

蚕丝蛋白与硅溶胶复合材料的研 究 *

程 成 邵正中** 陈 新

(教育部聚合物分子工程重点实验室 复旦大学高分子科学系和先进材料实验室 上海 200433)

摘 要 采用动态力学测试手段(DMA)并结合扫描电镜和拉曼光谱等方法,考察了用桑蚕丝蛋白与二氧化硅水分散体系(硅溶胶)制备的复合材料的结构与性质.结果表明,在此共混体系中,直径约为 100 nm 的二氧化硅聚集体与丝蛋白连续相的界面相容性良好.动态力学测试发现,复合材料的动态力学性能在 15℃ 到 55℃ 范围相对于纯丝蛋白材料得到了改善,二氧化硅组分的加入对丝蛋白分子链段的运动性有所阻碍,从而导致了 40℃ 模量损耗的消失.

关键词 再生丝蛋白, 硅溶胶, 二氧化硅, 动态力学性能

蚕丝及其丝蛋白具有优越的生物相容性和一定的可降解性,近年来在生物医药领域,如细胞培养和组织工程等方面有着广泛的应用,其中由再生丝蛋白制成的膜、多孔支架和凝胶等材料尤其受到重视^[1,2].然而,丝蛋白材料的宏观力学性能与其中丝蛋白的构象以及材料的存在形式(如纤维、各向同性的膜等)密切相关,以纤维形式存在的天然蚕丝具有出色的力学性能,而以膜形式存在的再生丝蛋白则显得比较脆弱^[3].因此,利用其他材料与丝蛋白的共混来改善丝蛋白膜的力学性能和特点已被众人所关注.目前,用于与丝蛋白共混的物质多是一些合成高分子或者生物大分子,如聚丙烯酰胺、聚丙烯腈、聚乙二醇、海藻酸钠、纤维素和壳聚糖等^[4-7].与纯丝蛋白膜相比,加入这些共混材料后共混膜的力学性质均有不同程度的改变.近年来随着科学家们对生物矿物的深入探索,若干关于无机物与丝蛋白复合材料制备的研究也已有所涉及^[8-11].

由于二氧化硅等硅酸盐类的物质与聚氨基酸或蛋白质之间既存在着静电又存在着比较强的氢键相互作用,其通常被认为对蛋白质具有潜在的交联作用^[12, 13].不仅如此,二氧化硅随着含量的增加,还可能形成纳米粒子、薄层甚至二氧化硅交联网络^[14].另一方面,蛋白质与这类无机矿物质在纳米尺度的均匀混合,所得材料往往具备特殊的物理性质和非常好的阻燃性,如二氧化硅与明胶等生物大分子的复合材料已经有所报道^[15].

桑蚕丝蛋白含有一定量的谷氨酸(Glu)和门

冬氨酸(Asp)等酸性氨基酸^[16],可能与带负电的二氧化硅粒子有一定的静电排斥作用,而二氧化硅与肽链之间也可能产生比较强的氢键作用.我们将水溶性的二氧化硅水分散体系即硅溶胶与高浓度丝蛋白水溶液进行不同配比的混合,经过自然条件下缓慢干燥成型而制备丝蛋白/二氧化硅复合材料,希望通过对二氧化硅矿物质组分和丝蛋白之间相互作用的探索,以了解二氧化硅对丝蛋白结构的影响及丝蛋白/二氧化硅复合材料的性能特征,并为其进一步的开发应用提供支持.

1 实验部分

1.1 丝蛋白/硅溶胶共混样品的制备

10 g 干净的桑蚕茧丝在 Na_2CO_3 (5 g/L) 水溶液(2 L, 100℃)中脱胶 40 min,用去离子水洗净,并在 60℃ 的烘箱内烘干.脱胶丝在 40℃ 的 9.3 mol/L LiBr 水溶液中溶解完全.多层纱布粗滤杂质后,丝蛋白溶液被置于透析袋中用去离子水透析 3 天,离心后得到质量分数约 4% 的再生丝蛋白水溶液,再用吸水剂浓缩透析获得质量分数约为 26% 的再生丝蛋白水溶液(具体的浓缩透析过程参见文献^[17]).

