

弱碱性低共熔溶剂溶解角蛋白过程及氢键机制

刘屹首^{1,2}, 李瑞鹏^{1,2}, 秦大恩^{1,2}, 宋凯利^{1,2,3*}

(1. 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, 浙江 杭州 310018; 2. 浙江理工大学生态染整技术教育部工程研究中心, 浙江 杭州 310018; 3. 浙江理工大学桐乡研究院有限公司, 浙江 桐乡 314500)

摘要: 利用低共熔溶剂 (DES) 较强的氢键拆解能力定向解构角蛋白分子间的次级键, 结合还原剂和 DES 高效断裂二硫键的能力, 建立了一种弱损溶解并提取鸡毛中角蛋白的方法。以氯化胆碱为氢键受体 (HBA)、乙醇胺、乙二醇、乳酸等为氢键供体 (HBD), 设计合成了 3 类 (碱性、中性和酸性) 13 种功能性的 DES, 考察了还原剂用量 (以鸡毛质量为基准, 下同)、温度、DES 中水质量分数对角蛋白相对分子质量和提取率的影响, 通过密度泛函 (DFT) 理论计算和溶剂显色参数分析了 DES 内部的氢键网络结构, 研究了 DES 对鸡毛角蛋白的弱损溶解机制。结果表明, 以乙醇胺为 HBD, 不添加还原剂, 在 $n(\text{乙醇胺}) : n(\text{氯化胆碱}) = 2 : 1$ 、DES 中不含水、温度 65 °C、0.5 h 的最优条件下, 再生角蛋白提取率为 31.8%, 相对分子质量最高, 为 66000。以乙醇胺为 HBD 制备的 DES 具有还原性, 作为碱性 DES, 其内部的氢键数量多, 氢键作用小, 氢键能低, 可以打乱鸡毛内部的氢键网络, 而不会对鸡毛二级结构造成太大破坏。

关键词: 低共熔溶剂; 角蛋白; 溶解机制; 分子模拟; 氢键; 分离提纯技术

中图分类号: O636.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2024) 08-1780-08

Process and hydrogen bonding mechanism of keratin dissolution in weakly alkaline eutectic solvent

LIU Yishou^{1,2}, LI Ruipeng^{1,2}, QIN Daen^{1,2}, SONG Kaili^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Advanced Textile Materials & Manufacturing Technology, Ministry of Education, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China; 2. Engineering Research Center for Eco-Dyeing and Finishing of Textiles, Ministry of Education, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China; 3. Zhejiang Sci-Tech University Tongxiang Research Institute Co., Ltd., Tongxiang 314500, Zhejiang, China)

Abstract: A method for dissolving and extracting keratin with little damage from chicken feathers was established by using the strong hydrogen bond dissolving ability of low eutectic solvent (DES) and the efficient disulfide bond breaking ability of reducing agent and DES. 13 DES in three types (basic, neutral and acidic) were designed and synthesized using choline chloride as hydrogen bond acceptor (HBA), ethanolamine, ethylene glycol, lactic acid and so on as hydrogen bond donors (HBD), and the influence of reducing agent content (based on the mass of chicken feathers, the same below), temperature, water mass fraction in DES on the relative molecular mass and extraction rate of keratin were investigated. The hydrogen bond network structure in DES was analyzed by density functional theory (DFT) and solvent polarity parameters, and the dissolution mechanism of DES on chicken feather keratin with weak loss was studied. The results showed that under the optimal extraction process of using ethanolamine as HBD without reducing agent added, $n(\text{ethanolamine}) : n(\text{choline chloride}) = 2 : 1$, temperature 65 °C, no water in DES and extraction time of 0.5 h, regenerated keratin exhibited an extraction yield of 31.8% and the highest

收稿日期: 2023-07-23; 定用日期: 2023-10-24; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230600

基金项目: 国家自然科学基金项目 (52303067); 桐乡研究院开放基金项目 (TTY202210); 中国国家博士后面上基金项目 (2020M681918)

作者简介: 刘屹首 (1997—), 男, 硕士生, E-mail: liuyishou.12@qq.com。联系人: 宋凯利 (1988—), 女, 特聘副教授, E-mail: kailisong12@163.com。

relative molecular mass of up to 66000. The DES prepared with ethanolamine as HBD displayed reducibility, and as basic DES, it showed large internal hydrogen bond number, small hydrogen bond action and low hydrogen bond energy, which could disrupt the hydrogen bond network inside the chicken feathers without causing too much damage to the secondary structure of the chicken feathers.

Key words: deep eutectic solvents; keratin; dissolution mechanism; molecular simulation; hydrogen bonds; separation and purification technology

中国作为畜牧养殖和纺织大国, 每年都有大量的家禽羽毛、没有纺织价值的短羊毛以及牛羊皮等废弃物产生, 这些固体废弃物都是富含角蛋白的天然资源, 回收利用这类废弃资源有助于实现变废为宝, 符合“双碳”目标要求^[1]。然而, 角蛋白结构中含有较多二硫键, 交联程度高; 还存在大量氢键、范德华力、疏水、盐式键等次级键作用, 使角蛋白三维网络结构十分稳定, 只有断裂二硫共价键及减弱非共价相互作用才能实现角蛋白的溶解再生, 因此, 角蛋白的溶解再生十分困难。目前, 角蛋白的提取方式主要有以下几种: 还原法、碱提取法、酶法、离子液体法等^[2-3]。但是这些方法对角蛋白的主链降解严重, 提取出的角蛋白相对分子质量(简称分子量)低, 使其实际应用受到限制。因此, 研究角蛋白的弱损提取方法, 明晰角蛋白分子间作用力可控拆解的调控机制, 制备主链完整、分子量大的角蛋白, 对于拓展这类材料的实际应用具有重要意义。

