

羊毛角蛋白的提取工艺及其特性表征

付学忠, 刘 琳, 姚菊明

(浙江理工大学先进纺织材料与制备技术教育部重点实验室, 杭州 310018)

摘 要: 采用化学还原法从羊毛中提取角蛋白, 制备角蛋白膜, 并采用红外、电泳等测试方法对提取的角蛋白进行表征, 同时探讨在透析液中加入少量十二烷基磺酸钠对角蛋白提取过程的影响。结果表明: 提取角蛋白的分子量集中在 50~70 kD; 角蛋白在溶解过程中并没发生肽键的断裂, 在透析时部分断裂的二硫键再次被氧化; 透析液中加入十二烷基磺酸钠, 可溶性角蛋白的产率由 56% 提高到 78%, 且十二烷基磺酸钠的加入对所提取角蛋白的分子量和内部结构没有明显影响。

关键词: 羊毛; 角蛋白; 十二烷基磺酸钠; 产率; 分子量; 二级结构

中图分类号: TS102.31 **文献标识码:** A

0 引 言

角蛋白广泛存在于羊毛、人发、指甲、角、羽毛和爬行动物表皮等组织结构中^[1]。目前, 来自纺织厂不可用的劣质羊毛, 羊毛副产品及屠宰场^[2]的角、羽毛等废弃物每年超过 400 万 t^[3]。这些废弃物的丢弃不仅是资源的浪费, 也给环境造成了很大的破坏, 因此角蛋白的再生利用逐渐受到人们的重视。角蛋白由 19 种氨基酸组成, 且不同物种和不同部位之间氨基酸的组成和顺序是各不相同的, 但均含有大量的半胱氨酸(7%~20%)。半胱氨酸残基被氧化形成大量的分子间和分子内二硫键, 这些二硫键形成很稳定的三维网络结构, 使得羊毛等材料具有良好的机械性能^[4]。正是由于二硫键的键能大且不容易断裂, 角蛋白很难溶于一般的酸碱试剂。因此, 要使角蛋白溶解, 首先要使二硫键发生断裂。许多学者曾采用不同的方法均提取出了可溶性角蛋白^[5-8], 2004 年, Katoh, K 等^[9]对之前的化学还原法进行了改进, 采用亚硫酸盐替代刺激性气味较大的巯基乙醇, 进一步促进角蛋白的工业化生产。

本研究采用化学还原法提取角蛋白并进一步探

讨在透析液中加入十二烷基磺酸钠(SDS)对角蛋白提取过程的影响。拟用 NaHSO₃ 作为还原剂使角蛋白中的二硫键断裂, 获取分子量较高的角蛋白, 并避免刺激性气味^[10]; 采用 SDS 用以防止已断裂的二硫键再次被空气中的氧所氧化, 增大角蛋白的溶解度; 采用高浓度的尿素溶液促使角蛋白大分子充分溶胀, 破坏大量的氢键、离子键、分子间作用力, 提高角蛋白的产率^[11]。并对所提取角蛋白的产率、分子量、内部结构进行表征。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

试剂与材料: 羊毛; 正己烷(分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司); 二氯甲烷(分析纯, 杭州高晶精细化工有限公司); 尿素(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); SDS(分析纯, 上海博彩生物科技有限公司); NaHSO₃(分析纯, 杭州高晶精细化工有限公司); 去离子水; 透析袋(8000~14000)。

仪器: 07HWS-2 数显恒温磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司); 高速立式冷冻离心机(Beckman Coulter); 101A-2B 型电热鼓风恒温干燥箱(杭州蓝

天化验仪器厂);ELB2000 电子天平(SHIMADA-ZU);Nicolet 5700 红外光谱仪(美国尼高力仪器公司);JSM-5610 LV 扫描电镜(日本电子株式会社)。

