

丝素接枝含酪氨酸多肽对其酶促改性的影响

朱雪珂, 周步光, 王平*, 崔莉, 季吉, 王强, 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: 丝素中含约 10% 酪氨酸残基, 但其可及度较低, 影响了丝素蛋白的反应性。借助利用天然生物交联剂京尼平, 将含酪氨酸多肽与丝素蛋白交联, 提升酪氨酸酶催化丝素与外源氨基化合物接枝改性的效果; 借助 SDS-PAGE、FTIR 和 TG 分析丝素分子量、结构与性能的变化, 并评价酶催化 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)在丝素表面接枝效率。研究表明, 经京尼平处理后丝素蛋白的分子量增加, 含酪氨酸多肽与丝素交联后, 不仅使丝素膜材料热稳定性提升, 也一定程度上增加了丝素蛋白膜材料机械性能, 借助甲基橙比色法验证了接枝多肽能促进酪氨酸酶催化 ϵ -PL 在丝素表面接枝。基于京尼平法接枝含酪氨酸多肽为提高丝素的反应性提供了有效途径。

关键词: 京尼平; 丝素蛋白; 含酪氨酸多肽; 酪氨酸酶; ϵ -聚赖氨酸

中图分类号: TS 195 文章编号: 1673-1689(2019)02-0059-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.009

Effect of Grafting of Tyrosine-Containing Peptide on Enzyme-Catalyzed Modification of Silk Fibroin

ZHU Xueke, ZHOU Buguang, WANG Ping*, CUI Li, JI Ji, WANG Qiang, FAN Xuerong

(Key Laboratory of Eco-Textiles, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Silk fibroin contains 10% of tyrosine residues, however, the reactivity of fibroin is limited owing to the restricted accessibility. In this work, grafting of a tyrosine-containing polypeptide is carried out using a natural crosslinking agent of Genipin (GP), aiming at promoting the tyrosinase-catalyzed reaction between fibroin and aniline compounds. The changes in molecular weight, structure and performance are investigated by means of SDS-PAGE, FTIR and TG, and the efficiency of enzymatic grafting of ϵ -Poly-L-Lysine (ϵ -PL) is also concerned. The results indicate that the molecular weight for the fibroin proteins increases after GP treatment; the thermo stability and mechanical property for the fibroin-based membranes are also improved compared to the control. Based on methyl orange colorimetry, it is also verified that grafting of polypeptide could promote the tyrosinase-catalyzed coupling of ϵ -PL. It provides an efficient way to improve reactivity of fibroin via grafting of tyrosine-containing using GP.

Keywords: genipin, silk fibroin, tyrosine-containing polypeptide, tyrosinase, ϵ -Poly-L-Lysine

收稿日期: 2016-04-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(51373071)。

* 通信作者: 王平(1971—), 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事生态染整及纺织生物技术研究。

E-mail: wxwping@163.com

引用本文: 朱雪珂, 周步光, 王平, 等. 丝素接枝含酪氨酸多肽对其酶促改性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(02): 59-64.

京尼平(Genipin, GP)是梔子苷经 β -葡萄糖苷酶水解后的产物,是传统中药杜仲的活性成分之一,是从京尼平苷中分离、提纯而获得的。京尼平属于环烯醚萜类化合物,作为优良的天然交联剂,可以与含游离氨基的高分子(如蛋白质、胶原和壳聚糖等)交联构建生物材料^[1-3]。丝素(SF)是一类天然蛋白类高分子,具有良好的机械性能、生物相容性和低免疫原性,在生物医用材料领域得到应用。丝素蛋白由20多种氨基酸组成,尽管其中含酚羟基的酪氨酸残基量接近10%,但由于其包埋在由甘氨酸和丙氨酸组成的疏水链中,在酪氨酸酶催化丝素改性中酪氨酸残基可及度较低,从而影响了丝素酶促改性效率^[4-5]。为提高丝素的反应性,可在其表面接枝含酪氨酸的多肽^[6-7],其中定制多肽GKGYGGYGK中酪氨酸的含量约为40%,赖氨酸含量约为32%。若借助于生物或化学方法将该多肽接枝到丝素蛋白上,通过提高丝素蛋白上酪氨酸残基的含量,则可提升酪氨酸酶催化丝素接枝伯胺类分子的效率,利于改善丝素蛋白膜的性能。

