

壳聚糖修饰羊毛防毡缩用蛋白酶的制备及其酶学性质

陈忍忍, 袁久刚, 余圆圆, 范雪荣, 王强*, 朱怡然

(江南大学 生态纺织教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了减少防毡缩整理中蛋白酶对羊毛纤维主体结构的破坏作用, 利用水溶性碳二亚胺将壳聚糖大分子偶联到蛋白酶(Savinase 16L)分子上, 增大蛋白酶分子量, 从而将水解作用限制在纤维表面。研究表明, 壳聚糖修饰后蛋白酶的二级结构更加规整, 整体结构更加紧凑; K_m 从 20.62 g/L 提高到 35.21 g/L, 表明其对底物的亲和力变小; 修饰酶的最适温度为 55 °C, 在该温度下的热稳定性较好, 且在 70 °C 以上的高温下, 修饰酶显示出优于未修饰酶的稳定性。

关键词: 壳聚糖; 蛋白酶; 碳二亚胺; 化学修饰; 酶学性质

中图分类号: TS 201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)05-0505-06

Preparation of Chitosan Conjugated Protease Used for Shrink Resistance of Wool and Its Properties

CHEN Ren-ren, YUAN Jiu-gang, YU Yuan-yuan, FAN Xue-rong,
WANG Qiang*, ZHU Yi-ran

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

Abstract: Chitosan was covalently coupled to protease (Savinase 16L) with water-soluble carbodiimide to enlarge its molecular weight, with the purpose of reducing enzymatic damage to wool fibres in anti-felting finishing. It was found that the secondary and the whole structures of the modified protease were much more regular and compact than the native one. The conjugated protease presented a lower affinity towards casein with an increase in K_m from 20.62 g/L to 35.21 g/L. There was no change in optimum temperature(55 °C) for the modified protease while its thermal stability at 55 °C was improved. Compared to the native enzyme, the modified protease displayed higher stability above 70 °C.

Key words: chitosan, savinase 16L, EDC, chemical modification, enzymatic properties

羊毛纤维表面覆盖着致密的鳞片层, 由于纤维间的定向摩擦效应, 使得毛织物在洗涤过程中, 发生严重的毡缩现象, 导致织物尺寸缩小。传统的氯化防毡缩整理虽然可以达到较好的防毡缩效果, 但是会产生有机氯化物等对环境有害的物质。因此,

环境友好的生物酶防毡缩整理方法越来越受到重视^[1-3]。

生物酶防毡缩整理主要是利用酶分子对羊毛纤维表面鳞片的水解作用, 破坏鳞片层, 达到防毡缩目的。羊毛防毡缩用蛋白酶 Savinase 16L 分子

收稿日期: 2011-05-09

基金项目: 国家 863 计划项目(2008AA02Z203); 国家自然科学基金项目(51073073); 江苏省自然科学基金项目(BK2009073); 江苏省高等学校优秀科技创新团队项目(苏教科 2009-10 号)。

* 通信作者: 王强(1973-), 男, 黑龙江佳木斯人, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事纺织生物技术研究。E-mail: qiang_wang@163.com

量相对较小,只有 26—29 kDa,很容易通过鳞片间隙的细胞膜复合物层扩散进入纤维主体,水解细胞间质,对纤维强力造成严重损伤^[1,4-5]。相关研究表明,通过化学修饰使蛋白酶分子量增大到一定程度,则可将酶的作用范围限制在纤维表面,降低对纤维主体的损伤^[1]。

已报道的可用于酶修饰的大分子有聚乙二醇(PEG)及其衍生物、环糊精(Cyclo-dextrin)、葡聚糖(Dextran)、壳聚糖(Chitosan)等^[6-7]。其中,壳聚糖是甲壳素脱乙酰基后的产物,基本单元是带有氨基的葡萄糖,分子链上分布着大量羟基和氨基,性质活泼,是比较合适的大分子修饰剂。目前,以壳聚糖为固定化载体,戊二醛为交联剂,将酶固定化的研究较多^[8-9]。但在均相体系中,将壳聚糖大分子与蛋白酶偶联以改变蛋白酶性能的研究还未见报道。由于大分子的规整性和氢键作用,壳聚糖只能溶于稀酸中,不溶于水和绝大多数有机溶剂,因此,壳聚糖改性的物质可以随着环境 pH 值的变化而改变其溶解性^[10]。本文正是利用该性质,实现壳聚糖修饰酶与未修饰酶的分离纯化。

EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) 是可溶于水的碳二亚胺,具有活化羧基的作用,可以引发羧基和伯胺的缩合

反应^[4]。本文利用 EDC 活化蛋白酶分子的羧基,使之与壳聚糖分子中的伯氨基之间发生缩合反应,形成壳聚糖-蛋白酶偶联物,从而达到增大蛋白酶分子量的目的。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要实验试剂 Sephacryl S-200 凝胶填料:北京拜尔迪公司提供;蛋白酶(Savinase 16L, 16 000 U/g):Novozymes 公司提供;壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90\%$,粘均分子量约 40 万):国药集团化学试剂有限公司产品;碳二亚胺(EDC, 纯度 $\geq 98.5\%$):上海晶纯实业有限公司产品;其他化学试剂均为分析纯。

1.1.2 主要实验设备 MF99-3 自动液相色谱分离层析仪,层析柱(内径 1.6 cm,长 50 cm):上海沪西分析仪器厂产品;F-4600 荧光分光光度计:日本 Hitachi 公司产品;MOS 450 圆二色谱仪:法国 Biologic 制造。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白酶的化学修饰 壳聚糖对蛋白酶的化学修饰过程如图 1 所示。

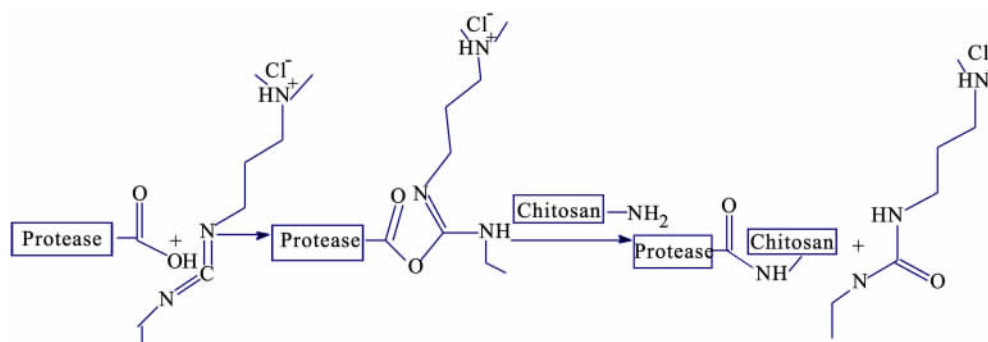


图 1 EDC 将壳聚糖偶联到酶分子上的反应历程

Fig. 1 Modification of protease with chitosan

参照文献^[10-13]的方法对蛋白酶进行修饰和分离纯化。先将壳聚糖溶解在 1% (W/V) 醋酸溶液中,配制成 20 g/L 溶液,备用。配制反应液,调节 pH 至 4,最终体系中含有 5% (V/V) 蛋白酶、8 g/L 壳聚糖。先在室温下震荡 30 min,充分混匀后,加入 40 mmol/L EDC,继续于室温反应 4 h。反应结束后,用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5) 缓冲液

调节溶液 pH 至弱碱性,使产物沉淀。再将其以 4 000 r/min 的速度离心 10 min,弃去上清液,将壳聚糖-蛋白酶偶联物分离出来。

1.2.2 酶活和蛋白质浓度测试 采用酪蛋白为底物,测试蛋白酶在 37 °C 的活力。酶活测定采用紫外分光光度法^[14],将每分钟催化酪蛋白水解生成 1 μ g 酪氨酸的酶量定义为一个活力单位。

蛋白质浓度测试采用考马斯亮蓝法^[15]。

1.2.3 体积排阻色谱检测 利用紫外检测仪在 280 nm 检测蛋白酶的出峰时间。洗脱液为 20 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5),其中含有 150 mmol/L 氯化钠。

1.2.4 荧光光谱分析 激发波长为 280 nm,狭缝宽度均为 5 nm,测定蛋白酶在 250~500 nm 内的发射光谱。

1.2.5 圆二色性谱图(Circular dichroism measurements, CD)分析 扫描波长范围 190~250 nm,响应时间为 1 s,比色皿光程为 1 mm。

1.2.6 米氏常数(K_m)的测定 采用 Lineweaver-Burk 双倒数法,固定蛋白酶浓度,测试在不同底物浓度下的初速度,以 $1/[V]$ 为纵坐标, $1/[S]$ 为横坐标作图,求出 K_m 。

