



丝素蛋白溶液二级结构协同稳定性调控研究

刘 轩^{a,b},胡秀俊^a,周 严^a,肖林蓉^a,江国华^{a,b}

(浙江理工大学,a.材料科学与工程学院;b.全省丝绸与蚕丝蛋白新材料重点实验室,杭州 310018)

摘 要: 针对丝素蛋白(Silk fibroin, SF)溶液在储存过程中易发生分子聚集和凝胶化的问题,探究烟酰胺(Nicotinamide, NAM)与聚酰胺-胺(Polyamidoamine dendrimer, PAMAM)作为稳定剂的协同作用机制,评估不同稳定剂组合在未灭菌及灭菌条件下对 SF 溶液稳定性的影响。实验结果表明,配方(1% SF-3% NAM-0.5% PAMAM)经高温灭菌后,21 d 内吸光度低于 0.318,粒径后期日增长率仅为 1.04%, α -螺旋与无规卷曲总含量保留率达 91.39%, β -折叠转化率较 SF 组降低 21.01%,该复合稳定剂显著提升了 SF 溶液在高温灭菌及后续长期储存的稳定性。机制研究表明,NAM 与 PAMAM 通过竞争性形成氢键及空间位阻效应双机制协同作用,分别从分子内外实现构象调控与聚集阻隔,在保障性能的同时具备良好的工艺兼容性与成本可控性。研究结果为丝素蛋白液体敷料的稳定化应用提供了可行方案。

关键词: 丝素蛋白溶液;稳定性调控;烟酰胺;聚酰胺-胺; β -折叠;高温灭菌;二级结构

中图分类号: TS102.33

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2026)09-0660-10

引文格式:刘轩,胡秀俊,周严,等. 丝素蛋白溶液二级结构协同稳定性调控研究[J]. 浙江理工大学学报(自然科学),2026,55(5):660-669.

Reference Format: LIU Xuan, HU Xiujun, ZHOU Yan, et al. A study on the synergistic regulation of secondary structure and stability of silk fibroin solutions[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2026, 55(5): 660-669.

A study on the synergistic regulation of secondary structure and stability of silk fibroin solutions

LIU Xuan^{a,b}, HU Xiujun^a, ZHOU Yan^a, XIAO Linrong^a, JIANG Guohua^{a,b}

(a. School of Materials Science & Engineering; b. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Silk and Silk Protein Materials, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To address molecular aggregation and gelation of silk fibroin (SF) solutions during storage, this study systematically investigates the synergistic stabilization mechanism of nicotinamide (NAM) and polyamidoamine dendrimer (PAMAM), and evaluates how varying NAM/PAMAM combinations influence SF solution stability under both non-sterile and sterile conditions. Following autoclave sterilization, the optimized formulation—comprising 1% (w/v) SF, 3% (w/v) NAM, and 0.5% (w/v) PAMAM—maintains an absorbance below 0.318 over 21 days, exhibits a late-stage particle size growth rate of only 1.04% per day, retains 91.39% of the combined α -helix and random coil content, and reduces β -sheet formation by 21.01% relative to the non-stabilized SF control. These results demonstrate that the NAM/PAMAM combination markedly improves thermal-sterilization tolerance and long-term solution stability of SF. Mechanistic analysis reveals that NAM and PAMAM synergistically operate through a dual mechanism involving competitive hydrogen bonding and steric hindrance, enabling conformational regulation and aggregation inhibition at the intramolecular and intermolecular levels respectively. This ensures superior performance while offering good process compatibility and cost controllability. The

收稿日期: 2025-12-23 网络出版日期: 2026-05-26

作者简介: 刘 轩(2001—),女,湖南衡阳人,硕士研究生,主要从事生物大分子组装与功能材料的研究。

通信作者: 江国华, E-mail: ghjiang_cn@zstu.edu.cn

research findings provide a feasible solution for the stabilization application of silk fibroin-based liquid dressings.

Key words: silk fibroin solution; stability regulation; nicotinamide; polyamidoamine dendrimer; β -sheet; high-temperature sterilization; secondary structure

0 引 言

丝素蛋白(Silk fibroin, SF)是蚕丝的主要成分^[1],由轻链(约 26 kDa)与重链(约 390 kDa)通过二硫键连接而成^[2-4],重链中富含的甘氨酸-X 重复序列(X 主要为丙氨酸、丝氨酸等)构成疏水性 β -折叠结晶区,赋予 SF 优异的生物相容性、可调控的降解性能及力学特性^[5-6],因此 SF 在生物医学敷料、组织工程支架及柔性功能材料等领域展现出广阔应用前景^[7-9]。SF 溶液在储存与加工过程中,其结构稳定性受温度、pH 值、离子强度等环境因素影响,易发生从无规卷曲向 β -折叠的构象转变。这一转变会诱发分子聚集、沉淀或凝胶化现象,不仅显著缩短溶液的可用周期,更严重影响材料最终性能的均一性与可靠性,已成为限制其规模化应用的关键瓶颈^[10-11]。

为提升 SF 溶液的稳定性,现有研究主要采用物理调节(如添加离液盐、低温保存、共混聚合物)或化学调控(如对 SF 进行修饰)两类策略^[2,12]。然而,单一稳定机制往往难以兼顾短期抑制与长期维持的效果,多数策略在应对长时间储存或温度波动时,其稳定效能会出现衰减。现有研究多聚焦于稳定剂在常温或短期内的效果评估,缺乏对溶液在长期老化过程中二级结构动态演变规律的系统考察,导致对稳定机制的理解仍停留在现象层面。因此,开发兼具温和性、长效性且能保持 SF 天然结构的稳定方法,深入探究其在长期储存条件下的构象演变规律,具有重要的科学与应用价值。

烟酰胺(Nicotinamide, NAM)是维生素 B₃ 的衍生物,广泛应用于护肤品和抗真菌药物领域^[13],其分子中的酰胺基与吡啶环可通过竞争性氢键作用与蛋白质相互作用,从而有效干扰丝素蛋白分子间的交联与 β -折叠形成,延缓聚集过程。聚酰胺-胺(Polyamidoamine dendrimer, PAMAM)作为一种高度支化的树枝状大分子,其表面可修饰为 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CHO}$ 等多种官能团^[14]。PAMAM 能通过静电吸附与蛋白质结合,并依靠其三维支化结构在蛋白表面形成空间位阻层与水化膜,进一步抑制分子聚集^[15]。Heiden 等^[16]证实 PAMAM 的毒性主

要与其代数、使用浓度及表面电荷性质相关;在低代数、低浓度条件下,其分子尺寸较小、结构相对柔韧,表现出较好的生物相容性。Liu 等^[17]通过高压灭菌在 SF 溶液中引入纳米颗粒,成功制备出高机械强度的纳米多孔 SF 膜,这为通过物理-化学协同策略调控丝素蛋白的聚集行为提供了新思路。

