

基于谷氨酰胺转胺酶催化交联的羊毛角蛋白成膜性能的研究

宫俊, 崔莉*, 范雪荣, 王强, 王平

(江南大学 生态纺织教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用谷氨酰胺转胺酶(TGase)催化羊毛角蛋白发生交联反应,探讨了酶用量、成膜溶液的pH值、温度、处理时间对羊毛角蛋白膜抗拉强度及断裂伸长率的影响,并考察了酶促交联反应对羊毛角蛋白膜在水中稳定性的影响。借助电泳(SDS-PAGE)对TGase催化羊毛角蛋白交联反应引起蛋白质相对分子质量的变化进行表征。研究结果表明,TGase催化羊毛角蛋白发生交联反应提高了其成膜的抗拉强度和稳定性,降低了膜的断裂伸长率。较好的工艺条件为:酶用量30 U/g角蛋白,成膜pH值为7.5,温度40℃,时间18 h左右。SDS-PAGE结果表明,羊毛角蛋白在TGase的催化作用下发生共价交联形成了相对分子质量更大的蛋白聚合物。

关键词: 谷氨酰胺转胺酶;羊毛角蛋白膜;机械性能

中图分类号: Q 55 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)06-0615-06

Study on Filming Performance of Wool Keratin with the Catalysis of Transglutaminase

GONG Jun, CUI Li*, FANG Xue-rong, WANG Qiang, WANG Ping

(Key Laboratory of Science and Technology of Eco-Textile of the Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, transglutaminase was adopted to catalyze wool keratin cross-linked and the effect of reaction conditions such as enzyme dosage, pH value of film-forming solution, temperature, treatment time on the mechanical properties of the film were determined. In addition, the effect of enzymatic cross-linking reaction on the stability of the wool keratin film in hot water was investigated. The keratin protein molecular change induced by TGase-mediated cross-linking was analyzed by SDS-PAGE. The results showed that, TGase-catalyzed preparation of keratin film could increase tensile strength and stability of water, but decrease the elongation. The optimum conditions were as follows: 30 U/g wool keratin of TGase, 40℃, pH 7.5 of film-forming solutions, 18 h of treatment time. SDS-PAGE result demonstrated that new biopolymers with higher molecular weight from wool keratin were formed by using TGase.

Key words: transglutaminase, wool keratin film, mechanical properties

收稿日期: 2011-04-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(51073073);江苏省自然科学基金项目(BK2009073);江南大学自主科研项目(JUSRP21002)。

* 通信作者: 崔莉(1972-),女,山西长治人,工学博士,副教授,主要从事生物技术应用研究。E-mail: cui_li_72@163.com

近年来,生物材料的研究日益受到人们的重视。角蛋白是自然界中最丰富的蛋白质之一,广泛存在于动物的毛发、鳞片、羽毛、角和蹄中^[1]。作为一类具有生物相容性和可生物降解性的材料,角蛋白在包装材料、生物医学^[2]、再生纤维材料等领域的应用研究逐渐引起了人们的兴趣。Timmons等^[3]在其专利中指出,使用氨水和巯基乙酸将头发还原制得角蛋白膜,可将其作为伤口敷料、组织细胞骨架使用。然而,再生角蛋白呈现较低的机械强度,通常需要使用交联剂(如甲醛、环氧树脂)来改善其机械性能^[4]。如陈华艳^[5]等在人发角蛋白中添加戊二醛作为交联剂,显著提高了角蛋白膜的机械强度。但由于化学交联剂的毒副作用,以及化学反应中往往存在能耗高、污染大等问题,使这种传统的改性方法越来越受到限制。

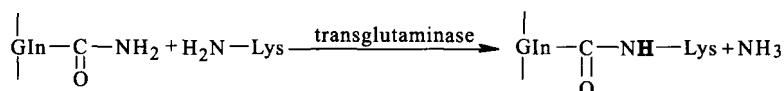


图1 TGase的催化交联反应

Fig. 1 TGase-catalyzed crossing-link reaction

作者以TGase为催化剂,研究了交联反应对羊毛角蛋白膜的机械性能的影响,并探讨了膜在水中的稳定性,同时借助电泳(SDS-PAGE)对TGase催化角蛋白交联反应引起产物相对分子质量的变化进行了表征。

