

文章编号 : 0253-9721(2007)05-0018-05

丝胶蛋白质溶液的动态表面吸附过程

阳建斌^{1,2}, 朱谱新¹, 杨红伟¹, 吴大诚¹

(1. 四川大学 纺织研究所, 四川 成都 610065; 2. 成都纺织高等专科学校, 四川 成都 611731)

摘 要 采用 Wilhelmy 吊片法测定一定浓度的丝胶溶液在不同 pH 条件下的动态表面张力, 通过数学经验公式分析动态吸附数据, 从吸附模型、吸附分子面积和吸附速率等方面, 说明丝胶溶液的动态表面吸附有扩散和动力学吸附 2 个过程。在不同 pH 条件下, 以丝胶溶液的动态表面压 p 对吸附时间 t , 动态表面张力 γ_t 对 $\lg t$, 以及 $\ln(dp/dt)$ 对 p 作图, 根据经验公式推导出丝胶溶液表面张力下降一半时的时间 $t_{1/2}$ 、丝胶蛋白质分子吸附控制参数 n 、丝胶分子在界面上初始渗透和固定时所占面积 ΔA_1 、以及在界面上重排和再取向时所占面积 ΔA_2 。结果表明: 丝胶蛋白质分子的吸附过程是扩散-动态吸附; 在表面上吸附的丝胶蛋白质分子的构象转变存在 2 个动态过程, 即在界面上的分子发生初始渗透和固定阶段, 以及吸附在表面上的分子发生重排和再取向阶段; 丝胶溶液的 pH 值影响动态表面张力和分子吸附面积; 在 pH 值低于丝胶等电点时, 丝胶分子在界面初始吸附和重排面积较小, 动态表面张力较高, 表面吸附速度较慢, 当 pH 值高于等电点, 表面张力变小, 吸附速度加快, 丝胶在界面吸附的分子面积变大。

关键词 丝胶; 动态表面张力; 吸附; 分子面积

中图分类号: TQ340.1 文献标识码: A

Dynamic adsorption process of sericin protein solutions

YANG Jianbin^{1,2}, ZHU Puxin¹, YANG Hongwei¹, WU Dacheng¹

(1. Textile Institute, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China;

2. Chengdu Textile College, Chengdu, Sichuan 611731, China)

Abstract The dynamic surface tensions of sericin solutions at a given concentration and different pH values were measured by Wilhelmy plate method. Such curves were plotted according to the dynamic surface tension (γ_t) data in different pH, as surface pressure p versus adsorption time t , the relationship between surface pressure and time, $\gamma_t - \lg t$, and $\ln(dp/dt) - p$. The curves were analyzed by using some experiential expressions to elucidate the dynamic adsorption behavior, through which the adsorption parameters were deduced of adsorption half-time ($t_{1/2}$, the time required for surface tension decreasing to the half of the equilibrium value), the constant controlling adsorption mode (n), the mean molecule area of the molecule occupied at the interface both in initial penetrated and anchored state (ΔA_1) and in rearranged and reoriented state (ΔA_2). The results indicated that the adsorption process of sericin protein is attributed to a model of diffusion-controlled adsorption kinetics. The conformational transformation of sericin protein molecules adsorbed at the surface undergoes two dynamic steps. The first is initial penetration and anchoring of the molecule from aqueous solution to the surface, and the other is the rearrangement and reorientation of the adsorbed molecule at the interface. The pH value of sericin solution has influences on the dynamic surface tension and the adsorbed molecule area. When pH value of sericin solution is smaller than the equipotential point of sericin protein, ΔA_1 and ΔA_2 are smaller; the dynamic surface tension is higher; and the adsorption rate becomes slower, in comparison with those in the pH value higher than the equipotential point.