硅溶胶(30 wt%)由上海原子核研究所德邦硅溶胶材料厂提供.将再生丝蛋白溶液与硅溶胶配成一系列混合溶液,其中硅溶胶的质量分数分别为 1%、5%、10% 和 15%.制得的混合溶液于室温下缓慢干燥 48 ~ 72 h,制成厚度约 5 ~ 10 mm 的固体样品.由于丝蛋白的强吸水性,此类样品仍含

* 2008-01-11 收稿, 2008-04-07 修稿; 国家杰出青年科学基金(基金号 20525414)、国家高技术研究发展计划(863 计划, 项目号 2006AA03Z452)及教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: zczshao@fudan.edu.cn

有 3% ~ 5% 不易除去的结合水。

1.2 测试和表征

样品在液氮中脆断后,用离子溅射法为断面镀金,采用 Philips 公司生产的 XL30 扫描电子显微镜作断面的形态观察。

采用法国 Dilor 公司生产的 LabRam-B 显微拉曼光谱仪观察样品中丝蛋白的构象。由 He-Ne 激光器产生波长为 632.8 nm 的激发光,功率为 6 mW,扫描范围 $800 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 。

共混材料打磨成两面光滑平整,厚度约 4 mm 的块状样品,采用 DMA242 动态力学分析仪进行动态力学性能的测试(压缩模式,频率 10 Hz 和 1 Hz 升温速率 2 K/min 温度范围 $-50 \sim 200^\circ\text{C}$)。

2 结果与讨论

2.1 丝蛋白/二氧化硅复合材料的断面形貌

对不同配比的丝蛋白/二氧化硅复合材料脆性断面做扫描电镜的观察(图 1),可以发现,纯丝蛋白材料的断面比较粗糙但相对均一,而硅溶胶

的加入将致使材料中出现分相现象。当硅溶胶的质量分数较小时,由其形成的二氧化硅聚集体(直径约为 100 nm)非常均匀地分布在丝蛋白所构成的连续相间,随着二氧化硅组分含量的增加,可以清楚地看到二氧化硅颗粒在数量上的增加,但没有发生进一步的聚集现象;在硅溶胶的含量为 15% 的材料中,小颗粒已经相当密集,却依然分散均匀。

在二氧化硅与其它聚合物如聚乙二醇(PEG)的共混研究中,随着复合材料放置的时间增长,体系中将逐渐出现“二氧化硅富集相”和“基质富集相”,即二氧化硅的聚集体尺寸慢慢增大,并与有机基质明显分离开来^[18]。而在本实验体系中,复合材料在长达一个月的放置之后甚至在溶胀的情况下却没有发生富集现象(图略)。究其原因,很可能是丝蛋白在成膜的过程中形成了 β -折叠结构(见下文),加上组分间硅氧键与肽链之间的氢键相互作用,两者同时限制了丝蛋白和二氧化硅的进一步聚集。

