

蚕丝丝素纤维中氨基酸在丝素纤维的径向分布研究*

郑今欢 邵建中** 刘今强

(浙江工程学院材料与纺织学院 杭州 310033)

摘 要 通过显微镜观察、红外光谱、氨基酸组成分析、福林试剂分析等方法研究蚕丝丝素纤维的微结构、丝素表层和内层的结构差异,研究氨基酸尤其是对丝素纤维的结构和性能起重要影响的主要芳香族氨基酸——酪氨酸在丝素由表及里各层中的含量和分布,以期最终揭示丝素结构与蚕丝织物应用中的固有缺陷(如泛黄、易皱、色牢度等)的关系。结果表明蚕丝丝素存在多层次结构,表层无定形区的比例较高,里层结晶区的比例较高;侧基较大的氨基酸和赖氨酸、组氨酸、胱氨酸、精氨酸、天门冬氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、谷氨酸、酪氨酸等在丝素的表层分布相对较多,而乙氨酸、丙氨酸、丝氨酸等小侧基氨基酸则在中间层至里层较多。

关键词 蚕丝丝素, 表面结构, 氨基酸, 微结构

近一个世纪以来,通过国内外学者的不懈努力,基本探明了蚕丝丝素纤维的化学成分、氨基酸组成、分子量、分子结构以及结晶度、取向度等微细结构。然而,蚕丝丝素是一种高分子生化材料,具有非均一的、复杂的化学和物理结构。丝素基质在成熟蚕体内的生化合成过程十分复杂,蚕体丝腺不同部位的丝素蛋白原液的性质不同,而且在蚕儿吐丝的过程中,丝素原液受到蚕的体内压力及口器的作用,会表现出不同的流变特性,最终可能导致丝素纤维表层和里层的分子结构和超分子结构等微细结构呈现较大的差异,并直接决定或影响蚕丝纤维的许多加工和服用性质,因此很有必要深入研究丝素纤维的表面性质及表面与本体在结构上的差异性和变化规律,以期提出丝纤维表面结构模型,为改善和克服蚕丝纤维的固有缺陷寻求新的途径,并为蚕丝纤维更深层次的改性及开发全新的丝纤维材料提供理论指导。

丝素的组成中几乎包含了所有天然的氨基酸,计有19种之多。但构成丝素蛋白的主要氨基酸却只有乙氨酸、丙氨酸、丝氨酸和酪氨酸4种。其中侧基小的乙氨酸和丙氨酸占75%左右,其次是丝氨酸和酪氨酸,各占约12%和5%(摩尔含量)^[1],含硫氨基酸的存在发现较晚,其含量甚微(约0.2%)^[2]。Shao and Carr曾应用XPS(X射线光电子能谱)^[3]等表面敏感的非损伤性的现代测试分析技术研究蚕丝丝素的表面结构,初步发现,丝

素表面和本体在元素成分、氨基酸组成上有显著差异。这些发现对探明丝纤维的特性具有较深远的意义。

本文主要采用万能显微镜、红外光谱仪、氨基酸自动分析仪及福林试剂法分析经过不同程度溶蚀处理后的残余丝素的结构及其氨基酸组成,探讨由表及里各层丝素的氨基酸组成和变化规律。

1 实验部分

1.1 主要实验材料

1999年浙江产春季桑蚕丝(用皂碱法精练脱胶,用苦味酸胭脂红溶液检验脱胶率,然后用蒸馏水洗净,晾干备用),标准酪氨酸(生化试剂),盐酸(分析纯),纯碱(分析纯),福林试剂(磷钼酸和磷钨酸的混合物,自制)。

