

DOI: 10.13475/j.fzxb.20181005906

# 超声波辅助对乳化交联工艺制备丝素蛋白 微球形貌的影响

王宗乾<sup>1,2</sup>, 王邓峰<sup>1</sup>, 周杭<sup>2</sup>, 李俊<sup>1</sup>

(1. 安徽工程大学 纺织服装学院, 安徽 芜湖 241000;  
2. 安徽工程大学 安徽省纺织印染行业技术中心, 安徽 芜湖 241000)

**摘要** 为解决经乳化交联工艺制备的丝素蛋白空白微球极易发生集聚且粒径分布不匀的问题, 在乳化交联过程中采用了超声波辅助工艺, 探讨其对微球聚集、形貌的影响规律。借助激光粒度分析仪、扫描电子显微镜分析了微球的粒度分布和形貌特征。研究表明: 无超声波辅助下, 乳化交联工艺制备微球的平均粒径为 15.08  $\mu\text{m}$ , 粒径标准偏差(SD)为 0.515, 聚集现象明显; 超声波辅助后, 微球平均粒径随超声频率和超声功率的增加而减小, 在 45 kHz、100 W 的超声波条件下制备的微球粒径减小至原来的 26%, 微球的 SD 值同时降低, 证明超声波辅助可显著改善微球的团聚现象, 促进微球粒径的均匀分布。

**关键词** 乳化交联工艺; 丝素蛋白; 空白微球; 超声波; 粒径分布

中图分类号: R 318.08; TS 102 文献标志码: A

## Effect of ultrasonic assistance on morphology of silk fibroin microspheres prepared by emulsion cross-linking process

WANG Zongqian<sup>1,2</sup>, WANG Dengfeng<sup>1</sup>, ZHOU Hang<sup>2</sup>, LI Jun<sup>1</sup>

(1. School of Textile and Garment, Anhui Polytechnic University, Wuhu, Anhui 241000, China; 2. The Technical Center of Textile Dyeing and Finishing of Anhui Province, Anhui Polytechnic University, Wuhu, Anhui 241000, China)

**Abstract** In order to solve the easy aggregation and nonuniform particle size distribution of silk fibroin blank microspheres prepared by emulsion cross-linking process, ultrasonic assistance was employed in the emulsion cross-linking process. The particle size distribution and the morphology of microspheres were measured by laser particle size analyzer and scanning electron microscopy. The results show that in the absence of the ultrasonic assistance, the microspheres prepared by emulsion cross-linking process have the average particle size of 15.08  $\mu\text{m}$  with the standard deviation (SD) value of 0.515, and the aggregation is very obvious. However, in the presence of ultrasonic assistance, the average particle size decreases with the increase of ultrasonic frequency and ultrasonic power. The particle size of the microspheres prepared in the presence of the ultrasonic assistance at 45 kHz and 100 W reduces to 26% of the original one. The SD value of microspheres also decreases, indicating that ultrasonic assistance can significantly reduce the aggregation of the microspheres and promote the uniform distribution of the particle size of the microspheres.

**Keywords** emulsification crosslinking process; silk fibroin; blank microsphere; ultrasonic; particle size distribution

收稿日期: 2018-10-30 修回日期: 2018-11-03

获奖说明: 本文荣获中国纺织工程学会颁发的第 19 届陈维稷优秀论文奖

基金项目: 国家级大学生创新创业计划项目(201710363033); 安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2016A796, 1804a09020077); 芜湖市科技计划重点项目(2017yf14); 安徽工程大学大学生科研项目(2017DZ20)

第一作者: 王宗乾(1982—)男, 副教授, 博士。主要研究方向为先进印染加工技术, 功能化纤维的结构调控与成形技术。E-mail: wzqian@ahpu.edu.cn。