低共熔溶剂(DES)是一种绿色溶剂, 因其物理化学性质与离子液体相似而被称为“类离子液体”。但与离子液体相比, DES 具有不挥发、可降解、低毒、价格低廉以及易制备等优点, 已被应用于物质的萃取分离^[4]、电化学^[5]、生物催化^[6]、生物质预处理^[7]等方面。DES 是由氢键受体(HBA)和氢键供体(HBD)在一定条件下通过氢键或共价键形成的离子或非离子混合物, 因此, 具有较强的氢键拆散能力^[8], 可以利用 DES 与蛋白质分子间的强氢键作用定向断裂交联网络中的次级键, 在不破坏主链酰胺键的同时有效拆解角蛋白的三维交联网络, 降低溶解过程对蛋白质主链的损伤降解, 从而提取出大分子量的角蛋白。但这需要 DES 内部的氢键强度适当, 以避免过强的氢键作用对蛋白质三维结构造成过度破坏, 例如: 使用草酸-氯化胆碱和醋酸钠-尿素作为溶剂会对蛋白质结构造成过度破坏, 致使分子量变小(<20000)^[9-10], 所以寻找合适内部氢键强度的 DES 种类成为了关键。

刘子同等^[11]使用巯基乙酸胆碱 DES 体系对角蛋白二硫键成功进行断裂, 但加剧了对角蛋白二级

结构的破坏, 导致再生鸡毛角蛋白分子量变小(<20000)。以上研究表明, DES 具有较强的氢键拆散能力, 可以通过分子设计将强亲核和强亲电基团引入溶剂体系, 利用溶剂与蛋白质分子强氢键作用定向断裂交联网络中的次级键, 在不破坏主链酰胺键的同时有效拆解蛋白的三维交联网络, 有望降低溶解过程对蛋白质主链的损伤降解。

本文拟设计合成酸性、中性和碱性 3 类 DES, 研究并对比 3 类 DES 对鸡毛中角蛋白的提取率及再生角蛋白的分子量大小, 探究溶解过程中对蛋白质损伤较低的 DES 种类, 分别从溶解温度、溶解所需还原剂与鸡毛的质量比、DES 中水的质量分数 3 个方面优化 DES 提取角蛋白的实验条件。对溶剂特性及内部氢键结构进行研究, 分析 DES 对鸡毛的弱损溶解机制, 探究不同种类 DES 对角蛋白溶解存在差别的原因, 以期建立弱损提取角蛋白的科学方法。

1 实验部分

1.1 原料和试剂

动物羽毛(鸡毛), 杭州永丰羽绒制品有限公司; 氯化胆碱、尿素、硫脲、乙酰胺、丙酰胺、乙醇胺、乙二醇、甘油、葡萄糖、1,5-戊二醇、乳酸、二水合草酸、苹果酸、柠檬酸、巯基乙酸、5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸)(DTNB), 分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 氢氧化钠, 分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司; 冰醋酸, 分析纯, 杭州高晶精细化工有限公司; 实验用水均为超纯水, 自制。

Lambda 35 型紫外-可见分光光度计, 美国 Perkinelmer 公司; VERTEX 70 型傅里叶变换红外光谱仪, 德国 Bruker 公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; ALPHA 型旋转黏度计, 纺吉莱博科技(北京)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DES 的合成

以氯化胆碱为 HBA, 与不同 HBD 在烧杯中按照一定物质的量之比混和均匀(表 1), 在 80 °C 水浴加热的条件下搅拌, 直至溶液澄清, 冷却至室温后得到 DES。

表 1 不同种类 DES 的合成
Table 1 Synthesis of different types of DES

编号	DES 种类分类	HBD	$n(\text{HBA}) : n(\text{HBD})$
1	碱性 DES	尿素	2 : 1
2		硫脲	2 : 1
3		乙酰胺	3 : 1
4		丙酰胺	2 : 1
5	中性 DES	乙醇胺	2 : 1
6		乙二醇	2 : 1
7		甘油	2 : 1
8		1,5-戊二醇	2 : 1
9	酸性 DES	葡萄糖	1 : 1
10		乳酸	2 : 1
11		柠檬酸	1 : 1
12		二水合草酸	1 : 1
13		苹果酸	1 : 1

注：均以氯化胆碱为 HBA。

1.2.2 再生角蛋白的提取

将鸡毛洗净后烘干（温度 60 °C、时间 48 h），使用粉碎机粉碎后备用，记为鸡毛粉末。取 40 mL 的 DES 置于烧杯中（不加水），然后将 1.20 g 鸡毛粉末与 0.18 g（占鸡毛粉末质量的 15%）还原剂（巯基乙酸）混匀后加入 DES 中，在 85 °C 油浴加热搅拌溶解 0.5~2.5 h，此时，鸡毛粉末大部分溶解，获得 DES 粗溶解液。将 DES 粗溶解液趁热使用棉布过滤后，向滤液中加入 100 mL 超纯水，并使用质量分数 2% 的冰醋酸溶液调节 pH=4.5，静置 30 min 后以 8500 r/min 的速度离心 15 min 得到角蛋白沉淀，冷冻干燥（-60 °C，72 h）后可得到再生角蛋白粉末。按公式（1）计算再生角蛋白提取率。

$$\text{再生角蛋白提取率}/\% = m_2/m_1 \times 100 \quad (1)$$

式中： m_1 为鸡毛粉末质量，1.20 g； m_2 为再生角蛋白粉末质量，g。

1.2.3 DES 提取鸡毛角蛋白单因素实验

通过不同 DES 体系提取再生角蛋白，以再生角蛋白的分子量较高且分子结构损坏较小为标准，筛选出较优的 DES 体系。然后在 1.2.2 节条件基础上，分别考察还原剂用量（分别为 0、5%、10%、15%、20%，占鸡毛粉末质量的百分数，下同）、溶解温度（65、75、85、95 °C）、DES 中水的质量分数（0、5%、10%、15%、20%）对再生角蛋白分子量和提取率的影响。