1.2 实验方法

以3 mol/L HCl溶液40℃处理丝素,分别经2 h、4 h、6 h、8 h、1天、3天的溶蚀及加热至全溶,随HCl对多肽链的水解作用加剧,使丝素由表及里地被逐层溶蚀,测定处理过程丝素的失重率(可通过测定当天丝素的回潮率及精确称量处理前后丝素的重量计算而得),用万能显微镜观察其形态结构的变化,用傅立叶变换红外光谱仪测试分析其微结构的变化,然后用氨基酸分析仪测定各残余丝素中的氨基酸组成,同时用福林试剂法测定各处理液中酪氨酸的含量。

* 2002-02-09 收稿, 2002-04-08 修稿; 国家自然科学基金(基金号 20075023)和浙江省自然科学基金资助项目(基金号 599111);

** 通讯联系人

1.2.1 显微镜形态结构测试 用配有照相机的万能显微镜对丝素的截面形状和纵向特征进行观察分析并摄影。

1.2.2 FTIR-ATR 测试 测试仪器为 Perkin Elmer 傅立叶变换红外光谱分析仪,辅之以衰减全反射附件;全反射棱镜由 ZnSe 晶体制成,反射角 45°;扫描次数 16 次,分辨率 4 cm⁻¹。

1.2.3 氨基酸组成分析法 试样(烘干并精确称量)在 6 mol/L HCl 中真空封管后,于 110℃ ± 2℃下水解 24 h,过滤定容后在日立 835-50 型氨基酸自动分析仪进行氨基酸含量测定。

1.2.4 福林试剂法 福林试剂(又称酚试剂)是磷钼酸和磷钨酸的黄色混合液,在碱性条件下极不稳定,易被酚类化合物还原而呈蓝色反应,生成杂磷钼和磷钨酸的混合物。由于蛋白质分子中含有含酚基的酪氨酸,因此也呈此反应^[4]。首先需配制不同浓度标准酪氨酸溶液,与福林试剂显色

反应后,用紫外分光光度仪测定其最大吸收波长 680 nm 处的吸光度,并绘制标准曲线,得到其标准曲线方程为 $C = K \times \text{ABS} + B$ ($K = 92.47$, $B = -1.591$ 修正系数 $R^2 = 0.9985$)。然后通过测定处理液与福林试剂显色反应后溶液的吸光度,即可求得其中酪氨酸的含量(μg/mL)。具体实验方法参见文献[4]。通过预先测得的当天丝素的回潮率和精确称量 HCl 处理前后丝素的重量,可换算得到酪氨酸相对于 HCl 处理前丝素的绝对干燥重量或对溶落丝素的重量百分率。

2 结果与讨论

2.1 HCl 处理后蚕丝形态结构变化

为了探明蚕丝纤维在 HCl 处理过程中丝素的溶落状况,对处理前后的蚕丝纤维进行显微镜观察分析,截面变化如图 1。

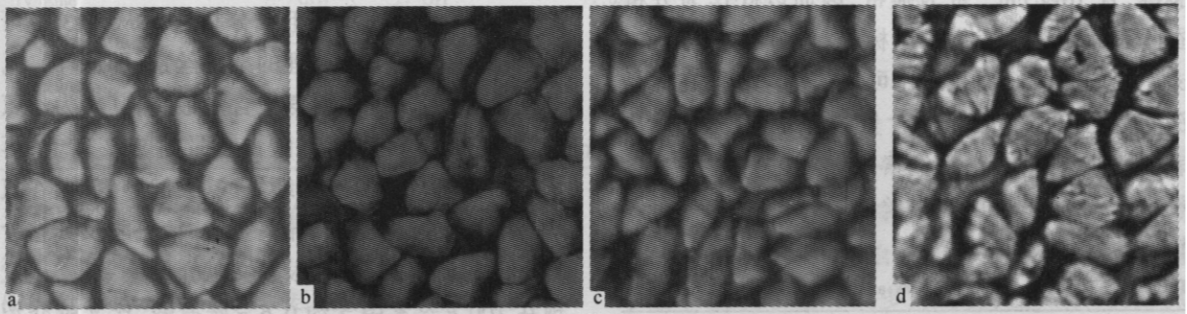


Fig. 1 Section of mulberry-silk fibron (×600)
a) Untreated; b) Weight lost of 5.40%; c) Weight lost of 14.33%; d) Weight lost of 16.20%