2 结果与分析

2.1 洗脱谱图分析

由于蛋白酶自身既含有羧基又含有伯胺基,在 EDC 的作用下,很可能发生自身交联。为了验证该交联反应是否会发生,按照相同的修饰配方和反应条件,在不加壳聚糖的情况下,将 EDC 加入蛋白酶溶液中进行反应。反应结束后,取 EDC 修饰和壳聚糖修饰反应液进行凝胶层析实验,结果如图 2 所示。

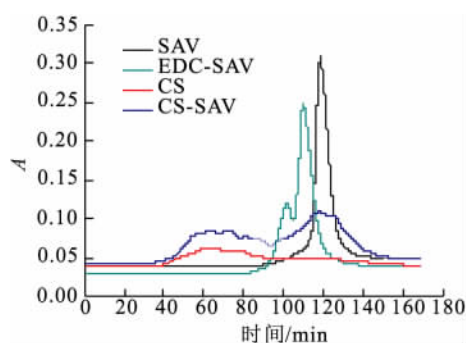


图2 修饰酶和未修饰酶的体积排阻色谱洗脱曲线

Fig.2 Size exclusion chromatograms of modified and native Savinase

比较洗脱曲线 1 和 2 可以发现,未修饰酶(SAV)只有一个峰,而 EDC 修饰酶(EDC-SAV)反应液有两个洗脱峰。经检测,EDC-SAV 反应液的两个峰都有酶活,且第一个峰的出峰时间比 SAV

提前约 20 min,第二个峰应该是在交联反应中没有被修饰的酶,其峰值比反应前小。这说明在 EDC 的作用下,反应液中出现了新的大分子量物质,很有可能蛋白酶分子自身发生了交联反应。实验中发现,随着反应时间的延长,EDC-SAV 反应液洗脱曲线中,第一个洗脱峰的峰值逐渐变大,而第二个峰值不断减小。

在单独 EDC 修饰反应中,进行蛋白酶活力测试,发现随着反应时间的延长,酶活并没有发生明显变化。这表明,分子间交联反应没有对酶的活性中心造成影响。

壳聚糖分子中含有大量伯胺基,当酶分子被大量壳聚糖分子包围时,在 EDC 的作用下,理论上可以形成以酰胺键连接的壳聚糖-蛋白酶偶联物。比较壳聚糖修饰酶(CS-SAV)反应液和壳聚糖(CS)溶液的洗脱曲线可知,前者也有两个洗脱峰。第一个峰的出峰时间虽然没有比单独壳聚糖溶液明显提前,但在 280 nm 的吸收增大,这表明部分蛋白酶被偶联后分子量变大,提前被洗脱出来。同时由于壳聚糖相对分子质量(40 万)比较大,且分布比较宽,与小分子量的蛋白酶偶联后,分子量分布并没有发生显著变化,造成出峰时间与壳聚糖相比没有太大区别。第二个峰是反应中未被修饰的蛋白酶,随着反应时间的延长,峰值逐渐变小。

2.2 圆二色性光谱(CD)分析

在远紫外区进行 CD 测试,观察蛋白酶被修饰后的构象变化。CD 谱的变化直接反应了蛋白质二级结构的变化。图 3 为修饰前后蛋白酶的 CD 谱图,表 1 为根据图 3 计算得到的各结构单元的百分含量。

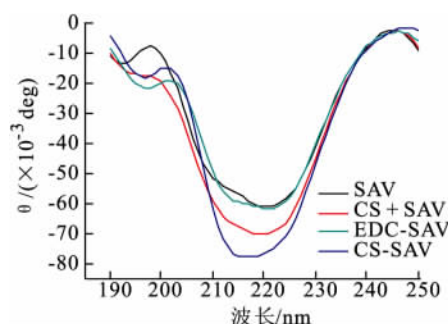


图3 修饰酶和未修饰酶的圆二色性谱图

Fig.3 Circular dichroism spectra of modified and native Savinase

表 1 修饰后蛋白酶二级结构变化

Tab. 1 The secondary structure of modified Savinase

蛋白酶	α -螺旋/%	β -折叠/%	转角/%	无规卷曲/%
SAV	34.8	11.3	23.4	32.1
EDC-SAV	34.7	11.4	23.5	32.1
CS+SAV	34.8	11.5	23.7	32.0
CS-SAV	80.6	0.4	5.8	15.3

