行为,其中粘度随剪切速率增大而降低。

[0113] 在一个实施方案中,根据本发明生产的水凝胶表现出独特的热可逆胶凝化行为。在升高的温度下加热和/或通过施加机械搅拌后,蛋白质凝胶恢复为液体形式。这是在现有水凝胶的情况下没有观察到的独特性质,现有水凝胶不会在加热后恢复到完全液态。相反,根据本发明制备的凝胶可以。在一个实施方案中,在升高的温度下加热和/或通过施加机械搅拌后,蛋白质溶液可以具有低于250Pa、低于100Pa、低于50Pa、低于10Pa的储能模量。这使得本发明的材料和方法二者都具有独特的制造能力。

[0114] 同样,如果需要,则可以通过除去本发明的溶剂体系来去除热可逆性。例如,可以使用本发明的方法来制备植物基微胶囊。一旦形成,就可以将溶剂体系洗掉,这将终止微胶囊的热可逆特性。因此,如果之后加热微胶囊,则它将保持稳定并且不会再熔融。这使得例

如根据本发明的微胶囊能够经受高温过程而仍然保持完整和稳定。

[0115] 因此,根据本发明形成的水凝胶具有在现有的植物基水凝胶中没有观察到的独特性质。这些包括由市售来源的高浓度(即5%-15%w/w)的植物基蛋白质来形成水凝胶的能力,以及在热变性后将这样的高浓蛋白质溶液保持在液态的能力,这使得它们能够模制为明确限定的物体。

[0116] 本发明的材料的一个特征是不需要提供交联剂,因为植物蛋白将自行形成水凝胶。因此,在本发明的一个实施方案中,提供了一种不含有或基本上不含有交联剂的植物蛋白材料(例如水凝胶)。

[0117] 然而,在一个备选实施方案中,根据本发明的水凝胶可以包含交联剂。合适的交联剂包括微生物转谷氨酰胺酶、戊二醛、甲醛、乙二醛、酚类化合物、环氧化合物、京尼平(genipin)或二醛淀粉。

[0118] 由于水凝胶的多孔网络,水凝胶内的溶剂混合物可以交换为另一种溶剂混合物,而不会损害水凝胶的机械稳定性。可以进行溶剂交换过程以从水凝胶多孔网络中除去有机酸。

[0119] 在本发明的一个实施方案中,所述方法包括将其中形成了植物基蛋白质水凝胶的溶剂体系交换为备选溶剂体系的步骤。在另一个实施方案中,这使用溶剂交换过程进行。此步骤可以在形成水凝胶之后进行,但也可以在水凝胶已形成为结构化材料之后(例如在本发明方法的步骤b)或c)之后)进行。在一个优选的实施方案中,使用水性缓冲液来替代水凝胶多孔网络内的有机酸共溶剂混合物。

[0120] 在一个实施方案中,使水凝胶内的溶剂混合物蒸发以产生干燥的材料,如膜、微米结构化/纳米结构化的薄膜或微珠。在另一个实施方案中,溶剂体系中的一种或多种共溶剂是挥发性溶剂。在一个优选的实施方案中,第一共溶剂是挥发性有机酸,如乙酸。在一个优选的实施方案中,第二或另外的共溶剂是挥发性醇,如乙醇。在又一个优选的实施方案中,第一共溶剂和第二或其他共溶剂都是挥发性溶剂。

[0121] 在一个实施方案中,本发明的材料可以包含一种或多种增塑剂。可能的增塑剂包括乙二醇、二甘醇、三甘醇、四甘醇、聚乙二醇、丙二醇、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、脂肪酸、葡萄糖、甘露糖、果糖、蔗糖、乙醇胺、脲、三乙醇胺;植物油、卵磷脂、蜡和氨基酸。

[0122] 待包含的增塑剂的量将取决于材料的用途,例如膜。在一个实施方案中,组合物可以包含约1%、约2%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%或更多的增塑剂。在另一个实施方案中,水凝胶可以包含约5-50%的增塑剂、约10-50%、约20-40%、约15-35%或约20%的增塑剂。

[0123] 添加增塑剂可能影响材料的机械性能。典型地,添加增塑剂将增大材料的弹性,但这典型地反过来降低所得材料的强度。

[0124] 本发明的水凝胶允许形成一系列有用的植物基生物材料。与先前使用的动物或石化源相比,使用植物基材料具有许多优势。首先,植物源是可再生的并且可以以环境有效的方式有效地获得。其次,植物源是可生物降解的并且因此是其他塑料的环保替代品。第三,与动物来源蛋白质相比,植物基蛋白质具有显著优势,即它们不会将动物来源蛋白质引入到人体中。这从药理学和药学角度来看都具有积极影响,其中动物来源的材料必须经过严格的检查和处理,以确保不存在不利要素(例如除去朊病毒等);而且因为这些产品适合素

食者/纯素食者。

[0125] 由于植物基蛋白质天然存在于人类(或其他动物)的饮食中,所以与其他生物聚合物如多糖(例如藻酸盐或壳聚糖)相比,根据本发明制备的生物材料表现出更高程度的消化率。这使得它们特别适用于药物、食品和/或化妆品用途。

[0126] 在一个实施方案中,本发明的水凝胶可以用于形成膜,例如薄膜。植物蛋白来源的膜具有许多应用,包括形成用于食品包装应用或与包括可植入装置在内的医疗装置一起使用的可生物降解的柔性膜。

[0127] 本发明的植物基材料相对于动物基材料(或淀粉基/纤维素材料)的一个优点是它们在水中的固有不溶性。大多数生物聚合物膜会容易地溶于水,因此使得它们本身不可用于食品包装应用,从而需要额外的利用合成聚合物的涂层。本发明克服了这些问题。

[0128] 膜的典型厚度可以为1-1000μm、1-100μm、10-100μm、20-60μm、30-50μm等。

[0129] 膜的杨氏模量可以为超过20MPa,超过50MPa,超过80MPa,超过100MPa,超过200MPa,超过300MPa,超过400MPa,超过500MPa,超过600MPa或更高。

[0130] 膜的断裂伸长率可以为高于10%、高于20%、高于30%、高于40%、高于50%、高于60%、高于70%、高于80%、高于90%、高于100%或更高。

[0131] 杨氏模量/断裂伸长率这些数字描述了使用植物基功能材料制成的膜。可以使用所述材料在如本文所述的所有结构化材料中复制所述特性。

[0132] 膜可以采用100nm至1000μm范围内的特征进行微图案化,从而实现新的功能特性,如:超疏水性(荷叶效应)或结构颜色(归因于米氏散射)。

[0133] 功能性复合膜可以通过嵌入无机纳米粒子,如金纳米粒子或银纳米粒子来生产,分别用于生成具有抗菌性能的柔性电子器件或膜。

[0134] 在另一个实施方案中,本发明的水凝胶可以用于形成微珠。由植物基来源形成微珠克服了利用当前塑料基微珠的环境问题。微珠典型地是其最大尺寸的直径小于一毫米的固体粒子。

[0135] 在一个实施方案中,根据本发明的微珠的最大尺寸的尺寸为小于1mm、小于900μm、小于800μm、小于700μm、小于600μm、小于500μm、小于400μm、小于300μm、小于200μm或小于100μm。

[0136] 在另一个实施方案中,本发明的水凝胶可以用于形成微胶囊。微胶囊可以用于封装多种物质,并有多种工业应用,包括化妆品、食品、家用产品用途、农用化学品用途和药物用途。

[0137] 根据本发明制备的微胶囊对于标准合成聚合物微囊化壳材料提供了完全可生物降解的替代物。

[0138] 根据本发明制备的微胶囊独特地使植物基材料能够微流体地进行组装。

[0139] 根据本发明制备的微胶囊例如针对不利储存条件提供优异稳定性,并且成为更安全的食品级或药物级方案,以保存食品用途中的活性成分,例如维生素、必需脂肪酸或抗氧化剂或者药物活性成分(包括小分子和大分子)。

[0140] 根据本发明制备的微胶囊还可以具有这样的优点,即,它们可以使用微流体技术生成,从而确保高再现性、生成复杂结构(核-壳)的能力和/或可以使用温和的加工条件制备,由此保护它们封装的活性剂。

[0141] 在没有交联剂或任何其他有害物质存在的情况下,通过控制蛋白质聚集体的自组装,也可以由植物基蛋白质生成坚固的微胶囊。

[0142] 在一个实施方案中,根据本发明的微胶囊可以封装疏水性内部组合物。在另一个实施方案中,根据本发明的微胶囊可以封装亲水性内部组合物。在另一个实施方案中,根据本发明的微胶囊可以封装活的有机体组合物。在另一个实施方案中,根据本发明的微胶囊可以封装粉状组合物。在又一个实施方案中,根据本发明的微胶囊可以封装水包油型、油包水型、油包水包油型或水包油包水型乳液等。

[0143] 根据本发明的植物基水凝胶可以形成微胶囊壳。在一个实施方案中,该壳的厚度可以为约100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1μm、2μm、3μm、4μm、5μm、6μm、7μm、8μm、9μm、10μm、11μm、12μm、13μm、14μm、15μm、16μm、17μm、18μm、19μm、20μm、25μm、30μm、30μm、35μm、40μm或50μm等。其他厚度包括介于10nm-50000μm、10μm-100μm、10μm-50μm、1μm-10μm等之间的厚度。

[0144] 根据本发明的植物基微胶囊可以封装任何营养、化妆、药物或农用化学合适的活性剂,这包括维生素、必需脂肪酸、抗氧化剂、小分子、亲水性小分子、疏水性小分子、蛋白质、抗体、抗体-药物缀合物、香料和其他大分子。

[0145] 合适的包封剂包括选自以下中的一种或多种:

[0146] 交联剂、硬化剂、有机催化剂和基于金属的催化剂(例如铂、钯、钛、钼、铜或锌的有机配合物和无机配合物),其用于弹性体配方、橡胶配方、油漆配方、涂料配方、粘合剂配方或密封剂配方的聚合;

[0147] 染料、着色剂、墨水用颜料、个人护理产品、弹性体配方、橡胶配方、油漆配方、涂料配方、粘合剂配方、密封剂配方或纸张配方;

[0148] 用于洗涤剂、家居清洁产品、个人护理产品、纺织品(所谓的智能纺织品)、涂料配方的香料。对本发明有用的香料是属于油国际香料协会(IFRA)公布和更新的标准清单的任何化合物;

[0149] 香料、调味剂、维生素、氨基酸、蛋白质、必需脂质、益生菌、抗氧化剂、防腐剂(用于饲料和食品);

[0150] 用于洗涤剂和个人护理产品的织物柔软剂和调理剂;

[0151] 生物活性化合物,如酶、维生素、蛋白质、植物提取物、保湿霜、消毒剂、抗菌剂、防晒剂、药物,用于个人护理产品、纺织品(所谓的智能纺织品)。这些化合物包括但不限于维生素A、维生素B、维生素C、维生素D、维生素E、对氨基苯甲酸、α-羟基酸、樟脑、神经酰胺、鞣花酸、甘油、甘氨酸、乙醇酸、透明质酸、氢醌、异硬脂酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、羟苯甲酮、泛醇、脯氨酸、视黄醇、棕榈酸视黄酯、水杨酸、山梨酸、山梨糖醇、三氯生、酪氨酸;和

[0152] 肥料、除草剂、杀昆虫剂、杀虫剂、杀真菌剂、驱虫剂和消毒剂(用于农用化学)。

[0153] 根据本发明的植物基微胶囊还可以用于诊断和高通量筛选。

[0154] 根据本发明的植物基水凝胶还可以用于制造微凝胶或微型海绵。微凝胶是微型水凝胶。微型海绵可以被认为是加载有物质,例如活性成分或成分的微凝胶。

[0155] 根据本发明的植物基水凝胶还可以用于制造生物支架和生物支持物。这样的材料可以用于体外和体内生长细胞和组织。水凝胶还可以用于涂覆医疗装置和植入物。

[0156] 根据本发明的植物基蛋白质可以被功能化和/或衍生化以改变蛋白质的特性。

[0157] 现在将参考以下非限制性实施例描述本发明。

[0158] 材料

[0159] -大豆蛋白分离物(SPI)(92％蛋白)购自MP Biomedicals。

[0160] -豌豆蛋白分离物(PPI)(80％蛋白)购自Cambridge Commodities Ltd。

[0161] -乙酸(冰的)和乳酸(天然,≥85％)、大豆油(得自菜用大豆(Glycine max)的大豆油)、(-)-核黄素、甘油和PFO(1H,1H,2H,2H-全氟-1-辛醇)购自Sigma Aldrich。果胶由Cargill友好提供。

[0162] -Fluorinert(FC-40)购自Fluorochem。

[0163] -008-含氟表面活性剂购自RAN Biotechnologies。

[0164] 实施例1

[0165] 根据以下过程制备自立的水凝胶。

[0166] 将冰醋酸与去离子水以不同比率(10％v/v、30％v/v、50％v/v、70％v/v和90％v/v)混合。将大豆蛋白分离物以100mg/ml的最终蛋白质浓度添加到DI水/乙酸溶液中。获得不溶性蛋白质的分散体。为了溶解蛋白质,将混合物暴露于超声处理进行30分钟(高频功率输出＝70W,频率＝20KHz,振幅＝90％)。在此过程期间,将样品温度保持在85℃-90℃。在30分钟后,获得完全半透明(translucent)的液体溶液。将样品在室温下冷却5min。在此过程期间,液体样品变成在小瓶倒置后可观察到的透亮且自立的水凝胶。

[0167] 对于不同乙酸/DI水比率,根据实施例1制备的水凝胶如图1所示。

[0168] 在10％-70％v/v的乙酸/DI水的比率下观察到自立的水凝胶。注意到,对于30％v/v或更高的溶液,产生完全半透明的溶液,其迅速形成自立的水凝胶。凝胶完全半透明的事实表明它是由小的可溶性聚集体结构组成,而不是由大的不溶性聚集体(如在蛋白质冷凝固凝胶中通常发现的那些)组成。根据本发明制备的水凝胶是稳定的并在水和乙醇二者中的多个洗涤步骤之后保持其结构。

[0169] 扫描电子显微镜

[0170] 对使用30％v/v共溶剂比率制备的水凝胶进行的SEM(扫描电子显微镜)并且在图2中示出。水凝胶微米结构证实了细链蛋白质聚集体的密排列网络的存在。该图还显示凝胶网络在除去乙酸后仍保持完整。

[0171] 因此,首次制备了植物基热可逆凝胶。

[0172] 在最后一步使用100％无水乙醇,使大豆蛋白水凝胶和微凝胶在乙醇中脱水。将样品转移到微孔样本胶囊(78μm孔径,Agar Scientific)中,该微孔样本胶囊用100％无水乙醇浸泡并部分填充以防止样品在转移期间干燥。然后,使用Quorum E3100临界点干燥器对样品进行临界点干燥,其中使用液体CO2冲洗4-5次并且每次冲洗之间至少15分钟温育。使用导电碳粘垫(Agar Scientific)将样品安装在铝SEM残端上,并使用Quorum K575X溅射涂布器涂覆15nm铱。使用在2keV和25-50pA探针电流运行的FEI Verios 460扫描电子显微镜来观察样品。使用以无场模式(低分辨率)的Everhard-Thornley检测器或以全浸没模式(高分辨率)的透过式透镜检测器来获取二次电子图像。

