

柞蚕丝素溶解方法的研究

毕可贤 冷玉梅

(辽宁省丝绸公司丝绸科学研究所)

柞蚕丝素的溶解,是研究茧丝理化性能经常遇到的一个重要问题。因为只有首先把丝素溶解成溶液之后,才能进行丝素的分子量、等电点、C-末端、N-末端、结晶部分和非结晶部分以及其他一些物理化学性质的研究。1927年 Weimarn^[1]曾提出用浓厚中性盐水溶液的方法,1939年大森^[2]从制造再生蛋白质纤维工业应用角度研究出碱性铜溶解法,1947年 Coleman 和 Howitt^[3]又提出了铜乙二胺法,至今这种方法还广泛应用于生物化学和蛋白质化学研究上^[4]。

用硫氰酸锂、氯化钙、铜乙二胺等来溶解家蚕丝素,是行之有效的办法,已有许多文献报道。但是,这些方法应用在柞蚕丝素的溶解上,却不能达到令人满意的结果,有的甚至距全溶相差很远。本文通过上述几种方法对比试验之后,重点对铜乙二胺法加以研究改进,使柞蚕丝素的溶解达到了比较令人满意的结果。并经过一定试验,初步证明用这种改进后的方法溶解的丝蛋白的化学构造无破坏,从而解决了柞蚕丝素难溶解的问题,为今后其他一系列物理化学性质的研究创造了有

利条件。

一、试验材料和纯化方法

1. 材料 1980年辽宁省凤城产的秋柞蚕茧(*Antheraea pernyi*),青黄六号种鲜茧层。

2. 丝素的提纯

(1) 脱胶:茧层去掉茧衣,分成3~4层,称10克,加入含有5克/升肥皂的0.05克分子浓度碳酸钠溶液1000毫升中,在98℃经常搅拌下煮60分钟,再换新液同上反复抽提4~5次。每次搅拌中间,戴上胶皮手套轻轻揉擦1~2次,以帮助胶杂质从丝素上脱落,最后用温水洗净,绞干。

(2) 脱盐:将脱胶后的茧层放入1%盐酸200毫升中,在室温下浸60分钟,用温水洗净(使呈中性),绞干,在80℃下烘干,撕开备用。

(3) 脱色和脱油蜡质:将脱盐烘干的茧层放入70%甲醇300毫升中,在60℃下浸120分钟,绞干。然后放入无水乙醇300毫升中,在60℃下浸60分钟绞干。再浸入300毫

升丙酮中,在40℃下浸60分钟,绞干。最后浸入300毫升乙醚中,在室温下放60分钟,取出用吹风机吹干。

(4) 继续脱胶杂质:用丝素100倍的蒸馏水,在98℃下煮60分钟,反复数次,至无双缩脲反应为止。

二、不同溶解方法的对比试验

1. 铜乙二胺法

(1) 氢氧化铜的制备:称取12克化学纯氢氧化钠和38克结晶硫酸铜,分别溶解在少量蒸馏水中。然后在不断搅拌下,把氢氧化钠溶液加到硫酸铜溶液中。最后要注意不要使氢氧化钠过量,要在偏酸性时终止反应,否则容易产生大量黑色氧化铜。

为了提高制品纯度,将上述混合物的沉淀在抽滤瓶中减压过滤,再把沉淀返回杯中,加水洗后再过滤,反复3~4次,然后在抽滤漏斗上水洗若干次。取出放入 P_2O_5 干燥器中,数日后备用。

(2) 铜乙二胺溶液的配制:称取上述制备的氢氧化铜6.6克,加入约30毫升蒸馏水,使溶解后,加入乙二胺(99%)8.5毫升,充分搅拌溶解后加水至100毫升,用 G_3 或 G_4 细菌漏斗过滤备用。

