

微生物转谷氨酰胺酶催化聚合酪蛋白酸钠研究

唐传核 杨晓泉 陈 中 彭志英

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510640)

摘 要 研究了不同条件下微生物转谷氨酰胺酶(MTGase)催化酪蛋白酸钠聚合。结果显示, MTGase 较易催化 α -以及 β -酪蛋白, 而不易催化 κ -酪蛋白, 随着酪蛋白量的不断下降, 而形成的生物聚合物量不断增多。MTGase 催化酪蛋白酸钠聚合的较佳条件如下: 酶量/酪蛋白酸钠比例为 10~20 U/g, pH 6.0~8.0, 最适催化温度为 37~50℃。

关键词 转谷氨酰胺酶 酪蛋白酸钠 聚合 生物聚合物 SDS-PAGE

转谷氨酰胺酶(transglutaminase, E. C. 2.3.2.13, 以下简称为 TGase)能催化酰基转移反应, 从而在蛋白质、多肽以及伯胺之间导入共价键。如果蛋白质中赖氨酸残基的 ϵ -氨基作为酰基受体, 那在分子间以及分子内会形成 ϵ -(γ -Glu)-Lys 键^[1]。

目前, TGase 已用于改性食品蛋白质的功能特性。早在 70~80 年代, 就已有很多学者研究了动物来源的 TGase(特别是豚鼠肝来源)催化动物和植物来源的蛋白质, 包括乳蛋白、大豆球蛋白以及其他蛋白质。通过不同蛋白质之间形成共价交联, 可明显提高了它们的功能特性, 如胶凝性、水化能力等。然而, 由于受酶来源以及价格的限制, 该酶用于食品蛋白质的改性一直进展不大。直至 1993 年, 日本味之素公司首次上市以微生物转谷氨酰胺酶(MTGase)为主的食品用酶制剂, 包括 TG-K、TG-S 和 TG-B, 这一现况才得已解决, 工业上采用 TGase 改性蛋白质成为一种现实。

Ikura 等(1980)^[2]最早研究比较了豚鼠肝 TGase 催化酪蛋白各组份的活性, 发现它更易催化 α_{s1} -或 β -酪蛋白。Fargemand 等(1998)^[3]研究显示 TGase 催化聚合酪蛋白, 在低聚合度时具有较高的稳定性, 而高聚合度时反而会使乳状液失稳。最近, Liu 等(1999)^[4]研究了 MTGase 催化 β -酪蛋白以及

对它乳化性质的影响, 结果显示聚合降低了乳状液的乳化指数, 然而随催化聚合程度的增加, 其稳定性却增加。可见, 两者存在一定的差异。而作者在前文^[5]也研究了 MTGase 催化酪蛋白酸钠聚合以及对其功能特性的影响, 着重研究了不同聚合度对其功能特性的影响, 结果显示聚合程度越高(即催化反应时间越长), 所得到的聚合物的乳化指数越高, 而其乳化稳定性随聚合度先升后降, 4 h 时最高。另外, MTGase 催化酪蛋白酸钠还明显提高其热稳定性。可见, MTGase 催化聚合酪蛋白, 可制备耐热而且具有较好功能特性的生物聚合物。

作者尝试采用 MTGase 催化酪蛋白酸钠聚合制备生物聚合物。本文主要研究不同条件(如酶量/蛋白质比例、pH 以及催化温度)对 TGase 催化聚合酪蛋白酸钠聚合的影响, 以期为进一步制备生物聚合物打下基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

CBZ-*L*-glutaminyglycine 和 *L*-glutamic acid γ -monohydroxamate, Sigma 公司; N-乙基顺丁烯二酰胺(NEM), 上海生化所; 转谷氨酰胺酶商品酶(TG-K), 日本味之素公司; 酪蛋白酸钠(食品级), 新西兰乳品公司; N、N'-二甲叉双丙烯酰胺(Bis), 四甲基乙二胺(TEMED),