[0173] 粒度分析

[0174] 为了表征SPI聚集体的大小,SPI分散体在各种溶剂体系中制备:a)去离子水,b)用NaOH调节至pH＝10的去离子水,c)用HCl调节至pH＝2的去离子水和d)30％(v/v)乙酸水溶

液),并用三种不同的方法处理:(1)未处理,(2)在水浴中于95℃加热30分钟,或(3)在95℃超声处理30分钟。使用Zetasizer Nano(Malvern)来测量粒度(流体动力学直径)。在超声处理后立即将所有样品稀释至0.1%(v/v),随后进行测量。

[0175] 动态光散射(DLS)分析(图3)表明,与在不同条件下制备的未溶解的那些相比,在95℃超声处理30分钟的在30%(v/v)乙酸溶液中制备的蛋白质聚集体具有显著更小的粒度(29±9.1nm)。

[0176] 流变学表征

[0177] 为了表征SPI水凝胶的流变特性,将经由实施例1生产的样品在室温冷却1h,然后在4℃保持12h。

[0178] 使用ARES受控应变流变仪进行流变测量。在20℃的温度使用25mm光滑平行板进行测试。应变和频率扫描在含有增加量乙酸的SPI水凝胶样品上进行。使用10rad/s的频率从0.01%到100%应变进行应变扫描。使用1%的应变(在线性粘弹性区域内)从0.1到100rad/s进行频率扫描。所有流变测量均在温度控制(20±0.25℃)下进行。

[0179] 图4a示出了作为H2O:乙酸共溶剂比率的函数的SPI水凝胶的流变特性。可以看出,添加少量乙酸(10%v/v)导致形成弱水凝胶,这可能归因于蛋白质的不完全溶解和较大的不溶性聚集体的存在。另一方面,大量乙酸也导致形成弱水凝胶(90%v/v)。以30-70%v/v的共溶剂比率形成的水凝胶导致更强的水凝胶,其中以30%和50%乙酸(v/v)制备的水凝胶显示大于2500Pa的G'。

[0180] 为了确定SPI水凝胶(分散在30%v/v乙酸水溶液中的75mg/ml SPI)的热可逆胶凝化特性,使用Discovery HR-2(TA Instruments)流变仪进行流变测量。使用20mm光滑平行板进行测试。使用10rad/s的角频率在不同温度下对SPI水凝胶样品进行测试。最初,在90℃将超声处理的SPI溶液加载到预热的流变仪探头中。在500秒后,将温度以5℃/min的速率降至10℃。在样品温度达到10℃后,将其在10℃下保持500秒。最后,将样品以5℃/min的速率加热至90℃。SPI水凝胶的热可逆流变特性的结果在图4c中示出。

[0181] 这显示了本发明的材料的独特制造能力,因为凝胶在凝胶和液体状态之间完全热可逆地移动。这样的热可逆性在以前从未见过。

[0182] FTIR

[0183] 研究了在不同溶剂比率下水凝胶二级结构的变化。使用FTIR-Equinox55光谱仪(Bruker)对SPI水凝胶进行结构分析。水凝胶样品在没有进一步预处理的情况下使用,并加载到FTIR保持器中,并通过减去50%v/v(DI水/乙酸)参比进行分析。从原始FTIR光谱减去气氛补偿光谱,并应用二阶导数进行进一步分析。每个FTIR测量对于每个样品复制重复3次(每个样品平均9次重复)。检测仪器的灵敏度为5%。为了解决大豆蛋白分离物的天然结构向超分子聚集体的转化,跟踪了与蛋白质二级结构严格相关的酰胺I的振动变化。

[0184] FTIR测量的结果如图5a所示。从二阶导数分析清楚的看出,SPI水凝胶具有高含量的α-螺旋(1656cm^{-1})和分子间平行β-折叠(1625cm^{-1})二级结构。

[0185] 图5b所示的使用不同溶剂比率制备的SPI水凝胶样品的FTIR测量结果表明,相对于分子间反平行和平行β-折叠(1620cm^{-1})的含量,使用增加量的乙酸导致α-螺旋结构(1654cm^{-1})增加。

[0186] 还研究了不同温度下水凝胶二级结构的变化。SPI水凝胶样品(分散在30%v/v乙

酸中的SPI 100mg/ml)的FTIR测量通过在FTIR样品保持器中在不同温度(90℃、55℃和20℃)温育样品来进行。在图5c中可以清楚地观察到,在90℃加热样品后,分子间平行β-折叠结构的量减少,而将样品冷却至20℃后,平行β-折叠结构的含量大大增加。

[0187] 这通过本发明的热可逆性得以证实,从而将这种有利特性与蛋白质二级结构相关联。

[0188] 实施例2

[0189] 根据以下过程,使用乳酸作为共溶剂来制备水凝胶。

[0190] 将乳酸与去离子水以不同比率(10%v/v、30%v/v、50%v/v、70%v/v和90%v/v)混合。将大豆蛋白分离物以100mg/ml的最终蛋白质浓度添加到DI水/乳酸溶液中。获得不溶性蛋白质的分散体。为了溶解蛋白质,将混合物暴露于超声处理持续30min(高频功率输出=70W,频率=20KHz,振幅=90%)。在此过程期间,将样品温度保持在85℃-90℃。在30min后,获得完全透亮的液体溶液。将样品在室温冷却5min。

[0191] 凝胶电泳

[0192] 使用具有MES缓冲液的NuPAGE 4 -12%凝胶,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)来进行在不同水:乳酸比率(从0到90%v/v)下的不同水解蛋白片段的分析。

[0193] 结果显示在图6中,并且可以看出,乳酸量的增加导致更高程度的蛋白质水解。

[0194] 已经确立了可以使用本发明的方法形成稳定的水凝胶,这样的水凝胶的用途可以在微流体方法中采用以形成离散且均匀的微观物体,如微凝胶和微胶囊。

[0195] 实施例3-微凝胶制作

[0196] 微流体装置(液滴发生器)使用利用阴性母版光刻胶(SU8 3050)的标准软光刻技术来制作。将连续油相(在Fluorinert FC-40中的2%008-含氟表面活性剂)加载到2ml管中,同时将分散的液体SPI相(在40%v/v乙酸中的85mg/ml SPI,保持在85℃)加载到1.5ml管中的,并迅速置于处于85℃的加热块上。为了防止SPI溶液在传输到微流体装置期间胶凝化,使用定制的有机硅加热器(Holroyd Components)(包括1/32”ID不锈钢管道)来维持连接SPI储器和微流体装置中的入口的PTFE管道的温度。硅加热器温度通过定制的温度控制器控制。通过压力驱动体系(Elveflow OB1)将两种溶液泵入标准流动聚焦液滴发生器中来生成~100μm直径的液滴。测试了不同的压力等级,直到实现单分散微液滴群的均匀且连续生成。分散水相的最终压力等级为175毫巴,并且连续油相的最终压力等级为200毫巴。将产生的液滴收集在1ml的移液器吸头中,并在室温下保持12小时以确保胶凝化过程完成。然后所形成的微凝胶通过标准的去乳化程序洗涤:首先从小瓶中取出含有含氟表面活性剂的连续油相。对于500ul的微凝胶,加入等体积的在Fluorinert FC-40中的10% PFO溶液并充分混合30秒。然后除去在FluorinertFC-40中的10% PFO溶液,并通过添加等体积的纯Fluorinert FC-40进行两次后续的油洗涤。最后,将500μl的去离子水加入小瓶中,导致微凝胶从油相转移到水相。将含有微凝胶悬浮液的上清液转移到单独的小瓶中。通过将500μl的已经用HCl调节至pH=2的去离子水添加到微凝胶悬浮液中,接着以1000rpm离心1min来进行后续的一系列洗涤步骤以从微凝胶悬浮液中除去乙酸。除去上清液,并通过加入500μl用HCl调节至pH=2的去离子水来重新悬浮微凝胶。总共进行3个洗涤步骤以从微凝胶悬浮液中除去乙酸。在最后的洗涤步骤之后获得悬浮在去离子水(pH=2)中的力学稳定的微凝

胶。为了制备用于SEM分析的微凝胶样品,在3步骤程序中用100％乙醇洗涤微凝胶:首先将微凝胶悬浮在25％v/v乙醇-水溶液中,并在恒定搅拌(100rpm)下放置3h。在离心并除去上清液后,接着将微凝胶重新悬浮在50％v/v乙醇-水溶液中,并在恒定搅拌(100rpm)下放置3h。最后,在离心并除去上清液后,接着将微凝胶重新悬浮在100％v/v乙醇-水溶液中,并在恒定搅拌(100rpm)下放置12h。

[0197] 此实验的结果如图7所示。图7的a示出了微珠形成的示意图。图7的b示出了悬浮在水溶液(pH＝2)中的稳定微凝胶。图7的c示出了通过超临界点干燥制备的微珠的SEM图像。图7的d示出了在微珠的表面上的凝胶网络的SEM图像。

[0198] 所得的微凝胶在酸性条件下的水溶液中以及在100％乙醇的存在下是稳定的。一旦自组装,蛋白质聚集体在溶液中就是完全不溶的,因此导致微凝胶的稳定性。

[0199] 这些结果证实,简单地通过控制在纳米级的蛋白质聚集体的自组装,并且在完全没有交联剂或任何有害物质的情况下,可以由植物基蛋白质生成力学上坚固的微凝胶。

[0200] 实施例4-核-壳微胶囊制作

[0201] 已经确立了力学上坚固的微凝胶可以产生后,探索水凝胶用于微胶囊化的用途。

[0202] 为了制作同轴流动聚焦微流体装置,依照多步光刻工艺。尽管在Tran,T.M.,Cater,S.&Abate,A.R.Coaxial flow focusing in poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices(聚(二甲基硅氧烷)微流体装置中的同轴流动聚焦),Biomicrofluidics 8,1-7(2014)中解释了光刻工艺,但在下面简要地说明。

[0203] 需要两个SU8光刻胶母版。在第一个母版中,制作25μm光刻胶层用于内通道,接着制作50μm层用于中通道,并且制作75μm层用于外通道。第二个母版含有一个用于介质通道的25μm层和一个用于外通道的50μm层。为了制作最终的同轴流动聚焦装置,从这些母版上剥离两个不同的PDMS片,并且随后对齐并通过等离子体氧化来粘合。在等离子氧化后,将少量喷洒的水滴置于两个PDMS片之间,以允许微流体通道对齐。将最终对齐的PDMS装置在烘箱中在65℃烘烤过夜,以完成两个层之间的粘合。

[0204] 生成核-壳微胶囊的微流体过程等同于实施例3中用于生成微珠的过程。然而,对系统增加一个用于内相(核)的额外入口。为了制作含有亲脂性活性成分的核-壳微胶囊,将450μl的大豆油在550μl SPI蛋白溶液(20mg/ml,30％v/v乙酸)中进行预乳化。通过压力驱动系统(Elveflow OB1),将水包大豆油乳液(内相)、SPI溶液(85mg/ml,40％v/v乙酸,中间相)和FC-40(2％v/v 008-含氟表面活性剂,外相)泵送至同轴流动聚焦微流体装置。测试不同的压力等级,直到实现具有～120μm直径(压力内相(100毫巴)、压力中间相(150毫巴)和压力外相(100毫巴))的单分散核-壳微胶囊群的均匀且连续生成。核-壳比率可以通过简单地控制内相和中间相之间的相对压力来调节。如前一节所述的,收集微胶囊并且随后进行洗涤。

[0205] 可以看出,在此实施例中将内核材料与壳材料保持分开,这与标准微囊化基质方法(其中活性成分预先与基质材料混合)不同。这种方法的原因是由于最初存在大量的乙酸而导致起始蛋白质溶液的pH非常低,并且还需要高温来保持蛋白质溶液处于液态。相反,使用3-D同轴微流体装置,其允许在没有损害封装成分的稳定性的情况下容易生产核-壳结构。

[0206] 图8a示出了微流体液滴发生器的示意图,其示出了一种3D流动聚焦微流体装置。

根据本发明生产的含有悬浮在水溶液中的亲脂性核的核-壳微胶囊在图8b中示出。微胶囊壳仅包含自组装的SPI蛋白并且核是水包油型微乳液(亲脂性)。

[0207] 实施例5-封装活性剂的核-壳微胶囊制作

[0208] 重复实施例4中描述的微流体过程以产生包含亲水性核的微胶囊。核包含含有可溶性活性成分(核黄素)的悬浮液的1％(w/w)HMP果胶溶液。

[0209] 根据本发明制备的含有悬浮在水溶液中的亲水性核的核-壳微胶囊如图9所示。微胶囊壳仅包含自组装的SPI蛋白并且核是活性剂(在这种情况下为核黄素)的亲水性悬浮液。

[0210] 实施例6-控释微胶囊

[0211] 由于蛋白质壳仅由蛋白质聚集体组成,所以进行了一项实验以经由两阶段体外消化率测试来证实:在消化酶的存在下,可以通过蛋白质外壳的降解触发负荷的释放。

[0212] 通过将0.257g KCl、0.061g KH2PO4、1.05g NaHCO3、1.38g NaCl、0.122g MgCl2(H2O)6和0.024g(NH4)2CO3溶解在1l的去离子水中来制备SGF(模拟胃液)电解质溶液的1L储液。通过将0.253g KCl、0.054gKH2PO4、3.57g NaHCO3、1.12g NaCl、0.335g MgCl2(H2O)6、0.44gCaCl2·2H2O和0.23g的胆汁提取物溶解在1l的去离子水中来制备SIF(模拟肠液)电解质溶液的1L储液。通过将8mg的胃蛋白酶溶解在SGF电解质溶液中来制备1ml的SGF,并且通过加入少量1M HCl将pH调节至pH＝2。

[0213] 通过使用实施例4中描述的方法(加入150μl处于pH＝2的去离子水),从油相中洗涤50μl根据实施例4制备的核-壳微胶囊。然后,将200μl SGF与微胶囊悬浮液混合,接着在Thermo Shaker中在37℃和300rpm温育60min。对于模拟肠阶段,将3mg的胰酶溶解在1ml的SIF电解质溶液中。将400μl的SIF添加到在SGF溶液中的先前微胶囊中。通过加入少量1MNaOH将pH调节至7。然后将微胶囊在37℃温育120min。

[0214] 实验的结果如图10a-图10c所示,其中图10a示出了在水溶液中的微胶囊;图10b示出了在SGF中60分钟后微胶囊仍然完整;并且图10c示出了在SIF中120分钟后微胶囊的释放。

[0215] 该实验证实,在SGF条件(8mg/ml胃蛋白酶,pH＝2)下温育触发了蛋白质壳的缓慢降解,同时没有损害保留在微胶囊内的亲脂性核的稳定性。随后在SIF(1.5mg/ml胰酶,pH＝7)中的温育导致蛋白质外壳的显著降解以及亲脂性核的完全释放。在没有酶但在相同pH条件下的对照实验表明,蛋白质壳降解主要由酶消化触发。

[0216] 因此可以看出,微胶囊在模拟胃条件下保持完整,但在模拟肠条件下迅速崩解,这证实根据本发明的微胶囊可以用于营养或药物活性成分的受控递送。

[0217] 实施例7-包含活性剂的控释微胶囊

[0218] 重复实施例6的实验,但使用根据实施例5制备的包含含有活性剂核黄素的亲水性核的微胶囊。

[0219] 图11a示出了核黄素微胶囊(即,具有亲水性核(1％ HMP果胶+核黄素)的微胶囊)。图11b示出了两阶段体外消化率研究的结果,接着HPLC分析显示核黄素在模拟条件下的累积释放。可以看出,通过将亲水性活性成分封装在植物基蛋白质微胶囊壳内能够实现在模拟的胃和肠条件下核黄素的控制释放。封装显示出防止核黄素的快速扩散并促进受控释放。