图 1(a)为完全脱胶后桑蚕丝的截面图,与文献记载一致^[5]。从图 1(a~d)可见,在本实验条件下,桑蚕丝的溶落基本上是由表及里逐层进行的。失重为 5.40%时,桑蚕丝截面依然光滑完整,但不及未处理丝的截面丰满;当失重为 14.33%时,截面仍然完整,无明显裂缝,但面积进一步缩小;在失重达 16.20%时,出现较明显裂缝,意味着 HCl 的催化水解作用开始深入到纤维较内层的无定形区,使部分多肽链断裂而脱落。纤维纵向的显微观察也发现丝纤维是逐渐变细的。纤维观察还显示,当桑蚕丝和柞蚕丝处理至失重分别达 25% 和 18% 时,由于无定形区受到严重破坏,丝纤维分裂成许多毛细纤维;继续处理,HCl 会进一步催化水解毛细纤维成细微的粒状物质,直至完全溶解。

蚕丝等蛋白质纤维与 HCl 的作用,并非在溶解状态下进行,所以反应是非均一的,首先发生在纤维的无定形部分和晶区表面,随着反应的加深,

也可使晶区发生由表及里的反应,使纤维解体,最后可完全水解为各种氨基酸。文献[5]用透射电镜和扫描电镜观察得出:丝素纤维的最基本结构单元是直径为 10~50 nm 的微原纤,微原纤聚集成一万至数万纳米的原纤,约 100 根原纤再集合为十万纳米数量级的巨原纤,它们的外围各自有一无序层,巨原纤再聚集成几百万纳米大小的丝素纤维。因此认为蚕丝丝素呈多层次结构,外表层以无定形区为主,而较里层含许多结晶程度较高的巨原纤、原纤、微原纤,越靠里层结晶的程度越大;水解分裂出的肉眼可见的毛细纤维可能为巨原纤组织。

2.2 HCl 处理后蚕丝的红外光谱分析

FTIR-ATR 是一种表面敏感的分析技术。以前的研究应用 FTIR-ATR 和二次微分谱图分析技术定性定量地分析羊毛表面的胱氨酸成分变化^[6]及羊毛和球蛋白的二次结构^[7,8]。本研究应用该分析

技术研究分析蚕丝表面的酪氨酸成分及丝蛋白的微细结构.图 2 为桑蚕丝的 RTIR-ATR 图.

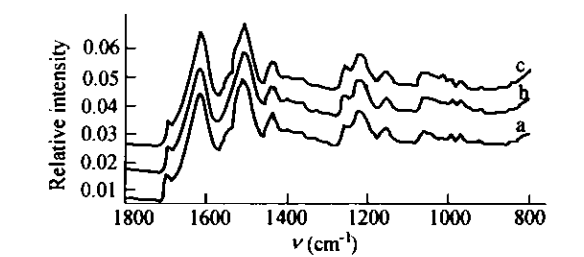


Fig. 2 FTIR(ATR) spectra of mulberry-silk fibroin
a) Untreated; b) Weight lost of 5.40%; c) Weight lost of 16.20%

2.2.1 蚕丝表面酪氨酸相对含量分析 图 2 中 1160 cm^{-1} 峰归属于酪氨酸酚羟基的振动吸收^[9], 1621 cm^{-1} 峰属于酰胺键的特征吸收峰之一(又称酰胺 I 带)^[10,11]. 由于蚕丝内存在大量的酰胺键,且 1621 cm^{-1} 带为强带,因而以此作为分析蚕丝表面酚羟基变化的内标峰. 1160 cm^{-1} 与 1621 cm^{-1} 处的吸收峰面积之比可反映蚕丝表面在样品深度范围内酪氨酸相对含量的变化(见表 1). 从表 1 可见, HCl 处理后丝素表面的酪氨酸相对含量呈下降趋势,表明在蚕丝丝素的外表层,分布着较多的酪氨酸.

