

谷朊粉水解物对微生物谷氨酰胺转氨酶稳定性的影响

彭 灿¹, 常忠义¹, 王疆元², 袁君宜¹, 高红亮¹

(1 华东师范大学 生命科学院, 上海 200062; 2 乐斯福有限公司, 上海 200232)

[摘 要] 为了比较几种多肽类物质对液体微生物谷氨酰胺酶(TGase)热稳定性的影响,利用复合蛋白酶 FV 酶解谷朊粉,制备了不同水解程度的谷朊粉水解物(WGPHs),并对添加了 WGPHs 的 TGase 热稳定性进行了分析。结果表明,添加一定量的谷朊粉水解物能明显提高谷氨酰胺转氨酶的热稳定性,而水解植物蛋白、蛋白胨的添加对 TGase 的热稳定性无影响,大豆低聚肽甚至降低了 TGase 的热稳定性;复合蛋白酶 FV 水解谷朊粉过程中所产生的水解物-小麦肽具有抗氧化能力;添加水解时间为 20 min 的谷朊粉水解物到 TGase 液中,50 ℃ 处理 2 h 后,其酶活残存率为 95.90%,较对照高 30.90%,但随着水解的进行,谷朊粉水解物对提高 TGase 热稳定性的作用减小,甚至降低了 TGase 的热稳定性。由此可见,以谷朊粉水解物作为保护剂,在添加量相同的条件下,水解 20 min 时的谷朊粉水解物保护效果更佳。

[关键词] 谷朊粉水解物;谷氨酰胺转氨酶;热稳定性;还原力

[中图分类号] Q555+.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)08-0171-05

Influence of wheat gluten partial hydrolysates on stability of aqueous microbial transglutaminase

PENG Can¹, CHANG Zhong-yi¹, WANG Jiang-yuan², YUAN Jun-yi¹, GAO Hong-liang¹

(1 School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China; 2 Lesaffre Co. Ltd, Shanghai 200062, China)

Abstract: The influence of different polypeptides on thermal stability of microbial transglutaminase was investigated in the study, Bioprotease FV-assited hydrolysates of wheat gluten with different degree of hydrolysis (DH) was prepared and the variety of themal stability of TGase added by WGPHs was analyzed. The results showed that the thermal stability of TGase was improved by wheat gluten partial hydrolysates(WGPHs), but decreased by the soybean oligo-peptide, and the addition of hydrolyzed vegetable protein or peptone had no effect on the thermal stability of TGase; bioprotease FV-assited hydrolysates of wheat gluten showed the antioxidative capacity. Enzyme activity of the TGase remained at 95.90% after heating at 50 ℃ for 2 hours when the 20 min hydrolysates had been added, 30.90% higher than the control. But the improving effect of WGPHs on thermal stability of TGase decreased with the increase of DH. So, the 20 min WGPHs had the best protective effect when added with the same quantity.

Key words: wheat gluten partial hydrolysate; transglutaminase; thermal stability; reducing capacity

谷氨酰胺转氨酶(Transglutaminase, 简称 TGase)又称转谷氨酰胺酶(蛋白质-谷氨酸-γ-谷氨

酰胺基转移酶, EC2.3.2.13), 其可以催化蛋白质分子内和分子间的交联及蛋白质和氨基酸之间的连

†收稿日期] 2006-07-10

[作者简介] 彭 灿(1982 - 0), 男, 安徽庐江人, 在读硕士, 主要从事食品酶稳定性研究。

[通讯作者] 高红亮(1973 -), 男, 河南林州人, 副教授, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: hlgaobio.ecun.edu.cn

接,并可促进蛋白质分子内谷氨酰胺基的水解,从而提高蛋白质的功能性质及改善蛋白质结构,并能通过引入赖氨酸提高蛋白质的营养价值^[1]。这种酶广泛存在于动物各种组织器官(如肝脏表皮、血液等)及植物和微生物内。天然来源的谷氨酰胺转氨酶往往成本较高,资源相对稀缺,不能满足工业化应用的要求。日本味之素公司早在 20 世纪 90 年代就已经开始利用微生物发酵生产转谷氨酰胺转氨酶并投放于市场^[2],而目前我国国内仅有个别厂家从事该酶的生产,还远远不能满足国内市场需求。

