

文章编号 :1009-038X(2003)05-0057-04

脱盐过程中丝素蛋白缔合机理

周凤娟, 许时婴, 王璋, 杨瑞金

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:采用透射电子显微镜(TEM)、X-射线衍射(X-ray)、红外光谱(IR)、圆二色谱(CD)等测定了在脱盐过程中丝素蛋白分子构象的变化。随着丝素蛋白盐溶液脱盐率的增加,丝素蛋白分子从无规线团结构慢慢向 β -折叠结构转变,导致丝素蛋白分子间发生缔合。

关键词:丝素 缔合 机理

中图分类号:S 886.9

文献标识码:A

Study on the Mechanism of Aggregation of Silk Fibroin in Desalting Process

ZHOU Feng-juan, XU Shi-ying, WANG Zhang, YANG Rui-jin

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In this paper, the conformational transition of silk fibroin in desalting process was studied by transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction, Infrared (IR) spectroscopy, circular dichroism (CD). With the increase in the desalted rate, the conformation of silk fibroin changed from random coil to β -sheet, leading to aggregation of silk fibroin.

Key words: silk fibroin; aggregate; mechanism

蚕丝的主要组分是丝素蛋白,研究表明,丝素蛋白具有很多生理功能,如促进胰岛素分泌、降低血液中胆固醇的含量、促进乙醇代谢、降压、防止衰老等^[1]。因此,丝素蛋白可以作为保健食品和药物的新资源。此外,丝素蛋白还是一种优良的化妆品添加剂^[2]。我国有充足的下脚茧和废丝等原料,其开发应用具有广阔的前景。

天然丝素蛋白不溶于水,必须先制备成丝素蛋白溶液。一般采用高浓度的 CaCl_2 溶液溶解丝素蛋白,对制得的溶丝液进行脱盐处理即得到丝素蛋白溶液。当丝素蛋白盐溶液脱盐率达到一定程度时,丝素蛋白开始缔合,从溶液中析出丝素蛋白纤维。蚕的吐丝过程与丝素蛋白纤维化有相似之处,一般

认为,蚕在吐丝过程中,液状丝素蛋白构象会发生转变,在稀水溶液中丝素蛋白呈无规线团构象,随浓度增加,构象逐渐转变成 α -螺旋形式,蚕在吐丝时由于受到应力和脱水作用,最终形成不溶于水的 β -折叠构象,形成丝素蛋白纤维。Yamaura 讨论了在不同搅拌速率下,再生丝水溶液生成的结晶丝素蛋白纤维的结构和产率,发现搅拌后的丝素蛋白构象由无规线团转变为 β -折叠构象,证实了丝素蛋白纤维化过程是由于蛋白质在应力作用下产生变性引起的^[3]。

作者主要研究丝素蛋白盐溶液在脱盐过程中丝素蛋白分子产生缔合,即丝素蛋白在脱盐过程中纤维化的机理。

收稿日期:2003-04-07; 修回日期:2003-05-19。

作者简介:周凤娟(1974-),女,辽宁辽阳人,食品科学与工程博士研究生。

万方数据

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

废蚕丝(落绵):江苏海安茧丝绸集团股份有限公司提供;超滤器:北京中科膜技术开发中心产品,超滤膜的截留相对分子质量为 5 000.透射电子显微镜 H-7000 型:日本日立公司产品;圆二色谱仪 J715 型:日本 JASCO 公司产品;红外分光光度计 5D XB FTIR 型:美国 Nicolet 公司产品;X-射线衍射仪 D/Mar-IIIB 型:日本理学(Rigoku)株式会社产品;氨基酸自动分析仪 Agilent 1100 型:美国安捷伦公司产品.

1.2 方法

1.2.1 丝素蛋白盐溶液的制备 废蚕丝(落绵)除杂后,用质量浓度为 5 g/L 的 Na_2CO_3 溶液精练,除去蚕丝纤维上的丝胶蛋白.将精练后的蚕丝 14 g 加入到沸腾的 100 mL 质量分数为 40% 的 CaCl_2 溶液中进行溶解,控制溶解时间在 2~5 min,制得的丝素蛋白盐溶液迅速冷却备用.

