

DOI: 10. 13475/j. fzx. 20180101606

# 丝素蛋白的磷酸化及其仿生矿化膜的制备

周 倩, 袁久刚, 李 澜, 王 平, 王 强

(生态纺织教育部重点实验室(江南大学), 江苏 无锡 214122)

**摘 要** 为制备功能性丝素基仿生矿化材料, 将丝素蛋白通过三聚磷酸钠(STP)磷酸化, 从而在仿生矿化过程中促进钙离子吸附, 利于更多的钙磷酸盐的形成和沉积。探究了体系中 pH 值和三聚磷酸钠用量对丝素磷酸化的影响, 分析了磷酸化对丝素蛋白二级结构、热性能、粒径及膜力学性能的影响; 以磷酸化丝素为原料制备冻干丝素膜, 采用交替矿化法, 在其表面沉积形成羟基磷灰石(HA); 借助扫描电子显微镜和能量色散 X 射线光谱仪, 评价了矿化膜表面结构形态和钙、磷元素含量变化。结果表明: 在 pH 值为 10 和 STP 质量为 0.24 g 条件下, 磷转移量达到 67.1%, 且磷酸化丝素膜对阳离子有较好的吸附效果, 力学性能较空白样略有下降; 经交替仿生矿化处理后, 磷酸化丝素膜表面沉积的羟基磷灰石较空白样结构更规整。

**关键词** 丝素蛋白; 矿化膜; 磷酸化; 羟基磷灰石; 仿生矿化

中图分类号: TS 195.5 文献标志码: A

## Phosphorylation of silk fibroin and preparation of bionic mineralization membrane thereof

ZHOU Qian, YUAN Jiugang, LI Lan, WANG Ping, WANG Qiang

(Key Laboratory of Eco-Textiles (Jiangnan University), Ministry of Education, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract** In order to prepare the silk fibroin-based bionic mineralization materials, silk fibroin (SF) was phosphorylated by sodium tripolyphosphate (STP), which can promote the adsorption of calcium ions, and facilitates the formation and deposition of calcium phosphate. The effects of two factors on the phosphorylated silk fibroin were explored by controlling pH and the amount of sodium tripolyphosphate. The secondary structure, thermal stability, particle size, mechanical properties were analyzed. Phosphorylated silk fibroin was freeze-dried to form a membrane, hydroxyapatite (HA) was formed on the surface by alternating mineralization method, and the surface morphology and content of calcium and phosphorus were evaluated by scanning electron microscopy and energy dispersive spectro-metry. The results show that the phosphorylated conditions is pH 10 and the 0.24 g of STP, phosphorus transfer rate reaches 67.1%, and the adsorption capacity of cationic dyes on the phosphorylated silk fibroin is better, and mechanical properties is slightly lower than the blank. Hydroxyapatite deposited on the surface of the phosphorylated silk fibroin membrane is more regular than the blank sample after alternating bionic mineralization.

**Keywords** silk fibroin; mineralization membrane; phosphorylation; hydroxyapatite; biomimetic mineralization

丝素蛋白不仅可用作纤维原料, 因其良好的生物相容性, 在生物材料制备中也有潜在用途<sup>[1]</sup>。为拓宽丝素在生物材料及医学领域中的应用, 不少研究者采用化学或生物的方法进行丝素改性加工, 如

采用辣根过氧化物酶(HRP 酶)催化丝素接枝丙烯酸, 加速矿化中丝素表面钙盐沉积, 制备仿生矿化材料<sup>[2]</sup>; 采用磷酸进行丝素磷酸化, 赋予丝素膜抗凝血性, 用于制作止血材料等<sup>[3]</sup>。

收稿日期: 2018-01-04 修回日期: 2018-05-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31771039); 江苏省高校青蓝工程资助项目(苏教师[2016]15号); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(JUSRP51717A)

第一作者简介: 周倩(1993—), 女, 硕士生。主要研究方向为纺织品生态加工技术。

通信作者: 王平, E-mail: wxwping@163.com。

羟基磷灰石在自然界中主要由钙磷灰石( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ )自然矿物化形成,羟基磷灰石具有优良的生物相容性和生物活性,可作为骨骼或牙齿的诱导因子被用于骨修复手术中。在生物材料表面生成羟基磷灰石的方法有很多种,按照矿化液的不同大致可分为 3 类:模拟体液法、交替矿化法和过饱和钙化溶液法<sup>[4]</sup>。