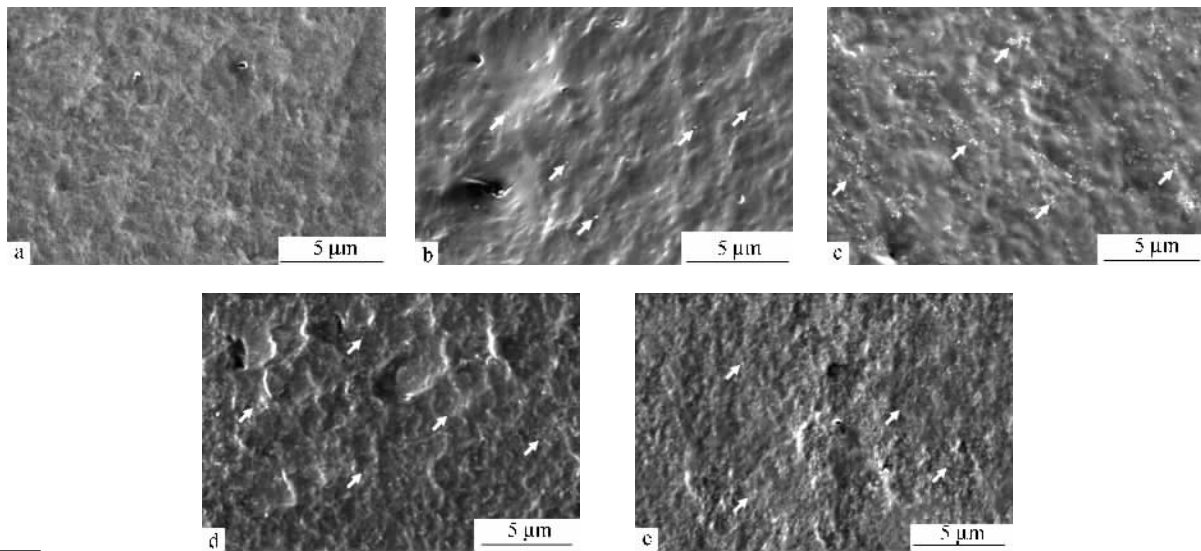


Fig. 1 Fracture of composite materials with different contents of silica

a) Pure silk fibroin ;b) Content of silica sol is 1% ;c) Content of silica sol is 5% ;d) Content of silica sol is 10% ;e) Content of silica sol is 15% Particles of silica are pointed out by white arrows.

2.2 丝蛋白/二氧化硅复合材料中丝蛋白的构象

对样品的 Raman 光谱测试显示,纯丝蛋白膜和丝蛋白/二氧化硅复合膜的酰胺 I 和酰胺 III 谱带均分别出现于 1666 cm^{-1} 和 1234 cm^{-1} 处,表明材料中的丝蛋白主要呈 β -折叠构象(图 2)。出现这样情况的原因主要是,制备过程中为了使样品致密且具有一定的厚度(约 5 mm),复合材料是由 26% 的丝蛋白浓溶液与硅溶胶混合,经长时间缓

慢干燥而形成的。时间对丝蛋白构象转变的诱导作用应该是使其逐渐由无规线团构象向 β -折叠构象转变的主要原因^[6]。为了检验复合材料中构象转变是否完全,我们将经过 80% 乙醇溶液处理 24 h^[19] 的同样样品做了对比实验,其 Raman 图谱的酰胺键特征峰与未经处理的样品图谱完全一致(图略)。因此,可以确定丝蛋白分子链在复合材料的制备过程中已经完成了构象的转变。

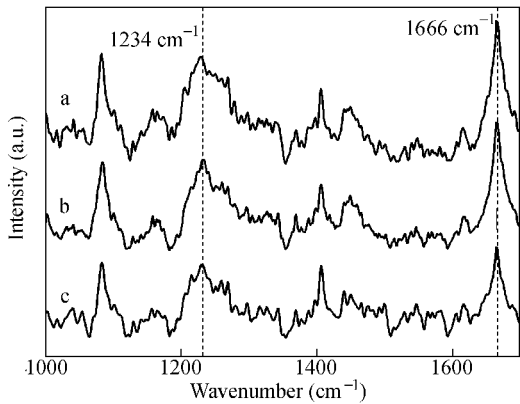


图 2 Raman spectra of materials with different contents of silica
a) Pure regenerated silk fibroin (RSF) membrane ; b) RSF/SiO₂ composite membrane with 1% silica sol ; c) RSF/SiO₂ composite membrane with 15% silica sol

