

微生物谷氨酰胺转胺酶对羊毛蛋白纤维改性作用的性能表征

崔莉¹, 范雪荣¹, 陈坚², 堵国成², 王平¹

(1. 江南大学纺织服装学院生态纺织教育部重点实验室; 2. 江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用 SEM, AFM, FT-IR 及 SDS-PAGE 等技术表征了谷氨酰胺转胺酶(Tgase)对不同预处理的羊毛的改性效果。结果表明, KMnO₄ 预处理主要引起羊毛红外光谱 S—O 振动区(1000~1200 cm⁻¹)变化, 蛋白酶预处理及 TGase 的作用没有显著改变羊毛的红外光谱吸收。与 H₂O₂ 相比, KMnO₄ 与蛋白酶使羊毛鳞片结构破坏, 纤维表面的平均粗糙度由 12.5 nm 升高至 24 nm, TGase 的作用未明显改变纤维的表面形态。SDS-PAGE 电泳分析显示 TGase 可催化羊毛蛋白间通过共价交联形成聚合物。

关键词: 谷氨酰胺转胺酶; 羊毛; 结构

中图分类号: R318.08

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2009)02-0344-06

1 前言

迫于环保压力, 传统的羊毛化学整理方法已受到很多发达国家法规的严格限制。生物酶的应用被认为是最有可能替代传统方法的途径之一, 其中利用蛋白酶改善羊毛性能已有许多研究。但蛋白酶的处理过程难以控制, 易造成纤维损伤过度, 因此工业上仍未广泛应用。人们继而转向开发新的适用于羊毛的酶制剂和新的加工工艺。Carla 等^[1]利用化学修饰将蛋白酶分子与 PEG 连接以增大蛋白酶分子体积, 阻止酶分子向纤维内部扩散, 使其主要作用于羊毛的表面。周爱晖等^[2]研究了 H₂O₂ 氧化预处理和 DCCA 氯化预处理对羊毛蛋白酶法防毡缩性能的影响。

谷氨酰胺转胺酶(Transglutaminase EC 2.3.2.13, 简称 TGase)可以催化蛋白质分子间发生交联反应, 与蛋白酶的水解作用完全相反, 目前广泛应用于食品、医药等领域^[3]。TGase 应用于纤维材料的改性刚刚起步, 因此相关的研究报道很少。目前国外只限于英国诺丁汉特伦特大学和英国农业部农业研究院的一些报道。英国的 Cortez 等^[4,5]采用来源于 *S. mobaraense* 的 TGase, 使受损的羊毛纤维强力有所恢复, 一定程度上改善了羊毛织物的毡缩性, 提高了染色织物的耐洗性。美国农业研究院研究人员^[6]利用 TGase 催化含有伯胺基团的磷酸乙醇胺与羊毛作用, 提高了羊毛的柔软性和白度。我们前期研究^[7-10]发现, 适当的化学及蛋白酶预处理为 TGase 的作用提供了条件, TGase 可以修复因化学或蛋白酶预处理带来的强力损伤, 降低纤维的碱溶解性, 提高染色性能, 并在一定程度上赋予羊毛织物防毡缩性。

然而, 上述研究均基于酶的实际应用效果来评价酶的有效性和对羊毛改性的适用性。研究预处理为 TGase 作用创造条件的机理及作用后对纤维表面形态的影响, 不仅能为该酶在羊毛改性中的应用提供理论指导, 还可为该酶对纺织材料的功能化改性开拓新的研究思路。本研究用吸水链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus* 发酵产生的 TGase 对羊毛纤维进行处理, 采用扫描电子显微镜(SEM)、原子力显微镜(AFM)、红外光谱(FT-IR)、凝胶电泳(SDS-PAGE)等分析手段对 TGase 改性羊毛蛋白纤维进行表征, 初步讨论了 TGase 对羊毛角蛋白的作用机理。

2 实验

2.1 实验材料与试剂

织物为华达呢毛坯, 无锡协新毛纺厂提供; TGase 粗酶制剂(100 U/g)发酵自制, 电泳纯 TGase 酶液由本研究室纯化得到, 蛋白酶 Savinase 16L(酶活 20000 U/mL)由上海诺维信有限公司提供。

