

# 乙醇对丝素蛋白结构及功能特性的影响

董文秀, 李军生, 阎柳娟, 黄国霞, 李秋杰

(广西科技大学生物与化学工程学院, 广西柳州 545006)

**摘要:** 为了研究在乙醇存在及不同透析时间下丝素蛋白的结构及功能特性, 通过扫描电镜 (SEM)、傅立叶红外光谱 (FT-IR)、表面张力、乳化性、乳化稳定性、起泡性、起泡稳定性及蛋白溶解性进行测定。FT-IR 分析表明当溶剂中添加乙醇后, 样品中  $\beta$ -折叠结构明显增加。SEM 分析表明  $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$  体系处理的丝素蛋白较  $\text{CaCl}_2\text{-H}_2\text{O}$  体系溶解更为完全。随透析时间的延长,  $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$  体系处理的丝素蛋白的最低表面张力值和临界胶束浓度均低于  $\text{CaCl}_2\text{-H}_2\text{O}$  体系。此外,  $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$  体系处理的丝素蛋白液在透析 20 h 左右的乳化性最好, 约为 97.51%, 15 h 左右乳化稳定性最好, 起泡性约为 355.49%, 泡沫稳定性在 10 h 左右最好; 而  $\text{CaCl}_2\text{-H}_2\text{O}$  体系处理的丝素蛋白液在透析 25 h 左右乳化性最好, 约为 96.23%, 20 h 左右的乳化稳定性最好, 起泡性约为 200.86%, 泡沫稳定性在 15 h 左右最好。因此, 乙醇的加入可有效改善丝素蛋白结构和功能特性, 为丝蛋白质基表面活性剂的开发提供理论依据。

**关键词:** 丝素蛋白; 氯化钙-乙醇-水; 氯化钙-水; 结构特性; 功能特性

文章编号: 1673-9078(2015)2-106-112

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.019

## Effect of Ethanol on the Structural and Functional Properties of Silk Fibroin

DONG Wen-xiu, LI Jun-sheng, YAN Liu-juan, HUANG Guo-xia, LI Qiu-jie

(College of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou, Guangxi 545006, China)

**Abstract:** In order to study the structural characteristics and functional properties of silk fibroin in the presence of ethanol, scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) were used to measure surface tension, emulsifying properties, emulsion stability, foaming properties, foam stability, and protein solubility. The FT-IR spectra indicated a significant increase in the  $\beta$ -sheet structures of the silk fibroin sample after the addition of ethanol to the solvent system. The SEM analysis showed that the silk fibroin was dissolved more completely in the calcium chloride-ethanol-water (CCEW) system than in the calcium chloride-water (CCW) system. With increasing dialysis time, the lowest surface tension and critical micelle concentration of the silk fibroin in the CCEW system were much lower than those in the CCW system. In addition, for the CCEW system-treated silk fibroin solution, the best emulsifying property (about 97.51%), emulsion stability (about 355.49%), and foam stability were achieved after dialysis times of 20, 15, and 10 h, respectively. For the silk fibroin solution treated with CCW system, the best emulsifying property (96.23%), emulsion stability (about 200.86%), and foam stability were achieved after dialysis times of 25, 20, and 15 h, respectively. Therefore, the addition of ethanol can effectively improve the structural and functional properties of silk fibroin, and this research could provide a theoretical basis for the development of silk protein-based surfactants.

**Key words:** silk fibroin; calcium chloride-ethanol-water; calcium chloride-water; structural properties; functional properties

丝素蛋白 (Silk Fibroin, SF) 是一种从蚕茧中获得的天然高分子蛋白质材料, 一直作为纺织纤维原料广泛应用于服装行业中。然而, 因其具有较低的免疫原性, 良好的生物相容性和保湿性, 缓慢的降解率以及特殊的物理化学性质, 近年来将丝素蛋白应用于生物、医药和精细化工领域的研究越来越多<sup>[1-3]</sup>。

收稿日期: 2014-06-26

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目 (桂科能 14122009-3-3; 桂科转 12125006-30); 国家科技型中小企业技术创新项目 (14C26214502814)

作者简介: 董文秀 (1989-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为食品科学

通讯作者: 李军生 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品化工

丝素蛋白因其表面含有高浓度的丙氨酸等疏水性氨基酸残基而不溶于水<sup>[4]</sup>, 要使丝素蛋白溶解, 就必须使紧密结合的丝素纤维结构膨胀并打破氢键网络<sup>[5]</sup>。一定浓度的钙盐溶液在适宜温度下可以使丝素蛋白大分子逐渐分散成较小分子, 破坏了多肽链之间的部分氢键和范德华力, 从而使紧密结合的纤维结构膨胀而松弛, 并逐渐由  $\beta$ -折叠向无规卷曲大分子结构转变<sup>[6]</sup>。魏涛等<sup>[7]</sup>通过采用一定浓度的硝酸钙溶液和硫氰酸锂溶液对丝素蛋白进行溶解, 证实了较高浓度的盐溶液有利于丝素蛋白分子构象从  $\beta$  折叠向  $\alpha$  螺旋/无规线团结构转变。Mathur 等<sup>[8]</sup>采用硝酸钙-乙醇体系来溶