MERCK 公司,其它电泳试剂购于上海伯奥生物公司,其它所有化学试剂均为分析级。

1.2 仪器

UVP 凝胶成像系统(White/Ultraviolet Transilluminator),美国;台式高速离心机(Hermle),德国。

1.3 方法

1.3.1 转谷氨酰胺酶的酶活测定

转谷氨酰胺酶的酶活采用 Folk 和 Cole (1965)^[6]报道的分光 Hydroxamate 分析法测量。最终反应物包含 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 6.0, 30 mmol/L CBZ-*L*-glutaminyglycine, 0.1 mol/L hydroxylamine。于 37℃ 与酶溶液反应 10 min 后,添加氯化铁/三氯醋酸试剂(质量浓度为 7 g/L)中止酶反应。离心(8 000 r/min, 15 min)去除沉淀后,所形成的红色于 525 nm 测量其吸光度。用 *L*-Glutamic acid/ γ -monohydroxamic acid 作标准曲线。1 单位转谷氨酰胺酶活力(U)定义为每 min 产生 1 μ mol/L hydroxamic acid 所需的酶量。

1.3.2 十二烷基钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

SDS-PAGE 电泳采用 Laemmli (1970)^[7]的方法,分离胶浓度为 12%,浓缩胶为 3%。样品溶液与 SDS-PAGE 样品缓冲液(含有 5% 巯基乙醇和 2% SDS)直接相混合(体积分数为 1:1),电泳前沸水沸腾 5 min。上样量为 15 μ L,凝胶电泳于恒流下进行,在浓缩胶中为 15 mA,进入分离胶后增加至 20 mA。凝胶染色液采用含有 0.25% 的考马斯亮蓝 R-250,脱色采用高甲醇的醋酸溶液, V(甲醇):V(醋酸):V(水)=277:37:263。

凝胶染色以及脱色后,于凝胶成像系统进行成像处理,同时进行光密度扫描分析。

1.3.3 不同条件下 MTGase 催化聚合酪蛋白酸钠

1.3.3.1 不同酶量/酪蛋白酸钠比例

酶反应体系为溶于 0.05 mmol Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)的 10 g/L 酪蛋白酸钠溶液,含 0.3 g/L 的叠氮钠。添加 TGase 酶量分别为

5、10、20 和 30 U/g 酪蛋白酸钠。反应混合物于 37℃ 下反应 1 h 或 2 h,反应后直接加入电泳样品缓冲液中中止酶反应。SDS-PAGE 后,进行光密度扫描,以各酪蛋白组分的相对光密度为纵坐标,不同酶量/蛋白比例为横坐标作图。

1.3.3.2 不同 pH 对聚合的影响

酶反应体系为溶于不同 pH 缓冲液的 10 g/L 酪蛋白酸钠溶液,含 0.3 g/L 的叠氮钠。添加 MTGase 酶量分别为 15 U/g 酪蛋白酸钠。反应混合物于 37℃ 下反应 1 h 或 2 h,反应后直接加入电泳样品缓冲液中中止酶反应。不同 pH 缓冲液配制如下:pH 6.0 ~ 8.0, 0.05 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠;pH 9.0, 0.05 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液。

1.3.3.3 不同温度对聚合的影响

酶反应体系为溶于 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)的 10 g/L 酪蛋白酸钠溶液,含 0.3 g/L 的叠氮钠。添加 MTGase 酶量分别为 15 U/g 酪蛋白酸钠。反应混合物于不同温度(25、37、50、60℃)下分别反应 1 h 和 2 h,反应后直接加入电泳样品缓冲液中中止酶反应。SDS-PAGE 后,进行光密度扫描,以各酪蛋白组分的相对光密度为纵坐标,反应温度为横坐标作图。

1.3.3.4 MTGase 催化酪蛋白酸钠的反应动力学

酶反应体系为溶于 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)的 10 g/L 酪蛋白酸钠溶液,含 0.3 g/L 的叠氮钠。添加 MTGase 酶量分别为 15 U/g 酪蛋白酸钠。反应混合物于不同温度下分别反应 30、60、120、240 min,反应后直接加入电泳样品缓冲液中中止酶反应。SDS-PAGE 后,进行光密度扫描,以各酪蛋白组分的相对光密度为纵坐标,反应时间为横坐标作图,得 MTGase 催化酪蛋白聚合的反应动力学。