标准蛋白购自华美生物工程公司, 其他试剂均为国产分析纯。

2.2 实验设备与分析仪器

Nexus 富立叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Electron 公司), H-7000 型电子显微镜(日本日立公司), 蛋白质电泳系统(美国伯乐公司), CSPM3300 原子力显微镜(本原纳米仪器有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 织物处理方法

所有织物处理前统一采用洗涤剂洗涤, 处理方法按

收稿日期: 2008-11-07, 修回日期: 2009-01-20

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目(编号: 2008AA02Z203); 国家“十五”科技攻关基金资助项目(编号: 2004BA713B03-02)

作者简介: 崔莉(1972-), 女, 山西省长治县人, 博士, 副教授, 研究方向: 生物技术应用, E-mail: licui@jiangnan.edu.cn; 范雪荣, 通讯联系人, Tel: 0510-85912007, E-mail: wxfxr@163.com.

文献[7].

高锰酸钾预处理方法: 织物热水浸渍→高锰酸钾溶液氧化[KMnO_4 4%(ω), 相对织物, 下同], JFC 1 g/L, pH 3~5, 温度 40 °C, 时间 30 min, 浴比 1:20]→皂洗(45 °C, 15 min)→中和清洗[Na_2CO_3 2%(ω)]→清水冲洗→50 °C 烘干→脱色[NaHSO_3 6%(ω), HAC 1%, 40 °C, 30 min, 浴比 1:20]→冲洗→烘干.

双氧水预处理方法: 织物热水浸渍→过氧化氢溶液氧化[H_2O_2 30 ml/L, Na_2SiO_3 4 g/L, Na_2CO_3 0.2%(ω), pH 8.5, 50 °C, 60 min, 浴比 1:25]→清水冲洗.

TGase 处理方法: 预处理后的织物浸入 TGase 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液[酶活 20 U/g, 润湿渗透剂平平加 O 0.5%(ω), 37 °C, 1 h, 浴比 1:20, pH 6.5]→高温灭酶→冲洗→烘干.

2.3.2 羊毛角蛋白溶液的制备

羊毛角蛋白溶液的制备方法参考文献[11]并稍作改动. 具体过程为: 称取经过高锰酸钾氧化及蛋白酶水解后的羊毛织物 1 g, 剪碎, 用 10 mL 含 0.7 g SDS, 4.8 g 尿素及 0.35 g DTT 的水溶液于 50 °C 提取 5 h, 过滤除去不溶物, 含有角蛋白的溶液以去离子水透析 3 d 除去小分子物质, 即得角蛋白溶液.

2.3.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

制得的角蛋白溶液调节 pH 至 7.0 左右, 经过滤离心除去不溶物质, 测定蛋白含量, 加入电泳纯的 TGase 酶液(20 U/g 蛋白), 以不加酶液的为对照, 分别在 30 °C 保温 1 h, 迅速冷却, 离心除去因絮凝析出的蛋白, 清液参照 Laemmli 方法[12]进行电泳. 分离胶浓度分别为 12%, 以 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 进行染色.

2.3.4 表观形态表征

用傅里叶变换红外光谱仪对羊毛织物进行分析, 分辨率为 4 cm^{-1} . 采用电子显微镜和原子力显微镜进行纤维形貌分析.

3 结果与讨论

3.1 处理后羊毛纤维表面结构的变化

前期研究[7-9]表明, 不经过预处理, TGase 很难对羊毛织物的性能产生影响, 当经过化学试剂或蛋白酶的适当作用后, 则为 TGase 的作用提供了一定的条件. 为了揭示预处理对 TGase 的促进作用及其对羊毛纤维表面形态的影响, 本研究首先采用红外光谱衰减全反射技术对羊毛织物处理前后的结构进行表征.