解丝素纤维而制得再生薄膜,并通过多种分析方法对其进行表征。Hiromi Yamada 等<sup>[9]</sup>研究了氯化钙-乙醇溶液和硫氰酸锂溶液对丝素蛋白结构的影响,结果表明氯化钙-乙醇溶液能使未脱胶蚕茧降解而硫氰酸锂溶液却只有使其在特定条件下进行部分分解。但是目前通过向溶剂中添加乙醇来探讨丝素蛋白结构变化及其水溶液的表面活性性能的相关研究却不多见。

采用  $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$  (Calciumchloride-Ethanol-Water, CCEW)和  $\text{CaCl}_2\text{-H}_2\text{O}$  (Calciumchloride-Water, CCW)对废茧进行溶解,然后透析处理而制得可溶性丝素蛋白溶液,考察了不同透析时间下样液中蛋白质和钙离子含量,并测定了可溶性丝素蛋白表面活性性能,同时借助扫描电镜、红外光谱从丝素蛋白的结构变化上为表面活性性能差异提供理论解释,以期对以废茧为原料制备绿色高效节能的蛋白质表面活性剂提供实验依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 原料

废茧,融安县金鼎制丝有限责任公司;氯化钙,AR,西陇化工股份有限公司;乙醇(95%),AR,天津市大茂化学试剂厂;无水碳酸钠,AR,广东光华科技股份有限公司;大豆油,市售;十二烷基硫酸钠(SDS),AR,汕头市光华化学厂。

### 1.2 主要仪器设备

DT-102型全自动界面张力仪,淄博华坤电子仪器有限公司;100LK高剪切混合乳化机,上海威宇机电制造有限公司;PinAAcle900T原子吸收分光光度计(AAS),美国PerkinElmer公司;KDN-08消化炉,上海洪纪仪器设备有限公司;透析袋,截留分子量为8000~14000 Da,上海源叶生物科技有限公司;冷冻干燥机VFD-2000,北京博医康实验仪器有限公司;S-3400N型扫描电子显微镜,日本HITACHI;Nicolet 380型傅立叶变换红外光谱仪,美国Thermo Fisher公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 两种溶剂体系下可溶性丝素蛋白溶液的制备

将蚕茧剪碎,取出蚕蛹,用去离子水将蚕茧清洗晾干,按溶比1:30(V/m)浸入600 mL的乙醚中48 h(每24 h更换一次)以除去蜡质物,洗净,晾干。然后将干燥蚕壳和蚕衣用无水乙醇在室温下浸泡24 h除

去部分有机物和杂质,去离子水洗净后室温下摊晾干燥备用<sup>[10]</sup>。然后在90℃的碳酸钠(0.05 wt%)水溶液中脱胶100 min,用去离子水反复漂洗后于45℃的烘箱中烘干。将干燥的脱胶丝素纤维分别溶于一定量的CCEW(1:2:8,摩尔比)和CCW(1:10,摩尔比)中,在一定温度下不断搅拌至丝素溶解得到淡黄色黏性透明状溶液,过滤,除去未溶解的丝素。将得到的丝素蛋白溶液装入活化处理过的截流分子量为8000~14000 Da的透析袋中,用流动的去离子水处理。重复操作,分别得到透析5、10、15、20、25、30、35和72 h的丝素蛋白溶液,以6000 r/min离心5 min,去除其它杂质,留下清液备用,通过凯氏定氮法得到丝素蛋白溶液的浓度。

#### 1.3.2 丝素蛋白溶解性的测定<sup>[7]</sup>

称取一定量纯化的丝素纤维按照溶比1:15(V/m)分别置于100 mL CCEW和100 mL CCW中,并分别在65℃和90℃下搅拌溶解30 min。未溶解的丝素纤维用滤纸过滤,在140℃烘干至恒重,溶解率的计算公式:

$$\text{溶解率} = \frac{\text{起始重量} - \text{残留重量}}{\text{起始重量}} \times 100\%$$

#### 1.3.3 蛋白质和钙含量的测定<sup>[11-12]</sup>

根据GB 5009.5-2010,采用凯氏定氮法,测定不同透析时间丝素蛋白样液中的蛋白质质量分数。

将不同透析时间下的丝素蛋白样液用混合酸消化液(硝酸:高氯酸=4:1,体积比)消化好后,分别导入火焰原子吸收光谱进行钙离子的测定,并与试样空白液进行比较。

#### 1.3.4 形态的测定

取适量两种溶剂体系下制得的丝素蛋白样液冻干而制成固体样品直接常规镀金后,采用扫描电镜在25 kV、10 μm条件下,放大1000倍进行各处理丝素蛋白形态观察。

#### 1.3.5 傅立叶变换红外光谱的测定

准确称取一定量冷冻干燥后的样品,加入适量溴化钾,研磨成均匀的粉末,并压成薄片,采用傅立叶红外光谱仪测定在波数4000~400 cm<sup>-1</sup>的红外光谱图。