1.2.4 量子化学计算

利用基组 B3LYP/6-31g(d,p) 将单组分的 HBA 和 HBD 进行结构优化，然后按照对应比例放入结构优化后的 HBA 和 HBD，利用基组 B3LYP/6-31g(d,p) 对不同的 DES 再次进行结构优化得到最优几何构型。最后对最优几何构型的 DES 进行单点能计算，并进行 BSSE（基团重叠误差）校正。

利用 AIM（Atoms-in-molecules）理论考察 DES 中的氢键特征，对 DES 中的氢键进行分析，在 Multiwfn 软件^[12]中计算优化 DES 中的氢键临界点（BCP）、拓扑路径和氢键电子密度，并采用公式（2）计算氢键键能^[13]。

$$E(\text{HB}) = -223.08 \times \rho(\text{BCP}) + 0.74 \quad (2)$$

式中： $E(\text{HB})$ 为氢键键能，kcal/mol； $\rho(\text{BCP})$ 为氢键临界点处的电子密度，a.u.；1 kcal=4.184 kJ，下同。

1.3 测试与表征

1.3.1 黏度测试

在 DES 加热至不同温度（50~90 °C）后，将黏度计转子插入 DES 中测量其黏度。每组样品在不同温度下均进行 3 组平行实验，取算数平均值。

1.3.2 蛋白质分子量测试

利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺（SDS-PAGE）凝胶电泳法对提取的再生角蛋白的分子量进行定量测试。标准蛋白指示剂分子量为 14000~94000，在 140 mV 电压和 60 mA 电流下进行实验。

1.3.3 FTIR 表征

采用 KBr 压片法对再生角蛋白进行 FTIR 测试，测试前先采集大气背景，进行全谱图扫描，之后对压片样品进行测试，扫描范围为 4000~500 cm^{-1} ，分辨率为 4 cm^{-1} 。

1.3.4 溶剂显色参数测试

选取尼罗红（NR）、4-硝基苯胺（ NH_2 ）、4-硝基苯甲醚（OMe）^[14] 作为探针，使用紫外-可见分光光度计对分别含有上述 3 种染料的 DES 样品进行测试，扫描范围 250~650 nm，每个样品扫描 3 次，以减少实验误差，得到样品的最大吸收波长（ λ_{max} ）^[15-16]。通过公式（3）~（7）对 DES 溶剂的氢键酸性（代表供氢能力， α ）、氢键碱性（代表受氢能力， β ）以及溶剂极性（ π^* ）进行计算^[17]。

$$E_{\text{T}}(\text{NR}) = 28591.44/\lambda_{\text{max}} \quad (3)$$

$$\nu = 1/(\lambda_{\text{max}} \times 10^{-4}) \quad (4)$$

$$\alpha = (19.9657 - 1.024 \pi^* - \nu_{\text{NR}})/1.6078 \quad (5)$$

$$\beta = (1.035 \nu_{\text{OMe}} + 2.64 - \nu_{\text{NH}_2})/2.80 \quad (6)$$

$$\pi^* = (34.12 - \nu_{\text{NH}_2})/2.343 \quad (7)$$

式中： $E_{\text{T}}(\text{NR})$ 为在尼罗红中的电子跃迁参数，kcal/mol； ν 为 DES 中加入 NH_2 、NR 和 OMe 探针后的波数， cm^{-1} 。

1.3.5 巯基含量测试

运用埃尔曼法^[18]分析角蛋白中巯基及二硫键含量的变化，DTNB 与游离巯基反应生成的黄色物质在 412 nm 处具有强吸收峰。具体步骤为：将 0.03 g 角蛋白溶解于 3.8 mL DTNB 溶液（溶剂为乙醇）中，通过紫外-可见分光光度计测定溶液的吸光度，再通

过标准曲线方程得到角蛋白溶液中巯基的浓度, 进而计算得到巯基含量 (mmol/g 角蛋白)。使用半胱氨酸制作巯基浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L 的溶液, 通过紫外-可见分光光度计测定溶液在 412 nm 处的吸光度制作标准曲线, 拟合曲线得到方程: $y=0.0692x-0.0074$ ($R^2=0.998$)。

2 结果与讨论

2.1 DES 的合成及性状分析

图 1 为设计并合成的 3 类共计 13 种 DES 采用的氢键供受体结构图。图 2 为 13 种 DES 在 50~90 °C 的黏度曲线 (图例为表 1 对应编号的 DES)。

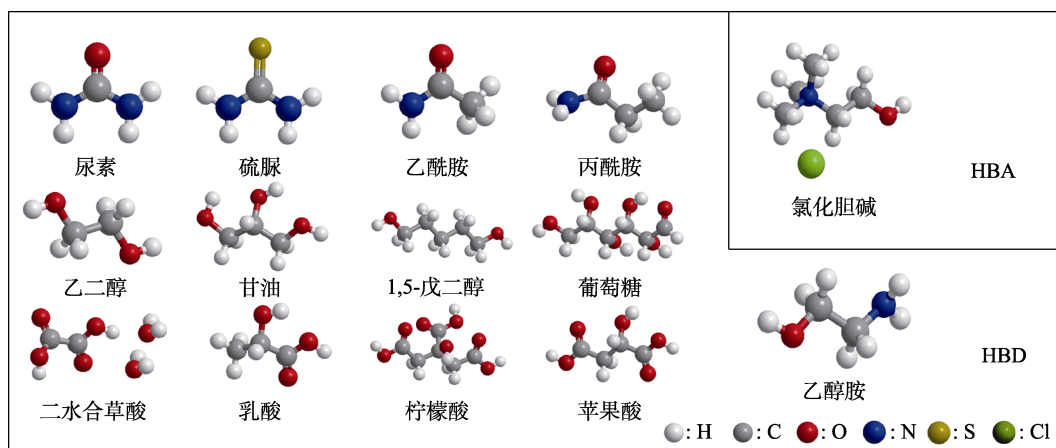


图 1 DES 氢键受体及氢键供体结构图

Fig. 1 Structure of hydrogen bond acceptor and hydrogen bond donor of DES

从图 2 可以看出, 所有 DES 的黏度均随着温度的升高而降低, 并且在 80~90 °C 时, 除编号 9、11、13 DES 的黏度在 50 mPa·s 以上 (图 2b), 其余 DES 的黏度均在 50 mPa·s 以下 (图 2a)。

