

经验交流

丝胶蛋白粉末的制备及其
应用于 L-天冬酰胺酶的固定化*陶美林¹⁾ 张雨青^{1)**} 沈卫德¹⁾ 王新波²⁾ 张海萍¹⁾ 周文林¹⁾ 马燕¹⁾(¹⁾ 苏州大学蚕丝生物技术实验室, 苏州 215006; ²⁾ 苏州大学材料学院, 苏州 215006)

摘要 蚕丝蛋白经高压高温水脱胶后所得的丝胶溶液, 经过纯化、浓缩以及喷雾干燥, 制成丝胶蛋白粉末。这种丝胶蛋白分子质量高达 200 ku, 其粉末呈白色, 平均粒度 10 μm , 为热水溶性蛋白。以这种丝胶蛋白粉末为载体, 用戊二醛为交联剂, 制成固定化 L-天冬酰胺酶。对这种固定化酶活性和动力学性质进行初步研究和分析, 结果表明这种固定化酶性能稳定, 对热的稳定性有所提高, 并具有较好的操作稳定性, 抗胰蛋白酶水解能力大大提高。

关键词 丝胶蛋白, 固定化酶, L-天冬酰胺酶, 载体

学科分类号 O629.8

蚕丝丝胶是被覆在蚕丝丝素纤维外面的一种高分子质量天然蛋白质, 分子质量高达 30 多万, 占丝蛋白总量的 20% ~ 30%。在缫丝、丝织、绢纺或丝棉生产的加工过程中, 废弃的丝胶蛋白可加以回收与利用, 以避免环境污染和能源浪费。分子质量较小的丝胶肽及其水解物具有优异的吸湿、放湿性能和抗氧化、抑制酪氨酸酶活性、抗肿瘤、抗衰老、促进肠胃消化以及护肤、美容等一系列功能, 在化妆品、保健品、营养食品等方面有广泛的应用前景^[1]。分子质量较大的丝胶蛋白经过交联、修饰或其他高分子材料交联、共聚等方法合成新的高分子材料, 在医用材料、生物可降解材料、合成高分子材料、功能性生物膜、表面活性剂、功能性纤维整理剂等方面有广泛的应用价值^[2]。本文利用高温高压脱胶法制备的高分子质量丝胶蛋白, 经过简单的过滤、浓缩等步骤, 最后制成热水溶性的、颗粒分布较窄的丝胶蛋白粉末。

丝胶蛋白由 18 种氨基酸组成。它含有极性侧链的氨基酸比例很高, 约占 72%, 主要是丝氨酸, 占总量 28%, 其次是天门冬氨酸为 18%。这些极性氨基酸侧链上的羟基、氨基等活性基团比较活泼。所以, 我们将这种来源丰富、易得, 且成本较低的大分子丝胶蛋白粉末为载体, 以戊二醛为交联剂, 制备出活性较高、性能稳定、抗蛋白水解能力强的固定化 L-天冬酰胺酶。本文就热水溶性丝胶蛋白粉末的制备及其特性进行了研究, 并以这种丝

胶粉末为载体, 进行 L-天冬酰胺酶固定化的研究与探讨, 具体报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

家蚕品种苏 5 × 苏 6。将去除蛹和蛹衣的茧壳剪成约 1 cm^2 的碎片备用。L-天冬酰胺酶购自江苏省常州生化千红制药有限公司 (271.8 U/mg)。天冬酰胺、戊二醛、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙烯二胺均为进口分装。三羟甲基氨基甲烷为生化试剂。KI、 HgI_2 、考马斯亮蓝 G-250 和溴酚蓝为分析纯。十二烷基硫酸钠 (电泳级)、过硫酸铵购自上海生物化学与细胞生物学研究所西巴斯生物公司。10~ 200 ku 标准梯度蛋白质为 Gibco 公司产品。

1.2 仪器

BIO-RAD POWER/PAC 1000 电泳仪、日立 U-3000 分光光度计、氨基酸分析仪、OMEC 激光粒度仪、Mettler AB204-S 分析天平、离心机、ORION 720 型酸度计、Yamato 真空冷冻干燥器、CS101-IE 电热鼓风干燥箱、HZS-H 水浴恒温振荡器、LS-B50L 型立式高压蒸汽锅、PWGS-2 型喷雾

* 江苏省“丝绸工程”重点实验室和苏州大学“211”工程资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0512-67606580, E-mail: yqzhang@public1.sz.js.cn

收稿日期: 2002-05-24, 接受日期: 2002-06-28

干燥器等. 杭州大和精密循环式恒温水槽 ($\pm 0.01^\circ\text{C}$), TGL-16G 台式高速离心机.