丝素是蚕丝的主体成分,其质量约占蚕丝总质量的 70%~80%<sup>[1]</sup>,作为一种天然蛋白质资源,具有良好的生物相容性和生物降解性能<sup>[2]</sup>,因此丝素蛋白在生物医药、组织工程等领域的应用受到了较多关注。同时,基于丝素蛋白的结构与反应特性,可将其设计加工制备薄膜<sup>[3]</sup>、凝胶<sup>[4]</sup>、多孔材料、纳米纤维、微球等不同形貌的产品<sup>[5-7]</sup>,具有丰富的可改造空间。应用于生物医药领域的微球通常是以高分子材料为载体,包裹或吸附药物而制成的微小球状实体,粒径范围分布在 1~300 μm 区间<sup>[8]</sup>。有研究表明,微球粒径是衡量其效能的重要指标,随着粒径的减小,微球的比表面积增加,有助于提升微球表面的吸附量,提高光散射比率等<sup>[9]</sup>;微球粒径减小也将导致分布在微球表面的相对原子数增多,致使微球表面能增加<sup>[10]</sup>;同时基于凝胶粒子体积改变的弛豫时间与其半径的平方成正比理论,粒径越小的微球对外界刺激的反应速度更快<sup>[11]</sup>。丝素蛋白微球应用于生物医药领域具有药物缓释作用,在慢性病治疗、创伤修复等领域具有广阔的应用前景<sup>[12]</sup>。综上所述,微球的制备是开发和利用丝素蛋白微球的首要环节,微球粒径的分布将直接影响其性能。潘岳林等<sup>[13]</sup>采用自组装方法制备了丝素蛋白微球,研究发现随着丝素蛋白质量分数的增加,微球粒径增大,微球也将发生集聚。杨道伟<sup>[14]</sup>以乳化交联工艺制备了丝素蛋白空白微球,并对影响微球粒径的工艺因素进行探讨。王鼎等<sup>[15]</sup>以自组装方法制备了丝素蛋白微球,并以此为模板制备介孔二氧化硅(SiO<sub>2</sub>)空心微球,在其研究中发现,不同体积比制备的丝素蛋白微球出现粘黏现象。

众所周知,超声波具有声空化效应,已广泛应用于化学化工、生物医药、纺织印染等领域<sup>[16-18]</sup>。当前已有学者将超声波技术应用于微球结构的调控:郭生伟等<sup>[19]</sup>利用超声辐照引发包覆乳液聚合制备了聚丙烯酸正丁酯(PBA)空心微球,透射电镜(TEM)和动态光散射(DLS)测试结果显示,空心微球粒径均一,壳层厚度均匀;汪衍涛等<sup>[20]</sup>以电火花-超声复合加工法制备镍微球,结果表明加入超声波之后,小粒径(0~10 μm)镍微球比例明显升高,且小粒径微球比例随着超声波频率的增大而降低,随着超声波功率的增大而升高;王伟华等<sup>[21]</sup>以异丙氧基钛(TiTP)为原料,利用超声波辅助溶胶/凝胶法制备微米级多孔性二氧化钛微球,结果表明超声波辅助可减小微球粒径,进一步提高微球比表面积。综上所述,超声波辅助工艺有助于降低微球的平均粒径并有利于微球的均匀分布。

已有文献同时表明,不同的脱胶、溶解等工艺对

丝素蛋白结构与性能产生显著影响,其中尿素脱胶工艺、氯化钙/乙醇/水三元体系溶解对丝素蛋白结构的影响较弱,可提取低损伤的丝素蛋白<sup>[22-23]</sup>。以尿素脱胶工艺提取的丝素蛋白为原料,采用乳化交联工艺制备丝素蛋白微球极易发生黏连团聚现象,微球粒径分布不匀。目前还没有超声波辅助乳化交联工艺制备丝素蛋白微球的报道。本文采用尿素脱胶、溶解等工艺制备了丝素蛋白,并结合电泳图谱分析其分子量分布;基于乳化交联工艺制备了丝素蛋白微球,并对其粒径、形貌进行表征;在此基础上,设计了超声波辅助乳化交联工艺制备微球的方案,采用激光粒度分析仪、扫描电镜(SEM)分别对超声辅助前后制备微球的粒度分布和形貌特征进行测试与表征,并通过超声频率和功率的调节,探讨了超声波辅助对乳化交联工艺制备丝素蛋白空白微球粒径分布、形貌的影响规律,以期为微球粒径的调控及均匀丝素蛋白微球的制备提供实验基础。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与试剂