2.2 不同种类 DES 对角蛋白提取率和分子量的影响

图 3a 为黏度较低的 10 种 DES 按照 1.2.2 节步骤提取所得再生角蛋白, 经过 SDS-PAGE 分子量测试后结果。

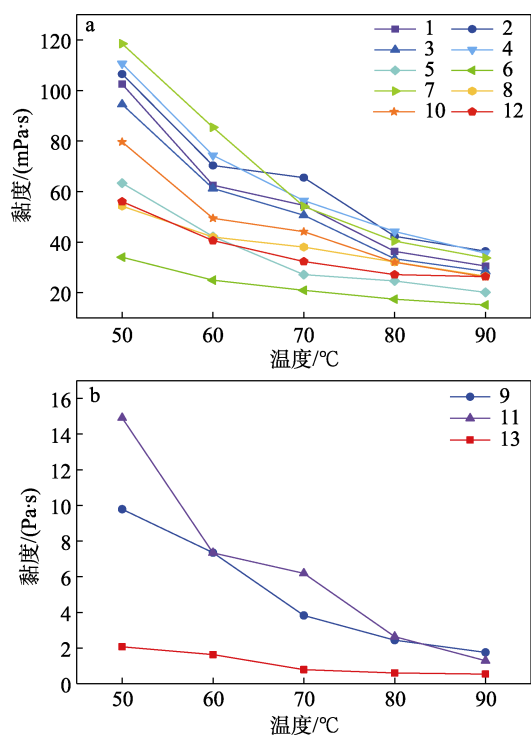


图 2 不同种类 DES 黏度对比

Fig. 2 Comparison of viscosity of different types of DES

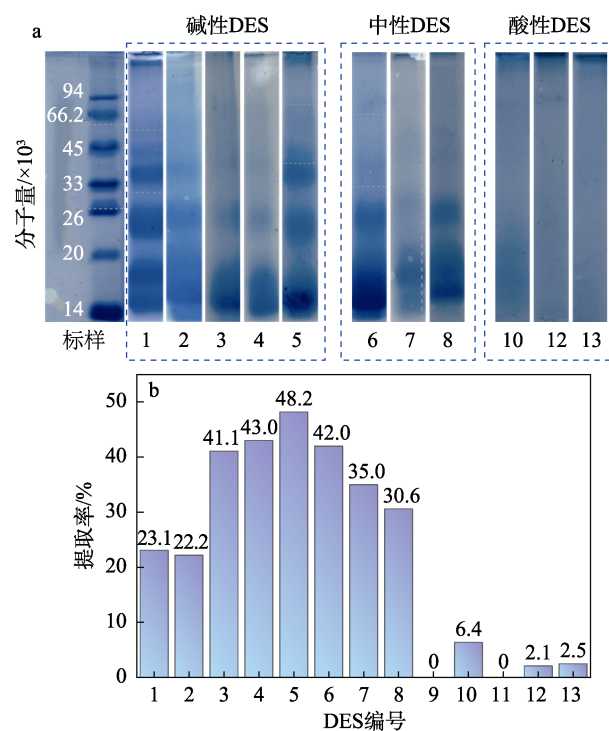


图 3 不同种类 DES 提取角蛋白的分子量及提取率

Fig. 3 Molecular mass (a) and extraction rate (b) of keratin extracted from different types of DES

从图 3a 可以看出, 碱性和中性 DES 所提取出的再生角蛋白分子量明显大于酸性 DES 所提取的。在碱性 DES 中编号为 1 和 5 的 DES 与中性 DES 中编号为 6 的 DES 提取的再生角蛋白分子量 (33000~45000) 明显较大; 而酸性 DES 提取角蛋白分子量较小, 几乎都在 14000 以下。

图 3b 为 13 种 DES 对再生角蛋白提取率结果。从图 3b 可以看出, 编号为 9~13 的 DES 再生角蛋白提取率明显偏低。原因在于, 编号为 9、11 和 13 的 DES 黏度太大 (图 2b), 导致提取率极低; 而编号为 10 和 12 的 DES 均为酸性 DES, 羽毛耐酸不耐碱, 角蛋白不溶于酸性环境中, 导致提取率较低。与之形成鲜明对比的是, 碱性 (编号 1~5) 和中性 (编号 6~8) 的 DES 的再生角蛋白提取率较大。综合图 3 可以得出, 酸性 DES 以及黏度较大的 DES 并不适合于溶解鸡毛粉末提取再生角蛋白。

2.3 DES 对鸡毛角蛋白提取工艺条件优化

2.3.1 还原剂用量的影响

在 1.2.2 节条件下, 不加水, 考察还原剂用量对提取的角蛋白分子量及提取率的影响, 结果见图 4。其中, 采用编号为 1、5、6 的 DES。

从图 4 可以看出, 随着还原剂用量的增加, 提取率呈先升后降的趋势。编号 5 的 DES 在不添加还原剂时也有一定的提取率, 可能是 DES 在高温下可断裂二硫键, 导致角蛋白溶解。当加入还原剂过量时, 二硫键也会被大量断开, 使角蛋白分子量减小, 从而形成很多小分子的游离角蛋白, 不能从 DES 中沉淀析出, 所以提取率会在还原剂加入过多时减小。以角蛋白分子量为主要判断依据, 提取率为次要判断因素, 综合考虑提取率与分子量, 编号 1、5 和 6 的 DES 最优还原剂用量分别为 15%、0 和 10%。

