

微生物谷氨酰胺转移酶 对大豆分离蛋白凝胶性能的影响

姜 燕, 温其标, 唐传核*

(华南理工大学轻工与食品学院华南理工食物蛋白工程研究中心, 广东广州 510640)

摘要:研究了底物浓度、pH、酶浓度、温度、时间、离子浓度和二巯基苏糖醇 (DTT) 的添加对微生物谷氨酰胺转移酶 (MTGase) 诱导的大豆分离蛋白 (SPI) 凝胶强度的影响。结果表明, 在 SPI 溶液中加入 MTGase, 可以使体系在低温下形成凝胶, SPI 低于 8% 不能形成凝胶, pH 7.0, 酶量为 30U/g 蛋白, 50℃ 水浴加热 1h, NaCl 为 0.6N 时, 均可获得最高的凝胶强度, 添加 DTT 对体系无影响。

关键词: 微生物谷氨酰胺转移酶, 大豆分离蛋白, 凝胶强度

Abstract: The effects of Soy Protein Isolate (SPI) concentration, microbial transglutaminase (MTGase) concentration, pH, reaction temperature and time, ion concentration and dithiothreitol (DTT) on the property of SPI gel induced by MTGase were studied in this work. It is shown that the addition of MTGase to SPI solution can make the system gel in low temperature. When SPI concentration is lower than 8%, it cannot gel. The highest gel strength can be obtained at pH 7.0, 30U MTGase/g protein for 1h at 50℃ and 0.6N NaCl concentration, respectively. The addition of DTT has no effect on SPI gel system.

Key words: microbial transglutaminase (MTGase); soy protein isolate; gel strength

中图分类号: TS201.25 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2006)05-0059-04

谷氨酰胺转移酶 (TGase; EC2.3.2.13; 全称为蛋白质-谷氨酰胺 γ -谷氨酰胺基转移酶) 是一种催化多肽或蛋白质的谷氨酰胺残基的 γ -羟胺基团 (酰基的供体) 与许多伯胺化合物 (酰基的受体) 之间的酰基转移反应的酶^[1]。TGase 可通过胺的导入、交联及脱胺三种途径改性蛋白质。TGase 存在于动物、植物和微生物中, 来自哺乳动物的酶源有豚鼠肝脏及发囊、牛血浆、猪血浆、人类胎盘及表皮、红细胞血浆等。由于

其来源稀有, 分离纯化工艺复杂, 不适合工业化生产, TGase 在工业上的应用受到很大的限制, 直到 Ando (1989)^[2] 从各地土壤中筛选出可产胞外 TGase 的菌株来, 利用微生物来源的 TGase 催化蛋白质交联才得到广泛的研究。目前, 有关 TGase 促进凝胶的形成已相当广泛。Nio 等 (1985, 1986)^[3,4] 报道 α_{s1} -酪蛋白在浓度低于 2% 时不能被 TGase 交联, 而在大于 3% 时可形成坚硬的凝胶; 大豆 11S、7S 球蛋白在浓度低于 5% 时不能被 TGase 交联, 而在大于 8% 时可形成坚硬的凝胶。Chanyongvorakul 等 (1994)^[5] 报道大豆球蛋白和蚕豆球蛋白在 TGase 的作用下, 只有酸性亚基通过形成分子间的交联而被聚合, 而两类球蛋白在 TGase 诱导的交联反应中以相似的方式作用, 大豆球蛋白形成凝胶的速度快, 凝胶的硬度和持水力均高于蚕豆球蛋白。但是, 对于 TGase 交联的大豆分离蛋白 (SPI) 的质构特性方面的研究不是很多, 本文以凝胶强度为指标, 通过对 SPI 溶液的浓度、pH、离子强度、酶的添加量、酶作用温度与时间以及 DTT 添加量等因素的调控, 研究微生物来源的 TGase 对 SPI 凝胶强度的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

微生物谷氨酰胺转移酶 (TG-B) 泰兴市一鸣精细化工有限公司; CBZ-L-glutaminyglycine、L-Gluamic acid γ -monohydroxamate Sigma 公司; 大豆分离蛋白 (SPI) 哈高科。

质构分析仪 TA-XT2i 英国 Stable Micro System; 22PC 分光光度仪 上海凌光科技; 台式高速离心机 (Hermle) 德国; 高速分散均质机 FJ-200 上海标本模型厂; 超声波生化仪 广州省新栋力超声电子设备有限公司。

