

文章编号:1673-1689(2009)06-0811-05

MTG 酶催化羊毛固定化溶菌酶及其抗菌性能

黄栋, 崔莉, 王强, 王平, 范雪荣*

(江南大学生态纺织教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用新型的生物催化剂微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)催化溶菌酶在羊毛织物上的固定化。通过 SDS-PAGE 方法研究了溶菌酶作为 MTG 催化底物的可行性,探讨了影响溶菌酶在羊毛上的固定化因素以及固定化后羊毛织物耐洗稳定性和抗菌性能。结果表明:羊毛织物在预处理后采用 MTG 催化可以实现溶菌酶的固定化,其中高锰酸钾预处理赋予了较好的固定化效果。实验得出的固定化条件为:溶菌酶用量 2 g/L,固定化 pH 值 7.0,固定化时间 8 h,MTG 用量 20 U/g,在此条件下得到的固定化溶菌酶羊毛织物较吸附固定法具有更好的耐水洗稳定性及抗菌效果。

关键词: MTG;羊毛;固定化;溶菌酶;抗菌

中图分类号:TS 131.9

文献标识码:A

Immobilization of Lysozyme Catalyzed by MTG on the Wool and Antibacterial Action

HUANG Dong, CUI Li, WANG Qiang, WANG Ping, FAN Xue-rong*

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

Abstract: A new biocatalysts(MTG) was employed in this research to immobilize lysozyme on the wool fabrics. Based on the feasibility by SDS-PAGE which MTG was able to catalyze lysozyme, the research discussed the immobilizing conditions as well as the washing stability and the antibacterial action. The result was that lysozyme can be immobilized in the wool which was pretreated by chemical agents, particularly potassium permanganate. The immobilizing conditions defined by this research as follows: 2 g/L lysozyme, pH value 7.0, immobilizing for 8 h with the MTG 20 U/g. In these conditions the wool would obtain better washing stability and antibacterial action than that immobilized only by adsorption.

Key words: MTG; wool; immobilization; lysozyme; antibacterial

由于羊毛是一种蛋白质纤维,在适宜的温度和湿度下会成为细菌和真菌生长的合适媒介。因此,针对羊毛织物的抗菌整理研究逐渐趋于热门。目

前开发的抗菌整理剂主要包括无机、有机和天然抗菌剂 3 大类^[1]。传统的抗菌剂虽然抗菌效果较好,但是随着人们环保和自身安全意识的提高,近年来

收稿日期:2008-12-07

基金项目:国家 863 计划项目(2008AA02Z203)。

* 通讯作者: 范雪荣(1963-),男,江苏常熟人,教授,博士生导师,主要从事纺织品生态加工技术方面的研究。

Email: wxfxr@163.com

在食品、医疗领域广泛应用的溶菌酶,以其安全有效的抗菌性能逐渐得到人们的青睐,目前已有报道将其应用于羊毛织物的抗菌整理^[2]。

作为一种碱性球蛋白,溶菌酶(Lysozyme)能有效地切断肽聚糖中N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸之间的 β -1,4糖苷键之间的联结,破坏肽聚糖支架,从而引起细菌裂解,达到抗菌效果^[3]。目前溶菌酶固定化的方法主要有吸附法和化学交联法^[2,4-5]。吸附法主要是利用离子键以及分子间作用力使溶菌酶大分子与羊毛结合,操作简单但是耐洗涤性差;化学交联法则是通过交联试剂(主要是戊二醛等)在溶菌酶和羊毛之间形成共价键,能有效地提高酶与纤维间的结合力,但戊二醛交联容易造成羊毛织物泛黄且对酶活有一定损伤。因此,研究人员一直在寻找新型的固定化方法。

2004年,Cortez J等人报道了通过谷氨酰胺转胺酶(Transglutaminase)的催化作用可以将带有荧光的1,5-戊二胺引入羊毛纤维,首次证实了在羊毛角蛋白上存在能够与伯胺发生交联反应的作用位点^[6],这使MTG酶应用于蛋白质纤维材料的改性成为可能。