2.3 丝蛋白与二氧化硅复合材料动态力学测试

图 3 显示了复合材料在 10 Hz 振动频率下的压缩储存模量和损耗角随着温度的变化曲线. 纯丝蛋白膜在 - 50℃ 到 15℃ 的范围内的储存模量基本保持稳定, 约为 1000 MPa. 而当温度上升至 15 ~ 25℃ 时, 样品的储存模量有明显的下降, 45 ~ 55℃ 时有所回升至较初始模量略低的水平, 约在 70℃ 时, 又开始大幅度的下降, 135℃ 左右降至最低, 但此时储存模量仍有 400 MPa 左右, 继续升温至 200℃, 材料发生永久形变. 储存模量曲线上丝蛋白样品的两次清晰“转变”过程, 在损耗角随温度变化的曲线上则显示为分别处在约 40℃ 和 100℃ 的损耗峰. 振动频率为 1 Hz 时的实验也重复了这个现象. 丝蛋白材料储存模量在 15 ~ 25℃ 下降和在 55℃ 左右回升的现象在丝蛋白薄膜在频率为 1 Hz 的动态拉伸研究中^[20] 和脱胶丝在 10 Hz 频率下动态拉伸实验中都有报道^[21,22]. 这个现象很可能是由于 15 ~ 40℃ 时, 丝蛋白链段的活性增加, 链段之间的相对运动导致储存模量的降低和损耗的增加. 而蛋白质在 70 ~ 135℃ 的模量变化则更可能是压缩过程中分子链间的滑移造成储存模量的大幅度下降和损耗的剧烈增加.

经过对不同组分样品的对比发现, 二氧化硅组分的加入对丝蛋白材料初始模量的影响并不明显, 复合材料在 - 50 ~ 15℃ 温度范围的压缩模量平均值与纯丝蛋白膜的压缩模量平均值基本相同. 而在 15℃ 之后, 随着二氧化硅组分的增加, 材料储存模量下降的幅度逐渐减小, 而模量开始回升的温度也逐渐降低, 在二氧化硅组分达到 10%

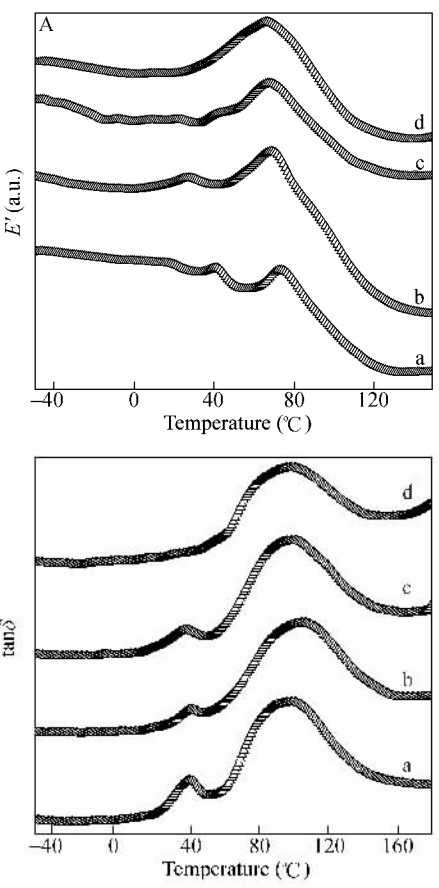


Fig. 3 DMA compression curves
(A) Storage modulus (E') curves of composite materials with (a) 0%, (b) 1%, (c) 5%, (d) 10% of silica sol ; (B) Loss angle ($\tan\delta$) curves of composite materials with (a) 0%, (b) 1%, (c) 5%, (d) 10% of silica sol

时, 储存模量在 15℃ 时未发生下降, 而是从 25℃ 开始上升. 从损耗角随温度变化的图线, 我们可以更明显的看出丝蛋白材料在 40℃ 时的损耗角峰值随着二氧化硅组分的逐渐增加而逐渐减小, 在二氧化硅组分达到一定量时, 这个特征峰消失, 而 100℃ 附近的损耗峰亦随着二氧化硅的增加而减小.