1.2.2 丝素蛋白盐溶液的脱盐 由以上制得的丝素蛋白盐溶液进行离心和过滤后,采用超滤器脱盐,对脱盐过程中产生的丝素蛋白纤维进行真空干燥,制成粉末备用.

1.2.3 Ca^{2+} 浓度测定 EDTA 滴定法^[4]

1.2.4 脱盐率测定 脱盐率 = $[1 - \text{浓缩液中 } \text{Ca}^{2+} \text{ 质量(g)}/\text{原料液中 } \text{Ca}^{2+} \text{ 质量(g)}] \times 100\%$.

1.2.5 丝素蛋白分子超微结构测定 在丝素蛋白盐溶液脱盐过程中取不同脱盐率的丝素蛋白溶液 1 滴,置于铜网上,以钨酸蒸汽固定并干燥,将样品置于透射电镜下在加速电压为 75 kV 时进行观察、拍照.

1.2.6 圆二色谱测定 丝素蛋白溶液质量浓度 300 $\mu\text{g/mL}$,比色皿光径 0.1 cm,分辨率 0.2 nm,扫

描速率为 200 nm/min,扫描 3 次,测定远紫外区 190~250 nm 范围溶液的圆二色谱.

1.2.7 红外光谱测定 丝素蛋白纤维粉末样品用 KBr 压片,测定在波数 4 000~400 cm^{-1} 的吸收光谱.

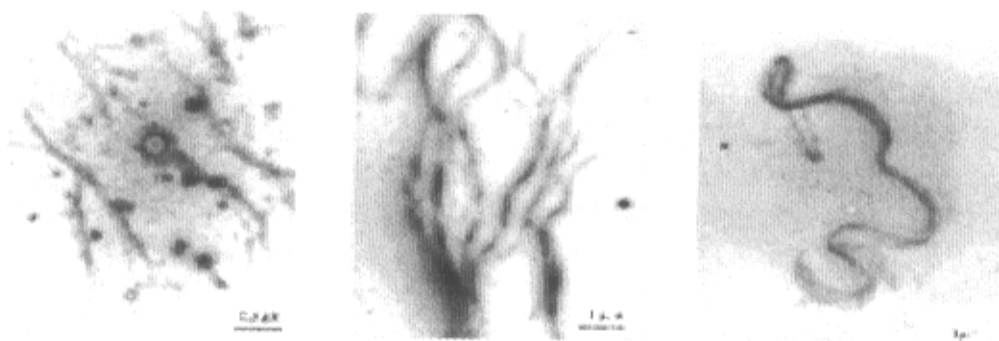
1.2.8 X-射线衍射测定 丝素蛋白纤维粉末在管电流 20 mA、管电压 35 kV、扫描速度 $10^\circ/\text{min}$ 的条件下,用 CuK_α 射线在 $2\theta = 10^\circ \sim 40^\circ$ 范围内测定 X-射线衍射强度.

1.2.9 丝素蛋白溶液的氨基酸组成分析 将脱盐率为 98% 的丝素蛋白溶液置于水解管中,加入 6 mol/L 的 HCl 溶液,真空封口,在 110 $^\circ\text{C}$ 下水解 24 h,冷却后定容、过滤、蒸干;再加入 0.02 mol/L 的 HCl 溶液,在空气中放置 30 min,测定氨基酸的质量分数.

2 结果与讨论

2.1 脱盐过程中丝素蛋白的线性缔合

图 1 是丝素蛋白盐溶液在脱盐过程中不同脱盐率的丝素蛋白的透射电子显微镜图.由图 1 可见,丝素蛋白分子在溶液中以纤维状存在,随着脱盐率增加,丝素蛋白分子聚集体的长度和宽度都逐步增加,说明在脱盐过程中丝素蛋白分子逐步产生线性缔合即分子间横向缔合和纵向缔合.随着脱盐率增加,丝素蛋白分子聚集体变得越来越长和越来越宽.脱盐率为 91.5% 的丝素蛋白溶液中丝素蛋白分子聚集体的长度和宽度是脱盐率为 47.9% 的丝素蛋白溶液的 2 倍左右,而脱盐率为 97.1% 的丝素蛋白溶液中丝素蛋白聚集体的长度和宽度是脱盐率为 91.5% 的丝素蛋白溶液的 2 倍左右(见表 1).这说明脱盐率超过 90% 以后丝素蛋白分子间缔合程度加剧.