本文作者借助于生物交联剂京尼平,促使含酪氨酸的多肽在丝素蛋白表面接枝,分析多肽在丝素表面接枝效果及交联机制,探究其对酪氨酸酶催化丝素蛋白接枝聚赖氨酸效果的影响,拓展基于酪氨酸酶法的酶促丝素蛋白改性效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

桑蚕丝织物(90 g/m²);京尼平(GP,上海宝曼生物技术有限公司);多肽(P,序列为GKGYGGYGK,郑州派和泰德医药科技有限公司);酪氨酸酶(TYR, 1070 U/mg, 美国 Worthington Biochemical Corporation); ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL, 郑州拜纳福生物工程股份有限公司);无水氯化钙、无水乙醇、冰醋酸、醋酸钠(国药集团化学试剂有限公司)。

UV-1800 紫外可见分光光度计(SHIMADZU, 日本);高效液相色谱仪(Waters e2695, 美国 Waters 公司);KDH-0.05 微机控制万能强力试验机(深圳市凯强利实验仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 丝素蛋白溶液的制备 将脱胶后桑蚕丝织物以氯化钙-乙醇体系(摩尔比 $\text{CaCl}_2:\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}:\text{H}_2\text{O}=1:2:8$)溶解,在 $70\pm 2^\circ\text{C}$ 的水浴锅中搅拌 3 h 后

冷却至室温,透析 3 d 去除盐组分,经离心去除杂质后得到丝素蛋白溶液。

1.2.2 京尼平交联丝素蛋白和多肽 以京尼平(4 g/L)在 37°C 、pH 6.0 条件下处理多肽(1.5 mmol/L)和丝素蛋白溶液(20 g/L),处理时间 7 h;对对照不加京尼平或多肽。

1.2.3 丝素蛋白膜的制备 将 1.2.2 节中的反应液倒入聚四氟乙烯模具中,在 -20°C 下冷冻 5 h,再在 -50°C 的冷冻干燥机中冻干 24 h,制得丝素冻干膜;或将反应液在室温条件下风干,制备丝素风干膜。

1.3 测试方法

1.3.1 UV-Vis 光谱分析 以 UV-1800 紫外/可见分光光度计测定丝素溶液反应体系的吸光度,记录溶液在 400~800 nm 范围内溶液吸光度的变化。

1.3.2 SDS-PAGE 凝胶电泳 取 20 μL 样品与 5 μL 上样缓冲液(5 $\times$)混合均匀,在 100°C 水浴中煮沸 10 min,取 5 μL 混合液上样到 8%~16%梯度胶上,然后在蛋白质凝胶电泳仪上进行实验,浓缩胶阶段电压 100 V,分离胶阶段电压为 200 V。电泳结束后,以考马斯亮蓝 R-250 染色,最后进行脱色。

1.3.3 体积排阻色谱(SEC) 不同条件下处理样品经离心和过滤后,借助高效液相色谱仪考察其分子量分布变化,实验条件:BioSuite450 凝胶色谱柱(7.8 mm $\times$ 300 mm, 8 μm)、2414 RI Detector、2998 PDA Detector,流量 0.5 mL/min,流动相为 PBS (0.05 mol/L pH=7 磷酸盐缓冲溶液, 0.3 mol/L NaCl)。

1.3.4 红外分析 采用 FTIR 光谱仪的 ATR 模式,在波长范围为 4 000~650 cm^{-1} 内对不同的冷冻干燥膜样品进行红外光谱分析。扫描次数 32 次,分辨率 4 cm^{-1} 。

1.3.5 热重法-微商热重法(TG-DTG) 使用热重分析仪分别测定处理后的丝素膜的 TG-DTG。条件为:样品量约为 2 mg,升温速度:10 $^\circ\text{C}/\text{min}$,升温范围:30~500 $^\circ\text{C}$, N_2 气氛(高纯 N_2 , 流量为 40 mL/min)。

