

文章编号: 1008-9357(2026)01-0074-11

DOI: 10.14133/j.cnki.1008-9357.20251116001

丝素蛋白水溶液制备工艺对其冻融再生多孔 支架材料结构与性能的影响

王雅欣^{1,2,3}, 石天奇^{1,2,3}, 王倩^{1,2,3}, 宁晚娥^{1,2,3}, 黄继伟^{1,2,3}
(广西科技大学 1. 生物与化学工程学院, 2. 天虹现代纺织产业学院,
3. 广西壮族自治区丝绸工程研究中心, 广西柳州 545006)

摘要: 选用氯化钙-乙醇-水、溴化锂-水和氯化钙-甲酸这3种典型溶剂溶解脱胶蚕丝, 并对所得的丝素蛋白溶解液进行透析、过滤和浓缩等处理, 制备出3种丝素蛋白水溶液。随后, 采用冻融法将这3种丝素蛋白水溶液分别制备成多孔支架材料。通过扫描电子显微镜(SEM)、X射线衍射(XRD)、傅里叶变换红外光谱(FT-IR)、热重分析(TGA)、差示扫描量热(DSC)和力学分析等对所得多孔支架材料的形貌、孔隙率、结构、热稳定性及力学性能等进行了表征和测试。结果表明, 不同丝素蛋白水溶液制备工艺对其冻融再生多孔支架材料的结构和性能影响并不显著, 3种多孔支架材料均具有相互连通的多孔形貌和稳定的 Silk I 结构, 但基于氯化钙-甲酸溶剂制备的丝素蛋白多孔支架材料具有更高的 β -折叠含量, 压缩力学性能更优。

关键词: 氯化钙-甲酸溶剂体系; 丝素蛋白水溶液; 冻融法; 多孔支架材料; Silk I 结构

中图分类号: R318.08

文献标志码: A

Effect of Silk Fibroin Aqueous Solution on Structure and Properties of Regenerated Porous Scaffold Materials Using Freeze-Thaw Method

WANG Yaxin^{1,2,3}, SHI Tianqi^{1,2,3}, WANG Qian^{1,2,3}, NING Wan'e^{1,2,3}, HUANG Jiwei^{1,2,3}

(1. College of Biological and Chemical Engineering, 2. Rainbow Modern Textile Industry College, 3. Guangxi Zhuang Autonomous Region Engineering Research Center of Silk, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, Guangxi, China)

Abstract: Three typical solvent systems, calcium chloride-ethanol-water, lithium bromide-water, and calcium chloride-formic acid, were employed to dissolve degummed silk fibers. The resulting silk fibroin solutions were subsequently subjected to dialysis, filtration, and concentration processes to obtain three distinct silk fibroin aqueous solutions. Porous scaffolds were then fabricated from each solution using the freeze-thaw method. The morphology, porosity, structure, thermal stability, and mechanical properties of the resulting scaffolds were characterized using scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC), and mechanical testing. The results indicated that the preparation methods of the three silk

收稿日期: 2025-11-16

基金项目: 国家自然科学基金(51763001); 广西自然科学基金(2024GXNSFAA010390); 广西研究生教育创新计划(YCSW2023476)

作者简介: 王雅欣(1999—), 女, 硕士生, 研究方向为蚕丝工程及丝蛋白基新材料。E-mail: 951476363@qq.com

通信联系人: 黄继伟, E-mail: huangjiwei@gxust.edu.cn

引用格式: 王雅欣, 石天奇, 王倩, 宁晚娥, 黄继伟. 丝素蛋白水溶液制备工艺对其冻融再生多孔支架材料结构与性能的影响 [J]. 功能高分子学报, 2026, 39(1): 74-84.

Citation: WANG Yaxin, SHI Tianqi, WANG Qian, NING Wan'e, HUANG Jiwei. Effect of Silk Fibroin Aqueous Solution on Structure and Properties of Regenerated Porous Scaffold Materials Using Freeze-Thaw Method [J]. Journal of Functional Polymers, 2026, 39(1): 74-84.

fibroin aqueous solutions exerted only a minor influence on the structure and properties of the freeze-thaw-derived porous scaffolds. All scaffolds exhibited interconnected porous architectures and a stable Silk I conformation. However, the scaffold derived from the calcium chloride-formic acid-based silk fibroin solution showed a higher β -sheet content and superior compressive mechanical properties.

Key words: calcium chloride-formic acid solvent system; silk fibroin aqueous solution; freeze-thaw method; porous scaffold material; Silk I structure

丝素蛋白(Silk Fibroin, SF)是一种源于蚕丝的天然高分子聚合物,可大规模生产,且已获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准认证^[1]。SF因具有优异的生物相容性、低免疫原性、可调控的生物降解性、易于功能化修饰以及良好的结构可设计性和力学性能,已成为构建生物多孔支架的理想候选原材料^[2,3]。围绕SF的提取与再生,以及在此过程中的结构演化规律与构效关系,一直是该领域的重要研究内容^[4]。其中,脱胶蚕丝的溶解行为及其所得溶解液的理化特性对再生丝素蛋白材料的结构与性能具有决定性影响,被视为关键基础环节^[5]。

脱胶蚕丝不溶于水及多数常规溶剂,这归因于其独特的氨基酸组成和高度稳定的Silk II型结晶结构。丝素蛋白的氨基酸序列中约75%为非极性或疏水性残基,其肽链大分子倾向于通过氢键自组装形成高度有序且热力学稳定的反平行 β -折叠片层结构(即Silk II)。这种致密的结晶网络显著限制了溶剂分子的渗透与溶胀,从而导致其在水及多数常规溶剂中溶解度极低^[6]。理想的溶解方法应能有效破坏分子间的连接,同时不破坏多肽链的结构。不同的溶解条件会改变丝素蛋白分子的产率和分子量,进而在一定程度上影响所得丝素蛋白材料的物理化学性质和生物活性^[7]。对此,科研人员进行了大量研究,已形成了多套较为成熟的溶解技术方案。其中,以溴化锂水溶液(LiBr-H₂O)和氯化钙-乙醇-水溶液(CaCl₂-EtOH-H₂O, 又称Ajisawa溶剂)为代表的溶解技术方案最为常用。LiBr-H₂O属于高浓度中性盐-水溶剂体系, LiBr的质量分数高达78.6%,这使得丝素蛋白溶解液必须经过长时间的透析处理才能转变为丝素蛋白水溶液。此外,高浓度的中性盐易使丝素蛋白降解,进而无法获得高质量的丝素蛋白再生材料^[8]。相对而言, CaCl₂-EtOH-H₂O中的盐浓度则明显降低,这不仅减少了后期透析处理的时间,还具有溶解效率高、对丝素蛋白作用缓和,成本低以及所得丝素蛋白溶液稳定性较好等优点^[9]。然而,无论是LiBr-H₂O, 还是CaCl₂-EtOH-H₂O作为溶剂,均需在一定温度和较长时间下才能完成,例如:以LiBr-H₂O为溶剂溶解脱胶蚕丝通常需要温度在60℃以上,溶解时长为4~6 h^[10,11];以CaCl₂-EtOH-H₂O为溶剂溶解脱胶蚕丝则需要温度在75℃以上,溶解时长为2~4 h^[12]。