[0220] 实施例8-微型海绵的制备

[0221] 根据本发明制备大豆蛋白微型海绵。重复实施例2中描述的微流体过程以产生大豆蛋白微凝胶(直径为100μm)。将微凝胶用100％乙醇在3步程序中洗涤:首先将微凝胶悬浮在25％v/v乙醇-水溶液中,并在恒定搅拌(100rpm)下放置1h。在离心并除去上清液后,将微凝胶重新悬浮在50％v/v乙醇-水溶液中,并在恒定搅拌(100rpm)下放置1h。最后,在离心并除去上清液后,将微凝胶重新悬浮在100％v/v乙醇-水溶液中,并在恒定搅拌(100rpm)下放置1h。此时,乙醇应该已经完全置换了微凝胶多孔网络中的水。将微凝胶悬浮液离心(1000rpm,1min)并除去乙醇上清液。然后,将250μl天竺葵油(Natural)添加到微凝胶中。通过轻轻摇动Eppendorf小瓶来将微凝胶悬浮在油溶液中。在这个阶段,将乙醇混溶的油相渗透微凝胶多孔网络。在向油-微凝胶悬浮液中加入500μl的去离子水后,接着将加载油的SPI微型海绵转移到水相中。从Eppendorf管中除去剩余的油相。

[0222] 图12a示出了加载香料油的植物基蛋白质微型海绵的分布。图12b示出了在更高放大率(20x)下的加载单一香料的植物基蛋白质微型海绵,其中可以很容易地观察到蛋白质微凝胶壳。

[0223] 通过使用这种方法,可以将与水不混溶的溶剂加载到植物基蛋白质微型海绵中,如香料油。这种方法能够在无需使用复杂的微胶囊生成方法(如核-壳结构)的情况下实现高加载效率。

[0224] 实施例9-膜的制备

[0225] 根据本发明制备大豆蛋白膜。将500mg大豆蛋白分离物)溶解在5mL的30％(v/v)乙酸中(100mg/ml蛋白质浓度)。然后将溶液暴露于超声处理(高频功率输出＝70W,频率＝20KHz,振幅＝90％)持续30min。在超声处理完成前几分钟,将125mg的甘油加入到SPI溶液中,并混合超声处理步骤的剩余时间。在超声处理步骤之后,立即将溶液流延到玻璃培养皿中以形成水凝胶(2mm厚度)。将玻璃培养皿加热到大约100℃以避免在流延过程期间发生任何胶凝化。然后将玻璃皿从加热板上取下并空气干燥过夜。在干燥后,将薄膜从玻璃培养皿移除并储存在50％湿度室中直至进一步使用。玻璃培养皿的底面涂有特氟龙片,使得膜能够易于剥离。

[0226] 根据实施例9的方法连同所得膜的示意图示于图13中。可以看出,产生了力学坚固的透明薄膜。

[0227] 拉伸性能

[0228] 作为添加的增塑剂的量的函数,测试了实施例9中产生的薄膜的拉伸性能。使用10％、20％、30％、40％和50％(w/w)的甘油来制造膜。

[0229] 使用具有10N载荷传感器的Tinius Olson 5kN来测试膜的拉伸性能。将膜切割成5mm宽的片,并且膜的两端用间隙长度为1mm的纸保持器粘合。将保持器和膜安装到机械试验机上,然后在测量前切割纸折叠物,以确保负载仅施加到膜上。以2mm/min的速度进行测量。使用数字卡尺来测量单个样品的膜厚度。典型的膜厚度为30-50um。

[0230] 本发明的膜的应力-应变曲线显示在图14a中。膜的杨氏模量在图14b示出,其中可以看出增加增塑剂的量降低膜的杨氏模量。断裂伸长率百分比在图14c中示出,其中最大伸长率显示在30％增塑剂处。

[0231] 通过这种方法获得的膜的机械性能优于先前报道的由商业大豆蛋白制成的膜的

机械性能。这是由于蛋白质分子的高度分子间相互作用和随后的自组装,这与在通过将单体大豆蛋白流延在高浓度离液剂(即8M脲)中生产的大豆蛋白膜中通常存在的弱分子间相互作用相反。

[0232] FTIR

[0233] 为了研究膜中的二级结构和分子间相互作用,对在没有添加甘油的情况下制备的SPI薄膜进行FTIR分析。

[0234] 使用在4cm-1分辨率的128次扫描以及背景扣除来收集数据。对于蛋白质的结构分析,光谱用二阶和七点窗口Savitzky-Golay滤波器平滑化并归一化。在酰胺I波带(1600-1700cm-1)中的二阶导数由平滑化数据计算,以解卷积和量化二级和四级结构贡献。

[0235] 生成的膜的FT-IR分析表明,与起始大豆蛋白分离物相比,膜中存在更高量的分子间β-折叠结构(65%)(图15)。

[0236] 透射电子显微镜(TEM)分析

[0237] 进行TEM分析以研究膜中存在的蛋白质自组装结构的形态。对于透射电子显微镜(TEM)成像,将用于如实施例9中详述的膜形成的SPI样品稀释至0.02%浓度并沉积在TEM网格(C400Cu,EM分辨率)上,用乙酸铀酰染色。图16示出了大量β-折叠晶体的存在,这与通过FTIR确定的高量的分子间β-折叠结构有关。

[0238] 以前从未在植物蛋白材料的情况下观察到β-折叠晶体。这样的晶体与已知具有增强的机械性能(包括强度)的丝材料有相似之处。不希望受理论束缚,据信所述β-折叠晶体是由于通过本发明描述的方法形成所致。与现有技术中描述的植物基凝胶相反,这样的β-折叠晶体可以有助于在本发明的植物基材料的情况下所观察到的增强的机械性能。β-折叠晶体数据与FTIR一起明确地表明:根据本发明制备的材料具有高度的分子间相互作用,这使得它们能够具有以前对于植物材料没有报道过的特性(例如膜的拉伸强度)。

[0239] 因此,本发明所得的植物基材料不同于已知的植物基凝胶,并且这些差异导致显著改善的性能。

[0240] 实施例10-微米结构和纳米结构图案化

[0241] 根据以下过程对根据实施例9制备的膜进行微图案化。

[0242] 为了在蛋白质膜上对微米结构如微柱进行图案化,使用SU-8 3025作为光刻胶,通过标准光刻技术在硅晶圆上制作20μm×20μm的微柱阵列的阴性图案。将聚二甲基硅氧烷弹性体和固化剂(Sylgard 184,Dow Corning)按10:1比率的混合物倒在晶圆上并在65℃下固化1小时。从晶圆上剥离固化的PDMS并用作大豆蛋白质膜的阴性图案。将如实施例9中制备的大豆蛋白溶液流延到PDMS上并干燥过夜。从PDMS母版上剥离SPI薄膜,并使用具有10nm铂涂层的扫描电子显微镜(SEM)(MIRA 3FEG-SEM,TESCAN)观察所得的微图案化结构。使用FTA1000B,First Ten Angstroms来测量膜的接触角。

[0243] 通过简单地将超声处理的大豆蛋白溶液流延到微图案化基底上,可以在膜表面上制作均匀的微柱阵列。微图案化薄膜的接触角为99°,其明显高于具有未微图案化表面的对照膜样品(图17a)。这清楚地表明,通过简单地在植物基蛋白质膜的表面上对微柱(如荷叶上天然存在的那些)进行图案化,可以大大地增强疏水性表面特性。

[0244] 为了生成具有光子特性的纳米结构化蛋白质膜,使用DVD光盘作为模具基底。首先,小心地从DVD光盘上除去外塑料层,并使用剩余的中间层。将PDMS倒在DVD基底上并在65

℃固化1小时。从DVD基底上剥离图案化的PDMS,并且将如实施例9中制备的成膜大豆蛋白溶液流延在PDMS基底上并在室温下干燥过夜。从PDMS母版上剥离SPI薄膜,并使用具有10nm铂涂层的扫描电子显微镜(SEM)(MIRA 3FEG-SEM,TESCAN)观察所得的纳图案化结构。通过肉眼可以很容易地观察到膜的光子特性(米氏散射)(图17b)。

[0245] 实施例11-涂层的制备

[0246] 为了测试植物基蛋白质膜的涂层特性,在没有增塑剂存在的情况下,将一小块纸板(2×2cm)浸入如实施例9中制备的成膜SPI溶液中。在将纸板浸入成膜溶液中约5秒后,将纸板从溶液中取出并在室温风干过夜。在完全干燥后,将蛋白质涂覆的纸板浸入10mL的去离子水中以测量纸板的吸水量。通过测量纸板在以不同时间间隔浸入去离子水中时的重量增加来计算吸水量。

[0247] 作为对照样品,测试未涂覆的纸板片和大豆蛋白单体涂覆的纸板(通过将纸板浸入在碱性条件(pH=9)下制备的大豆蛋白溶液中制备)。在将纸板样品浸泡在水中之前,利用测得的初始重量将吸水量归一化。

[0248] 如在图18中观察到的,未涂覆的纸板对照样品在水中浸泡10秒后表现出非常高的吸水量。与未涂覆的对照样品或用在碱性条件下制备的大豆蛋白溶液涂覆的纸板样品(这些也表现出非常低的耐水性)相比,SPI涂覆的纸板的吸水量减少了几乎50%。这些结果突出表明:由具有高度分子间相互作用的蛋白质组装的植物基蛋白质膜产生的涂层表现出增强的阻水性能。

[0249] 实施例12-硬胶囊制造

[0250] 根据本发明制造大豆蛋白硬胶囊。首先通过将5g的SPI溶解到50ml的含有乙酸(40%v/v)的水溶液中来制备100mg/ml SPI溶液。将蛋白质分散体在95℃加热30min,接着暴露于超声处理重新5min(高频功率输出=70W,频率=20KHz,振幅=90%)。将溶液保持在85℃以防止胶凝化。将2ml Eppendorf管浸入加热的溶液中,然后在液体溶液中保持5秒,并且随后取出。在2ml Eppendorf管从液体SPI溶液中取出后的几秒钟内在其外表面周围形成SPI水凝胶的薄层(图19a)。然后将小瓶置于在45℃的烘箱中持续一小时,以确保水凝胶层内的水/乙酸溶剂级分蒸发,从而生成3-维薄膜。在溶剂蒸发后,从Eppendorf管上取下硬胶囊(图19b)。

[0251] 这是第一个显示由植物基蛋白质生产的硬胶囊的形成的实施例。只有这些植物基材料的热可逆特性,这个过程才是有可能的,其使得能够在基底上形成薄的3-维水凝胶。

[0252] 实施例13-豌豆和马铃薯蛋白材料

[0253] 通过使用豌豆蛋白分离物(80%)和马铃薯蛋白分离物作为起始材料,按照实施例1、实施例3和实施例9中描述的程序来生产蛋白质水凝胶、微凝胶和膜。

[0254] 图20的a示出了在小瓶倒置后可观察到的半透明且自立的豌豆蛋白水凝胶。

[0255] 如图21所示的,利用马铃薯蛋白也观察到了与本文所述类似的特性,该图示出了由在30%(v/v)乙酸水溶液中的100mg/ml马铃薯蛋白分离物制备的马铃薯蛋白水凝胶。

[0256] 实施例13表明本发明的方法适用于一系列植物基蛋白质源的多样性。

[0257] 实施例14-应力应变膜分析

[0258] 图22a-图22b中示出了本发明的膜的应力-应变曲线。图22a示出了根据本发明制备的膜的应力-应变曲线。自组装样品(蓝色)的应变-应力曲线对应于在30%甘油(w/w,相

对于干蛋白质重量)的存在下由30％(v/v)乙酸水溶液制备的SPI膜。未结构化样品(红色)的应变-应力曲线对应于在30％甘油(w/w,相对于干蛋白质重量)的存在下使用NaOH调节至pH＝10的碱性水溶液中制备的SPI膜。

[0259] 图22b示出了在不同量的甘油作为增塑剂(20％至40％w/w,相对于干蛋白质重量)的存在下由30％(v/v)乙酸水溶液制备的SPI膜的应变-应力曲线)。

[0260] 在30％(w/w)甘油下制备的自组装SPI膜表现出高的拉伸强度(15.6±2.07MPa)和杨氏模量(209±39.1MPa)。

[0261] 可以看出,改变甘油的量能够实现对水凝胶的机械性能的调整。例如,当甘油的浓度从20-40％(w/w)变化时,机械性能的杨氏模量从483±58.4MPa变为92.7±25.3MPa,并且拉伸强度从25.0±3.49MPa变为6.18±0.98MPa。发现使用30％(w/w)甘油的自组装膜的拉伸强度和杨氏模量高于使用30％(w/w)甘油的未结构化膜的值(杨氏模量和拉伸强度分别为131±22.6MPa和9.30±1.53MPa)。

[0262] 实施例14中的样品制备如下:

[0263] 将500mg的SPI分散在5mL的30％(v/v)乙酸水溶液中并充分摇动,直至获得混浊且高度粘稠的分散体。然后使用超声波匀化器(Bandelin,HD4200)以25％的功率(脉冲持续时间为接通时间0.7秒和断开时间0.3秒)对其进行超声处理30分钟。在超声处理后,添加不同浓度(20、30或40w/w％)的甘油(≥99.5％,Sigma-Aldrich)作为增塑剂,并将溶液再超声处理1分钟。将热的液体溶液立即流延到在90℃预热的7cm玻璃培养皿上。然后将流延溶液在室温(19-22℃)和环境湿度(典型地为50-70％)下干燥3天。然后将干燥的膜从模具取出并储存在湿度受控室(50％)中直至进一步使用。

[0264] 作为对照实验,还在碱性水溶液中制备膜,其中在pH＝10(用NaOH调节)的水溶液中制备100mg/ml SPI分散体,并在95℃加热30分钟而不进行超声处理(称为未结构化SPI)。然后加入30％(w/w)甘油,将热的液体溶液流延到玻璃培养皿上并干燥3天。

[0265] 实施例15-乙酸与HCl与NaOH的比较

[0266] 进行对比实验以评价根据本发明利用乙酸制备的水凝胶与使用HCl或NaOH的方法(不经历溶胶-凝胶转变)之间的差异。结果在图23示出。

[0267] 图23示出了在高温下通过超声处理在不同水溶液中制备的100mg/ml SPI分散体的光学图像。(a)在30％(v/v)乙酸水溶液(左)、使用HCl调节至pH＝2的酸性水溶液(中)和在30分钟超声处理后使用NaOH调节至pH＝10的碱性水溶液(右)中的SPI分散体。(b)将玻璃瓶倒置显示出仅对于在30％(v/v)乙酸中制备的SPI溶液观察到胶凝化。HCl和NaOH小瓶显示没有发生溶胶-凝胶转变。

[0268] 总之,本发明提供了如本文所述的溶剂体系,其能够实现在高温和高剪切下破坏分子间相互作用的方法。这允许在温度变化时选择性促进分子间相互作用的形成。这样的方法允许将材料模制成不同的形状。这迄今为止对于植物来源的材料还不是可能的。