1.3.6 机械性能的测定 使用万能材料试验机对丝素风干膜进行机械性能测试,拉伸速度为 40 mm/min,夹距为 40 mm。测试前样品裁剪成 80 mm $\times$ 5 mm 样条,并放在恒温恒湿箱(20 $^\circ\text{C}$, RH=65%)中平衡 24 h,实验中每个样品进行 10 次重复试验,样品断裂强度和断裂伸长率分别如下。

$$\text{断裂强度}(\text{MPa}) = \frac{\text{强力}(\text{N})}{\text{平均厚度}(\text{mm}) \times \text{膜宽}(\text{mm})} \quad (1)$$

$$\text{断裂伸长率}(\%) = \frac{\text{伸长}(\text{mm})}{\text{原长}(\text{mm})} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.7 丝素膜表面 ϵ -PL 接枝率测定 溶液中 ϵ -PL 浓度测定采用 Itzhaki 比色法^[8]。实验中制作 ϵ -PL 与甲基橙吸光度的相关性标准曲线,其中当 ϵ -PL 的质量浓度在 0~0.1g/L 时,其浓度与吸光度 A_{465} 具有良好的线性关系为

$$A = -1.721\ 67C + 0.486\ 74 \quad R^2 = 0.997\ 6 \quad (3)$$

式中: C 为 ϵ -PLL 的浓度; A 为溶液在 465 nm 处的吸光值。

酶促丝素膜表面接枝 ϵ -PL 中,通过分光法测定吸光度,借助于标准曲线计算 ϵ -PL 的接枝率。

2 结果与讨论

2.1 京尼平对丝素/多肽体系吸光度的影响

含酪氨酸的多肽分子链上含 3 个游离氨基,丝素蛋白分子端基及赖氨酸残基中也含有一定量的氨基,GP 可与多肽和丝素蛋白分子中的氨基反应,从而形成栀子蓝色素,使反应体系呈蓝色,借助于分光法可了解丝素蛋白的交联效果^[9-10]。

利用紫外可见光谱扫描,检测 SF/GP/P 体系溶液吸收光谱变化,其中京尼平和氨基酸反应后生成的栀子蓝色素的特征吸收峰在 600 nm 附近。图 1 中对照样 1、2、3 和 4 溶液均无色,而样品 5 和 6 呈蓝色;图 2 中在 600 nm 附近出现新的特征吸收峰,与溶液中呈现蓝色相吻合,表明 GP 的交联作用使得 SF+GP 和 SF+GP+P 中均有栀子蓝色素出现。



1-GP;2-P;3-SF;4-SF+P;5-SF+GP;6-SF+GP+P

图 1 京尼平反应后丝素/多肽体系溶液的色外观

Fig. 1 Appearances of fibroin/polypeptide solutions after treated by GP

2.2 京尼平对丝素/多肽体系分子量分布的影响

京尼平可与氨基化合物上的游离氨基反应,或经过自身聚合后再与外源氨基化合物反应,形成分子内或分子间的共价键^[11-12]。实验中借助于 SDS-

PAGE、HPLC^[13-14]评价京尼平对丝素蛋白分子量的影响,结果如图 3 和 4 所示。

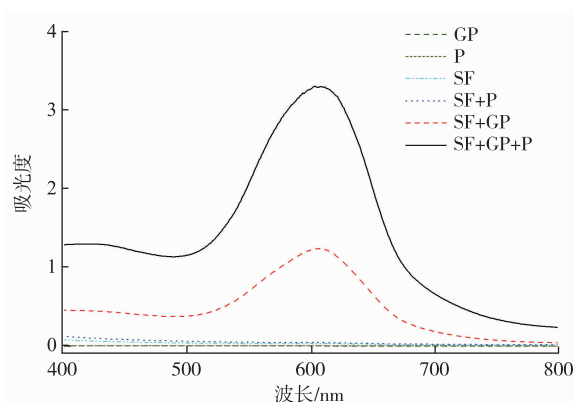
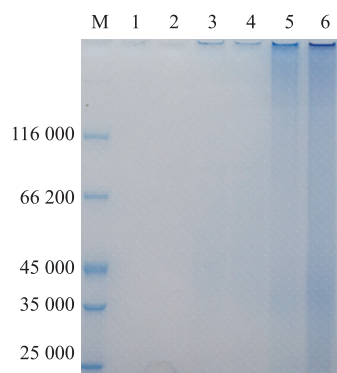


图 2 京尼平处理丝素/多肽体系的紫外可见吸收光谱

Fig. 2 Absorbances of silk fibroin and polypeptide solution after GP treatment



1-GP;2-P;3-SF;4-SF+P;5-SF+GP;6-SF+GP+P

图 3 京尼平交联后丝素溶液 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGEs of fibroin and polypeptide after crosslinking with GP