近年来,另一种脱胶蚕丝溶解技术方案备受关注,其采用氯化钙-甲酸溶液(CaCl₂-FA)为溶剂,该溶剂中的CaCl₂质量分数可低至2%,且无需加热,室温即可实现脱胶蚕丝的溶解,完全溶解的时长在2 h以内^[13]。更重要的是,以CaCl₂-FA为溶剂可实现脱胶蚕丝的“原纤级”溶解,即将脱胶蚕丝解离成纳米原纤,而非完全拆解为大分子,所得纳米原纤的形态与尺寸则依赖CaCl₂的浓度^[14,15]。已有研究证实,甲酸能够提供良好的溶液稳定性,所得丝素蛋白溶液透明度高、储存稳定,且具有诱导丝素蛋白结晶化的能力,是一种优良的脱胶蚕丝溶剂^[16,17]。然而,甲酸具有较强的腐蚀性和较高的挥发性^[18],这严重限制了基于CaCl₂-FA溶剂的纳米级丝素原纤溶液在多领域的拓展,使得CaCl₂-FA溶剂的“原纤级”溶解能力无法发挥。找到一种可行的技术方案将CaCl₂-FA溶剂溶解脱胶蚕丝所得溶解液进行水化处理成为解决这一问题的关键。已有相关研究表明,通过对丝素蛋白的CaCl₂-FA溶解液进行湿气处理,配合稀碱溶液透析处理,可以将丝素蛋白的CaCl₂-FA溶解液转化为丝素蛋白水溶液^[19-21]。然而,基于该工艺所得丝素蛋白水溶液与常用溶剂制备丝素蛋白水溶液之间的差异及其对再生材料结构与性能的影响尚不明确。

本文选取CaCl₂-EtOH-H₂O、LiBr-H₂O和CaCl₂-FA分别溶解脱胶蚕丝,并对所得的丝素蛋白溶解液进行透析、过滤和浓缩等处理,制备出3种丝素蛋白水溶液,随后采用冻融法将这3种丝素蛋白水溶液制备成多孔支架材料,探讨了不同丝素蛋白水溶液制备工艺对其冻融再生多孔支架材料结构与性能的影响。

1 实验部分

1.1 原料和试剂

桑蚕生丝: 柳州市昌海茧丝有限责任公司; 无水碳酸钠: 分析纯, 广东光华科技股份有限公司; 无水氯化

钙:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;氢氧化钠、甲酸、无水溴化锂、无水乙醇:分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 实验仪器

电子天平(奥豪斯 AR224CN 型);双数显恒温磁力搅拌器(常州时博 HJ-6B 型);磁力搅拌水浴锅(金坛市城西富威 FJS-6 型);电热鼓风干燥箱(余姚市正泰 XMA-600 型);电子万能试验机(东莞宝大 PT-1198 型);冰箱(小米 BCD-215MDMJ05 型);冷冻干燥机(上海田枫 TF-FD-1 型);场发射扫描电镜(德国蔡司 Sigma300 型);全自动 X 射线衍射仪(荷兰 PANalytical 公司 X'PertPro 型);傅里叶变换红外光谱仪(茨颀光学 FOLI10-R 型);Jupiter 同步热分析仪(德国耐驰 STA449F5 型)。

1.3 实验步骤

1.3.1 桑蚕生丝的脱胶 采用碱法对桑蚕生丝进行脱胶,将一定质量桑蚕生丝放入 $w=0.5\%$ 的碳酸钠溶液中,浴比 1:200(1g 桑蚕生丝需要 200 mL 处理液处理),100 °C 煮沸脱胶,30 min 后取出,用去离子水反复清洗,重复该脱胶过程 3 次。脱胶后的蚕丝在室温下自然晾干并剪碎后备用。

1.3.2 基于 $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$ 溶剂制备丝素蛋白水溶液 称取一定质量的脱胶蚕丝,将其置于 $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$ 溶剂($n(\text{CaCl}_2):n(\text{EtOH}):n(\text{H}_2\text{O})=1:2:8$)中溶解,浴比 1:10,于 80 °C 恒温水浴条件下搅拌 3 h 得到丝素蛋白溶解液,待溶解液冷却至室温后,转移至截留分子量为 3500 的透析袋中,再置于流动的去离子水中透析 72 h,以脱除体系中的乙醇和氯化钙。透析结束后,将溶液于 8000 r/min 转速下离心 10 min,分离去除凝聚物,离心收集上清液,得到基于 $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$ 溶剂制备的丝素蛋白水溶液。

1.3.3 基于 $\text{LiBr-H}_2\text{O}$ 溶剂制备丝素蛋白水溶液 称取一定质量的脱胶蚕丝,将其置于 $\text{LiBr-H}_2\text{O}$ 溶剂($c=9.3\text{ mol/L}$)中溶解,浴比 1:10,于 60 °C 恒温水浴下搅拌 5 h 得到丝素蛋白溶解液,待溶解液冷却至室温后,用 0.45 μm 滤膜过滤,再进行透析和离心(方法同 1.3.2 节),收集上清液,得到基于 $\text{LiBr-H}_2\text{O}$ 溶剂制备的丝素蛋白水溶液。

1.3.4 基于 $\text{CaCl}_2\text{-FA}$ 溶剂制备丝素蛋白水溶液 称取一定质量的脱胶蚕丝,将其置于 $\text{CaCl}_2\text{-FA}$ 溶剂($c=0.2\text{ mol/L}$)中溶解,采用磁力搅拌辅助溶解,搅拌至完全溶解的时间约 2 h,制得 $\text{SF-CaCl}_2\text{-FA}$ 混合溶解液,然后将所得溶解液置于敞口玻璃容器中,并放入自制箱体装置中,通入水蒸气持续加湿 6 h;随后将经加湿处理的溶液转入透析袋,置于 0.075 mol/L NaOH 溶液中进行透析处理,其间每 30 min 更换 1 次 NaOH 溶液,当透析袋内溶液 pH 达到 7~8 后,将透析袋转移至去离子水中继续透析 24 h,透析结束后离心,收集上清液,得到基于 $\text{CaCl}_2\text{-FA}$ 溶剂制备的丝素蛋白水溶液。

1.3.5 基于冻融法制备丝素蛋白多孔支架材料 将上述 3 种丝素蛋白水溶液分别装入透析袋,置于聚乙二醇溶液($w=40\%$)中进行浓缩处理约 6 h,将所得浓缩液稀释至 $w(\text{SF})$ 为 5%,用 0.45 μm 滤膜过滤后分别移至 24 孔板中,先置于 -20 °C 冰柜中冷冻处理 24 h,随后转移至 -5 °C 冰柜中继续冷冻 48 h,冷冻结束后取出样品,在室温环境下自然解冻 6 h,获得冻融法制备的丝素蛋白多孔支架材料。将这 3 种丝素蛋白多孔支架材料分为 4 组进行后处理:(1)直接在室温下晾干(Air-drying);(2)先浸泡于纯水中 2 h,之后在室温下晾干(Soaking in water, then air-drying);(3)先浸泡于体积分数为 75% 乙醇溶液中 2 h,再转移至纯水中浸泡 2 h,之后置于室温下晾干(Soaking in ethanol, then air-drying);(4)先置于 -5 °C 冰柜中冷冻 24 h,再进行冷冻干燥(Freeze-drying),最终得到基于冻融法及其不同后处理方式制备的丝素蛋白多孔支架材料。

1.4 测试与表征

1.4.1 扫描电镜(SEM) 使用刀片切取丝素蛋白多孔支架材料的中间部分,切片厚度约 3 mm,使用导电胶将样品固定于样品台表面,经 60 s 喷金处理后将样品置于场发射扫描电镜下观察,设定电压为 10 kV。