2 结果与讨论

2.1 不同酶量与酪蛋白酸钠比例对 MT-

MTGase 聚合的影响

一般来说,酶量/底物比例的大小越大,反应就越快达到终点,反之越慢。综观以前 TGase 催化不同蛋白的研究,选定 5、10、20 和 30 U/g 4 个水平进行实验。图 1 为在该 4 个水平下 MTGase 催化酪蛋白酸钠聚合(催化时间选择 1 h 和 2 h)的 SDS-PAGE 图谱。第 2 条酪蛋白酸钠的电泳带,稍大于 32 ku 的考马斯染色点为 β -酪蛋白,稍低于 31 ku 的为 α -酪蛋白,而处于约 19 ku 的即为 κ -酪蛋白。从此图可看出,随着 MTGase 酶量/酪蛋白酸钠比例不断增大,其 β -酪蛋白和 α -酪蛋白下降越快,而 κ -酪蛋白下降要缓慢得多。与此同时,在浓缩胶的顶部以及分离胶的界面出现较明显的聚合物(由于分子质量大不能进入)。以 β -酪蛋白、 α -酪蛋白和 κ -酪蛋白的相对光密度(相对未经 MTGase 催化的)为纵坐标, TGase/酪蛋白比例为横坐标作图,其结果如图 2 所示。

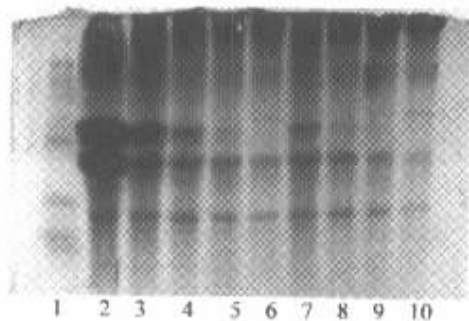


图 1 不同 TGase/蛋白比例催化酪蛋白的 SDS-PAGE

1 为标准分子质量(从下至上,分别为 14.4、21.5、31、40、66、97 ku) 2~6 分别为 0、5、10、20 和 30 U/g 酪蛋白时催化反应 1 h 7~10 为催化反应 2 h。

图 2 显示 MTGase 催化酪蛋白聚合 1 h 时 0~10 U/g 范围内 β -和 α -酪蛋白含量几乎以线性下降,之后下降速趋于平缓,10 U/g 时 β -和 α -酪蛋白含量分别下降 92% 和 85%。而 MTGase 催化聚合 2 h 时,以线性下降的 TGase 酶/酪蛋白比例下降至 5 U/g,此时 β -和 α -酪蛋白含量下降分别为 90% 和 81%。可见,即 5 U/g 的酶量催化 2 h 可达到 10 U/g 酶量催化

1 h 的效果。另外,MTGase/酪蛋白酸钠比例超过 10 U/g 时对 MTGase 催化聚合酪蛋白酸钠的影响不大。于是,MTGase 催化酪蛋白酸钠聚合所需的酶量可选择 10~20 U/g。

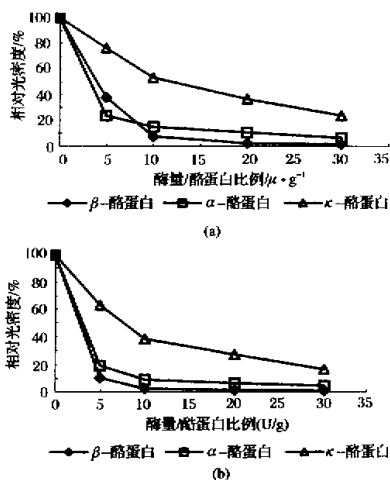


图 2 不同 MTGase/蛋白比例催化酪蛋白的 SDS-PAGE 光密度图
(a) 1 h ; (b) 2 h

2.2 不同 pH 对 MTGase 聚合酪蛋白酸钠的影响

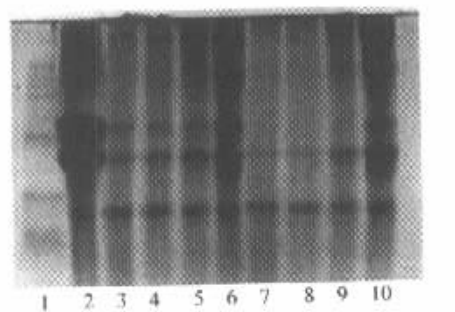


图 3 不同 pH 时 MTGase 催化酪蛋白酸钠的 SDS-PAGE

1 为标准分子质量(从下至上,分别为 14.4、21.5、31、40、66、97 ku) 2~6 分别为 pH 6、7 和 9 时反应 1 h 的电泳带; 7~10 为 pH 6、7、8 和 9 时反应 2 h。