GP 和 P 的分子量较小(分别为 226 和 885),图 3 中对应的泳道 1 和 2 没有明显谱带;丝素蛋白分子量在几万到几十万的范围内,泳道 3 没有明显的分子量集中分布谱带;泳道 4 和泳道 3 的颜色深浅差别不大,说明在仅丝素蛋白和 P 存在时,两者间未发生交联反应;泳道 5 比泳道 3 的颜色要深一些,说明在 GP 作用下,丝素蛋白发生了自交联;泳道 6 比泳道 3 和 5 的谱带颜色都深,表明丝素蛋白在 GP 的作用下除了发生自交联作用外,还存在 P 接枝到丝素蛋白上,同时 P 还可能作为桥梁连接丝素蛋白分子,使得溶液中蛋白分子量整体增加。为进一步验证 GP 促进 P 接枝丝素蛋白的效果,采用尺寸排阻色谱(Size Exclusion Chromatography,SEC)凝胶柱检测丝素蛋白分子量变化,结果见图 4。

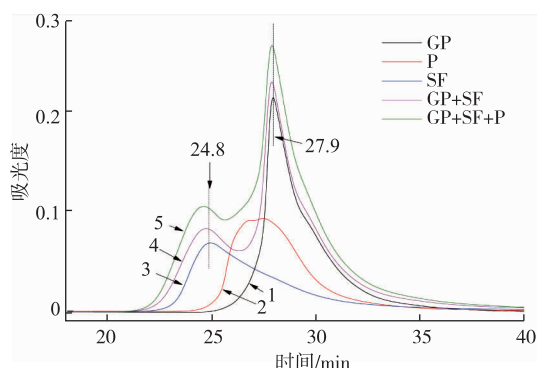


图4 京尼平交联丝素蛋白的体积排阻色谱

Fig. 4 SEC chromatograms of fibroin and polypeptide after incubating with GP

图4中可以看出,GP(曲线1)和丝素SF(曲线3)最高峰值相应的保留时间分别为24.8 min和27.9 min,P(曲线2)最高峰对应的保留时间约为27 min;GP+SF(曲线4)比SF(曲线3)的出峰时间略有缩短,这是由于GP使SF分子间发生了交联;GP+SF+P(曲线5)的出峰时间比GP+SF(曲线4)有所提前,是因为更多丝素分子间通过P发生交联。图3和图4结果表明,GP可引发丝素蛋白和多肽发生分子内或分子间交联,导致丝素分子量整体增加,这与图1溶液色外观变化、图2的吸光度结果一致。

2.3 京尼平对丝素/多肽结构及结晶度的影响

交联丝素蛋白和多肽的之后,京尼平分子中六元环上的氧原子会被伯氨基的N取代,形成含叔胺N的杂环^[1],因此可以通过进行红外光谱分析考察其结构的变化,结果见图4和5。

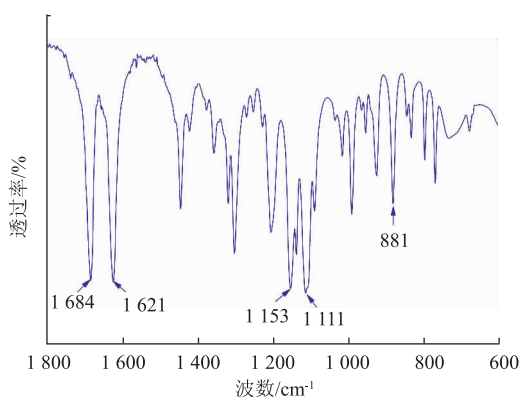


图5 京尼平红外吸收光谱

Fig. 5 FTIR spectra of GP

由图5可得,京尼平有一些明显特征峰。1684 cm^{-1} 附近的吸收峰为C=O的伸缩振动;1621 cm^{-1} 强吸收峰为烯环上C=C的伸缩振动;1153 cm^{-1} 和

1111 cm^{-1} 处的吸收峰是C-O的伸缩振动;881 cm^{-1} 附近的吸收峰,被认为是杂环上的C-H的伸缩振动区。京尼平为杂环化合物,含有多个活性基团,可与氨基反应生成深蓝色素,从而起到交联效果^[1]。