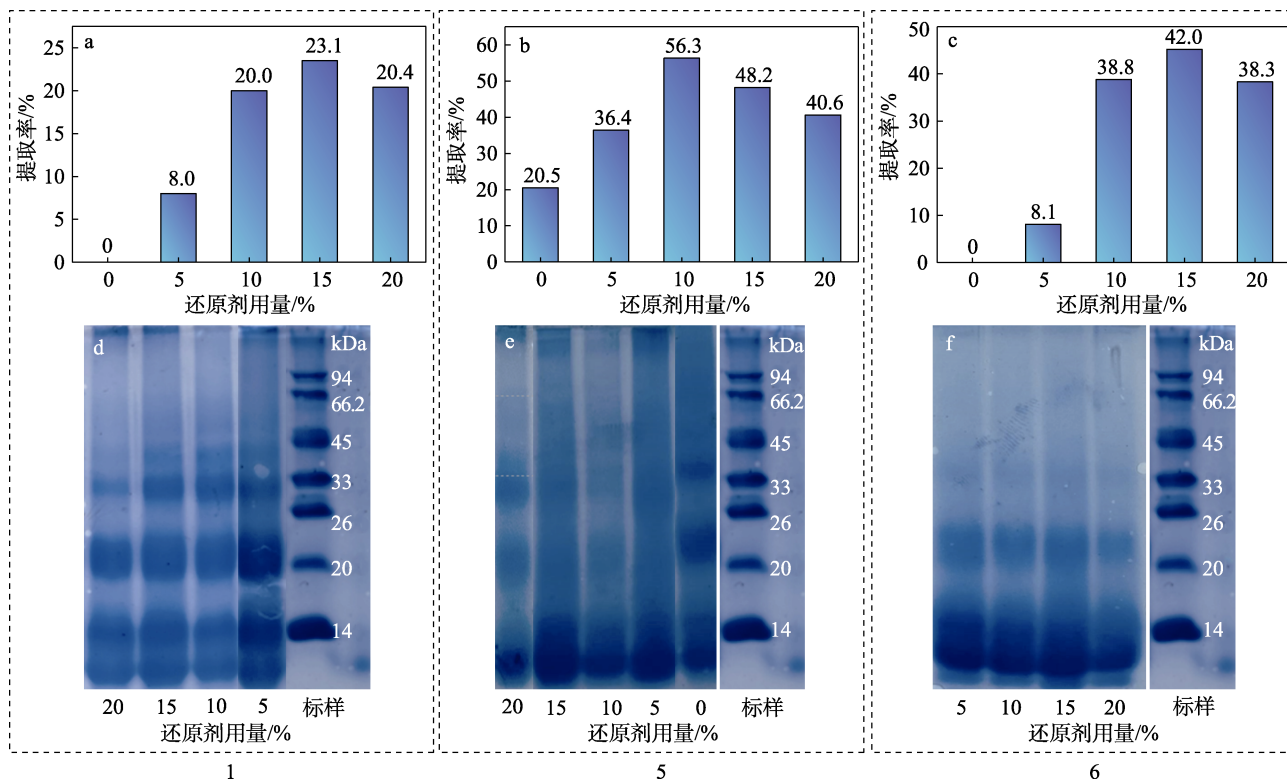


图 4 还原剂用量对 3 种 DES 角蛋白提取率 (a~c) 和分子量 (d~f) 的影响

Fig. 4 Effects of reducing agent dosage on the extraction rate (a~c) and relative molecular mass (d~f) of keratin

从图 4 还可以看出, 编号 1 和 5 的 DES 提取出的再生角蛋白分子量明显大于编号 6 的 DES, 它们的再生角蛋白在分子量 33000 处颜色较深, 在分子量 33000~45000、分子量 45000~66000 之间也具有稍浅的颜色, 而编号 6 的 DES 提取的再生角蛋白在分子量 20000~26000 之间的颜色很深, 分子量 33000 处仅具有模糊的痕迹。这可能与 DES 的氢键能有关, 详见后续讨论部分。但编号 6 的中性 DES 的提取率在还原剂用量 (10%~20%) 时具有较大的提取率,

依然具有较大的应用价值。

2.3.2 温度的影响

在确定最优还原剂用量 (编号 1、5 的 DES 最优还原剂用量分别为 15%、0) 的基础上, 研究温度 (65、75、85 和 95 °C) 对角蛋白溶解的影响, 结果如图 5 所示。

从图 5 可以看出, 随着温度的升高, 再生角蛋白的提取率先增加后降低, 分子量不断降低。这是因为, 鸡毛内部角蛋白分子之间存在大量的氢键作

用, 而温度增加会使角蛋白分子间的氢键作用减弱, 使鸡毛溶解。但过高的温度也会严重破坏角蛋白的二级结构, 从而形成大量的小分子角蛋白, 导致分子量的降低, 提取率下降。从图 5a 可以看出, 编号 1 的 DES 在 75、85 °C, 编号 5 的 DES 在 65 °C 提取的角蛋白分子量较大, 但编号 1 的 DES 在 75 °C 提取率 (3.5%) 太低。综合提取率和角蛋白分子量, 编号 1 的 DES 最佳提取温度为 85 °C, 编号 5 的 DES 最佳提取温度为 65 °C。