Key words sericin; dynamic surface tension; adsorption; mean molecular area

收稿日期: 2006-07-26 修回日期: 2006-12-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50673062)

作者简介: 阳建斌(1969—), 男, 副教授, 博士生。主要研究领域包括材料的表面与界面、染整工程等。朱谱新, 通讯作者,

E-mail: puxinzhu@sina.com。

蛋白质溶液的动态表面吸附性质在许多科学技术领域,特别是在生物科学领域中发挥着重要的作用^[1-2]。在超分子科学中,蛋白质分子在二维单分子膜中的构象和性质,以及蛋白质分子的层状自组装膜等受到较多的关注。人们正在试图通过分子膜技术制造一系列蛋白质分子器件,包括生物传感器、生物芯片、生物纳米功能材料等^[3]。

丝胶是一种天然蛋白质大分子,在蚕丝脱胶工艺中可大量回收。这种可再生资源的许多良好性能正被开发和利用。例如,丝胶蛋白质能抗氧化和紫外线,能和聚合物交联、共聚和共混,可用于制备生物降解材料、生物医学材料和功能膜材料等,如制备PVA/丝胶交联膜用于分离乙醇和水,制备具有较好力学性能和热性能的丝胶聚氨酯合金等^[4],但是在分子水平上对丝胶蛋白质溶液的动态表面吸附性质及构象转变的研究少有报道。

丝胶是由蚕的中部丝腺分泌的蛋白质,并以层状方式包围在丝素纤维的外面,约占蚕丝质量的25%。在水溶液中丝胶蛋白质的大多数极性侧链位于分子表面形成亲水区,大多数非极性侧链总是埋藏在分子内部形成疏水核。当丝胶蛋白质自液相吸附到空气-水界面时,表面张力降低,说明有一部分非极性氨基酸残基的碳氢链必然分布于界面上^[5]。

丝胶蛋白质是模拟生物生理功能的理想模型物之一,其水溶液的性质是其工程应用的基础,因此,研究丝胶蛋白质在空气-水界面上的动态吸附性质及构象转变十分重要。为了阐明丝胶溶液的pH值对动态吸附过程的影响,本文测定了不同pH值条件下丝胶溶液的动态表面张力。采用这些动态数据分析了动态表面吸附过程、分子吸附面积等参数。

1 实验部分

1.1 丝胶蛋白质的制备

将1g蚕丝纤维在脂肪萃取器中(乙醚100mL)脱脂48h,然后在去离子水中煮沸1h,使丝胶溶解于水中,将其过滤后即得到丝胶蛋白质溶液。采用凝胶渗透色谱分析(AKTA™ explorer,缓冲液为0.05mol/L磷酸二氢钠+0.15mol/L氯化钠,pH值7.0)表明,丝胶的分子量分布较广,主要集中在26~35kDa。丝胶蛋白质含有18种氨基酸,其中有丝氨酸30.1%、天门冬氨酸16.8%、丙氨酸4.0%、谷氨酸10.1%、苏氨酸8.5%、甘氨酸8.8%、精氨酸4.2%、酪氨酸4.9%等^[5]。根据丝胶的氨基酸残基

比例,其肽链链节的平均分子量为98,可由此计算丝胶溶液的摩尔浓度^[6]。

1.2 动态表面张力的测定

采用Wilhelmy吊片法研究丝胶在气液界面上的吸附(Sigma 703表面张力仪,芬兰)。对相同质量浓度(7.9×10^{-3} mg/mL)的丝胶溶液采用缓冲体系调节溶液的pH值分别至3、4、5、6、7和8。缓冲溶液的配制采用A、B组分为原始溶液,其中,A组分:分别准备柠檬酸和磷酸溶液,使它们能够中和并消耗相同体积的1.0 mol/L氢氧化钠溶液,各取上述的柠檬酸和磷酸溶液100 mL混合,再加3.54 g硼酸和343 mL浓度为1.0 mol/L的氢氧化钠,然后用水稀释至1 000 mL;B组分为0.1 mol/L盐酸。缓冲溶液的配制方法为:100 mL (A) + x mL (B) + H₂O = 500 mL, x是根据pH值所需要添加的B组分量,当pH值为3、4、5、6、7、8时, x值分别为282.5、252.5、225.9、197.1、163.3、141.1 mL。