[0269] 因此,本发明可以涉及一种模制植物来源材料的方法,其包括如本文所描述的方法。

[0270] 另外,本发明创建了自组装材料的蛋白质二级结构,其具有更高量的分子间β-折叠结构(与蛋白质起始材料相比)。在现有的植物来源材料中还没有看到这样的新型材料。这种新型的二级结构赋予了材料独特的特性,如更高的拉伸膜强度。

[0271] 毫无疑问,技术人员会想到许多其他有效的替代方案。应当理解,本发明不限于所描述的实施方案,并且涵盖对本领域技术人员显而易见的且落在本发明的精神和范围内的改变。

[0272] 参考文献

[0273] 1.Ahnert,S.E.,Marsh,J.A.,Hernández,H.,Robinson,C.V.&Teichmann,S.A.Principles of assembly reveal a periodic table of protein complexes(组装的原理揭示蛋白质复合物的周期表).Science(80-.).350,(2015)。

[0274] 2.Mezzenga,R.&Fischer,P.The self-assembly,aggregation and phase transitions of food protein systems in one,two and three dimensions(食物蛋白质体系在一维、二维和三维中的自组装、聚集和相变).Reports Prog.Phys.76,(2013)。

[0275] 3.Knowles,T.P.J.&Mezzenga,R.Amyloid Fibrils as Building Blocks for Natural and Artificial Functional Materials(作为用于天然和人工功能材料的结构单元的淀粉样原纤维).Adv.Mater.6546-6561(2016).doi:10.1002/adma.201505961

[0276] 4.Shimanovich,U.等人Protein Microgels from Amyloid Fibril Networks(来自淀粉样原纤维网络的蛋白质微凝胶).ACS Nano 9,43-51(2014)。

[0277] 5.Zhou,X.M.等人Enzymatically Active Microgels from Self-Assembling Protein Nanofibrils for Microflow Chemistry(来自用于微流化学的自组装蛋白质纳米原纤维的酶活性微凝胶).ACS Nano 9,5772-5781(2015)。

[0278] 6.Shen,Y.等人Amyloid fibril systems reduce,stabilize and deliver bioavailable nanosized iron(淀粉样原纤维体系减少、稳定和递送生物可利用的纳米尺寸铁).Nat.Nanotechnol.12,642-647(2017)。

[0279] 7.Nyström,G.,Fong,W.K.&Mezzenga,R.Ice-Templated and Cross-Linked Amyloid Fibril Aerogel Scaffolds for Cell Growth(用于细胞生长的冰模板化和交联的淀粉样原纤维气凝胶支架).Biomacromolecules 18,2858-2865(2017)。

[0280] 8.Amagliani,L.&Schmitt,C.Globular plant protein aggregates for stabilization of food foams and emulsions(用于食品泡沫和乳液稳定化的球形植物蛋白聚集体).Trends Food Sci.Technol.67,248-259(2017)。

[0281] 9.Munialo,C.D.,Martin,A.H.,Van Der Linden,E.&De Jongh,H.H.J.Fibril formation from pea protein and subsequent gel formation(自豌豆蛋白的原纤维形成和随后的凝胶形成).J.Agric.Food Chem.62,2418-2427(2014)。

[0282] 10.Munialo,C.D.,van der Linden,E.&de Jongh,H.H.J.The ability to store energy in pea protein gels is set by network dimensions smaller than50nm(在豌豆蛋白凝胶中储存能量的能力由小于50nm的网络尺寸设定).Food Res.Int.64,482-491(2014)。

[0283] 11.Lee,K.H.,Ryu,H.S.&Rhee,K.C.Protein solubility characteristics of commercial soy protein products(商业大豆蛋白产品的蛋白质溶解度特性).JAOCS,J.Am.Oil Chem.Soc.80,85-90(2003)。

[0284] 12.Lee,H.等人Soy protein nano-aggregates with improved functional properties prepared by sequential pH treatment and ultrasonication(通过依次pH

处理和超声处理制备的具有改进功能特性的大豆蛋白纳米聚集体).Food Hydrocoll.55,200-209(2016)。

[0285] 13.Jiang,S.等人Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments(通过pH转移和超声联合处理来改变豌豆蛋白的理化性质).Ultrason.Sonochem.38,835-842(2017)。

[0286] 14.Mason,T.O.等人Expanding the solvent chemical space for self-assembly of dipeptide nanostructures(扩展用于二肽纳米结构的自组装的溶剂化学空间).ACS Nano 8,1243-1253(2014).

[0287] 15.Li,Y.等人Understanding the dissolution ofα-zein in aqueous ethanol and acetic acid solutions(了解α-玉米醇溶蛋白在乙醇和乙酸水溶液中的溶解).J.Phys.Chem.B 116,12057-12064(2012)。

[0288] 16.Akkermans,C.等人Micrometer-sized fibrillar protein aggregates from soy glycinin and soy protein isolate(来自大豆球蛋白和大豆蛋白分离物的微米尺寸纤维状蛋白质聚集体).J.Agric.Food Chem.55,9877-9882(2007)。

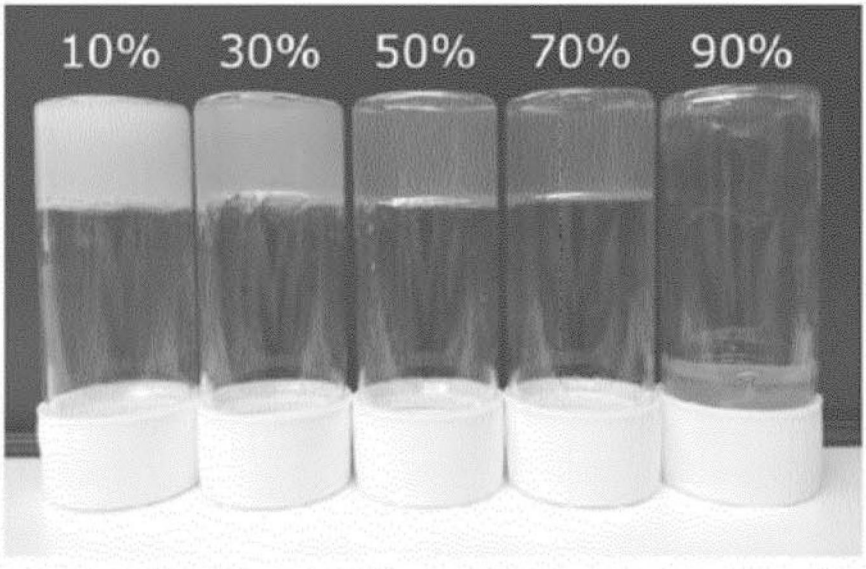


图1

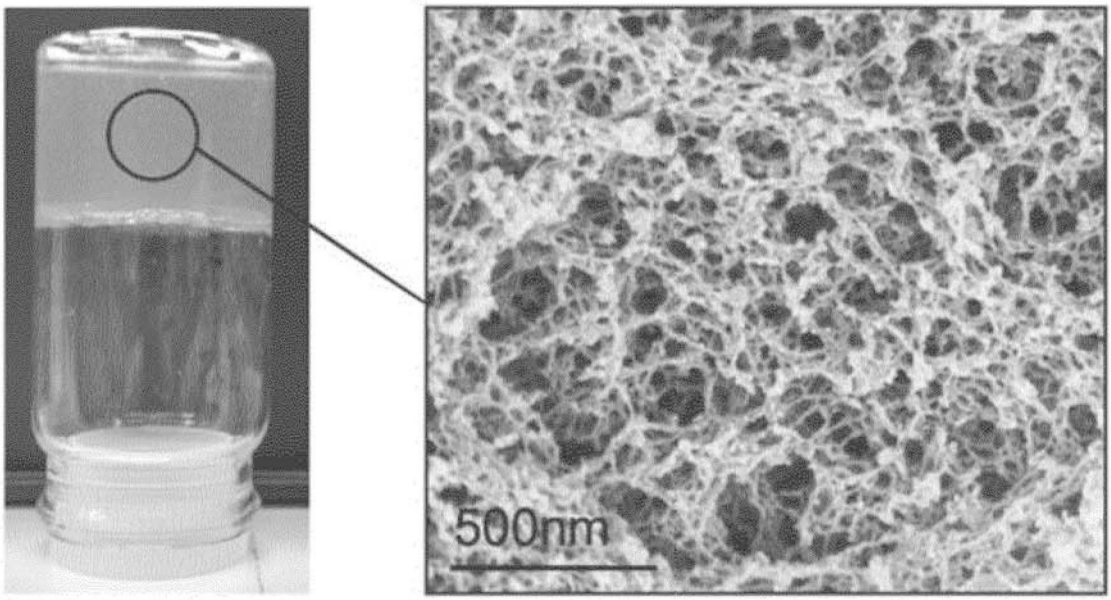


图2

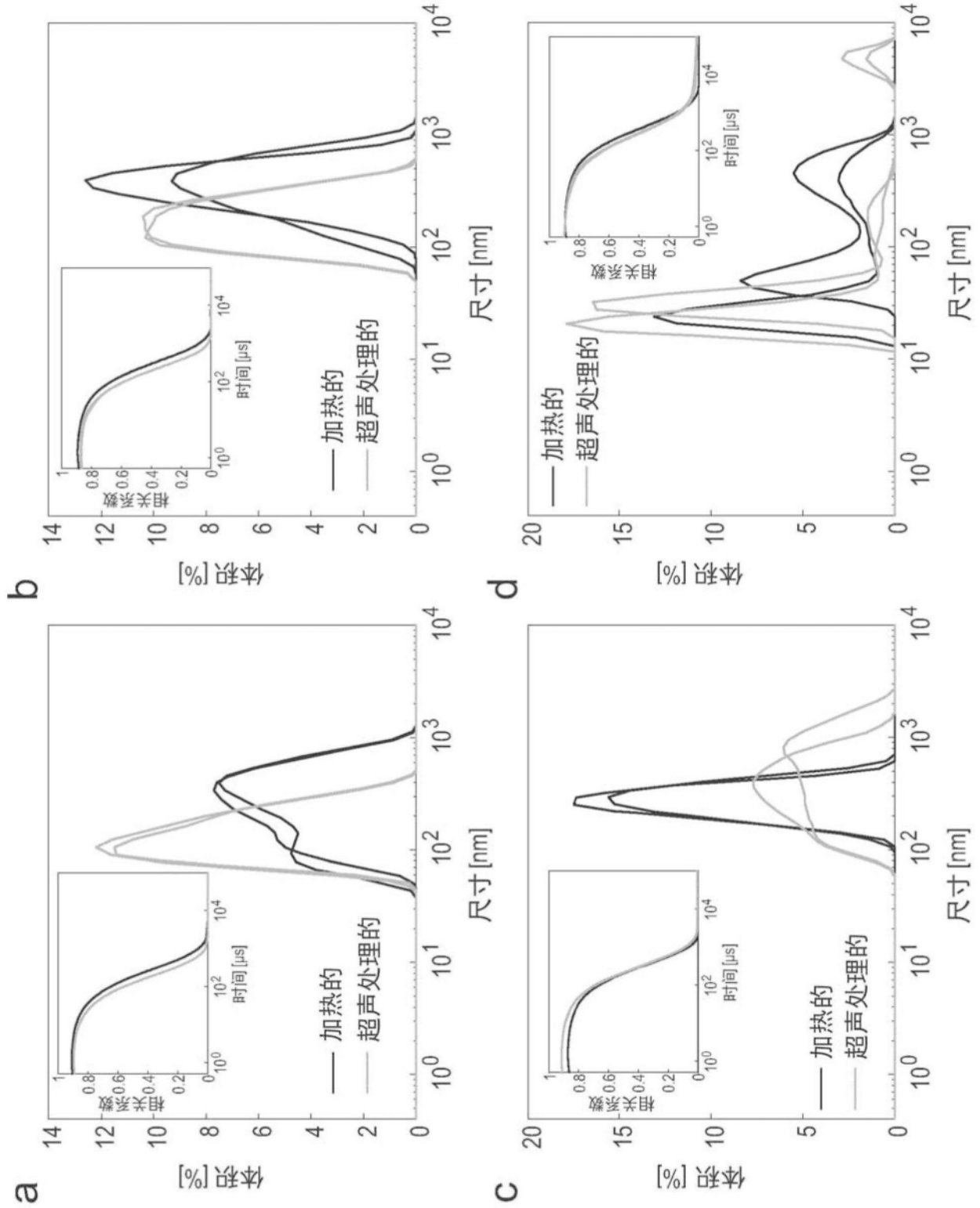


图3

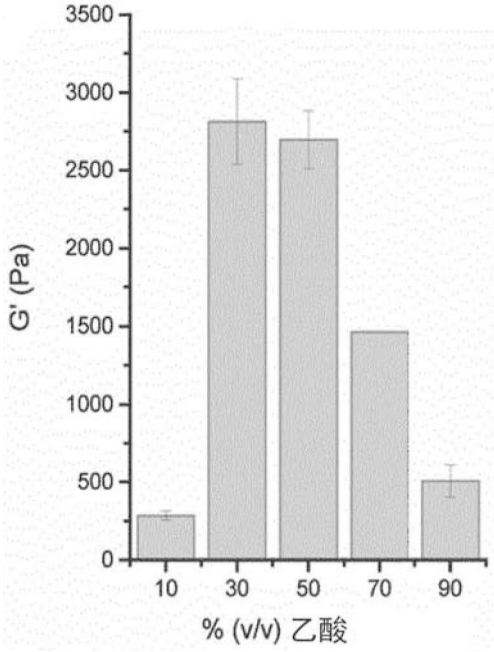


图4a

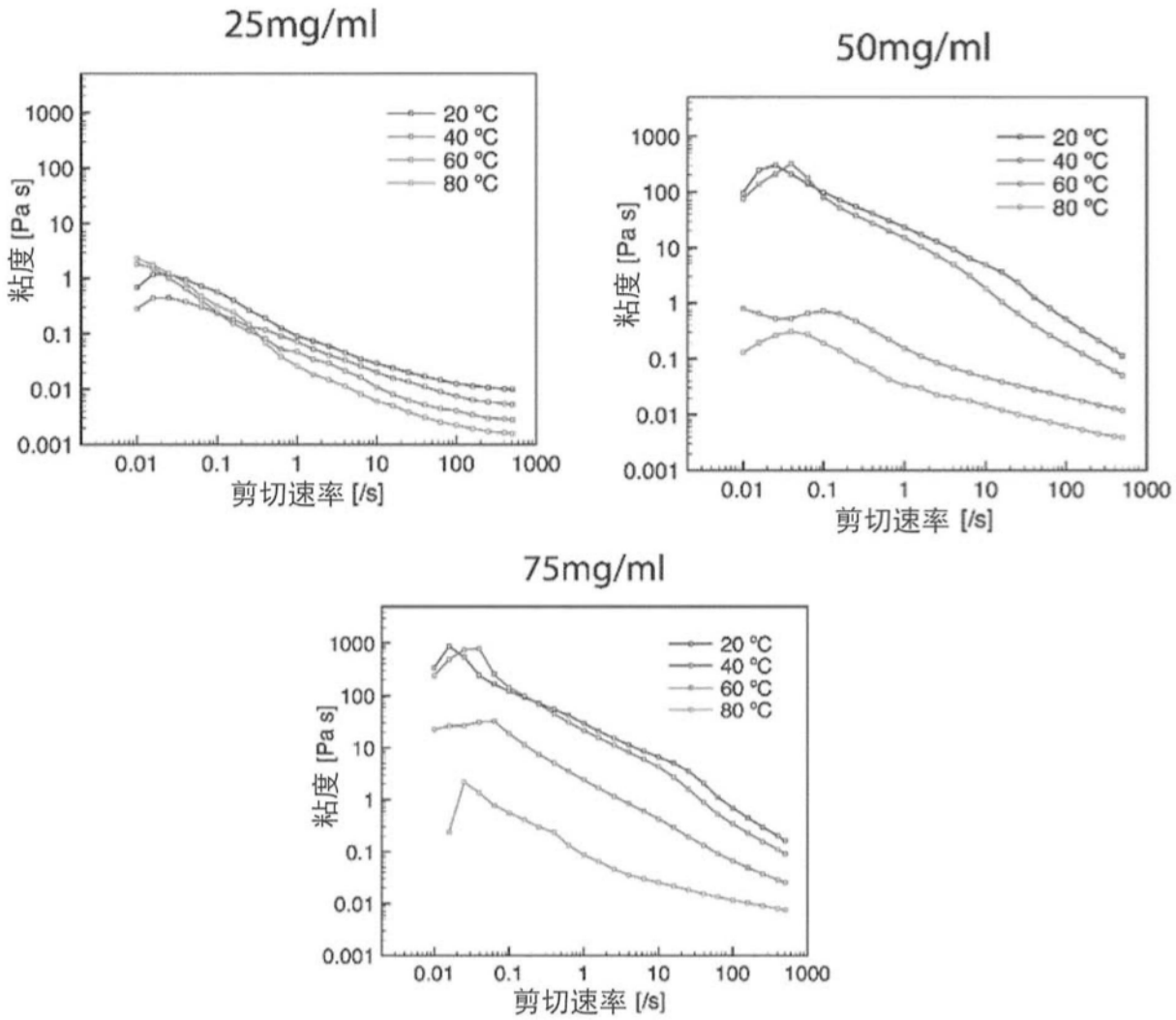

25mg/ml
50mg/ml
75mg/ml
粘度 [Pa s]
剪切速率 [/s]
20 ℃
40 ℃
60 ℃
80 ℃
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000

