

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2026.06.011

生物相容性抗菌丝胶蛋白-铜纳米酶的制备与性能研究

翟雅莉, 杨庆华, 姜海萍

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘 要:文章以 Cu(II) 螯合改性蚕丝丝胶蛋白(silk sericin, SS), 制备一种具有类过氧化物酶(POD)活性的 Cu@SS, 以实现丝胶蛋白的再利用; 并研究 Cu(II) 对丝胶蛋白结构的影响, 以及 Cu@SS 纳米酶的催化性能、生物相容性和抗菌活性。结果表明, Cu@SS 纳米酶具有类 POD 活性, 以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和过氧化氢(H₂O₂)为底物, Cu@SS 催化反应的米氏常数(K_m)分别为 1.965×10⁻⁴、1.238×10⁻³ mol/L; 细胞实验结果表明, Cu@SS 纳米酶具有良好的生物相容性, 对巨噬细胞 RAW 264.7 无细胞毒性。此外, 在 H₂O₂ 存在下, Cu@SS 纳米酶可以使大肠杆菌(*Escherichia coli*)的相对存活率下降至 45%。因此, Cu@SS 纳米酶具有良好的生物相容性和良好的抗菌性能。

关键词:蚕丝丝胶蛋白(SS); Cu(II) 纳米酶; 类过氧化物酶(POD)活性; 生物相容性; 抗菌性能

中图分类号: TS149

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2026)06-0795-06

Preparation and properties of biocompatible antibacterial sericin-copper nanozymes

ZHAI Yali, YANG Qinghua, JIANG Haiben

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: In this study, silk sericin(SS) was modified by Cu(II) chelation to prepare Cu@SS with peroxidase (POD)-like activity for the reuse of sericin. The effect of Cu(II) on the structure of sericin and the catalytic performance, biocompatibility and antibacterial activity of Cu@SS nanozymes were studied. The results showed that Cu@SS nanozymes had POD-like activity, and their Michaelis constants(K_m) for 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB) and hydrogen peroxide(H₂O₂) were 1.965×10⁻⁴ mol/L and 1.238×10⁻³ mol/L, respectively. Cell experiments showed that Cu@SS nanozymes had good biocompatibility and no cytotoxicity against macrophage RAW 264.7 cells. Furthermore, Cu@SS nanozymes reduced the relative bacterial viability of *Escherichia coli* to 45% in the presence of H₂O₂. Therefore, Cu@SS nanozyme is a good biocompatible material with favorable antibacterial properties.

Key words: silk sericin(SS); Cu(II) nanozymes; peroxidase(POD)-like activity; biocompatibility; antibacterial property

中国是世界上最早发明养蚕缫丝的国家,早在 4 000 多年前便开始使用蚕丝作为纺织材料^[1]。蚕丝纤维由丝素蛋白纤维(silk fibroin, SF)和蚕丝丝胶蛋白(silk sericin, SS)组成^[2]。在传统蚕桑生产与丝绸加工过程中,主要使用 SF,而 SS 则被认为

是蚕丝工业的副产品,在蚕丝进行脱胶工艺处理后常被作为废物丢弃,导致大量天然蛋白资源的浪费与环境的污染^[3-5]。据估计,传统方法处理 1 t 蚕丝将产生 3 t 废水,其中 0.25 t 的 SS 随着废水一同被遗弃。因此,将 SS“变废为宝”不仅有助于环境保

收稿日期:2024-03-20;修回日期:2024-05-07

基金项目:材料复合新技术国家重点实验室开放基金资助项目(PA2021GKSK0010);合肥工业大学产学研校企合作资助项目(W2021JSKF0657)

作者简介:翟雅莉(1999—),女,安徽灵璧人,合肥工业大学硕士生;

杨庆华(1977—),男,安徽宿松人,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者, E-mail: yqhsina@hfut.edu.cn.