蚕生丝(安徽青阳县三方丝绸有限公司);尿素(南京化学试剂有限公司);无水乙醇(上海泰坦科技股份有限公司);异丙醇、石油醚、非离子表面活性剂 Span 80、无水氯化钙、50%戊二醛、液状石蜡、聚合度为 20 000 聚乙二醇(上海阿拉丁试剂有限公司)。以上试剂均为分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 丝素蛋白的制备

蚕生丝经脱胶、溶解、透析、浓缩等工序后,制得了实验所需的丝素蛋白液。具体操作如下:精确称取一定质量的蚕丝并按 1:30 的浴比将其浸渍于 8 mol/L 的尿素溶液中,在 100 °C 下脱胶 3 h,取出并经去离子水冲洗至无滑腻感,于 40 °C 烘箱内烘至质量恒定,制得尿素脱胶蚕丝;取 2 g 脱胶蚕丝按 1:20 的浴比浸渍于预先配制的 CaCl<sub>2</sub>/C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH/H<sub>2</sub>O 三元溶剂(三组分的量比为 1:2:8)中,在 50 °C 下先溶胀 2 h,后升温至 85 °C,恒温振荡溶解 2 h,得到丝素蛋白溶解液;丝素蛋白溶解液经离心(转速 6 000 r/min,时长 10 min)处理,将上层清液注入透析袋(截留分子量 8 000~14 000 kDa)中进行透析,透析持续 3 d,每间隔 4~6 h 换水;经聚乙二醇浓缩制得质量分数为 4%的丝素蛋白液,备用。

#### 1.2.2 微球乳化交联制备工艺

量取 40 mL 液状石蜡与 4 mL 的 Span 80 搅拌混合 40 min,用移液枪缓慢滴加 4%的丝素蛋白溶

液 3.6 mL 在 400 r/min 条件下继续搅拌 40 min 形成均匀稳定的油包水(W/O)型乳液后,缓慢滴加 50%戊二醛 1.2 mL,持续搅拌 3 h,低速离心,倒出上层清液,用石油醚、异丙醇多次洗涤,干燥,收集微球。

### 1.2.3 超声波辅助微球制备

在乳化交联工艺制备微球的乳化阶段加以超声波辅助,施加的超声波频率在 28、45、80 kHz 3 档可调,功率可在 40、60、80、100 W 4 档可调,超声波作用时间均为 5 min,温度为室温;超声波辅助工艺中,微球制备的乳化时长缩短至 5 min。

## 1.3 测试方法

### 1.3.1 蚕丝脱胶率

采用称重法计算蚕丝脱胶率。具体操作如下:脱胶前后蚕丝样品于 40 ℃ 烘箱调查间距干至质量恒定,后放入干燥器中平衡 24 h,精确称量,并按下式计算脱胶率。

$$R = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$$

式中:  $R$  为脱胶率,%;  $m_1$  为脱胶前蚕丝质量, g;  $m_2$  为脱胶后蚕丝质量, g。

### 1.3.2 丝素蛋白分子质量分布

采用 SDS-PAGE 凝胶电泳方法测试本实验制备丝素蛋白的分子质量分布;具体操作同文献[22]所述。

### 1.3.3 微球粒径分布

采用 Nano ZS90 纳米激光粒度仪(英国 Malvern 公司)对制备微球的粒径分布进行分析,测试前将各微球样品分散于超纯水,粒径测试区间设定为 0.02~2 000  $\mu\text{m}$ 。

### 1.3.4 微球形貌观察

用吸管吸取少量干燥微球平铺于附有导电胶的载物台上,表面喷金,将丝素蛋白微球置于电镜台,采用 S-4800 扫描电子显微镜(日本 Hitachi 公司)检测微球表面形貌。