Table 1 FTIR-ATR absorbance peak areas of mulberry-silk fibroins*

Weight lost of Fibroins (%)	1160 cm^{-1} (Tyrosine)①	1621 cm^{-1} (Amide- I)②	①/②
0	1.4756	2.5434	0.5802
5.40	1.5715	3.0398	0.5169
16.20	1.4954	3.3551	0.4457

* Arbitrary unit

2.2.2 蚕丝表面结晶程度分析 图 2 中 1230 cm^{-1} 归属于桑蚕丝酰胺 III 带中无规线团(构成无定形区)的特征吸收, 1263 cm^{-1} 归属于桑蚕丝酰胺 III 带中呈反平行 β -折叠结构(构成结晶区)的特征吸收^[10,12]. 比较这两处谱带的强度,可获得纤维表面结晶程度的信息. 由于两谱带相互交叠,难以定量分析,故将图 2 作二次微分处理并计算二次微分谱图中相应特征吸收峰的面积(见表 2),从而可定量分析纤维表面结晶程度^[7,9].

由表 2 明显可见,蚕丝纤维表面部分结晶程度随失重率的增加而增大,这是由于表层无定形部分被溶解而溶落,导致了残余丝素纤维表面结晶比例相应增大,也进一步表明了桑蚕丝存在多层次结构,外表层无定形所占的比例相对较高,而

内层则结晶部分所占的比例较高.

Table 2 FTIR-ATR 2nd derivative peak areas of Amide-III band on mulberry-silk fibroins*

Weight lost of fibroins (%)	1230 cm^{-1} (random coil) ①	1263 cm^{-1} (β -sheet) ②	Degree of crystallinity(%) ②/① + ②%
0	3.94	5.64	58.87
5.40	3.32	6.21	65.16
14.33	1.63	3.86	70.31

* Arbitrary unit

2.3 氨基酸组成分析

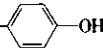
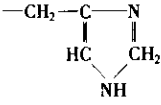
用氨基酸自动分析仪测定桑蚕春丝氨基酸含量,结果见表 3(色氨酸在酸水解时被破坏,故未测定;脯氨酸含量太少,不易测定准确,均未列出),表中氨基酸含量为 HCl 溶蚀处理后残余丝素中各种氨基酸相对于处理前该丝素 100 g 绝对干燥重量的克数.

2.3.1 桑蚕丝氨基酸组成分析 从表 3 中可以看出,在未经 HCl 处理的桑蚕丝素(即原样)中,侧基简单的乙氨酸、丙氨酸含量最高,其次为丝氨酸、酪氨酸,这 4 种氨基酸占总量的 80% 以上,再依次为侧基较为复杂的缬氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、精氨酸及其它含量更低的氨基酸.这与很多文献介绍一致^[5].还发现在 100 g 丝素中含约 0.6 g 胱氨酸,比文献介绍要高一些.

为了分析桑蚕丝由表及里各层中氨基酸的分布状况,将表 3 数据转化为氨基酸损失的重量百分率列于表 4.

从表 3 和表 4 中可以发现,随失重率增加,各种氨基酸含量不断降低,但降低的程度不同.在失重率达 10% 时(可视为丝素的表层),氨基酸溶落含量高低依次为:赖氨酸、组氨酸、胱氨酸、精氨酸、天门冬氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、谷氨酸、酪氨酸等,而乙氨酸、丙氨酸、丝氨酸等侧基简单的氨基酸溶落得相对较少;在失重率达 25% (可视为丝素的次表层)时,氨基酸溶落含量高低依次为:赖氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、天门冬氨酸、精氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、谷氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、组氨酸、酪氨酸、缬氨酸,而乙氨酸、丙氨酸溶落量相对较低;失重率达 35% (可视为丝素的中间层)时,精氨酸、组氨酸溶落量又大大增加;除了乙氨酸、丙氨酸、丝氨酸、谷氨酸、缬氨酸等侧基较为简单的氨基酸损失率低于或略高于