1.3 丝胶蛋白粉末制备

将清洁的茧壳碎片加入到 20~30 倍量 (质量体积比) 的蒸馏水中, 置于高压锅内, 于 120°C 处理 60 min, 收集丝胶溶液^[3]. 经过滤、纯化、浓缩成 2% 左右的丝胶溶液, 最后进行喷雾干燥 (塔底温度 75°C , 塔顶温度 120°C), 制得热水溶性丝胶粉末, 这是一种热水溶性的高分子丝胶蛋白, 不溶于冷水.

1.4 固定化酶制备

称取 5 g 丝胶粉末, 加入 50 ml 77 U/ml L-天冬酰胺酶、一定量的戊二醛溶液和 50 ml 保护剂天冬酰胺 (5 g/L), 搅拌, 放置于 4°C 交联固定 12 h. 然后分别用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.6) 和蒸馏水反复、充分冲洗, 以洗去粘在丝胶上的游离 L-天冬酰胺酶和未交联的戊二醛. 过滤后, 经真空冷冻干燥制得固定化 L-天冬酰胺酶丝胶粉末.

1.5 酶活性测定

按文献 [4] 报道的方法进行固定化酶活性测定. 称取上述制备的固定化酶 10~20 mg 或一定量的游离酶加入到 0.2 ml Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.6, 0.05 mol/L) 中, 在 37°C 水浴中平衡 10 min 后, 加入 1.7 ml 天冬酰胺 (pH 8.6, 0.05 mol/L), 保温、磁力搅动反应 10 min. 反应后加入 1.5 mol/L TCA 0.10 ml, 使酶失活而终止反应. 反应液离心 1 min 后取上清液 0.5 ml, 加入 7.0 ml 蒸馏水和 1.0 ml Nessler 试剂, 混合后于室温下静置 10 min, 用分光光度计 (450 nm 处) 以空白管为对照测定吸光度. 每个样品重复测定 3 次, 取平均值计算固定化酶的活性或相对活性.

2 结 果

2.1 氨基酸分析

称取一定量丝胶粉末在 6 mol/L HCl 中于 110°C 水解 24 h, 将丝胶水解液去除盐酸, 吸取一定体积的水解液, 在氨基酸自动分析仪上进行测定, 氨基酸组成如表 1. 极性氨基酸占 72%, 其中丝氨酸占 28%, 天冬氨酸 18%, 将近氨基酸总量的一半.

2.2 分子质量测定

应用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法测定丝胶蛋白的分子质量范围, 结果如图 1 所示. 丝胶蛋白的分子范围在 10~200 ku 之间.

Table 1 Amino acid composition of the hot water soluble sericin

Amino acid	Molar percentage/ %
Asp	17.970
Thr	7.777
Ser	28.004
Glu	6.249
Pro	0.000
Gly	16.289
Ala	5.200
Cys	0.691
Val	3.767
Met	0.000
Ile	0.785
Leu	1.211
Tyr	2.870
Phe	0.644
Lys	3.722
His	1.316
Arg	3.516

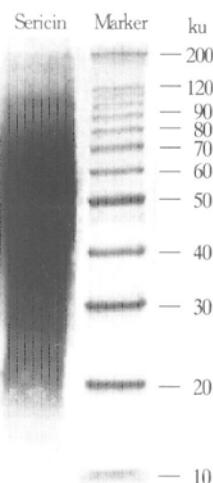


Fig. 1 Molecular mass of sericin

2.3 丝胶粉末粒度测定

取少量丝胶粉末, 加入盛有 5 ml 水的样品瓶中, 置于超声波仪上进行超声处理 15 min, 促使样品粉末充分分散在水介质中, 然后用 OMEC 激光粒度仪测定丝胶粉末颗粒的粒度分布情况 (图 2). 图中虚线为丝胶粉末粒度的累积分布 (%), 而实线为丝胶粉末粒度的微分分布 (%).

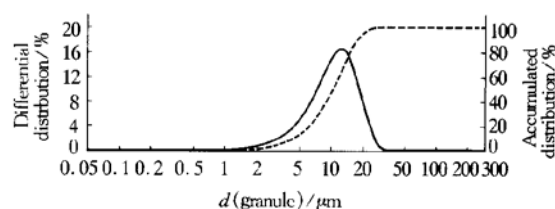


Fig. 2 Size distribution of the hot water soluble sericin powder

这种热水溶性丝胶蛋白粉末呈白色, 颗粒分布较窄, 粒径从 1~30 μm , 平均粒径 10 μm 左右.