1.4.2 傅里叶变换红外衰减全反射光谱(FTIR-ATR) 使用傅里叶变换红外光谱仪对丝素蛋白多孔支架材料进行红外光谱表征,取少量碎片状样品置于探头下方,下压探头使其与样品充分接触,扫描区间设定为 400~4000 cm^{-1} ,分辨率为 4 cm^{-1} 。

1.4.3 X 射线衍射(XRD) 使用 X 射线衍射仪对碎片状样品进行测试分析,以 $\text{Cu-K}\alpha$ 辐射作为 X 射线光源,设定电压为 40 kV、电流为 40 mA,扫描速率为 10($^\circ$)/min,扫描角度为 5°~50°。

1.4.4 热学性能 在氮气氛围下,用同步热分析仪对碎片状样品进行热学性能测试,吹扫流速控制为 20 mL/min,升温速率设定为 10 °C/min,温度区间为 25~800 °C。

1.4.5 孔隙率 依据液体置换法^[22]测定丝素蛋白多孔支架材料的孔隙率(R_E)。将干燥后的多孔支架材料置

于无水乙醇溶液(体积为 V_0)中,待样品被无水乙醇完全浸没后,测定体系总体积为 V_1 ;随后取出样品,记录剩余无水乙醇的体积为 V_2 。依据公式(1)计算 R_E ,每组样品平行测定3次,结果取平均值。

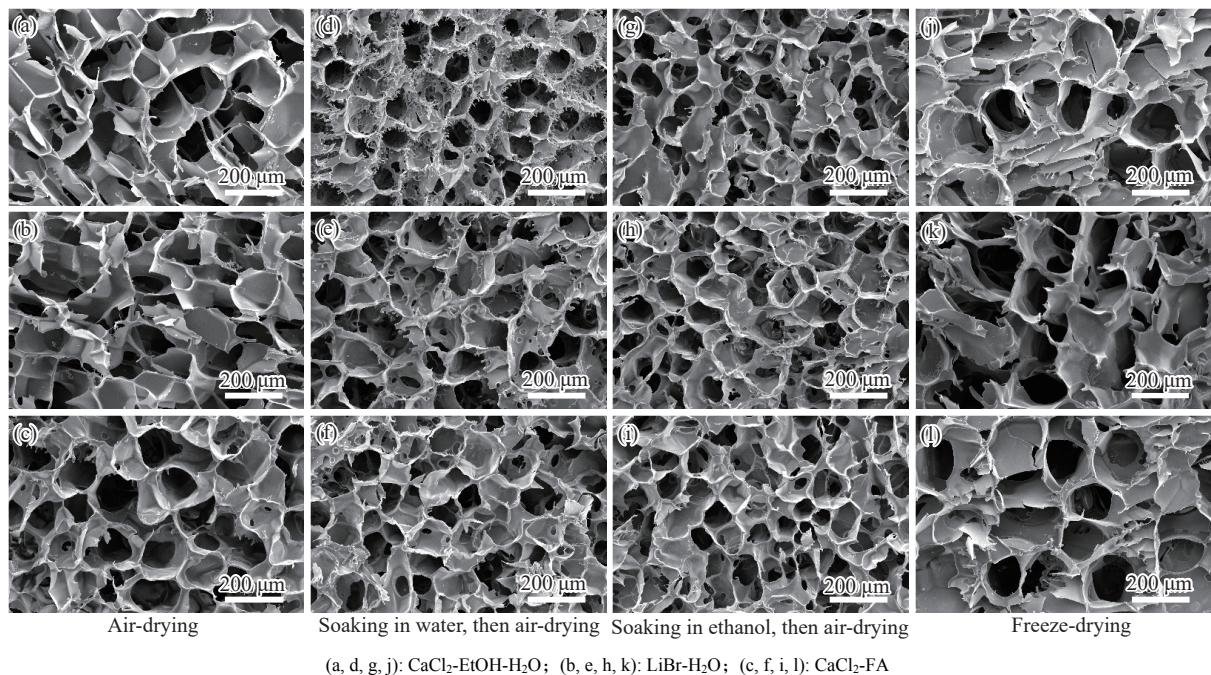
$$R_E = \frac{V_0 - V_2}{V_1 - V_2} \times 100\% \quad (1)$$

1.4.6 力学性能 用电子万能试验机对丝素蛋白多孔支架材料进行干、湿两种状态下的压缩性能测试^[23]。圆柱状支架材料的直径约14 mm、高度约10 mm。干态测试时,直接将样品置于电子万能试验机上进行压缩测试;湿态测试时,样品需浸泡在去离子水中预处理10 min,然后吸去表面多余水分,再进行压缩测试。测试过程中设定压头下压速率为3 mm/min,当压缩变形量达到支架材料初始高度的60%时终止。压缩模量通过应力-应变曲线在3%~8%区间的斜率计算得出^[24]。每组测试重复5次。

2 结果与分析

2.1 微观形貌与孔隙率

不同丝素蛋白多孔支架材料的微观形貌如图1所示。由图1可见,所制备的丝素蛋白多孔支架材料均呈现出相互连通的多孔网络结构,这些相互连通的多孔网络结构可为细胞迁移与营养物质传输提供理想的微环境,符合组织工程领域对支架材料的核心使用需求^[25]。相比较而言,不同的冻融后处理工艺对所制备的丝素蛋白多孔支架材料的多孔网络结构影响不明显。



(a, d, g, j): $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$; (b, e, h, k): $\text{LiBr-H}_2\text{O}$; (c, f, i, l): $\text{CaCl}_2\text{-FA}$

图1 多孔支架材料的微观形貌

Fig. 1 Morphology of porous scaffold materials

不同丝素蛋白多孔支架材料的孔隙率如图2所示。由图2可知,所制备的丝素蛋白多孔支架材料具有较高的孔隙率(84%~94%),可满足皮肤、脂肪和软骨等组织工程用支架材料的再生要求^[26]。相比较而言,基于不同溶剂制备丝素蛋白水溶液对其经冻融法制备的多孔支架材料的孔隙率影响不显著。然而,不同的冻融后处理工艺对所制备的丝素蛋白多孔支架材料的孔隙率却有明显影响(孔隙率从高到低依次为冷冻干燥、自然干燥、浸泡水后自然干燥、浸泡乙醇后自然干燥)。冷冻干燥过程中冰晶的升华作用可有效形成多孔结构,因而被认为是获得高孔隙率支架的最优工艺。相比之下,自然干燥及水、乙醇浸泡后自然干燥所制备的丝素蛋白多孔支架的孔隙率逐渐降低,这与丝素蛋白在这些工艺条件下发生构象转变,导致多孔支架材料收缩等因素有关,尤其是乙醇作为一种有效的丝素蛋白促结晶剂,能促使丝素蛋白向 β -折叠构象转变,进而导致丝素蛋白多孔支架材料发生收缩,孔隙率下降^[27]。