护,更能为我国传统特色产业带来新的经济收益。

SS 作为一种富含丝氨酸和天冬氨酸的天然蛋白质,具有良好的生物相容性、生物可降解性、细胞黏附性以及抗氧化性等特性。在医学领域中,SS 常被用作神经修复材料、组织工程支架材料以及皮肤组织修复材料等。近年来的研究表明,以 SS 作为敷料可促进成纤维细胞的黏附、存活和增殖,改善创面修复过程^[6-7]。如将 SS 加入到传统的水凝胶中可以促进纤维细胞增殖,促进肉芽组织和新生血管的形成^[8]。此外,SS 还能与其他材料形成复合材料,应用于创伤修复领域,SS 与植物提取物、银纳米粒子复合制备的水凝胶,可作为创面敷料用于急性期创面的快速愈合^[9]。然而,SS 促进细胞增殖的作用及其弱抗菌的特性一定程度上制约了其在细菌感染治疗中的应用。

本文从脱胶的废弃碱液中提取出天然 SS,通过添加 Cu(II)进行化学改性,实现 Cu(II)与 SS 的螯合,制备具有类过氧化物酶(POD)活性的 Cu@SS 纳米酶,并系统研究了其类 POD 催化性能和抗菌性能,为 SS 废料在生物医学领域中的潜在应用提供了新思路。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

研究用蚕丝为实验室自制;巨噬细胞 RAW 264.7 来自实验室细胞库;碳酸钠(AR)、过氧化氢(AR)均购于国药集团化学试剂有限公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*)、噻唑蓝(MTT)均购于合肥吉象生物技术有限公司;氯化铜(AR)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

本研究所用仪器有:Dura 12 型纯水机(泽拉布仪器科技(上海)有限公司);SC9ENTZ-12N 型真空冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司);GENE-SYS 10S 型紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);EM-30+型扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)(韩国 COXEM 公司);PANalytical X-Pert PRO MPD 型 X 射线衍射仪(X-ray diffractometer, XRD)(荷兰 PANalytical B. V. 公司);PerkinElmer Spectrum 3™型傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)(美国 PerkinElmer 公司)。

1.2 Cu@SS 的制备

1.2.1 SS 的提取

取适量干燥洁净的蚕丝置于烧杯中,加入

0.5% Na₂CO₃ 溶液(浴比为 1:50),水浴煮沸 30 min^[10-11];弃去蚕丝,离心收集上清液后透析 3 d(截留分子量为 8 000~14 000 Da),冷冻干燥后得到 SS 粉末,备用。

1.2.2 Cu@SS 的合成

将 4 mL 1.25% SS 溶液和 1 mL 的 400 mg/mL CuCl₂ 溶液混合,调节 pH 值至 7.4,将混合溶液于 60 °C 条件下加热 3 h;离心收集沉淀,去离子水洗涤 3 次,将沉淀冷冻干燥后得到 Cu@SS 材料,备用。

1.3 Cu@SS 的表征

1.3.1 微观形貌分析

取适量样品粉末贴于粘有导电胶的样品台上,喷金 60 s,采用 SEM 观察样品形貌,测试电压为 10.0 kV。

1.3.2 XRD 分析

取适量样品粉末进行压片制样,采用 XRD 进行测试,其中,靶材为 Cu 靶,电压 40 kV,电流 40 mA,2 θ 扫描范围为 5°~70°。

1.3.3 FTIR 分析

取适量样品粉末进行 FTIR 分析,波数测试范围为 650~4 000 cm⁻¹,分辨率为 4 cm⁻¹,扫描 16 次。

1.4 Cu@SS 的类 POD 活性测定

以 TMB 为底物,测定 Cu@SS 的类 POD 活性,将 10 mmol/L TMB(终浓度为 0.50 mmol/L)、10 mmol/L H₂O₂(终浓度为 2.0 mmol/L)与 PBS 缓冲液混合后,加入 2 mg/mL Cu@SS 溶液(终质量浓度为 0.2 mg/mL)振荡反应;记录该反应体系的紫外吸收光谱形状,并对 TMB 和 H₂O₂ 的浓度、pH 值和温度等反应条件进行优化。

1.5 Cu@SS 的稳态动力学参数分析

将不同体积的 10 mmol/L TMB(终浓度分别为 0、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mmol/L)、0.1 mL 10 mmol/L H₂O₂(终浓度为 2.0 mmol/L)与 PBS 缓冲液(pH 值为 5)混合后,加入 2 mg/mL Cu@SS(终质量浓度为 0.2 mg/mL),测定体系于紫外波长 652 nm 处的吸光度(A_{652})随时间的变化。