本文采用三聚磷酸钠作为磷酸化试剂对丝素蛋白进行磷酸化,其机制是:丝素蛋白中丝氨酸(Ser)、酪氨酸(Tyr)的羟基和赖氨酸(Lys)的氨基与无机磷发生酯化反应,形成 C—O—P 和 C—N—P 的结构<sup>[5]</sup>。在磷酸化的丝素膜材料基础上进行仿生矿化,诱导羟基磷灰石的形成,实现丝素基仿生矿化材料的制备。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

桑蚕丝练白绸(35.5 g/m<sup>2</sup>,江苏鑫缘茧丝绸有限公司);三聚磷酸钠(STP)、一水溴化锂、无水氯化钙、无水乙醇、十二水磷酸氢二钠、对二苯酚、钼酸铵、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸等试剂(分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 丝素溶液的制备

将桑蚕丝练白绸溶解在溴化锂/无水乙醇/水(物质的量比为 1:1:2)体系中,在 75 °C 条件下搅拌 2 h 得到丝素(SF)溶液,用去离子水对丝素溶液进行透析,直至透析液电导率值小于 4  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ,再将丝素溶液离心去除不溶物,以称量法标定上清液浓度,将丝素溶液在 4 °C 条件下保存。

#### 1.2.2 丝素的磷酸化

分别取 40 g/L 的丝素蛋白溶液各 30 mL,用 1 mol/L NaOH 溶液调节溶液 pH 值分别为 8、9、10。在 35 °C 作用下,缓慢加入 0.24 g 三聚磷酸钠反应 30 min,反应过程中用 NaOH 溶液调节 pH 值使其保持在加入 STP 前的固定值。反应结束后冷却,调节溶液 pH 值至中性。为探究 STP 的用量对丝素磷酸化的影响,同样条件下控制 pH 值为 10,温度为 35 °C,分别加入质量分别为 0.06、0.24 g 的 STP(不同质量的 STP 与 SF 反应后的溶液分别标记为 SF-1, SF-2),反应 30 min。

#### 1.2.3 丝素膜的制备

风干膜制备:将 STP 磷酸化后的丝素溶液中加入 0.125 g 甘油,混合均匀后将其转移至聚四氟乙烯模具中,在恒温恒湿箱中以流延法制备风干膜。

冻干膜制备:将 STP 质量分别为 0.06、0.24 g 的磷酸化后的丝素溶液进行透析。透析完毕后将溶液在 -50 °C 冷冻干燥成膜,将冻干膜在 50% 乙醇醇化处理 4 h 后再次冻干(不同质量的 STP 与 SF 反应后的膜分别标记为 SF-1 膜, SF-2 膜)。

#### 1.2.4 丝素/羟基磷灰石复合材料的制备

丝素/羟基磷灰石复合材料采用交替矿化法制备<sup>[6]</sup>。分别取未处理丝素冻干膜和磷酸化丝素冻干膜,用  $\text{CaCl}_2/\text{Tris-HCl}$  溶液( $\text{CaCl}_2$  浓度为 500 mmol/L; Tris-HCl 浓度为 50 mmol/L, pH 值为 7.45)进行钙化,先在 37 °C 下处理 30 min,以去离子水水洗后,再将样品浸渍在  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Tris-HCl}$  ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  浓度为 300 mmol/L; Tris-HCl 浓度为 50 mmol/L, pH 值为 8.50)溶液中,在 37 °C 下处理 30 min,然后用去离子水水洗。上述过程被定为 1 个 Ca-P 矿化周期,重复 7 个周期直至结束。作为对比,磷酸化丝素膜只用  $\text{CaCl}_2$  处理,不加  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 。不同矿化的处理条件如表 1 所示。

表 1 不同矿化处理条件

Tab. 1 Different mineralization conditions of silk membranes

样品编号	STP 质量/g	$\text{CaCl}_2$ 浓度/( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 浓度/( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
SF1-1	0	500	0
SF1-2	0	500	300
SF2-1	0.06	500	0
SF2-2	0.06	500	300
SF3-1	0.24	500	0
SF3-2	0.24	500	300