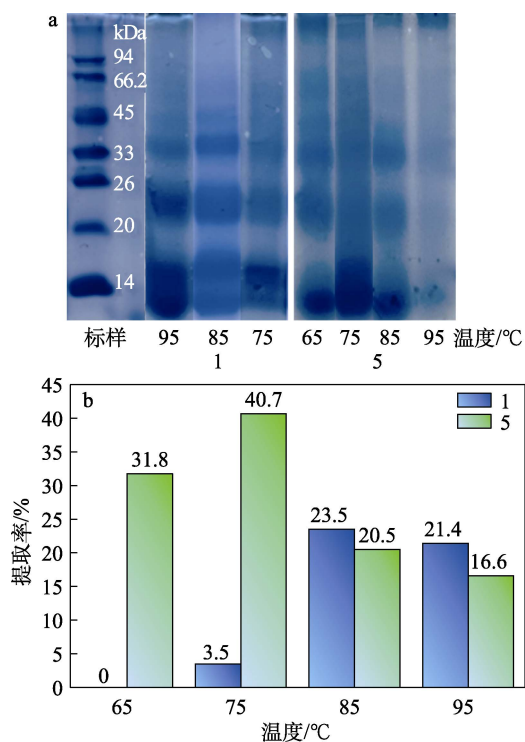


图 5 温度对角蛋白的分子量 (a) 及提取率 (b) 的影响
Fig. 5 Effect of temperature on molecular mass (a) and extraction rate (b) of keratin

2.3.3 DES 中水质量分数的影响

水的加入可能会影响 DES 体系氢键网络, 造成氢键网络重构, 因此, 研究了在 DES 体系加水, 考察 DES 中水质量分数对角蛋白提取的影响。图 6 为编号为 1 和 5 的 DES 中水质量分数对提取的角蛋白分子量及提取率的影响。将编号 1 水质量分数分别为 0、5%、10%、15%、20% 的 DES 提取的角蛋白编号为 1-0、1-5、1-10、1-15、1-20; 将编号 5 的 DES 提取的角蛋白分别编号为 5-0、5-5、5-10、5-15、5-20。

从图 6 可以看出, 编号 1 的 DES, 在水质量分数为 0、5% 和 15% 的条件下, 提取的角蛋白的分子量相差不大, 但是在水质量分数 15% 时, 提取率更高 (18.9%); 编号 5 的 DES, 在水质量分数为 0 时, 提取的角蛋白的分子量 (约为 66000) 最大, 提取

率也达到了 31.8%, 远高于编号 1 的 DES 的提取率 (22.3%)。

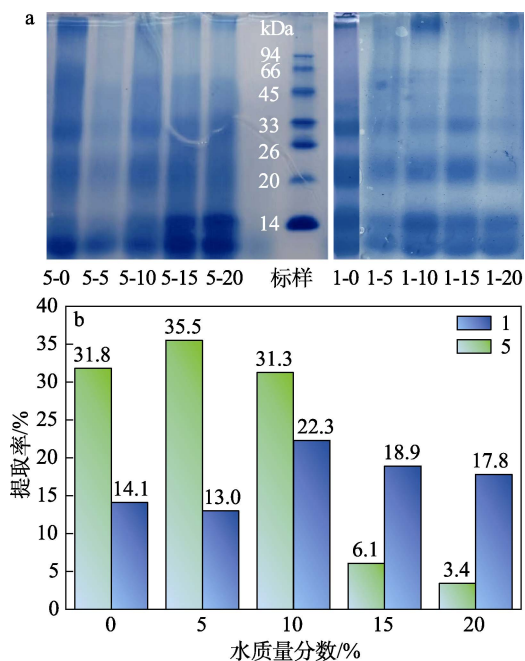


图 6 DES 中水质量分数对角蛋白的分子量 (a) 及提取率 (b) 的影响
Fig. 6 Effect of water mass fraction in DES on molecular mass (a) and extraction rate (b) of keratin

经过对不同种类 DES 的筛选以及对溶解条件中还原剂用量、温度、水质量分数的优化, 得到了弱损溶解鸡毛粉末提高再生角蛋白分子量和提取率的最佳工艺: 以 $n(\text{乙醇胺}):n(\text{氯化胆碱})=2:1$ 制备 DES, 65 °C 溶解提取, 不添加还原剂, DES 中不含水, 经提取后的再生角蛋白, 分子量约为 66000, 提取率为 31.8%。

2.4 再生角蛋白的化学结构分析

图 7 为编号 1 和 5 的 DES, 以及传统还原方法^[19]提取的鸡毛角蛋白 (图中编号分别为 1、5 和 K) 的分子量和 FTIR 谱图。

从图 7a 可以看出, K 的分子量在 26000~33000, 5 的分子量最大在 66000, 相比 K 明显提高。

从图 7b 可以看出, 3300 cm^{-1} 处为 C—H 和 N—H 键的伸缩振动峰; 1250 cm^{-1} 处吸收峰主要与 C—N 键的伸缩振动和 N—H 键的平面弯曲振动有关; 1450 cm^{-1} 附近出现吸收峰是由 N—H 平面弯曲振动和 C—N 键的伸缩振动引起, 归属于酰胺 II 带; 1600~1700 cm^{-1} 之间的吸收峰主要与 C=O 键的伸缩振动相关, 归属于酰胺 I 带^[20]。通过比较两种不同 (1 和 5, K) 溶解方法得到再生角蛋白可以发现, 再生角蛋白的主体结构没有差别。由于氢键的形成可以使伸缩振动频率降低, 吸收峰向低

波数方向移动,通过观察 $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 之间的吸收峰发现,与 K 相比,1 和 5 的吸收峰向低波数方向移动,说明 DES 溶解法提取的角蛋白内部氢键数目更多^[21-22]。