将 0.025 mL 10 mmol/L TMB(终浓度为 0.50 mmol/L)、不同体积的 10 mmol/L H₂O₂(终浓度分别为 0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mmol/L)与 PBS 缓冲液(pH 值为 5)混合后,加入 0.1 mL 的 2 mg/mL Cu@SS(终质量浓度为 0.2 mg/mL),测定 A_{652} 随时间的变化。

采用 Michaelis-Menten 方程拟合反应速率和相应的底物浓度,得到以 TMB 和 H_2O_2 为底物的动力学参数米氏常数与最大反应速率^[12-13]的关系式为:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{c} + \frac{1}{v_{\max}}$$

其中: v 为初始反应速率; K_m 为米氏常数; $v_{\max}$ 为最大反应速率; c 为底物浓度。

1.6 Cu@SS 的生物相容性测定

将密度为 2×10^4 个/mL 的巨噬细胞 RAW 264.7 接种到 96 孔板中,每孔 90 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 培养箱中培养 16 h。对照组加入 10 μL $1 \times \text{PBS}$,实验组分别加入 10 μL 不同质量浓度的 SS 或 Cu@SS 溶液,培养 24 h。每孔加入 10 μL 的 5 mg/mL MTT,培养 4 h。弃去孔中液体,加入 200 μL DMSO,振荡 15 min,记录 A_{490} ,计算细胞存活率。每组 5 个平行实验。

1.7 Cu@SS 的抗菌活性测定

配制 LB 琼脂液体培养基,灭菌冷却后倒在平板上,制成固体培养基备用。在不加入或加入 20 μL 10 mmol/L H_2O_2 (终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$) 的水溶液中再加入 100 μL 1×10^5 CFU/mL 的 *E. coli* 菌液,以及不同体积的 2 mg/mL SS 或 Cu@SS 溶液 (终质量浓度为 0、0.05、0.10、0.20 mg/mL);室温孵育 12 h 后,取各组 100 μL 在平板上均匀涂布,以只涂布菌悬液的平板为空白对照。将平板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养 18 h 后进行计数,以细菌存活率来评价各组的抗菌性能。每组 3 个平行实验。

2 结果与讨论

2.1 Cu@SS 的结构分析

通过 SEM 对 Cu(II) 螯合改性前、后 SS 的形貌进行表征,结果如图 1 所示。

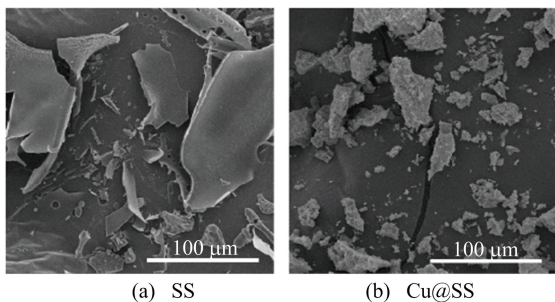


图1 SS 和 Cu@SS 的 SEM 图

从图 1 可以看出,SS 本身呈表面光滑的片

状、部分为块状的结构,而在螯合 Cu(II) 后的 Cu@SS 呈现表面粗糙的不规则块状结构。

据报道,SS 的 XRD 图谱在 2θ 为 19.20°、21.15° 处出现吸收峰^[14-15]。通过 XRD 对 SS 和 Cu@SS 纳米酶的晶型结构进行表征,结果如图 2 所示。

从图 2 可以看出,SS 在 21.60° 处存在明显的衍射峰,而负载 Cu(II) 对 SS 的晶体结构产生显著影响。使用分析软件 Jade 6 对 Cu@SS 与 Cu、 Cu_2O 、CuO、 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 的 XRD 标准图谱进行精准比对后发现,所制得的 Cu@SS 的衍射峰并未与上述任何铜基材料的衍射峰匹配。结果表明,Cu@SS 中的铜并非晶态的氧化铜化合物或金属晶体结构。