a. 脱盐率为 47.9%(18 000 倍); b. 脱盐率为 91.5%(9 000 倍); c. 脱盐率为 97.1%(9 000 倍)

图 1 不同脱盐率的丝素蛋白溶液的透射电子显微镜图

万方数据

Fig.1 TEM micrographs of silk fibroin solution with different desalted rate

表 1 不同脱盐率的丝素蛋白溶液中丝素蛋白分子聚集体的长度和宽度

Tab.1 The length and width of silk fibroin aggregation of silk fibroin solution with different desalted rate

脱盐率/%	长度/ μm	宽度/ μm
47.9	5.22~7.67	0.056~0.22
91.5	12.67~13.78	0.11~0.56
97.1	24.55~26.67	0.11~1.11

2.2 脱盐过程中丝素蛋白分子构象变化

蛋白质分子缔合是一个复杂的过程.当丝素蛋白分子线性缔合至具有一定长度和宽度的丝素蛋白聚集体时,它不再溶解,从水溶液中析出,成为肉眼可见的丝素蛋白纤维.随着脱盐率增加,丝素蛋白溶液中丝素蛋白分子逐步缔合,当脱盐率达 97.4% 时,虽然肉眼尚未能观察到丝素蛋白分子的聚集体,但是从图 1c 观察到丝素蛋白分子聚集体无论从长度或宽度都已大大增加,与此同时,丝素蛋白分子构象也发生了变化.图 2 是脱盐率为 97.4% 的丝素蛋白溶液的圆二色谱,由图可见,在 195 nm 附近有明显的无规线团构象的特征负峰出现,此外在 214 nm 附近也出现了 β -折叠构象的特征负峰,但峰值较低,说明脱盐率达 97.4% 时,丝素蛋白分子构象以无规线团结构为主,但已有少量的 β -折叠结构出现,这意味着部分无规线团结构松开,分子排列开始向有序方向转化.

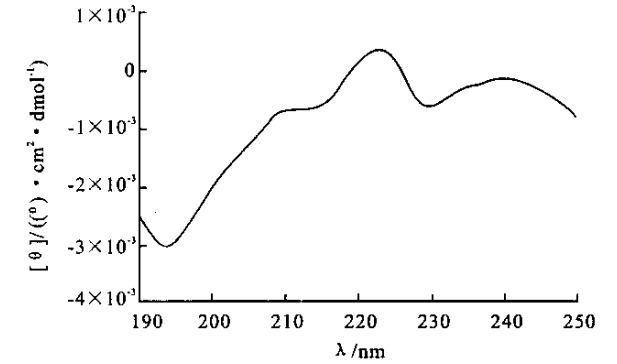


图 2 脱盐率为 97.4% 的丝素蛋白溶液的圆二色谱
Fig.2 CD spectrum of silk fibroin solution of the desalted rate at 97.4%

脱盐率超过 98.7% 时,肉眼已明显见到丝素蛋白纤维形成.图 3 是丝素蛋白纤维的红外吸收光谱,1 700,1 640 cm^{-1} 为酰胺 I 的特征谱带,1 525 cm^{-1} 为酰胺 II 的特征谱带,1 237 cm^{-1} 为酰胺 III 的特征谱带,700 cm^{-1} 为酰胺 V 的特征谱带,是典型的 β -折叠结构.这说明丝素蛋白分子构象已由无规线团向 β -折叠结构转化,丝素蛋白分子间有序定

向排列相互作用加强,分子间缔合形成不溶的丝素蛋白纤维.