1 材料与方法

1.1 实验材料

全毛华达呢:220 g/m²,无锡协新毛纺有限公司产品;谷氨酰胺转胺酶:酶活100 U/g,江苏一鸣生物制药有限公司产品。三氯甲烷、甲醇、亚硫酸氢钠、尿素、十二烷基硫酸钠SDS、丙三醇、氢氧化钠均为分析纯试剂。

1.2 实验仪器与设备

数显恒温水浴锅:HH-2,江苏金坛市荣华仪器制造有限公司产品;紫外分光光度计:WFZ UV-2802S,尤尼柯上海仪器有限公司产品;蛋白质电泳仪:BIO-RAD,美国;螺旋测微器:鑫量仪器科技(上海)有限公司产品;电子拉力试验机:Zwick-BZ25/TNIS,德国产品。

1.3 实验方法

1.3.1 羊毛角蛋白成膜溶液的制备 羊毛织物经

生物技术的应用在现代材料工业中发挥着越来越重要的作用,包括提高材料的应用性能、降低成本并且保护了环境。其中酶因其作用条件温和、高效率及高度的专一性而倍受人们的关注。谷氨酰胺转胺酶(Transglutaminase EC 2.3.2.13,简称TGase)是一种催化蛋白质分子间或分子内、蛋白质和氨基酸之间形成ε-(γ-谷氨酰基)赖氨酸共价键的转移酶(见图1),通过催化蛋白分子之间发生交联,形成更高分子量的聚合物,同时使蛋白的物理化学稳定性得到相应的提高。目前利用TGase的交联作用改变各类食品蛋白膜性质的研究很多也很深入,但尚未见TGase改性羊毛角蛋白材料的相关报道。羊毛角蛋白中谷氨酸含量达13.42%,赖氨酸含量达2.82%^[6],理论上可以作为TGase的作用底物。

水洗干燥后,用溶剂体积比为4:1的三氯甲烷和甲醇的混合液在索氏提取器中脱脂萃取5 h。称取萃取后的羊毛10 g,剪碎后放入200 mL含8 mol/L尿素、0.5 mol/L NaHSO₃、30 g/L的SDS溶液中,用5 mol/L的NaOH调节pH值至6.5,室温下静置2 h;在65℃恒温水浴振荡器中继续反应5 h,过滤。将所得滤液用截留分子量为12 000~14 000的渗析袋在去离子水中渗析3天,并浓缩至50 mg/mL^[7]。

1.3.2 羊毛角蛋白膜的制备 取一定量的角蛋白溶液,加入甘油、DTT质量浓度分别为15 g/L、10 mmol/L,并调节pH值至7.5,加入一定量的TGase,搅拌均匀,在水浴中保温反应一段时间,然后在85℃下放置10 min使酶失去活性,静置一段时间后,倒在衬有聚乙烯薄膜的玻璃板上,在室温下自然干燥24 h,揭膜,以不加TGase的膜作为对照。

1.3.3 TGase酶促反应不同条件的设计 用1 mol/L的NaOH调节质量浓度为5 g/dL的角蛋白溶液至不同pH值,加入一定量的TGase,搅拌均匀,在不同温度的水浴中保温反应一段时间,然后在85℃下放置10 min使酶失去活性,按照1.3.2

操作方法制膜,测定酶促反应条件对角蛋白膜机械性能的影响。

1.3.4 角蛋白膜的机械性能测定 将角蛋白膜裁成长度 $\times$ 宽度=100 mm $\times$ 10 mm的长条,放在温度为 $(23\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 $(50\pm 5)\%$ 的环境中平衡48 h以上,用螺旋测微器(精确到0.001 mm)测定每块样品5个不同位置的厚度,求其平均值。按ASTM(1991)标准方法D882测定羊毛角蛋白膜的抗拉强度和断裂伸长率。每种膜测10个样。

1.3.5 羊毛角蛋白膜的稳定性 准确称取30 mg在 70°C 和0.05 MPa的真空干燥器中干燥24 h的角蛋白膜,将其置于温度为 50°C 水溶液的密闭离心管中振荡2 h后,离心5 min。采用考马斯亮蓝法^[8]测定溶液中蛋白质的含量,以溶出蛋白质含量来评价角蛋白膜的稳定性。