动态表面张力测定实验均采用二次去离子水,在恒温室中((16 ± 1) °C)进行。在16 °C下测得纯水的表面张力是73.3 mN/m,缓冲溶液的表面张力为75.6 mN/m。测定表面张力的程序:将不同pH值,质量浓度为 7.9×10^{-3} mg/mL的丝胶溶液100 mL缓慢倒入悬挂有张力传感铂片的聚四氟乙烯槽中,使吊片刚好浸入丝胶溶液,丝胶蛋白质即从溶液相吸附到新鲜的气液界面上,开始实时记录其动态表面张力^[7]。

2 结果与讨论

2.1 丝胶溶液的动态表面张力

采用Wilhelmy吊片法测定丝胶溶液在60 min内的动态表面张力 γ_t ,并研究溶液pH值的影响,以动态表面压 p (缓冲溶液表面张力与动态表面张力之差, $p = \gamma_0 - \gamma_t$)对吸附时间 t 作图(见图1),并以动态表面张力 γ_t 对 $\lg t$ 作图(见图2)。由图2可见,表面张力随吸附时间延长而下降。根据文献[8]的分析,表面张力的变化可分为4个阶段:诱导区、快速下降区、亚稳平衡区和平衡区。一般认为诱导区在 $(\gamma_0 - \gamma_t)/(\gamma_t - \gamma_m) = 1/10$ 时结束,快速下降区在 $(\gamma_0 - \gamma_t)/(\gamma_t - \gamma_m) = 1$ 时结束。对于前面3个区间,其动态表面张力可以描述为^[9]

$$(\gamma_0 - \gamma_t)/(\gamma_t - \gamma_m) = (t/t_{1/2})^n \quad (1)$$

式中: γ_t 为 t 时刻丝胶溶液的动态表面张力; γ_m 为

亚稳平衡表面张力; γ_0 为缓冲溶液的表面张力; $t_{1/2}$ 和 n 为常数, $t_{1/2}$ 具有时间尺度(即表面张力下降一半时的时间), n 无量纲。

对式(1)两边取对数,得到

$$\lg[(\gamma_0 - \gamma_t)/(\gamma_t - \gamma_m)] = n \lg t - n \lg t_{1/2} \quad (2)$$

用 $\lg[(\gamma_0 - \gamma_t)/(\gamma_t - \gamma_m)]$ 对 $\lg t$ 作图可得一直线,由直线的截距和斜率可计算得到丝胶溶液的 $t_{1/2}$ 和 n 等动态表面张力(DST)参数,列于表 1。

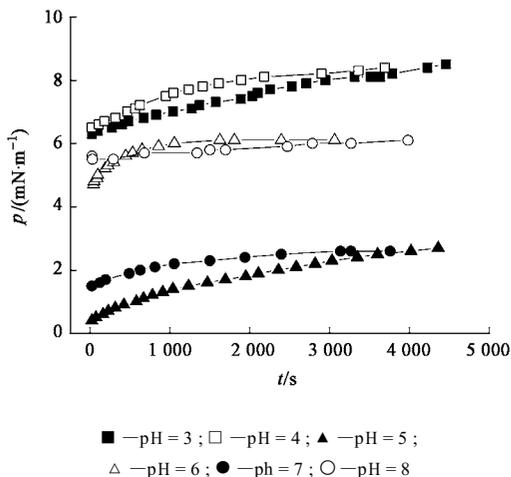


图 1 丝胶溶液在不同 pH 条件下的表面压差与吸附时间

Fig.1 Surface pressure and adsorption time for the bulk concentrations of sericin solution in different pH of solutions

参数 n 可以用于估计表面活性分子转移的机制。一般认为,表面活性分子转移到新鲜表面经历 2 个阶段:一是活性分子从本体溶液相扩散到次表面层,受到扩散过程控制;二是次表面层的活性分子被吸附到表面层,以及表面层的活性分子脱附到次表面层,受到吸附和脱附过程控制。Chang 等人^[6]综合以上过程提出一种扩散-动态吸附控制模型,其 $n \geq 1$;而对于单纯的扩散控制模型, $n = 0.5$ ^[10]。从表 1 可知,在 pH 值为 3 ~ 8 的不同条件下,均有 $n \geq 1$,表明丝胶溶液的动态表面性质是属于扩散-动态吸附控制模型。