本文以解决 SF 溶液灭菌后长期储存稳定性问题为核心目标,选取 NAM 与 PAMAM 构建复合稳定体系,实验设置灭菌与未灭菌两组对照,采用 60 °C 加速老化(老化速率约为室温的 8~10 倍,21 d 等效于室温储存 168~210 d),该温度既可放大不同稳定剂体系对 SF 溶液稳定性的调控差异,又避免蛋白不可逆热变性^[18]。结合紫外光谱、动态光散射、圆二色光谱及傅里叶变换红外光谱,从宏观浊度与粒径、介观聚集行为及微观二级结构层面,系统探究复合稳定剂的协同作用机制及其对 SF 溶液稳定性的调控效果。本文明确了 NAM 与 PAMAM 对 SF 构象调控的协同效应,揭示了高温灭菌条件下复合稳定剂对 SF 二级结构动态演变的调控规律。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

主要材料:蚕茧(家蚕)购自本地桑蚕养殖场;碳酸钠(Na_2CO_3 ,纯度 $\geq 99.9\%$)购自上海易恩化学技术有限公司;溴化锂(LiBr,纯度 $\geq 99\%$)和烟酰胺(NAM,纯度 $\geq 99.5\%$)购自上海源叶生物科技有限公司;聚酰胺-胺树枝状大分子(PAMAM, G2 代,纯度 $\geq 95\%$)购自西安瑞禧生物科技有限公司;透析袋(截留分子量为 3500 Da)购自北京微克航科技有限公司。

仪器:水浴锅(HH-S26S 型,金坛区西城新瑞仪器厂);数控超声波清洗器(KQ-500DE 型,昆山市超声仪器有限公司);常温磁力搅拌器(金坛区医疗仪器厂);pH 计(FE28 型,梅特勒-托利多仪器有限公司);全自动立式压力蒸汽灭菌器(LDZX-50KBS 型,上海申安医疗器械厂);热空气老化试验箱(401A 型,上海实验仪器厂有限公司);动态光散射仪(DLS, Zetasizer Nano ZS90 型,英国马尔文帕纳科公司);紫外-可见分光光度计(UV-Vis, UV-2600

型,日本岛津公司);圆二色光谱仪(CD,Chirascan V100 型,英国 Applied Photophysics 公司);傅里叶红外光谱仪(FT-IR,Nicolet iS50,美国 Thermo Electron Scientific 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 再生丝素蛋白的提取

采用碳酸钠脱胶-溴化锂溶解法制备丝素蛋白,具体方法参见文献[19]。将 20 g 桑蚕蚕茧剪碎后,置于质量分数为 0.5% Na₂CO₃ 溶液中煮沸脱胶 30 min(重复 3 次),去离子水洗涤后 60 ℃烘干 24 h;将脱胶丝素溶于 9.3 mol/L 溴化锂溶液(55 ℃,4 h),所得溶液经透析袋透析 72 h 以去除盐分,冷冻干燥 24 h 获得高纯度丝素蛋白冻干。

1.2.2 丝素蛋白稳定剂 NAM 与 PAMAM 添加量的确定

结合文献调研^[20-22]与加速老化预实验,综合确定 NAM 与 PAMAM 的添加量。参考液体敷料常用添加量,确定 NAM 的初步筛选质量体积分数为 1%~5%,低代数 PAMAM 的质量体积分数为 0.1%~1.0%,上述浓度范围兼顾稳定剂功能发挥与体系渗透压平衡。将不同质量体积分数的 NAM(1%、3%、5%)、PAMAM(0.1%、0.5%、1.0%)分别与 1% SF 溶液复配,于 60 ℃加速老化,以溶液澄清度为指标筛选。3% NAM 抑制 SF 溶液聚集沉淀的效果最优,0.5% PAMAM 能最有效维持溶液澄清,最终确定 3% NAM 与 0.5% PAMAM 为最优单剂浓度,并以此构建 SF 稳定溶液体系。

1.2.3 丝素蛋白溶液的制备与老化分析

采用超声辅助溶解法制备含不同稳定剂的 SF 溶液(见表 1)。分别配制质量体积分数为 2% 的 SF 溶液、12% 的 NAM 母液及 2% 的低代数 PAMAM 母液(磁力搅拌 250 r/min,10~15 min)。按表 1 配比将 NAM 与 PAMAM 母液依次加入 SF 溶液中,超声 5 min,密封置于 4 ℃避光保存。将所得溶液分为灭菌组(121 ℃,30 min)与未灭菌组,一同置于 60 ℃恒温箱中进行加速老化,并于老化 1、3、5、7、14、21 d 定期观察记录溶液状态。

表 1 丝素蛋白溶液实验组配方设计

组别	质量体积分数/%		
	SF	NAM	PAMAM
空白	1		
SF-NAM	1	3	
SF-PAMAM	1		0.5
SF-NAM-PAMAM	1	3	0.5

1.2.4 溶液浊度测定

采用紫外-可见分光光度法测试溶液浊度变化。将样品置于 60 ℃下进行老化,分别于老化第 1、3、5、7、14、21 天取样,精确移取 2 mL 样品溶液,利用紫外-可见分光光度计测定其在 280 nm 波长处的吸光度值。基于溶液浊度与吸光度的正相关性,通过监测吸光度随老化时间的增加趋势,定量表征 SF 溶液的稳定性变化。

1.2.5 粒径分布测定

采用动态光散射仪定量表征 SF 溶液的粒径分布变化。测试前将各组样品经 90 Hz 超声处理 10 min 以确保分散均匀,取溶液 1 mL,在 25 ℃,相对湿度 60% 条件下,分别测定老化第 1、3、5、7、14、21 天溶液的粒径分布。通过 21 d 内的粒径变化可准确获取溶液中蛋白聚集体的大小分布信息,为评估溶液稳定性提供重要参数指标。

1.2.6 圆二色光谱测试

采用圆二色光谱(CD)分析灭菌后各组样品老化 1 d 与 21 d 的蛋白质二级结构变化。将各组丝素蛋白液体样品稀释成质量浓度 0.5 mg/mL 的溶液;分别取老化 1 d 与 21 d 的 200 μL 样品,置于 0.05 mm 仪器样品池中,在远紫外区 190~260 nm 波长范围内进行扫描。设置扫描速度 100 nm/min、分辨率 1.0 nm,每一样品扫描 3 次并取平均值,以保证数据准确性。对所得光谱数据进行基线校正与归一化处理,以判断 21 d 内 SF 溶液二级结构的变化情况。

1.2.7 傅里叶变换红外光谱分析

采用傅里叶红外光谱仪(FT-IR)表征 SF 溶液中蛋白质二级结构的含量变化。根据 Yan 等^[23]的方法,将冷冻干燥后的样品与 KBr 粉末按 1:100 的比例加入研钵中,充分研磨多次;放入压片机中压制成透明薄片,用于 FT-IR 扫描测试。测试前先采集背景,再采集样品的红外光谱。设置测试条件为:分辨率 4 cm⁻¹,扫描次数 32 次,波数范围 400~4000 cm⁻¹。对蛋白质特征吸收峰波数为 1600~1700 cm⁻¹ 的红外光谱图进行基线校正、去卷积、二阶求导及曲线拟合处理,以分析 SF 二级结构含量的变化。