1.3.6 TGase 催化羊毛角蛋白的 SDS-PAGE TGase 催化羊毛角蛋白形成的聚合物通过电泳(SDS-PAGE)来表征,电泳实验参照 Laemmli^[9]的方法,分离胶浓度为12 g/dL,浓缩胶浓度为5 g/dL。分别在0、3、6、9、12 h时取含有TGase的角蛋白溶液于样品缓冲液(0.125 mol/L, pH值6.8 Tris-HCL,体积分数2% SDS,体积分数5% 2-巯基乙醇,体积分数10%甘油)中充分混合,电泳前煮沸3~5 min,取6 μL 上样,以体积分数0.1%考马斯亮蓝R-250进行染色。

2 结果与分析

2.1 TGase 用量对羊毛角蛋白膜机械性能的影响

TGase 作为一种生物催化剂,其用量对角蛋白膜的机械性能应有较大的影响。不同酶用量对羊毛角蛋白膜的机械性能的影响如图2所示。

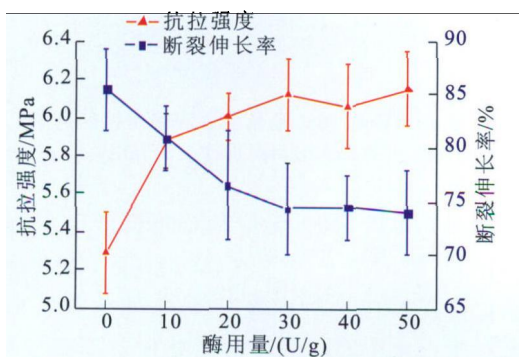


图2 TGase 用量对羊毛角蛋白膜机械性能的影响

Fig. 2 Effect of TGase dosages on the mechanical properties of wool keratin film

由图2可以看出,与对照膜相比,TGase 显著增加了羊毛角蛋白膜的抗拉强度,同时降低了断裂伸长率。该结果意味着 TGase 催化羊毛角蛋白发生了交联反应,从而在成膜过程形成了比对照膜更加致密的网络结构,改善了羊毛角蛋白膜的抗拉强度。当TGase的用量从10 U/g增加至30 U/g时,膜的抗拉强度比对照膜提高了11.2%~15.7%,同时断裂伸长率下降了5.3%~13.5%,表明蛋白的交联程度逐渐增加。随着酶用量的继续增加,抗拉强度和断裂伸长率趋于平缓。因此酶用量的选择为30 U/g角蛋白。

2.2 pH 值对羊毛角蛋白膜机械性能的影响

环境的pH值对酶活性影响较大,TGase 的最适pH值范围是6.0~7.5,在pH 5.0~8.5均具有较高的活性,低于4.0和高于9.0时极不稳定酶显著失活^[10-11]。pH值对TGase 催化羊毛蛋白交联引起角蛋白膜机械性能的变化如图3所示。

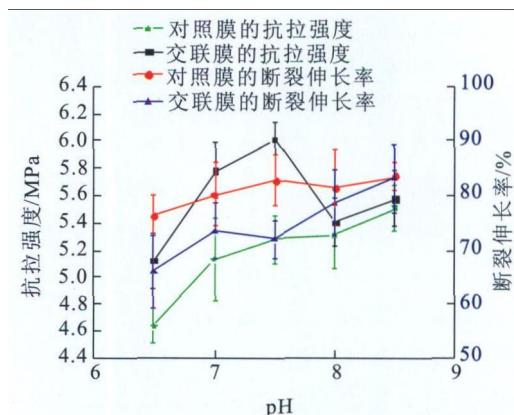


图3 成膜溶液的pH值对羊毛角蛋白膜机械性能的影响

Fig. 3 Effect of pH values on the mechanical properties of wool keratin film

由图3可以看出,成膜溶液pH值对对照膜的抗拉强度和断裂伸长率会产生一定的影响,二者均随着溶液中pH值的增加而增大。这是由于蛋白质的等电点为4.5~4.8,pH值较低时,溶液中会有部分蛋白质聚集沉淀。pH值越大,越偏离等电点,角蛋白在溶液中的溶解性越好,分散也越均匀,成膜的抗拉强度和断裂伸长率也越高。在pH值为6.5~7.5时,TGase 的催化作用使得膜的抗拉强度比对照膜提高了10.6%~13.8%,断裂伸长率比对照膜降低了8.5%~13.43%。当pH值高于7.5时,

酶活较低,酶催化作用较弱,所以交联膜与对照膜相比机械性能无明显变化。因此 TGase 催化羊毛角蛋白成膜的 pH 值为 7.5。

2.3 温度对羊毛角蛋白膜机械性能的影响

酶是一种具有生物活性的蛋白质,在一定的范围内,温度越高,酶催化反应速率越快,同时酶因变性失活的速度也越快。已知所用 TGase 的最适温度在 30~50℃,在此范围内不同处理温度对羊毛角蛋白膜机械性能的影响结果如图 4 所示。