#### 1.3.6 表面疏水性的测定

分别取1 mL 1.3.1中透析72 h的透析液于7支洁净比色管中,加入1 mL配置好的ANS溶液,然后分别加入0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0和3.5 mL的无水乙醇,并用去离子水稀释至刻度处,充分混合,倒入光径为1.0 cm的石英比色皿中,在F-320型荧光分光光度计(天津港东科技发展股份有限公司)上进行测定,并以未加蛋白和ANS组作为空白对照。

通过加入外源探针 8-苯胺-1-萘磺酸 (ANS) 来研究不同乙醇浓度中的外源探针与可溶性丝素蛋白疏水区结合的情况,从而了解在不同构象中,丝素蛋白的疏水区的变化。实验中,使用的 ANS 的浓度为  $8 \times 10^{-4}$  mol/L, SF 水溶液浓度为 0.37 g/L。ANS 的激发波长为 370 nm, 激发和发射单色器的带宽均为 5 nm, 发射光谱的扫描范围为 400~650 nm。所有样品在室温下放置 30 min 后再进行测试。

### 1.3.7 表面张力(Surface Tension, ST)和临界胶束浓度(Critical Micelle Concentration, CMC)<sup>[13]</sup>

利用全自动界面张力仪测定不同透析时间下的丝素蛋白溶液的 ST, 通过绘制 ST-C 的关系曲线, 确定样品的 CMC 和 ST。

### 1.3.8 乳化性及乳化稳定性测定<sup>[14]</sup>

向 80 mL 样液中加入 24 mL 大豆油于室温下 8000 r/min 均质 70 s 以形成乳化液, 均质后立即从乳化液底部吸取 150  $\mu$ L, 用 10 mL 0.1% 的 SDS 稀释后在 500 nm 条件下测定吸光值  $A_0$ , 以此吸光值表示乳化性。将上述乳化液静置 10 min 后从底部取 150  $\mu$ L 乳液, 迅速分散于 10 mL 0.1% SDS 溶液中, 于 500 nm 处测吸光值  $A_{10}$ 。

乳化稳定性 (Es) 计算公式:

$$Es(\%) = \frac{A_{10}}{A_0} \times 100\%$$

### 1.3.9 起泡性及泡沫稳定性测定<sup>[15]</sup>

取 110 mL 样液置于 500 mL 量筒 (口径 6 cm, 高 20 cm), 用高速乳化均质机以 7000 r/min 均质 50 s, 连续 3 次共计 150 s, 记录均质后液面高度  $V_0$  和泡沫高度  $V_0'$ , 静置 30 min 后记录液面高度  $V_{30}$  和泡沫高度  $V_{30}'$ 。

起泡性(Fc)计算公式:

$$Fc/\% = \frac{V_0' - 110}{110} \times 100$$

泡沫稳定性(Fs)计算公式:

$$Fs/\% = \frac{V_{30}' - V_{30}}{V_0' - V_0} \times 100$$

## 1.4 数据分析

每个实验重复 3 次。采用 Origin 8 软件进行数据处理和分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 溶解性分析

从图 1 可以看出, 丝素蛋白在 65  $^{\circ}$ C 的 CCEW 中

能很快溶解, 虽然在 15 min 时的溶解度只有 13.12%, 但之后迅速增加, 30 min 后几乎溶解完全。而相比之下, 丝素蛋白只有在 90  $^{\circ}$ C 的 CCW 中才开始快速溶解, 这表明 CCEW 溶解丝素的能力大于 CCW。因此我们可以充分利用 CCEW 较强的溶解能力, 使丝素蛋白在低温条件下溶解。

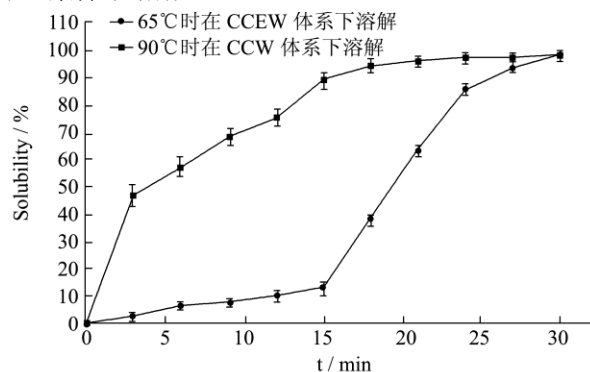


图 1 丝素蛋白在两种溶剂体系中不同时间的溶解性

Fig.1 Solubility of the silk fibroin in both solvent systems at different dissolving time