$t_{1/2}$ 表示动态表面张力下降到一半时所需的时间,可以说明溶液降低动态表面张力的速率。一般文献认为丝胶等电点时 pH 为 3.8 ~ 4.5,但是它受蚕品种、产茧季节及丝胶在茧层上的部位等因素影响,而本文实验采用沉淀法测得等电点时 pH 约为 4.5 ~ 5.0。因此,在丝胶的等电点及以下,其 $t_{1/2}$ 约为 160 ~ 195 s,说明丝胶蛋白质带正电荷时表面活性较低;在丝胶的等电点以上时,其 $t_{1/2}$ 约为 85 s,仅为前者的一半,说明丝胶蛋白质分子带负电荷时降低表面活性的效率较高,且表面张力较低。这个结果说明丝胶溶液的表面活性与丝胶蛋白质分子在溶液表面上的构象转变有关。

丝胶是水溶性蛋白质,其肽链通过 63% ~ 68% 无规卷曲、23% ~ 34% β 折叠和 2% ~ 10% α 螺旋形成大分子构象,并随着溶液的 pH 值、离子强度等变化而发生构象的转变^[4]。当丝胶分子吸附到界面上时由于水分子环境发生变化,即丝胶分子受到界面上水分子不平衡的力场作用,疏水作用力减弱,会发生去折叠或去螺旋现象,使疏水内核暴露在外,分子链构象变得较为伸展,在界面上的疏水基伸向空气当中,从而减少表面张力。

另一方面,在不同的 pH 下其分子链伸展程度不同。由于带正电荷的氨基酸残基与带负电荷的氨基酸残基之比约 1:2.4,在高于等电点条件下,较多的氨基酸带有负电荷,使得蛋白质分子链伸展,有利于疏水基在界面吸附,因而表面张力较低,表面张力下降速度较快;在等电点以下蛋白质分子带正电荷,也有利于分子链伸展,但由于电荷数相对较少,降低表面张力的能力和效率都不如等电点以上的情况;而当 pH = 5(接近于等电点),分子链几乎不带电荷,不利于蛋白质分子链伸展,疏水链暴露较少,因此表面张力最高,表面张力下降速度较慢。

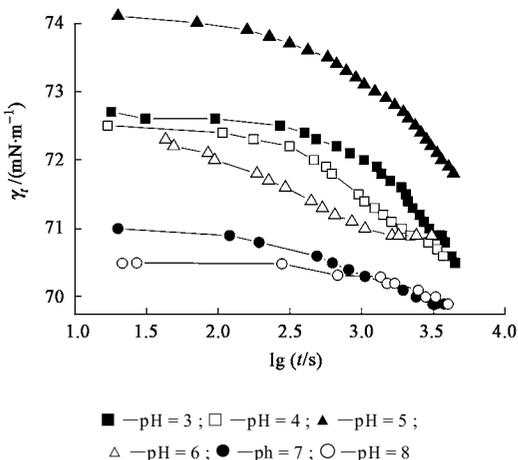


图 2 丝胶溶液的 pH 值对动态表面张力 γ_t 和 $\lg t$ 的影响

Fig.2 Effect of pH value on dynamic surface tension of sericin solutions and time

表 1 丝胶溶液的 DST 参数

Tab.1 DST parameters for sericin solution

pH 值	n	$t_{1/2}/s$	$\gamma_{ml}/(mN \cdot m^{-1})$
3	1.03	194.98	70.5
4	1.10	144.87	70.5
5	1.02	167.88	71.8
6	1.55	88.18	70.9
7	1.16	84.33	69.9
8	1.09	88.24	69.9