2.2 结构分析

2.2.1 XRD 分析 图 3 为不同丝素蛋白多孔支架材料的 XRD 图谱。由图 3 可知,所制备的丝素蛋白多孔支架材料均在 12.0° 、 19.8° 、 24.5° 、 28.2° 和 37.0° 附近出现衍射峰。其中, 12.0° 和 19.8° 处的衍射峰较强,此两处的衍射峰是 Silk I 结晶结构的标志特征; 24.3° 、 28.2° 和 37.0° 处的衍射峰虽较弱,但亦可印证丝素蛋白材料属于 Silk I 结晶结构^[28, 29]。相比较而言,基于 $\text{CaCl}_2\text{-FA}$ 溶剂制备的丝素蛋白水溶液经冻融法所得多孔支架材料在 19.8° 处的 Silk I 特征峰强度高于基于 $\text{LiBr-H}_2\text{O}$ 和基于 $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$ 溶剂所得的丝素蛋白多孔支架材料,且峰形尖锐,这说明基于 $\text{CaCl}_2\text{-FA}$ 溶剂所得丝素蛋白多孔支架的结晶度较高。经不同的冻融后处理工艺所制备的丝素蛋白多孔支架材料的 XRD 图谱及峰位并没有显著变化,依然表现出 Silk I 结晶结构,说明基于冻融法制备的丝素蛋白多孔支架材料具有稳定的 Silk I 结晶结构,且冻融后处理工艺对这种 Silk I 结晶结构的影响并不明显。

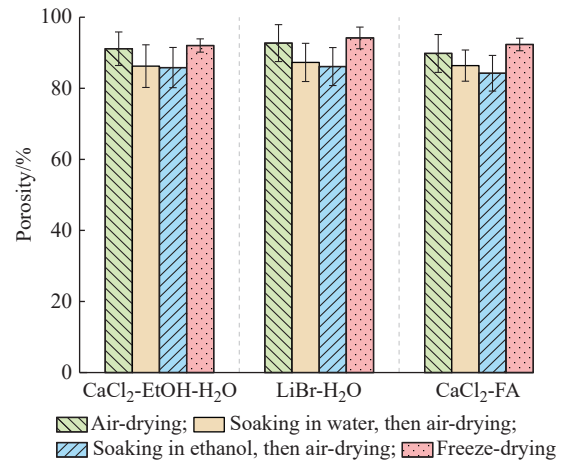


图 2 多孔支架材料的孔隙率

Fig. 2 Porosity of porous scaffold materials

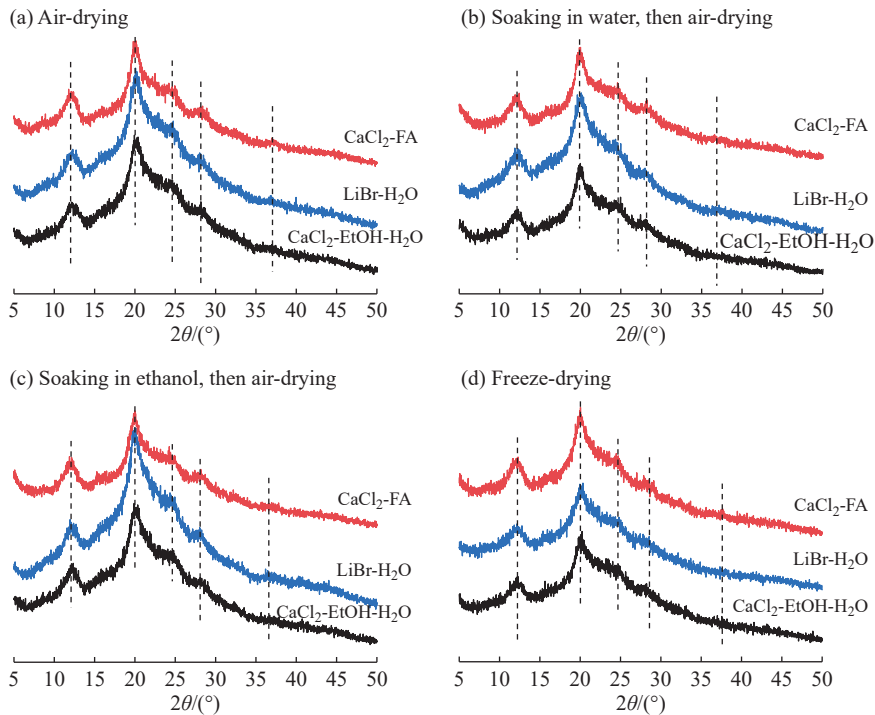


图 3 多孔支架材料的 XRD 图谱

Fig. 3 XRD spectra of porous scaffold materials

2.2.2 FT-IR 分析 图 4 为不同丝素蛋白多孔支架材料的 FT-IR 图谱。 $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 对应丝素蛋白的酰胺 I 区,其特征峰主要源于 C=O 和 C-N 键的伸缩振动,同时受 N-H 键平面内弯曲振动的影响; $1600\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 为丝素蛋白的酰胺 II 区,其特征峰主要由 N-H 键平面内弯曲振动及 C-N 键伸缩振动共同作用; $1350\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 为丝素蛋白的酰胺 III 区,其特征峰主要归因于 C-N 键伸缩振动与 N-H 键平面内弯曲振动的协同作用^[30]。由图 4(a)可知,基于 $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$ 溶剂制备的丝素蛋白多孔支架材料在酰胺 I 区存在一个非尖锐峰,其峰位分布于 $1646\sim 1624\text{ cm}^{-1}$ 之间,且 1646 cm^{-1} 与 1624 cm^{-1} 处的透射率几乎相等。基于 $\text{LiBr-H}_2\text{O}$ 溶剂制备的丝素蛋白多孔支架材料在酰胺 I 区亦存在一个非尖锐峰,但 1646 cm^{-1} 处的透射率低于 1624 cm^{-1} 处,而基于 $\text{CaCl}_2\text{-FA}$ 溶剂制备的丝素蛋白多孔支架材料在酰胺 I 区 1646 cm^{-1} 处的透射率更低,使得其在酰胺 I 区形成了近似单一的尖锐峰。通常,对于丝素蛋白材料的酰胺 I 区, 1646 cm^{-1} 处的峰位表明其以无规卷曲或 α -螺旋构象为主,而 1624 cm^{-1} 处的峰位则表明其以 β -折叠构象为主。图 4(a)说明基于 $\text{CaCl}_2\text{-FA}$

FA 溶剂制备的丝素蛋白多孔支架材料中 β -折叠构象的含量最高, 基于 LiBr-H₂O 溶剂制备的丝素蛋白多孔支架材料中的 β -折叠构象的含量次之, 而基于 CaCl₂-EtOH-H₂O 溶剂制备的丝素蛋白多孔支架材料中的 β -折叠构象的含量最低。图 4(b、d) 与图 4(a) 存在类似的现象, 这说明自然干燥、浸泡水后自然干燥和冷冻干燥对丝素蛋白多孔支架材料二级结构的影响近似。由图 4(c) 可知, 基于 3 种不同溶剂所得的丝素蛋白多孔支架材料在酰胺 I 区仅在 1622 cm⁻¹ 处存在 1 个尖锐的单峰, 这说明采用浸泡乙醇后自然干燥所得的丝素蛋白多孔支架材料以 β -折叠构象为主。正如前文所述, 乙醇是一种有效的丝素蛋白促结晶剂, 能促使丝素蛋白向 β -折叠构象转变^[27], 这可解释图 4(c) 所呈现的结果。