2 结果与讨论

2.1 丝素蛋白溶液宏观形貌观察及吸光度变化

吸光度值与溶液浊度呈显著正相关,可客观反映体系稳定性。不同组分 SF 溶液经 60 ℃加速老

化后的宏观形貌变化及其在 280 nm 处的吸光度定量分析结果见图 1 和图 2。SF 溶液在老化过程中稳定性最差,未灭菌样品 SF(W)(图 1(a))与灭菌样品 SF(M)(图 1(e))自老化 5 d 起均出现明显浑浊,吸光度分别从初始 0.06 和 0.061 显著升高至 21 d 时的 0.517 和 0.532。这表明,未经稳定剂保护的 SF 溶液在加速老化条件下易发生聚集沉淀。SF-NAM 组在未灭菌条件下表现出良好的稳定性(图 1(b)),样品在整个 21 d 老化过程中保持澄清透明,吸光度从 0.054 缓慢升至 0.368;其灭菌样品(图 1(f))在老化 21 d 出现丝状沉淀析出,吸光度从 0.062 升至 0.329,较未灭菌样品略低但沉淀现象明显。这说明 NAM 在常温下可通过竞争性形成氢键抑制 SF 沉淀,但高温高压环境会削弱其氢键竞争能力,导致灭菌后样品的长期热稳定性下降。SF-

PAMAM 组中,未灭菌样品(图 1(c))在老化 7 d 出现轻微浑浊,吸光度从 0.059 升至 21 d 时的 0.386;其灭菌样品(图 1(g))在老化过程中澄清度优于 SF-NAM(M)组,吸光度从 0.052 升至 0.378,且未出现明显沉淀。这表明,低代数 PAMAM 的空间位阻效应在高温条件下对维持 SF 稳定具有更显著的作用。SF-NAM-PAMAM 组(图 1(d)—(h))在两种处理条件下均展现出最优的稳定性。灭菌与未灭菌样品在 21 d 老化过程中均保持澄清状态,未出现浑浊或沉淀;吸光度数据显示未灭菌样品从 0.046 升至 0.342,灭菌样品从 0.052 升至 0.318,始终低于其他各组。综上,NAM 与低代数 PAMAM 在抑制 SF 聚集方面具有协同作用,二者联合使用可有效弥补单一稳定剂在不同环境条件下的应用局限性。

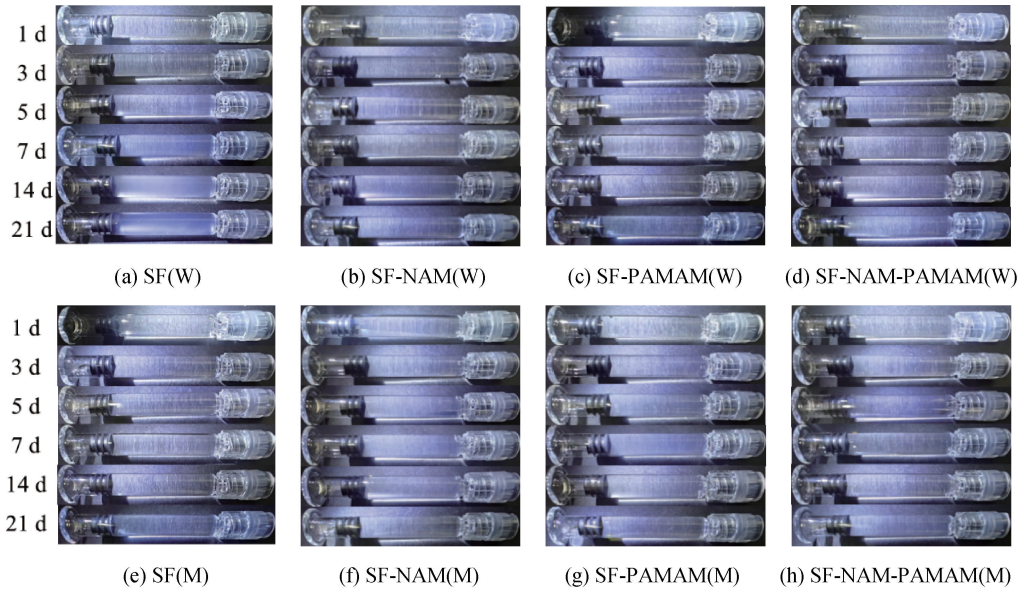


图 1 不同组分 SF 溶液经 60 °C 老化宏观形貌变化

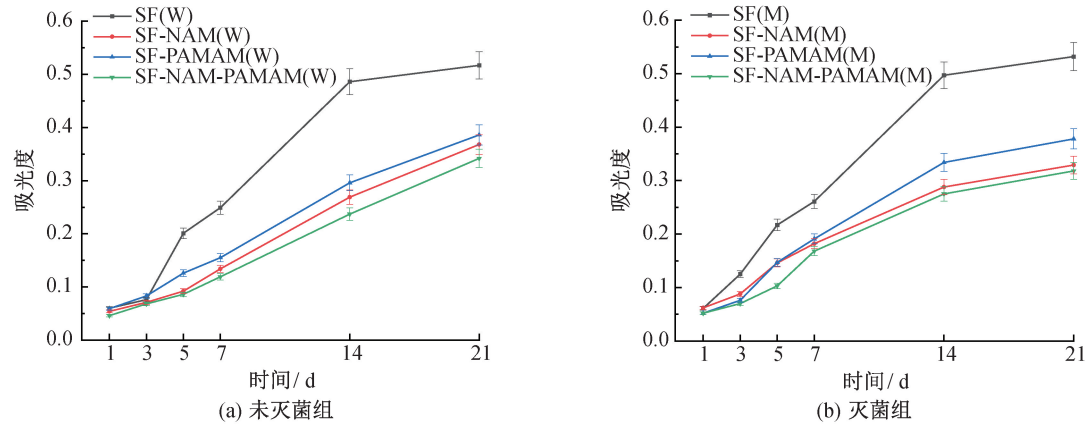


图 2 不同组分 SF 溶液在 280 nm 处的吸光度-时间曲线

2.2 丝素蛋白溶液的粒径变化

采用动态光散射仪(DLS)表征 SF 溶液在未灭

菌与灭菌条件下的粒径演变(结果如图 3 所示)。粒径变化可直接反映蛋白质聚集程度与体系稳定性。

未灭菌条件下,SF 组粒径随老化时间显著增大,21 d 时,粒径达到 705.33 nm;单一稳定剂均能抑制 SF 聚集,其中 SF-PAMAM 组(568.20 nm)与 SF-NAM 组(625.20 nm)的粒径均显著低于 SF 组,SF-NAM-PAMAM 复合组粒径最小(516.47 nm),其老化后期(14~21 d)的粒径增长率仅为 1.14%。灭菌条件下,各组粒径较未灭菌组整体升高,SF 组 21 d 时粒径达 690.77 nm;SF-NAM 组与 SF-PAMAM 组的粒径分别为 561.25 nm 和 513.33 nm,均显著低于 SF 组;SF-NAM-PAMAM 复合组仍保持最小粒径(492.13 nm),其老化后期粒径增长率仅为