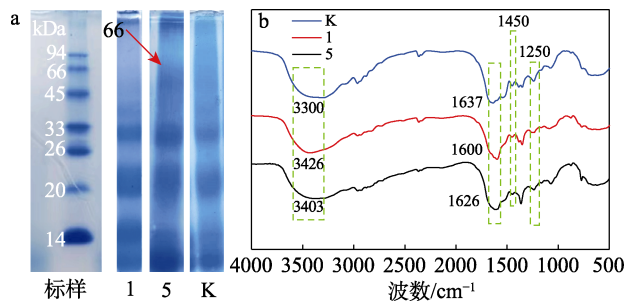


图 7 再生角蛋白的分子量 (a) 和 FTIR 谱图 (b)

Fig. 7 Molecular mass (a) and FTIR spectra (b) of regenerated keratin

2.5 角蛋白弱损溶解机制分析

2.5.1 不同种类 DES 内部氢键分析

图 8 为以胱氨酸为模型化合物代替鸡毛进行 Gaussian16 的模拟计算 (图中数据均为氢键键能, 单位 kcal/mol)。

从图 8 可以看出,胱氨酸内部的氢键包含分子间的氢键 ($E_1=5.76\text{ kcal/mol}$, $E_2=3.27\text{ kcal/mol}$) 和分子内氢键 ($E_3=0.13\text{ kcal/mol}$)。酸性 DES 内部的氢键数量较少,但是氢键键能较大,其中,乳酸的氢键键能最大,为 9.85 kcal/mol ,远远大于胱氨酸分子间的氢键键能 E_1 和 E_2 ;中性 DES 的内部氢键数量最多,且以乙二醇、甘油、1,5-戊二醇分别制备的 3 种 DES 的最大氢键键能分别为 6.21 、 6.37 、 6.07 kcal/mol ,都超过了胱氨酸分子间的最大氢键键能 E_1 ;碱性 DES 中的氢键数量和中性 DES 相差不大,但碱性 DES 内的氢键键能大多在 E_1 和 E_2 之间。

结合 2.2 和 2.3 节分析可知,酸性 DES 内的氢键数量少,氢键键能大,对鸡毛内部氢键网络结构的破坏性强,但破坏效率低,所以提取的再生角蛋白分子量小,提取率低;中性 DES 内部具有较多的氢键数量和较强的氢键键能,能提升 DES 对再生角蛋白的提取率,但对鸡毛内部的氢键网络破坏较大,而导致分子量较低;碱性 DES 内部具有较多的氢键数量和适中的氢键键能,所以碱性 DES 具有角蛋白提取率高、分子量大的优势。

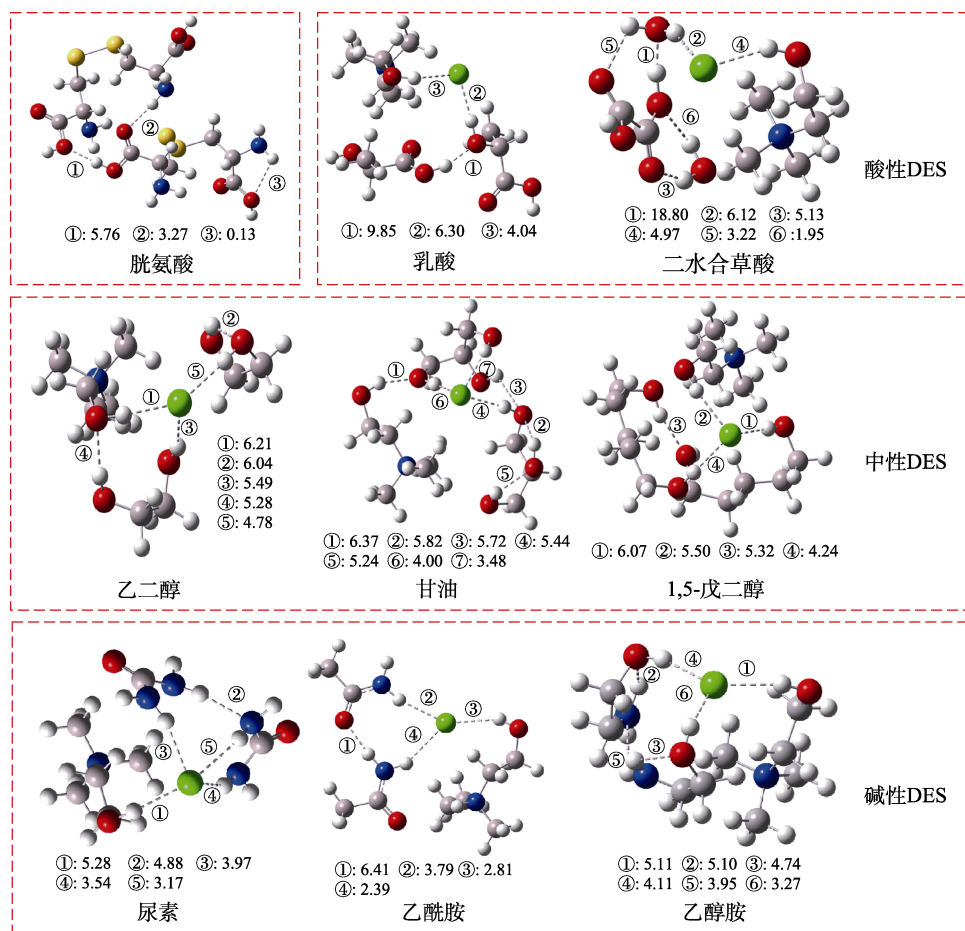


图 8 胱氨酸及不同种类 DES 内部氢键分析

Fig. 8 Analysis of hydrogen bonds in cystine and different types of DES

2.5.2 含水 DES 内部氢键分析

图 9 为不含水和含水的编号 1 的 DES 进行 Gaussian16 的模拟计算结果(图中数据均为氢键键能, 单位 kcal/mol)。

从图 9 可以看出, 向 DES 中加入水后, DES 中的氢键数量和最大氢键键能都发生了变化。向编号 1 的 DES 模型中加入 2 个水分子后, 其模型中增加了 3 个氢键, 最大氢键能从 5.28 kcal/mol 增加到 6.61 kcal/mol。所以, 向 DES 中加水会改变氢键结构, 从而对再生角蛋白分子量和提取率造成影响。