1.2 角蛋白的提取

洗净干燥后的羊毛在正己烷和二氯甲烷混合溶剂中(体积比为 1 : 1)浸泡 24 h 脱脂,干燥;取 10 g 脱脂干燥后的羊毛溶于溶解液(尿素 8 mol/L, 180 mL;SDS, 6 g;NaHSO₃, 10 g),水浴 90℃,在 N₂ 保护下,反应 5 h;将上述溶液过滤,除去不溶物,将滤液置于透析袋中,透析 3d(透析液每天换 3 次),第一组透析液用蒸馏水,第二组透析液在蒸馏水中加入少量 SDS^[12];将透析后的溶液离心,取其上清液,浓缩备用。

1.3 测试与表征

1.3.1 产率 将过滤出的不溶物和离心分离出的固体沉淀洗涤干燥后称重,采用以下公式计算水溶性角蛋白的产率 Y。

$$Y = (1 - m_1 / m_2) \times 100\%$$

式中:m₁ 为不溶物和固体沉淀干燥后的重量, m₂ 为羊毛总重量。

1.3.2 分子量测定 采用电泳法(SDS-PAGE)测定。

1.3.3 内部结构分析 利用 Nicolet 5700 红外光谱仪对羊毛和角蛋白膜的结构进行检测,光谱范围 4 000~600 cm⁻¹,扫描次数 32 次,分辨率 4 cm⁻¹。

1.3.4 表面形貌分析 利用 JSM-5610 LV 扫描电镜对脱脂前后的羊毛的表面形态进行表征。

2 结果与讨论

2.1 羊毛的表面形态

羊毛纤维的外表面包裹着鳞片层,鳞片的覆盖密度因羊的种类及羊毛粗细的不同而有很大差异。鳞片的表面是一层油脂,因此羊毛很难溶于一般的水溶液,要使羊毛溶解需脱除其油脂层。从图 1 可以看出,羊毛纤维的表面的鳞片结构比较规整;并且脱脂前后,纤维表面没有发生明显变化。

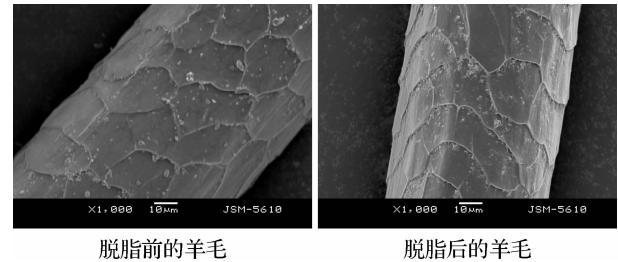
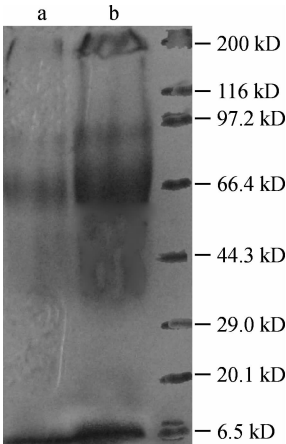


图 1 羊毛表面形态的电镜照片

2.2 提取角蛋白的分子量及产率

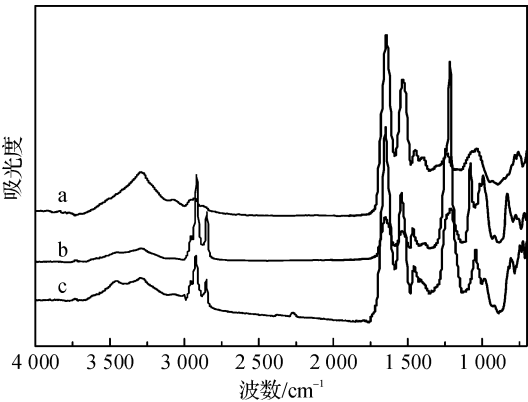
通过对两组角蛋白的提取率的研究,结果显示:透析液中未加 SDS 的水溶性角蛋白的产率为 56%,而加入 SDS 的水溶性角蛋白其产率可达到 78%。因此在透析液中加入少量 SDS 会促使角蛋白的产率提高。透析过程对于还原剂和尿素等小分子的去除,会导致半胱氨酸再次被氧化以及多肽链聚集而生成不透明的凝胶^[12]。SDS 可与角蛋白分子形成巨大胶束,在透析过程中一定程度上可降低氧气对角蛋白分子的氧化作用,保护角蛋白分子,从而提高角蛋白的产率^[11]。图 2 为所提取角蛋白的电泳实验结果,可以看出:两组角蛋白的分子量没有明显变化,均集中在 50~70 kD,说明角蛋白在溶解过程中没有发生肽键的断裂;在透析过程中,加入 SDS 并没有对角蛋白的分子量造成明显的影响。



