

Instantaneous Gelatination of Silk Fibroin Solution*

Yiyun Shen^{1,2}, Shan Sun¹, Fang Zhang¹, Shenzhou Lu^{1#}

¹National Engineering Laboratory for Modern Silk, Soochow University, Suzhou

²College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou

Email: [#]lushenzhou@suda.edu.cn

Received: Jul. 10th, 2013; revised: Aug. 2nd, 2013; accepted: Aug. 16th, 2013

Copyright © 2013 Yiyun Shen et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Protein solution has a tendency of gelation. For silk fibroin solution, it needs more than ten days to gel at room temperature. This paper proposes an efficient method to promote instant silk fibroin gelatinization. SEM analysis showed that the instantaneous silk hydrogel had a porous three-dimensional network structure with random curves crossed inside. Besides, there are a lot of micro globular structures cross-boned together. The results from X-ray Diffraction (XRD) and Fourier Transform Infrared spectrum (FTIR) showed that the molecular structure of silk fibroin has little change and maintains random coils during the rapid gelation process. This kind of instantaneous hydrogel has excellent mechanical properties and moisture retention performance, so it can be used for moisturizing cosmetics and tissue engineering material.

Keywords: Silk Fibroin; Instantly Gelation; Hydrogel; Structure

丝素溶液的瞬时凝胶化*

沈漪云^{1,2}, 孙 姗¹, 张 芳¹, 卢神州^{1#}

¹现代丝绸国家工程实验室, 苏州大学, 苏州

²医学部药学院, 苏州大学, 苏州

Email: [#]lushenzhou@suda.edu.cn

收稿日期: 2013年7月10日; 修回日期: 2013年8月2日; 录用日期: 2013年8月16日

摘 要: 蛋白质溶液具有凝胶化趋势, 其中丝素蛋白的凝胶化在常温下需要十几天的时间。本文提出了一种促使丝素蛋白瞬时凝胶化的方法, 该方法能够促使丝素蛋白水凝胶瞬时形成。SEM分析显示该水凝胶内部为疏松多孔的三维交联网状无规则卷曲结构, 且有很多微球状的结构交联在一起。利用X衍射、红外光谱等手段进行检测, 结果显示丝素蛋白分子快速凝胶化过程中, 其分子结构基本保持无规卷曲不变。该瞬时凝胶化的丝素水凝胶具有一定的力学性能和保水性能, 可以用于化妆品以及组织工程材料。

关键词: 丝素蛋白; 瞬时凝胶化; 水凝胶; 结构

1. 引言

水凝胶是一种具有三维网络结构的交联大分子, 内部呈多孔状, 能够吸收和保持大量水分^[1], 溶质可

在其中扩散和透过, 既能为细胞提供立足地, 又能够将扩散性的生长因子提供给粘附着的细胞表面, 表现出优良的生物相容性。因此在临床医学领域具有广泛的应用, 主要用作药物释放载体和组织工程支架。此外在隐形眼镜, 光学器件和生物传感器薄膜, 人工皮肤等方面也有重要的应用。目前国内外已经对再生家

*资助信息: 教育部留学回国人员科研启动基金, 南通市科技项目(BK2012095), 中国博士后科学基金资助项目(2013M531418)。

[#]通讯作者。

蚕丝素水凝胶进行了比较全面的研究^[2-5]。但是丝素蛋白水凝胶的形成需要十几天的时间,本文提出了一种瞬时制备蚕丝蛋白水凝胶的方法,促使凝胶瞬时形成。由于蚕丝蛋白本身具有的营养成分和生物活性,这种方法制备的水凝胶就可以作为一种天然的面膜被应用到护肤品中,与传统的无纺布面膜和市面上以蚕丝蛋白为精华液添加的面膜相比具有极大的优势,在化妆品应用中具有极大前景^[6,7]。

2. 实验材料与方法

2.1. 丝素溶液的制备

将半束家蚕丝置于煮沸的质量分数为 0.05%的 Na_2CO_3 溶液中,煮沸处理 30 min,重复 3 次,以脱去蚕丝中的丝胶。在 60℃烘箱中烘干后得到精练蚕丝。精练丝采用 9.3 mol/L 的溴化锂进行溶解,置于恒温磁力搅拌器中于 65℃ ± 2℃下搅拌溶解半小时后,经透析、过滤、浓缩后得到丝素水溶液,并在 105℃下测试其体积分数。