## 2 结果与讨论

### 2.1 尿素脱胶蚕丝及丝素蛋白性能

采用相同的尿素脱胶工艺,平行对 5 组蚕生丝进行脱胶处理,测试脱胶率数据在 27.56%~28.36% 之间,平均值为 27.87%,标准偏差值为 0.30。该脱胶率值稍低于传统的碳酸钠脱胶数据,但与文献所述不同工艺脱胶数据基本吻合<sup>[24]</sup>,同时 27.87% 的脱胶率值也与丝胶在蚕丝中的质量分布相对应<sup>[1]</sup>;尿素脱胶机制在于对丝胶组分的吸湿溶

胀,促进丝胶蛋白的溶解,尿素脱胶体系不呈碱性,对丝素蛋白结构与分子量不产生影响,这也是尿素脱胶工艺制备低损伤丝素的缘由。此外,在尿素脱胶平行实验中,脱胶率标准偏差值小,表明不同批次之间在脱胶率上不存在显著差异,该工艺稳定且易于控制。尿素脱胶蚕丝保留了原有的蚕丝光泽,其蓝光白度值大于 70%,该数值高于传统碳酸钠脱胶所得蚕丝的白度值(68.43%)<sup>[22]</sup>,这可能与丝素蛋白在碱性环境中易于发生光氧化黄变及蛋白质变性相关。

尿素脱胶蚕丝经溶解、离心、透析处理,制得丝素蛋白液,实验对其进行了 SDS-PAGE 凝胶电泳分析,结果如图 1 所示。

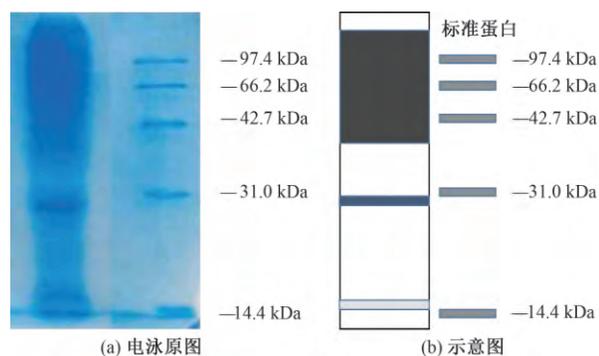


图 1 丝素蛋白分子质量分布

Fig.1 Molecular weight distribution of silk fibroin.

(a) Original image; (b) Schematic diagram

脱胶蚕丝可由  $\text{CaCl}_2/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  三元体系完全溶解,得到淡黄色溶液,离心后底部有痕量的黑色物质,判断为氯化钙药剂所含杂质;经透析后,丝素蛋白液呈半透明乳白色,没有丝素蛋白析出及团聚现象。由图 1 可知,制备的丝素蛋白集中分布在 40~100 kDa 区间,此外在稍低于 31.0 kDa 以及稍高于 14.4 kDa 处也有分布,这与丝素蛋白由轻链和重链 2 种蛋白构成密切相关。由此可见尿素脱胶没有致使重链丝素蛋白水解,保留了丝素蛋白原有的分子量分布。文献研究表明,分子量较大的丝素蛋白更易成膜成球,且成膜结构较为稳定,具有更好的耐热和机械稳定性能,有助于提升微球的稳定性能<sup>[25]</sup>;在微球制备与应用中,微球形貌的稳定性至关重要,为此尿素脱胶为获取大分子的丝素蛋白提供了有效途径。

### 2.2 乳化交联工艺制备的空白微球

图 2 示出乳化交联工艺制备微球的粒径分布。由图可知,微球粒径集中分布于 10~20  $\mu\text{m}$  区间,平均粒径为 15.48  $\mu\text{m}$ ,微球粒径分布的标准偏差值为 0.515。采用 SEM 对微球形貌进行表征,如图 3 所示。发现微球呈现了较为严重的集聚和粘连形貌,

形成了多个较大尺寸的微球集聚体,这和微球粒径分布测试数据并不相符。分析致使微球集聚和黏联的原因在于乳化交联工艺中,因大分子的丝素蛋白具有较强的自聚集效应,且极易成膜<sup>[25]</sup>,在乳化交联工艺的机械搅拌条件下,大分子丝素蛋白分散不均匀,致使形成的单个微球形貌并不完整,即丝素蛋白在单个微球上并未形成完整且稳定的球壁,在烘干过程中,微球球壁相互之间重新发生黏结,并形成较大的集聚体。在粒径分布的测试中,需要将微球分散在水介质中,且介质中蛋白微球的质量浓度很低(小于 0.01%),微球之间碰撞接触的机会较小,难以形成集聚体,因此仅凭微球粒径测试数据尚不能全面反映制备微球的真实形貌。为解决这一问题,必须在乳化交联制备微球的工艺中,促使丝素蛋