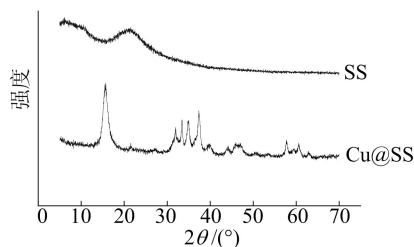


图2 SS 和 Cu@SS 的 XRD 图谱

采用 FTIR 研究螯合 Cu(II) 对 SS 的影响,并对 SS 和 Cu@SS 的红外吸收峰进行分析,得到二级构象的占比,结果如图 3 所示。图 3a 的 FT-IR 谱图表明,在引入 Cu(II) 后,Cu@SS 纳米酶在 3 279 cm^{-1} ($-\text{OH}$ 和 $-\text{NH}_2$) 和 1 643 cm^{-1} ($-\text{COOH}$) 处的特征峰发生分裂和红移,这可能源于 Cu(II) 与 SS 中羟基、巯基、氨基、羧基等基团相配位。

从图 3a 还可以看出,SS 的特征峰位于 1 643、1 526、1 245 cm^{-1} ,分别对应酰胺 I 带 (1 700~1 600 cm^{-1})、酰胺 II 带 (1 600~1 500 cm^{-1}) 和酰胺 III 带 (1 350~1 200 cm^{-1}),其中:酰胺 I 带主要源于 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动;酰胺 II 带吸收峰则来自于 $\text{N}-\text{H}$ 弯曲振动和 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动;酰胺 III 带是由 $\text{C}-\text{N}$ 拉伸和 $\text{N}-\text{H}$ 面内弯曲振动造成的^[16-17]。

为探究 Cu(II) 对 SS 结构的影响,选取酰胺 I 区域进行去卷积拟合,并根据峰面积计算各二级结构的占比,结果如图 3b 所示。由图 3b 可知, β -折叠的占比下降而 β -转角的占比上升。这可能是由于 Cu(II) 与 SS 之间的螯合作用限制了无规则线团和 α -螺旋向 β -折叠构象的转变,从

而使 β -折叠的占比减少^[18]。

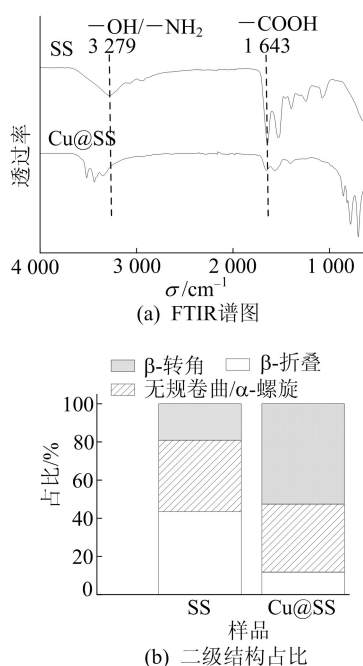


图3 SS、Cu@SS 的 FTIR 谱图及二级结构占比

2.2 Cu@SS 的类 POD 活性分析

本研究使用 H_2O_2 和 TMB 探究 Cu@SS 的类 POD 活性,如图 4 所示。

从图 4 可以看出,在 Cu@SS 存在下,TMB 可被 H_2O_2 氧化为氧化态 TMB(oxTMB),其在 652 nm 处具有显著的紫外吸收峰,表明 Cu@SS 具有良好的类 POD 活性。

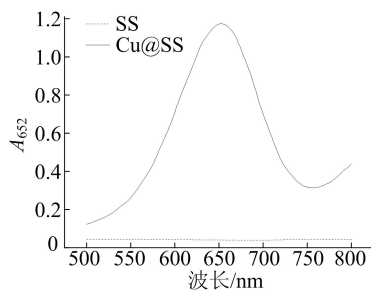


图4 Cu@SS 反应体系的紫外-可见吸收光谱图

本文进一步研究了 Cu@SS 的类 POD 活性与 TMB 浓度、 H_2O_2 浓度、温度和缓冲液 pH 值的关系,结果如图 5 所示。从图 5 可以看出,在 TMB 的终浓度为 0.50 mmol/L、 H_2O_2 的终浓度为 2.0 mmol/L、温度为 35 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 5.0 时,Cu@SS 的催化活性最佳。

为了更好地评价 Cu@SS 的类 POD 活性,本文对 Cu@SS 的催化反应进行动力学分析,并通过 Michaelis-Menten 方程计算 Cu@SS 的 K_m 和