(3) 丝素的溶解:精确称取丝素样品0.25克,放入50毫升烧杯中,加12.5毫升铜乙二胺溶液,在水浴(60℃)上,在经常搅拌中保温60分钟。取出冷却后,用10%醋酸缓慢地中和至pH 8.5~9.0。中和时溶解液最好用电磁搅拌器搅拌,如用人工搅拌,一定要充分,严防局部形成蛋白质凝块。此外,中和时由于该溶液颜色很深,无法识别终点,我们在同一批试验中取一样品,事先在ZD-2型自动电位计上边中和边测pH值,记取中和到pH 8.5~9.0时10%醋酸的耗用量,然后用此已知量对同批试验进行中和。

中和后的溶液装入透析袋中,用蒸馏水在冰箱中进行透析。开始时每小时换水一次,

三次后每2小时换一次水,再经3~4次后每4小时换一次水,直到18~20小时透析袋内呈浅黄色,透析液pH值低于7为止。

将透析液转移到小烧杯中,用事先称得恒重的过滤纸过滤,滤液收集于100毫升容量瓶中。用同体积50℃、pH 7.8、0.2克分子的磷酸盐缓冲液将透析袋中、杯中和滤纸上的沉淀顺次洗净,促使透析过程中产生的少量丝蛋白沉淀尽量重新溶解到溶液中去,最后把全部沉淀转到滤纸上。这时要把上下两部分分开,对下边的溶液用pH 7.8的0.1克分子磷酸盐缓冲液稀释到100毫升,以备酶解分析丝素结晶部分和非结晶部分用。对上部沉淀分别用温水1000毫升及冷水1000毫升洗净,除去溶剂中的磷酸盐。在105℃烘干,称得恒重,求出不溶物的百分含量。

2. 硫氰酸锂法

(1) 硫氰酸锂溶液的制备:称取化学纯硫氰酸铵63.5克,加20毫升蒸馏水搅拌溶解。然后,边搅拌边加入氢氧化锂34.8克(按等克分子比),在70~80℃水浴上赶氮(减压),用盐酸中和至pH 7,再用蒸馏水稀释到100毫升,得到约8.3克分子的硫氰酸锂浓溶液。

(2) 丝素的溶解:精确称取0.5克样品,加25毫升上述硫氰酸锂溶液,按所定温度、时间进行各种条件溶解试验。溶解液迅速过滤,用60℃温水1000毫升和冷水1000毫升先后洗净,用事先恒重的滤纸过滤,在105℃烘干到恒重,求出不溶物的百分含量。

3. 氯化钙溶解法

用氯化钙:水:乙醇=1:8:2克分子比组成的三体系混合溶剂进行丝素的溶解^{[5][6]}。溶剂用量同上述两种方法(为丝素的50倍),不溶物的测定也同上述两方法。

4. 微晶型纤维素薄层层析法

为对透析液进行有效的鉴别试验,首先必须使透析液具有较高的浓度。我们采用同样的一份样品,送入200毫升量筒中透析(上

述试验是在 2000 毫升中), 取第一次透析液(连续 4 小时以上), 并在旋转式真空薄膜蒸发仪上, 于 50~60℃ 浓缩至 20~30 毫升。点样时被检液和空白对照溶剂的色泽深浅应尽量一致, 然后按文献^{[7][8]} 分别进行微晶型薄层层析和聚酰胺薄膜层析。

三、各种方法的结果

1. 硫氰酸锂法溶解结果

硫氰酸锂法溶解柞蚕丝素效果很差, 我们只作了几个比较简单的试验, 就明显看出要用该法溶解柞蚕丝素是极为困难的, 结果见表 1、2。

表 1 不同时间的不溶物百分率

小时数	1	2	4	8
次数				
1	90.66	90.81	85.16	60.16
2	90.65	90.61	94.12	84.48
平均	90.66	90.71	89.64	72.32

注: 上述结果均在 60℃ 温度下取得。

表 2 提高温度的溶解结果

温 度	60℃		80℃		98℃	
	不溶物	溶解率	不溶物	溶解率	不溶物	溶解率
%	84.48	15.52	86.12	13.88	67.39	32.61