从图 3 可以看出, SAV 的椭圆度^[9]在 220 nm 处达到最低值, EDC-SAV 的最低值也在 220 nm, 而 CS-SAV 在 217 nm 处值最小, 峰位发生蓝移。结合表 1 可以发现, 未修饰酶分子以 α -螺旋构象和无规卷曲为主; 单独 EDC 修饰后, 酶分子的结构单元含量均未发生变化。为了更好地说明壳聚糖修饰后蛋白酶分子的结构变化, 直接将蛋白酶与壳聚糖按照修饰配方物理混合(CS+SAV)后进行 CD 测试, 发现 α -螺旋和 β -折叠等各结构单元含量基本不变; 加入 EDC 使壳聚糖与蛋白酶偶联后, α -螺旋的含量从 34.8% 提高到 80.6%, 而无规卷曲的含量下降到 15.3%, β -折叠和转角的含量也相应减少, 说明 CS-SAV 的二级结构发生了较大变化。

2.3 荧光光谱分析

在天然蛋白质分子结构中, 酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe)这 3 种氨基酸会发射荧光。由于 Tyr、Trp 和 Phe 侧链的疏水性, 一般情况下, 这些基团分布在蛋白质内核的疏水区^[16-17]。修饰和未修饰酶的荧光发射光谱如图 4 所示。

在 280 nm 的激发波长下, 未修饰酶的最大发射波长为 340.4 nm; EDC 修饰后, 最大发射波长未发生变化; 壳聚糖与蛋白酶物理混合后最大发射波长红移到 346.4 nm, 荧光强度下降了 70.9%; 壳聚糖修饰酶的最大发射波长为 345.4 nm, 荧光强度比未修饰酶弱, 稍强于两者直接物理混合的荧光强度。在 280 nm 处激发产生的荧光, 主要是色氨酸残基的荧光发射^[16-17]。上述现象, 可能是由于壳聚糖修饰后, 蛋白酶的结构更加紧凑, 色氨酸被包埋的更深所致。此外, 单独 EDC 修饰蛋白酶后, 荧光强度也有所降低。殷海波在半乳糖修饰葡萄糖氧化酶的研究中也发现类似现象, 即修饰酶的发射峰位红移, 荧光强度明显降低^[18]。

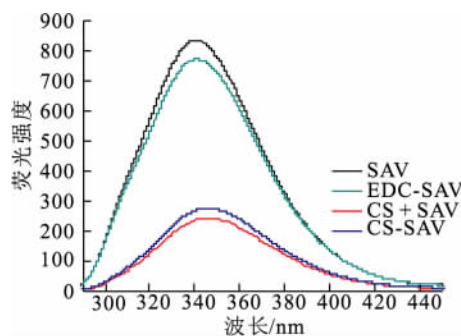


图 4 修饰酶和未修饰酶的荧光发射光谱

Fig. 4 Fluorescence emission spectra of modified and native Savinase

综上所述, 单独 EDC 修饰后, 蛋白酶的结构和性质变化都不大。因此, 接下来的实验中均只研究壳聚糖修饰后蛋白酶的酶学性质变化。

2.4 壳聚糖修饰酶的表现米氏常数变化

K_m 是酶催化反应动力学的重要常数, 反映酶与底物亲和力的大小。根据 Lineweaver-Burk 方程, 可计算 K_m 。图 5 为壳聚糖修饰前后蛋白酶的 Lineweaver-Burk 双倒数图。

壳聚糖修饰后, 蛋白酶的 K_m 从 20.62 g/L 提高到 35.21 g/L, 说明 CS-SAV 与底物酪蛋白之间的亲和力变小。这可能是由于 CS-SAV 的结构更加规整、紧凑, 造成酶分子的活性中心与底物结合时, 缺乏与底物结合所必要的分子链柔韧性, 构象变化受到限制, 从而导致其与底物之间的亲和力减小; 也可能是由于蛋白酶被修饰后, 酶分子量和体积均增大, 底物酪蛋白的分子量也比较大, 在空间位阻的作用下, 难以与酶的活性中心接近, 故表现米氏常数增大^[4, 19]。