### 2.2 形态分析

为了进一步观察丝素纤维的溶解情况, 将两种溶剂体系下制得的丝素蛋白形态采用扫描电镜进行观察 (见图 2)。

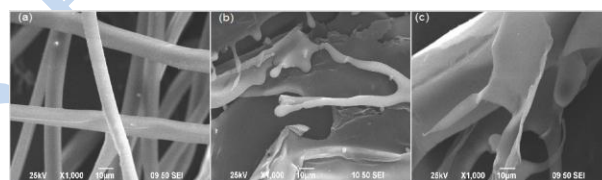


图 2 再生丝素蛋白电镜扫描图

Fig.2 SEM images of the regenerated silk fibroins

注: (a) 未脱胶丝素; (b) CCW-SF; (c) CCEW-SF。

从图 2 可以看出, (a) 主要以纤维状形式存在; 而 (b) 表面有许多突起而主要呈较松散的带状结构, 表明有少量丝素纤维残余; (c) 中丝素蛋白几乎全部溶解, 而以片层状结构为主。这些形貌特征差异给我们提供了如下信息: (1)、两种溶剂中 CCW 对丝素的溶解性要好一些; (2)、带状结构比层状结构有着更高的比表面积, 说明丝素蛋白与水之间有更多的相互作用, 这可能是由于丝蛋白在 CCW 中亲水性占据主导造成的; 而 CCEW-SF 中肽链则倾向于折叠或者形成疏水区域; (3)、带状结构提示了 SF 在 CCW 中处于伸展网络结构的可能性。

### 2.3 红外光谱分析

从图 3 可以看出, (a) 的吸收峰在 1674  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺



I),  $1636\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 I),  $1515\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 II),  $1234\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 III),  $689\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 V),  $544\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 VI), 表明天然丝素纤维分子主要呈  $\beta$ -折叠和  $\alpha$ -螺旋结构。(b)的吸收峰在  $1641\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 I),  $1642\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 I),  $1543\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 II),  $1245\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 III),  $955\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 IV),  $801\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 V),  $672\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 V),  $581\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 VI),  $537\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 VI), 表明 CCW-SF 中含有大量的  $\alpha$ -螺旋/无规线团和  $\beta$ -折叠构象。而(c)的结构中出现了一些新的吸收峰, 其中酰胺 I 的吸收峰变为  $1622\text{ cm}^{-1}$ , 表明有反平行  $\beta$  结构的存在, 同时还发现在  $1532\text{ cm}^{-1}$  和  $1089\text{ cm}^{-1}$  处存在属于  $\beta$ -折叠结构的吸收峰, 然而  $1239\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰说明了无规线团的存在,  $1320\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰与  $\beta$ -折叠结构的酰胺 III 相关。因此, 丝素蛋白在 CCEW 体系下  $\beta$ -折叠结构明显增加, 这进一步说明了丝素蛋白在 CCEW 体系下溶解得更为完全。

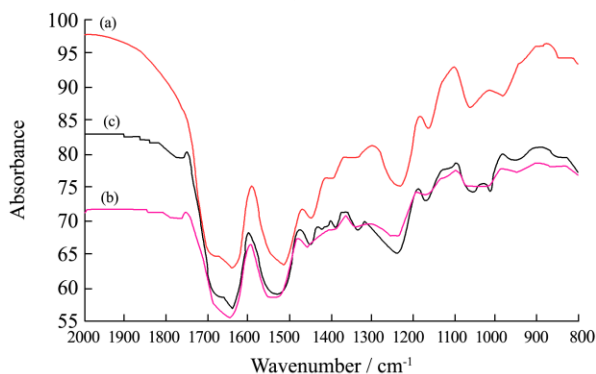


图3 再生丝素蛋白的红外光谱图

Fig.3 FT-IR spectra of the regenerated silk fibroins

注: (a) 未溶解的脱胶丝素; (b) CCW-SF; (c) CCEW-SF。

## 2.4 蛋白质含量的分析

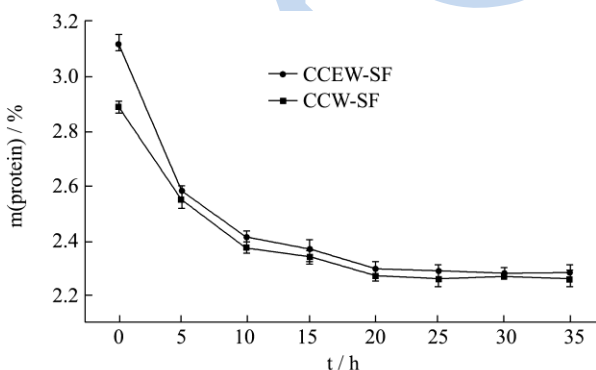


图4 透析时间对丝素蛋白样液中蛋白质含量的影响

Fig.4 Effect of dialysis time on the protein content of the silk fibroin solution

从图4可以看出, 丝素蛋白样液中蛋白质的含量随透析时间的延长逐渐降低, 最后趋于恒定。透析 0~5 h 时蛋白质含量迅速下降, 可能是因为丝素蛋白原液

浓度过高, 透析袋两侧浓度差过大, 结果使较多小分子物质渗透到透析袋中。透析 5~30 h 蛋白质含量略有降低, 且下降缓慢, 这可能是因为随透析时间延长, 透析袋内外小分子物质浓度逐渐趋于平衡, 同时蛋白质含量也趋于稳定。此外, 在整个透析过程中, CCEW-SF 含量均略高于 CCW-SF, 这进一步证实了 CCEW 对丝素蛋白的溶解更为完全。