图4b

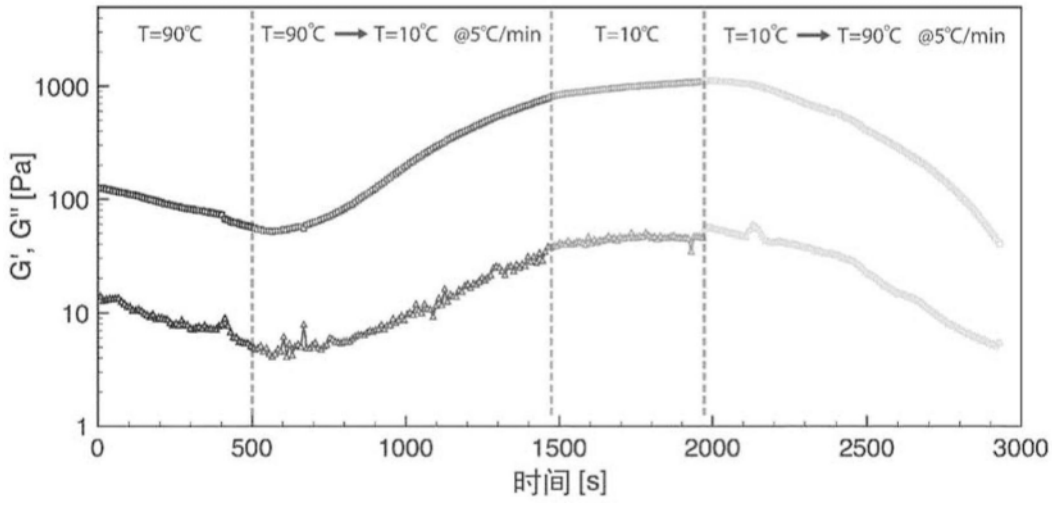

T=90℃
T=90℃ → T=10℃ @5℃/min
T=10℃
T=10℃ → T=90℃ @5℃/min
G', G'' [Pa]
时间 [s]
1
10
100
1000
0
500
1000
1500
2000
2500
3000

图4c

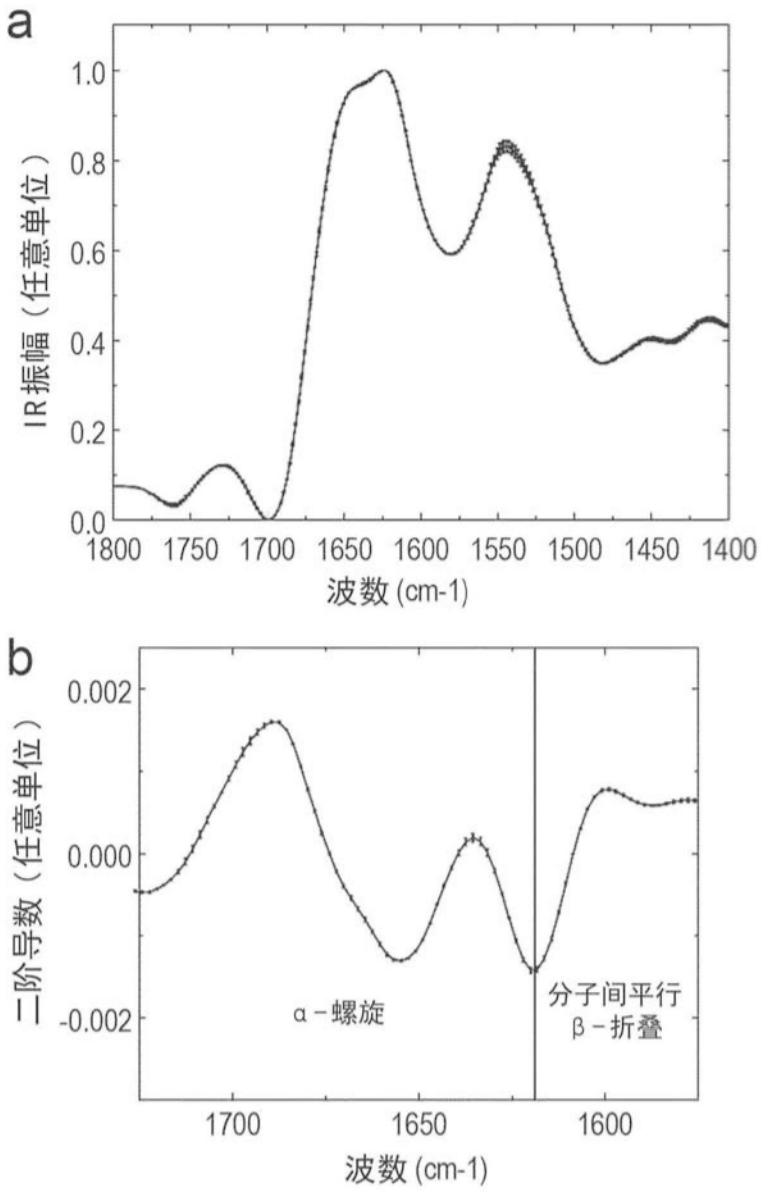

a
IR振幅（任意单位）
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1800 1750 1700 1650 1600 1550 1500 1450 1400
波数 (cm-1)
b
二阶导数（任意单位）
0.002
0.000
-0.002
α－螺旋
分子间平行
β－折叠
1700 1650 1600
波数 (cm-1)

图5a

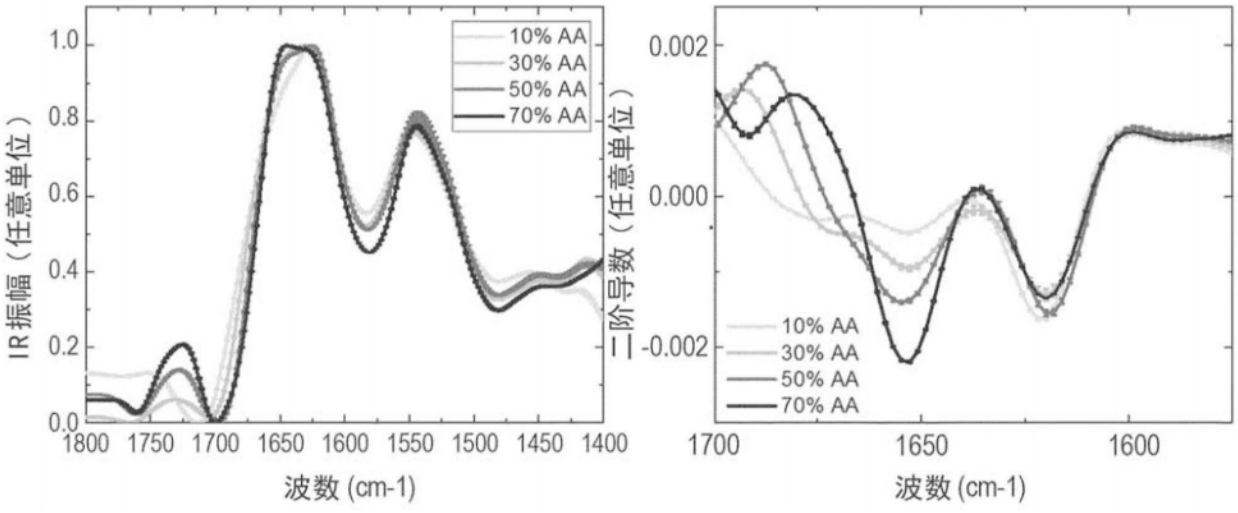

10% AA
30% AA
50% AA
70% AA
IR振幅（任意单位）
波数 (cm-1)
二阶导数（任意单位）
波数 (cm-1)

图5b

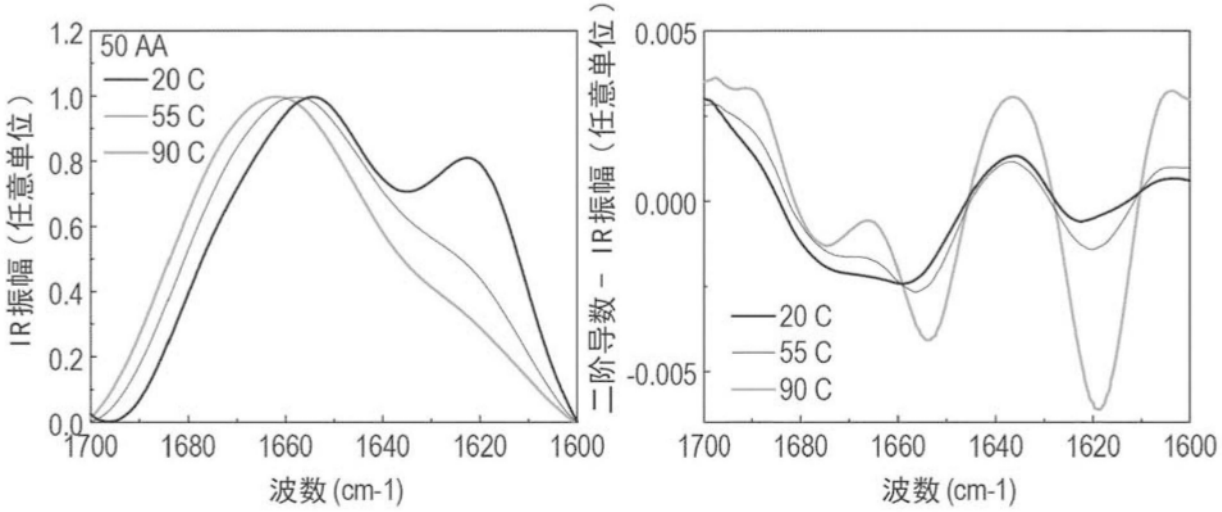

50 AA
20 C
55 C
90 C
IR振幅（任意单位）
波数 (cm-1)
二阶导数 - IR振幅（任意单位）
波数 (cm-1)

图5c

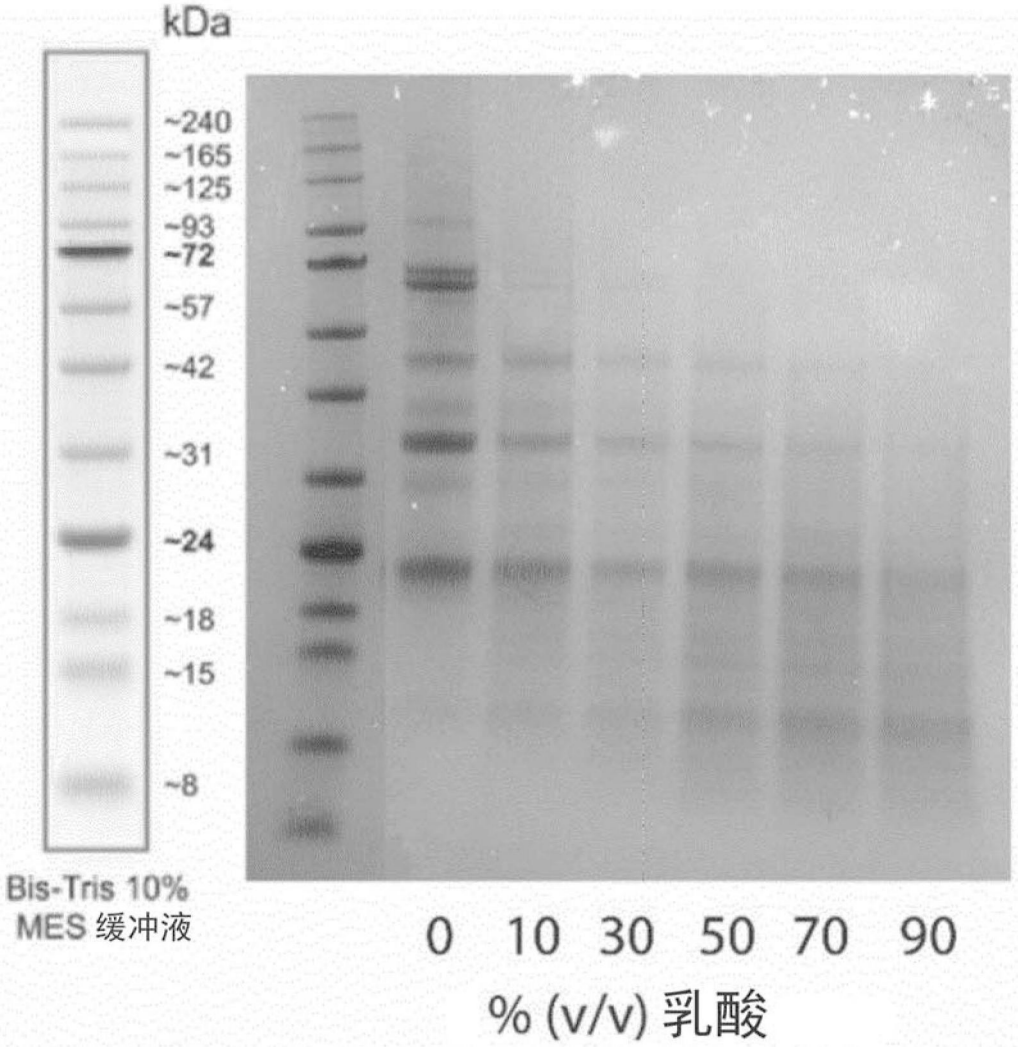

kDa
~240
~165
~125
~93
~72
~57
~42
~31
~24
~18
~15
~8
Bis-Tris 10%
MES 缓冲液
0 10 30 50 70 90
% (v/v) 乳酸