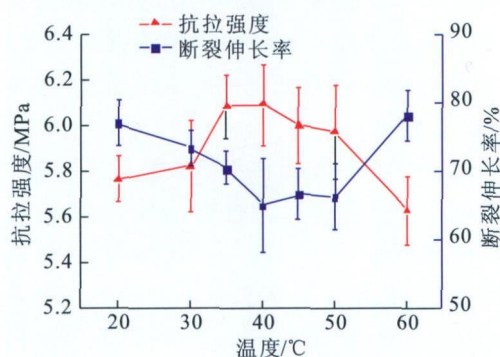


图 4 温度对羊毛角蛋白膜机械性能的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the mechanical properties of wool keratin film

由图 4 结果可以看出,当温度从 20℃ 升高至 40℃,交联膜的抗拉强度逐渐增加,断裂伸长率逐渐下降,表明 TGase 随着温度的缓慢升高,酶的催化活性逐渐增加,蛋白的交联程度也随着增强。随着温度的继续升高,交联膜的机械性能逐渐下降,意味着随着温度的升高,酶的反应活性虽然增加,同时因为高温而导致酶的变性失活速度也加快,因此蛋白之间的交联程度逐渐下降。因此 TGase 催化羊毛角蛋白成膜的适宜温度为 40℃。

2.4 酶促反应时间对羊毛角蛋白膜机械性能的影响

羊毛角蛋白的分子组成比较复杂,酶促反应的进行不及其它种类的食品蛋白容易,因而 TGase 催化羊毛角蛋白交联反应是一个较为缓慢的过程,需要较长时间才能达到平衡,因此反应时间直接影响蛋白成膜过程中蛋白分子之间的交联程度,酶促反应时间对羊毛蛋白膜物理机械性能的影响如图 5 所示。

从图 5 可以看出,酶处理时间为 0~3 h 时,膜的抗拉强度和断裂伸长率并无明显变化,而酶处理时间增加到 12 h 时,抗拉强度快速提高,增加了 15%,断裂伸长率下降了 26.8%。当酶处理时间为 18 h 时,角蛋白膜的抗拉强度继续缓慢增大至 6.09

MPa,并达到最大值,断裂伸长率下降至最低。继续延长反应时间,抗拉强度和伸长率趋于平缓,并无明显变化。这可能是因为羊毛角蛋白含有大量的二硫键,其空间结构较为紧密, TGase 与羊毛角蛋白中的催化活性位点(Lys 和 Gln 残基)需要经历一个结合过程^[12]。当酶促反应到一定时间时,反应趋于平衡,羊毛角蛋白膜的机械性能不再有明显的变化。因此 TGase 催化羊毛角蛋白的反应时间为 18 h 左右。

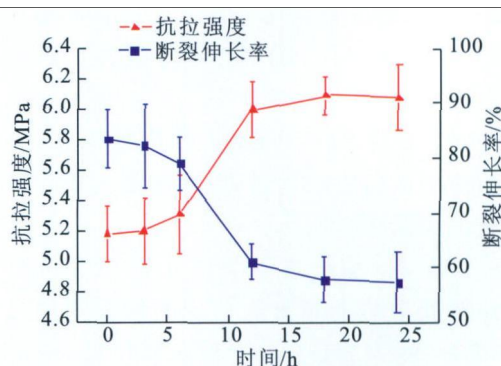


图 5 处理时间对羊毛角蛋白膜机械性能的影响

Fig. 5 Effect of treatment time on the mechanical properties of wool keratin film