酶的不稳定性是酶商品化的阻碍之一。由于谷氨酰胺转氨酶的活性中心含有巯基基团,在空气中容易被氧化而失去活性,同时该酶还容易受到能引起酶蛋白变性的各种物理、化学、生物学等因素的影响,因此研究该酶的稳定性对该酶的生产 and 利用具有非常重要的意义。

蛋白质和多肽类物质被认为是保护酶稳定性的一种有效物质。一些食品蛋白质同时含有分子内和分子间的交联,如二硫键及酪氨酸类的交联等。酶中加入蛋白质后形成的空间网络状结构,将酶分子包围在其中,同时锁住一定的水分,减少了酶活性被破坏的可能^[3]。一些蛋白质(如酪蛋白)含有酶的作用底物,可在酶的活性中心部位形成疏水结构,以保护酶的催化活性。牛血清白蛋白(BSA)和 β -环糊精经常被用来抑制蛋白质的聚集,提高蛋白质的稳定性^[4]。与蛋白质相比,部分蛋白水解物(多肽类)由于溶解时粘度变化很小,容易控制添加量,故对酶的保护作用具有更高的效率。

本试验比较了几种多肽类物质对液体微生物谷氨酰胺酶的保护作用,并着重研究了添加谷朊粉水解物对液体酶热稳定性的影响,以期对谷氨酰胺酶的进一步工业化生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料 微生物谷氨酰胺转氨酶(酶活 $\geq 1\ 600\ \text{U/g}$)由江苏省泰兴一鸣精细化工有限公司提供;谷朊粉水解物由上海天之冠可再生能源有限公司提供(固体状);谷朊粉市售(蛋白质含量 $800\ \text{g/kg}$);Bioprotease FV ($1\ 000\ \text{LAP/mL}$)由凯瑞公司提供; $\text{N}\alpha\text{-CBZ-Gln-Gly}$ 和 $\text{L-Glu-}\gamma\text{-单羟氧肟酸}$ 由 SIGMA 公司提供;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 添加不同多肽类物质对 T Gase 热稳定性的影响 取 $0.8\ \text{g}$ T Gase 溶于 $15\ \text{mL}$ 的 Tris-HCl (pH

$= 6.0, 0.2\ \text{mol/L}$) 缓冲溶液中,配成酶活约 $100\ \text{U/mL}$ 的酶液,分别添加体积分数 1% 的谷朊粉水解物、水解植物蛋白、蛋白胨、大豆低聚肽,混合均匀,于 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中热处理 $0, 30, 60, 90, 120\ \text{min}$,并以未加入保护剂的酶液作为对照组,稀释 10 倍后测定酶活。

1.2.2 谷朊粉水解物的制备 称取一定量的谷朊粉,边搅拌边加入到一定量的水中,形成体积分数 3% 的分散悬浮液,搅拌 $30\ \text{min}$,调节 pH 值至 7.0 ,调超级恒温水浴器温度至 $50\text{ }^\circ\text{C}$,加入复合蛋白酶 FV (Bioprotease FV) $5\ \text{mL}$ 。每隔 $20\ \text{min}$ 取样 1 次,酶解液于 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴灭酶 $5\ \text{min}$,后冰水浴迅速冷却,用 $0.1\ \text{mol/L}$ NaOH 调 pH 至 7.0 , $3\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $20\ \text{min}$,所得上清液即为所需谷朊粉水解液。

1.2.3 水解不同时间的谷朊粉水解物对 T Gase 热稳定性的影响 称取 $0.25\ \text{g}$ T Gase 溶于 $25\ \text{mL}$ 水中,配成溶液。取 $2\ \text{mL}$ 酶液,加入水解 $20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160\ \text{min}$ 的 $2\ \text{mL}$ 谷朊粉水解液,混匀,取 $1.5\ \text{mL}$ 于 Eppendorf 管中, $50\text{ }^\circ\text{C}$ 热处理 $2\ \text{h}$ 后测定酶活。以不添加谷朊粉水解液作为对照。