未经任何处理的羊毛红外图谱(图 1 曲线 a)中, 1600~1700 和 1530~1550 cm^{-1} 分别为 C=O 伸缩振动及 N—H 的弯曲振动产生的酰胺 I 谱带和酰胺 II 谱带, 1390

与 1451 cm^{-1} 附近为 CH_2 和 CH_3 基团 C—H 的变形振动, 1070 cm^{-1} 附近是 C=S 伸缩振动, 其中 1000~1200 cm^{-1} 归属于 S—O 振动区[13,14], 能够提供羊毛表面胱氨酸的氧化产物和氧化中间产物的信息. KMnO_4 氧化预处理和蛋白酶的水解作用使羊毛纤维表面的结构都有变化, 与对照(曲线 a)相比, 经 KMnO_4 预处理的羊毛在 1041 cm^{-1} 处出现了一个吸收峰(图 1 曲线 b), 为磺基丙氨酸(R-SO_3^-)中 S—O 键的伸缩振动, 说明 KMnO_4 氧化处理使羊毛表面的部分二硫键 S—S 氧化断裂形成了氧化产物, 此外, 与对照相比, KMnO_4 和蛋白酶处理后的羊毛 1451 cm^{-1} 处的峰都发生了变化, 可能意味着羊毛表面的部分类脂类物质得到改性或去除, 提高了 TGase 对羊毛角蛋白的可及性, TGase 催化的交联作用改善了羊毛纤维的物理化学稳定性和毡缩性[7-9], 但除了使 1451 cm^{-1} 处的峰略微改变外, 并没有引起羊毛红外光谱的显著变化(图 1 曲线 d, e).

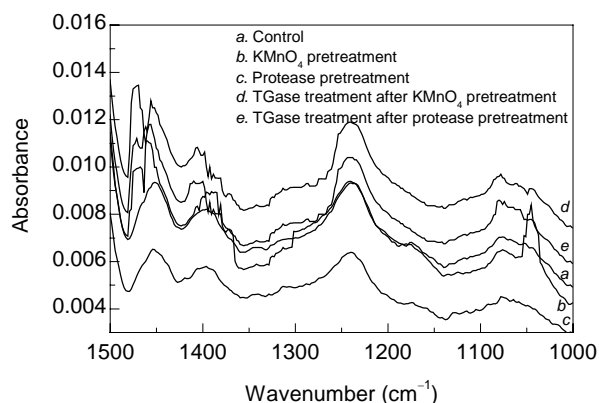


图 1 不同方法处理后羊毛的红外光谱图

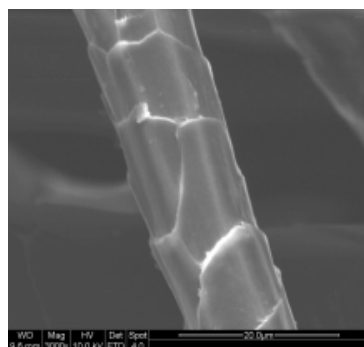
Fig.1 FT-IR ATR spectra of wool after different treatments