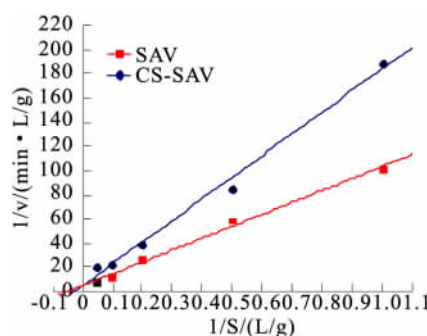


图 5 修饰酶和未修饰酶的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 5 Lineweaver-Burk plot of modified and native Savinase

2.5 温度对壳聚糖修饰酶活力的影响

修饰和未修饰酶在不同温度下的活力如图 6

所示。

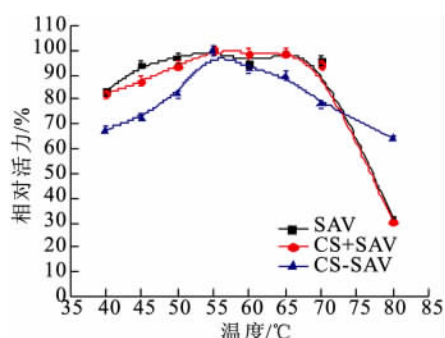


图6 修饰酶和未修饰酶在不同温度下的酶活曲线

Fig. 6 Temperature-activity profile of modified and native Savinase

从图6可以看出,在pH 6的磷酸盐缓冲溶液(20 mmol/L)中,SAV在55℃时活力最高,并且在70℃以下温度范围内都具有很高活力。蛋白酶与壳聚糖物理混合后,蛋白酶的温度-酶活曲线几乎没有发生变化。壳聚糖修饰后,蛋白酶的最适温度仍保持在55℃;此外,CS-SAV在80℃还能保持最适温度时60%以上的酶活,而SAV在80℃只残留30%左右的酶活,表明CS-SAV的适用温度范围更宽。

2.6 壳聚糖修饰酶的热稳定性变化

蛋白酶的使用温度一般都在其最适温度,故考察在最适温度55℃保温不同时间后,修饰和未修饰酶的稳定性,结果如图7所示。

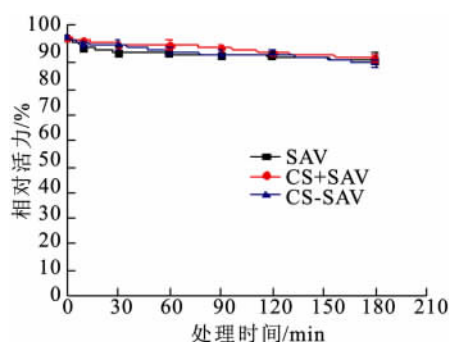


图7 修饰酶和未修饰酶在55℃的热稳定性曲线

Fig. 7 Thermal stability profile of modified and native Savinase

由图7可知,SAV在55℃、pH 5的醋酸-醋酸钠缓冲溶液(20 mmol/L)中的热稳定性较好,处理180 min后,仍能保留90%以上的活力;蛋白酶与壳聚糖物理混合后,蛋白酶的热稳定性没有受到显著影响,仅在前90 min内酶活稳定性稍有提高;CS-SAV的稳定性也很好,稍高于SAV。这可能是由于壳聚糖共价偶联到酶分子上后,在较高温度下酶分子的构象变化受到限制,减少了分子内部基团的热振动,使其不易失活^[16];也可能是由于壳聚糖的大分子长链包围在酶分子周围,对蛋白酶起到了一定保护作用,导致热稳定性提高^[20],这应该也是造成物理混合后蛋白酶热稳定性稍有提高的原因之一。但是,由于SAV在55℃的热稳定性已经很好,故CS-SAV热稳定性提升的空间并不大。

3 结 语

1) 在EDC的活化作用下,蛋白酶分子自身发生交联,但是该反应并不影响蛋白酶的活力,修饰后蛋白酶的结构也未发生明显变化。

2) 从圆二色谱计算结果可知,壳聚糖修饰后,蛋白酶分子中无规卷曲的含量从32.1%下降到15.3%,无规卷曲减少,表明蛋白酶的二级结构更加规整。

3) 荧光发射光谱分析表明,壳聚糖修饰后,蛋白酶的最大荧光发射波长从340.4 nm红移到345.4 nm,且荧光强度显著降低,揭示了修饰酶的结构更加紧凑。

4) 根据Lineweaver-Burk方程计算可知,壳聚糖修饰后,蛋白酶的 K_m 从20.62 g/L提高到35.21 g/L,说明修饰酶与底物之间的亲和力变小。

5) 壳聚糖修饰酶的最适温度没有发生变化,仍为55℃,而在70℃以上高温下的稳定性得到提高,适用范围变宽。

参考文献(References):

- [1] Schroeder M, Schweitzer M, Lenting H B M, et al. Chemical modification of protease for wool cuticle scale removal[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2004, 22 (5/6):299-305.