图6

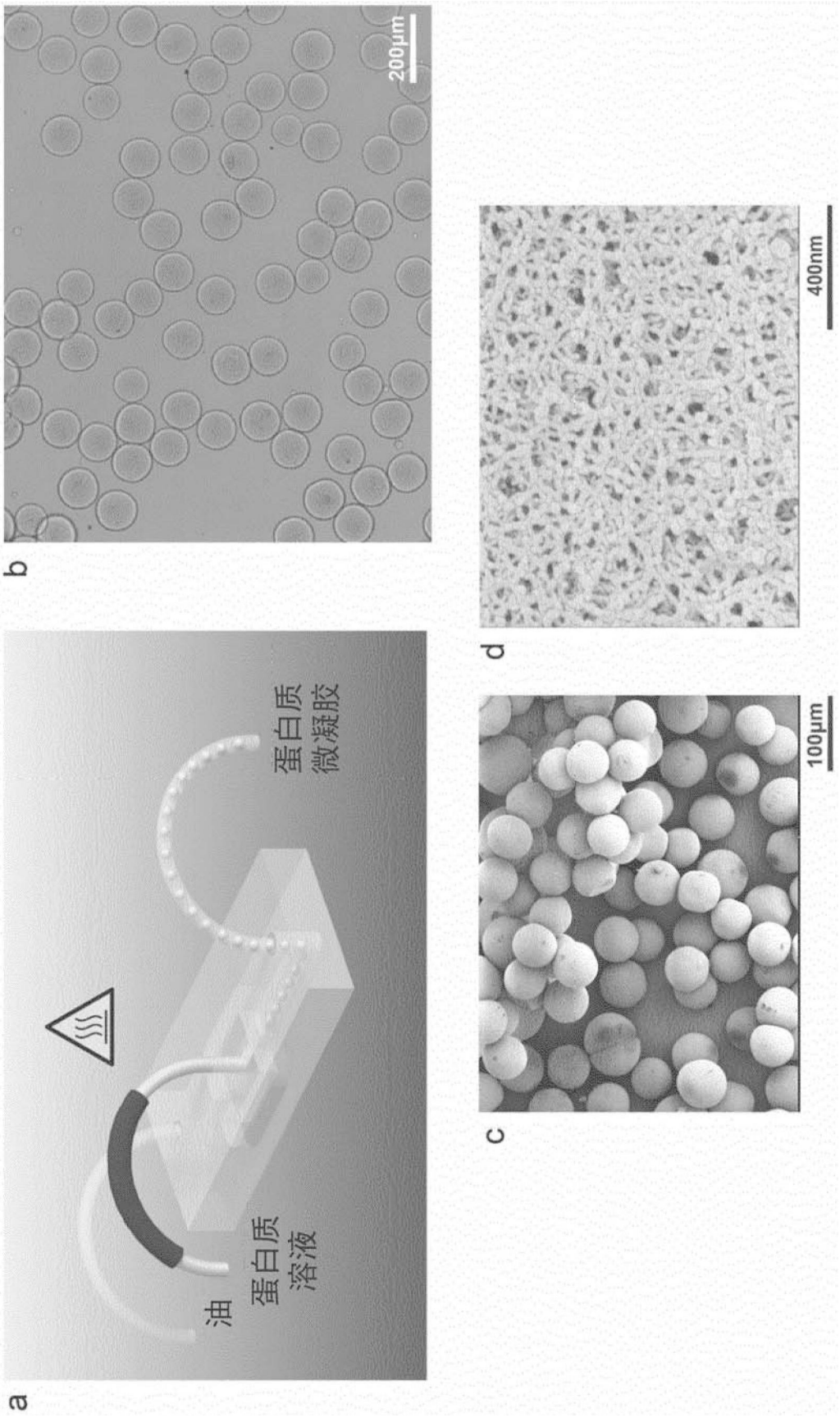


图7

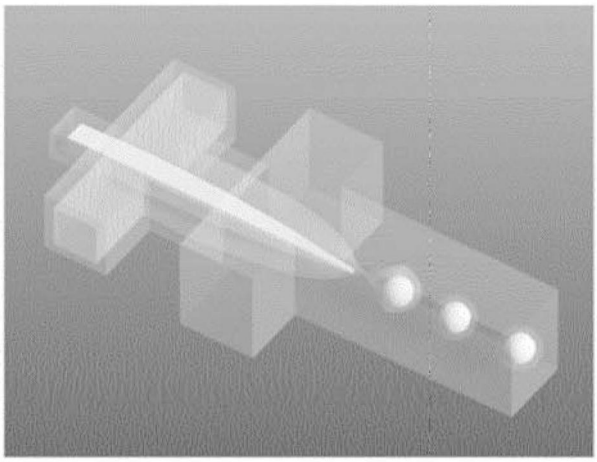


图8a

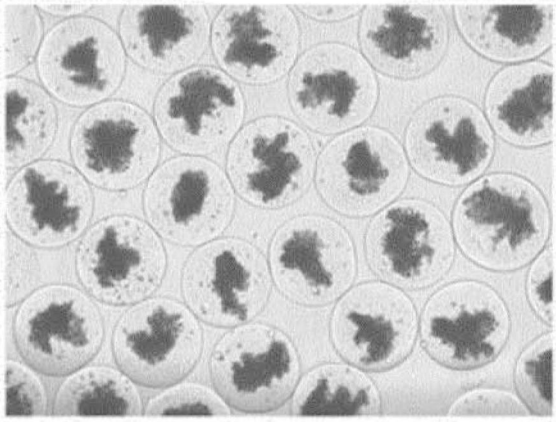


图8b

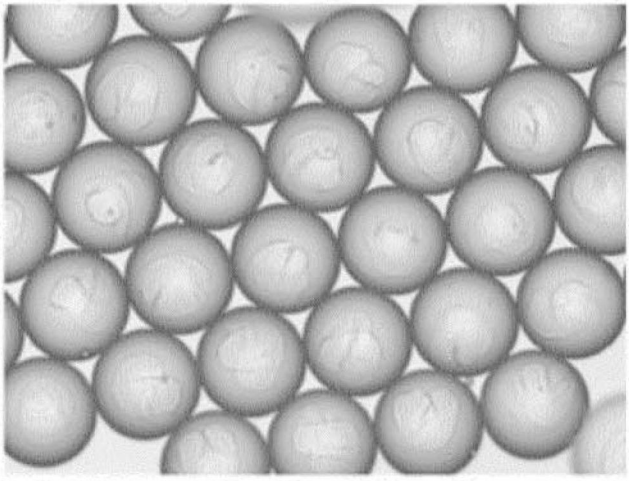


图9

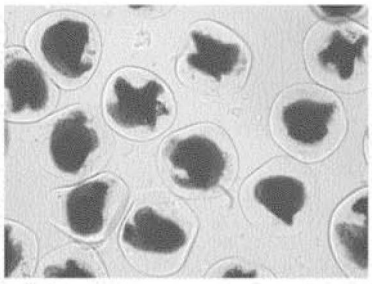


图10a

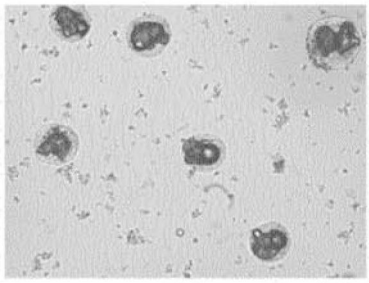


图10b

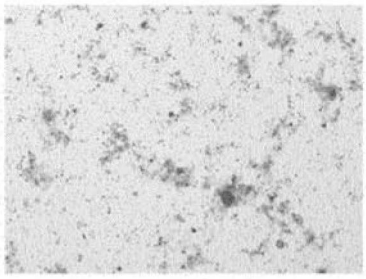


图10c

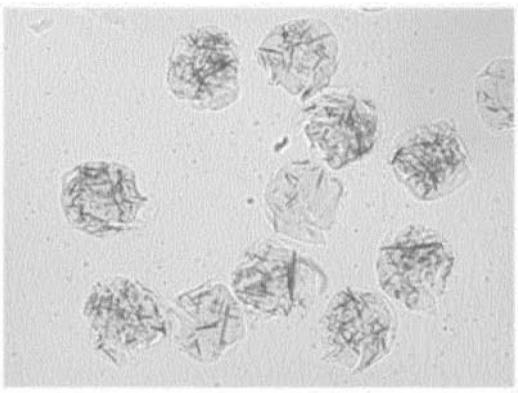


图11a

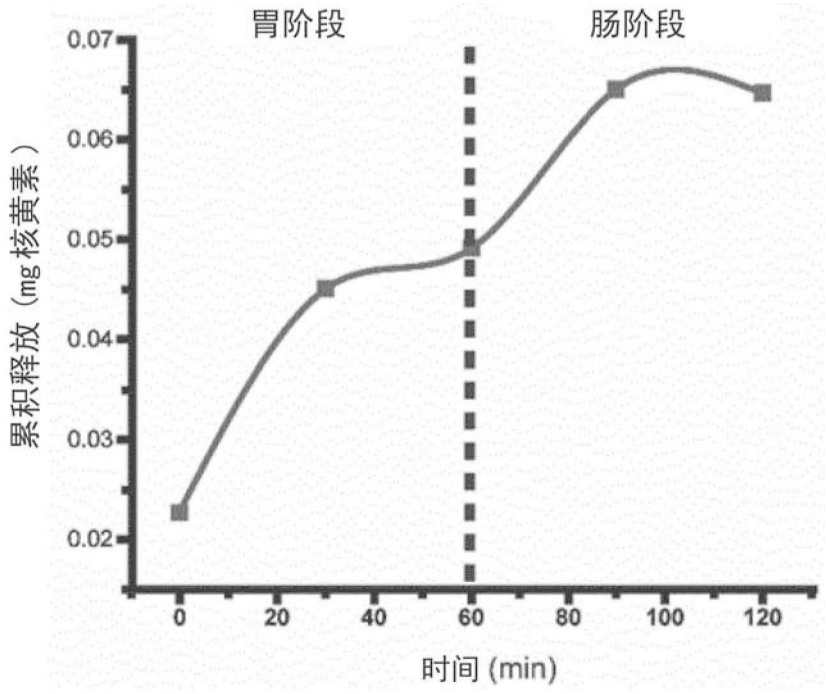

胃阶段
肠阶段
累积释放（mg核黄素）
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0
20
40
60
80
100
120
时间 (min)