注: 溶解时间皆为 8 小时。

从表 1、2 可知, 该法在 98℃ 经 8 小时才能溶解柞蚕丝素 32.61%, 故不能作为柞蚕丝素的溶解剂。

2. 氯化钙法溶解结果

我们主要根据味泽昭义^[5] 选出的最佳条件进行试验, 结果见表 3。

表 3 氯化钙法不同温度的溶解结果

次 数	60℃		80℃		98℃	
	不溶物	溶解率	不溶物	溶解率	不溶物	溶解率
1	90.41	9.59	89.88	10.12	52.76	47.24
2	92.20	7.80	88.92	11.08	52.88	47.12
平均	91.30	8.70	89.40	10.60	52.82	47.18

从表 3 可知, 氯化钙法也不能适用。

3. 铜乙二胺法溶解结果

铜乙二胺法在溶解柞蚕丝素方面, 比上述两种方法效果都好, 在室温下三分钟就可把家蚕丝素全溶, 对柞蚕丝素也能溶解。但当用 10% 醋酸中和该溶液时, 立刻形成类似橡皮一样的凝块。这表明此方法虽能显示出较高的溶解能力, 但实际上仍无法应用, 看来要对此法的试验条件和操作方法加以研究改进, 方能适用于柞蚕丝素的溶解。

四、铜乙二胺法的改进试验

1. 溶解温度和时间的选择

我们将溶解时间从 30 分钟延长到 60 分钟, 温度逐步提高到 60℃, 结果见表 4、5。

表 4 不同时间的溶解结果

时间(分)	30	40	50	60
样品				
不溶物 1 (%)	4.12	1.64	0.84	0.28
不溶物 2 (%)	7.40	1.48	0.80	0.48
平均 (%)	5.76	1.56	0.82	0.38
丝素溶解率 (%)	94.24	98.44	99.18	99.62

表 5 不同温度的溶解结果

温度(℃)	30	40	50	60
样品				
不溶物 1 (%)	5.82	2.40	1.0	0.76
不溶物 2 (%)	—	—	1.0	0.44
不溶物 3 (%)	—	—	0.96	0.32
平均 (%)	5.82	2.40	0.97	0.51
丝素溶解率 (%)	94.18	97.60	99.03	99.49

从表 4、5 可知, 在 60℃、60 分钟条件下, 可得到最高的溶解率 99.5%, 剩余的 0.5% 不溶物可看作是丝素中不溶性杂质。

2. 中和对试验结果的影响

上述溶解率最高值, 绝不是仅通过温度和溶解时间的延长而取得的, 在铜乙二胺溶液的配制上也有所改变。如氢氧化铜的用量由 6 克增加到 6.6 克, 乙二胺由 8.0 毫升增加到 8.5 毫升。但必须设法防止已溶解的蛋

白质重新凝集沉淀析出。为此,我们在中和和透析操作中都作了些改进。如原法用 10%醋酸中和至 pH 7.0,现改中和至 pH 8.5~9.0,这样使溶液保持在微碱性中,在长时间透析时大大减少了蛋白质发生沉淀析出的可能。此外还摸索出中和时防止凝块产生的一些操作方法,这些都是相当重要的,如不注意掌握,同样会导致试验失败。

3. 透析法的改进

透析和中和这两步骤的着眼点不是在提高对丝素的溶解能力,而是在透析分离除去溶剂杂质的同时,如何防止或尽量减少已溶解的丝蛋白的重新聚集析出。为此,应采取两方面的措施:首先是缩短透析时间。由于规定了前述透析换水时间,可使透析时间由 48 小时降低到 20 小时,大大减少了丝蛋白沉淀析出的机会。其次是把不可避免地析出的少量蛋白质沉淀物,重新溶解到溶液中去。这里主要是增加了用 pH 7.8 的 0.2 克分子的磷酸盐缓冲液反复洗涤溶解沉淀析出物的方法(详见前述)。

总之,通过以上各种试验条件和操作方法的改进,使我们获得了比以往文献报道的方法高得多的柞蚕丝素的溶解率,达到了 99.5% 左右,不溶物仅有 0.4~0.6%。

4. 丝素是否降解的试验

关于用铜乙二胺法是否会导致柞蚕丝素部分降解或化学构造的破坏,试验如下。

所谓蛋白质化学结构遭到破坏,应该是指构成蛋白质大分子的主链骨架被破坏,也就是说,蛋白质的一级结构被切断,这样就必然要产生出一些小分子的短肽或游离氨基酸。因此,检查透析液中是否有短肽或游离氨基酸的存在,就可证明丝蛋白的化学结构是否被破坏。在用各种方法溶解的情况下,可能对蛋白质的高级结构如聚集形态构型等会发生一定程度的改变,但这与我们研究的问题并无关系,故这里不加讨论。我们主要采用现代生物化学上所常用的微晶型纤维素薄