Table 3 Amino acid composition of mulberry-silk fibroin with various HCl-treating time

Time (h)		0	4	8	24	72
Weight lost of Fibroins(%)		0	6.78	10.44	23.59	36.52
Amino acid	Side-chain					
Glycine	—H	36.866	33.912	32.640	26.916	23.534
Alanine	—CH ₃	30.654	28.971	27.849	24.844	20.478
Valine	—CH(CH ₃) ₂	2.856	2.717	2.482	1.900	1.835
Leucine	—CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0.847	0.726	0.626	0.208	—
Isoleucine	—CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	1.056	0.965	0.793	0.511	—
Serine	—CH ₂ OH	12.405	10.850	10.767	7.852	7.600
Threonine	—CH(OH)CH ₃	1.207	1.074	0.951	0.558	0.515
Aspartic acid	—CH ₂ COOH	2.646	2.134	1.895	1.081	1.080
Glutamicacid	—CH ₂ CH ₂ COOH	2.598	2.381	2.154	1.837	1.668
Lysine	—(CH ₂) ₄ NH ₂	0.428	0.375	0.217	0.103	—
Arginine	—(CH ₂) ₃ NHC=NH ₂	1.039	0.837	0.667	0.464	0.048
Methionine	—CH ₂ CH ₂ SCH ₃	0.105	—	—	0.058	—
Cystine	—CH ₂ S—SCH ₂ —	0.589	0.482	0.358	—	—
Phenylanine	—CH ₂ — 	1.567	1.481	1.123	0.660	0.657
Tyrosine	—CH ₂ — 	11.022	9.961	9.456	7.060	6.614
Histidine	—CH ₂ — 	0.450	0.334	0.265	0.289	0.135
Whole Amino acids		106.335	—	—	—	—

失重率外,其它侧基复杂的氨基酸损失率远高于失重率.以上分析表明,各种氨基酸在桑蚕丝丝素中的分布是不均一的,赖氨酸、组氨酸、胱氨酸、精氨酸、天门冬氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、

苏氨酸、谷氨酸、酪氨酸及甲硫氨酸等大侧基或极性侧基的氨基酸尽管含量不高,但分布在丝素的表层和次表层相对较多,其次为丝氨酸,而乙氨酸、丙氨酸等分布在丝素内层相对较多.

Table 4 Weight lost percentage of amino acid in mulberry-silk fibroin (%)

Time (h)	0	4	8	24	72
Weight lost of Fibroins (%)	0	6.78	10.44	23.59	36.52
Amino acid					
Glycine	0	8.01	11.46	26.99	36.16
Alanine	0	5.49	9.09	18.95	33.19
Valine	0	4.88	13.11	33.46	35.74
Leucine	0	14.35	26.07	66.93	—
Isoleucine	0	8.65	24.96	51.69	—
Serine	0	12.54	13.20	36.70	38.73
Threonine	0	11.02	21.25	53.82	57.37
Aspartic acid	0	19.34	28.38	59.14	59.18
Glutamicacid	0	8.39	17.10	29.30	35.82
Lysine	0	12.52	49.33	75.92	—
Arginine	0	19.51	35.80	55.33	95.35
Methionine	0	—	—	44.70	—
Cystine	0	18.16	39.26	—	—
Phenylanine	0	5.52	28.34	57.88	58.10
Tyrosine	0	9.63	14.21	35.95	40.00
Histidine	0	25.67	41.13	45.82	69.96