1.04%。上述粒径数据表明,两种稳定剂的抑制机制存在差异:PAMAM 通过空间位阻直接阻隔分子间聚集,在粒径层面表现更优;而 NAM 主要通过抑制 β -折叠成核实现构象稳定,其对粒径增长的抑制作用相对温和。二者通过氢键竞争与空间位阻的协同作用,在两种条件下均表现出最优的粒径控制效果。复合组在老化后期粒径增长均趋于平缓(增长率约为 1.0%~1.2%),表明体系已进入稳定期,进一步证实 NAM-PAMAM 协同策略能有效抑制 SF 溶液长期储存中的聚集行为,赋予体系优异的长期稳定性。

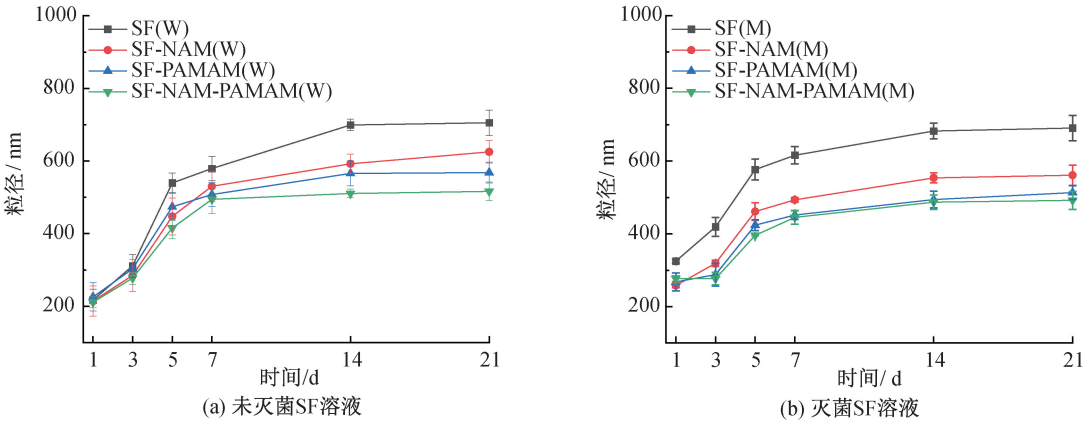


图 3 灭菌前后不同组分 SF 溶液的粒径-时间曲线

2.3 丝素蛋白溶液的圆二色光谱

图 4 为灭菌条件下不同 SF 溶液在加速老化初期(1 d)与末期(21 d)的圆二色谱图。老化初期,各组样品在 198~200 nm 附近均显示明显的负吸收峰,表明 SF 主要以无规卷曲构象存在。老化末期,各组峰谱特征发生明显分化。SF 组在 190 nm 左右出现正吸收峰(α -螺旋 192 nm 与 β -折叠 185~200 nm 特征峰的重合峰),同时在 218 nm 处出现明显的负吸收峰(β -折叠特征指纹峰),表明二级结构中 β -折叠含量显著升高,发生

了严重的构象转变。单一稳定剂组(SF-NAM 与 SF-PAMAM)在 192 nm 与 218 nm 处均出现负吸收峰,但其峰强度均低于 SF 组,表明二者虽未能完全阻止 β -折叠形成,但均能有效抑制构象转变程度,其中 SF-PAMAM 组的抑制效果优于 SF-NAM 组。SF-NAM-PAMAM 复合组在 192 nm 处出现明显负吸收峰,而 218 nm 处未检测到明显的 β -折叠特征负峰,表明 SF-NAM-PAMAM 复合组 β -折叠含量较低,二级结构以无规卷曲构象为主。

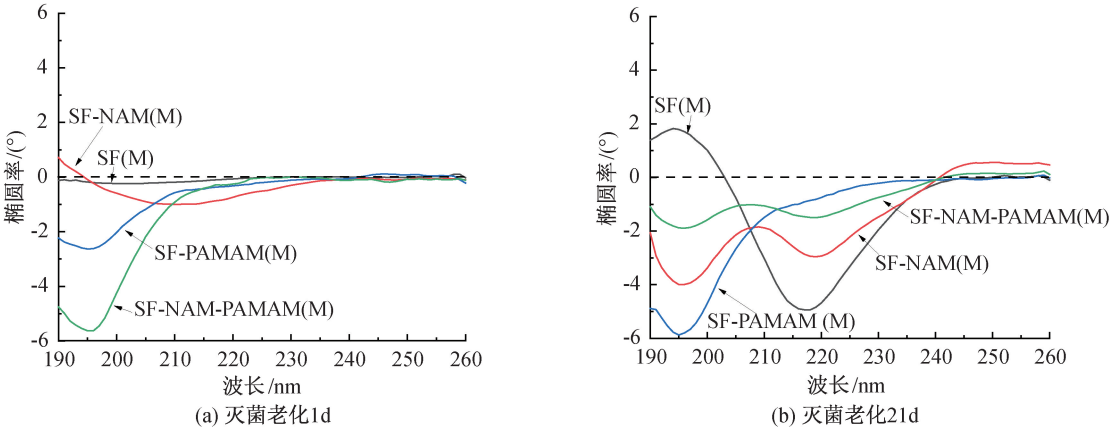


图 4 灭菌后不同组分 SF 溶液的 CD 光谱图

2.4 丝素蛋白溶液的红外吸收光谱结果

表 2 为蛋白质不同二级结构在红外光谱酰胺 I、II、III 区的经验值^[24-25]。由表 2 可得,α-螺旋通常出现在 1647~1660 cm⁻¹,β-折叠对应 1515~1525 cm⁻¹ 和 1615~1640 cm⁻¹,无规卷曲则位于 1535~1545 cm⁻¹ 和 1641~1646 cm⁻¹。本文主要依据分辨率更高的酰胺 I 区进行二级结构定量分析,同时以酰胺 II 区和 III 区的特征峰变化作为辅助验证。将这些经验峰位与本文测得的光谱吸收峰进行对比分析(图 5)。图 5(a)显示,SF 组在 1620~1621 cm⁻¹ 处呈现典型 β-折叠特征峰,且酰胺 II 区 1515 cm⁻¹ 及酰胺 III 区 1235 cm⁻¹ 的 β-折叠相关峰随老化时间峰强显著增强,反映 SF 分子在加速老化过程中易向聚集态 β-折叠构象转变。NAM 的引入使 SF-NAM 组(图 5(b))在 1591~1621 cm⁻¹ 的特征峰发生偏移,酰胺 II 区 1459 cm⁻¹(偏移)、酰胺 III 区 1240 cm⁻¹ 的峰强随老化时间变化平缓,说明 NAM 能有效维持 SF 的构象稳定性。SF-PAMAM 组