2.4 固定化酶的回收率

首先测定不同浓度酶溶液的游离 L-天冬酰胺酶的吸光度值, 求出酶浓度与吸光度值的线性方程和相关系数, 然后测定不同酶浓度固定化酶的吸光度值, 根据线性方程, 计算出固定化酶的活性回收率, 结果由表 2 所示. 随着固定化酶中酶浓度的升高, 其活性回收率也随之下降. 在以下的实验中, 使用的固定化酶浓度均为 0.77 U/mg.

Table 2 Activity recovery of the immobilized enzyme

$\rho(\text{sample ASNase})$ / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	ASNase content/ U	ASNase activity/ U	Activity recovery/ %
0.039	1.93	0.2979	15.47
0.077	3.85	0.5519	14.34
0.154	7.70	0.7335	9.53
0.770	38.50	2.3880	6.20
1.540	77.00	3.2980	4.28

2.5 pH 值对固定化酶活力的影响

一定量的固定化酶或游离酶在不同 pH 值缓冲液中进行酶反应的测定结果. 如图 3 所示, 固定化酶的最适 pH 值为 7.0, 与游离酶的最适 pH 8.0 相比, 发生了向酸性一侧偏移的现象.

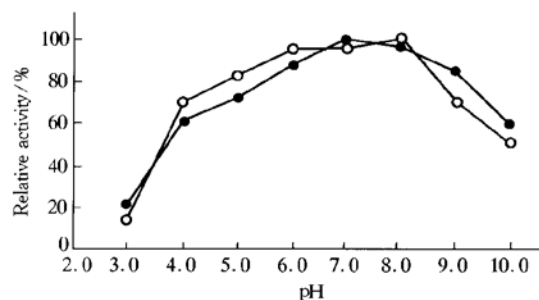


Fig. 3 Effect of pH on the activity of immobilized L-asparaginase (F-ASNase)

●—●: F-ASNase; ○—○: free ASNase.

2.6 温度对固定化酶活力的影响

固定化 L-天冬酰胺酶和游离酶分别在不同温度下反应并测定酶活力, 实验结果如图 4 所示. 游离酶经固定化后, 其反应最适温度提高了 10 $^{\circ}\text{C}$, 在 70 $^{\circ}\text{C}$ 时, 固定化酶保留近 60% 活性, 而游离酶活性已基本上全部丧失.

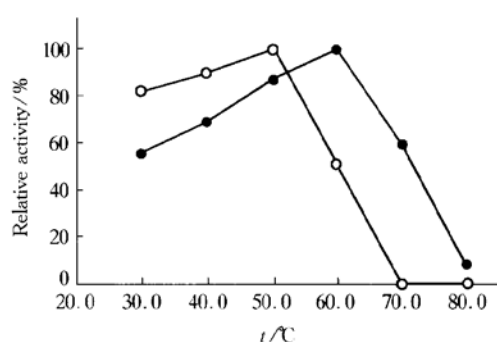


Fig. 4 Effect of temperature on the activity of immobilized L-asparaginase (F-ASNase)

●—●: F-ASNase; ○—○: free ASNase.

2.7 固定化酶的热稳定性

加入缓冲液内的固定化 L-天冬酰胺酶或游离酶在如图 5 所示的温度下分别保温 30 min, 然后测定其酶活力. 结果表明固定化 L-天冬酰胺酶的热稳定性基本与游离酶相仿, 随着保温温度的升高, 其酶的活性随之下降.

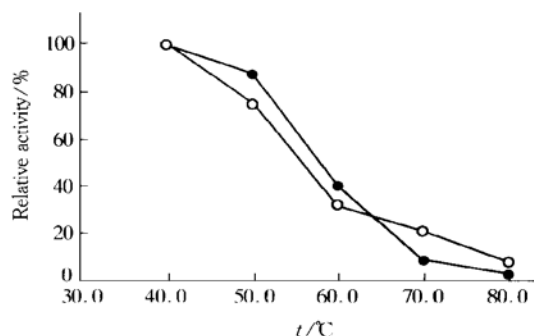


Fig. 5 The stability of immobilized L-asparaginase (F-ASNase) in different temperature

●—●: F-ASNase; ○—○: free ASNase.