已有多种研究方法表明^[5,13],桑蚕丝丝素的结晶区主要由乙氨酸、丙氨酸和丝氨酸组成,也含极少量的酪氨酸、缬氨酸;无定形区则含几乎所有的氨基酸.本文实验结果表明在蚕丝丝素的表层分布着相对较多的易于构成无规卷曲链的酪氨酸、苯丙氨酸等含芳环侧基的氨基酸及其它大侧基氨基酸,这一结果与 Shao and Carr 等用 X 射线光电子能谱仪等现代测试分析技术对丝素的研究结果也是一致的^[3];中间层至里层分布着相对较多的易于构成 β -折叠链的乙氨酸、丙氨酸、丝氨酸等小侧基氨基酸.进一步说明蚕丝丝素中多肽链可能呈层状分布,表层主要为无定形区,中间层直至里层则为无定形区和晶区的不均一混合区,所以 HCl 处理丝素过程首先溶落了在外表层和次表层的无定形区中分布较多的大侧基氨基酸.

2.3.2 桑蚕丝酪氨酸含量测定 蚕丝纤维的泛黄主要是由于酪氨酸等含芳香环侧基的氨基酸被氧化所致,酪氨酸的酚羟基又是蚕丝活性染料

染色时能与染料反应的重要基团,因此探讨酪氨酸的含量和分布尤为重要。

表 5 列出了 3 mol/L HCl 溶液 40℃ 经 4 h、8 h、1 天、3 天的溶蚀及加热至全溶的处理过程丝素的失重率,用福林试剂法测得的处理液中酪氨酸含量和氨基酸自动分析仪测得的残余丝素中酪氨酸含量(均换算成相对于未处理丝素的绝对干燥重量的重量百分率)。

Table 5 Weight lost of fibroin, tyrosine in dissolution, tyrosine in remained fibroins treated with HCl

Time (h)	0	4	8	24	72
Weight lost of fibroin (%)	0	6.28	10.44	23.59	36.52
Tyr in dissolution (%)	0	0.81	1.45	3.44	5.02
Tyr in remained Fibroin (%)	11.02	9.96	9.46	7.06	6.61

从表 5 数据中可知,随失重率的增加,溶落的酪氨酸含量增加,溶蚀后残余丝素中酪氨酸含量

不断减少.与某一失重率对应的溶落的酪氨酸含量与溶蚀后残余丝素中酪氨酸含量之和基本等于该丝素原样中的酪氨酸含量,表明氨基酸自动分析仪法和福林试剂法测定结果基本吻合。

图 3 为桑蚕丝丝素整体失重率、溶落的酪氨酸占未处理丝素酪氨酸总含量的增加百分率及残余丝素中酪氨酸占未处理丝素酪氨酸总含量的损失百分率随 HCl 不同时间处理的变化趋势。

由图 3 可见,溶落的酪氨酸增加百分率与残余丝素中酪氨酸损失百分率曲线较为接近,也表明氨基酸自动分析仪法和福林试剂法测定结果基本吻合.桑蚕丝在失重率低于 36% 范围,其溶落的酪氨酸含量增加的程度或溶蚀后残余丝素中酪氨酸含量减少的程度,均高于整体失重率增加的程度,进一步表明酪氨酸在蚕丝丝素的表层和次表层的分布相对较多。

综上所述,(1)纤维形态结构的显微观察和红外光谱分析均表明桑蚕丝存在多层次结构,蚕丝丝素的表层以无定形区为主,中间层至里层为无定形区和晶区的不均一混合区。(2)氨基酸分析结果表明各种氨基酸在桑蚕丝丝素中的分布是不均一的,在丝素的外表层和次表层分布着相对较多的赖氨酸、组氨酸、胱氨酸、精氨酸、天门冬氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、谷氨酸、酪氨酸及甲硫氨酸等侧基较复杂的氨基酸,中间层至里层分布着相对较多的乙氨酸、丙氨酸、丝氨酸等侧基简单的氨基酸。(3)红外光谱法、氨基酸分析法和福林试剂法测定结果均表明酪氨酸在蚕丝丝素的外表层和次表层的分布相对较多。