## 2.5 残留钙含量的分析

丝素蛋白样液中钙离子含量太高, 会严重影响产品的色泽和口感, 并使产品的表面活性如乳化性、起泡性、表面张力等发生变化, 因此对丝素蛋白溶液进行脱钙就显得尤为重要。

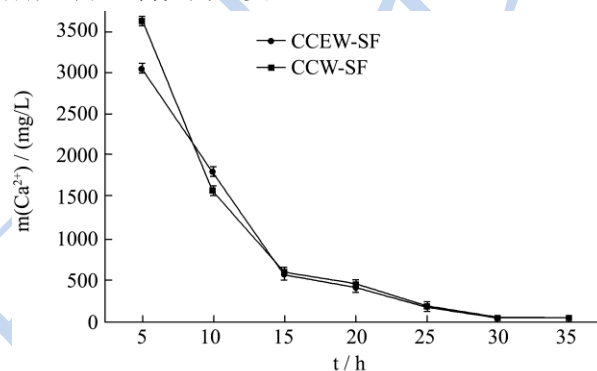


图5 透析时间对丝素蛋白溶液中钙离子含量的影响

Fig.5 Effect of dialysis time on the calcium content of the silk fibroin solution

由图5可知, 5~15 h 时钙离子含量迅速下降, 主要是因为初始阶段丝素蛋白样液中钙盐浓度较高, 大量钙离子通过透析袋渗透到水溶液中。15~30 h 时钙离子含量变化缓慢, 可能是因为随着透析时间延长, 透析袋两侧离子浓度差逐渐减小, 推动力不断降低。30 h 后丝素蛋白样液中的钙离子基本趋于恒定, 表明溶液中游离的钙离子达到动态平衡, 而残留在溶液中的钙离子可能与丝素蛋白质中酪氨酸、丝氨酸等进行配位螯合<sup>[16]</sup>。

## 2.6 表面疏水性的分析

丝素蛋白表面疏水性相互作用是维持蛋白质三级结构的主要作用力, 对蛋白质结构的稳定性及功能性质有着重要的作用。ANS 是一种丙烯酰胺类衍生物, 其最大发射波长会随着溶剂极性的增加而发生红移, 量子产率随之下降, 因此 ANS 荧光探针法成为了一种极好地评价蛋白质表面疏水性的方法。

图6结果表明, 纯的 ANS 在极性环境中展现出一个很宽的荧光发射光谱, 荧光强度很低, 最大发射波长位于 498 nm 处 (曲线 a)。当加入丝素蛋白后,

ANS 发射光谱的荧光强度急剧增加,最大发射波长蓝移至 462 nm 处(曲线 0),这证明了在丝素蛋白主要处于无规线团结构时,ANS 与蛋白质的疏水区域发生作用,包埋在更疏水的环境中。且随着乙醇的加入,ANS 的荧光强度逐渐增加,最大发射波长从 462 nm 红移到 477 nm(曲线 1-7),说明了随着乙醇浓度的增加,ANS 的荧光强度急剧下降,到乙醇浓度超过 30% (V/V) ANS 的荧光强度基本上不再变化,说明当乙醇浓度达到 30%时,丝素蛋白的疏水区域基本上被完全破坏,这一方面可能是因为丝素蛋白与 ANS 之间发生了相互作用而导致丝素蛋白构象变化而使 ANS 的量子产率降低,另一方面则可能是因为 ANS 与丝素蛋白的疏水区域发生作用,由于乙醇分子的加入,丝素蛋白的结构中疏水区域被破坏,导致 ANS 重新游离于溶剂中。

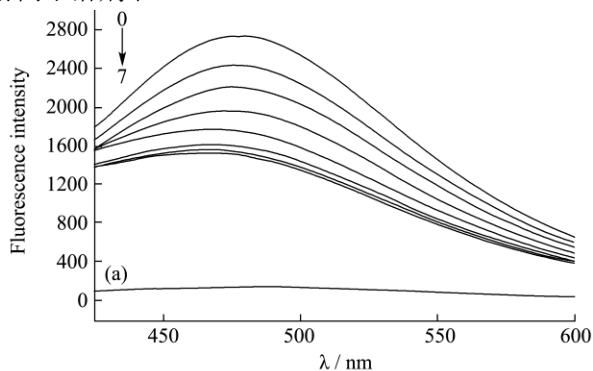


图 6 不同乙醇浓度下可溶性丝素蛋白溶液中加入等量 ANS 后的荧光发射光谱

Fig.6 Fluorescence emission spectra of soluble silk fibroin solutions at different ethanol concentrations after adding equal amounts of ANS

注:  $C_{SF}$ : 0.37g/L,  $\varphi_{ethanol}/\%$ : (0)0; (1)5; (2)10; (3)15; (4)20; (5)25; (6)30; (7)35。