作者首次采用微生物谷氨酰胺转胺酶(Microbial Transglutaminase,简称MTG)作为生物催化剂^[7],利用其能催化蛋白质中谷氨酰胺(Gln)和赖氨酸(Lys)残基之间交联的作用,在经过一定预处理的羊毛织物上对溶菌酶进行固定化,从而克服传统固定化方法中固定化酶耐洗性差和织物泛黄等缺点,为羊毛织物的生物法功能化改性提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 织物 全毛华达呢(220 g/m²),无锡协新毛纺有限公司产品。

1.1.2 试剂 蛋清溶菌酶:酶活20 000 U/mg,广西庞博生物工程有限公司产品;微生物谷氨酰胺转胺酶(MTG):酶活100 U/g,江苏一鸣生物制药有限公司产品;微球菌粉:南京建成生物工程研究所生产;三羟甲基氨基甲烷(Tris),四甲基乙二胺(TEMED),N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(Bis),十二烷基硫酸钠(SDS),考马斯亮蓝R-250;其余试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器

EPS301型电泳仪,BIO-RAD凝胶成像及分析系统;UV-2802S型紫外可见分光光度计;PL203

型电子天平;pHs-2C型酸度计;WHYF-2F恒温水浴振荡器。

1.3 实验方法

1.3.1 SDS-PAGE 表征 MTG 对溶菌酶的交联反应 取浓度为1%的溶菌酶溶液,加入MTG酶量为20 U/g溶菌酶,在37℃下反应一定时间后取出,经离心后与SDS-聚丙烯酰胺凝胶样品缓冲液混合,进行凝胶电泳。分离胶质量浓度为12 g/dL,浓缩胶质量浓度为5 g/dL,电泳前将样品煮沸5 min,上样量为10 μ L,凝胶电泳于20 mA恒流下进行,时间1.5 h,用0.4%的考马斯亮蓝R-250染色。脱色后于凝胶成像系统进行成像处理。

1.3.2 羊毛预处理

1)高锰酸钾预处理:织物热水浸渍 \rightarrow 高锰酸钾氧化(KMnO₄ 4%,JFC 1 g/L,pH 4.0,40℃、30 min,浴比1:20) \rightarrow 皂洗(45℃、15 min) \rightarrow 中和清洗(纯碱2%) \rightarrow 清水冲洗 \rightarrow 烘干(50℃) \rightarrow 脱色(NaHSO₃ 6%,HAc 1%,40℃、30 min,浴比1:20) \rightarrow 冲洗 \rightarrow 烘干待用。

2)亚硫酸钠预处理:织物浸渍还原液(Na₂SO₃ 3%,pH 8.0,40℃、45 min,浴比1:30) \rightarrow 水洗烘干待用。

3)双氧水预处理:织物热水浸渍 \rightarrow 双氧水氧化(H₂O₂ 30 mL/L,Na₂SiO₄ 4 g/L,Na₂CO₃ 0.2%,pH 8.5,50℃、60 min,浴比1:25) \rightarrow 清水冲洗 \rightarrow 烘干待用。

1.3.3 固定化溶菌酶的制备 称取一定量溶菌酶,用0.1 mol/L、pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液配置成一定浓度的酶溶液。把经过预处理的羊毛织物剪成直径为1 cm的圆片,并准确称取0.5 g浸渍于上述酶液中,同时加入20 U/g织物的MTG,在37℃下反应一定时间。取出羊毛试样并用磷酸盐缓冲溶液充分清洗,室温晾干后于4℃下保存备用。对照试样反应体系中不含MTG,其它工艺相同。

1.3.4 固定化溶菌酶耐洗稳定性 取固定化溶菌酶后的羊毛试样,恒温水浴振荡器中于37℃洗涤5次,每次洗涤15 min,转速150 r/min,每次洗涤后的织物室温晾干并进行酶活测定,以未洗涤固定化酶试样的酶活为相对酶活100%。