1.2 实验方法

收稿日期: 2005-08-09 * 通讯联系人

作者简介: 姜燕 (1973-), 女, 博士生, 主要从事食品科学方面的研究。

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (20306008)。

1.2.1 MTGase 酶活性的测定 MTGase 酶活性采用 Folk 和 Cole (1965)^[6]报道的分光 Hydroxamate 分析法测定。反应物 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH6.0, 30mmol/L CBZ-L-glutaminyglycine 0.1mol/L hydroxylamine 于 37℃ 与酶溶液反应 10min 后, 添加氯化铁/三氯醋酸试剂 (0.7% w/v) 终止酶反应, 离心 (8000r/min, 15min) 去除沉淀, 所形成的红色上清液于 525nm 测定其吸光度, 用 L-Glutamic acid r-mono-hydroxamic acid 作标准曲线。1 单位谷氨酰胺转移酶活性 (U) 定义为在 37℃ pH6.0 的条件下每分钟产生 1 μ mol hydroxamic acid 所需要的酶量。

1.2.2 样品处理 定量称取 SPI 于 Tris-醋酸 (pH7.5) 缓冲溶液中, 用玻璃棒搅拌溶解, 使 SPI 浓度达到 10%, 用高速分散均质机使其分散溶解, 然后用超声脱气, 取反应液 5mL 于事先加有 MTGase (20U/g 蛋白) 的称量瓶 (25mm $\times$ 25mm) 中, 分散均匀后于 37℃ 水溶液中保温 1h, 然后将其立即冰浴降温, 贮于 4℃ 下过夜, 测定其凝胶强度。

1.2.3 凝胶强度测定 测定仪器使用 SMS 公司 TA-XT2i 型质构分析仪, 质构的测定采取压缩模式。压缩变形为样品高度的 30%, 探头为 P/0.25SS, 探头下行速度为 1.0mm/s, 检测温度为室温。凝胶的最大破坏力 (即曲线的最高值) 作为凝胶强度。

1.2.4 底物浓度对 MTGase 催化的 SPI 凝胶强度的影响 分别配制 6%、7%、8%、9% 和 10% 的 SPI 溶液, 按 20U/g 蛋白加入 MTGase, 其它条件不变。

1.2.5 pH 对 MTGase 催化的 SPI 凝胶强度的影响 取 8 等份配制好的 10% SPI 溶液 (用蒸馏水配制), 分别调整溶液的 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0, 吸取每个 pH 下分散均匀的溶液 5mL 于事先加有酶液 (20U/g 蛋白) 的称量瓶 (25mm $\times$ 25mm) 中, 其它条件不变。

1.2.6 MTGase 浓度对其催化的 SPI 凝胶强度的影响 固定其它条件, MTGase 添加量为 0、5、10、20、30、40 和 50U/g 蛋白。

1.2.7 酶反应温度与时间对 MTGase 催化的 SPI 凝胶强度的影响 控制酶反应温度分别为 25、37、50、60 和 70℃, 时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 和 3.0h, 其它条件不变。

1.2.8 底物溶液中离子强度对 MTGase 催化的 SPI 凝胶强度的影响 取 10 等份配制好的 10% SPI 溶液, 用 NaCl 调整其离子强度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 和 2.0N, 酶的添加量为 30U/g 蛋白, 其它条件不变。

1.2.9 添加 2-巯基苏糖醇 (DTT) 对 MTGase 催化的 SPI 凝胶强度的影响 DTT 的添加量分别是 0、5、10、20、30 和 40mmol/L, 控制其它条件不变, 酶的添加量为 30U/g 蛋白。

2 结果与分析

2.1 底物浓度对 MTGase 催化的 SPI 凝胶强度的影响

制备大豆蛋白凝胶时通常需要对蛋白质溶液进行加热处理 (90℃ 左右), 目的是让大豆蛋白质充分变性, 暴露出一定数量的功能基团, 即形成氢键的基团和疏水性基团, 便于凝胶网络结构所需氢键和疏水相互作用的形成, 加热对于这些键的形成是必需的。TGase 可以催化大豆蛋白质分子间形成 ϵ - γ -谷氨酰基赖氨酸共价键, 使分子间的网络得到加强, 使蛋白质溶液不经高温加热处理也能形成凝胶。由图 1 可见, TGase 催化 SPI 溶液形成凝胶的最低底物浓度是 8%, 随着底物浓度的增加, 凝胶强度也逐渐增强。浓度为 6% 时不能形成凝胶, 7% 时形成的凝胶很弱, 不在质构仪的测量量程内; 浓度为 10% 时, 凝胶强度最高, 达到 71.20g, 是 8% 时形成凝胶的 3.2 倍。蛋白质凝胶的形成是蛋白质-蛋白质和蛋白质-溶剂的相互作用以及邻近肽链之间的吸引力和排斥力平衡的结果。当蛋白质浓度较低时, 蛋白质-溶剂相互作用占优势, 体系不易形成凝胶。