图6中丝素蛋白在酰胺I、酰胺II、酰胺III的峰分别出现在1641、1520、1234 cm^{-1} 附近。在1108 cm^{-1} 与887 cm^{-1} 波长处出现了新的吸收峰,其中1108 cm^{-1} 代表了C-N伸缩振动,且此N原子是与氨基反应后形成的叔胺N原子,887 cm^{-1} 处的特征峰为杂环上C-H伸缩振动,证明了京尼平和丝素或多肽中的 $-\text{NH}_2$ 发生了交联作用。曲线d中1108 cm^{-1} 与887 cm^{-1} 波长处出现的峰强度均比曲线c中的高,说明SF+GP+P样品中有更多C-N和C-H,验证了丝素蛋白和多肽间发生交联。考察丝素蛋白接枝多肽膜材料的热学性能,结果见图7。

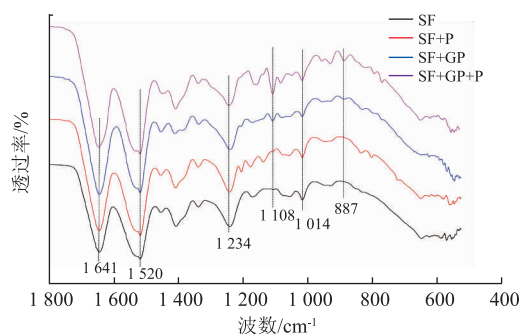


图6 丝素/多肽冻干膜的ATR-FTIR光谱图

Fig. 6 FTIR spectra of the freeze-dried membranes of fibroin/polypeptide

图7中改性丝素和空白样的曲线变化情况基本一致,均有两阶段的质量损失。其中,第1阶段的质量损失出现在30~200 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,是因为丝素膜表面或内部自由水蒸发引起;第2阶段在200~500 $^{\circ}\text{C}$,最大分解速率在290 $^{\circ}\text{C}$ 附近,主要是由大分子熔融降解引起的。SF和SF+P样品的失重温度分别为291.52 $^{\circ}\text{C}$ 和294.52 $^{\circ}\text{C}$,经GP交联之后,SF+GP和SF+GP+P样品的失重温度有所上升,分别是303.14 $^{\circ}\text{C}$ 和299.28 $^{\circ}\text{C}$,表明交联后的丝素样品热稳定性提高。加入交联剂后,交联剂分子在相邻大分子间有结合力,结合力使大分子相互靠拢,分子链间作用力增加,排列规整化,使得丝素膜结晶度有所增加,其稳定性也相应增加^[13]。SF+GP+P样品失重温度比SF+GP略低,可能是由于部分丝素分子和多肽发生交联,使丝素蛋白自身间交联有所减少所致。