2.8 固定化酶抗胰蛋白酶水解能力

将一定量的固定化酶或游离酶加入到 pH 8.6 的 Tris-HCl 缓冲液中, 分别与 100 μg 胰蛋白酶混合, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行反应, 在不同时间取出样品, 测定酶活性. 图 6 表示了两种酶的抗胰蛋白酶水解能力. 从图 6 中可以发现, 固定化酶抗胰蛋白酶水解的能力要远大于游离酶. 在经过 2 h 胰蛋白酶水解反应后, 固定化酶仍可保持原有活力的 82%, 而游离酶与胰蛋白酶反应 10 min 活力已下降为原来的一半, 20 min 后酶活力几乎完全丧失. 这表明 L-天冬酰胺酶经丝胶蛋白固定化后其抗胰蛋白酶水解能力大大加强. 这一性能非常有利于以丝胶

蛋白粉末为载体的固定化酶的研究与开发.

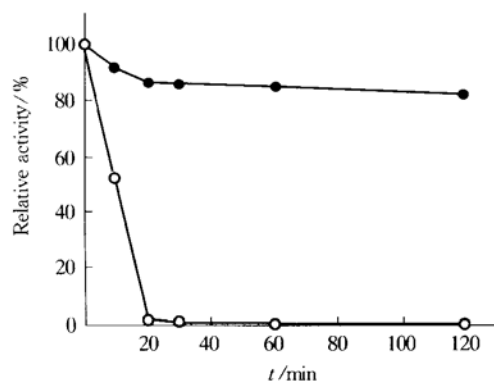


Fig. 6 Effect of trypsin on the immobilized L-asparaginase (FASNase)

●—●: FASNase; ○—○: free ASNase.

2.9 固定化酶半衰期

称取 50 mg 左右的粉末状固定化酶, 加入 0.6 ml Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 8.6), 4 ml 天冬酰胺 (pH 8.6, 0.05 mol/L), 在 37 °C 恒温水浴中反应, 每隔 4 h 更换反应液, 逐日测定固定化酶的活力. 测定后的固定化酶经过滤、冲洗后仍放入反应液中继续反应, 结果如图 7 所示. 固定化酶的操作半衰期为 8 天.

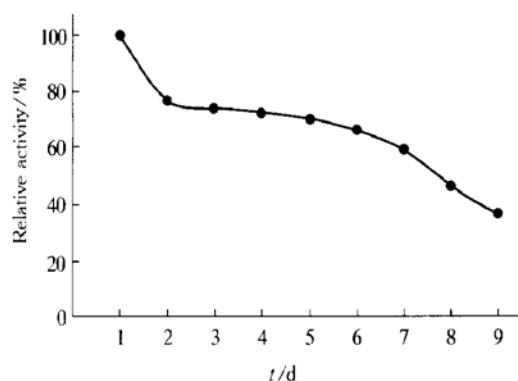


Fig. 7 Relative activity of the immobilized enzyme day by day

3 讨 论

早在 1978 年, Miyairi 等^[5]以戊二醛作为交联剂, 在丝胶蛋白膜上进行了 β 葡萄糖苷酶的固定化试验. 实验表明这种固定化酶的热稳定性、抗电渗性等较游离酶高, 但固定化酶活性很低. 以后几乎没有关于丝胶蛋白膜为固定化酶载体的报道. 直到 1992 年, Asakura 等^[6]使用丝胶和丝素水溶液制成的混合丝蛋白膜进行了葡萄糖氧化酶的包埋试验.

结果表明这种混合制备的固定化酶活性较单一丝胶制备的固定化酶活性要高. 随后, 岩元淳等^[7]又将丝胶与水溶性的聚乙烯醇混合, 制成固定化酶的混合膜. 不过, 将丝胶蛋白制成微米级的热水溶性粉末, 并作为固定化酶的载体进行研究还属首次.

本文利用蚕丝生产中的下脚茧、种茧等以及蚕丝加工过程中的废料, 回收丝胶蛋白, 制成大分子的热水溶性丝胶粉末. 由于丝胶蛋白是一种生物高分子蛋白, 具有生物相容性, 可生物降解, 对人体无毒性、无免疫反应. 丝胶蛋白分子中带有极性侧链如羟基、羧基、氨基等氨基酸占三分之二以上, 经戊二醛交联后这些基团与酶的氨基共价结合成为稳定的固定化 L-天冬酰胺酶. 用这种载体制成的固定化酶其热稳定性、操作稳定性、抗蛋白酶水解能力等方面都要优于其他一些载体如壳聚糖^[8]、甲壳素^[9]、葡聚糖磁性毫微粒^[10]等制备的固定化酶及多聚唾液酸修饰的 L-天冬酰胺酶^[11]. 所以, 以丝胶粉末为载体的固定化 L-天冬酰胺酶在口服药物或体外血液透析等方面具有一定的实用意义. 有关固定化 L-天冬酰胺酶丝胶粉末的动物体内活性与毒性试验正在进行之中.