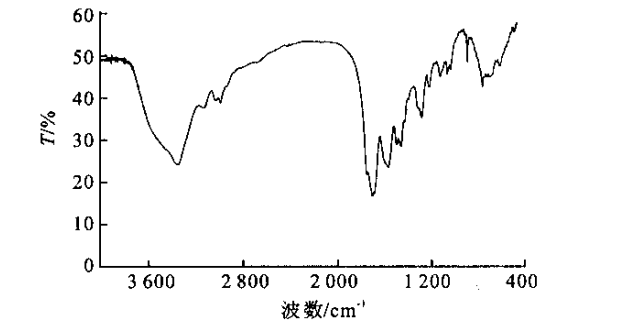


图 3 丝素蛋白纤维粉末的红外吸收光谱
Fig.3 IR spectrum of silk fiber powder

图 4 是脱盐率超过 98.7% 时,产生的肉眼可见的丝素蛋白聚集体即丝素蛋白纤维的 X-射线衍射图谱.从图 4 可以看出,丝素蛋白纤维粉末在 $2\theta = 20.04^\circ$ 附近出现较大的峰值,为丝素 II 型的特征吸收^[5],说明产生的丝素蛋白纤维的结晶状态为丝素 II 型,分子结构以 β -折叠结构为主,与红外吸收光谱的结果一致.

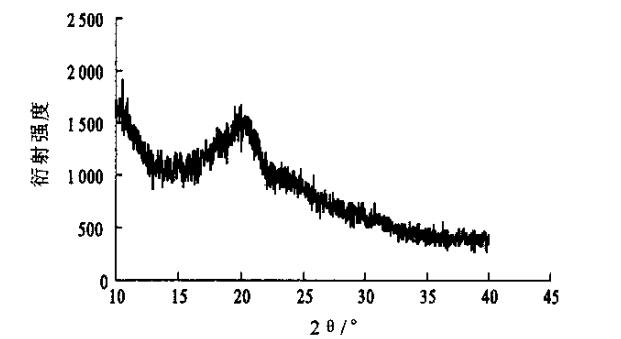


图 4 丝素蛋白纤维粉末的 X-射线衍射图谱
Fig.4 X-ray spectrum of silk fiber powder

2.3 丝素蛋白发生缔合的机理探讨

盐与蛋白质相互作用存在两种机制:一种是离子与蛋白质分子内部的极性基团的作用;另一种是离子改变溶剂的结构,以影响水分子与蛋白质极性侧链基团的相互作用,从而间接地影响蛋白质构象的稳定性^[6]. CaCl_2 能降低丝素蛋白质的稳定性,促进蛋白质溶解,但 CaCl_2 溶解丝素蛋白质的确切机理尚未完全弄清.一般认为在室温时蚕丝蛋白质纤维的肽链处于冻结状态,当加入高浓度的 CaCl_2 溶液时,一方面数量众多的强极性离子产生较强的水化作用,使丝素蛋白质分子表面吸附大量的水,水是增塑剂,显著加强多肽链的运动,削弱了分子链间的范德华引力,伴随着氨基酸残基侧链间的氢键被破坏,溶剂化作用还使丝素蛋白质分子的多肽链部分发生断裂;另一方面, Ca^{2+} 离子与丝素蛋白质中

的极性氨基酸残基如酪氨酸、丝氨酸残基形成络合物,从而破坏了酪氨酸与肽链或其它残基之间的相互作用;由于丝素蛋白质的结晶区中也存在部分酪氨酸,因此这一破坏不仅影响了丝素蛋白质的非结晶区,同时也影响了丝素蛋白质的结晶区^[7-8]。

然而,随着丝素蛋白溶液脱盐率的增加,丝素蛋白质分子逐渐发生了聚集,脱盐率超过 98.7% 时,蛋白质分子线性缔合形成具有一定长度和宽度的聚集体,并从溶液中析出,形成丝素蛋白纤维。这说明脱盐率较高即盐含量较少时丝素蛋白溶液处于不稳定状态,在外力作用下(如搅拌时产生的剪切力)很容易形成丝素蛋白纤维。表 2 为丝素蛋白质的氨基酸组成,丝素蛋白的非极性氨基酸残基的质量分数为 36.2%,甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸占氨基酸质量的 84% 左右,甘氨酸、丙氨酸这些分子较小的氨基酸很容易通过疏水相互作用靠拢,使丝素蛋白分子发生聚集,形成结晶纤维。因此,推测在丝素蛋白纤维形成过程中,疏水相互作用是主要因素之一。