1.3 测定项目

1.3.1 T Gase 酶活残存率 酶活的测定采用日本味之素公司提供并经 Pastenack 修正的标准氧肟酸盐测定法^[5]进行。分别取 $2\ \text{mL}$ 试剂 A 液(终浓度为 $0.03\ \text{mol/L}$ $\text{N}\alpha\text{-CBZ-Gln-Gly}$, $0.1\ \text{mol/L}$ 盐酸羟胺, $0.01\ \text{mol/L}$ 盐酸半胱氨酸, $0.2\ \text{mol/L}$ $\text{pH}\ 6.0$ 的 Tris-HCl 缓冲液,配置过程用 $1\ \text{mol/L}$ 的 HCl 调 pH 至 6.0)和 B 液(分别配置 $3\ \text{mol/L}$ 盐酸、 $120\ \text{g/L}$ 三氯乙酸、 $50\ \text{g/L}$ FeCl_3 后,按体积比 $1:1:1$ 的比例混合)加入磨口试管中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 保温 $15\ \text{min}$,加入 $0.2\ \text{mL}$ 酶液,反应 $10\ \text{min}$,在加入 A 液的试管中加 $2\ \text{mL}$ B 液终止反应;加入 B 液的试管加入 $2\ \text{mL}$ A 液,过滤,以第 2 支试管反应液作为空白对照,在波长 $525\ \text{nm}$ 处测定 OD 值。谷氨酰胺转氨酶酶活和残存率的计算公式为:

谷氨酰胺转氨酶活 (U/mL) = $\text{OD}_{525\ \text{nm}} \times 3.5 \times$
稀释倍数;

谷氨酰胺转氨酶活残存率 (%) = (处理后酶活/处理前酶活) $\times 100\%$ 。

1.3.2 水解度(DH)的测定 蛋白质的水解度是指蛋白质水解反应过程中被裂解开的肽键的百分数。水解度的测定采用文献[6]的方法进行。

1.3.3 还原力值的测定^[7-8] 取 $1\ \text{mL}$ 待测谷朊粉水解物,加入 $2.5\ \text{mL}$ $\text{pH}\ 6.6$ 的磷酸盐缓冲液(0.2

mol/L)和 2.5 mL 10 g/L 铁氰化钾溶液,混匀,在 50 ℃ 保温 20 min 后加入 2.5 mL 100 g/L 三氯乙酸,混合后 3 000 r/min 离心 10 min。取上清液 2.5 mL,加 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 1 g/L FeCl_3 ,然后在波长 700 nm 处比色。

2 结果与分析

2.1 不同多肽类物质对 TGase 热稳定性的影响

由图 1 可以看出,随着处理时间的延长,TGase 活力逐渐下降,但 TGase 的失活速度变慢。谷朊粉水解物对 TGase 有很好的保护作用,能提高酶的热稳定性,经过同样的热处理时间,酶活残存率较对照高出 10 % 左右。而水解植物蛋白和蛋白胨对 TGase 几乎无保护作用,处理后的酶活残存率与对照基本保持一致。与对照相比,大豆低聚肽使 TGase 的热稳定性降低,在 50 ℃ 处理 120 min 后其酶活残存率降低了 20.9 %。

2.2 谷朊粉的酶法水解

2.2.1 复合蛋白酶 FV 水解谷朊粉的进程曲线

由图 2 可以看出,在 160 min 的水解过程中,前 20 min 的水解速率最大。随着反应的进行,曲线斜率逐渐减小,表明水解速率逐渐减小,这是因为反应过程中产物的积累抑制了复合蛋白酶的活性。此外,

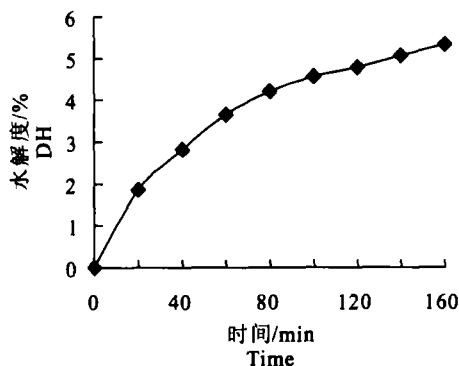


图 2 蛋白酶 FV 水解谷朊粉的进程曲线

Fig. 2 Enzymatic hydrolysis of wheat gluten with Bioprotease FV

2.2.2 谷朊粉酶法水解过程中谷朊粉水解物(WGPHs)还原力的变化 依据 WGPHs 还原能力的测定方法,在波长 700 nm 处测定的吸光值越大,则样品的还原能力越强。由图 3 可以看出,谷朊粉悬浮液本身并无还原力,但在水解过程中,前 20 min 的还原力急剧上升,20 min 以后上升缓慢,40 min 以后还原力趋于平稳。可见,谷朊粉水解所得的小麦肽具有还原力,而一般情况下样品的还原