$v_{\max}$,如图 6 所示。

从图 6 可以看出,Cu@SS 以 TMB 和 H_2O_2 为底物,进行催化反应的米氏常数 K_m 分别为 1.965×10^{-4} 、 1.238×10^{-3} mol/L,最大反应速率 $v_{\max}$ 分别为 9.832×10^{-5} 、 8.708×10^{-5} mol/(L·min)。结果表明,Cu@SS 对 2 种底物均有良好的亲和力。

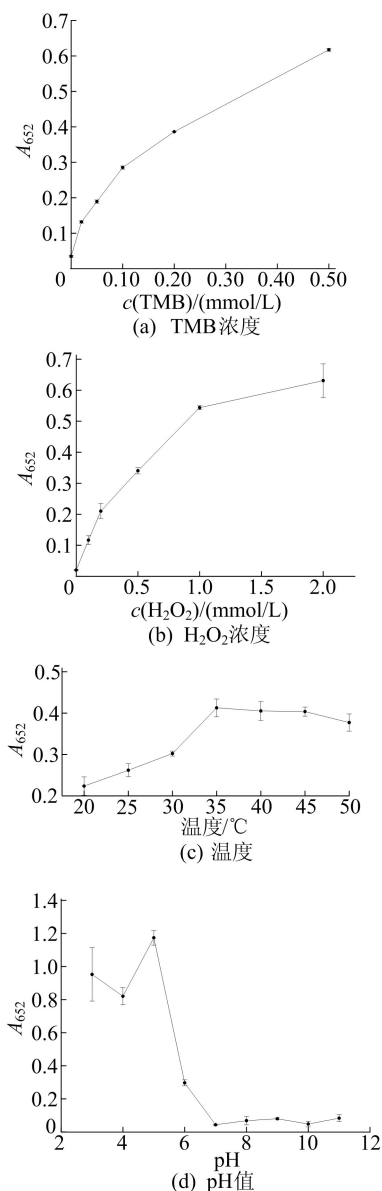
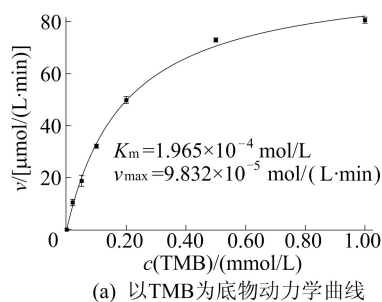
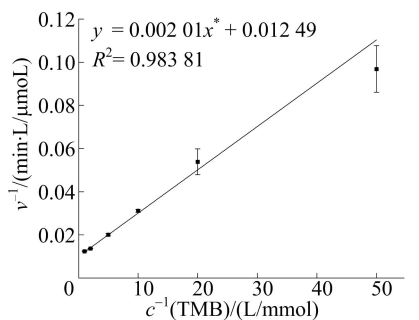


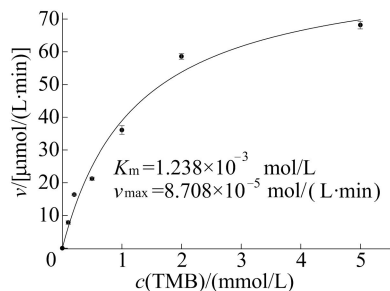
图5 Cu@SS 反应体系的条件优化



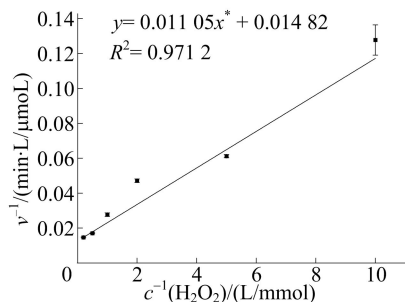
(a) 以 TMB 为底物动力学曲线



(b) 以TMB为底物Lineweaver-Burk图



(c) 以H₂O₂为底物动力学曲线



(d) 以H₂O₂为底物Lineweaver-Burk图

图 6 Cu@SS 反应体系的动力学分析

2.3 Cu@SS 的生物相容性分析

优异的生物相容性对于生物材料的应用十分关键^[19],使用 MTT 法测定 Cu@SS 纳米酶的生物相容性,结果如图 7 所示。图 7 中: * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$; *** 表示 $P < 0.001$; **** 表示 $P < 0.000 1$ 。下同。