表 2 丝素蛋白的氨基酸组成

Tab.2 Amino acid composition of silk fibroin

氨基酸	质量分数/%	氨基酸	质量分数/%
天门冬氨酸	2.63	异亮氨酸	0.99
苏氨酸	1.10	亮氨酸	0.76
丝氨酸	12.29	酪氨酸	9.19
谷氨酸	2.03	苯丙氨酸	1.17
甘氨酸	33.26	赖氨酸	0.32
丙氨酸	28.77	组氨酸	0.029
半胱氨酸	0.055	精氨酸	0.99
缬氨酸	2.69	脯氨酸	1.36
蛋氨酸	0.26	色氨酸	—

从产生的丝素蛋白纤维的红外光谱、X-射线衍射图谱可以判断其是典型的 β -折叠结构。脱盐率为 97.4% 的丝素蛋白溶液的圆二色谱在 214 nm 附近负峰的出现,说明丝素蛋白溶液在形成肉眼可见的纤维前已出现了 β -折叠结构,表明丝素蛋白质分子形成纤维时,丝素蛋白分子以及丝素蛋白质和水之间存在氢键作用。

除了氢键和疏水相互作用,静电相互作用对丝素蛋白纤维的形成也起一定作用。因为丝素蛋白质分子带同种电荷,分子间存在静电排斥,这对于维持蛋白质-水相互作用也是必需的。

综上所述,丝素蛋白纤维的形成主要涉及疏水相互作用、氢键和静电相互作用,并通过聚集作用形成了结晶蛋白质纤维。

3 结 论

1) 丝素蛋白分子在盐溶液中以纤维状存在,当脱盐率增加时,丝素蛋白分子聚集体的长度和宽度都增加,说明在脱盐过程中丝素蛋白分子间的缔合包括横向缔合和纵向缔合,当脱盐率超过 98.7% 时,肉眼已明显见到丝素蛋白纤维形成,并从溶液中析出。

2) 在脱盐率为 97.4% 的丝素蛋白溶液中,丝素蛋白质分子构象以无规线团为主,但有少量的 β -折叠结构,随着缔合度增加,丝素蛋白分子构象发生了根本性的变化,由以无规线团结构为主转变为以 β -折叠结构为主。

3) 脱盐率超过 98.7% 时,丝素蛋白溶液处于不稳定状态,在外力作用下(如剪切力)很容易析出丝素蛋白纤维。丝素蛋白纤维的形成主要是蛋白质分子间疏水相互作用,另外还有氢键和静电的相互作用。

参考文献：

[1]倪莉,王璋,许时婴.可溶性丝素粉末的制备[J].无锡轻工大学学报,2000,19(2):146-149.
[2]张许昌,曹丽华.丝蛋白在化妆品中的应用[J].日用化学工业,1990,273:44-46.
[3]Yamaur K. Mechanical denaturation of high polymers in solution[J]. J Macromolecules Sci phys,1982,B21(1):49-69.
[4]浙江大学分析化学教研组.分析化学实验[M].北京:高等教育出版社,1992.
[5]刘永成,邵正中,孙玉宇.蚕丝蛋白的结构和功能[J].高分子通报,1998(3):17-23.
[6]陶慰孙.蛋白质分子基础[M].北京:高等教育出版社,1981.
[7]韩仓哲郎,中山信彦.家蚕フィブロインの盐化カルシウム水溶液中の溶解机构に関する¹³C,¹Hおよび⁴³Ca NMRによる研究[J].SEN-I GAKKASHI,1989,45(6):52-57.
[8]Murase R. Part of tyrosine by salt shrink[J]. SEN-I GAKKASHI,1950(6):334-337.

(责任编辑 朱 明)