(图 5(c))在 1641~1648 cm⁻¹ 的无规卷曲特征区峰位与峰强均保持高度稳定,酰胺 II 区 1515 cm⁻¹ 及酰胺 III 区 1240 cm⁻¹ 的 β-折叠峰无明显增强,说明 PAMAM 可通过空间位阻效应及保护性氢键作用,在高温环境下维持 SF 的天然构象。SF-NAM-PAMAM 组中(图 5(d)),1621 cm⁻¹ 处 β-折叠特征峰强度始终维持在较低水平,且其酰胺 II 区和 III 区的 β-折叠峰强度均低于其他各组,这表明 NAM 与 PAMAM 的差异化构象调控机制形成协同效应,既通过氢键竞争抑制 β-折叠生成,又借助空间位阻稳定蛋白构象,从而实现对 SF 分子构象与聚集行为的长效调控。

表 2 蛋白质不同二级结构在红外光谱酰胺 I 区、酰胺 II 区、酰胺 III 区的经验值^[24-25]

构象	酰胺 I 区	酰胺 II 区	酰胺 III 区
α-螺旋	1647~1660	1545	1260~1300
β-折叠	1615~1640	1515~1525	1220~1240
无规卷曲	1641~1646	1535~1545	1245~1250

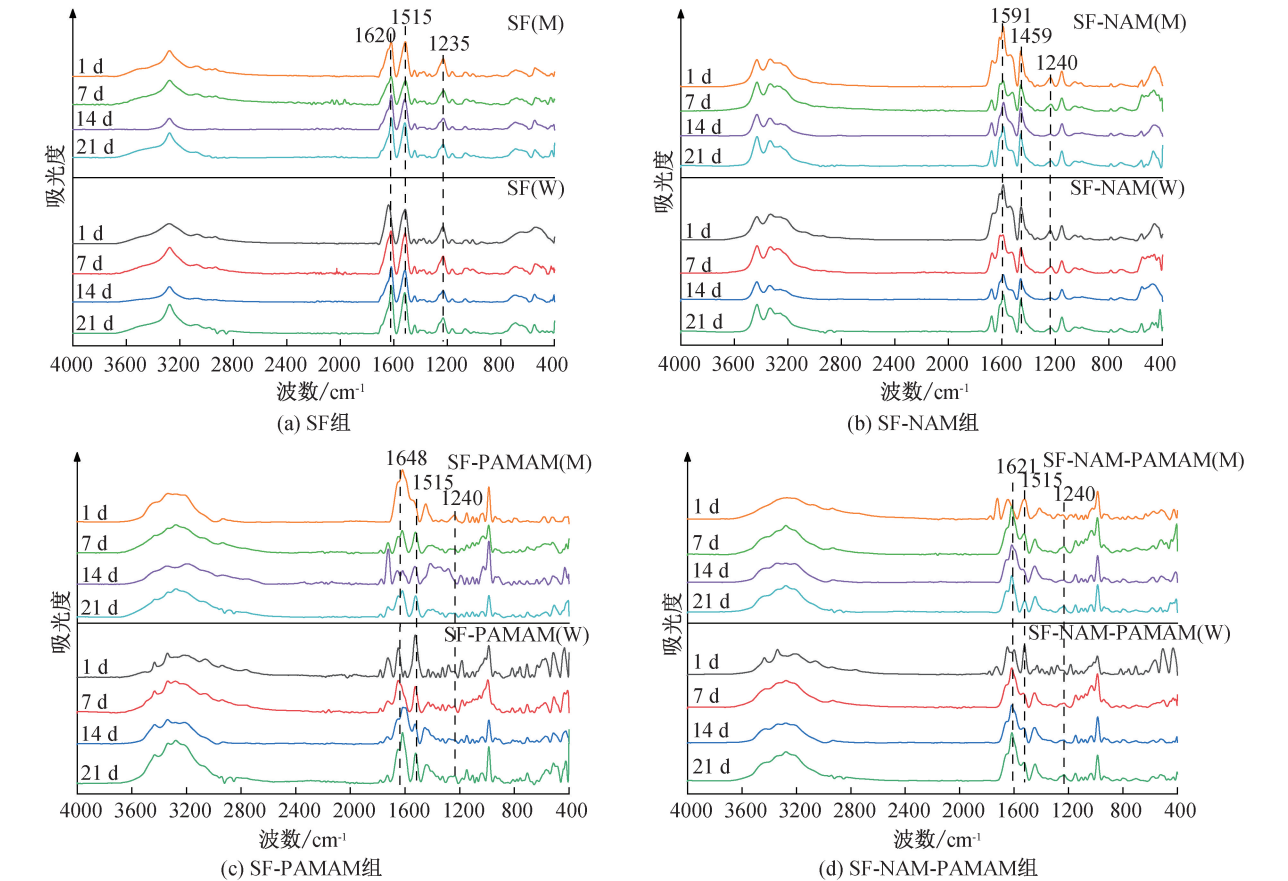


图 5 灭菌前后不同组分 SF 溶液不同老化时间的红外吸收光谱图

结合 2.2 节中 DLS 粒径演变的动态数据与上述 FT-IR 分析结果,可进一步揭示 NAM 与 PAMAM 在稳定丝素蛋白过程中分阶段发挥的协

同作用。在老化初期(1~5 d),NAM 优先发挥竞争性形成氢键的作用,从而阻断 β-折叠的形成,从源头上抑制疏水聚集成核,此阶段 DLS 观测到的粒径

小幅增长主要源于蛋白质水化层的扩展,而非不可逆聚集。老化中后期(6~21 d),PAMAM 凭借树枝状结构可以在 SF 分子间产生空间位阻效应,在 NAM 抑制构象转变的基础上,为部分展开的蛋白质提供物理屏障,阻止其向大尺寸不可逆聚集集体演变,这与 DLS 观测到的粒径增长速率显著放缓高度吻合。综上,NAM 与 PAMAM 形成了动态防护体系:NAM 通过竞争性氢键实现分子内构象调控,PAMAM 通过水化膜与空间位阻实现分子间聚集阻隔,二者从构象到尺寸层面协同保护 SF 溶液。

2.5 丝素蛋白溶液二级结构变化结果

为探究 NAM 与 PAMAM 对丝素蛋白二级结构演变的具体调控作用,基于图 5 的酰胺 I 带分峰拟合结果(所有样本在 1600~1700 cm⁻¹ 范围内均呈现典型特征峰,灭菌后部分样本峰形发生偏移,表明二级结构可能重组),进一步量化不同处理对 SF 二级结构演变的影响。蛋白质二级结构与其物理性