### 1.3 分析测试方法

#### 1.3.1 磷含量的测定

依据 GB 12393—1990《食物中磷的测定方法》,采用磷钼蓝比色法<sup>[7]</sup>测定磷含量,原理为:无机磷元素在酸性溶液中会与钼酸铵结合生成磷钼酸铵,经对苯二酚、亚硫酸钠还原磷钼酸铵后会形成蓝色化合物钼蓝,其最大吸收波长是 660 nm。

磷标准曲线的绘制:分别吸取 1~5 标准液(磷标准液用磷酸氢二钾配制,质量浓度为 1 mg/mL)至 50 mL 刻度试管中,然后依次加入 2 mL 质量分数为 5% 的钼酸铵溶液、1 mL 质量分数为 20% 的亚硫酸钠溶液、1 mL 质量分数为 0.5% 的对苯二酚溶液,加水定容到 20 mL,摇晃试管使溶液混合均匀,再静置 30 min。测定溶液 660 nm 处的吸光度,以标准液质量浓度  $C$  (mg/mL) 为横坐标,吸光度  $A$  为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程  $y = 0.0536x + 0.0895$ ,  $R^2 = 0.99623$ 。

取反应后溶液 5 mL,加入 15 mL 三氯乙酸溶

液(2 mol/L) 沉淀丝素蛋白,静置一段时间后离心,取上层清液 2 mL 及同样的空白溶液,分别置于 20 mL 具塞试管中,其余操作同标准曲线,磷转移量以磷酸化后体系中磷质量浓度的降低率表示。

### 1.3.2 圆二色谱和粒径测试

通过圆二色谱仪检测丝素溶液二级结构的变化,取丝素样品加入到 1 mm 比色皿中,检测波长范围为 195 ~ 250 nm,扫描速度为 100 nm/min。使用粒径及 Zeta 电位分析仪测定 25 °C 条件下丝素溶液的粒径大小和粒径分布。

### 1.3.3 化学结构分析

采用 Nicolet iS 10 傅里叶红外光谱仪(FT-IR)的全反射(ATR)模式,在扫描范围为 4 000 ~ 650 cm<sup>-1</sup>内对不同的冷冻干燥膜样品进行红外光谱分析。扫描次数为 32,分辨率为 4 cm<sup>-1</sup>。

### 1.3.4 丝素膜对阳离子的吸附效果

以阳离子染料进行丝素膜沾色实验,沾色工艺条件:温度为 85 °C,处理时间为 30 min,浴比为 1:100,其中染料质量浓度为 0.2 g/L。吸附能力以沾色率表示,即膜材料沾色前后染液吸光度的变化率。

### 1.3.5 断裂强度测试

采用 YG141 型织物厚度仪测定丝素风干膜厚度,采用万能材料试验机测定膜的力学性能,拉伸速度为 40 mm/min,夹距为 40 mm。测试前将样品裁剪成尺寸为 80 mm × 5 mm 的样条,并在恒温恒湿箱(温度为 20 °C,相对湿度为 65%)中平衡 24 h,每个样品进行 10 次重复实验,样品断裂强度和断裂伸长率分别由以下公式计算:

$$Q = \frac{P}{d \times b}$$

$$\varepsilon = \frac{L'}{L} \times 100\%$$

式中:Q 为断裂强度,MPa;P 为强力,N;d 为厚度,mm;b 为膜宽度,mm;ε 为断裂伸长率,%;L' 为伸长,mm;L 为原长,mm。

### 1.3.6 热力学性能测试

使用 Q200 型差示扫描量热仪测定不同条件处理后的丝素冻干膜。测试条件:样品质量为 5 mg,升温速度为 10 °C/min,升温范围为 100 ~ 400 °C,氮气流量为 50.0 mL/min。

### 1.3.7 表面元素测试

将样品置于能量色散 X 射线能谱仪中分别进行线扫描和面扫描,测试出丝素膜表面元素含量和分布<sup>[8]</sup>。

### 1.3.8 形貌观察

使用 SU1510 型扫描电子显微镜观察所制备的

丝素材料的表观形态结构,样品经过喷金处理,扫描加速电压为 5 kV。

## 2 结果与讨论

### 2.1 pH 值和 STP 质量对磷酸化程度影响

磷转移量一定程度上反映丝素蛋白的磷酸化效果,采用磷钼蓝比色法测得:当 pH 值分别为 8、9、10 时,磷转移量分别为 35.5%、42.3%、67.1%。在 pH 值为 8 时磷转移率最低,在 pH 值为 10 时磷转移率最高。pH 值较低时,磷酸根主要与赖氨酸反应,但丝素中赖氨酸含量很低,因此磷酸化程度就低。当碱性增强时,Ser—OH 电离成 Ser—O<sup>-</sup>,此时亲核取代效应增强,游离的磷酸根基团与 Ser—O<sup>-</sup> 基团反应,氨基酸残基侧链中的羟基活性会变得越来越高<sup>[9]</sup>,丝素蛋白磷酸化程度增加。