层层析和聚酰胺薄膜层析法,对透析液中有无游离氨基酸和短肽,进行了反复检查,结果见图 1、2。

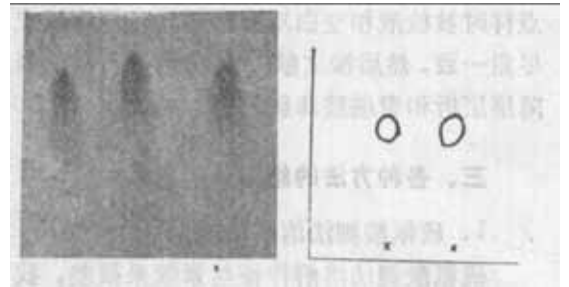


图1 纤维素薄层层析结果

图2 聚酰胺薄膜层析结果

图 1 为微晶型纤维薄层层析,中间为空白溶液(即铜乙二胺溶剂),两边为被检液,结果都显示出一个单一斑点,且 Rf 值相同,故可证明都是溶剂中乙二胺斑点。从聚酰胺薄膜层析法看,也得到了同上述方法一致的结果。左边为空白,右边为被检液,结果都只出现一个溶剂的单一斑点,可以证明没有游离氨基酸或短肽存在,因此对于这种改进后的铜胺法得到了肯定。

五、结 语

本文根据家蚕丝常用的几种溶解丝素的有效方法,对柞蚕丝素的溶解进行了各种试验,结果发现各种方法都不很理想,无法应用,于是在铜乙二胺法的基础上,进行了研究改进,得到了以下几方面的结果。

1. 柞蚕丝素对浓厚的中性盐溶液具有很强的抵抗力,在家蚕丝素基本全溶的情况下,柞蚕丝素的溶解率都很低。如硫氰酸铈法的溶解率仅达 32%,氯化钙·水·乙醇三体系混合溶解法的溶解率也只有 47%。

2. 铜乙二胺法虽比上述两方法显示出较高的溶解率,但中和后立即形成凝块(或大颗粒),实际上也失去了应用价值。但通过本试验研究改进后,可达到较为令人满意的结果,使柞蚕丝素的溶解率达到 99.5%,不溶物残渣仅为 0.5% 左右。其最适宜的溶解条

件为：

铜乙二胺溶液组成为氢氧化铜 6.6 克，乙二胺 8.5 毫升，加水至 100 毫升，丝素与溶剂之比为 1:50。溶解温度为 60℃，溶解时间为 60 分钟。与此同时，辅以适当的中和与透析等操作方法。

3. 经过微晶型纤维素薄层层析法和聚酰胺薄膜层析法检查，透析液中没有短肽或游离氨基酸存在，可证明溶解过程中丝素蛋白质的化学结构并没有被破坏。因此，此方法为柞蚕丝以及其他野蚕丝的化学结构和性质的研究创造了有利的条件。

参 考 资 料

- [1] Weimarn «大版工业试验所报告», 1927, 17.
- [2] 大森台三郎, «再生绢丝に関する研究», 1939, 纺织杂志社.
- [3] Cole-man, D and Howitt. F.O. Proc. R. Soc. London, 1947, A. 190, 245.
- [4] 业涤舒正, «続絹丝の构造», 1980.
- [5] 味沢昭义, «日本纤维学会志», 1968, 24, 2, 61~69.
- [6] 味沢昭义, «日本蚕丝学杂志», 1969, 38, 4, 340~346.
- [7] 王玉梅, «生物化学与生物物理进展», 1976, 3, 25.
- [8] 陈远聪等, «生物化学与生物物理进展», 1975, 1, 38~40.