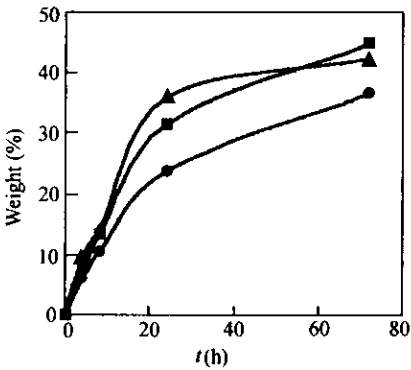


Fig. 3 Tyrosine with various HCl-treating time
◆ Weight lost of fibroin (%); ■ Weight increase of tyrosine in dissolution (%); ▲ Weight loss of tyrosine in remained fibroin (%)

REFERENCES

1 Lucas F. Nature, 1966, 210: 952
2 Schroeder W A, Kay L M. J Amer Chem Soc. 1955, 77: 3908
3 Shao J, Carr C M, Rowlands C P, Walton J. J Text Inst, Part 1, 1999, 90(4): 459 ~ 468
4 Jin Xianxiang(金咸祥). Experiment on Dyeing and Finishing(染整工艺实验). Beijing(北京): Textile Industry Publishing House(纺织工业出版社), 1987. 159 ~ 165
5 Wang Jusheng(王菊生), Sun Kai(孙铠). Principle on Dyeing and Finishing(染整工艺原理). Part1. Beijing(北京): China Textile Publishing House(中国纺织出版社), 1997. 290 ~ 309
6 Douthwaite F J, Lewis D M. J S D C, 1994, 110: 304
7 Jeffrey S C, Gary L C, Andrea L W. Biopolymer, 1997, 42: 7 ~ 17
8 Thomas F K, Harold M F. Trends in Food Science & Technology, 1993, (4): 169 ~ 174
9 Sun Xinjun(孙新军). Journal of Textile Research(纺织学报), 1989, (2): 75 ~ 77
10 Nadiger G S, Halliyal V G. Colourage, 1984, (10): 23 ~ 32
11 Liu Yongceng(刘永成), Shao Zhengzhong(邵正中), Sun Yuyu(孙玉宇). Polymerica Bulletin(高分子通报), 1989, (3): 17 ~ 23
12 Bhat N V. Textile Research Journal, 1985, (1): 65 ~ 69
13 Ping Linjie(平林洁). Fibers Bulletin(纤维学会志[日]), 1967, 23(5): 199 ~ 203

STUDIES ON DISTRIBUTION OF AMINO ACIDS IN SILK FIBROIN

ZHENG Jinhuan, SHAO Jianzhong, LIU Jinqiang

(*College of Materials and Textiles, Zhejiang Institute of Science and Technology, Hangzhou 310033*)

Abstract The micro-structure of silk fibroin and the structural difference between silk surface and bulk were studied using a range of analytical techniques, microscopy, Fourier transform infra-red spectroscopy in ATR mode, analysis of amino acids composition and FuLin reagent analysis; The compositions and distribution of the amino acids in silk fibroin, especially the main aromatic amino acids (tyrosine) which plays an important role on the structure and properties of silk fibroin was studied, in order to reveal the relationship between silk structure and the intrinsic defect of silk fabrics such as yellowing, easy-crease, and color fastness. The results show that there is multiple-layers structure in natural silk fibroin, with higher crystallinity in the in-layer than out-layer; The acids with large side-chain such as Lys, His, Cys, Arg, Asp, Phe, Leu, Glu, Tyr are richer in the outer-layer, and the amino acids with small side-chain such as Gly, Ala and Ser are richer in the inner-layer of silk fibrions.

Key words Silk fibroin, Surface structure, Amino acid, Micro-structure