图11b

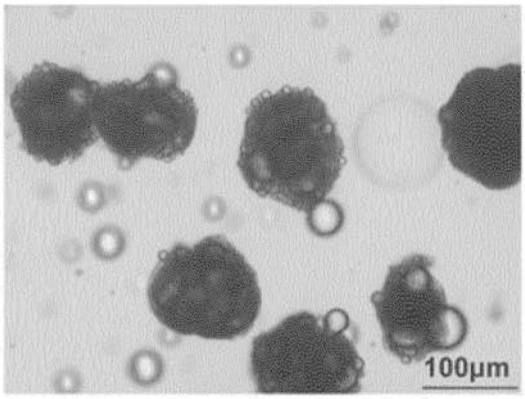

100μm

图12a

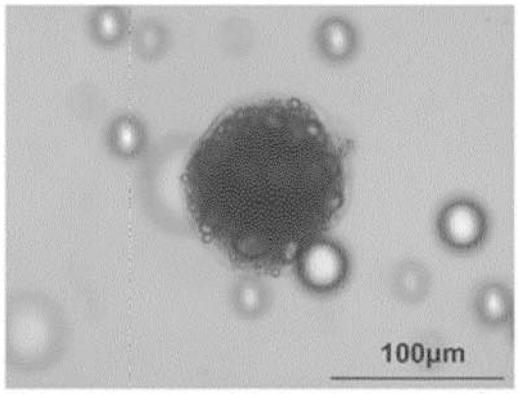

100μm

图12b

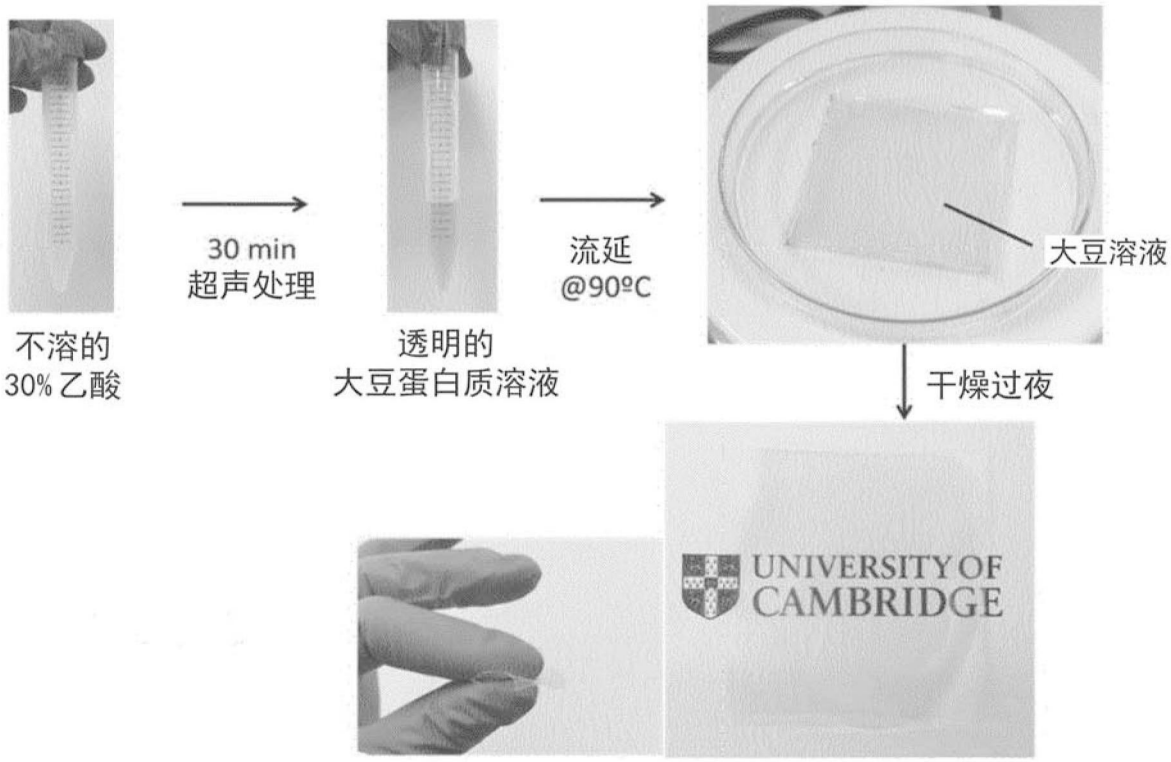

不溶的
30% 乙酸
30 min
超声处理
透明的
大豆蛋白质溶液
流延
@90ºC
大豆溶液
干燥过夜
UNIVERSITY OF
CAMBRIDGE

图13

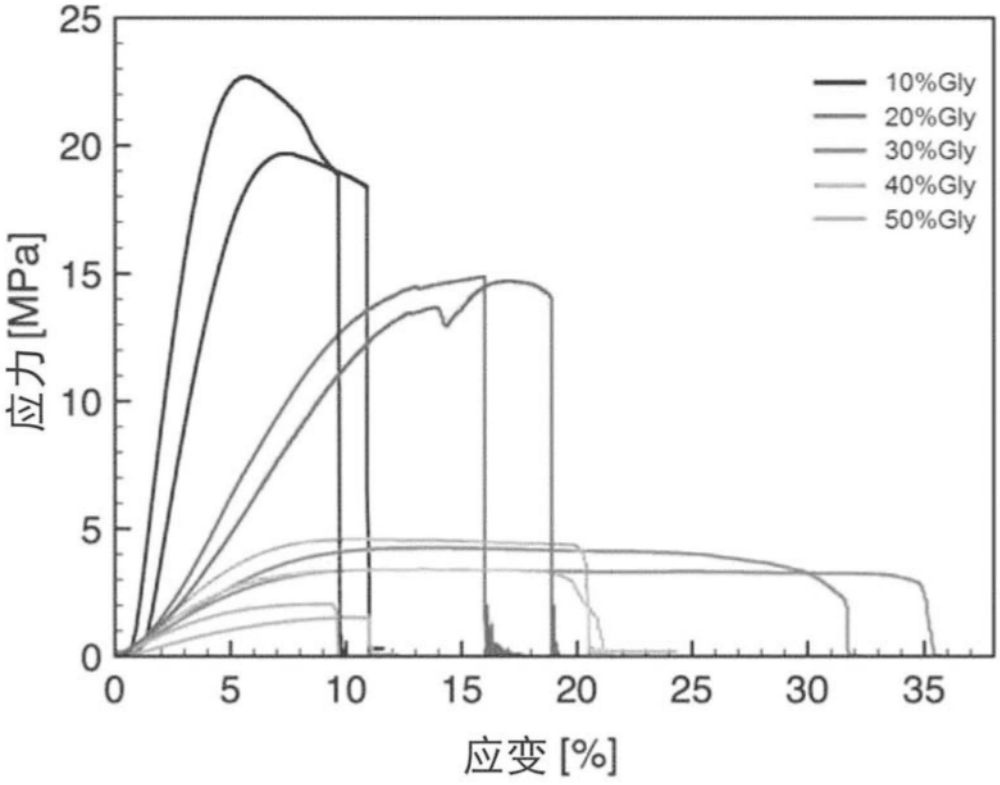

25
20
15
10
5
0
应力 [MPa]
0
5
10
15
20
25
30
35
应变 [%]
10%Gly
20%Gly
30%Gly
40%Gly
50%Gly

图14a

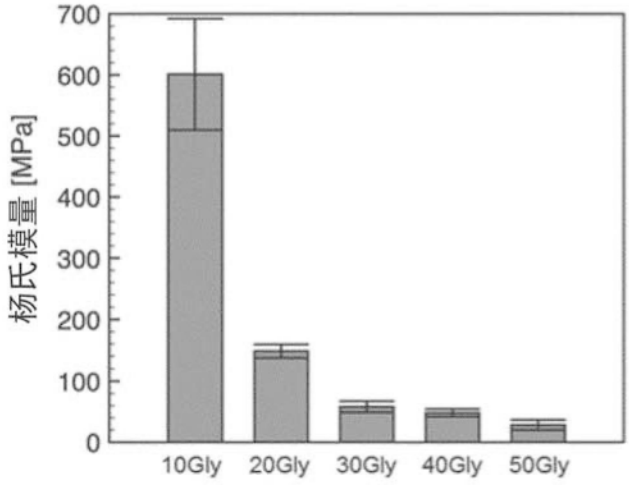

700
600
500
400
300
200
100
0
杨氏模量 [MPa]
10Gly
20Gly
30Gly
40Gly
50Gly

图14b

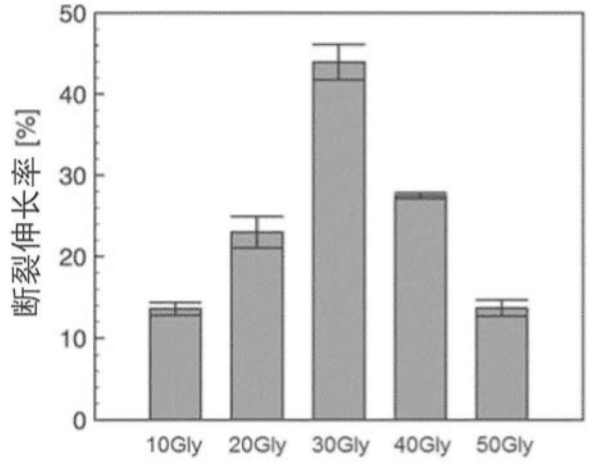

断裂伸长率 [%]
50
40
30
20
10
0
10Gly
20Gly
30Gly
40Gly
50Gly

图14c

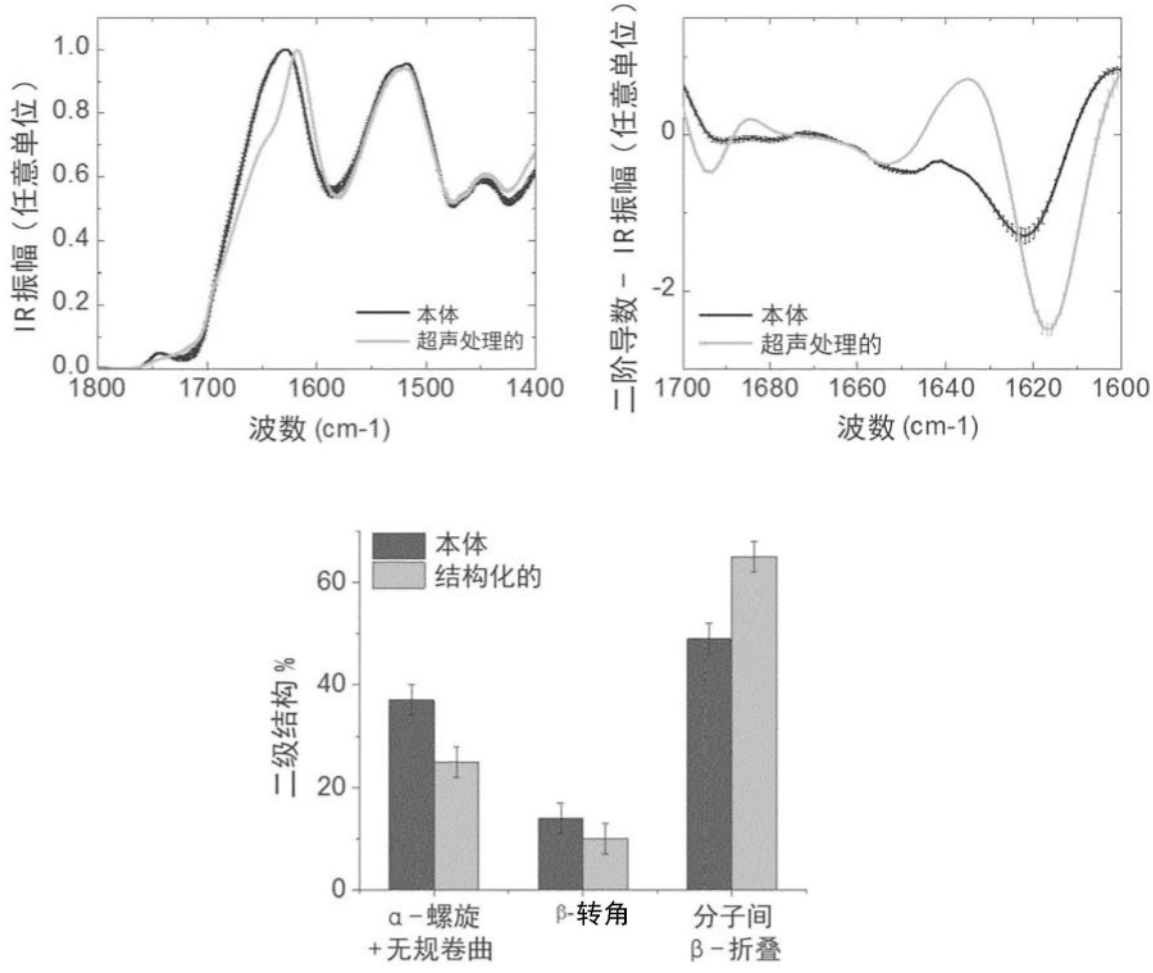

IR振幅（任意单位）
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
本体
超声处理的
1800
1700
1600
1500
1400
波数 (cm-1)
二阶导数 - IR振幅（任意单位）
0
-2
本体
超声处理的
1700
1680
1660
1640
1620
1600
波数 (cm-1)
本体
结构化的
二级结构 %
60
40
20
0
α-螺旋
+无规卷曲
β-转角
分子间
β-折叠

图15

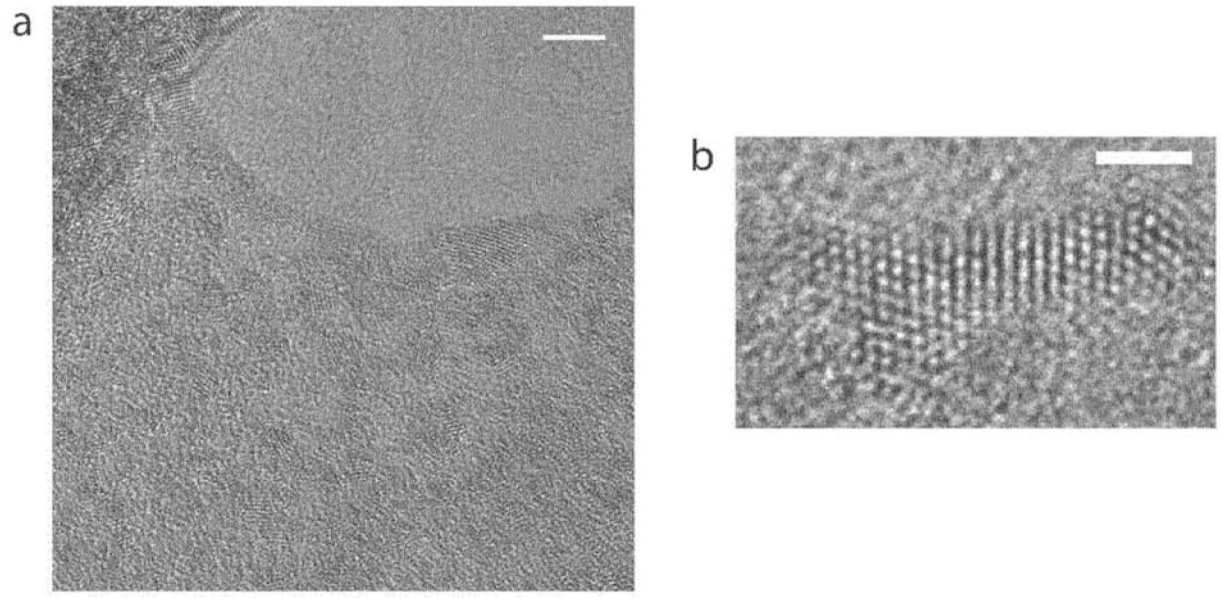


图16

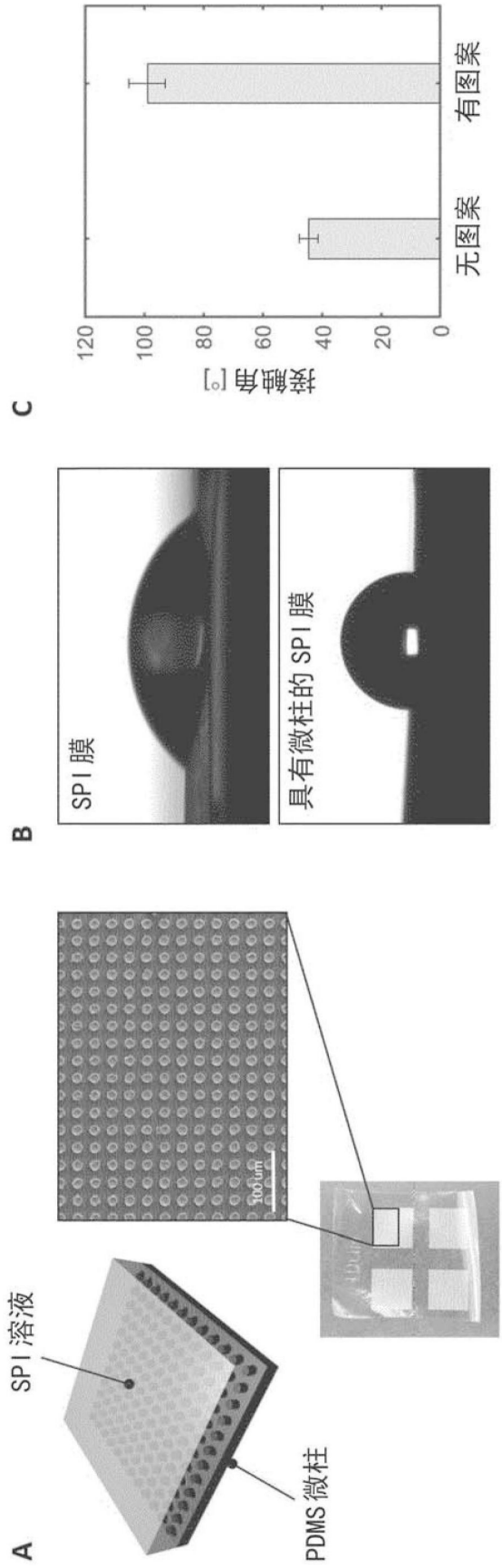

A
SPI 溶液
PDMS 微柱
100 um
B
SPI 膜
具有微柱的 SPI 膜
C
接触角 [°]
120
100
80
60
40
20
0
无图案
有图案