2.2 丝胶蛋白质在空气-水界面的吸附面积

当蛋白质从本体相吸附到表面时,它的二级结构会在表面伸展和重排,即变性,导致表面张力随时间变化。而丝胶溶液的 pH 值变化会影响在界面上排布的蛋白质的构象,进而影响表面张力,因此,利用 p 与 t 关系曲线的数据,根据动态表面压差的变化速率,可以得到丝胶在界面上吸附和重排的信息。丝胶分子从溶液中向表面吸附的速率可以用下式描述^[11]:

$$d\Gamma/dt = Kc_0 \exp(-p\Delta A/kT) \quad (3)$$

式中: $d\Gamma/dt$ 为表面吸附量的变化率; K 为吸附速率; c_0 为本体浓度; p 为表面压; ΔA 为吸附分子所占的面积; k 为 Boltzmann 常数; T 为温度。

因 $d\Gamma/dt = (d\Gamma/dp)(dp/dt)$, 式(3)经整理可写为^[11]:

$$\ln(dp/dt) = \ln(Kc_0/(d\Gamma/dt)) - p\Delta A/kT \quad (4)$$

根据图 1 的数据,由非线性曲线拟合后对 p 微分,用 dp/dt 对 p 作图(见图 3)。由图可见,在不同 pH 值条件下 dp/dt 对 p 曲线都是非线性的,但是可以分为 2 个线性区间。这表明在气液界面上形成蛋白质单分子膜至少有 2 个分子构象变化的过程^[11]。例如 pH=3 曲线,发生在 6.2~7.7 mN/m 的第 1 阶段可以认为是界面上分子的初始渗透和固定阶段,发生在 7.7~8.3 mN/m 的第 2 阶段与吸附在表面上的分子的重排和重取向有关。

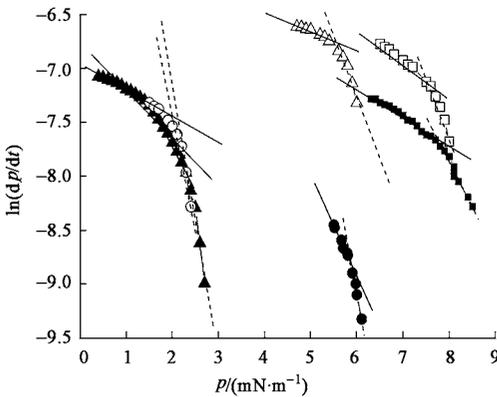


图 3 丝胶溶液的 $\ln(dp/dt)$ 与 p 关系曲线
Fig.3 $\ln(dp/dt) - p$ plots for sericin solutions

根据图 3 和式(4),从 2 段曲线的斜率计算得到 ΔA_1 和 ΔA_2 ,列于表 2。 ΔA_1 与丝胶分子在界面上固定并占据初始面积有关。 ΔA_2 是界面上重排和重取向分子链段所占的面积^[11]。当丝胶溶液的 pH 值低于等电点时(pH 值 3,4), ΔA_1 约 1.2 nm²。假设每

个氨基酸残基在界面所占的平均面积为 0.15 nm²^[11],可知丝胶分子中至少有 8 个氨基酸残基起着初始渗透和固定分子的作用。当丝胶溶液的 pH 值接近等电点时(pH 值 5,6),丝胶分子的正负电荷相等,分子间的静电作用力为零,此时分子呈较为紧密的无规线团构象,其 ΔA_1 约 0.95 nm²,仅有 6 个氨基酸残基初始渗透和固定在界面上。当丝胶溶液的 pH 值大于等电点时(pH 值 7,8), ΔA_1 较大,说明带负电荷的丝胶分子在初始吸附过程中,其构象较为伸展,使丝胶分子的疏水基暴露呈吸附态,至少有 15~25 个氨基酸残基固定在界面上。

表 2 丝胶蛋白质单分子在界面上的面积

Tab.2 Surface area per sericin protein molecule at the air-water interface

pH 值	初始吸附阶段 $\Delta A_1/$		分子重排阶段 $\Delta A_2/$	
	nm ²		nm ²	
3	1.13		3.03	
4	1.36		6.67	
5	0.97		3.47	
6	0.95		5.73	
7	1.93		8.98	
8	3.69		7.81	