a. 透析液中加入 SDS, b. 透析液中未加 SDS
图 2 角蛋白分子量

2.3 提取角蛋白的结构

角蛋白溶液在 45℃干燥成膜,同时对脱脂后的羊毛和角蛋白膜进行红外表征。图 3 中曲线 a 为羊

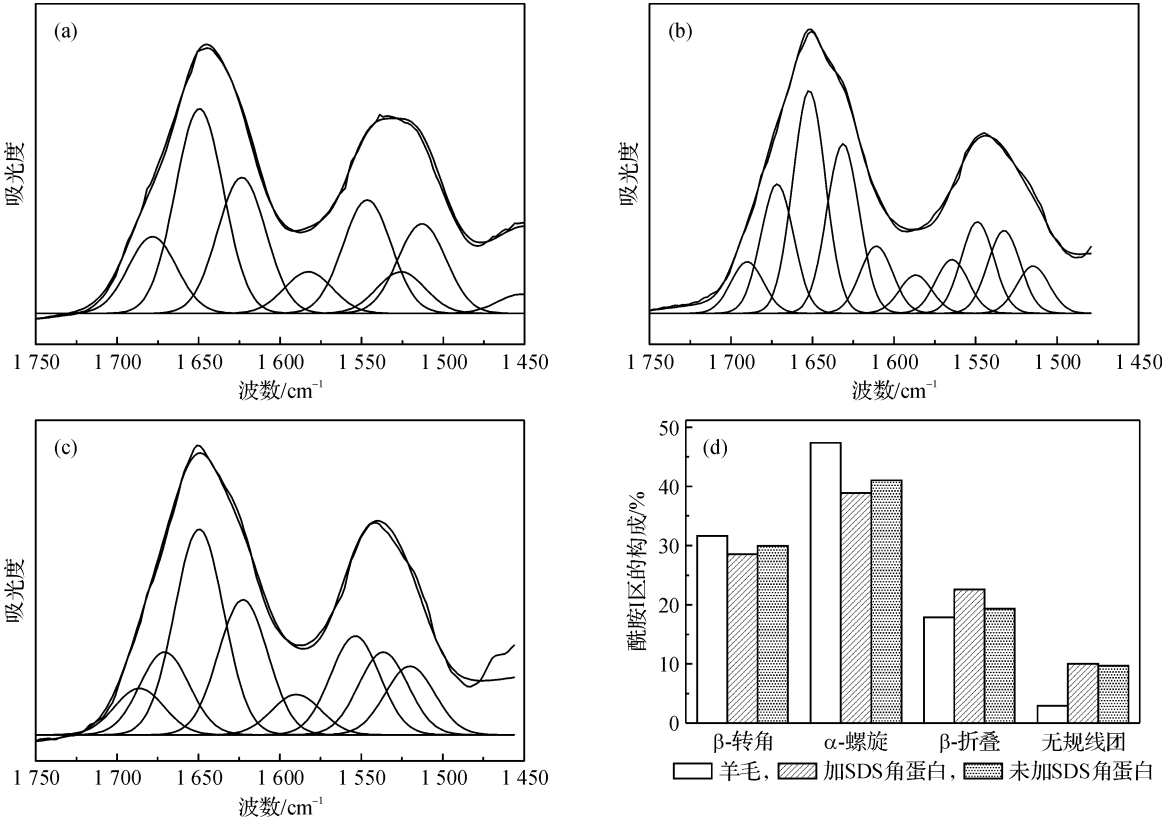


a. 羊毛;b. 加入 SDS 的角蛋白;c. 未加 SDS 的角蛋白
图 3 羊毛和角蛋白的红外谱图

毛的红外曲线,其中 $3\,292\text{ cm}^{-1}$ 处强而宽的吸收峰为 N-H 和 O-H 的特征峰; $1\,645\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为 (-CO-NH-) 中 C=O 的伸缩振动吸收峰(酰胺 I 区); $1\,538\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是 N-H 的弯曲振动吸收峰(酰胺 II 区); $1\,239\text{ cm}^{-1}$ 处的中强峰代表 N-H 的伸缩振动吸收峰(酰胺 III 区); $1\,454\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,397\text{ cm}^{-1}$ 的小峰是由羊毛分子中的 CH_3 、 CH_2 中的 C-H 弯曲振动所引起的^[13]。图 3 中曲线 b 和 c 分别为两组角蛋白膜的红外曲线,两曲线没有明显差别,说明在透析液中加入 SDS 未对角蛋白膜的内部结构造成较大影响。在 $2\,918\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\,850\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰代表 CH_3 、 CH_2 中的 C-H 伸缩振动吸收峰,由于二硫键的断裂使得峰的强度明显加强;在 $1\,645\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,538\text{ cm}^{-1}$ 处都有酰胺 I 区和酰胺 II 区的特征吸收峰;在 $1\,239\text{ cm}^{-1}$ 处酰胺 III 区的吸收强度明显加强;在 $1\,000\text{ cm}^{-1}$ 左右出现的小峰是由于半胱氨酸中部分已断裂的二硫键又被氧化,而形成半胱氨酸的一氧化物。