3.2 处理后羊毛纤维的微观表面形貌

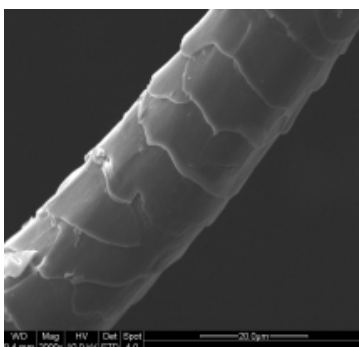
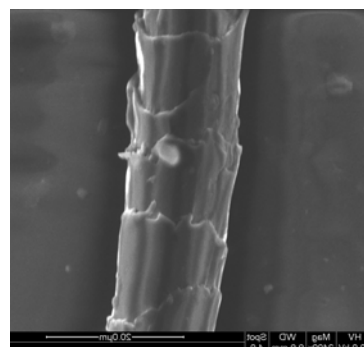
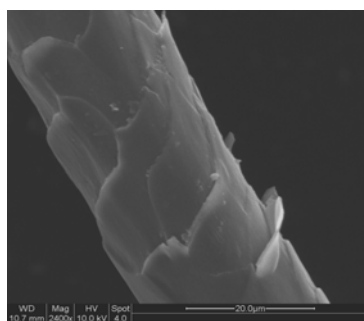
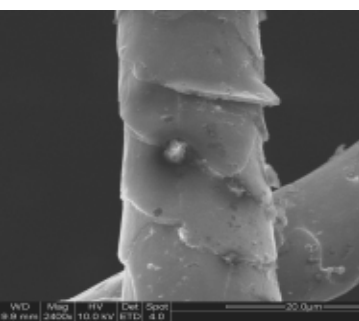
前期研究[7-9]表明, KMnO_4 和蛋白酶预处理可以明显提高 TGase 对羊毛的作用效果, 而氧化剂 H_2O_2 预处理后却很难发挥 TGase 改善纤维性能的作用. 对各种方法处理的羊毛纤维进行电镜扫描, 结果如图 2 所示. 皂洗后不经任何预处理的空白样品, 纤维表面结构完整, 鳞片层的边缘非常清晰[图 2(a)], 经 H_2O_2 氧化处理后, 纤维表面结构变化不大, 偶尔有鳞片破坏, 但大部分仍保持完整结构[图 2(b)]. 当采用 KMnO_4 、蛋白酶或两者结合处理羊毛, 纤维表面的结构发生了明显的变化. 鳞片边缘因受 KMnO_4 的氧化作用和蛋白酶的水解作用而钝化, 在某些区域出现了鳞片翘起, 甚至有些鳞片发生脱落使鳞片边缘变得模糊, 暴露出里面的皮质层[图 2(d)~(f)], 因此这些预处理方法均可使羊毛织物的毡缩性下降, 同时强力受到了损伤[7-9], 纤维表面出现了少

许的片状物质, 应该是受到破坏剥落下来的鳞片层的碎片. 在这些预处理的基础上, 用 TGase 粗酶制剂对纤维进行处理, 通过电镜观察纤维表面结构的变化[图 2(g)~2(i)]. TGase 作用后并没有显著改变由预处理形成的表面形态和结构, 鳞片层结构也未发生明显变化, 但在纤维表面出现了一些新的不同形状和大小的絮凝状

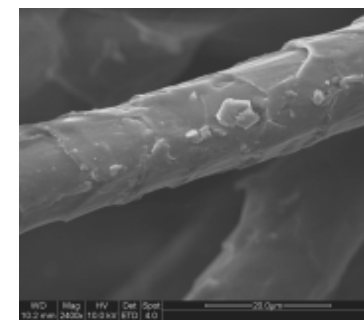
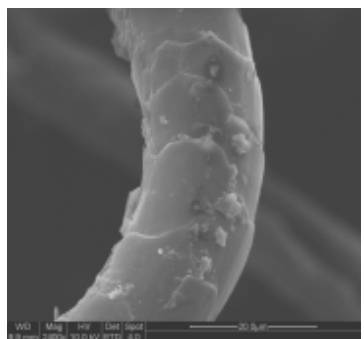
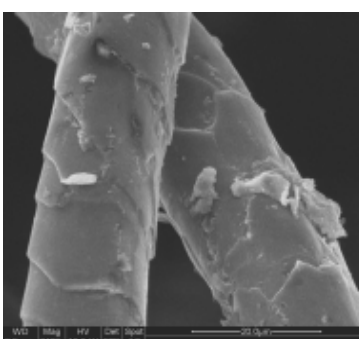
物质, 与上述鳞片碎片结构完全不同. 采用失活的 TGase 粗酶制剂处理后的羊毛表面并没有出现相同的絮凝状物质[图 2(c)], 原因可能是所用 TGase 粗酶制剂中有大量的杂蛋白, 发生交联后连接在了纤维表面所致. 因此鳞片结构受到一定程度的破坏, 为 TGase 的作用和对羊毛纤维改性加工提供了条件.