2.5 TGase 处理对羊毛角蛋白膜水稳定性的影响

蛋白膜的水稳定性是决定其应用性能的一个重要因素, TGase 的酶促反应对羊毛角蛋白膜在热水中的稳定性的影响如图 6 所示。

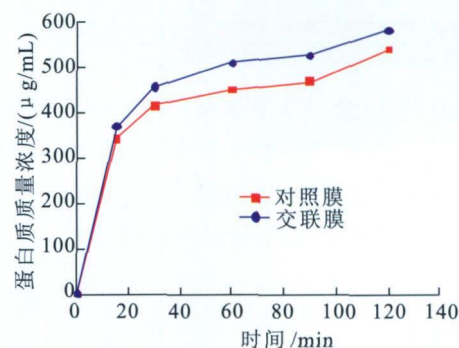


图 6 TGase 对羊毛角蛋白膜稳定性的影响

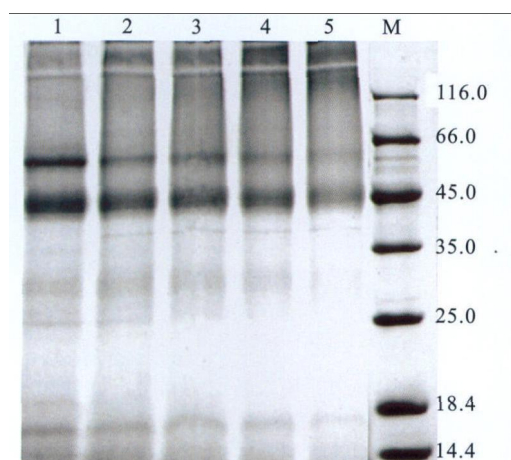
Fig. 6 Effect of TGase-treated on the stability of wool keratin film

由图 6 可以看出,无论是对照膜还是 TGase 交联膜在 50℃ 的热水中放置 30 min 后,都有一定浓度的蛋白质溶出。然而经 TGase 催化交联形成的角蛋白膜在水中溶出的蛋白质要比对照膜低 6.8%~11.2%,这可能主要有两方面的原因:一方面酶

的催化交联降低了蛋白质中某些氨基酸(Lys 和 Gln)残基的亲水性,因而交联的角蛋白膜具有较高的水稳定性;另一方面是经 TGase 催化交联的角蛋白具有比对照更高的蛋白分子量,而高分子的蛋白质具有较高的稳定性,因此,交联的羊毛角蛋白膜在水溶液中的溶解性要比对照膜差。

2.6 TGase 对羊毛角蛋白交联的 SDS-PAGE 分析

采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)考察了 TGase 催化溶液中的羊毛角蛋白交联前后蛋白质分子量的变化情况,结果如图 7 所示。



(1-5 分别代表在 0、3、6、9、12h 所取的样品,M 代表标准蛋白分子量)

图 7 TGase 催化羊毛角蛋白交联的 SDS-PAGE 图

Fig. 7 SDS-PAGE profiles of wool keratin proteins cross-linked by TGase

由图 7 可以看出,随着催化反应时间的延长,相对分子质量较低的蛋白组分含量不断下降,相对高分子质量的蛋白聚合物含量不断增加,聚合物由于分子量的增加而滞留在分离胶上部,有些聚合物甚至聚集在浓缩胶与分离胶的界面而不能进入分离胶,由于 SDS-PAGE 是在变性剂 β -巯基乙醇和 DTT 存在下进行的,可以确定新出现的聚合物是通过二硫键以外的共价键聚合的,而不是其它非共价键所致。因此,羊毛角蛋白是 TGase 催化的良好底物,这与 TGase 处理后的羊毛角蛋白膜的抗拉强度和稳定性得到显著提高相一致。

3 结 语

1)TGase 催化交联的羊毛角蛋白成膜的较好条件为:酶用量 30 U/g 角蛋白、成膜 pH 值 7.5、温度 40 °C、时间 18 h 左右。

2)TGase 催化羊毛角蛋白发生交联反应一定程度上改善了角蛋白膜的物理机械性能,其中抗拉强度增加了 10%~15%,断裂伸长率降低了 13%~26%,同时交联后的羊毛角蛋白膜在热水中的稳定性得到了一定程度的提高,溶解率下降 11%左右。

3)SDS-PAGE 电泳分析显示,TGase 可以催化羊毛角蛋白发生共价交联反应形成聚合物。

参考文献(References):