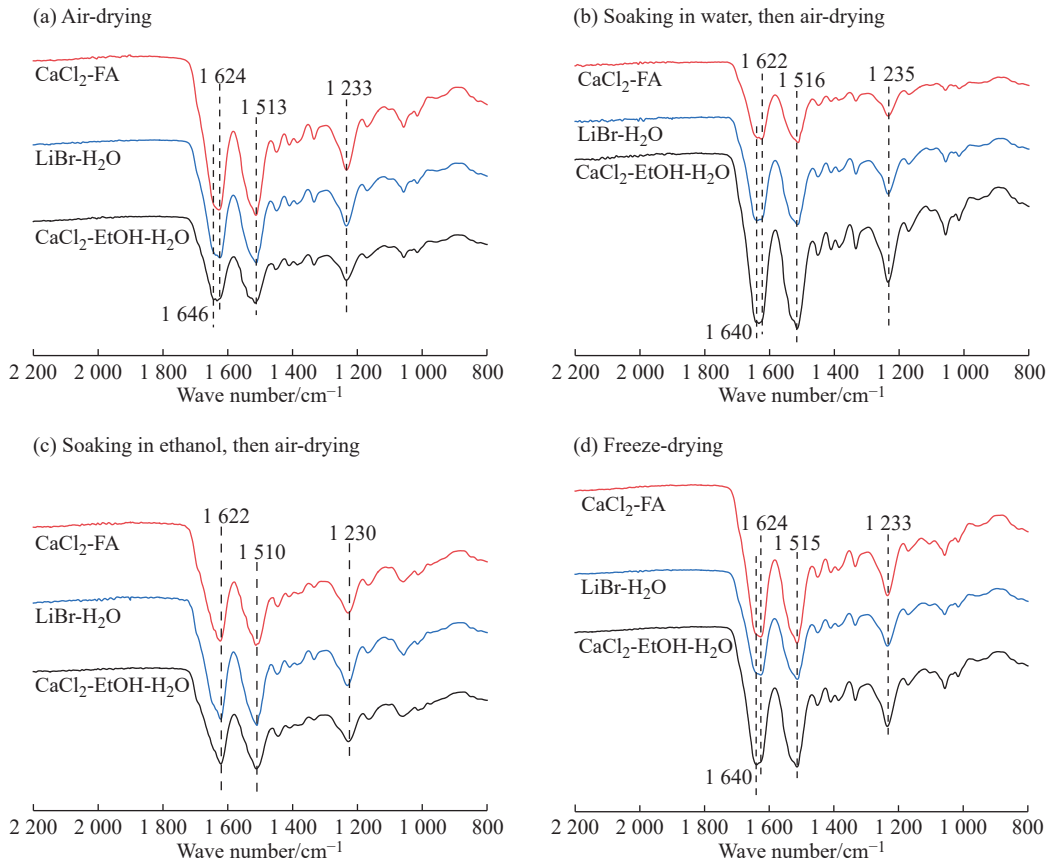


图 4 多孔支架材料的 FT-IR 图谱
Fig. 4 FT-IR spectra of porous scaffold materials

为实现进一步的量化分析, 采用 Hu 等^[30] 建立的方法, 对丝素蛋白多孔支架材料 FT-IR 图谱中酰胺 I 区的特征吸收峰进行分峰拟合, 通过计算获得二级结构各组分的相对含量(表 1)。由表 1 可知, 在相同的冻融后处理工艺条件下, 基于 CaCl₂-FA 溶剂制备的丝素蛋白多孔支架材料中 β -折叠构象相对含量稍高; 在 4 种冻融后处理工艺条件中, 冻融后浸泡乙醇再自然干燥所得丝素蛋白多孔支架材料的 β -折叠构象相对含量最高。分析认为, 以 CaCl₂-FA 为溶剂溶解脱胶蚕丝所得溶液在加湿和稀碱溶液透析过程中, 甲酸对丝素蛋白 β -折叠构象的形成存在一定的诱导作用^[31]。然而, 与以 CaCl₂-FA 为溶剂溶解脱胶蚕丝所得溶液直接风干(这种处理方式将会导致丝素蛋白形成高度的 Silk II 结晶结构^[32])相比, 在加湿和稀碱溶液透析过程中, 甲酸诱导丝素蛋白 β -折叠构象形成的能力则显著不足, 这可能与水分子的存在限制了丝素蛋白分子的聚集有关。

2.3 热学性能

图 5 所示为不同丝素蛋白多孔支架材料的热分析曲线。由图 5 可见, 基于 3 种不同溶剂制备的丝素蛋白多孔支架材料的热分析曲线呈现出显著的相似性, 这说明所制备的丝素蛋白多孔支架材料具有相似的热稳定性。由 TGA 曲线可知, 所制备的丝素蛋白多孔支架材料在 110 °C 左右水分散失完全, 在 260 °C 左右开始出现热分解。由 DTG 曲线可知, 所制备的丝素蛋白多孔支架材料的最大热分解速率温度出现在 298 °C 附近。由 DSC 曲线可知, 所制备的丝素蛋白多孔支架材料在 290 °C 左右出现吸热峰。

丝素蛋白多孔支架材料的热学性能与其结晶结构有关, 通常结晶度越高, 其最大热分解速率温度越高,

表 1 多孔支架材料的二级结构相对含量
Table 1 Secondary structure relative content of porous scaffold materials

Post-processing	Solution	Relative content/%			
		β -Sheet	Random coil	α -Helix	β -Turn
Air-drying	CaCl ₂ -EtOH-H ₂ O	31.62	29.93	10.81	17.82
	LiBr-H ₂ O	31.98	29.87	9.98	17.91
	CaCl ₂ -FA	33.25	28.63	10.02	18.01
Soaking in water, then air-drying	CaCl ₂ -EtOH-H ₂ O	32.09	28.99	9.87	18.12
	LiBr-H ₂ O	32.17	29.05	10.12	17.93
	CaCl ₂ -FA	34.67	28.31	10.06	17.11
Soaking in ethanol, then air-drying	CaCl ₂ -EtOH-H ₂ O	35.43	27.33	10.77	17.25
	LiBr-H ₂ O	35.69	27.45	10.68	17.31
	CaCl ₂ -FA	35.72	26.99	10.74	17.48
Freeze-drying	CaCl ₂ -EtOH-H ₂ O	32.16	29.56	10.94	17.32
	LiBr-H ₂ O	32.21	29.83	10.05	17.62
	CaCl ₂ -FA	34.53	28.74	10.11	16.81