(a) Control

(b) H₂O₂ pretreatment(c) Inactivated TGase treatment after KMnO₄ pretreatment(d) KMnO₄ pretreatment

(e) Protease pretreatment

(f) KMnO₄ and protease pretreatment(g) TGase treatment after KMnO₄ pretreatment

(h) TGase treatment after protease pretreatment

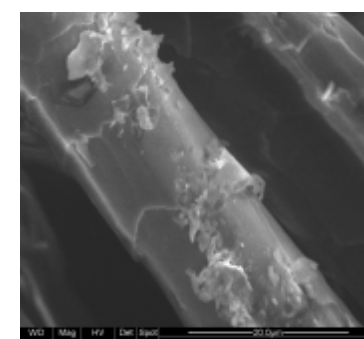
(i) TGase treatment after KMnO₄ and protease pretreatment

图2 不同方法处理后羊毛表面的电镜照片

Fig.2 SEM images of wool fiber samples after different treatments

作为 SEM 分析的有益补充, 原子力显微镜能够表征原子级分辨率的样品表面精细形貌特征^[15]. 图 3 为经过不同方法处理的羊毛纤维表面的 AFM 照片, 表 1 为基于 AFM 的羊毛纤维表面粗糙度分析结果. 从图 3(a)可以看出, 不经任何预处理的羊毛纤维表面相对光滑(最大岭脊高度 160.00 nm, 平均粗糙度为 12.5 nm), 经 KMnO₄ 和蛋白酶预处理后[图 3(b)], 由于纤维表面受到

一定程度的破坏而变得相对粗糙(最大岭脊高度 233.27 nm, 平均粗糙度为 24 nm). 在此基础上, TGase 的粗酶制剂作用后[图 3(c)], 使羊毛纤维呈现出最大粗糙程度的表面形态(最大岭脊高度 288.38 nm, 平均粗糙度为 32 nm), 这很可能是由于酶制剂中杂蛋白交联反应所致. SEM 和 AFM 结果均可证实预处理使纤维表面结构受到一定程度的破坏, 为 TGase 的作用提供了一定的条件.