图 1 示出不同质量的 STP 对磷酸化程度的影响。当 STP 质量较低时,随着 STP 质量的增加,磷酸化程度显著增加;当 STP 质量达 0.12 g 时,磷酸化程度趋于稳定。这表明磷酸根较少时,不是所有氨基酸残基都能够参加反应,有些可能因空间位阻和所处的化学环境限制了其反应<sup>[10]</sup>。当磷酸根足够多时,氨基酸残基能充分反应,磷酸化程度最大并趋于稳定。

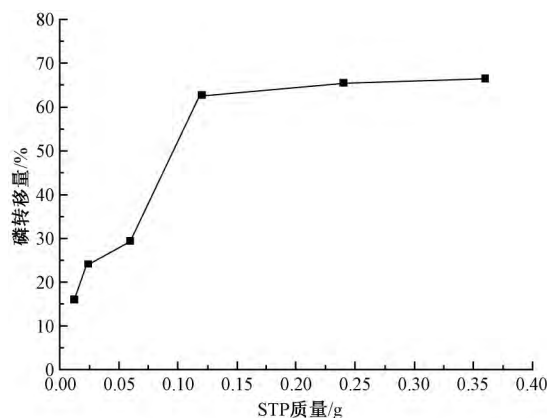


图 1 不同质量的 STP 对磷酸化程度的影响

Fig. 1 Effect of mass of STP on phosphorylation

### 2.2 磷酸化对丝素蛋白结构和粒径的影响

采用圆二色谱考察了丝素经过磷酸化后二级结构的变化,结果见图 2。可看出,丝素溶液在 220 nm 处有负峰,这说明丝素蛋白的二级结构以 α 螺旋为主<sup>[11]</sup>。当用 STP 处理后,220 nm 处负峰强度增大,表明丝素蛋白的二级结构发生了变化。通过计算得到丝素蛋白二级结构的分布,见表 2。

由表 2 可知,SF 的螺旋结构最少,无序度最高。当用 STP 处理 SF 后,其样品的螺旋结构都增加了,

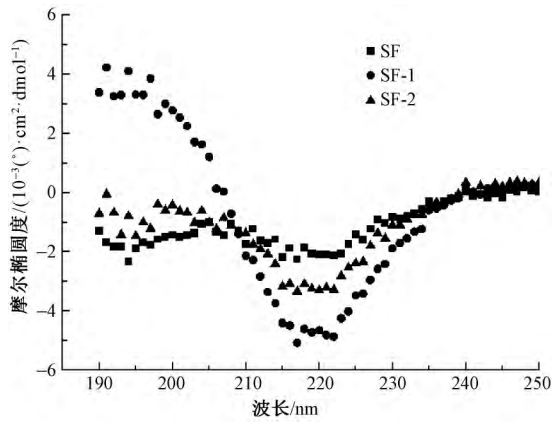


图 2 STP 处理后丝素溶液的圆二色谱图  
Fig. 2 Circular dichroism of silk fibroin solution after STP treatment

表 2 STP 处理后丝素溶液的二级结构变化

Tab.2 Secondary structure changes of fibroin solution after STP treatment

样品	$\alpha$ 螺旋结构占比	$\beta$ 折叠结构占比	无规卷曲结构占比
SF	4.09	29.34	46.90
SF-1	26.90	24.47	26.29
SF-2	9.16	31.92	37.90

无规卷曲都有不同程度的减少,即磷酸化使得丝素的结构更加完整,这也为后续的丝素膜材料构建奠定了良好的结构基础。由表 2 还可看出,当 STP 质量为 0.06 g 时,其螺旋结构最多,无规卷曲最少,即适度的磷酸化对丝素蛋白结构影响较大。