### 2.7 表面张力的分析

由图 7a 可知, SF 水溶液在低浓度范围,溶液的 ST 随质量浓度的增加明显降低;当 CCEW-SF 和 CCW-SF 水溶液浓度分别高于 0.39 g/mL 和 0.42 g/mL 时由于体系中球形、椭球形等胶束的形成,曲线出现了一个转折点,即为 SF 水溶液的 CMC;当 SF 水溶液浓度进一步增大时,溶液的 ST 变化缓慢,最后基本保持恒定。也就是说,当 SF 水溶液达到 CMC 时,浓度的增加对 ST 的影响不大,这是由于当达到 CMC 时, SF 水溶液表面布满了吸附的分子或离子单分子层,随着浓度的进一步增加,多余的分子或离子分散于体相外,在分子引力的作用下逐渐相互聚集而成为较大的聚集体,使疏水基朝向内部,亲水基朝向水相,

SF 分子在溶液表面排列成单分子膜,此时 ST 达到最低点。图 7b 中拐点所对应的 ST 值为样品的 ST,所对应的浓度为样品的 CMC。从而知道 CCEW-SF 的 ST 和 CMC 分别为 47.61 mN/m 和 0.39 g/mL,而 CCW-SF 的 ST 和 CMC 分别为 65.83 mN/m 和 0.42 g/mL,这说明了对于乙醇-丝素蛋白混合体系,由于乙醇分子具有比丝素蛋白低的表面活性,较小的分子体积使之拥有远高于丝素蛋白的吸附效率而使得乙醇分子先吸附到表面,然后逐渐被丝素蛋白分子取代,同时乙醇分子与丝素蛋白分子的疏水部分相互作用,降低了丝素蛋白溶液的表面张力<sup>[17]</sup>。

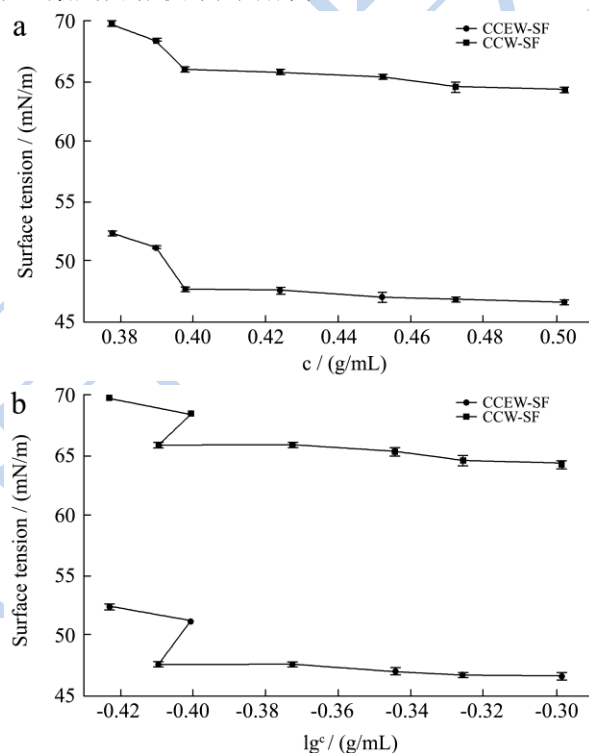


图 7 表面张力-浓度(a)和表面张力-浓度对数曲线(b)

Fig.7 Surface tension-concentration (a) and surface tension-concentration logarithmic curve (b)

### 2.8 乳化性及乳化稳定性的分析

图 8 反映了两种溶剂体系中样液的乳化性及乳化稳定性与透析时间的关系。由图 8a 可知,随着透析时间的延长,丝素蛋白样液的乳化性基本上均呈现先增大后减小的趋势。这主要是由于多肽的数量随透析的继续而逐渐增加,同时疏水性氨基酸的侧链外露,静电电荷数增加<sup>[18]</sup>,因此样液的乳化性在一定程度上随透析的延长而增大;但是当透析时间延长到一定程度(即 CCEW-SF 在透析 20 h 左右的乳化性最好,约为 97.51%,CCW-SF 在透析 25 h 左右乳化性最好,约为 96.23%),静电荷数继续增加,亲水性随之增大,但亲油性下降<sup>[19]</sup>,因此其乳化性降低。由图 8b 可以看

出,随着透析时间的延长,丝素蛋白样液的乳化稳定性先增大后减小。这是由于随着透析时间的延长,透析袋外侧的水分子逐渐渗透到体系中,疏水基团逐渐外露,使得液珠中蛋白分子与油滴的吸引力增强,CCEW-SF在透析15 h左右乳化稳定性最好,CCW-SF在透析20 h左右的乳化稳定性最好。随着透析时间的进一步增加,分子中疏水区域的结构逐渐被破坏,导致乳状液的稳定性减小。这可能是因为透析到一定时间后,丝素蛋白溶液中蛋白质含量随透析时间变化很小,而相应的钙离子含量将影响其乳化性和乳化稳定性。综合考虑,CCEW-SF的乳化性和乳化稳定性要优于CCW-SF。这主要是因为溶液中出现了乙醇分子后,丝素蛋白分子被溶解得更为完全(图2和图3),颗粒更小,多肽分子数量更多。