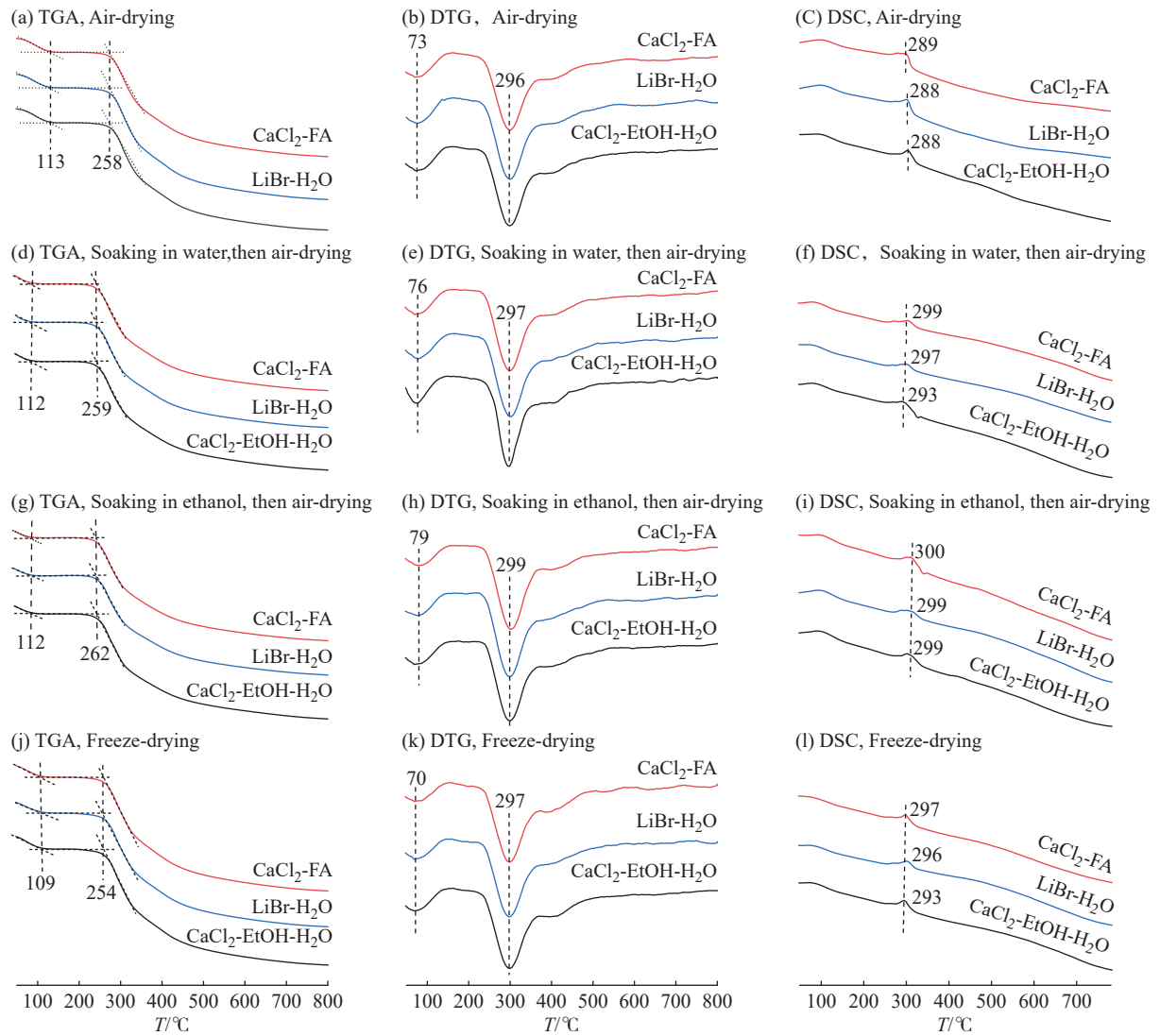


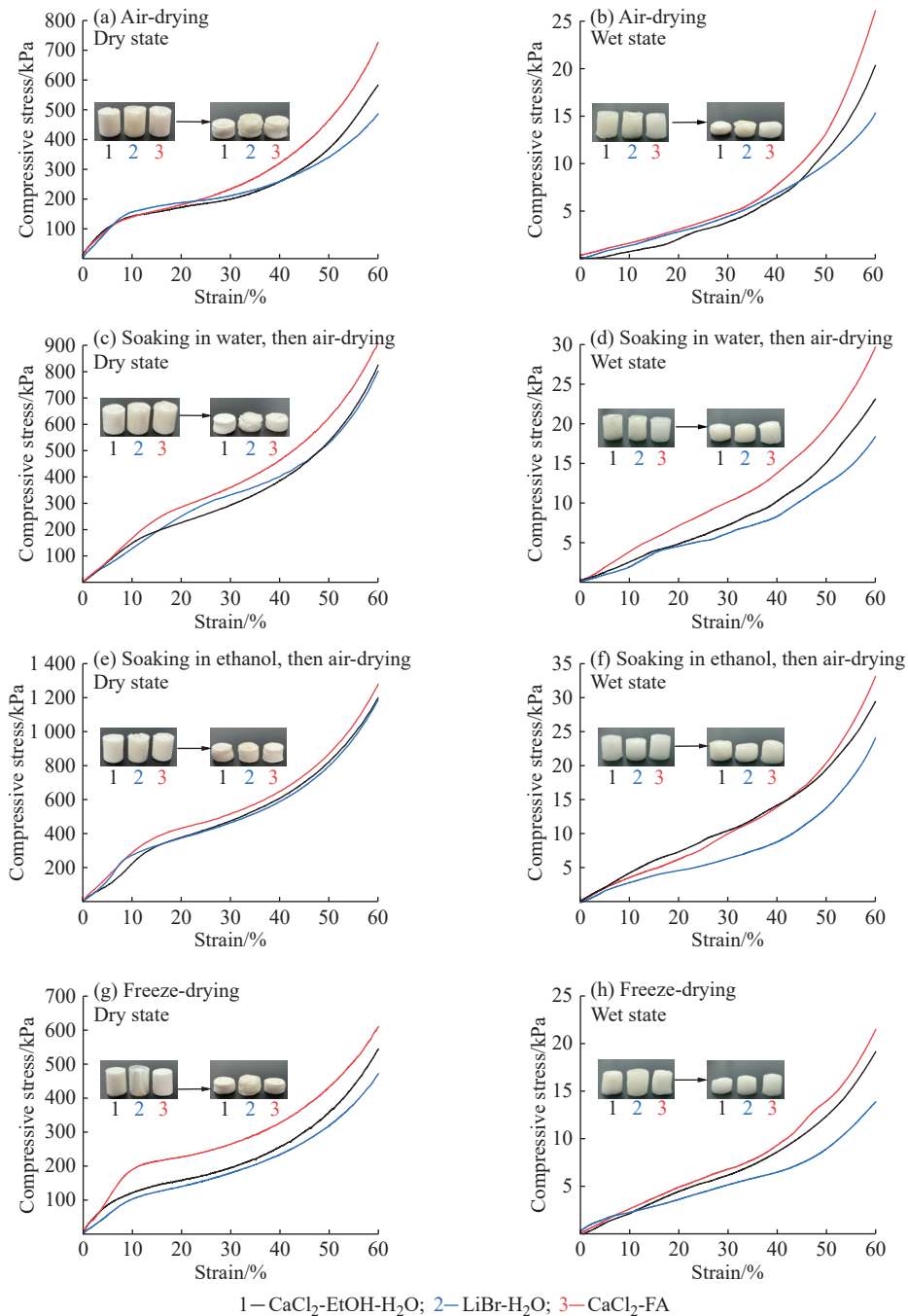
图 5 多孔支架材料的热分析曲线

Fig. 5 Thermal analysis curves of porous scaffold materials

吸热峰温度也越高。对比所制备丝素蛋白多孔支架材料的热分析曲线可知, 冻融后浸泡乙醇再自然干燥所得丝素蛋白多孔支架材料的最大热分解速率温度和吸热峰温度最高, 这与前述的结构分析基本对应。对于不同丝素蛋白水溶液制备的多孔支架材料, 基于 $\text{CaCl}_2\text{-FA}$ 溶剂制备的丝素蛋白多孔支架材料的吸热峰温度最高, 这与前文分析结果基本一致。然而, 基于 $\text{CaCl}_2\text{-FA}$ 溶剂制备的丝素蛋白多孔支架材料的最大热分解速率温度与另外两种溶剂制备的丝素蛋白多孔支架材料相比并无明显差异, 这可能与微弱的 β -折叠含量差异并不能在最大热分解速率温度分析中体现出来有关。