由于进行动态力学测试时, 固体材料中的水分对其硬度和力学性能有着很密切的联系, 而且, 随着测试中温度的上升, 水分会从材料中逐渐蒸发, 因此也有一些文献中对丝蛋白材料在 15 ~ 60℃ 的模量变化现象解释为在这个温度下水分的散失引起材料硬度的变化^[20]. 为了将水分的影响排除, 得到关于材料内部结构的信息, 我们采取多次升温的方法, 第一次升温至 120℃ 时, 在材料未发生永久形变的前提下, 保证材料内部的水分完全除尽. 保持仪器的密封, 将温度降至 - 50℃, 进

行第二次升温. 同样升至 120℃ 后, 再次降温进行第三次升温扫描. 得到的纯丝蛋白材料的模量以及损耗的结果见图 4. 由图 4(a) 可以看出, 对经过多次升温—冷却过程的丝蛋白材料, 由于水分的丧失, 第二次扫描得到的材料初始模量比第一次扫描发生了显著的提高(由 1000 MPa 左右的平均值升高至 2000 MPa 左右); 由于此时材料中的含水量已经非常少了, 第三次扫描图谱与第二次基

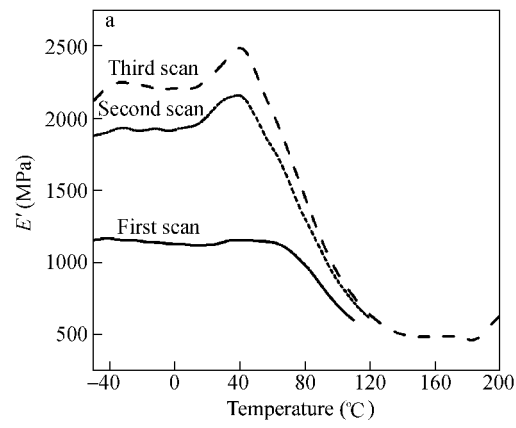


图 4 Storage modulus (E') curves of multi-scanning RSF membrane (a) and Loss angle ($\tan\delta$) curves of multi-scanning RSF membrane (b)

因此, 二氧化硅的加入造成丝蛋白材料压缩动态力学性质变化, 应该归因于二氧化硅对丝蛋白结构的影响, 即二氧化硅在复合材料中是以微小粒子的形式非常均匀地分散在以 β -折叠结构为主的丝蛋白连续介质中, 二氧化硅分散介质的阻碍作用加上稳定的丝蛋白 β -折叠构象的限制, 导致复合材料的链段活性减弱, 进而影响了材料力学性质随着温度的变化.

3 结论

对于由浇铸成型的再生丝蛋白/硅溶胶复合

REFERENCES

- 1 Qian J, Liu Y, Liu H, Yu T, Deng J. *Fresenius J Anal Chem*, 1996, 354: 173 ~ 178
- 2 He S J, Valluzzi R, Gido S P. In *J Bio Macromol*, 1999, 24: 187 ~ 195
- 3 Liu Yongcheng (刘永成), Shao Zhengzhong (邵正中), Sun Yuyu (孙玉宇), Yu Tongyin (于同隐). *Chinese Polymer Bulletin (高分子通报)*, 1998, (3): 17 ~ 23
- 4 Ayub Z H, Arai M, Hirabayashi K. *Polymer*, 1994, 35: 2197 ~ 2200
- 5 Thiel B L, Guess K B, Viney C. *Biopolymers*, 1997, 41: 703 ~ 719
- 6 Magoshi J, Magoshi Y, Nakamura S. Mechanism of fiber formation of silkworm, in silk polymers: materials science and biotechnology. In: Kaplan D, Adams W, Farmer B eds. *American Chemical Society Symposium Series 544*. Washington D C: American Chemical Society, 1994. 292 ~ 310
- 7 Valluzzi R, Gido S P. *Biopolymers*, 1997, 42: 705 ~ 717
- 8 Nemoto R, Wang L, Ikoma T, Tanaka J, Senna M. *J Nanopart Res*, 2004, 6: 259 ~ 265
- 9 Nemoto R, Nakamura S, Isobe T, Senna M. *J Sol-Gel Sci Techn*, 2001, 21: 7 ~ 12