参 考 文 献

- 1 张雨青. 丝胶蛋白的护肤、美容、营养与保健功能. 纺织学报, 2002, 23 (2): 70~72
Zhang Y Q. Journal of Textile Research, 2002, 23 (2): 70~72
- 2 Zhang Y Q. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. Biotechnology Advances, 2002, 20 (2): 91~100
- 3 张雨青. 蚕丝脱胶方法的比较分析. 蚕业科学, 2002, 28 (1): 75~79
Zhang Y Q. Acta Sericologica Sinica, 2002, 28 (1): 75~79
- 4 Mashburn L T, Wriston J C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase. Biochem Biophys Res Comm, 1963, 12: 50~53
- 5 Miyairi S, Sugiura M. Properties of β -glucosidase immobilized in sericin membrane. J Ferment Technol, 1978, 56 (4): 303~308
- 6 Asakura T, Sakai H, Komatsu K, Kurioka S. Carrier supporting immobilized physiologically active substance and production thereof. Japan, Japan Patent, 04-053490A. 1992-02-21
- 7 岩元淳, 野口隆志, 寺本彰, 等. 絹セリシンとシンデリオタケ (ポリニアルニール混合皮膜の物理性質との酵素固定化能). 日本蚕学杂志, 1995, 65 (4): 427~434
Iwamoto K, Noguchi T, Yeramoto A, et al. J Sericult Sci Jap, 1995, 65 (4): 427~434
- 8 周纪宁, 江体乾, 方波, 等. 甲醛活化壳聚糖制备固定化 L-天冬酰胺酶. 功能高分子学报, 1998, 11 (4): 532~538
Zhou J N, Jiang T Q, Fang B, et al. Journal of Functional Polymers, 1998, 11 (4): 532~538
- 9 周纪宁, 金浩, 江体乾, 等. 抗癌酶制剂 L-天冬酰胺酶在甲壳素上的固定化. 华东理工大学学报, 1999, 25 (5): 438~445
Zhou J N, Jin H, Jiang T Q, et al. Journal of East China University of Science and Technology, 1999, 25 (5): 438~445
- 10 徐慧慧, 李民勤, 潘再群, 等. 葡聚糖磁性毫微粒固定化 L-天

冬酰胺酶的研究. 生物化学杂志, 1996, 12 (6): 744~ 746

Xu H X, Li M Q, Pan Z Q, *et al.* Chinese Biochemical Journal, 1996, 12 (6): 744~ 746

11 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. 生物工程学报, 2000, 16 (4): 517~ 520

Wang Y D, Guo L, Qian S J, *et al.* Chin J Biotech, 2000, 16 (4): 517~ 520

Preparation of Silk Sericin Powder and Its Application as a Support for The Immobilization of L-Asparaginase*

TAO Mei-Lin¹⁾, ZHANG Yu-Qing^{1)**}, SHEN Wei-De¹⁾, WANG Xin-Bo²⁾,

ZHANG Hai-Ping¹⁾, ZHOU Wen-Lin¹⁾, MA Yan¹⁾

(¹⁾ Biotechnology Laboratory for Silkworm and Silk, Suzhou University, Suzhou University, Suzhou 215006, China;

(²⁾ Materials College, Suzhou University, Suzhou 215006, China)

Abstract Silk sericin protein powder can be produced from the sericin solution by the processing of degumming in the high temperature and high-pressure conditions, purifying, condensing and spray drying. Molecular mass of the sericin protein is high up to 200 ku. Taking on white color and about 10 μ m average granularity, the powder of the protein is hot water soluble. L-Asparaginase was immobilized on the natural silk sericin powder by cross-linked with glutaraldehyde. The enzyme activity and dynamical properties of the immobilized L-asparaginase were described. It was found that the immobilized enzyme is very stable, and the stability to heat increased in comparison with free enzyme, and this immobilized enzyme has preferable stability of operation. The resistance to trypsin hydrolysis was also improved greatly compared to that of soluble enzyme.

Key words silk sericin protein, L-asparaginase, immobilized enzyme, support

* This work was supported by grants from the "211 Project" Funds of Suzhou University and Key Lab Funds of Silk Project of Jiangsu Province, China.

** Corresponding author. Tel: 86-512-67606580, E-mail: yqzhang@public1.sz.js.cn

Received: May 24, 2002 Accepted: June 28, 2002