1.3.5 溶菌酶活力测定

1)游离酶活力测定:采用改进舒加法(Shugar)测定游离酶的酶活力^[8]:

$$\text{溶菌酶活力(U/mg)} = \frac{\Delta OD_{450}}{0.001 \times \text{样品量}}$$

式中: ΔOD_{450} :微球菌液在450 nm处60 s内吸光度

变化值;样品量:0.5 mL 酶液中溶菌酶的毫克量。

2) 固定化酶活力测定

固定化溶菌酶活力单位定义为每平方米羊毛织物每分钟使 ΔOD_{450} 下降 0.001 为一个酶活力单位^[9] (25 °C, pH 6.24):

$$\text{固定化溶菌酶活力 (U/cm}^2\text{)} = \frac{\Delta OD_{450} \times 1\,000}{S}$$

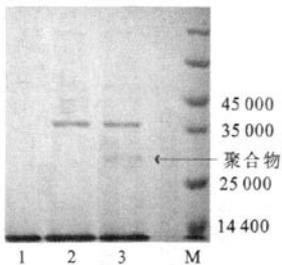
式中: ΔOD_{450} 为微球菌液在 450 nm 处 60 s 内吸光度变化值;S 为加入羊毛织物的面积(cm^2);

1.3.6 抗菌性能测试 采用振荡烧瓶法进行抗菌性能测试^[10]。实验菌种为金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌代表, ATCC6538 *Staphylococcus aureus*), 结果用数码相机拍照。

2 结果与讨论

2.1 MTG 催化溶菌酶交联反应

实验采用的蛋清溶菌酶是一种小分子球状蛋白质,结构紧密,分子中存在 4 个—S—S—键,从而使 MTG 不易接近其催化活性部分谷氨酰胺(Gln)和赖氨酸(Lys)残基,所以催化蛋清溶菌酶蛋白应是一个缓慢的过程。为了说明溶菌酶分子是 MTG 的催化底物,作者首先采用 SDS-PAGE 表征了溶菌酶自身的酶促交联反应,结果见图 1。



1. 溶菌酶; 2. 溶菌酶与 MTG 混合 0 h; 3. 溶菌酶与 MTG 混合反应 24 h; M. 标准蛋白质

图 1 MTG 催化溶菌酶分子交联的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of Lysozyme incubated with MTG

由图 1 可以看出,溶菌酶相对分子质量约为 15 000,反应体系中由 MTG 催化形成的溶菌酶蛋白聚合物(相对分子质量约为 30 000),由于相对分子质量的增加而被滞留在分离胶中溶菌酶分子的上部。因为 SDS-PAGE 是在变性剂(巯基乙醇)存在的条件下进行的,于是可确定新出现的聚合物是通过共价键聚合的,而不是其它非共价键所致。

2.2 预处理条件对溶菌酶固定化的影响

羊毛纤维表面以共价键形式结合的类型层的存在不仅使羊毛具有很强的疏水性,也严重影响了亲水性溶菌酶的吸附以及 MTG 的催化作用。为了

促进 MTG 的催化作用,提高溶菌酶的固定化效果,作者研究了羊毛不同预处理方法对固定化溶菌酶活性的影响,结果见图 2。

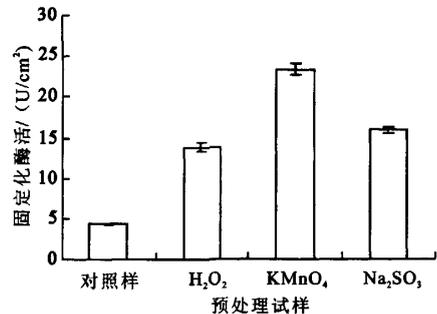


图 2 预处理对羊毛固定化溶菌酶影响

Fig. 2 Effect of wool pretreatment on lysozyme immobilization

由图 2 可知,所选用的几种预处理方法均不同程度地提高了溶菌酶在羊毛上的固定化效果,相对于双氧水和亚硫酸钠来说,高锰酸钾预处理对溶菌酶的固定化酶活影响最大,经过高锰酸钾预处理后羊毛织物的固定化酶活性由未经预处理试样的 4.3 U/ cm^2 增加至 23.3 U/ cm^2 。这是因为高锰酸钾处理过程更为剧烈,在酸性条件下对羊毛表层的破坏作用比较明显,对类脂层的去除能力较强,可以大大地改善纤维的亲水性,从而有利于溶菌酶在羊毛表面的吸附;同时,纤维表面亲水性的改善及纤维蛋白层的暴露有助于 MTG 发挥催化作用,从而促进附着在羊毛表面的溶菌酶与羊毛蛋白之间形成共价交联。因此,后续实验均选择高锰酸钾的预处理条件。