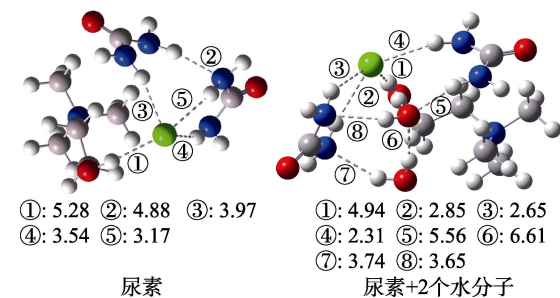


图 9 水对 DES 内部氢键的影响

Fig. 9 Influence of water on internal hydrogen bond in DES

2.5.3 巯基含量分析

表 2 为编号 5 的 DES 在 65 °C、不添加还原剂、不加水条件下提取的再生角蛋白和鸡毛粉末的巯基含量结果。从表 2 可以看出, 编号 5 的 DES 提取的再生角蛋白中的巯基含量高于鸡毛粉末中的巯基含量, 可认为鸡毛粉末在溶解过程中, 有部分二硫键被还原为巯基, 由此可得, 编号 5 的 DES 表现出一定的还原性能。

表 2 角蛋白巯基含量
Table 2 Keratin sulphydryl content

材料	吸光度/a.u.	巯基含量/(mmol/g)
鸡毛粉末	0.633	0.0462
DES 提取的再生角蛋白 ^①	0.791	0.0600

①代表编号 5 的 DES 提取的再生角蛋白。

2.5.4 溶剂显色参数分析 DES 性质

氢键酸性(α)描述了溶剂提供质子的能力, 氢键碱性(β)描述溶剂接受质子或提供电子密度以形成氢键的能力。 α 和 β 越大, 氢键酸性与碱性越强, HBD 与 HBA 之间发生氢键相互作用, 从而形成分子间氢键的能力越强, 所以两参数共同影响着生成氢键能力的强弱。 π^* 是测量非特异性相互作用的指标, 例如: 偶极诱导的偶极相互作用以及染料和 DES 之间发生的极化率。 $E_T(\text{NR})$ 可以用来估计溶剂的极性。表 3 为 9 种 DES 的溶剂显色参数测试结果。

从表 3 的数据综合 α 与 β 考虑, 酸性 DES 生成氢键的能力更强, 中性 DES 次之, 碱性 DES 生成

氢键的能力最弱。从表 3 还可知, 不同 DES 的非特异性相互作用相差不大, 但是中性和碱性 DES 的极性明显大于酸性 DES。因为具有较弱的氢键作用(α 与 β 较小)和较强的极性 [$E_T(\text{NR})$ 较大], 所以, 碱性 DES 更适合提取再生角蛋白。

表 3 不同种类 DES 的溶剂显色参数
Table 3 Solvent color parameters of different types of DES

DES 种类	DES 编号	溶剂显色参数			
		α	β	π^*	$E_T(\text{NR})/(\text{kcal/mol})$
酸性 DES	10	1.30	3.28	1.10	47.89
	13	1.34	3.32	1.06	47.81
	12	1.32	3.28	1.10	47.81
中性 DES	7	1.06	3.39	0.97	49.38
	8	0.68	3.32	1.06	50.87
	6	0.83	3.38	1.10	50.07
碱性 DES	2	0.80	3.36	1.14	50.07
	3	0.61	3.42	1.10	51.06
	5	0.58	3.43	0.93	51.70

3 结论

通过研究酸性、中性和碱性 DES 对鸡毛中角蛋白溶解再生的影响, 发现碱性 DES 更适合用于溶解鸡毛, 提取再生角蛋白。

(1) 以 $n(\text{乙醇胺}):n(\text{氯化胆碱})=2:1$ 制成的 DES 提取再生角蛋白的效果最好, 在不需要添加还原剂和水的条件下, 65 °C 的溶解温度和 0.5 h 的提取时间, 提取的再生角蛋白分子量最大可达 66000, 提取率为 31.8%。

(2) 通过 Gaussian16 对鸡毛和 DES 进行模拟计算, 对不同种类 DES 的溶剂显色参数进行了测试, 分析了 DES 对鸡毛溶解机制, 酸性和中性 DES 内部较强的氢键键能远远大于鸡毛内部的氢键键能, 会使鸡毛溶解的同时对其二级结构造成巨大破坏, 导致提取的再生角蛋白分子量较小, 提取率偏低。

(3) 碱性 DES 内部的氢键数量多, 氢键作用小, 氢键键能低, 可以打乱鸡毛内部的氢键网络, 而不会对其二级结构造成太大破坏, 所以提取再生角蛋白的分子量较大, 提取率较高。

参考文献:

[1] REDDY C C, KHILJI I A, GUPTA A, *et al.* Valorization of keratin waste biomass and its potential applications[J]. Journal of Water Process Engineering, 2021, 40: 101707.

[2] LI S T (黎淑婷), ZHANG Y (张毅), ZHANG H (张昊), *et al.* Extraction of keratin from rabbit hair using L-cystein as reductive agent[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2017, 34(8): 954-960.

[3] WANG Y X, CAO X J. Extracting keratin from chicken feathers by using a hydrophobic ionic liquid[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(5): 896-899.

(下转第 1839 页)