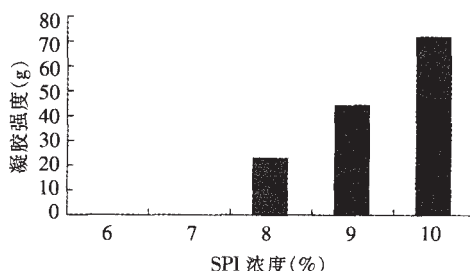


图 1 底物浓度对 MTGase 催化的 SPI 凝胶强度的影响

2.2 pH 对 MTGase 催化的 SPI 凝胶强度的影响

溶液的 pH 是影响凝胶强度的关键因素。由图 2 可见, 在不同 pH 下形成的凝胶, 其强度明显不同。当 pH 为 3.0 时, 蛋白质大量沉淀不能形成凝胶; pH 为 4.0 和 5.0 时, 体系形成的凝胶很弱, 不在质构仪的测量量程内; pH 为 6.0 和 7.0 时凝胶体系的凝胶强度最大, 分别高达 58.9 和 61.1g; pH 高于 7.0, 随 pH 增大, 凝胶强度呈下降趋势; pH 10.0 时形成的凝胶强度仅为 pH 7.0 时的 33.1%。体系 pH 改变一方面影响酶活性和稳定性, MTGase 的最适 pH 范围是 6.0~7.5, MTGase 在 pH 5.0~7.0 范围内相当稳定; pH 小于 4.0 或 pH 大于 9.0 时该酶不稳定, 在 pH 3.0~4.0 于 37℃ 保温几小时酶活损失非常严重^[9]; 另一方面影响 SPI 的溶解性, 影响蛋白质相互作用过程中的疏水作用和静电作用之间的平衡, 进而影响凝胶的网状结构。在极高 pH 下, 酶易失活; 而 pH 为 4.0 和 5.0 时, 正处于 SPI 的等电点附近, 蛋白质分子所带净电荷较少, 易凝结成块, 无法形成有序的网状结构, 且蛋白

质相对紧密,酶很难与所作用的肽键接触,酶活也不稳定,故形成的凝胶强度很低。

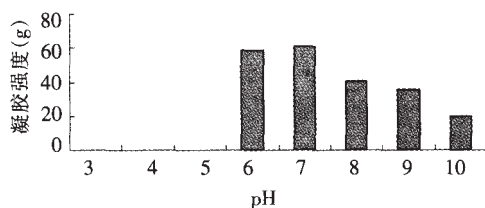


图2 pH对MTGase催化的SPI凝胶强度的影响

2.3 MTGase 浓度对其催化的 SPI 凝胶强度的影响

由图3可见,没有添加TGase的SPI溶液不能形成凝胶,说明低温下制备SPI凝胶必须添加TGase;随着TGase浓度的增加,体系的凝胶强度随之增大;在TGase为30U/g蛋白时,体系的凝胶强度最大,为72.9g,是TGase浓度为5U/g蛋白时所形成凝胶的1.9倍;随后,随着TGase浓度进一步增大,凝胶强度略有降低。Sakamoto^[7]对TGase酶促反应物 ϵ - γ -谷氨酰赖氨酸(GL)的含量进行测定,证实GL的含量随着TGase浓度的升高而升高,这与本实验中低酶浓度时的变化相符。在本实验中,TGase浓度升高到30U/g蛋白时,蛋白质的凝胶强度达到最大值,说明维系蛋白质凝胶网络的稳定所需的共价键的数目具有一定的饱和性。过多的酶量反而不利于凝胶的空间网络,江波^[8]等推测是由于酶体系中可能存在水解酶,导致凝胶破裂强度在高酶浓度时下降。