2.3 缓冲溶液 pH 值对溶菌酶固定化的影响

在酶固定化过程中,由于酶和固定化载体都存在于缓冲溶液中,而缓冲液的 pH 值可以改变酶分子和纤维载体的离子化状态。同时酶作为一种蛋白质,当溶液的 pH 值超过一定范围时,微观结构会发生变化而引起酶的失活,因此缓冲液 pH 值是影响酶固定化的关键因素之一。在不同 pH 值的缓冲液中固定化溶菌酶,并测定其酶活,结果见图 3。

由图 3 可以看出,在 pH 6~8 范围内得到的固定化酶活力较高,pH 值为 7 时,固定化溶菌酶活力可达到 20.2 U/ cm^2 。其中一方面可能是由于游离 MTG 在 pH 为 6~8 范围内具有较高的酶活,这将提高其对溶菌酶的催化效率;另一方面,在固定化过程中,不同的 pH 值可以改变羊毛带电状态,使溶菌酶和羊毛之间的微环境改变,作为碱性蛋白质的溶菌酶可以在此 pH 6~8 范围内最大程度地聚集在羊毛表面,提高了溶菌酶在羊毛上的固定化数量。

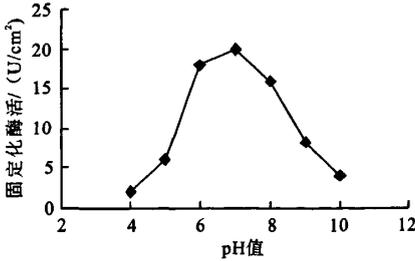


图 3 缓冲溶液 pH 值对固定化酶活的影响

Fig. 3 Effect of the buffer pH on activities of immobilized lysozyme

2.4 初始溶菌酶质量浓度对固定化酶活的影响

选取 MTG 的用量为 20 U/g, 研究不同溶菌酶初始浓度对固定化效果的影响, 结果图 4。

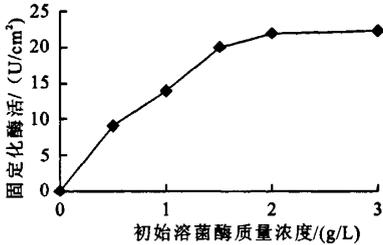


图 4 溶菌酶质量浓度对固定化酶活的影响

Fig. 4 Effect of lysozyme concentration on activities of immobilized lysozyme

固定化溶菌酶的活性随着初始酶质量浓度的增加而提高。当酶质量浓度达到 2 g/L 时, 固定化酶活达到 21.2 U/cm²。这是因为固定化时加入的溶菌酶越多, 由溶液向载体表面聚集的酶就越多, 从而羊毛载体上固定的酶活力越大。当初始酶质量浓度超过 2 g/L 时, 固定化酶活没有继续上升, 表明在此用量下, 酶在羊毛表面的结合位点已达饱和。

2.5 固定化时间对溶菌酶固定化的影响

MTG 催化溶菌酶交联是一个缓慢的过程, 所以固定化时间对于其在羊毛上的固定化是一个重要的因素。

由固定化时间对溶菌酶固定化效果的影响结果见图 5。在固定化的初始阶段, 固定化溶菌酶活性随着时间的延长而上升, 固定化时间为 8 h 时, 酶活达到最大值, 并且在 6~12 h 内保持相对较高的酶活, 之后酶活开始下降。这说明 MTG 的催化反应过程缓慢, 需要一定的反应时间将附着在羊毛表面的溶菌酶分子与羊毛角蛋白之间形成共价键, 提高固定化效率, 但当时间超过 8 h 后, 溶菌酶可能由于变性失活, 使得固定化酶的活性逐步下降。因此, 固定化时间以 8 h 为宜。