为进一步验证磷酸化对丝素溶液粒径产生的影响,测定了反应前后丝素溶液的粒径分布变化,结果如图 3 所示。可以看出 3 组样品的主要粒径分布范围在 100 ~ 250 nm 之间,其中 SF 的平均粒径和分散性指数(PDI)分别为 143.5 nm 和 0.528。当用 STP 处理 SF 溶液后,粒径分布都有不同程度的增大。STP 质量为 0.06 g 时,平均粒径和 PDI 分别为 158.5 nm 和 0.566;而当 STP 质量为 0.24 g 时,丝素溶液的平均粒径增大到 171.5 nm,PDI 为 0.615。这是因为磷酸根的引入使得丝素溶液间的静电斥力增加,使得粒径分布增加。

### 2.3 磷酸化丝素化学结构分析

为进一步证明丝素中氨基酸与 STP 发生反应的结构变化,利用红外光谱仪的全反射模式对不同处理条件的丝素膜进行测试,其结果如图 4 所示。可以看出,丝素蛋白的特征酰胺键主要分布在 1 654、1 513  $\text{cm}^{-1}$  附近,表明经过冷冻干燥后的再生丝素蛋白材料以无定形结构为主<sup>[12]</sup>。STP 中磷酸根的特征峰在 896  $\text{cm}^{-1}$  处,丝素经过 STP 处理后,在 921  $\text{cm}^{-1}$  处有新峰,其位置对应是 P—O 键的伸

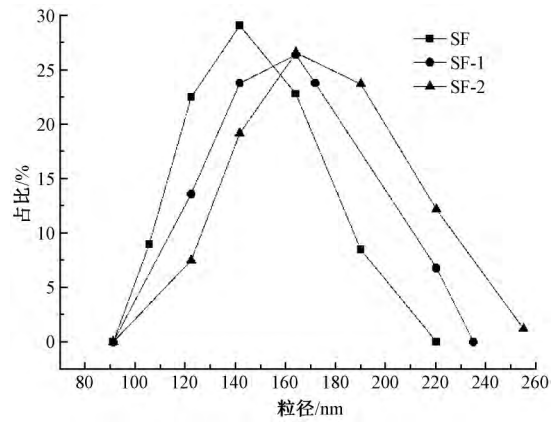


图 3 STP 处理后丝素溶液的粒径分布  
Fig. 3 Size distribution of fibroin solution after STP treatment

缩振动峰<sup>[13]</sup>,即证明丝素成功被 STP 磷酸化。

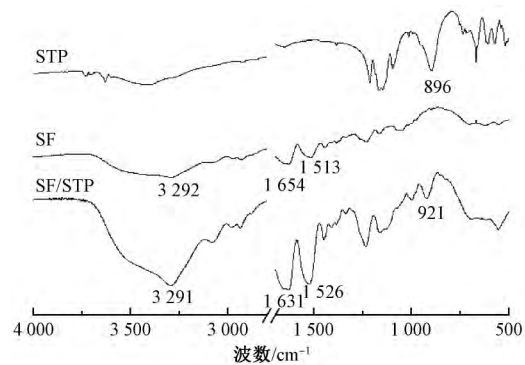


图 4 磷酸化的丝素冻干膜 ATR-FT-IR 光谱图  
Fig. 4 ATR-FT-IR spectra of phosphorylated silk fibroin

### 2.4 磷酸化丝素膜对阳离子的吸附效果

磷酸化影响丝素蛋白表面电荷分布,使得丝素蛋白分子表面负电性基团增多。借助阳离子染料沾色实验,探究磷酸化丝素表面对阳离子的吸附。结果发现,STP 质量为 0、0.06、0.24 g 时对应的沾色率分别为 9.3%、16.2%、31.8%。磷酸化会在蛋白质分子中引入负电性磷酸根基团,阳离子染料带正电,与丝素间结合力主要为库仑引力。根据丝素膜表面沾色率变化,可判别出丝素膜磷酸化的程度。当 STP 质量为 0.24 g 时,丝素对染料的沾色率增至 31.8%,表明丝素磷酸化有利于膜表面阳离子的吸附,为后续丝素表面钙磷酸盐的吸附和沉积奠定了基础。