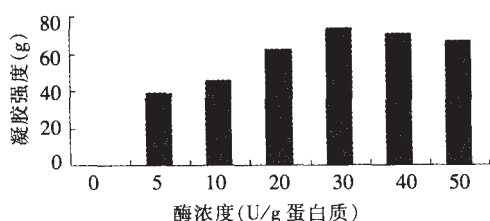


图3 MTGase 浓度对其催化的 SPI 凝胶强度的影响

2.4 酶反应温度与时间对 MTGase 催化的 SPI 凝胶强度的影响

由图4可见,25℃时,随TGase作用时间增加,凝胶强度几乎恒定,与对样品(25℃,0h)的凝胶强度基本相同;37℃水浴加热3h,凝胶强度达到最高值82.2g;50℃水浴加热1h,凝胶强度达到最高值80.0g;60℃水浴加热2h,凝胶强度达到最高值36.2g;70℃时,随作用时间延长,凝胶强度基本恒定,维持在20~22g之间。温度一方面影响酶反应的速度,另一方面影响酶活性。据唐传核^[9]报道,MTGase的最适反应温度为50~55℃,大于60℃时,该酶热失活较严重。这与本实验结果相同,在50℃经过1h反应后的凝胶强度就达到37℃反应3h的水平;在60℃和70℃时,酶严重失活,所形成凝胶强度也很低,其最高值远低于对样品(25℃,0h)的凝胶强度。凝胶强度与反应时间的关系表现为随时间增加凝胶强度增加,达到最高

值,而后稍有下降。这与长时间高温处理酶的失活相关,影响到凝胶在冰箱中过夜的过程中TGase对凝胶网络的作用。

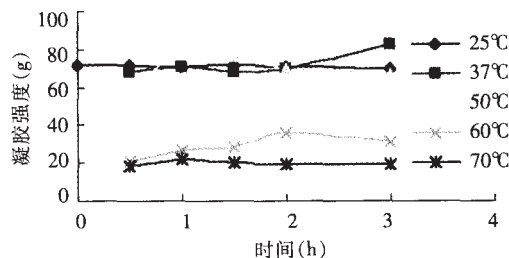


图4 酶反应温度与时间对MTGase催化SPI凝胶强度的影响

2.5 底物溶液中的离子浓度对 MTGase 催化的 SPI 凝胶强度的影响

底物溶液中的离子浓度由0增加到2.0N时,TGase催化的SPI凝胶强度的变化如图5所示。NaCl浓度为0.2~1.6N时,凝胶强度均明显高于离子浓度为0时所形成的凝胶;NaCl浓度从0.2N变化到0.6N时,凝胶强度几乎呈直线增加,0.6N时达到最高值82.4g,比离子浓度为0时所形成的凝胶提高了49.3%;NaCl浓度的进一步增加,凝胶强度略有下降。中性离子对蛋白质分子表面活性基团及水分活度有明显的影响。低盐溶液下,无机盐离子在蛋白质表面上吸附,使颗粒带相同电荷而互相排斥,同时增加了蛋白质的亲水性,改善与水膜的结合,增加了蛋白质分子与溶剂分子的相互作用力,影响了体系中氢键、疏水键和静电的相互作用,使分子间的网络得到加强,提高了凝胶强度。

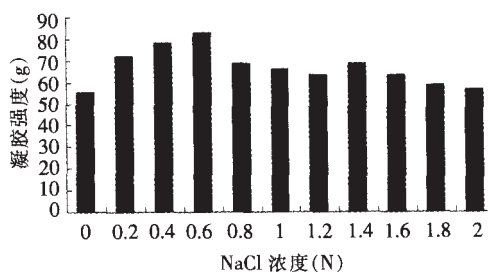


图5 底物溶液中的离子浓度对MTGase催化的SPI凝胶强度的影响

2.6 添加 DTT 对 MTGase 催化的 SPI 凝胶强度的影响

DTT为较强的还原剂,可破坏维持大豆球状蛋白空间结构的二硫键,从而认为它可能提高TGase对大豆蛋白的催化活性。然而,由图6可见,添加DTT对TGase催化SPI凝胶强度的影响不大。有研究显示,10~20mmol/L的DTT可显著地增加TGase对乳清蛋白的催化活性。两者的差别可能是维持乳清蛋白与大豆蛋白(特别是 β -伴豆球蛋白)的空间结构

的方式不一样,前者主要以二硫键为主,其中 β -乳球蛋白有4个二硫键,而 α -乳白蛋白也有2个,而维持 β -伴豆球蛋白的空间结构主要为疏水键。添加DTT,可以使 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白的分子伸展开来,便于酶的作用,而对于大豆蛋白,则可以使其亚基与亚基分开,而亚基仍然为球形结构,因此基本没有改善酶的作用。