复合蛋白酶受温度的影响部分失活,也是导致水解速率逐渐减小的原因之一。

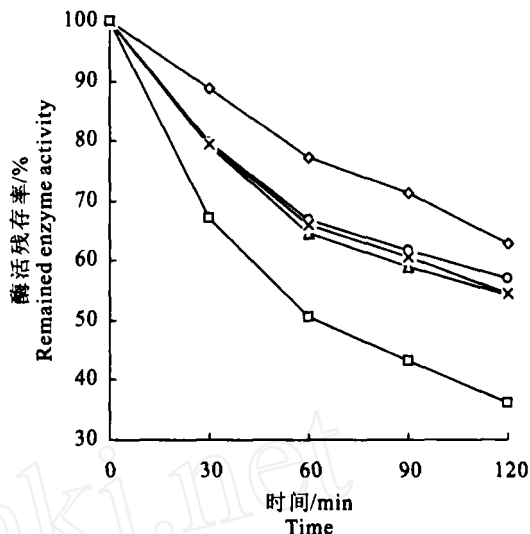


图 1 添加不同多肽类物质对 TGase 热稳定性的影响

—○—对照; —□—谷朊粉水解物; —△—水解植物蛋白;
—×—蛋白胨; —◇—大豆低聚肽

Fig. 1 Effect of different kinds of polypeptide on thermal stability of TGase.

—○—Control; —□—Wheat gluten partial hydrolysate;
—△—Hydrolyzed vegetable protein; —×—Peptone;
—◇—Soybean oligo-peptide

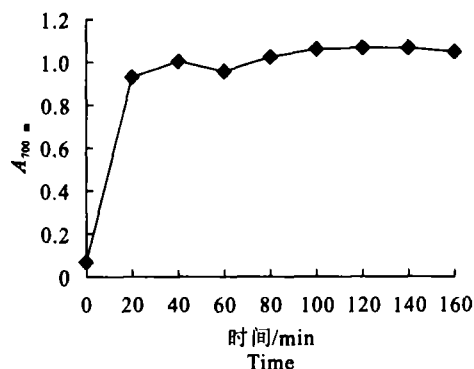


图 3 谷朊粉酶法水解过程中 WGPHs 还原力的变化曲线

Fig. 3 Variety of reducing capacity of WGPHs during enzymatic hydrolysis of wheat gluten

力与抗氧化能力呈正相关^[7],故 WGPHs 具有抗氧化作用。

2.2.3 水解不同时间的谷朊粉水解物(WGPHs)对 TGase 热稳定性的影响 由表 1 可知,添加了水解时间为 20,40 min WGPHs 的 TGase 液在 50 ℃ 热处理 120 min 后,残存酶活均为 90 % 以上,其中水解时间为 20 min 的 WGPHs 对应的酶活残存率为 95.90 %,较对照高出了 30.90 %,大大提高了

TGase 的热稳定性。但随着水解时间的延长, WGPHs 的保护作用逐渐减弱, 水解时间为 140 和 160 min 的 WGPHs 对应的酶活残存率分别为 64.35%, 60.58%, 均低于对照, 即添加水解时间为 140 和 160 min 的 WGPHs 对 TGase 的热稳定性有降低作用, 其原因可能有二: 一是随着水解的进行, 逐渐产生了某种抑制 TGase 活性的物质; 二是随着水解的进行, 产生的小麦肽段越来越小, 无法形成相应的空间网络结构, 从而不能将酶分子包裹在其中而限制蛋白的展开, 导致保护作用逐渐消失。

表 1 添加不同水解时间 WGPHs 对 TGase 热稳定性的影响

Table 1 Effect of WGPHs with different hydrolyzed time on thermal stability of TGase