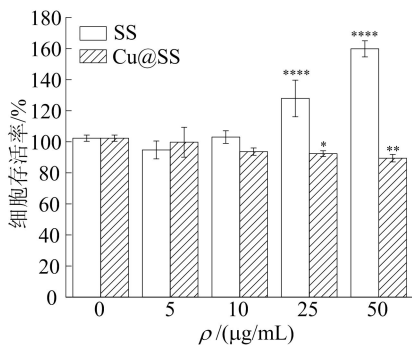


图 7 MTT 法测定 RAW 264.7 细胞的存活率

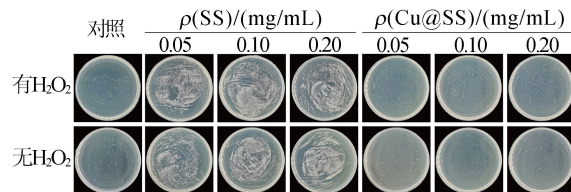
由图 7 可知,SS 质量浓度在 5~50 $\mu\text{g/mL}$

范围内,细胞存活率均超过 90%,且随 SS 质量浓度的提高而增加,其中 SS 质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞存活率约为对照组的 1.5 倍。这表明 SS 不但具有良好的生物相容性和对细胞的保护作用,而且能促进细胞增殖^[20-21]。但 Cu@SS 处理的细胞活力相较于对照组和 SS 组有所下降(均大于 85%),表明 SS 负载 Cu(II)后对细胞的增殖和保护能力下降,但仍然具有较好的生物相容性。

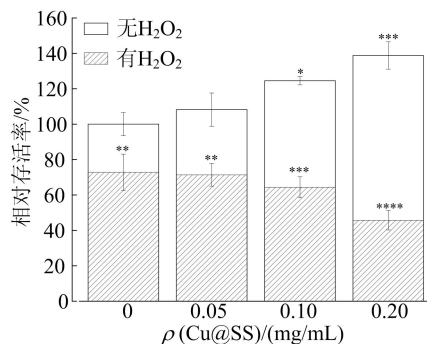
2.4 Cu@SS 的抗菌活性分析

在抗菌领域,具有类 POD 活性的材料可以催化 H_2O_2 产生活性更强的活性氧自由基,因而被视为有前途的杀菌剂。

Cu@SS 纳米酶与 *E. coli* 培养 12 h 后的抗菌效果如图 8 所示,其中未加入 H_2O_2 与 Cu@SS 的为空白组。从图 8 可以看出,SS 在不同质量浓度条件下,无论有无 H_2O_2 ,其菌落数量均明显高于空白组,表明 SS 非但不具有抗菌能力,还为细菌的增殖提供了营养条件。实验结果与文献[22]研究结论相似。

图 8 SS 和 Cu@SS 对 *E. coli* 生长的影响

在有、无 H_2O_2 条件下,Cu@SS 对 *E. coli* 相对存活率的影响如图 9 所示。

图 9 Cu@SS 对 *E. coli* 相对存活率的影响

由图 9 可知:Cu@SS 组在无 H_2O_2 条件下,菌落数略高于空白组,这表明螯合 Cu(II)后 SS 促进细菌增殖的能力减弱;而当加入 H_2O_2 时,不同 Cu@SS 质量浓度组下的菌落数与空白组均有

显著差异,表明 Cu@SS 与 H_2O_2 共孵育后具有抗菌作用,这可能是由于 Cu@SS 具备的类 POD 酶活性催化 H_2O_2 转化为活性氧(reactive oxygen species,ROS)自由基;与空白组相比,Cu@SS+ H_2O_2 组的 *E. coli* 相对存活率为 45%,但考虑到 Cu@SS 对 *E. coli* 具有促增殖作用,仍可认为 Cu@SS 纳米酶具有明显的抗菌效果。