2.2. 丝素蛋白水凝胶的制备

将十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)溶液以 40 mmol/L 的浓度加入到丝素溶液中,充分搅拌混合均匀,置于 37℃恒温的生化培养箱中,瞬时凝胶化获得 CTAB-SF 水凝胶。

2.3. 凝胶时间的测定

将 CTAB 溶液以 40 mmol/L 的浓度加入到丝素蛋白溶液中,充分混匀后置于 24 孔板中,并取纯丝素样品作为对照,最终的混合溶液中丝素蛋白的浓度为 50 g/L。将 24 孔板放入 Synergy HT 型多功能酶标仪中,在 37℃下每隔一定时间在波长为 550 nm 下测定相应样品的吸光度值(OD),并用此 OD 值来表征相应丝素样品的凝胶时间^[8]。

2.4. 流变性能

取适量的 CTAB-SF 丝素凝胶,采用美国 AR2000 流变仪在 37℃下进行频率扫描,采用锥板直径为 20 mm,锥度为 1°,扫描范围为 1~100 rad/s^[9]。因为纯丝素凝胶的粘弹性和流动性不适合流变性能的测试,故在此不作参照。

2.5. 压缩力学性能

制备 CTAB-SF 共混水凝胶和纯丝素水凝胶,置于 37℃恒温培养箱中直至凝胶彻底形成,在用打孔模具将其制成 14 mm(直径) × 9 mm(高)的圆柱型凝胶样品,在 INSTRON-3356 型万能材料试验机上进行压缩力学测试,测试温度为 25℃,压缩变形速度恒定为 5 mm/min,每种样品作六个平行样。根据样品截面形状和厚度变化,可计算得出压缩应力(KPa)和应变(%),并以此作应力 - 应变曲线。

2.6. 形貌观察

将纯丝素凝胶、CTAB-SF 凝胶放入液氮中,速冻固定,真空干燥备用。用切片器切取一定体积的冻干凝胶样品,表面喷金 60 秒钟后,采用日本 Hitachi S-4800 型扫描电子显微镜(SEM),观察凝胶的截面形貌。

2.7. 结构测试

取冻干后的样品,研磨成直径小于 80 μm 的粉末,用于 X 射线衍射(XRD)测试,记录 $2\theta = 5^\circ \sim 45^\circ$ 之间的衍射强度曲线。红外吸收光谱(FTIR)测定采用 KBr 压片法,测试 400~4000 cm^{-1} 的吸光度。

2.8. 保湿性能测试

在培养皿中制备直径为 3 cm,厚度为 1 mm 的 CTAB-SFG 和甘油-CTAB-SFG 水凝胶片,先测其原始质量 W_0 ,放于聚四氟乙烯板上,置于 37°烘箱中,每 20 分钟取出称其质量,记为 W_n ,并用公式(1)计算单位面积质量损失量,以纯水、纯丝素溶液做对照样,作单位面积质量损失量随时间的变化曲线。

$$\text{单位面积质量损失量}(\text{g}/\text{cm}^2) = (W_0 - W_n) / (\pi * 1.5^2) \quad (1)$$

3. 结果与讨论

3.1. 凝胶时间

将丝素溶液与 CTAB 混合后,其凝胶时间的测定基于在 37℃下吸光度(OD)值随时间的变化,以此来表征浑浊度的变化。各时间点测得的纯丝素和 CTAB-丝素混合溶液的 OD 值变化如图 1 所示。由图可知,