2.4 力学性能

图 6 所示为不同丝素蛋白多孔支架材料在干态和湿态下的压缩应力-应变曲线。由图 6 可见, 丝素蛋白多孔支架材料的压缩应力-应变曲线呈现典型的 3 阶段特征: 第 1 阶段为弹性区, 该区域曲线近似线性, 反映材料在低压缩负荷下的弹性形变能力, 压缩模量可通过此区域曲线的斜率计算获得; 第 2 阶段为屈服区, 随



1— $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$; 2— $\text{LiBr-H}_2\text{O}$; 3— $\text{CaCl}_2\text{-FA}$

图 6 丝素蛋白多孔支架材料的压缩应力-应变曲线

Fig. 6 Compression stress-strain curves of porous scaffold materials

着压缩应力的增加,曲线斜率显著减小,曲线趋于平缓,表明材料内部结构开始发生塑性变形或局部滑移;第 3 阶段为硬化区,当压缩达到一定程度后,曲线斜率急剧增大,归因于材料内部孔隙结构被逐步压实,抵抗压缩的能力显著增强。

图 7 所示为不同丝素蛋白水溶液经冻融法制备的多孔支架材料的压缩模量和最大应力。由图 7 明显看出,冻融后浸泡乙醇再自然干燥所得丝素蛋白多孔支架材料的压缩模量和最大应力均为最高,这是由其 β -折叠含量高所致,与前文的分析结果是一致的。对比不同丝素蛋白水溶液所制备的丝素蛋白多孔支架材料的力学性能可知,基于 $\text{CaCl}_2\text{-FA}$ 溶剂制备的丝素蛋白多孔支架材料的压缩模量和最大应力均优于另外两种溶剂所制备的丝素蛋白多孔支架材料。

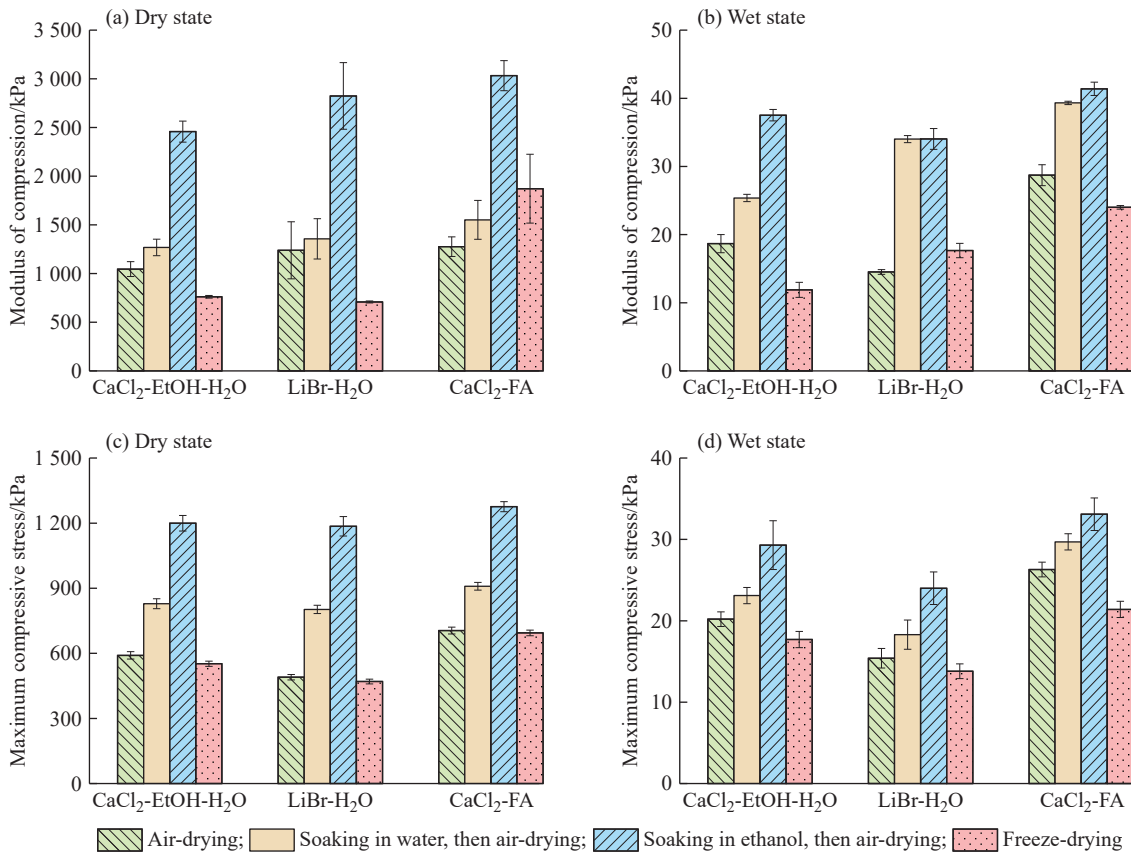


图 7 丝素蛋白多孔支架材料的压缩模量与最大应力

Fig. 7 Compressive modulus and maximum compressive stress of porous scaffold materials

3 结 论

(1) 3 种不同丝素蛋白水溶液制备工艺对其冻融再生多孔支架材料的结构和性能影响并不显著,均具有相互连通的多孔形貌和稳定的 Silk I 结构。相对而言,基于 $\text{CaCl}_2\text{-FA}$ 溶剂制备的丝素蛋白多孔支架具有更高的 β -折叠含量。

(2) 冻融后浸泡乙醇再自然干燥所得丝素蛋白多孔支架材料的 β -折叠含量更高,使得其具有更高的压缩模量和最大应力。

参考文献:

- [1] ZHAO W K, CAI G L, QIAN J Y, GENG J J, YAO X, ZHANG Y P. Protein conformational transition microenvironment in silk fibroin hydrogels: Proliferation and chondrogenesis of encapsulated stem cells [J]. *Regenerative Biomaterials*, 2025, 12: rbaf102.
- [2] WANG Y, FENG X, CHEN X. Autonomous bioelectronic devices based on silk fibroin [J]. *Advanced Materials*, 2025, 37(22):