### 2.5 磷酸化对丝素热力学和力学性能影响

为深入分析磷酸化对丝素膜材料热力学性能的影响,采用差示扫描量热仪分析丝素膜的热力学转变温度,结果如图 5 所示。可以看出,SF 蛋白膜存在 3 个明显的吸热峰,其中在 50、121  $^{\circ}\text{C}$  附近的吸热峰分别是由于自由水和结合水的蒸发引起的,在 278  $^{\circ}\text{C}$  附近的吸热峰则是由于丝素蛋白膜材料热降解引起的,该温度为丝素蛋白的热分解温度<sup>[14]</sup>。经

过 STP 处理后的 SF 膜,丝素蛋白的热性能发生了较小的变化,但从图 5 可看出,当温度升高到 285 °C 左右以后,经过磷酸化的 SF 膜完全被降解,可见 STP 的引入使得 SF 膜的热稳定性有所下降。原因是:磷酸根的引入使得丝素蛋白质分子间的氢键被大量破坏,引入大量负电基团使静电斥力加大,从而导致样品的热性能急剧降低。

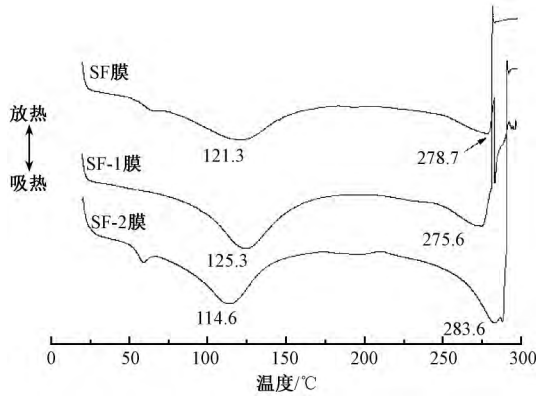


图 5 磷酸化丝素膜的 DSC 曲线

Fig. 5 DSC curves of phosphorylated silk fibroin membranes

为探究丝素磷酸化对风干膜材料力学性能的影响,测定了丝素风干膜的断裂强度和断裂伸长率,结果如图 6 所示。可以看出:当 STP 质量为 0.06 g 时,对应的样品断裂强度和断裂伸长率最高;当 STP 质量为 0.24 g 时,所对应的样品断裂强度、断裂伸长率最低。当 STP 质量为 0.24 g 时,样品断裂强度下降,这是因为在磷酸化过程中,蛋白分子中羟基或氨基磷酸化后,不仅使分子间氢键减少,且引入的负电磷酸根基团加大了蛋白分子间的静电斥力。当 STP 质量为 0.06 g 时,样品断裂强度比原样稍有提高。从丝素二级结构可看出,丝素蛋白经 0.06 g STP 处理后,无序度最低,且螺旋结构变多,使得力学性能增加,即抵消了磷酸化对膜材料强力的消极影响。

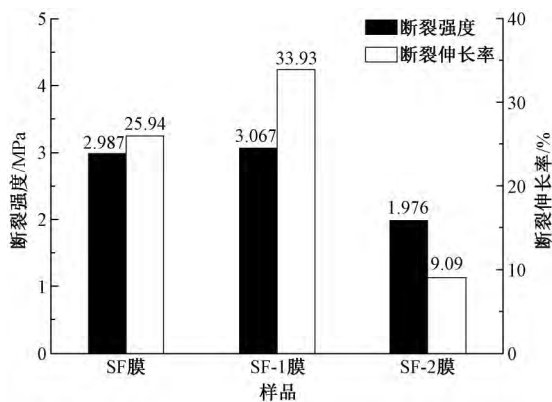


图 6 磷酸化丝素膜的力学性能

Fig. 6 Mechanical properties of phosphorylated silk fibroin membranes

## 2.6 仿生矿化膜表面元素和形貌分析

采用能量色散 X 射线能谱仪分析经过仿生矿化丝素膜表面不同元素的含量,其结果如表 3 所示。当 SF 经 STP 处理后,引入了部分磷酸根,因此将磷酸化后的丝素膜只用 CaCl<sub>2</sub> 处理时,其中 Ca 元素和 P 元素含量随着磷酸化程度的提高而增加,其中 P 元素的引入都是 STP 磷酸化导致的,也因此间接反映磷酸化程度。当用 CaCl<sub>2</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 对磷酸化的丝素膜进行仿生矿化后,Ca 元素和 P 元素含量都比只用 CaCl<sub>2</sub> 矿化的丝素膜高。