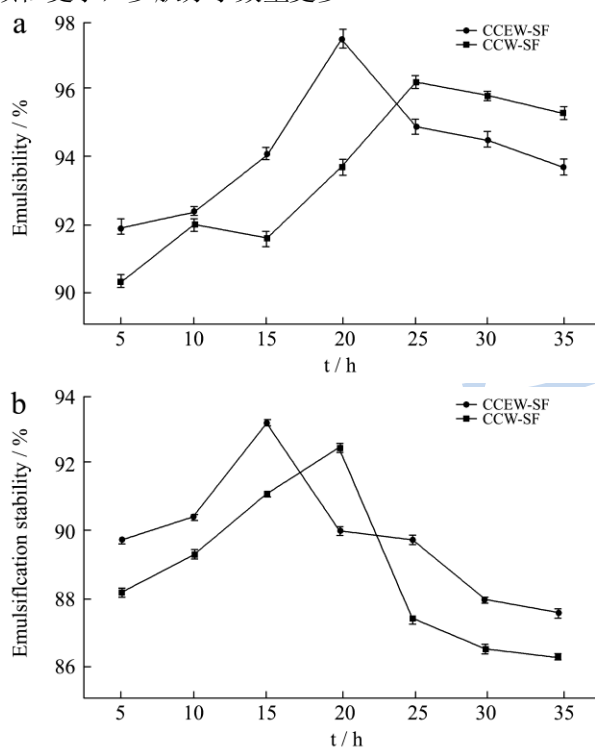


图8 透析时间对丝素蛋白乳化性(a)和乳化稳定性(b)的影响

Fig.8 Effect of dialysis time on the emulsifying property (a) and emulsion stability (b) of the silk fibroin solution

### 2.9 起泡性及泡沫稳定性的分析

图9反映了两种溶剂体系中样液的起泡性及起泡稳定性与透析时间的关系。由图9a可知,起泡性随透析时间延长变化很小,CCEW-SF起泡性大约为355.49%,CCW-SF起泡性大约为200.86%。这说明乙醇的加入降低了体系的表面张力(图7),而使样液的起泡性更好。而图9b中CCEW-SF在5~10 h时起泡性稳定性呈上升趋势,10 h之后有所降低。CCW-SF在5~15 h起泡性稳定性呈上升趋势,15 h后稍有降低。

可能是因为刚开始钙离子下降迅速,尽管蛋白质质量分数或乙醇含量有所降低,溶液的黏度稍有下降,但此时钙离子含量影响占主要方面;透析到一定时间后,蛋白质质量分数、钙离子含量和乙醇含量均缓慢下降,但此时蛋白质质量分数和乙醇含量占主要地位。

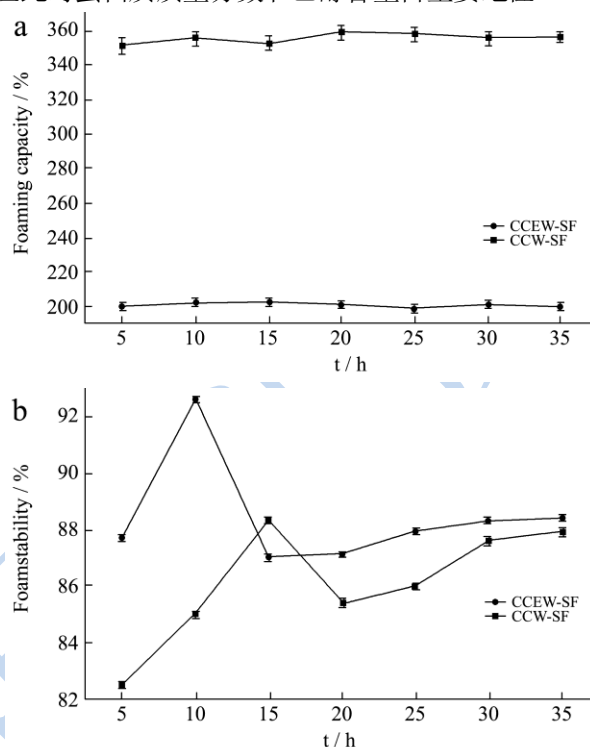


图9 透析时间对丝素蛋白起泡性(a)和起泡稳定性(b)的影响

Fig.9 Effect of dialysis time on the foaming capacity (a) and foam stability (b) of the silk fibroin solution

### 3 结论

3.1 丝素蛋白在65℃的CCEW中能很快溶解,而只有在90℃下才能缓慢溶于CCW中,证实了丝素蛋白低温溶解的可能性。电镜扫描、红外光谱均表明丝素蛋白经CCEW溶解得更为完全,体系中的β-折叠结构明显多于CCW-SF。

3.2 CCEW-SF能够达到的最低表面张力值和表面张力均低于CCW-SF。随着透析时间的延长,CCEW-SF的乳化性、乳化稳定性、起泡性和起泡稳定性基本上都优于CCW-SF。说明了溶剂中乙醇的加入改善了丝素蛋白表面活性性能,为下一步绿色蛋白质基表面活性剂的开发提供理论依据,更好地应用于功能性食品产业。