为进一步了解角蛋白溶解后其结构的变化以及 SDS 对角蛋白结构的影响,对羊毛和角蛋白的红外

谱图($1\,750\sim1\,450\text{ cm}^{-1}$)进行了分峰,分析了羊毛和角蛋白的二级结构。图 4 分别为羊毛、加入 SDS 的角蛋白膜、未加入 SDS 的角蛋白膜的红外分峰图($1\,750\sim1\,450\text{ cm}^{-1}$)。羊毛和角蛋白的二级结构一般可分为 α -螺旋结构和 β -折叠结构, α -螺旋结构是由纵向的 α -螺旋分子链并列而成,伸缩性好,氢键被破坏后,毛发可拉伸至原来的 2 倍,此时肽链的结构就变成了 β -折叠结构; β -折叠结构是由很多 β -折叠片平行堆积而成的多层结构,抗张性能好,但分子链处于完全伸展状态,因此伸缩性能较差^[14]。在二级结构中, α -螺旋是在 $1\,657\sim1\,651\text{ cm}^{-1}$, β -折叠是在 $1\,694\sim1\,680\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,631\sim1\,621\text{ cm}^{-1}$,无规卷曲是在 $1\,697\sim1\,670\text{ cm}^{-1}$ ^[15]。同时在图 4(d)可以看到,羊毛和角蛋白均是以 α -螺旋结构为主,其在羊毛分子中占到 47%,而在角蛋白分子中占到 40%左右,比例稍有下降。 β -折叠结构在羊毛分子中占 18%,而在角蛋白分子中占 22%左右,比例有所增加。无规线团结构由羊毛中的 3%上升到角蛋白膜中的 10%左右,比例有所增加。而在透析液中加入 SDS,对角蛋白分子的二级结构影响不大。



a. 羊毛; b. 加入 SDS 的角蛋白; c. 未加 SDS 的角蛋白; d. 不同结构在酰胺 I 区的比例

图 4 羊毛及角蛋白的红外分峰图($1\,750\sim1\,450\text{ cm}^{-1}$)