表 3 仿生矿化后的丝素膜表面元素含量

Tab. 3 Element contents of silk fibroin membrane surfaces after bionic mineralization

样品	Ca	P
SF1-1	2.86	0.00
SF1-2	32.97	12.72
SF2-1	5.20	3.06
SF2-2	28.61	13.94
SF3-1	13.55	8.91
SF3-2	35.66	16.58

为更直观地观测丝素膜矿化后的变化,借助扫描电镜对各个丝素膜的形貌变化进行观察,结果如图 7 所示。

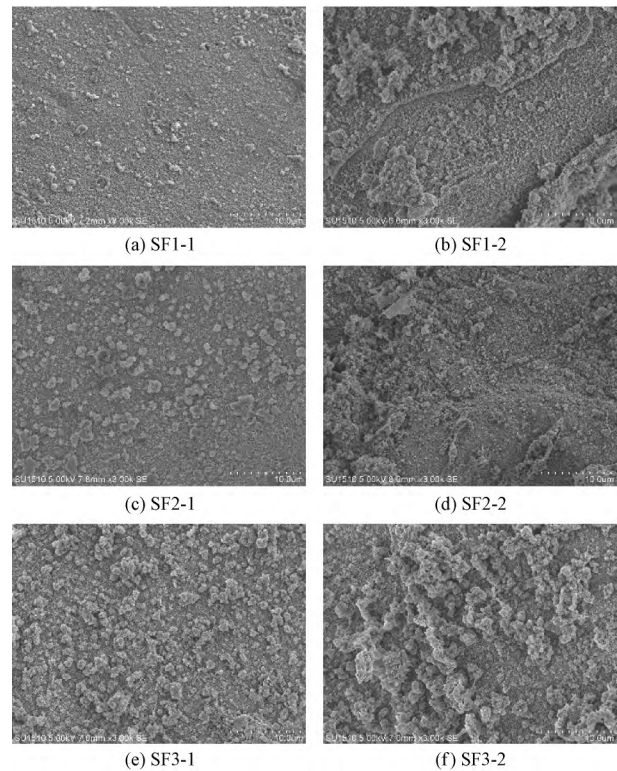


图 7 不同矿化条件下丝素膜的形态结构(×300)

Fig. 7 Morphological structures of silk membranes under different mineralization conditions(×300)

从图 7 可看出, 未经磷酸化处理的 SF 膜表面很光滑, 经过  $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  交替矿化处理的 SF 膜表面变得很粗糙, 有少量颗粒状无机物生成, 表明有磷酸钙盐或羟基磷灰石晶体生成, 但其分布并不均匀。随着磷酸化程度增加, SF/STP 处理膜表面生成的羟基磷灰石晶体逐渐增多, 且分布较均匀。矿化过程中用  $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  处理的丝素膜表面生成的羟基磷灰石数目比仅用  $\text{CaCl}_2$  处理的丝素膜要多, 即丝素经 STP 磷酸化后, 提供了部分的磷酸根, 从而为矿化过程提供了更多的沉积位点。

### 3 结 论

1) 丝素蛋白在三聚磷酸钠质量为 0.24 g、pH 值为 10.35  $^{\circ}\text{C}$  条件下处理 30 min, 获得了较好的磷酸化效果; 丝素经过磷酸化处理后, 蛋白二级结构和分子粒径发生变化, 磷酸化丝素膜对阳离子的吸附能力较空白样增加。

2) 采用三聚磷酸钠作为磷酸化试剂对丝素蛋白的力学与热稳定性有影响, 当磷酸化程度较高时, 丝素膜材料的力学与热力学性能发生不同程度的下降。

3) 磷酸化丝素膜经  $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  交替矿化处理后, 其表面较空白样生成更多羟基磷灰石, 采用三聚磷酸钠作为磷酸化试剂有利于丝素基仿生矿化材料的制备。 **FZXB**