3 结 论

本研究采用碱脱胶法从蚕丝中提取出 SS,SS 与 Cu(II)螯合制备得到 Cu@SS 纳米酶,其具有显著的类 POD 活性,对巨噬细胞 RAW 264.7 也显示了良好的生物相容性。同时,在 H_2O_2 存在的条件下,Cu@SS 对 *E. coli* 显示了有效的抗菌性,且随着 Cu@SS 质量浓度的增加抗菌性能增强。综上所述,Cu@SS 纳米酶是一种具有良好抗菌性能的生物相容性材料,对于蚕丝工业中废弃的丝胶资源的再利用和抗菌材料的开发都具有一定的理论意义和潜在应用价值。

[参 考 文 献]

- [1] 王勤. 近代中国纺织技术发展[D]. 上海: 东华大学, 2022.
- [2] 李温柔. 蚕丝提取物在护肤品中的活性成分分析与开发[J]. 化纤与纺织技术, 2023, 52(11): 21-23.
- [3] 马雅. 不同来源的丝胶蛋白对溃疡性结肠炎口服治疗效果及机制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [4] 吕金凤, 周婵, 曾秀, 等. 脱胶废水回收丝胶的技术方法[J]. 畜禽业, 2020, 31(2): 10-11.
- [5] 蒋恒翔. 脱胶废水中回收丝胶蛋白的电场辅助技术研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2021.
- [6] WANG J, LIU H, SHI X L, et al. Development and application of an advanced biomedical material-silk sericin[J]. Advanced Materials, 2024, 36(23): E2311593.
- [7] WU T, ZHANG G, FANG A, et al. A native sericin wound dressing spun directly from silkworms enhances wound healing[J]. Colloids and Surfaces, B. Biointerfaces, 2023, 225: 113228.
- [8] XUE R, LIU Y, ZHANG Q, et al. Shape changes and interaction mechanism of *Escherichia coli* cells treated with sericin and use of a sericin-based hydrogel for wound healing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(15): 4663-4672.
- [9] MUNIR F, TAHIR H M, ALI S, et al. Characterization and evaluation of silk sericin-based hydrogel: a promising biomaterial for efficient healing of acute wounds[J]. ACS Omega, 2023, 8(35): 32090-32098.
- [10] 夏震然, 李万鑫, 卢神州, 等. 脱胶对蚕丝纤维及再生蚕丝蛋白材料性能的影响[J]. 丝绸, 2022, 59(11): 47-53.
- [11] 冯燕萍, 董志红, 张颖, 等. 丝素蛋白纤维提取技术的研究[J]. 丝绸, 2022, 59(4): 9-15.
- [12] 王雪. 锰钴氧化物仿酶活性及应用研究[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2021.
- [13] 孙京京. Ru 纳米酶的可控制备及其过氧化物酶性能研究[D]. 天津: 天津理工大学, 2023.
- [14] CAO T T, ZHANG Y Q. Processing and characterization of silk sericin from *Bombyx mori* and its application in biomaterials and biomedicines[J]. Materials Science & Engineering, C. Materials for Biological Applications, 2016, 61(7): 940-952.
- [15] RUI C, GANG T, HUA H, et al. One-step synthesis of silver nanoparticles on polydopamine-coated sericin/polyvinyl alcohol composite films for potential antimicrobial applications[J]. Molecules, 2017, 22(5): 721.
- [16] NAYAK S, TALUKDAR S, KUNDU S C. Potential of 2D crosslinked sericin membranes with improved biostability for skin tissue engineering[J]. Cell & Tissue Research, 2012, 347: 783-794.
- [17] TERAMOTO H, MIYAZAWA M. Molecular orientation behavior of silk sericin film as revealed by ATR infrared spectroscopy[J]. Biomacromolecules, 2005, 6(4): 2049.
- [18] 可佳. 纳米银抗菌蚕丝的制备与研究[D]. 天津: 天津大学, 2020.
- [19] 陶刚. 丝胶蛋白创伤修复材料的构建及功能研究[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [20] LAMBONI L, GAUTHIER M, YANG G, et al. Silk sericin: a versatile material for tissue engineering and drug delivery[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(8): 1855-1867.
- [21] 杨梅蓉. 基于丝胶蛋白的抗菌材料及 dsRNA 递送载体的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [22] 毛建萍, 沈卫德. 以丝胶蛋白为细菌培养基主要成分的研究[J]. 丝绸, 2003, 40(11): 25-27, 36.

(责任编辑 闫杏丽)