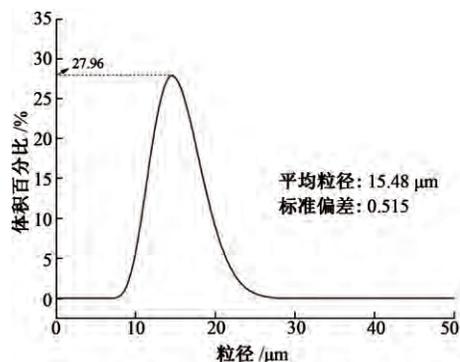


图 2 空白微球粒径分布图

Fig.2 Particle size distribution of blank microspheres

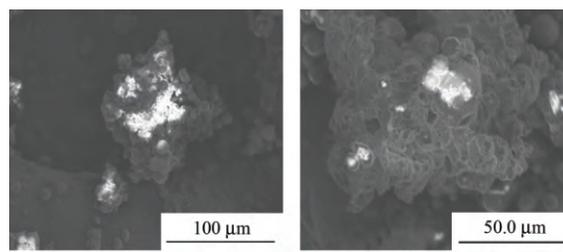


图 3 空白微球形貌

Fig.3 Morphology of blank microspheres. (a) Microsphere aggregation(×500); (b) Amplification of microsphere aggregation(×1 000)

白均匀分散,并保证微球形貌的完整,避免干燥过程中球壁丝素蛋白发生再次聚集。

### 2.3 超声辅助制备的空白微球

#### 2.3.1 超声频率的影响

在恒定的超声功率(40 W)下,改变超声频率,测试了不同频率作用下制备微球的粒径分布与形貌特征,结果分别如表 1 和图 4 所示。

表 1 超声频率对微球粒径分布的影响

Tab.1 Impact of ultrasonic frequency on size distribution of blank microspheres

频率/kHz	平均粒径/μm	体积百分比*/%	标准偏差
28	11.02	28.15	0.459
45	8.52	30.24	0.436
80	3.34	32.31	0.414

注: \* 指测试微球样品中,具有平均粒径的体积百分比。

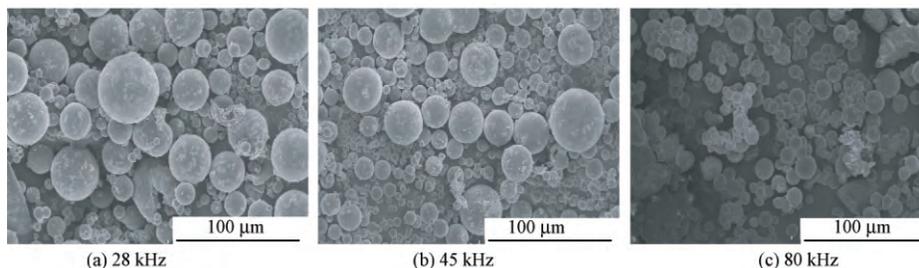


图 4 超声频率对微球形貌的影响(×500)

Fig.4 Impact of ultrasonic frequency on morphology of microspheres(×500)

由表 1 可知:随着超声频率的增加,微球平均粒径明显减小,与未经超声波辅助的乳化交联工艺制备微球相比,在超声频率为 80 kHz 时,微球粒径几乎减小至原来的 1/5;同时,超声波辅助下具有平均粒径的微球体积百分比值逐渐增加,微球粒径分布标准偏差 SD 值逐渐减小,2 个指标的变化也表明了超声波辅助还有助于微球粒径的集中分布,提高粒径的均匀程度。