- [1] Toshizumi Tanabe, Naoya Okitsu, Akira Tachibana. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film [J]. *Biomaterials*, 2002, 23:817-825.
- [2] 刘伟,于伟东. 羊毛角蛋白作为生物医用材料的研究进展[J]. *材料导报*, 2005, 19(9):111-113.
Liu Wei, Yu Wei-dong. Research progress in wool keratin as biomedical materials[J]. *Materials Review*, 2005, 19(9):111-113. (in Chinese)
- [3] Timmons S F, Smitl R A. Porolls and bulk keratin bio-polymers [P]. 美国专利:US Patent, 6159495, 2000-12-12.
- [4] A Aluigi, M Zoccola, C Vineis. Study on the structure and properties of wool keratin regenerated from formic acid [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007, 41:266-273.
- [5] 陈华艳,黄绵延,王宇新. 头发角蛋白塑料的制备和力学性能研究[J]. *中国塑料*, 2006, 20(10):31-35.
Cheng Hua-yan, Huang Mian-yan, Wang Yu-xin. Preparation and mechanical properties of keratin plastics from hair [J]. *China Plastics*, 2006, 20(10):31-35. (in Chinese)
- [6] Cortez J, Bonner Phillip L R, Griffin M. Application of transglutaminase in the modification of wool textile [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2004, 34(1): 64-72.

- [7] Toninl C, Aluigi A, Vineis C, et al. Thermal and structural characterization of poly (ethylene-oxide) /keratin films [J]. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2007, 89: 601—608.
- [8] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. **Anal Biochem**, 1976, 76: 248—50.
- [9] Laemmli U k. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage [J]. **Nature (London)**, 1970, 227: 680—685.
- [10] 姜燕, 唐传核, 温其标. 工艺条件对酶法改性大豆蛋白膜性能的影响 [J]. 食品与生物技术学报, 2009, Vol. 28. No. 1. Jiang Yan, Tang Chuan-he, Wen Qi-biao. Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, Vol. 28. No. 1. (in Chinese)
- [11] Ho M L, Leu S Z, Hsieh J F, et al. Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from streptovorticillium ladakanum [J]. **Food Science**, 2000, 65: 76—80.
- [12] 唐传核, 杨晓泉, 陈中. 微生物转谷氨酰胺酶 (MTGase) 的蛋白质底物催化特性及其催化机理研究 [J]. 食品科学, 2003, Vol. 24, No. 5. Tang Chuan-he, Yang Xiao-quan, Chen Zhong. Study on catalytic characteristics and mechanism of microbial transglutaminase (MTGase) polymerization of protein substrate [J]. **Food Science**, 2003, Vol. 24, No. 5. (in Chinese)

科技信息

研究称大量摄入垃圾食品会致人上瘾类似毒品

医学研究显示,垃圾食品受到人们青睐,是因为它们就像诱人上瘾的毒品,会驱使大脑产生刺激食欲的化学作用。报道称,刊登在最新一期医学期刊《自然神经科学》的研究报告说,研究人员在啮齿类动物对垃圾食品反应的实验中发现,垃圾食品会让大脑产生如服用海洛因和可卡因之后的反应。

研究人员发现,喂食老鼠垃圾食品,老鼠因而养成强迫进食习惯,类似毒瘾者对于吸食毒品的反应。不停吃喝垃圾食品的老鼠,久而久之体重增加且活力降低。报告说,这项实验足可解释,为何食品制造商总是在产品中调配许多的糖、盐及人工添加物。

研究发现,对垃圾食品上瘾的老鼠,体内巴胺乙型受体的数量减少。先前研究显示,这种受体的减少与毒品上瘾有密切关联。报告说,大量摄入垃圾食品将导致大脑的“奖励回路”产生染上毒瘾般的神经适应反应,使实验鼠养成强迫饮食的习惯。

非政府组织欧洲公共卫生联盟表示,部分欧盟国家如丹麦、法国、匈牙利,已施行对垃圾食品课税的措施,值得其他国家效法。

[信息来源]中国新闻网. 研究称大量摄入垃圾食品会致人上瘾 类似毒品 [EB/OL]. (2012-5-9). <http://www.chinanews.com/gj/2012/05-09/3876212.shtml>.

欧盟食品安全局发布牛乳铁蛋白的科学意见

应欧盟委员会的要求,5月24日欧盟食品安全局饮食产品、营养与过敏专家组发布了针对牛乳铁蛋白 (Bovine Lactoferrin, BLf) 的科学意见。

牛乳铁蛋白是一种天然存在于牛奶中的蛋白质。欧盟委员会拟将其作为食品补充剂、婴儿配方、特殊医用和运动营养食物等的原料。专家组认为,1岁以下的婴儿以及19岁以上的成人所摄取的牛乳铁蛋白的量低于安全限量,按照推荐的使用范围与使用量的要求,摄取新型食品配料牛乳铁蛋白不会对人体健康产生负面影响。

[信息来源]EFSA. Scientific Opinion on bovine lactoferrin [EB/OL]. (2012-5-24). <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2701.htm>.