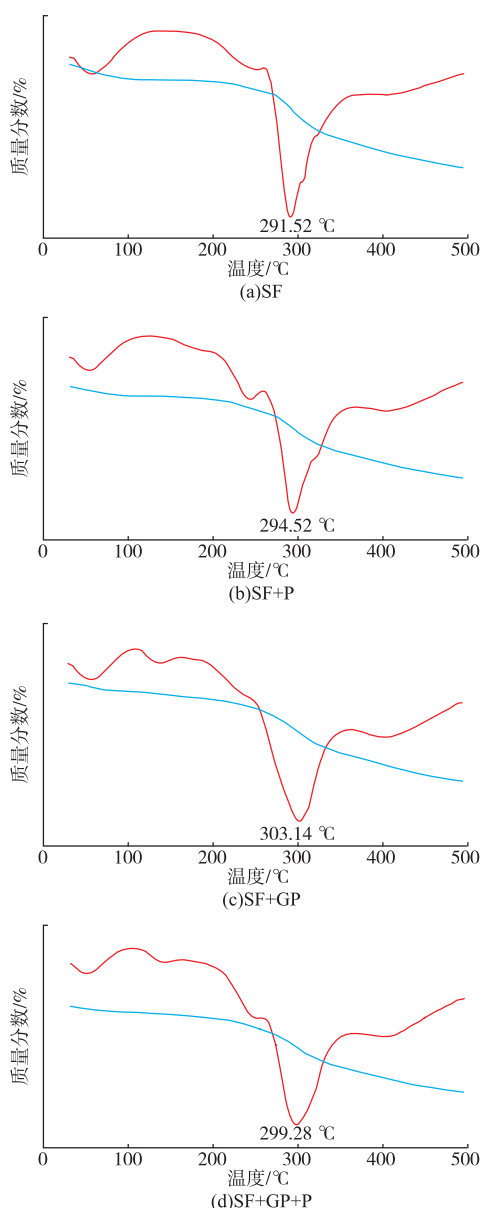


图7 丝素/多肽冻干膜 TG/DTG 曲线

Fig. 7 TGA and DTG curves of the freeze-dried membranes of fibroin/polypeptide

2.4 京尼平对丝素/多肽风干膜机械性能的影响

考察京尼平对丝素/多肽膜结构的影响,对比加入 0.1%(w/v) 甘油条件下丝素/多肽风干膜的断裂强度和断裂伸长率,结果见图 8。

从图 8 中可以看出,京尼平处理后丝素膜材料的拉伸强度略有增加,这是由于丝素蛋白和多肽经京尼平交联后发生分子内或分子间交联,其分子间作用力加强,拉伸强度增加。在受到外力拉伸时,SF+P 和 SF+GP+P 膜中高分子链段间的滑动能力降低,膜材料断裂伸长率略有下降。

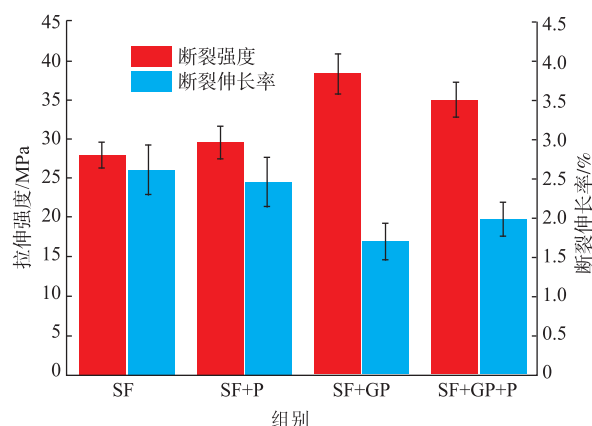


图8 丝素/多肽风干膜的机械性能

Fig. 8 Mechanical properties of the air-dried fibroin/polypeptide membranes

2.5 丝素接枝多肽对酪氨酸酶催化接枝 ϵ -PL 的影响

丝素蛋白接枝含酪氨酸多肽后,其酪氨酸含量增加,有利于提高酪氨酸酶催化氧化丝素产生更多醌类活性基^[14-16]。可进一步实现酶促丝素中醌类基团与外源功能性氨基化合物(如壳聚糖等)反应,改善丝素蛋白材料的应用性能^[17]。实验中以 ϵ -PL 氨基化合物模型物,考察经京尼平改性后丝素膜在酪氨酸酶催化下接枝 ϵ -PL 的效果,见图 9。

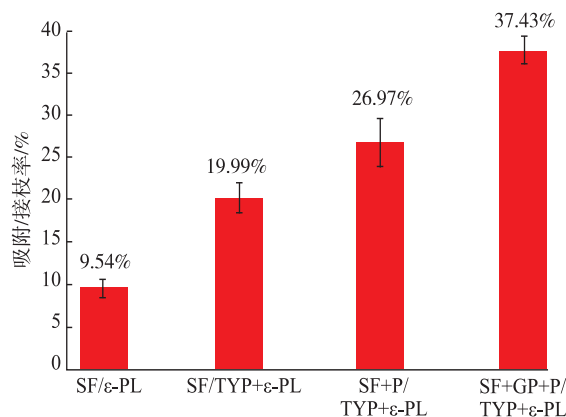


图9 酪氨酸酶催化聚赖氨酸接枝多肽改性丝素膜

Fig. 9 Tyrosinase-catalysed grafting ϵ -Poly-L-Lysine on silk fibroin treated by polypeptide

由图 9 可知,SF/ ϵ -PL 样品的吸附/接枝率为 9.54%,其原因是 ϵ -PL 含有较多氨基, ϵ -PL 等电点 pI 在 9 左右,而丝素蛋白 pI 为 4.2~4.5,两者可依靠库仑力、范德华力或氢键结合,吸附在丝素膜表面。SF/TYP+ ϵ -PL 样品中 ϵ -PL 的吸附/接枝率为 19.99%,高于 SF/ ϵ -PL,表明酪氨酸酶可催化 ϵ -PL