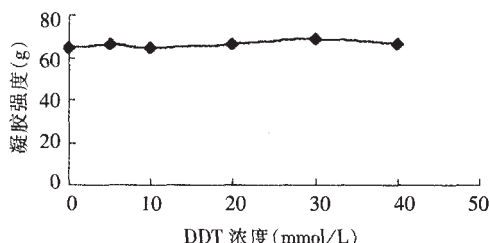


图6 添加DTT对MTGase催化SPI凝胶强度的影响

3 结论

3.1 在SPI溶液中加入MTGase,可以使体系在较低温度下形成凝胶。10%SPI溶液,加入20U/g蛋白,不经过水浴处理,直接在冰箱中过夜,也能形成强度为71.8的凝胶。

3.2 SPI低于8%,加入MTGase不能形成凝胶,pH低于5.0,加入MTGase不能形成凝胶,在pH7.0时,凝胶强度最高;酶的添加量在30U/g蛋白,能够获得最大凝胶强度;50℃水浴作用1h可达到37℃时3h的效果,酶反应最佳温度是50℃;NaCl的浓度为0.6N时,凝胶效果最好;添加DTT对MTGase加入的SPI体系无影响。

(上接第58页) 3 结论

在7℃贮藏条件下,随贮藏时间的延长,样品感官变化陆续表现为“空皮”、“出水、出油”和“胀袋”等腐败特征,同时伴有酸味、臭味等异味产生,样品pH下降,TVB-N值先上升,后下降,TBARS值变化的上升或下降有一定的波动性,但总的变化趋势呈先上升后下降;样品腐败微生物菌群的细菌总数消长规律为初期细菌总数缓慢上升,随后急剧上升,然后趋于稳定,最后下降。

4 讨论

低温熏煮香肠的贮藏特性研究结果表明,从贮藏初期至腐败,低温熏煮香肠的感官变化表现出不同的腐败特征,pH和腐败微生物的消长规律也有一定的变化规律,可见,对腐败样品中腐败微生物的菌相构成和优势腐败微生物的生物学特性进行研究,能够为低温肉制品腐败的控制技术研究提供依据,并具有指导意义。

参考文献:

[1] 李开雄,李应彪,唐明翔.低温肉制品的市场现状及发展对

参考文献:

- [1] Motoki M, Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing[J]. Trends Food Sci Technol, 1998(9):204~210.
- [2] Ando H, Adachi M, Umeda K et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms[J]. Agric Biol Chem, 1989,53:711~716.
- [3] Nio N, Motoki M, Takinami K. Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase [J]. Agric Biol Chem, 1985,48:2283~2286.
- [4] Nio N, Motoki M, Takinami K. Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase[J]. Agric Biol Chem, 1986, 50: 851~855.
- [5] Chanyongvorakul Y, Matsumura Y, Sakamoto H, et al. Gelation of bean 11S globulins by Ca^{2+} -independent transglutaminase [J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(5): 864~869.
- [6] Folk J E, Cole P W. Structural requirements of specific substrates for guinea pig liver transglutaminase [J]. J Biol Chem, 1965, 240(7):2591~2960.
- [7] Sakamoto H, Kumazawa Y, Motoki M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions[J]. J Food Sci, 1994, 59(4): 866~871.
- [8] 江波,周红霞.谷氨酰胺转移酶对火腿肠凝胶性质的影响[J].食品与发酵工业, 2000, 27(4): 1~6.
- [9] 唐传核.酶法聚合食物蛋白质及其改性机理研究[D].广州:华南理工大学博士学位论文, 2002. 31~32.
- [10] 策[J].新疆农垦经济, 2000(1):20~21.
- [11] 董寅初.低温肉制品是我国肉制品发展的总趋势[J].肉类研究, 1997(1):3~5.
- [12] 徐百万.关于我国动物性食品安全的几点认识[A].第三届肉类科技大会论文集, 2001.1~5.
- [13] 余光寿.浅谈禁用“瘦肉精”监控工作的体会及存在问题[J].中国动物检疫, 2002(1):19~20.
- [14] 牛胜田译.2000年的食物链-食品安全是一个世界性的挑战[J].国外医学卫生学分册, 2002, 29(1):1~5, 19.
- [15] Ewen C D Todd. Microbiological safety standards and public health goals to reduce food borne disease[J]. Meat Science, 2003, 66: 33~43.
- [16] Centers for Disease Control and Prevention. Update: multistate outbreak of listeriosis-United States, 1998-1999[J]. Morbidity and Mortality Weekly Reports, 1999, 47 (51):1117~1118.
- [17] De Sousa G B, Tamagnini L M, Olmos P, et al. Microbial enumeration in ready-to-eat foods and their relationship to good manufacturing practice[J]. Journal of Food Safety, 2002, 22: 27~38.