由图 4 可知,超声波辅助后制备微球形貌完整,微球间未发生黏连与聚集,且微球粒径随着超声频率的增加逐渐减小。超声波辅助工艺下,因声空化

效应,丝素蛋白大分子在乳化交联体系中被均匀分散,依靠氢键和范氏力发生的蛋白大分子集聚现象被打破,分子之间无法产生自聚集和自组装,因此成球后球壁状态完整,微球个体稳定。随着超声频率的增加,超声化效应增强,丝素蛋白的分散倾向于更小且更加均匀<sup>[26]</sup>,为此随着超声频率的增加,制备微球的粒径逐渐减少,且粒径分布更加集中。但在实验过程中发现,超声波辅助对微球产率产生较大影响,随着超声频率的增加,制备微球的产率逐渐降低,当频率达到 80 kHz,微球产率已降低至乳化交联工艺的 40%~50%,而当超声频率为 45 kHz,成球

率也有所降低,但降低幅度在 10% 之内。综上,实验选择在 45 kHz 条件下,继续探讨超声功率对微球粒径分布和形貌的影响规律。

### 2.3.2 超声功率的影响

在恒定的超声频率(45 kHz)条件下,分析了不同功率的超声波作用对制备微球粒径分布与形貌特征影响的规律,结果分别如表 2、图 5 所示。

表 2 超声功率对微球粒径分布的影响

Tab.2 Impact of ultrasonic power size distribution of blank microspheres

功率/W	平均粒径/ $\mu\text{m}$	体积百分比/%	标准偏差
40	8.52	30.24	0.436
60	7.21	30.39	0.428
80	5.92	31.04	0.421
100	4.07	31.78	0.415

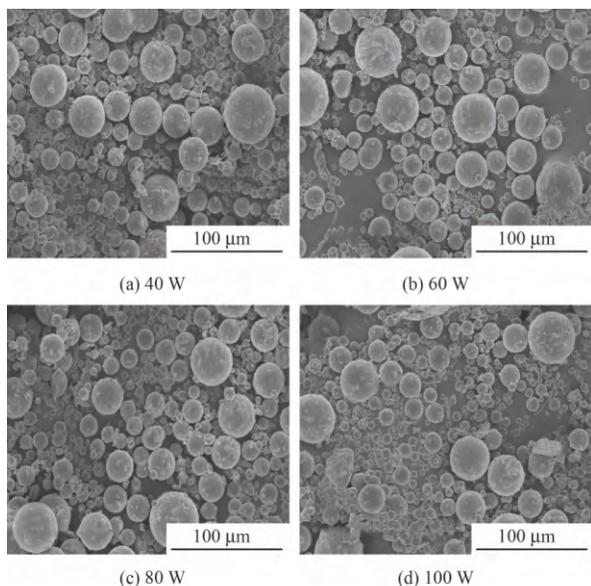


图 5 超声功率对微球形貌的影响

Fig.5 Impact of ultrasonic power on morphology of microspheres

由表 2 可知,随着超声波功率的增加,制备微球的平均粒径也呈逐渐减小的趋势,但减小幅度不及表 1 中超声频率的影响;与未经超声波辅助的乳化交联工艺相比,在 45 kHz,100 W 条件下制备微球粒径(4.07  $\mu\text{m}$ )减少至原微球粒径(15.48  $\mu\text{m}$ )的 26%;此外,由微球体积百分比和粒径分布的 SD 数据可知,超声波功率的增加有助于提高微球粒径分布的均匀性。

由图 5 可知,在恒定的超声波频率作用下,增加超声功率将进一步减少微球粒径,且制备微球未出现集聚和粘连现象。随着功率的增加,镶嵌于微球之间小微球或小颗粒有增加的趋势,这表明随着超声波辅助效应的增强,声空化效应将直接作用于丝素蛋白内

部氢键及肽键,促使丝素蛋白分解成小分子量的蛋白,甚至在乳化过程中形成微小乳滴,难以成球,因此造成微球收率降低。综上,超声波辅助乳化交联工艺可显著改善微球的团聚现象,促进微球粒径的均匀分布,但也有降低微球收率的不利影响,在微球制备中尚需对超声波辅助工艺进行优化设计。