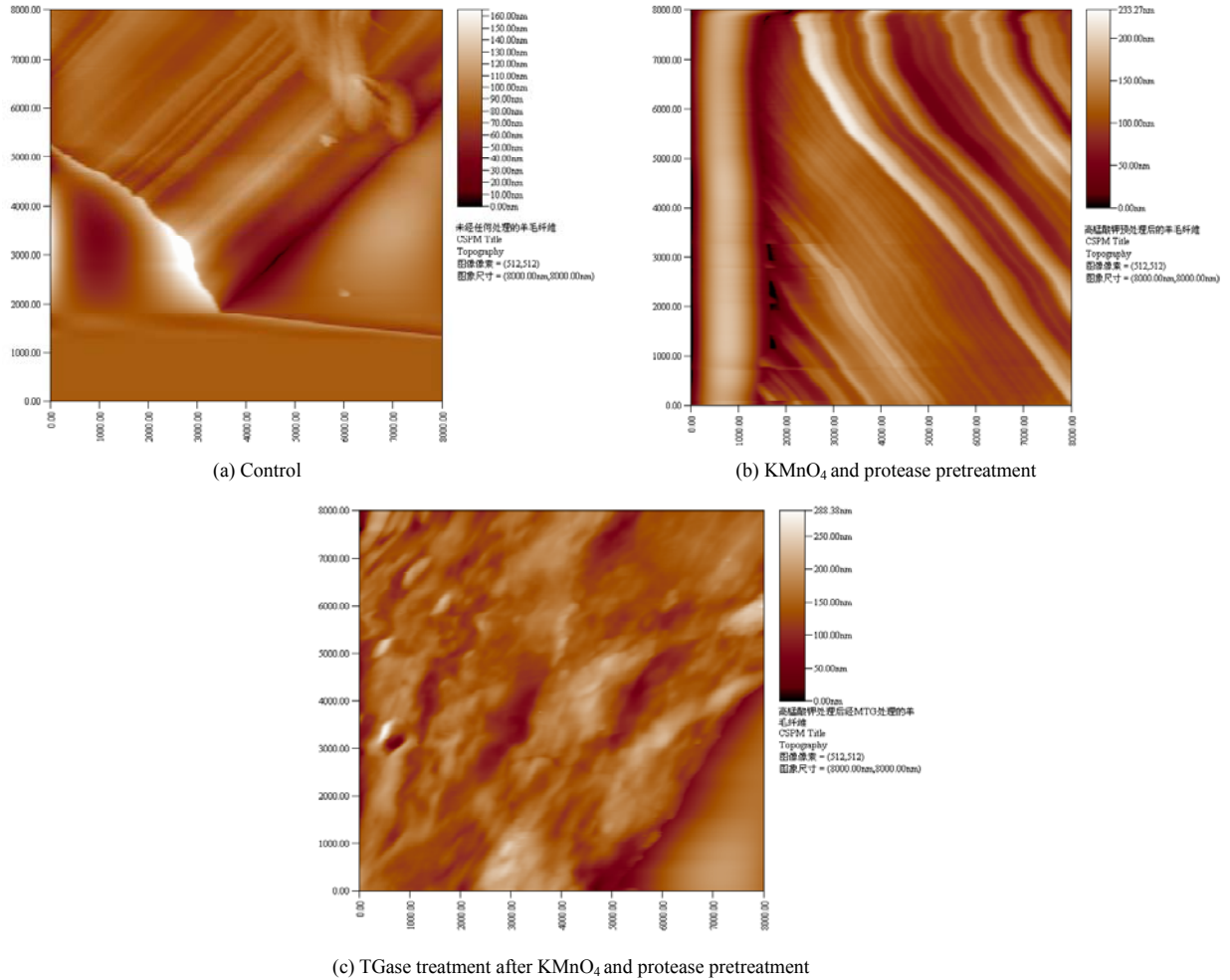


图 3 羊毛纤维的原子力显微镜照片
Fig.3 AFM photographs of wool fibre samples through different treatments

表 1 羊毛纤维表面粗糙度分析

Table 1 Surface roughness analysis of wool fiber

Sample	Average roughness (nm)	Root means square roughness (nm)	Core roughness depth (nm)	Reduced valley depth (nm)
Control	12.5	18.9	21.2	28.2
KMnO ₄ and protease pretreatment	24	30.8	73.3	36.5
TGase treatment after KMnO ₄ and protease pretreatment	32	39.7	106	40.8

3.3 TGase 对羊毛角蛋白交联反应的 SDS-PAGE 分析

从电泳照片(图 4)可以直观地观察到蛋白质被交联前后分子量的变化. 羊毛角蛋白组成非常复杂, 包括分子量范围为 8~60 kDa 的几十种组分. 在角蛋白制备及反应过程中, 有相当多已溶解的蛋白重新絮凝析出, 使清液中蛋白含量很低, 图 4 中 c 带显示角蛋白溶液中成分较少, 在用纯 TGase 处理 1 h 后, 有少量聚合物形成, 由于分子量的增加而滞留在分离胶上部, 有些甚至不能进入分离胶而停留在分离胶和浓缩胶的界面上(图 4 中 b 带). 由于样品处理液中含巯基乙醇和 DTT, 表明聚合物的形成不是因为分子间形成了二硫键, 而是形成共价键. 虽然这种现象远不如食品蛋白被 TGase 交联后的 SDS-PAGE 图谱明显, 但可以说明 TGase 能催化部分

角蛋白分子间发生交联反应.

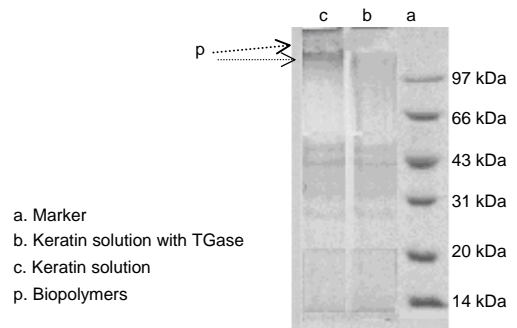


图 4 TGase 催化可溶性角蛋白反应体系的凝胶电泳分析
Fig.4 SDS-PAGE analysis of soluble wool keratin catalyzed by TGase