质密切相关, β -折叠含量越高、 α -螺旋含量越低,蛋白质结构通常越紧密,导致溶解性下降、表面疏水性增加。

图 6 为分峰拟合后不同组分 SF 溶液的 β -折叠与 α -螺旋含量随时间变化特征,所有组别的 SF 溶液均呈现 β -折叠含量上升、 α -螺旋与无规卷曲含量下降的构象趋势。如图 6(a)~(b)所示,随老化时间延长,各组 SF 溶液 β -折叠含量均呈上升趋势,SF 组在未灭菌条件下由 34.26% 上升至 61.68%,灭菌条件下由 31.19% 升至 60.47%,表明 β -折叠的大量生成是诱导 SF 聚集浑浊的关键构象驱动力;SF-NAM 组与 SF-PAMAM 组均能不同程度抑制 β -折叠形成,但呈现环境适应性差异,未灭菌条件下 SF-NAM 组终含量(41.00%)低于 SF-PAMAM 组(43.40%),灭菌条件下 SF-PAMAM 组终含量(39.46%)低于 SF-NAM 组(40.99%),而 SF-NAM-PAMAM 复合组在两种条件下 β -折叠终含

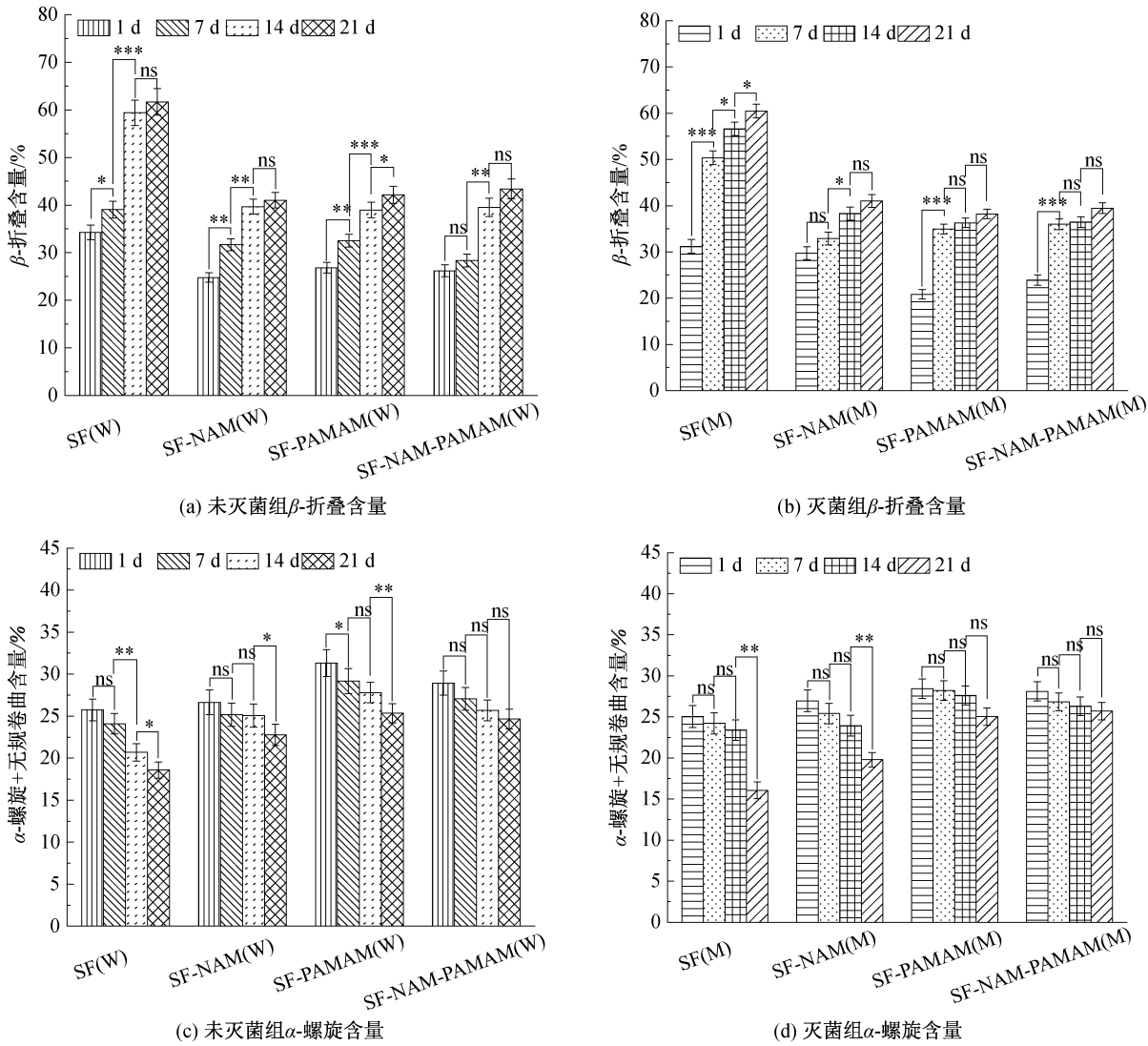


图 6 分峰拟合后不同组分 SF 溶液的 β -折叠与 α -螺旋含量柱状图

量均低于单一稳定剂组,灭菌后的 SF-NAM-PAMAM 组较 SF 组 β -折叠转化率降低 21.01%。如图 6(c)—(d)所示,各组 SF 溶液 α -螺旋与无规卷曲总含量随老化进程均呈下降趋势,SF 组在未灭菌条件下由 25.75%降至 18.58%,灭菌条件下由 25.05%降至 16.06%,天然构象损失最为显著。SF-NAM 组与 SF-PAMAM 组均表现出构象保护效果,而 SF-NAM-PAMAM 复合组在未灭菌与灭菌条件下分别由 28.94%降至 24.65%、28.12%降至 25.70%, α -螺旋与无规卷曲总含量保留率分别达 85.18%和 91.39%,构象保留效果优于其他各组。结果表明,NAM 与低代数 PAMAM 通过氢键竞争和空间位阻的协同作用,在常温及高温环境下共同抑制 β -折叠过度形成,维持 SF 天然松散构象,弥补单一稳定剂的应用局限,实现对 SF 构象演变与聚集行为的高效调控。

2.6 NAM、PAMAM 稳定丝素蛋白溶液的机理

综合上述结果,NAM 与 PAMAM 协同稳定 SF 溶液的机理模型如图 7 所示。如图 7(a)所示,无论灭菌(M)还是未灭菌(W)的体系,SF 二级结构均呈现 β -折叠含量升高、 α -螺旋含量降低的演变趋势;SF 在高温高压、pH 波动或长期储存等外部刺激