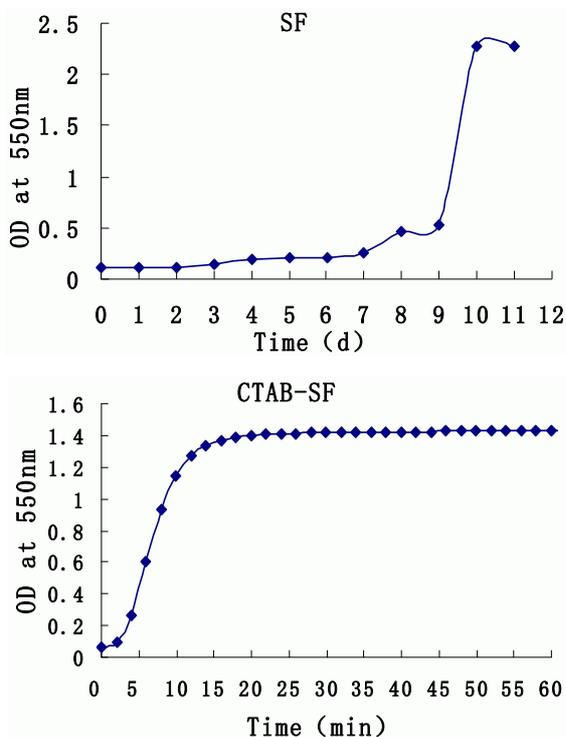


Figure 1. The gelation process of the silk fibroin solution
图 1. 丝素溶液的凝胶过程

纯丝素溶液的凝胶时间在 10 天左右；而 40 mM 的 CTAB 的加入会明显加快丝素的凝胶，OD 值瞬时增大，说明此时溶液已经开始形成凝胶，当 OD 值达到最大不再发生变化时，说明凝胶过程已经完成，由此可以说明，40 mM 的 CTAB-SF 凝胶瞬时形成，持续 20 min 之后完成。

3.2. 凝胶的形貌观察

由图 2 可以看出纯丝素凝胶(SFG)、CTAB-SF 凝胶在冻干后的截面形貌。纯丝素凝胶内部为紧密相连的片状结构，加入 CTAB 以后，丝素凝胶由原来变为疏松多孔的无规则卷曲结构，且可观察到很多微球状的结构，在结构上使其具有优良的弹性形变。

3.3. 丝素蛋白凝胶的结构

由 CTAB 引发的丝素凝胶(CTAB-SFG)、纯丝素凝胶(SFG)和丝素溶液(SFS)的结构如图 3 所示。图 3 显示，纯丝素凝胶在 9.2°，20.7°，24.3°附近出现了吸收峰，这些特征衍射峰表明纯丝素凝胶中的丝蛋白为

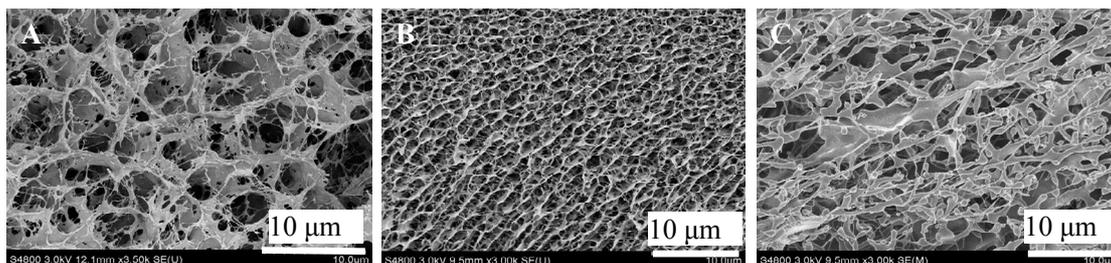


Figure 2. SEM images for freeze-dried silk hydrogels (A), silk solution (B) and CTAB-SF hydrogels (C)
图 2. 纯丝素凝胶(A)、丝素溶液(B)和 CTAB-SF 凝胶(C)的电镜照片

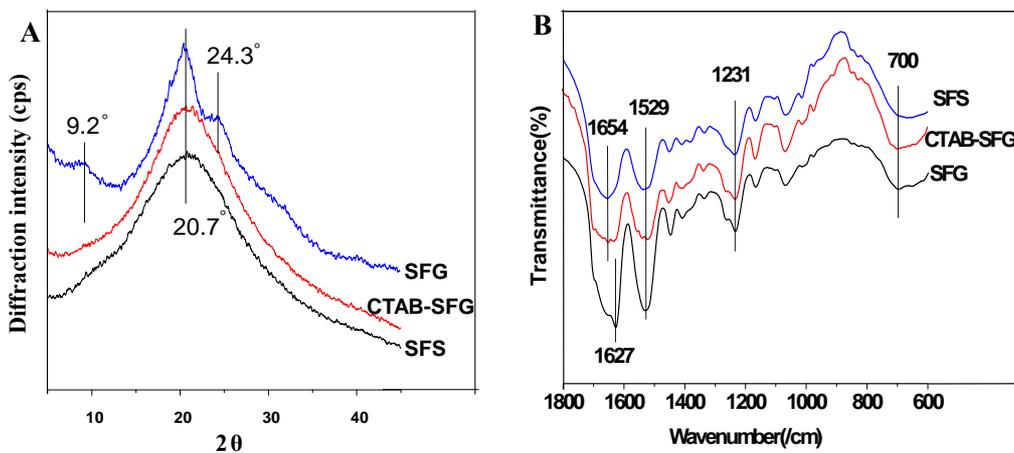


Figure 3. XRD curves (A) and FTIR data (B) collected from silk solution, pure silk gel and CTAB-SFG silk gels
图 3. 丝素溶液，纯丝素水凝胶，CTAB-SF 丝素水凝胶的 X-衍射曲线(A)和红外光谱(B)