3.4 谷氨酰胺转胺酶对羊毛蛋白纤维改性机理分析

羊毛蛋白是 TGase 作用的良好底物(图 4), 然而羊毛纤维表面覆盖着一层以共价键形式结合的排列整齐的单层脂层结构, 使羊毛纤维具有很强的疏水性, 因此 TGase 分子很难接触羊毛角质蛋白进行催化反应. 这些疏水性物质可以通过化学试剂, 如氧化还原剂或蛋白酶的水解作用部分被除去, 从而改善羊毛织物的毡缩性和纤维表面的亲水性^[9,16]. 尽管作为氧化剂的 H_2O_2 一定程度上对羊毛表面进行了改性, 但仍保留了羊毛鳞片结构的完整性[图 2(a)], 阻碍了 TGase 分子向纤维内部扩散及催化蛋白之间的交联反应, 因此对羊毛的毡缩性及机械强力影响不大^[7-9].

$KMnO_4$ 可以分布至整个羊毛纤维, 与 H_2O_2 相比可以使更多种类的基团发生氧化反应, 较剧烈地破坏纤维表面结构^[17]; 而蛋白酶处理导致纤维表面的鳞片张开, 可能是因为蛋白酶直接对鳞片之间的细胞间质催化水解, 使鳞片之间结合力减弱. 因此经过 $KMnO_4$ 和蛋白酶处理后的羊毛表面结构均有一定的变化(图 1 曲线 b, c), $KMnO_4$ 与蛋白酶的作用使羊毛鳞片结构变得蓬松, 甚至剥落暴露出皮质层[图 2(d)~2(f)], 这样 TGase 分子能较深入地进入羊毛的皮质层进行反应, 通过 ϵ -(γ -谷氨酰)赖氨酸共价键使蛋白质分子间发生交联, 使羊毛角蛋白分子形成了更为稳定的网状结构, 尽管对羊毛表面的结构未造成显著影响, 但部分恢复了因化学试剂和蛋白酶水解而破坏的织物结构^[7-9], 同时也为外源蛋白和羊毛蛋白之间的交联反应提供了条件, 通过酶促反应将外源蛋白连接至纤维表面[图 2(h), 2(i)和图 3(c)]. 由以上结果可知, 羊毛表面亲水性的改善和鳞片结构被破坏是 TGase 作用的基础.

4 结论

采用 SEM, AFM, FT-IR ATR 及 SDS-PAGE 等分析手段表征了谷氨酰胺转胺酶(TGase)对不同预处理羊毛的改性作用, 得到如下结论:

(1) $KMnO_4$ 氧化预处理主要引起羊毛红外光谱 S—O 振动区($1000\sim 1200\text{ cm}^{-1}$)变化, 蛋白酶预处理及 TGase 的作用没有显著改变羊毛的红外吸收光谱. 与 H_2O_2 预处理相比, $KMnO_4$ 与蛋白酶使羊毛鳞片结构遭到较为剧烈的破坏, 纤维表面的平均粗糙度由 12.5 nm 升高至 24 nm.

(2) TGase 的催化作用虽然未明显改变纤维的表面形态, 但可将外源蛋白交联至纤维表面. SDS-PAGE 电泳分析显示, TGase 可催化羊毛蛋白间通过共价交联形

成聚合物, 这为利用 TGase 的催化作用对羊毛表面进行生物法功能改性提供了一条新的研究思路.

参考文献:

- [1] Carla J S M S, Prabakaran M, Gubitz G, et al. Treatment of Wool Fibres with Subtilisin and Subtilisin-PEG [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, 36(7): 917-922.
- [2] 周爱晖, 范雪荣, 王强, 等. 预处理在羊毛酶法防毡缩中的作用 [J]. *毛纺科技*, 2008, (8): 14-18.
- [3] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J. Microbial Transglutaminase: A Review of Its Production and Application in Food Processing [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, 44(5): 277-282.
- [4] Cortez J, Bonner P L R, Griffin M. Transglutaminase Treatment of Wool Fabrics Leads to Resistance to Detergent Damage [J]. *J. Biotechnol.*, 2005, 116(4): 379-386.
- [5] Cortez J, Anghieri A, Bonner P L R, et al. Transglutaminase Mediated Grafting of Silk Proteins onto Wool Fabrics Leading to Improved Physical and Mechanical Properties [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2007, 40(7): 1698-1704.
- [6] Gembeh S V, Farrell Jr H M, Taylor M M, et al. Application of Transglutaminase to Derivatize Proteins: 1. Studies on Soluble Proteins and Preliminary Results on Wool [J]. *J. Sci. Food Agric.*, 2005, 85: 418-424.
- [7] 崔莉, 范雪荣, 肖王平, 等. 预处理在谷氨酰胺转胺酶改善羊毛织物性能中的作用 [J]. *毛纺科技*, 2006, (11): 9-13.
- [8] 崔莉, 范雪荣, 李艳娟, 等. 微生物谷氨酰胺转胺酶改善羊毛织物性能 [J]. *纺织学报*, 2006, (8): 7-11.
- [9] Du G C, Cui L, Zhu Y, et al. Improvement of Shrink-resistance and Tensile Strength of Wool Fabric Treated with a Novel Microbial Transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2007, 40(7): 1753-1757.
- [10] Cui L, Du G C, Chen J, et al. Effect of Microbial Transglutaminase on Dyeing Properties of Natural Dyes on Wool Fabric [J]. *Biocatal. Biotransform.*, 2008, 26(5): 399-404.
- [11] Yamauchi K, Yamauchi A, Kusunoki T, et al. Preparation of Stable Aqueous Solution of Keratins and Physicochemical and Biodegradational Properties of Films [J]. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1996, 31: 439-444.
- [12] Laemmli U K. Cleavage of Structural Protein During the Assembly of Head of Bacteriophage T4 [J]. *Nature (London)*, 1970, 227: 680-685.
- [13] Wojciechowska E, Rom M, Wlochowicz A, et al. The Use of Fourier Transform-infrared (FT-IR) and Raman Spectroscopy (FTR) for the Investigation of Structural Changes in Wool Fiber Keratin after Enzymatic Treatment [J]. *J. Mol. Struct.*, 2004, 704: 315-321.
- [14] Church J S, Corino G L, Woodhead A L. The Analysis of Merino Wool Cuticle and Cortical Cells by Fourier Transform Raman Spectroscopy [J]. *Biopolymers*, 1997, 42(1): 7-17.
- [15] Birdi K S. Scanning Probe Microscopes: Applications in Science and Technology [M]. Boca Raton: CRC Press, 2003. 86.
- [16] Brack N, Lamb R, Pham D, et al. Nonionic Surfactants and the Wool Fiber Surface [J]. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects*, 1999, 146: 405-415.
- [17] Simpson W S, Crawshaw G H. *Wool: Science and Technology* [M]. Cambridge: Woodhead Publishing, 2002. 221.

Characterization of Wool Fibers Modified by Using Microbial Transglutaminase

CUI Li¹, FAN Xue-rong¹, CHEN Jian², DU Guo-cheng², WANG Ping¹

(1. Key Lab. Science and Technology of Eco-Textile, Ministry of Education, Jiangnan University; Wuxi, Jiangsu 214122, China

2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University; Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: The modification mechanism of wool fibers after different pretreatments with microbial transglutaminase (TGase) was analyzed by SEM, AFM, FT-IR ATR and SDS-PAGE. The results showed that KMnO_4 pretreatment induced the alteration of characteristic peaks at around $1000\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ and the FT-IR absorption spectrum did not change obviously after protease pretreatment H_2O_2 and TGase treatment. The scale structure of wool surface was significantly damaged after KMnO_4 and protease pretreatment in comparison with H_2O_2 pretreatment, which increased the average roughness of fiber surface from 12.5 to 24 nm. The surface morphology of fibers after TGase treatment was not evidently altered, but SDS-PAGE spectrum demonstrated that new biopolymers with higher molecular weight from wool keratin were formed by using TGase.

Key words: transglutaminase; wool; structure