图 3 为不同 pH 时 TGase 催化酪蛋白酸钠聚合的 SDS-PAGE 图谱,结果显示 pH 对 MTGase 催化酪蛋白酸钠的影响较显著。在

pH 6~9 范围之内, pH 越小越有利于 MTGase 催化聚合酪蛋白酸钠, 碱性条件(pH > 8.0)不利于 MTGase 催化。以 β -酪蛋白、 α -酪蛋白和 κ -酪蛋白的相对光密度(相对未经 MTGase 催化)为纵坐标, pH 为横坐标作图, 结果如图 4 所示。

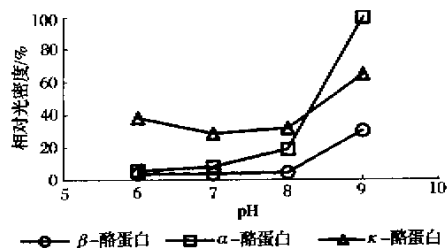


图 4 不同 pH 时 MTGase 催化酪蛋白酸钠的 SDS-PAGE 相应相对光密度(2h)

在 pH 6~9 范围之内, pH 越小越有利于 MTGase 催化聚合酪蛋白酸钠, 碱性条件(pH > 8.0)不利于 MTGase 催化。不过, 不同 pH 值影响 MTGase 催化不同酪蛋白组分的程度有所不同。对此来说, pH 6.0~8.0 内的聚合几乎差不多, 只有大于 pH 8.0 时, 聚合程度才会有所下降。而对于 α -酪蛋白, 发现随着 pH 的增加(pH 6.0~9.0), 其聚合程度呈逐渐下降的趋势, pH 6.0~8.0 内下降较缓, 然而 pH > 8.0 时其聚合程度显著下降。而 MTGase 催化 κ -酪蛋白的场合, 与 β -酪蛋白相类似。在 pH 9.0 时, MTGase 催化 2h, β -酪蛋白和 κ -酪蛋白受 TGase 聚合的量分别为 70% 和 36%, 而 α -酪蛋白几乎不变。可见, pH 值影响 MTGase 催化不同酪蛋白聚合的顺序: α -酪蛋白 > β -酪蛋白 \approx κ -酪蛋白。

pH 值对 MTGase 催化酪蛋白聚合的影响, 究其原因是 MTGase 的催化活性受 pH 值影响的缘故。有文献^[8]指出, 它的最适 pH 范围为 6.0~7.0。这与以上的结果是相吻合的。不过, 需要指出的是, 碱性 pH(> 7.0)对 MTGase 催化酪蛋白聚合的影响要比酸性大得多。另外, MTGase 催化不同酪蛋白受 pH 的影响程度却不一样, 作者推测这可能与不

同酪蛋白在不同 pH 下的溶解度相关。底物溶解度的下降肯定会影响 MTGase 对它的催化, 似乎 α -酪蛋白受 pH 的影响最为明显。

2.3 MTGase 催化酪蛋白酸钠聚合最适温度的确定

对于化学反应, 温度越高, 反应越快, 这是常识。而对于酶反应来说, 还涉及到酶稳定性问题。反应温度越高, 酶反应速度越快, 然而其热变性也剧增(当超过某温度时)。另外, 作者在前文也显示在不同温度下 MTGase 催化酪蛋白聚合的聚合度是有所差异的, 譬如 50℃ 催化 1h 与 37℃ 催化 2h 的效果相同(酪蛋白下降量相同), 但结果形成的酪蛋白聚合物的聚合度会有不同, 也许后者的聚合度更高, 从而两者的功能特性也会有所差异。

本实验选取 25、37、50 和 60℃ 4 个水平来观察 MTGase 对酪蛋白聚合的影响。图 5 为 MTGase 在不同温度下催化酪蛋白酸钠的 SDS-PAGE 图谱。从该图明显地看出, 温度越高, 反应越快, 即 α 和 β -酪蛋白的下降越快。室温(25℃)下, 可清楚地观察到 MTGase 催化酪蛋白聚合的进程, 0~2h 范围

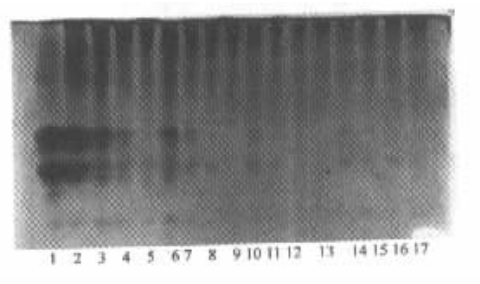


图 5 MTGase 在不同温度下催化酪蛋白酸钠的 SDS-PAGE

1 为未经 TGase 催化的酪蛋白酸钠电泳带, 2~5、6~9、10~13 和 14~17 分别为 25、37、50、60℃ 下 MTGase 催化 0.5、1.0、2h 和 4h 时的电泳带。