接枝丝素。SF+GP+P/TYR+ ϵ -PL上 ϵ -PL的吸附/接枝率为37.43%,高于其他样品,表明丝素接枝含酪氨酸多肽后其反应性增强,酪氨酸酶催化丝素氧化的反应位点增多,因此 ϵ -PL在丝素膜表面的接枝效率提高。

3 结 语

1) 京尼平能促进丝素蛋白与含酪氨酸多肽中伯胺基之间反应,引发生成栀子蓝色素;京尼平处

理后丝素/多肽体系的蛋白分子量增加,实现了多肽在丝素蛋白表面的接枝。

2) 含酪氨酸多肽和丝素交联后,不仅使丝素膜材料的热稳定性提高,也在一定程度上增加了丝素蛋白膜材料的机械性能。

3) 多肽在丝素蛋白分子表面接枝后,使得丝素蛋白中酪氨酸含量增加,提高了酪氨酸酶催化 ϵ -PL在丝素表面的接枝效果,验证了通过接枝含酪氨酸多肽可提高丝素的酶促反应性。

参考文献:

- [1] 汪宜宇. 京尼平交联丝素蛋白材料的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
- [2] YOU R C, XU Y M, LIU G Y, et al. Regulating the degradation rate of silk fibroin films through changing the genipin crosslinking degree[J]. **Polymer Degradation and Stability**, 2014, 109: 226-232.
- [3] YU S H, WU S J, WU J Y, et al. Preparation of fucoidan-shelled and genipin-crosslinked chitosan beads for antibacterial application[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2015, 126: 97-107.
- [4] SAMPAIO S, TADDEI P, MONTI P. et al. Enzymatic grafting of chitosan onto *Bombyx mori* silk fibroin: kinetic and IR vibrational studies[J]. **Journal of Biotechnology**, 2005, 116: 21-33.
- [5] FREDDI G, ANGHILERI A, SAMPAIO S, et al. Tyrosinase-catalyzed modification of *Bombyx mori* silk fibroin: grafting of chitosan under heterogeneous reaction conditions[J]. **Journal of Biotechnology**, 2006, 125: 281-294.
- [6] MEINEL L, HOFMANN S, KARAGEORGIOU V, et al. The inflammatory responses to silk films *in vitro* and *in vivo* [J]. **Biomaterials**, 2005, 26: 147-155.
- [7] SOFIA S, MCCARYHY M B, GRONOWICZ G, et al. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation [J]. **Journal of Biomedical Materials Research**, 2001, 54: 139-148.
- [8] ITZHAKI R F. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine[J]. **Anal Biochem**, 1972, 50: 569-574.
- [9] LI Lingjin, LI Junsong, WANG Dong, et al. The genipin-dyeing effect on silk fibroin [J]. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, 2009, 6: 799-802. (in Chinese)
- [10] FUJIKAWA S, FUKUI Y, KOGA K, et al. Brilliant skyblue pigment formation from Gardenia fruits [J]. **Journal of Fermentation Technology**, 1987, 65: 419-424.
- [11] PARK J E, LEE J Y. Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of *Gardenia jasminoides*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002, 50 (22): 6511-6518.
- [12] MEKHAIL M, JAHAN K, TABRIZIAN M. Genipin-crosslinked chitosan/poly-L-lysine gels promote fibroblast adhesion and proliferation[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2014, 108: 193-198.
- [13] ZHANG Q S, WANG X Z, MU Q F, et al. Genipin-cross-linked silk sericin/poly (N-isopropylacrylamide) IPN hydrogels: Color reaction between silk sericin and genipin, pore shape and thermo-responsibility [J]. **Materials Chemistry and Physics**, 2015, 166: 133-143.
- [14] KANG G D, LEE K H, KI C S, et al. Crosslinking reaction of phenolic side chains in silk fibroin by tyrosinase [J]. **Fiber and Polymers**, 2004, 5(3): 234-238.
- [15] JUS S, KOKOL V, GUEBITZ G M. Tyrosinase-catalysed coupling of functional molecules onto protein fibers [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2008, 42: 535-542.
- [16] WANG Xiaolan, YAO Wenjie, YUAN Jie. Effect of the polysaccharides and other active extracts from *cynanchum auriculatum* on the activity of tyrosinase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(10): 1097-1100. (in Chinese)
- [17] MURPHY A R, KAPLAN D L. Biomedical application of chemically-modified silk fibroin[J]. **Journal of Materials Chemistry**, 2009, 19(36): 6443-6450.