下,易通过分子内、分子间氢键驱动 β -折叠大量形成,最终发生失控聚集,这与丝素蛋白凝胶形成过程中 β -折叠增多的规律一致。图 7(b)说明了 NAM 的稳定作用基于竞争性氢键机制,其分子中的酰胺基与吡啶环可与 SF 的氢键结合位点发生竞争结合,破坏 SF 原有氢键网络,直接抑制 β -折叠生成,这与 NAM 可通过氢键作用调控蛋白质构象的已有研究结论相符。PAMAM 则通过空间位阻与水化膜效应实现 SF 构象保护,其高度支化的树枝状结构及丰富的末端亲水基团(胺基、酰胺基)可通过氢键作用结合于 SF 表面,有序捕获水分子形成致密水化层,该水化层既能通过物理屏障作用阻隔 SF 分子间直接接触,又能维持界面水有序结构、降低疏水基团外露的热力学驱动力,从而在高温或长期储存条件下抑制 β -折叠不可逆聚集,这与 PAMAM 可通过空间位阻效应实现分子保护的相关研究结果一致(图 7(c))。二者协同作用机制示意图如图 7(d)所示,NAM 的氢键调控作用与 PAMAM 的构象保护作用形成互补,NAM 弥补了 PAMAM 常温下空间位阻效果有限的不足,PAMAM 则强化了 NAM 高温下氢键竞争能力减弱后的稳定作用,从化学与物理层面共同抑制 β -折叠积累,显著提升 SF 溶液稳定性。

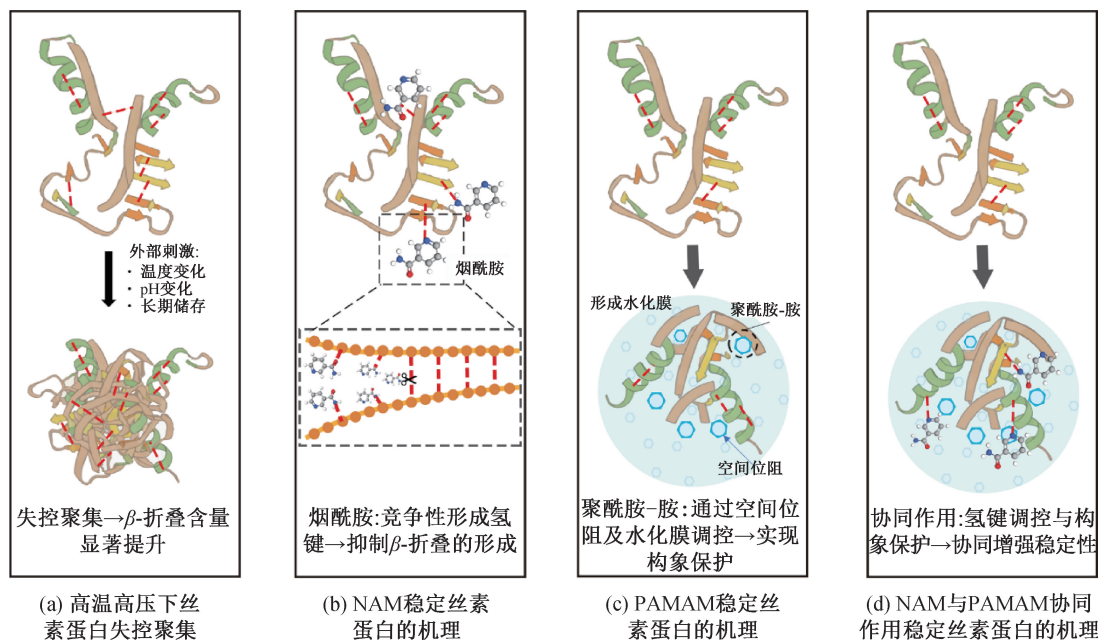


图 7 NAM、PAMAM 稳定丝素蛋白的机理图

2.7 稳定策略的经济性与规模化生产潜力分析

从应用转化角度评估,本文所采用的协同稳定策略在成本控制与规模化生产方面具备可行性,具体经济性评估如表 3 所示。NAM 作为维生素 B3 衍生物,是制药与化工行业的大宗原料,市

场供应充足且价格低廉,PAMAM 虽为功能性树枝状聚合物,但本文使用的质量体积分数较低(0.5%),单位体积溶液中的添加量有限,引入的原料成本增量处于可控范围,每升溶液用量约 21.5~42.4 元。在规模化生产适配性方面,本策

略的优势在于其工艺简单,稳定剂的添加仅涉及加热物理混合步骤,无需复杂的设备改造或特殊反应条件,与现有生物制品生产线兼容性好,易于实现工艺的放大,工艺改造费用可忽略不计。添加 NAM 与 PAMAM 虽会增加原料成本,但根据

60 ℃加速老化 21 d 结果推算,SF 溶液货架期可延长至 180 d 以上,预估可降低约 92%的凝胶化相关报废损耗,综合经济效益预期为正。在保障性能的前提下,该体系兼顾了成本与工艺可行性,具备明确的产业化应用潜力。

表 3 协同稳定策略的经济性评估表

评估项目	评估内容	评估结果
原料成本增量	NAM 添加成本 (质量体积分数 3%)	NAM:1.5~2.4 元/L
	PAMAM 添加成本 (质量体积分数 0.5%)	PAMAM:20~40 元/L (工业级批量采购)
工艺改造费用	设备改造及工艺适配成本	可忽略不计,与现有生产线高度兼容
预期经济效益	货架期延长带来的损耗降低	货架期从 14 d 延长至 180 d 以上,预估降低损耗 92%
综合效益评估	成本增量与效益提升的对比	综合效益为正,具备产业化潜力

3 结 论

本文针对 SF 溶液在储存与加工过程中易发生构象转变、诱发聚集凝胶的关键问题,构建了 NAM 与 PAMAM 协同稳定体系。基于宏观形貌、浊度、粒径与二级结构的系统分析,得出以下主要结论:

a)NAM 与 PAMAM 表现出温度差异互补作用。NAM 通过竞争性氢键破坏 SF 分子内 β -折叠成核网络,实现分子内构象调控,常温稳定效果显著;PAMAM 通过亲水基团形成水化膜、三维结构构建空间位阻,从分子外部阻隔聚集,其物理屏障作用在高温下更稳定,弥补了 NAM 在高温下的作用短板。常温下 SF-NAM 组对粒径增长的抑制率为 11.4%,而高温下 SF-PAMAM 组对粒径增长的抑制率为 25.7%,二者内外互补、实现全温度范围协同保护。

b)NAM 与 PAMAM 在分子内外位点及时序维度上形成协同稳定机制。NAM 通过进入 SF 分子内部抑制初期 β -折叠的形成,PAMAM 则在分子外围形成空间屏障阻隔后期蛋白质分子间聚集。双维度协同作用克服了单一稳定剂的环境适配缺陷,实现了 SF 溶液在灭菌和未灭菌条件下的长期稳定。经高温灭菌后,SF-NAM-PAMAM 组 21 d 粒径为 492.1 nm,较 SF 组降低 28.8%;SF-NAM-PAMAM 组 21 d 内 α -螺旋与无规卷曲总含量的保留率达 91.39%, β -折叠转化率较 SF 组(60.47%)降低 21.01%,实现了灭菌条件下 SF 溶液的长期稳定。

参考文献:

[1] Liu B, Song Y W, Jin L, et al. Silk structure and degradation

[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2015, 131: 122-128.