3 结 论

利用化学还原法成功制备了羊毛角蛋白溶液,并对其进行了特性表征,所提取的角蛋白分子量集中在 50~70 kD。

角蛋白在提取过程中,二硫键发生了断裂,但部分又被重新被氧化,生成半胱氨酸的一氧化物。在二级结构中, α 螺旋结构的比例有所降低, β 折叠结构和无规线团结构的比例有所增加。加入 SDS 角蛋白的产率明显增加,从 56% 增加到 78%,且 SDS 的加入对所提取角蛋白的分子量和二级结构没有明显影响。

参考文献:

- [1] Zoccola M, Aluigi A, Vineis C, et al. Study on cast membranes and electrospun nanofibers made from keratin/fibroin blends[J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9(10): 2819-2825.
- [2] Salminen E, Rintala J. Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste [J]. *Bioresource Technology*, 2002, 83: 13-26.
- [3] Yin J, Rastogi S, Terry A E, et al. Self-organization of oli-go peptides obtained on dissolution of feat her keratins in super-heated water[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8 (3): 800-806.
- [4] Tanabe T, Okitsu N, Tachibana A, et al. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(3): 817-825.
- [5] Rhodes H J, Potter B, Widra A. Characteristics of the alpha-keratose fraction of hair inducing ascosporeogenesis in *Nanniz-ia Grubyia*[J]. *Mycopathologia*, 1967, 33(3): 345-348.
- [6] Thomas H, Conrads A, Phan K-H, et al. In vitro recon-

- stitution of wool intermediate filaments[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1986, 8(5): 258-264.
- [7] Takeaki M, Hiroshi S, Hiroshi I. The phase transition in alpha-keratin fibers[J]. *Bulletin of the Institute for Chemical Research*, 1987, 65(2): 109-119.
- [8] Yamauchi K, Yamauchi A, Kusunoki T, et al. Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films[J]. *Journal of Bio-medical Materials Research*, 1996, 31(4): 439-444.
- [9] Katoh K, Tanabe T, Yamauchi K. Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity[J]. *Biomaterial*, 2004, 25(18): 4255-4262.
- [10] 蔡 婷, 赵耀明, 杨崇玲. 羽毛角蛋白溶液的制备及研究[J]. *印染助剂*, 2007, 24(6): 20-23.
- [11] 熊小明, 胡仲禹. 废弃毛类物质的提取物:角蛋白的制备及应用[J]. *江西化工*, 2007(3): 8-12.
- [12] Schrooyen P M M, Dijkstra P J, Oberthur R C, et al. Stabilization of solutions of feather keratins by sodium dodecyl sulfate[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001, 240(1): 30-39.
- [13] 李文霞, 廖 青, 刘 燚. 利用付立叶红外光谱与付立叶拉曼光谱初探超细羊毛粉的光谱行为[J]. *分析科学学报*, 2007, 23(5): 519-522.
- [14] 贾如琰, 何玉凤, 王荣民, 等. 角蛋白的分子构成、提取及应用[J]. *化学通报*, 2008(4): 265-271.
- [15] Jeanette M. Cardamone. Investigating the microstructure of keratin extracted from wool: peptide sequence (MALDI-TOF/TOF) and protein conformation (FTIR) [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2010, 969(1): 97-105.

The Extraction and Characterization of Keratin from Wool

FU Xue-zhong, LIU Lin, YAO Ju-ming

(The Key Laboratory of Advanced Textile Materials and Manufacturing Technology (Zhejiang Sci-Tech University), Ministry of Education, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Keratin is extracted from the wool by the chemical reduction method to prepare the keratin membrane. The keratin solution and membranes are characterized by FTIR, SDS/PAGE. The influence of the addition of SDS in the dialysate on the keratin extraction is also investigated in the study. The results show that the molecular weight of the keratin derived from the wool generally distributes from 50 to 70 KD; No peptide bonds fracture in the dissolution process of the keratin, and part of the fractured disulfide bonds are oxidized during the process of dialysis; The yield of keratin increases from 56% to 78% after the addition of SDS in the dialysate, without causing any effects on the molecular weight and structure of the extracted keratin.

Key words: wool; keration; SDS; yield; molecular weight; secondary structure

(责任编辑: 张祖尧)