- 2500073.
- [3] ZHU T H, CAI G L, ZHAO W K, YAO X, ZHANG Y P. Effects of silk fibroin hydrogel degradation on the proliferation and chondrogenesis of encapsulated stem cells [J]. *Biomacromolecules*, 2025, 26(2): 1305-1319.
- [4] YANG C, WANG H Y, WANG K, CAO Z L, REN F G, ZHOU G D, CHEN Y Z, SUN B. Silk fibroin-based biomembranes for bionic artificial intelligence robot applications [J]. *ACS Nano*, 2025, 19(18): 17173-17198.
- [5] YANG G, LIU Y, LU Q. Advances of silk nanofibrils: Preparation, properties, and applications [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2025, 25(9): e00066.
- [6] CARISSIMI G, BARONIO C M, MONTALBÁN M G, VÍLLORA G, BARTH A. On the secondary structure of silk fibroin nanoparticles obtained using ionic liquids: An infrared spectroscopy study [J]. *Polymers*, 2020, 12(6): 1294.
- [7] YAO X, ZOU S Z, FAN S, NIU Q Q, ZHANG Y P. Bioinspired silk fibroin materials: From silk building blocks extraction and reconstruction to advanced biomedical applications [J]. *Materials Today Bio*, 2022, 16: 100381.
- [8] ZHANG H, LI L L, DAI F Y, ZHANG H H, NI B, ZHOU W, YANG X, WU Y Z. Preparation and characterization of silk fibroin as a biomaterial with potential for drug delivery [J]. *Journal of translational medicine*, 2012, 10(1): 117.
- [9] LU P W, WU Y T, CHANG L Y, LU T W, CHONLACHAT J, HUANG C S, CHUANG M F M, LIN C, CHEN I, BRANGULE A. The biocompatibility and hemostatic efficacy of silk fibroin nanofibrils fabricated by shear-induced phase separation process [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 474: 145731.
- [10] SS A L, VIPIN K V, SURENDRAN A, AUGUSTHY A R, HUSSAIN N V, PREMALETHA K. Unlocking nature's biomaterial: silk fibroin and the revolution in tissue repair [J]. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2024, 13(16): 267-287.
- [11] LUO Y, LI N, TU J, SHEN P, SHEN Y C, LU S J, ZHANG F. Anisotropic tussah silk nanofiber scaffolds for accelerating wound repair [J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2025, 8(11): 10101-10111.
- [12] GUMEDZE K M, KEBEDE T G, NINDI M M, DUBE S, KGOMO H. Innovations in wild silk processing and applications: A comparative review of african and other wild silks [J]. *Fibers and Polymers*, 2025, 26: 5249-5268.
- [13] 黄继伟. 蚕丝在甲酸溶剂体系中的溶胀收缩与溶解机制研究 [D]. 江苏苏州: 苏州大学, 2022.
HUANG J W. Study on swelling, shrinkage and dissolution mechanism of silk in formic acid solvent system [D]. Suzhou, Jiangsu: Soochow University, 2022.
- [14] ZHANG F, LU Q, MING J F, DOU H, LIU Z, ZUO B Q, QIN M D, LI F, KAPLAN D L, ZHANG X G. Silk dissolution and regeneration at the nanofibril scale [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(24): 3879-3885.
- [15] ZHANG T, XIONG Q W, SHAN Y X, ZHANG F, LU S J. Porous silk scaffold derived from formic acid: Characterization and biocompatibility [J]. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2021, 2021(1): 3245587.
- [16] ZHANG F, YOU X R, DOU H, LIU Z, ZUO B Q, ZHANG X G. Facile fabrication of robust silk nanofibril films via direct dissolution of silk in CaCl₂-formic acid solution [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(5): 3352-3361.
- [17] 梁苏平, 何秀萍, 牛翔宇, 宁晚娥, 王倩, 黄继伟. 甲酸对丝素蛋白结晶结构转变的影响 [J]. *丝绸*, 2024, 61(3): 44-54.
LIANG S P, HE X P, NIU X Y, NING W E, WANG Q, HUANG J W. Effect of formic acid on the crystalline structure transition of silk fibroin [J]. *Journal of Silk*, 2024, 61(3): 44-54.
- [18] GHANAATI S, ORTH C, UNGER R E, BARBECK M, WEBBER M J, MOTTA A, MIGLIARESI C, KIRKPATRICK C J. Fine-tuning scaffolds for tissue regeneration: Effects of formic acid processing on tissue reaction to silk fibroin [J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2010, 4(6): 464-472.
- [19] 翁敏仪, 王志伟, 宁晚娥, 王倩, 黄继伟. 湿气处理对丝素蛋白甲酸溶液盐析法制备支架材料的影响 [J]. *丝绸*, 2025, 62(4): 54-64.
WENG M Y, WANG Z W, NING W E, WANG Q, HUANG J W. Effect of moisture treatment on the preparation of scaffold materials by salting out method from silk fibroin formic acid solution [J]. *Journal of Silk*, 2025, 62(4): 54-64.
- [20] 翁敏仪, 王志伟, 宁晚娥, 王倩, 黄继伟. 不同工艺制取丝素蛋白水溶液对丝素蛋白/壳聚糖复合支架材料性能的影响 [J]. *丝绸*, 2025, 62(12): 50-59.
WENG M Y, WANG Z W, NING W E, WANG Q, HUANG J W. Effect of different silk fibroin aqueous solution preparation processes on the properties of silk fibroin/chitosan composite scaffold materials [J]. *Journal of Silk*, 2025, 62(12): 50-59.
- [21] 翁敏仪, 王志伟, 宁晚娥, 王倩, 黄继伟. 基于氯化钙-甲酸溶剂体系的 Silk I 结构丝素蛋白支架材料的制备与性能 [J]. *功能高*

分子学报, 2025, 38(2): 157-166.

WENG M Y, WANG Z W, NING W E, WANG Q, HUANG J W. Preparation and properties of silk I structured silk fibroin scaffold materials based on calcium chloride-formic acid solvent system [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2025, 38(2): 157-166.

- [22] XIAO L Y, LIU S S, YAO D Y, DING Z Z, FAN Z H, LU Q, KAPLAN D L. Fabrication of silk scaffolds with nanomicroscaled structures and tunable stiffness [J]. *Biomacromolecules*, 2017, 18(7): 2073-2079.
- [23] ZHANG Z S, DING Z Z, HUANG J W, QIN J Z, SHEN Y X, ZHANG F, ZUO B Q. Green process to prepare water-insoluble silk scaffolds with silk I structure [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 144-151.
- [24] STOPPATO M, STEVENS H Y, CARLETTI E, MIGLIARESI C, MOTTA A, GULDBERG R E. Effects of silk fibroin fiber incorporation on mechanical properties, endothelial cell colonization and vascularization of PDLA scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(19): 4573-4581.
- [25] NIU L, CHEN S, GUO X, DENG J, ZHENG P, WANG R. Mechanically robust polyvinyl alcohol/silk fibroin cryogels via freeze-thaw processing for cartilage defect repair [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 323: 147122.
- [26] XIAO M L, SUN L Y, FU H, YANG W H, YAO J R, SHAO Z Z, LING S J, ZHAO B J, CHEN X. Controllable fabrication of silk fibroin porous scaffolds and their regulation on cellular behaviours [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2025, 13(18): 5453-5465.
- [27] LI X F, LI N, FAN Q M, YAN K, ZHANG Q, WANG D, YOU R C. Silk fibroin scaffolds with stable silk I crystal and tunable properties [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 248: 125910.
- [28] JIN H J, PARK J H, KARAGEORGIU V, KIM U J, VALLUZZI R, CEBE P, KAPLAN D L. Water-stable silk films with reduced β -sheet content [J]. *Advanced Functional Materials*, 2005, 15(8): 1241-1247.
- [29] NAZAROV R, JIN H J, KAPLAN D L. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin [J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3): 718-726.
- [30] HU X, KAPLAN D, CEBE P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy [J]. *Macromolecules*, 2006, 39(18): 6161-6170.
- [31] 朱聪聪, 左保齐. 预拉伸对不同盐质量分数再生丝素膜的影响 [J]. *丝绸*, 2019, 56(1): 1-7.
ZHU C C, ZUO B Q. Effect of pre-stretching on regenerated silk fibroin films with different salt mass fractions [J]. *Journal of Silk*, 2019, 56(1): 1-7.
- [32] 王鹏, 左保齐. 不同盐/甲酸溶解体系下丝素膜的制备及性能表征 [J]. *丝绸*, 2016, 53(7): 18-22.
WANG P, ZUO B Q. Preparation and performance characterization of silk fibroin films in different salt/formic acid dissolution systems [J]. *Journal of Silk*, 2016, 53(7): 18-22.

(责任编辑: 王吉晶)