[2] Vepari C, Kaplan D L. Silk as a biomaterial[J]. Progress in Polymer Science, 2007, 32(8/9): 991-1007.

[3] Floren M, Migliaresi C, Motta A. Processing techniques and applications of silk hydrogels in bioengineering[J]. Journal of Functional Biomaterials, 2016, 7(3):26.

[4] Sun W, Incitti T, Migliaresi C, et al. Viability and neuronal differentiation of neural stem cells encapsulated in silk fibroin hydrogel functionalized with an IKVAV peptide[J]. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2017, 11(5): 1532-1541.

[5] Smeets R, Tauer N, Vollkommer T, et al. Tissue adhesives in reconstructive and aesthetic surgery: application of silk fibroin-based biomaterials [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(14): 7687.

[6] Partlow B P, Tabatabai A P, Leisk G G, et al. Silk fibroin degradation related to rheological and mechanical properties[J]. Macromolecular Bioscience, 2016, 16(5): 666-675.

[7] Chen S Y, Liu M Y, Huang H M, et al. Mechanical properties of *Bombyx mori* silkworm silk fibre and its corresponding silk fibroin filament: a comparative study[J]. Materials & Design, 2019, 181: 108077.

[8] Li J, Yang F, Liu D Y, et al. Graphene composite paper synergized with micro/nanocellulose-fiber and silk fibroin for flexible strain sensor[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 240: 124439.

[9] Lu S J, Tang X C, Lu Q Q, et al. In vitro and in vivo degradation of silk fibers degummed with various sodium carbonate concentrations[J]. Materials Today Communications, 2021, 27: 102369.

[10] 张野妹, 潘志娟. 再生天然丝蛋白的分子构象转化特征与机理的研究现状[J]. 丝绸, 2013, 50(7): 34-40,46.

[11] Li X G, Wu L Y, Huang M R, et al. Conformational transition and liquid crystalline state of regenerated silk fibroin in water[J]. Biopolymers, 2008, 89(6): 497-505.

[12] Huang W, Ling S, Li C, et al. Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology [J]. Chemical Society Reviews, 2018, 47(17): 6486-6504.

[13] Khan S N, Khan S, Misba L, et al. Synergistic fungicidal activity with low doses of eugenol and amphotericin B against Candida albicans [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 518(3): 459-464.

[14] Abedi-Gaballu F, Dehghan G, Ghaffari M, et al. PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy[J]. Applied Materials Today, 2018, 12: 177-190.

[15] Domański D M, Klajnert B, Bryszewska M. Influence of PAMAM dendrimers on human red blood cells [J]. Bioelectrochemistry. 2004, 63(1/2): 189-191.

[16] Heiden T C K, Dengler E, Kao W J, et al. Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2007, 225(1): 70-79.

[17] Liu J, Huang R, Li G, et al. Generation of nano-pores in silk fibroin films using silk nanoparticles for full-thickness wound healing[J]. Biomacromolecules, 2021, 22(2): 546-556.

[18] Manning M C, Chou D K, Murphy B M, et al. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update [J]. Pharmaceutical Research, 2010, 27(4): 544-575.

[19] Zhang X Y, Xiao L Y, Ding Z Z, et al. Fragile-tough mechanical reversion of silk materials via tuning supramolecular assembly[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2021, 7(6): 2337-2345.

[20] Bissett D L, Miyamoto K, Sun P, et al. Topical niacinamide reduces yellowing, wrinkling, red blotchiness, and hyperpigmented spots in aging facial skin[J]. International Journal of Cosmetic Science, 2004, 26(5): 231-238.

[21] Marques C, Hadjab F, Porcello A, et al. Mechanistic insights into the multiple functions of niacinamide: therapeutic implications and cosmeceutical applications in functional skincare products[J]. Antioxidants, 2024, 13(4): 425.

[22] Zhou M, Lin F, Li W D, et al. Development of nanosilver doped carboxymethyl chitosan-polyamideamine alginate composite dressing for wound treatment [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 166: 1335-1351.

[23] Yan C J, Zhou Z. Walnut pellicle phenolics greatly influence the extraction and structural properties of walnut protein isolates[J]. Food Research International, 2021, 141: 110163.

[24] 李炜祥, 凌静, 王详, 等. 单宁酸对丝素蛋白二级结构的影响作用研究[J]. 丝绸, 2023, 60(6): 1-6.

[25] Barth A. Infrared spectroscopy of proteins [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2007, 1767(9): 1073-1101.

团队介绍

浙江理工大学智能生物材料研究所主要围绕以生物相容性功能材料、仿生医用材料为基础的生物材料开展研究工作,具体研究方向包括智能微针材料、智能皮肤修复材料、生物相容/生物可降解材料、胶囊智能微体系、纳米生物医用发光材料的新合成方法与特性。智能生物材料研究所建有省级研究平台浙江-毛里求斯生物医用材料与组织工程联合研究中心、浙江省智能生物材料与功能纤维国际科技合作基地,与毛里求斯大学、浙江大学、复旦大学等国内外高校具有良好合作关系,与多家高科技企业建立了长期战略伙伴关系。每年有近百人次的教师与研究生参加国际学术讨论、国际合作研究或在外进修和攻读学位。

江国华,教授,博导/硕导,2006年3月毕业于浙江大学材料与化学工程学院高分子化学与物理专业,获理学博士学位;2006年8月至2008年7月先后在新加坡南洋理工大学和美国密歇根大学任博士后研究员。目前已在 *Soft Matter*、*ACS Applied Materials & Interfaces*、*Polymer Chemistry*、*Journal of Materials Chemistry-A*、*ACS Macro Letters* 等重要学术期刊发表 SCI 论文近 100 篇,获授权专利 8 项,获中国商业联合会科学技术奖——全国商业科技进步奖二等奖 1 项,浙江省高校科研成果二等奖 1 项,中国纺织工业联合会纺织教育教学成果三等奖 1 项,浙江省自然科学奖二等奖、三等奖各 1 项,“十一五”浙江省自然科学基金优秀成果 1 项,主持和参加了多项国家自然科学基金和省自然科学基金等纵向项目及企业横向项目。主要研究方向包括环境响应性聚合物的分子设计与应用、光催化复合材料的制备与应用、有机-无机纳米复合材料的制备与应用。刘轩,硕士研究生,主要从事生物大分子组装与功能材料的研究。

(责任编辑:张会巍)