#### 参考文献:

- [1] 周步光, 张宇慧, 王平, 等. 丝素/丙烯酰胺/丙烯酸吸水复合材料的紫外光辐照法制备[J]. 纺织学报, 2017, 38(5): 25-30.  
ZHOU Buguang, ZHANG Yuhui, WANG Ping, et al. Preparation of water-absorbing composite of silk fibroin/acrylamide/acrylic acid using UV irradiation [J]. Journal of Textile Research, 2017, 38(5): 25-30.
- [2] ZHOU B G, HE M, WANG P, et al. Synthesis of silk fibroin-g-PAA composite using  $\text{H}_2\text{O}_2$ -HRP and characterization of the in situ biomimetic mineralization behavior [J]. Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications, 2017, 81: 291-302.
- [3] 卢神州, 李明忠, 秦建彬. 丝素膜表面磷酸化研究[J]. 丝绸, 2006(10): 296-299.  
LU Shenzhou, LI Mingzhong, QIN Jianbin. Study on the surface phosphorylation of silk fibroin membrane [J]. Journal of Silk, 2006(10): 296-299.
- [4] 张瑾莉, 任小元, 张琪, 等. 仿生矿化法制备 HA/SF/Ti 复合材料的研究进展[J]. 丝绸, 2014, 51(3): 19-24.  
ZHANG Jinli, REN Xiaoyuan, ZHANG Qi, et al. Research on the preparation of HA/SF/Ti composites by bionic mineralization [J]. Journal of Silk, 2014, 51(3): 19-24.
- [5] 刘天一. 大豆分离蛋白的磷酸化改性功能性质的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(6): 118-121.  
LIU Tianyi. Study on functional properties of soybean protein isolates by phosphorylated modification [J]. Journal of Food and Fermentation Industries, 2004, 30(6): 118-121.
- [6] JAISWAL A K, CHHABRA H, SONI V P, et al. Enhanced mechanical strength and biocompatibility of electrospun polycaprolactone-gelatin scaffold with surface deposited nano-hydroxyapatite [J]. Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications, 2013, 33(4): 2376-2385.
- [7] 梁茂林. 应用磷钼蓝比色法快速测定磷铜合金中磷含量的研究[J]. 山东化工, 2016, 45(18): 60-61.  
LIANG Maolin. Rapid determination of phosphorus content in phosphor bronze by phosphomolybdate blue colorimetric method [J]. Shandong Chemical Industry, 2016, 45(18): 60-61.
- [8] TRAGOONWICHIAN S, KOTHARY P, SIRIVIRIYANUN A, et al. Silicon-compound coating for preparation of water repellent cotton fabric by admicellar polymerization [J]. Colloids & Surfaces A: Physicochemical & Engineering Aspects, 2011, 384(1): 381-387.
- [9] 王伟.  $\text{CaCO}_3$  和  $\text{SiO}_2$  改性丝素/聚乙烯醇共混膜的制备与性能研究[D]. 天津: 天津工业大学, 2010: 15-27.  
WANG Wei. Preparation and properties of  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{SiO}_2$  modified silk fibroin / PVA blends [D]. Tianjin: Tianjin Polytechnic University, 2010: 15-27.
- [10] 孟陆丽, 程谦伟, 李军生, 等. 丝素蛋白的磷酸化改性研究[J]. 食品科技, 2009(7): 221-224.  
MENG Luli, CHENG Qianwei, LI Junsheng, et al. Research on phosphorylation of silk fibroin [J]. Journal of Food Science and Technology, 2009(7): 221-224.
- [11] 洪言婧, 王平, 朱雪珂, 等. 基于酶法交联的再生纳米弹性蛋白膜构建[J]. 功能材料, 2016, 47(10): 10076-10080.  
HONG Yanjing, WANG Ping, ZHU Xueke, et al. Construction of regenerated nano-elastase membrane based on enzymatic crosslinking [J]. Journal of Functional Materials, 2016, 47(10): 10076-10080.
- [12] HONG Y Q, ZHU X K, WANG P, et al. Tyrosinase-mediated construction of a silk fibroin/elastin nanofiber bioscaffold [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2016, 178(7): 1363-1376.
- [13] 陈俊高, 迟玉杰, 王喜波, 等. 提高大豆分离蛋白乳化性的工艺优化及性质分析[J]. 食品与发酵工业, 2010(11): 67-72.  
CHEN Jungao, CHI Yujie, WANG Xibo, et al. Process optimization and property analysis of improving emulsification of soy protein isolate [J]. Journal of Food and Fermentation Industries, 2010(11): 67-72.
- [14] HUX, CEBE P, KAPLAN D. Effect of water on thermal properties of silk fibroin [J]. Thermochimica Acta, 2007, 461(1): 137-144.