材料, 纳米级的二氧化硅聚集体能够稳定均匀地分布在作为连续相的丝蛋白中. 丝蛋白稳定的 β -折叠结构以及二氧化硅微粒的阻碍, 使得复合材料中分子链段间的相对运动减弱, 其动态力学性能得以改善. 实验结果表明, 当二氧化硅组分含量达到 10% 时, 可以避免丝蛋白材料在 40℃ 时的特征模量损失.

- 10 Wang L, Nemoto R, Senna M. J Eur Ceram Soc, 2004, 24: 2707 ~ 2715
- 11 Chen Jianyong (陈建勇), Feng Xinxing (冯新星), Xu Dan (许丹). Acta Polymerica Sinica (高分子学报), 2006, (5): 649 ~ 653
- 12 Coradin T, Durupthy O, Livage J. Langmuir, 2002, 18: 2331 ~ 2336
- 13 Coradin T, Coupe A, Livage J. Colloid Surface B, 2003, 29: 189 ~ 196
- 14 Iler R K. The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry. New York: Wiley, 1979
- 15 Smitha S, Mukundan P, Pillai P K, Warriar K G K. Mater Chem Phys, 2007, 103: 318 ~ 322
- 16 Tsukada M, Freddi G, Crighton J S. J Polym Sci Pol Phys, 1994, 32: 243 ~ 248
- 17 Chen X, Shao Z Z, Zhou L. China patent, ZL 03142201.2. 2005-09-21
- 18 Vrieling E G, Beelen T P M, van Santen R A, Gieskes W W C. Angew Chem Int Edit, 2002, 41: 1543 ~ 1546
- 19 Chen X, Shao Z, Marinkovic N S, Miller L M, Zhou P, Chance M R. Biophys Chem, 2001, 89: 25 ~ 34
- 20 Lee K H. Macromol Rapid Comm, 2004, 25: 1792 ~ 1796
- 21 Freddi G, Kato H, Tsukada M, Allara G, Shiozaki H. J Appl Polym Sci, 1995, 55: 481 ~ 487
- 22 Tsukada M, Freddi G, Shiozaki H, Kasai N, Kobayashi M. Angew Makromol Chem, 1996, 241: 41 ~ 56

COMPOSITE MATERIAL MADE OF REGENERATED SILK FIBROIN AND SILICA SOL

CHENG Cheng, SHAO Zhengzhong, CHEN Xin

(Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers of Ministry of Education, Advanced Materials Laboratory,
Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract Regenerated silk fibroin solution and silica sol were mixed to produce the silk fibroin/silica composite materials. In order to probe if there is interaction between silk protein and silica, and further more, whether the interaction can improve the mechanical properties of composite materials, the structure and properties of the silk fibroin/silica composite material were studied by dynamic mechanical analysis (DMA) together with scanning electron microscopy (SEM) and Raman spectroscopy. The SEM results revealed the good compatibility between silk fibroin and silica in the composite. Nano-sized silica particles dispersed evenly in the continuous matrices of silk fibroin. Raman spectra of the composite materials indicated that the silk fibroin was dominated by β -sheet conformation. Comparing to the pure silk fibroin material, the composites showed better dynamic mechanical properties in the range of 15°C to 55°C. When the content of silica reached 10%, the composite material appeared absolutely no dissipation in the temperature range around 40°C. Due to both the hydrogen bond and electrostatic interaction between SiO_2 and silk fibroin, the silica particles' interdiffusion among the chains of protein had a motive-impeding influence on the protein chains. This influence together with the stable β -sheet conformation of silk fibroin matrices led the avoidance of modulus dissipation of the material.

Keywords Silk fibroin, Silica sol, DMA, Composite material