## 3 结 论

1) 尿素脱胶获得的丝素蛋白具有较高的分子量分布,经乳化交联工艺制得的丝素蛋白微球平均粒径为 15.08  $\mu\text{m}$ ,粒径标准偏差为 0.515;扫描电子显微镜观察发现微球易发生集聚和粘连。

2) 超声波辅助工艺解决了乳化交联制备微球易于集聚粘连的问题,且制备微球的粒径随着超声频率、超声功率的增加而减少,同时微球粒径分布更加均匀;在 45 kHz,100 W 的超声波辅助工艺下制备的微球粒径减小至原来的 26%,粒径标准偏差同时减小,但超声波辅助将降低微球的收率。 FZXB

### 参考文献:

- [1] TZENOV P, VASILEVA J, PANTALEEVA D. Silk shell fibroin content heterosis expression in Bulgarian F1 silkworm *Bombyx mori* L hybrids [J]. *Indian Journal of Sericulture*, 2010, 49(2): 110-114.
- [2] KUNDU B, RAJKHOWA R, KUNDU S C, et al. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(4): 457-70.
- [3] HIGA K, TAKESHIMA N, MORO F, et al. Porous silk fibroin film as a transparent carrier for cultivated corneal epithelial sheets [J]. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 2011, 22(17): 2261.
- [4] KAPOOR S, KUNDU S C. Silk protein - based hydrogels: promising advanced materials for biomedical applications [J]. *Acta Biomaterialia*, 2015, 31: 17-32.
- [5] 高欣,张海萍,陈宇,等. 丝素蛋白多孔材料及其在组织工程领域的应用 [J]. *纺织学报*, 2008, 29(10): 132-136.  
GAO Xin, ZHANG Haiping, CHEN Yu, et al. Porous silk fibroin material and its application in tissue engineering [J]. *Journal of Textile Research*, 2008, 29(10): 132-136.
- [6] BHATTACHARJEE P, KUNDU B, NASKAR D, et al. Nanofibrous nonmulberry silk/PVA scaffold for osteoinduction and osseointegration [J]. *Biopolymers*, 2015, 103(5): 271-284.
- [7] SRIHANAM P, SRISUWAN Y, IMSOMBUT T, et al. Silk fibroin microspheres prepared by the water-in-oil emulsion solvent diffusion method for protein de-