内 α 和 β -酪蛋白受 MTGase 聚合几乎呈直线下降(见 2.4 节)。而较高温度下, 在较短时间之内呈直线下降, 之后趋于平缓。可见, 在室温下, 尽管 MTGase 催化酪蛋白聚合的速度慢一点, 但温度对 TG 活性的影响几乎很小。

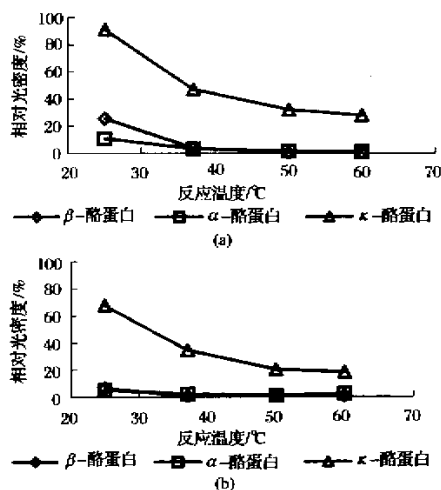


图 6 不同反应温度下 MTGase 催化酪蛋白聚合的 SDS-PAGE 的对应相对光密度图
(a) 1 h; (b) 2 h

MTGase 催化酪蛋白聚合 1 h 时,不同反应温度对它的影响是较显著的(如图 6(a)),不同酪蛋白组分的聚合程度都随反应温度的增加而增加。37 ~ 60℃ 范围之内, α -以及 β -酪蛋白的量几乎已全部聚合(1 h),这里看不出不同温度对它的影响。相对来说, κ -酪蛋白不易受 MTGase 的催化,可清楚地看到不同反应温度对 MTGase 催化它的影响(如图 6)。我们就以 κ -酪蛋白为例,探讨不同反应温度下 MTGase 催化酪蛋白聚合的效率。比较催化 1 h 和 2 h 的 κ -酪蛋白相对光密度,以 $\Delta OD/OD_{1h}$ 为指标来评价 MTGase 在不同温度下催化酪蛋白的效率(其中 ΔOD 为 κ -酪蛋白在 1 h 和 2 h 是相对光密度的差,而 OD_{1h} 则为 1 h 时的相对光密度)。通过计算,得 $\Delta OD/OD_{1h} \sim t$ 相关图(如图 7)。从该图可见,50℃ 时 MTGase 催化 κ -酪蛋白聚合的效率最好,温度低于 50℃ 时其催化效率($\Delta OD/OD_{1h}$)随温度的增加而增加,而超过 50℃ 时反而有所下降。推测超过 50℃ 时,MTGase 的热失活已较明显。于是,MTGase 催化酪蛋白聚合的最佳反应温度为 50℃。

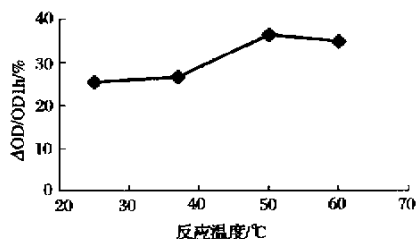


图 7 κ -酪蛋白的 $\Delta OD/OD_{1h} \sim t$ 相关图

2.4 MTGase 催化酪蛋白聚合的反应动力学

MTGase 在不同反应温度下催化 α -、 β -以及 κ -酪蛋白聚合,其含量随反应时间的变化见图 8 所示(根据图 5 的 SDS-PAGE 相对光密度)。不同酪蛋白经 MTGase 的聚合催化,其含量(光密度)随反应时间不断下降。其中, β -酪蛋白下降最为迅速, κ -酪蛋白最慢,可见 β -酪蛋白最易受 MTGase 的催化,而 κ -酪蛋白最不易受 MTGase 的催化。