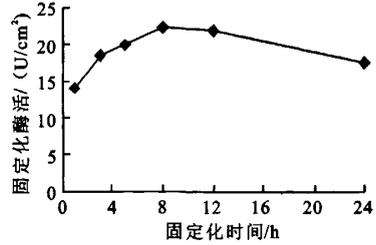


图 5 固定化时间对固定化酶活的影响

Fig. 5 Effect of the immobilized time on activities of immobilized lysozyme

2.6 固定化溶菌酶的耐洗稳定性

在羊毛织物表面通过吸附作用结合的溶菌酶, 主要是通过分子间作用力结合, 水洗稳定性较差。作者利用 MTG 酶催化酰胺基与伯胺基的交联反应在溶菌酶与羊毛蛋白之间形成稳定的共价键(Gln-CO-NH-Lys)来实现溶菌酶的固定化, 因此在理论上具有更好的水洗稳定性。

图 6 结果表明, 羊毛织物上通过吸附作用和 MTG 的催化作用形成的固定化溶菌酶具有不同的耐洗稳定性。经过 5 次洗涤, 由吸附得到的固定化溶菌酶大部分从羊毛脱落, 酶活保持率仅剩 30% 左右, 而在 MTG 催化条件下得到的固定化酶活保持率则大于 55%。可见, MTG 的催化作用能改善溶菌酶在羊毛载体上的固定化, 使其具有更好的耐水洗稳定性。

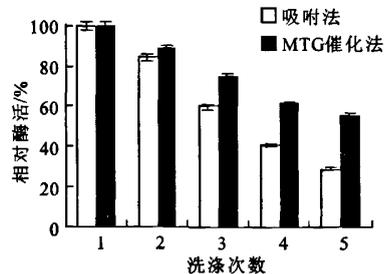


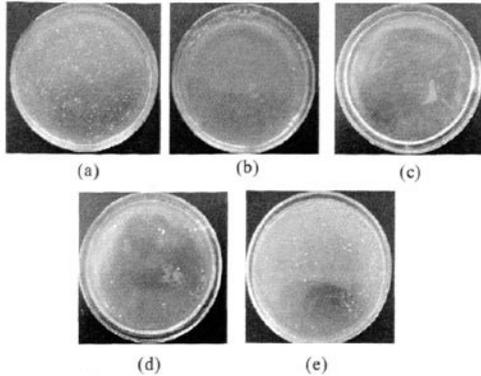
图 6 MTG 作用对固定化溶菌酶耐洗性影响

Fig. 6 Washing stability of immobilized lysozyme by MTG

2.7 抗菌性能测试

采用振荡烧瓶法对最佳工艺条件下固定溶菌酶的羊毛织物进行抗菌性能测试, 实验菌种为金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌代表, ATCC6538 *Staphylococcus aureus*), 结果见图 7。

从图 7 中金黄色葡萄球菌菌落生长情况可以看出, 没有经过任何处理的羊毛织物金黄色葡萄球菌菌落生长明显(见图 7a), 而通过 MTG 催化作用固定溶菌酶的羊毛织物和通过吸附作用结合溶菌酶的羊毛织物都体现出较好的抗菌效果, 表现为羊



a. 未处理; b. MTG 催化法固定; c. 吸附法固定化; d. MTG 催化法固定且经 5 次洗涤样; e. 吸附法固定且经 5 次洗涤样

图 7 羊毛织物抗菌效果

Fig. 7 The phenomenon of the antibacterial effect of wool fabric

毛织物上菌落稀少(见图 7b, c),可见固定在织物上的溶菌酶赋予了羊毛较好的抑菌效果。在经过多次洗涤后,通过吸附作用固定溶菌酶的羊毛织物细菌数目(图 7d)明显多于通过 MTG 催化溶菌酶