ΔA_2 是丝胶分子在界面上重排所占面积,此时分子构象逐渐较为伸展和松弛,固定的氨基酸残基增多,分子所占的面积较大。其分子面积与溶液的 pH 值有一定的相关性。从表 2 可见,当丝胶分子带正电荷时,其 ΔA_2 较小;当丝胶分子带负电荷时,其 ΔA_2 较大。由此证实了 2.1 节的分析。

3 结 论

本文研究了丝胶蛋白质在空气-水界面上的动态表面吸附过程。测定和计算了动态表面张力、分子吸附面积等参数,以表征丝胶溶液的动态表面吸附过程和吸附分子构象转变性质。

在不同的 pH 条件下,丝胶溶液的动态吸附参数 $n \geq 1$,表明其动态表面性质不是单纯的扩散模型,而属于扩散-动态吸附控制模型。 $t_{1/2}$ 数据说明在不同的 pH 条件下,丝胶蛋白质分子所带电荷的变化引起溶液表面吸附的丝胶分子构象的变化,从而影响溶液的表面活性。根据丝胶溶液 $\ln(dp/dt)$ 与 p 关系曲线的 2 段直线斜率 ΔA_1 和 ΔA_2 ,说明在表面上吸附的丝胶蛋白质分子的构象转变存在 2 个动态过程,即在界面上的分子初始渗透和固定阶段,

以及吸附在表面上的分子发生重排和再取向阶段。

丝胶溶液的 pH 值影响动态表面张力和分子吸附面积。在等电点附近并低于等电点 (pH 值为 4.5 ~ 5.0) 的条件下,丝胶分子在界面初始吸附和重排面积较小,表面活性最低,表面吸附速度较慢;在 pH 值大于丝胶蛋白质等电点条件下,丝胶分子带负电荷时,分子在界面吸附面积增大,吸附速度增加,丝胶溶液的表面活性增强。

FZXB

参考文献:

- [1] Miller R, Aksenenko E V, Fainerman V B, et al. Kinetics of adsorption of globular proteins at liquid/fluid interfaces[J]. Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2001, 183 - 185 : 381 - 390 .
- [2] Xu Shuqian, Damodaran Srinivasan. The role of chemical potential in the adsorption of lysozyme at the air water interface[J]. Langmuir, 1992(8) : 2021 - 2027 .
- [3] Andrade J D. Thin organic films of proteins[J]. Thin Solid Films, 1987(152) : 335 - 343 .
- [4] Zhang Yr-Qing. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials biotechnology[J]. Advances, 2002, 20 : 91 - 100 .
- [5] 阳建斌, 华坚, 吴大诚. 丝胶蛋白质在空气-水界面上的吸附[J]. 四川大学学报: 工科版, 2002, 34(3) : 103 - 106 .
- [6] 刘冠峰, 陈文兴, 傅雅琴, 等. 丝胶蛋白质与铜(II) 的配位反应[J]. 高分子学报, 2001(1) : 58 - 61 .
- [7] Chang Chien Hsiang, Frances Elias I. Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1995, 100 : 1 - 45 .
- [8] Xi Yuan Hua, Rosen Milton J. Dynamic surface tension of aqueous surfactant solutions, I : basic parameters[J]. J Colloid and Interface Sci, 1988, 124(2) : 652 - 659 .
- [9] Rosen Milton J, Song Li D. Dynamic surface tension of aqueous surfactant solutions, 8 effect of spacer on dynamic properties of Gemini surfactant solutions[J]. J Colloid and Interface Sci, 1996(179) : 2666 - 2680, 2333 .
- [10] Inger Nahrungbauer. Dynamic surface tension of aqueous polymer solutions, I : ethyl (hydroxyethyl) cellulose (BERMOCOLL cst-103) [J]. J Colloid and Interface Sci, 1995, 176 : 318 - 328 .
- [11] Srinivasan Damodaran, Song Kyung B. Kinetics of adsorption of proteins at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption[J]. Biochim et Biophysica Acta, 1998(954) : 253 - 264 .