### 参考文献

[1] Luo Q, Chen Z M, Hao X F, et al. Preparation and properties of nanometer silk fibroin peptide/polyvinyl alcohol blend films for cell growth [J]. Int. J. Biol. Macromol., 2013, 61(10):

- 135-141
- [2] Wang Y Z, Kim H J, Novakovic G V, et al. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(36): 6064-6082
- [3] 赵林, 谢艳招, 郑怡德, 等. 蚕丝蛋白在化妆品中的应用研究进展[J]. *日用化学工业*, 2012, 42(6): 452-456  
ZHAO Lin, XIE Yan-zhao, ZHENG Yi-de, et al. Progress in research work with respect to application of silk protein in cosmetics [J]. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, 2012, 42(6): 452-456
- [4] Hossain K S, Ohyama E, Ochi A, et al. Dilute-solution properties of regenerated silk fibroin [J]. *Phys. Chem. B.*, 2003, 107: 8066-8073
- [5] Freddi G, Pessina G, Tsukada M. Swelling and dissolution of silk fibroin (*bombyx mori*) in N-methyl morpholine N-oxide [J]. *Int. J. of Biol. Macromol.*, 1999, 24: 251-263
- [6] Heredia P, Rivas J D L. Calcium-dependent conformational change and thermal stability of the isolated psbo protein detected by FTIR spectroscopy [J]. *Biochemistry*, 2003, 42: 11831-11838
- [7] Wei T, Li M Z, Zhao C X. Structure and properties of regenerated *antheraea pernyi* silk fibroin in aqueous solution [J]. *Int. J. of Biol. Macromol.*, 2007, 40(5): 472-478
- [8] Mathur A B, Tonelli A, Rathke T, et al. The dissolution and characterization of *Bombyx mori* silk fibroin in calcium nitrate-methanol solution and the regeneration of films [J]. *Biopolymers*, 1997, 42(1): 61-74
- [9] Hiromi Y, Hiroshi N, Yoko T, et al. Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons [J]. *Materials Science and Engineering*, 2001, 14: 41-46
- [10] 张瑶琴, 陈忠敏, 张艳冬, 等. 丝胶蛋白分子结构及其制取条件[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(3): 468-472  
ZHANG Yao qin, CHEN Zhong min, ZHANG Yan dong, et al. Structure and extraction conditions of sericin protein [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2011, 15(3): 468-472
- [11] 中华人民共和国卫生部. GB5009.5-2010 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010  
Ministry of Health of the people's Republic of China. GB5009.5-2010 determination of protein in foods [S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2010
- [12] 周丽, Terry, Ann E. 黄郁芳, 等. 桑蚕丝腺体和丝纤维中金属离子的含量[J]. *化学学报*, 2005, 63(15): 1379-1382  
ZHOU Li, TERRY, Ann E., HUANG Yu-fang, et al. Metal element contents in silk gland and silk fiber of *bombyx mori* silkworm [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2005, 63(15): 1379-1382.
- [13] Rossen S. Surface tension, interfacial tension and contact angles of ionic liquids [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2011, 16: 310-316
- [14] Kevin N P, John E K. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1978, 26(3): 716-723
- [15] Kato A, Takahashi A, Matsudomi N, et al. Determination of foaming properties of proteins by conductivity measurements [J]. *J. Food Sci.*, 1983, 48: 62-65
- [16] 陈宇岳, 盛家镛, 胡凤霞, 等. 真丝纤维在钙盐作用下的形态结构研究[J]. *纺织学报*, 1999, 20(3): 12-14  
CHEN Yu-yue, SHENG Jia-yong, HU Feng-xia, et al. Morphological structure research of real silk fiber under the effect of calcium salt [J]. *Journal of Textile Research*, 1999, 20(3): 12-14
- [17] 杨宇红. 再生 *Bombyx mori* 丝素蛋白在水溶液中的结构和性质的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2004  
YANG Yu-hong. Investigations on structures and properties of regenerated *bombyx mori* silk fibroin in aqueous solutions [D]. Shanghai: Fudan University, 2004
- [18] 任晓芬, 潘道东, 曾小群, 等. 胞壁蛋白酶(CEP)酶解对脑蛋白结构及功能特性的影响[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(11): 2643-2648  
REN Xiao-fen, PAN Dao-dong, ZENG Xiao-qun, et al. Effects of enzymatic hydrolysis with cell wall proteinase (CEP) on structural and functional properties of casein [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(11): 2643-2648
- [19] 管军军, 裘爱泳, 周瑞宝. 提高大豆分离蛋白乳化性及乳化稳定性的研究[J]. *中国油脂*, 2003, 28(11): 38-42  
GUAN Jun-jun, QIU Ai-yong, ZHOU Rui-bao. Improvement of emulsifying and emulsion-stabilizing properties of soybean protein isolate [J]. *China Oils and Fats*, 2003, 28(11): 38-42