固定后的试样(图 7e)。这是因为溶菌酶通过 MTG 的催化作用,与羊毛之间形成了稳定的共价键结合。而通过离子键以及分子间作用力固定化的溶菌酶在经过多次洗涤后,溶菌酶脱落严重,因此抑菌效果相对较差。可见,在羊毛载体固定化溶菌酶过程中引入 MTG 酶可以改善其抗菌性能。

3 结 语

1) 利用 SDS-PAGE 表征了溶菌酶是 MTG 催化的底物,其酶促反应是一个缓慢的过程。

2) 预处理对 MTG 催化羊毛织物固定化溶菌酶影响显著,其中,高锰酸钾预处理对固定化效果最佳。羊毛织物作为载体在经过高锰酸钾预处理之后固定了溶菌酶,其固定化条件为:溶菌酶用量 2 g/L,固定化 pH 为 7.0,时间 8 h,MTG 用量 20 U/g。

3) 通过 MTG 催化得到的固定化溶菌酶羊毛织物比吸附法具有更好的耐水洗稳定性,织物经过 5 次洗涤后仍然能有效地抑制金黄色葡萄球菌菌落生长。

参考文献(References):

- [1] 商成杰,邹承淑,张洪杰. 国内外织物抗菌卫生整理的进展[J]. 印染助剂, 2003, 20(5): 1-4.
SAHNG Cheng-jie, ZOU Cheng-shu, ZHANG Hong-jie. Advances in antibacterial and hygienic finishing of fabrics[J]. *Textile Auxiliaries*, 2003, 20(5): 1-4. (in Chinese)
- [2] 胡英俊,范雪荣,王强,等. 羊毛织物的固定化溶菌酶抗菌整理[J]. 印染, 2008, 34(9): 8-10.
HU Ying-jun, FAN Xue-rong, WANG Qing, et al. Anti-bacterial finish of wool fabric by immobilized lysozyme[J]. *Dyeing and Finishing*, 2008, 34(9): 8-10. (in Chinese)
- [3] 肖怀秋,林亲录,李玉珍,等. 溶菌酶及其在食品工业中的应用[J]. 中国食物与营养, 2005, (2): 32-34.
XIAO Huai-qiu, LIN Qin-lu, LI Yu-zhen, et al. Application of lysozyme in the food industry[J]. *Food and Nutrition in China*, 2005, (2): 32-34. (in Chinese)
- [4] Ayako Kurimoto, Toshizumi Tanabe, Akira Tachibana, et al. Keratin sponge: immobilization of lysozyme[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, (3): 307-309.
- [5] Ai Xia-u, Xue Pin-liao, Rong Qing-zhou, et al. Preparation of Fe(III)-immobilized collagen fiber for lysozyme adsorption [J]. *Colloids and Surfaces*, 2007, (301): 85-91.
- [6] João Cortez, Phillip L R Bonner, Martin Griffin. Application of transglutaminases in the modification of wool textiles[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, (34): 64-72.
- [7] 崔莉,范雪荣,李艳娟,等. 微生物谷氨酰胺转氨酶改善羊毛织物性能[J]. 纺织学报, 2006, 27(8): 7-8.
CUI Li, FAN Xue-rong, LI Yan-juan, et al. Improving the properties of wool fabrics by micro transglutaminases[J]. *Journal of Textile Research*, 2006, 27(8): 7-8. (in Chinese)
- [8] 赵玉萍,张灏,杨严俊. 溶菌酶测定方法的改进[J]. 食品科学, 2002, 23(3): 116-119.
ZHAO Yu-ping, ZHANG Hao, YANG Yan-jun. Improvement of lysozyme measurement[J]. *Food Science and Technology*, 2002, 23(3): 116-119. (in Chinese)
- [9] 陈建龙. 溶菌酶在高效空气玻纤滤材上的固定化及其应用研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2006.
- [10] 王静,冀志江,金宗哲,等. 抗菌功能建材抗菌性能评价方法[J]. 中国建材科技, 2004, 13(2): 6-12.
WANG Jin, JI Zhi-jiang, JIN Zong-zhe, et al. Test for antimicrobial activity of antimicrobial building materials[J]. *China Building Materials Science & Technology*, 2004, 13(2): 6-12. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)