图17a

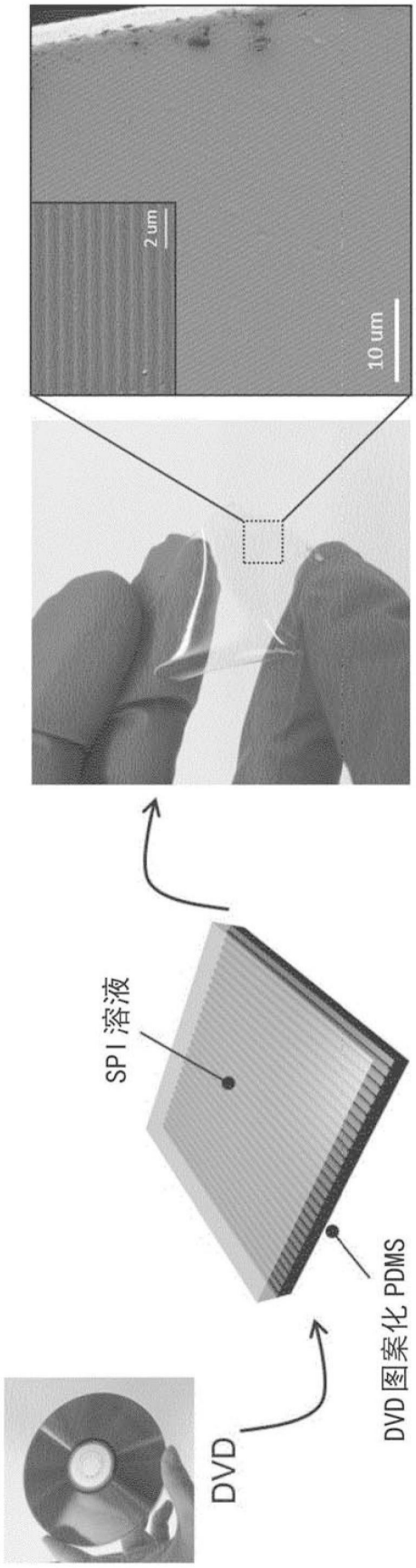


图17b

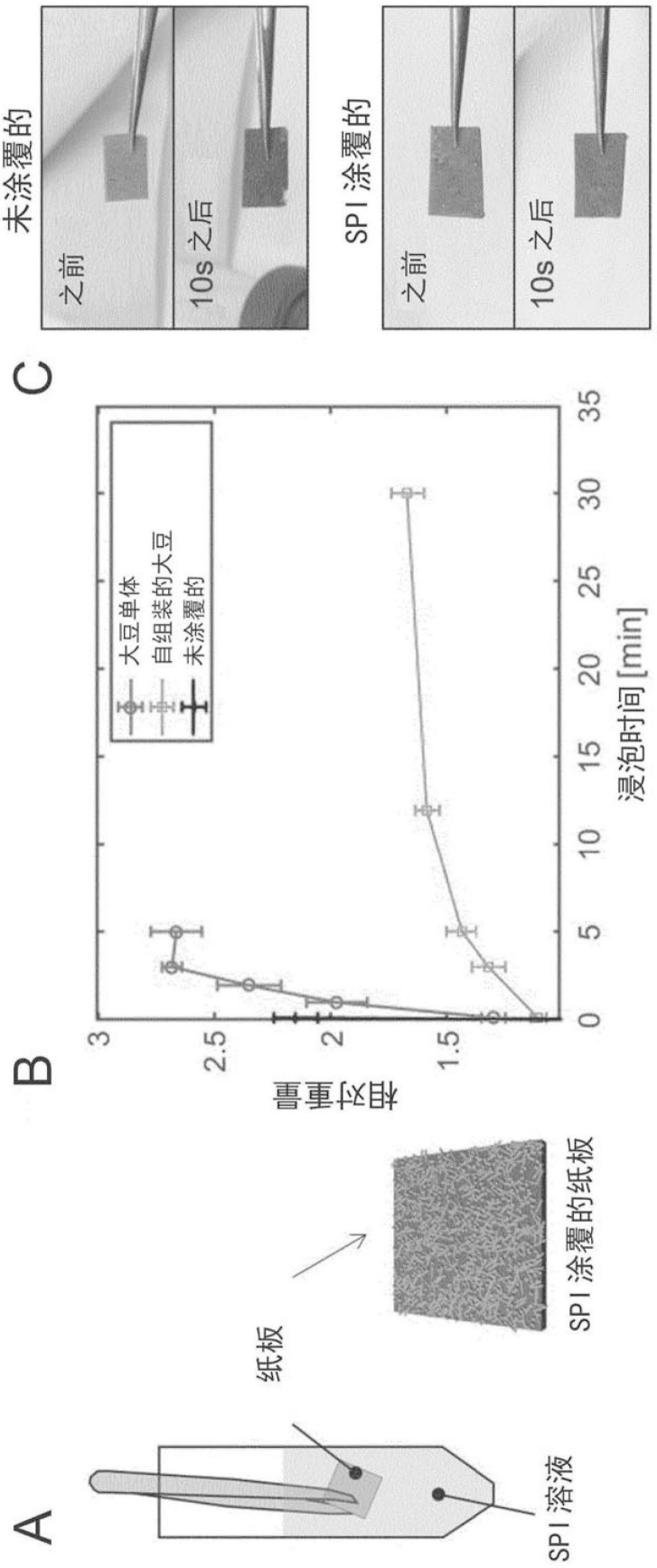

A
SPI 溶液
纸板
SPI 涂覆的纸板
B
相对重量
浸泡时间 [min]
大豆单体
自组装的大豆
未涂覆的
C
未涂覆的
之前
10s 之后
SPI 涂覆的
之前
10s 之后

图18

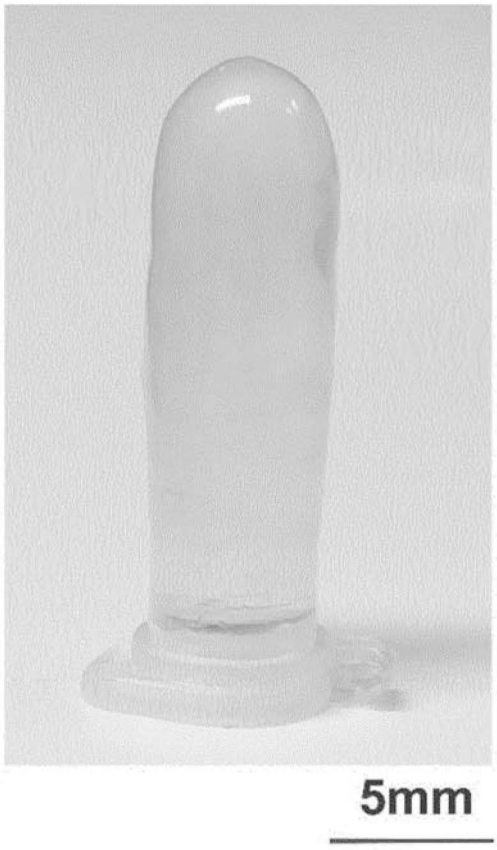


图19a



图19b

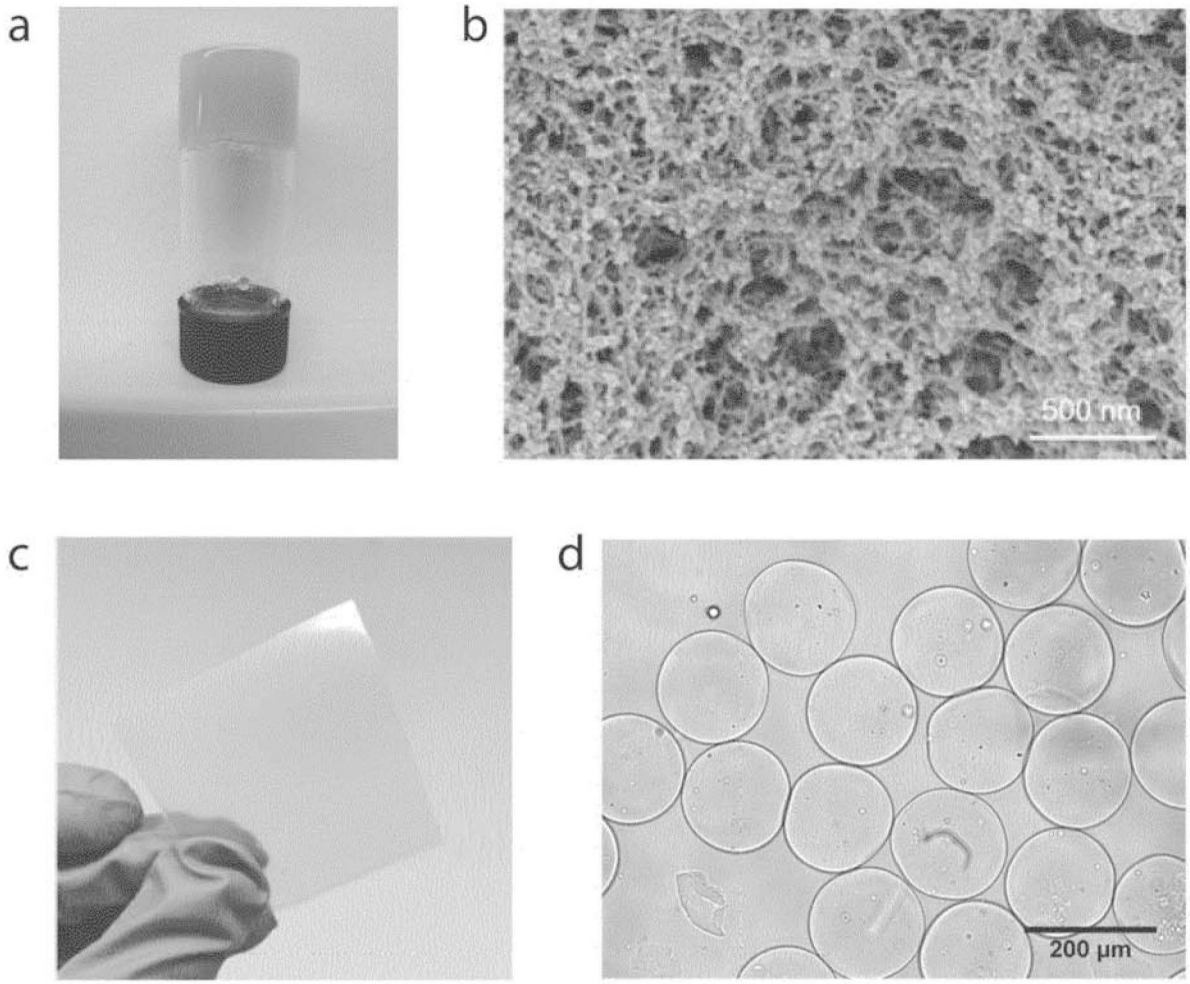


图20



图21

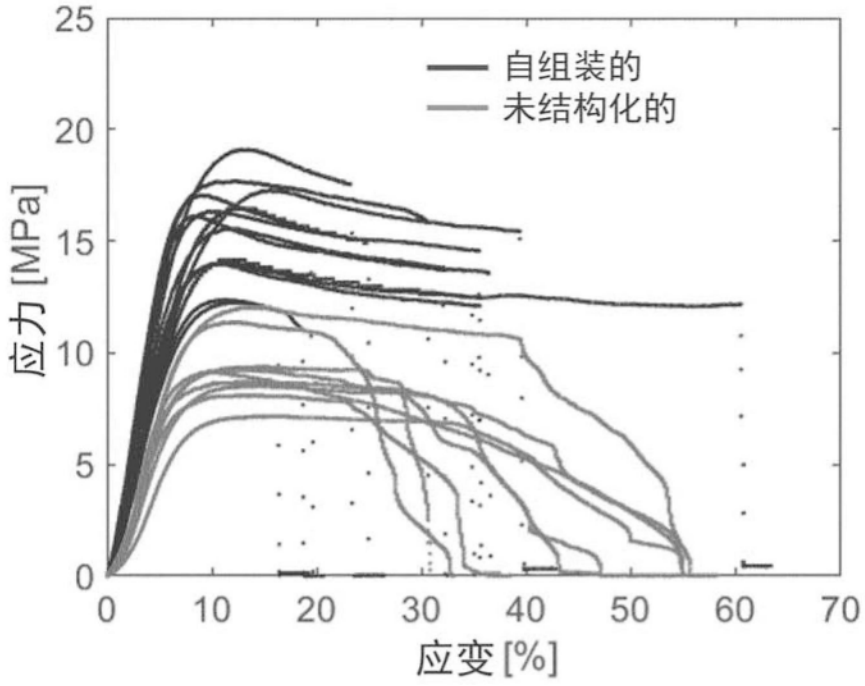

自组装的
未结构化的
应力 [MPa]
应变 [%]
0
5
10
15
20
25
0
10
20
30
40
50
60
70

图22a

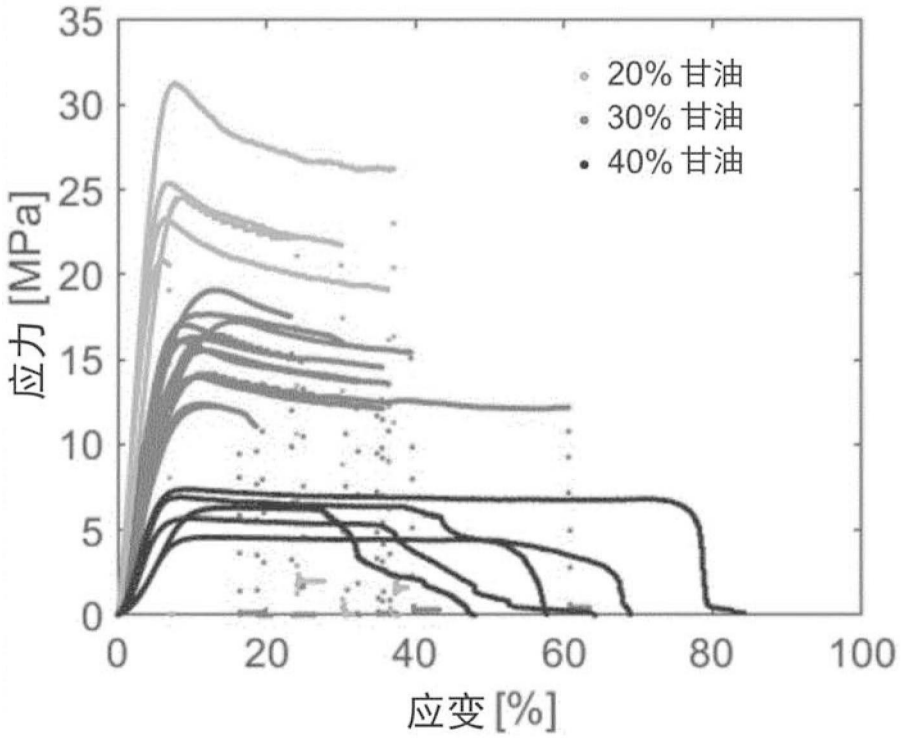

20% 甘油
30% 甘油
40% 甘油
应力 [MPa]
应变 [%]
0
5
10
15
20
25
30
35
0
20
40
60
80
100

图22b

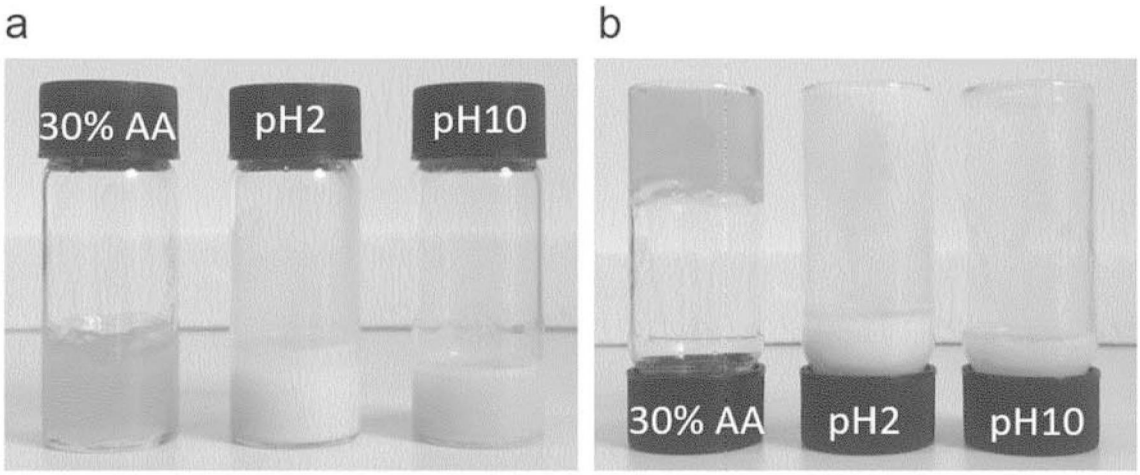


图23