- livery[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2011, 28(1): 293-297.
- [8] 白荣. 乳酸-羟基乙酸共聚物缓释微球的制备工艺与生物学性能[J]. 中国组织工程研究, 2009, 13(34): 6769-6772.  
BAI Rong. Preparation and biological properties of lactic acid - glycolic acid copolymer sustained release microspheres [J]. Journal of Chinese Tissue Engineering, 2009, 13(34): 6769-6772.
- [9] RUI Y, WANG L, ZHAO J, et al. Template - free synthesis of hierarchical TiO<sub>2</sub> hollow microspheres as scattering layer for dye-sensitized solar cells [J]. Applied Surface Science, 2016, 369: 170-177.
- [10] JIN Y, LU H F, GUO X L, et al. The effect of water addition on the surface energy, bulk and flow properties of lignite[J]. Fuel Processing Technology, 2018, 176: 91-100.
- [11] ZANDSTRA J, HIEMSTRA C, PETERSEN A H, et al. Microsphere size influences the foreign body reaction[J]. European Cells & Materials, 2014, 28: 335-347.
- [12] FANG S, ZHAO H, ZHANG Q, et al. The application status and development trends of ultrasonic machining technology [J]. Journal of Mechanical Engineering, 2017, 53(19): 22-32.
- [13] 潘岳林, 杨明英, 邓连霞, 等. 自组装方法制备丝素微球及其结构与性能表征 [J]. 蚕业科学, 2015, 41(4): 729-733.  
PAN Yuelin, YANG Mingying, DENG Lianxia, et al. Preparation of silk fibroin microspheres by self-assembly method and its structure and performance characterization [J]. Sericulture Science, 2015, 41(4): 729-733.
- [14] 杨道伟. 丝素空白微球的制备 [J]. 药学研究, 2013, 32(10): 590-592.  
YANG Daowei. Preparation of silk fibroin blank microspheres [J]. Pharmaceutical Research, 2013, 32(10): 590-592.
- [15] 王鼎, 朱晶心, 陈松, 等. 以丝素蛋白微球为模板制备介孔 SiO<sub>2</sub> 空心微球 [J]. 化工新型材料, 2017(12): 216-220.  
WANG Ding, ZHU Jingxin, CHEN Song, et al. Preparation of mesoporous SiO<sub>2</sub> hollow microspheres using silk fibroin microspheres as template [J]. New Chemical Materials, 2017(12): 216-220.
- [16] SHAN J J, ZHEN-LEI D U, QING L I, et al. Application of ultrasonic in chemical industry [J]. Hebei Journal of Industrial Science & Technology, 2009, 26(2): 127-130.
- [17] PRITCHARD E M, KAPLAN D L. Silk fibroin biomaterials for controlled release drug delivery [J]. Expert Opinion on Drug Delivery, 2011, 8(6): 797-811.
- [18] GUESMI A, LADHARIN, SAKLI F. Ultrasonic preparation of cationic cotton and its application in ultrasonic natural dyeing [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2013, 20(1): 571-579.
- [19] 郭生伟, 王琪, 赵越. 超声辐照乳液聚合制备聚丙烯酸正丁酯空心微球 [J]. 高分子学报, 2009, 1(9): 891-895.  
GUO Shengwei, WANG Qi, ZHAO Yue. Preparation of polybutyl n - butyl acrylate hollow microspheres by ultrasonic irradiation emulsion polymerization [J]. Acta Polymerica Sinica, 2009, 1(9): 891-895.
- [20] 汪衍涛, 李翔龙, 刘一凡, 等. 电火花-超声复合加工法制备镍微球时非电工艺参数对镍微球尺寸的影响规律 [J]. 机械工程学报, 2015, 51(11): 195-200.  
WANG Yantao, LI Xianglong, LIU Yifan, et al. Effect of non - electrical process parameters on nickel microsphere size during preparation of nickel microspheres by electric spark-ultrasonic composite processing [J]. Journal of Mechanical Engineering, 2015, 51(11): 195-200.
- [21] 王伟华, 姜子涛, 李荣. 超声波辅助溶胶-凝胶法制备多孔微米级钛胶微球 [J]. 材料导报, 2013, 27(24): 53-57.  
WANG Weihua, JIANG Zitao, LI Rong. Preparation of porous micron titanium adhesive microspheres by ultrasonic - assisted sol-gel method [J]. Journal of Materials Review, 2013, 27(24): 53-57.
- [22] 王宗乾, 杨海伟, 王邓峰. 脱胶对蚕丝纤维的溶解及丝素蛋白性能的影响 [J]. 纺织学报, 2018(4): 69-76.  
WANG Zongqian, YANG Haiwei, WANG Dengfeng. Effects of degumming on the dissolution of silk fibroin and the properties of silk fibroin [J]. Journal of Textile Research, 2018(4): 69-76.
- [23] WANG Z, YANG H, LI W, et al. Effect of silk degumming on the structure and properties of silk fibroin [J]. Journal of the Textile Institute, 2018(6): 1-7.
- [24] 张雨青. 蚕丝脱胶方法的比较分析 [J]. 蚕业科学, 2002, 28(1): 75-79.  
ZHANG Yuqing. Comparative analysis of silk degumming methods [J]. Sericulture Science, 2002, 28(1): 75-79.
- [25] 吴章伟, 冯新星, 朱海霖, 等. 不同溶解体系的丝素蛋白分子质量及对再生丝素膜性能的影响 [J]. 蚕业科学, 2010, 36(4): 707-712.  
WU Zhangwei, FENG Xinxing, ZHU Hailin, et al. Molecular weight of silk fibroin in different dissolution systems and its effect on the properties of regenerated silk fibroin film [J]. Sericulture Science, 2010, 36(4): 707-712.
- [26] HAN Y, RADZIUK D, SHCHUKIN D, et al. Stability and size dependence of protein microspheres prepared by ultrasonication [J]. Journal of Materials Chemistry, 2008, 18(42): 5162-5166.