Silk II (β -折叠) 结晶结构^[10]。CTAB-SFG 凝胶样品在 9.2°, 24.3° 处则没有明显的特征峰, 与丝素蛋白的溶液相似, 说明瞬时形成的 CTAB-SFG 凝胶与丝素蛋白溶液的结构基本相同。

根据丝素凝胶样品的红外光谱可以看出, 纯丝素凝胶的红外吸收峰出现在 1627 cm^{-1} , 为酰胺 I 谱带范围内, 强的 β -折叠结构吸收峰, 在 1529 cm^{-1} , 1231 cm^{-1} , 700 cm^{-1} 附近也出现明显的特征吸收峰, 分别各属于酰胺 II, 酰胺 III 和酰胺 IV 谱带范围, 为典型的 β -折叠结构。而 CTAB-SFG 凝胶样品的 FTIR 峰出现在 1654 cm^{-1} , 与纯丝素溶液的峰位置较一致, 表现为典型的无规卷曲结构^[11], 说明瞬时形成的 CTAB-SFG 凝胶与丝素溶液的结构基本相同。

3.4. 流变性能

图 4 显示了 CTAB-SF 凝胶的储能模量 G' 、损耗模量 G'' 随扫描频率的变化, 在所采用的扫描频率下, 该凝胶的储能模量 G' 始终大于损耗模量 G'' , 所以该 CTAB-SF 凝胶是典型的弹性体, 且凝胶结构比较稳定。

3.5. 压缩性能

对纯丝素凝胶和 CTAB-SF 凝胶进行轴向压缩试验, 其应力-应变曲线如图 5 所示, 由图可见, 两种丝素凝胶样品的压缩应力-应变曲线均表现出一定的非线性行为, 说明材料具有一定的粘弹性, 当应变达到 35% 以后, 纯丝素凝胶的应力开始出现波动, 说明内部已经出现了裂痕, 但是应力仍然在增加, 应变达到 50% 以后, 应力略有下降, 逐渐趋于平稳, 此时的凝胶柱体已经碎裂, 但是并未完全崩塌。而 CTAB-

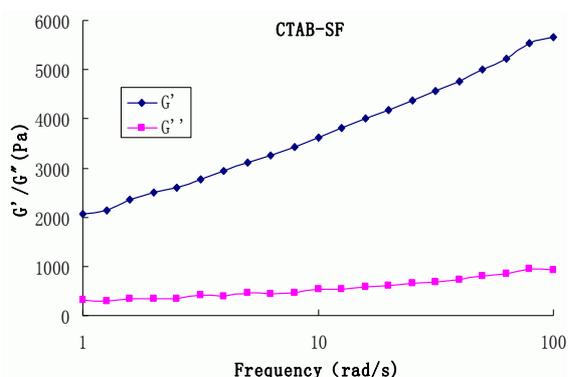


Figure 4. Rheological property of CTAB-SF hydrogels
图 4. CTAB-SF 凝胶的流变性能

SF 共凝胶在应变达到 66% 时应力仍呈现非线性增长的趋势, 说明凝胶内部仍未出现断裂, CTAB 的加入能够提高丝素凝胶的破坏应变。在同样的应力下, CTAB-SF 共凝胶的应变远大于纯丝素凝胶, 说明纯丝素凝胶的刚性比较大, 而 CTAB-SF 水凝胶的弹性优于纯丝素凝胶。

3.6. 丝素凝胶保湿性能

由图 6 中可以看出, 水、丝素溶液、CTAB-SF 凝胶和加入甘油后的 CTAB-SF 凝胶, 其失水率与时间均大致成线性关系。比较 4 条曲线的斜率发现, 随着时间的延长, 其单位面积质量损失率依次减小, 保湿性能依次增加, 说明水凝胶的形成能大大改善丝素溶液的保湿性能。甘油本身具有良好的保湿性能, 在 CTAB-SF 凝胶中加入甘油后其保湿性能更加优良。