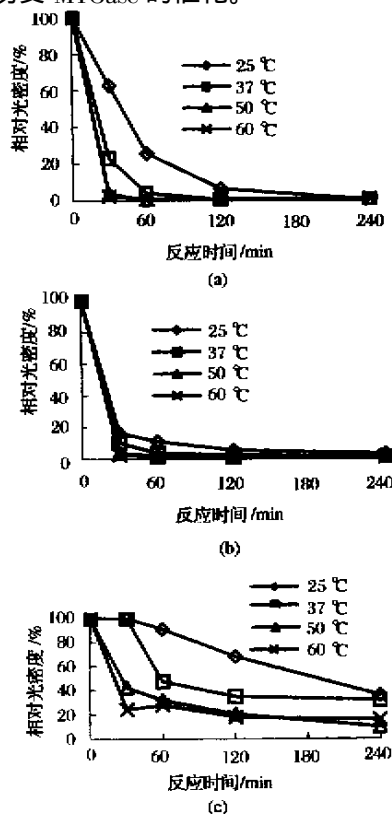


图 8 MTGase 催化酪蛋白聚合的时间变化图
(a) α -酪蛋白 (b) β -酪蛋白 (c) κ -酪蛋白

参 考 文 献

- 1 Motoki M, Seguro K. Trends Food Sci. Technol. , 1998(9) 204 ~ 210
- 2 Ikura K et al. Agric. Biol. Chem. , 44(7) : 1567 ~ 1573
- 3 Faergemand M et al. Int. Dairy Journal , 1998 , 111 : 715 ~ 723
- 4 Liu M X et al. J. Agric. Food Chem. , 1999 , 47 : 1514 ~ 1519
- 5 唐传核等. 转谷氨酰胺酶催化酪蛋白酸钠以及对其功能特性的研究, 中国食品学报 , 待发表
- 6 Folk J E et al. J. Biol. Chem. , 1965 , 240 : 2951 ~ 2960
- 7 Laemmli U K. Nature , 1970 , 227 : 680 ~ 685
- 8 添田孝彦. 食品と开发 , 1993 , 28(10) : 42 ~ 45

Study on the Polymerization of Sodium Caseinate Catalyzed by Microbial Transglutaminase

Tang Chuanhe Yang Xiaoquan Chen Zhong Peng Zhiying

(Institute of Food and Bioengineering , South China University of Technology , Guangzhou , 510640)

ABSTRACT The polymerization of sodium caseinate by microbial transglutaminase (MTGase) at different conditions was studied. It was shown that α - and β -caseinate were more easily catalyzed by MTGase than κ -caseinate , and the biopolymer of sodium caseinate increased as the amount of caseinate declined. The appropriate conditions of MTGase to catalyze the sodium caseinate was followed as : the rate of enzyme activities to sodium caseinate at 10 ~ 20 U/g , pH6.0 ~ 8.0 , and the best appropriate temperature at 37 ~ 50 °C .

Key words microbial transglutaminase (MTGase) , sodium caseinate , polymerization , biopolymer , SDS-PAGE

预测 2002 年全球葡萄酒消费将达 25.5 亿箱

日前 ,美国 Impact 统计数据公司出版了一本长达 600 余页、名为《全球饮料市场预测》的行业研究报告 ,该报告根据国际葡萄酒市场现状和发展趋势 ,大胆作出预测 :2002 年 ,全球葡萄酒消费市场将达到 25.5 亿箱 ,比去年增长 1.2% ,预计到 2010 年 ,全球葡萄酒销量还将会增加 1.2 亿箱。

象中国、俄罗斯这样的葡萄酒新兴市场 ,未来葡萄酒消费的增长是完全可以预计到的。美国的这份研究报告让人有些意外的观点是 ,美国、英国、澳大利亚和南非等传统葡萄酒消费大国也被预测将消费更多的瓶装葡萄酒 ,这将令人留神关注。怀疑者认为 ,以南非为例 ,在过去的几年里 ,南非葡萄酒的消费量呈下降趋势 ,白兰地酒消费呈直线下滑的趋势目前似乎刚刚止住。该报告指出 ,作为葡萄酒的生产大国 ,法国和意大利的葡萄酒在国际市场的份额正在逐年减少。20 世纪 80 年代 ,这两个国家分享了全球葡萄酒销量的 45% ,但是到 2001 年 ,这一数字已经下降到了 28%。在葡萄酒新世界中 ,澳大利亚是发展最快的国家。

报告还指出 ,在世界范围内 ,强化及相关类型葡萄酒将继续保持下滑趋势 ,与此同时 ,佐餐葡萄酒将增加其市场份额。目前 ,自然发酵的葡萄酒已占全球葡萄酒销量的 90% 以上。法国的 E&J 葡萄酒公司是世界最大的葡萄酒集团 ,其每年销售 2500 万箱葡萄酒。