- [2] Silva C J S M, Gübitz G, Cavaco-Paulo C. Optimisation of a serine protease coupling to Eudragit S-100 by experimental design techniques[J]. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2006, 81(1):8–16.
- [3] Hossain K M G, Juan A R, Tzanov T. Simultaneous protease and transglutaminase treatment for shrink resistance of wool[J]. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2008, 26(5):405–411.
- [4] Silva C J S M, Zhang Q H, Shen J S, et al. Immobilization of proteases with a water soluble-insoluble reversible polymer for treatment of wool[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006, 39(4):634–640.
- [5] Araújo R, Silva C, Machado R, et al. Proteolytic enzyme engineering: A tool for wool[J]. **Biomacromolecules**, 2009, 10(6):1655–1661.
- [6] 翁樑, 王志武, 刘崑. 酶化学修饰的研究进展[J]. 成都大学学报:自然科学版, 2003, 22(2):10–13.
WENG Liang, WANG Zhi-wu, LIU Wei. Progress in chemical modification of enzyme [J]. **Journal of Chengdu University: Natural Science**, 2003, 22(2):10–13. (in Chinese)
- [7] 伍志权, 黄卓烈, 金昂丹. 酶分子化学修饰研究进展[J]. 生物技术通讯, 2007, 5(18):869–871.
WU Zhi-quan, HUANG Zhuo-lie, JIN Ang-dan. Progress in chemical modification of enzymes[J]. **Letters in Biotechnology**, 2007, 5(18):869–871. (in Chinese)
- [8] 谭丽, 夏文水. 壳聚糖微球固定化胰蛋白酶的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(3):46–50.
TAN Li, XIA Wen-shui. The immobilization of trypsin on Chitosan microspheres[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(3):46–50. (in Chinese)
- [9] 吴召慧, 田亚平. 包埋吸附法固定化酒用酸性脲酶的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(3):437–441.
WU Zhao-hui, TIAN Ya-ping. Immobilization of acid urease via adsorption and embedded[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(3):437–441.
- [10] Delanoy G, Li Q, Yu J. Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2005, 35(1–2):89–95.
- [11] 吴蓓蓓. 偏中性 pH 敏感性的壳聚糖制备及其生物催化与分离应用[D]. 杭州:浙江大学理学院, 2008.
- [12] Hernández K, Fernández L, Gómez L, et al. Glycosidation of trypsin with end-group activated dextran[J]. **Process Biochemistry**, 2006, 41(5):1155–1159.
- [13] Villalonga R, Tachibana S, Pérez Y, et al. Increased conformational and thermal stability properties for phenylalanine dehydrogenase by chemical glycosidation with end-group activated dextran[J]. **Biotechnology Letters**, 2005, 27(17):1311–1317.
- [14] 周文龙. 酶在纺织中的应用[M]. 北京:中国纺织出版社, 2002. 358–360.
- [15] 丛峰松. 生物化学实验[M]. 上海:上海交通大学出版社, 2005. 119–120.
- [16] 董斌. 脂肪酶构象的刻录及荧光光谱分析[D]. 杭州:浙江大学, 2006.
- [17] 邓静. 几种小分子物质对胰蛋白酶部分性质的影响研究[D]. 成都:四川大学, 2007.
- [18] 殷海波. 利用半乳糖修饰葡萄糖氧化酶的研究[D]. 广东:暨南大学, 2009.
- [19] Arasaratnam V, Galaev I Y, Mattiasson B. Reversibly soluble biocatalyst: optimization of trypsin coupling to eudragit S-100 and biocatalyst activity in soluble and precipitated forms[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2000, 27(3–5):254–263.
- [20] 王颖达, 郭丽, 钱世钧, 等. 多聚唾液酸对 L-天冬酰胺酶的修饰及修饰酶特性研究[J]. 生物工程学报, 2000, 16(4):517–520.
WANG Ying-da, GUO Li, QIAN Shi-jun, et al. Modification of L-asparaginase with colominic acid and the new characteristics of the modified enzyme[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2000, 16(4):517–520. (in Chinese)