4. 结论

在再生丝素蛋白溶液中添加一定浓度的 CTAB,

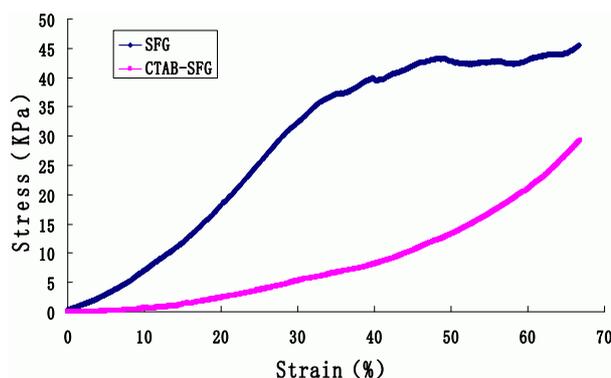


Figure 5. Compression properties of silk gel
图 5. 丝素凝胶的压缩性能

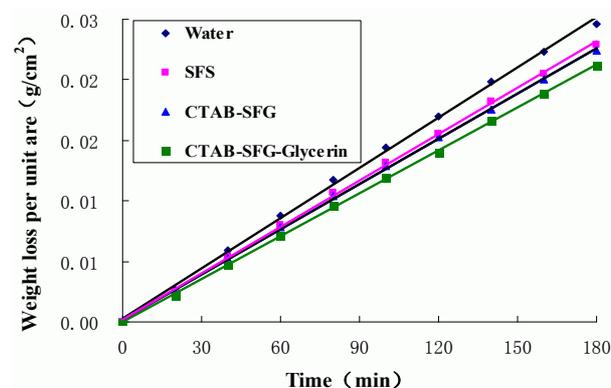


Figure 6. Moisturizing performance of silk gel
图 6. 丝素凝胶保湿性能

可以快速诱发 CTAB-SF 水凝胶的形成, 并且该水凝胶具有优良的弹性和良好的保湿性能, 内部为疏松多孔、三维网状交联的无规则卷曲结构, 可以用于保湿护肤和创面敷料等各方面用途。

参考文献 (References)

- [1] L. Yu, J. Ding. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37(8): 1473-1481.
- [2] J. L. Drury, D. J. Mooney. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 2003, 24(24): 4337-4351.
- [3] Q. Lu, Y. Huang, M. Li, B. Zuo, S. Lu, J. Wang and H. Zhu. Silk fibroin electrogelation mechanisms. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(6): 2394-2400.
- [4] S. Lu, X. Wu and M. Luo. Silk fibroin sol-gel transitions in different solutions. *Advanced Materials Research*, 2011, 175-176: 153-157.
- [5] X. Wu, J. Hou, M. Li, J. Wang, D. L. Kaplan and S. Lu. Sodium dodecyl sulfate-induced rapid gelation of silk fibroin. *Acta Biomaterialia*, 2012, 8(6): 2185-2192.
- [6] 李志林, 吴瑞红. 蚕丝蛋白开发利用的研究进展[J]. *广东化工*, 2006, 2: 16-19.
- [7] 王方林, 韩艳霞, 陈伟. 蚕丝蛋白水解工艺及作为化妆品添加剂的应用研究[J]. *化学世界*, 2006, 9: 541-547.
- [8] A. Matsumoto, J. Chen, A. L. Collette, U. J. Kim, G. H. Altman, P. Cebe and D. L. Kaplan. Mechanisms of silk fibroin sol-gel transitions. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110(43): 21630-21638.
- [9] A. E. Terry, D. P. Knight, D. Porter and F. Vollrath. pH induced changes in the rheology of silk fibroin solution from the middle division of *bombyx mori* silkworm. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3): 768-772.
- [10] M. Li, S. Lu, Z. Wu, K. Tan, N. Minoura and S. Kuga. Structure and properties of silk fibroin-poly(vinyl alcohol) gel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2002, 30(2): 89-94.
- [11] X. Chen, D. P. Knight, Z. Shao and F. Vollrath. Regenerated Bombyx silk solutions studied with rheometry and FTIR. *Polymer*, 2001, 42(25): 9969-9974.