WGPHs 水解 时间/ min Hydrolyzed time	酶活残存率/ % Remained enzyme activity	酶活提高的百分数/ % Enhanced enzyme activity
CK	65.00 $\pm$ 0.39	
0	68.26 $\pm$ 0.45	3.26
20	95.90 $\pm$ 0.58	30.90
40	92.32 $\pm$ 0.10	27.32
60	89.37 $\pm$ 0.39	24.37
80	82.96 $\pm$ 0.22	17.96
100	74.01 $\pm$ 0.28	9.01
120	68.16 $\pm$ 0.27	3.16
140	64.35 $\pm$ 0.25	- 0.65
160	60.58 $\pm$ 0.28	- 4.42

3 讨 论

谷氨酰胺转氨酶溶液在保藏过程中易被氧化, 且易受温度、微生物的影响。首先, 无论是动物来源的 TGase, 还是微生物来源的 TGase, 其活性中心氨基酸序列均为 Tyr-Gly-Gln-Cys-Trp, 即其活性中心含有 Cys, 在空气中易被氧化而导致酶活的丧失^[9-10]; 其次, 影响 TG 酶稳定性的另一个重要因素就是温度。热动力学认为, 蛋白稳定与否受到焓和熵两个主导参数的相对作用, 这两个参数均依赖于温度, 其中焓值(分子内的相互作用)是固定的, 熵值(损失值, 即天然状态构象熵的损失量)是可变的^[11]。高温诱导使蛋白质的稳定性降低($\Delta G < 0$), 这是由于失活状态较天然状态的自由能减少所致。失活状态的自由能随温度升高而降低, 主要原因是由于熵值的增加^[12]。此外, TGase 溶液相对固体状的 TGase 更难保存, 这是因为在其贮存过程中微生物的生长对该酶的分解利用引起的。有研究表明, 添加一些常用的防腐剂虽然能够阻止微生物的繁殖, 但可能会抑制 TGase 的活性或者危害人体健

康, 而添加 L-聚赖氨酸盐不仅能抑制微生物的生长, 并且该聚合物在人体内能顺利被降解、吸收, 对人体无害^[13]。

本研究结果表明, 在谷氨酰胺转氨酶的保藏中, 添加一定量的(一般为 1%~4%)谷朊粉水解物能明显提高该酶的热稳定性, 而水解植物蛋白、蛋白胨的添加对 TGase 的热稳定性无影响, 大豆低聚肽甚至降低了 TGase 的热稳定性。复合蛋白酶 FV 水解谷朊粉过程中所产生的水解物-小麦肽具有一定的还原能力, 即抗氧化能力; 随着水解的进行, WGPHs 对 TGase 热稳定性的提升作用越来越小, 所以在同样的添加量下, 添加水解时间为 20 min 的谷朊粉水解物保护效果最佳。

蒲首丞等^[14]研究表明, 谷朊粉水解物——小麦肽具有抗氧化能力。这与本研究的结果一致。可见, 添加谷朊粉水解物能有效防止 TGase 活性中心的巯基被氧化, 从而阻止了酶的失活。

谷朊粉水解物对 TGase 酶热稳定性的提高作用随着其水解程度的增加而降低, 其原因可能有二: 一是随着水解的进行, 逐渐产生了某种物质抑制了 TGase 的活性; 二是随着水解的进行, 产生的小麦肽段越来越小, 从而导致其保护作用逐渐消失。

综上所述, 谷朊粉水解物的添加不仅能大大提高 TGase 的热稳定性, 且由于其抗氧化作用使酶更加稳定。谷朊粉水解物的制备工艺简单, 原料廉价、易得, 将会是一种很好的 TGase 保护剂。当然对其的工业化应用仍需做进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, et al. Microbial transglutaminase—a review of its production and application in food processing[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 44: 277-282.
- [2] 寇明钰, 赵国华, 阚健全. 谷氨酰胺转氨酶及其在食品工业中的作用[J]. 中国食品添加剂, 2004, 31(5): 81-84.
- [3] 王 璋, 许时婴, 汤 坚. 食品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 48-69.
- [4] Sah H. Stabilization of proteins against methylene chloride/water interface-induced denaturation and aggregation[J]. J Controlled Release, 1999, 58: 143-151.
- [5] Kutemeyer C, Froeck M, Werlein H D, et al. The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase[J]. Food Control, 2005, 16: 735-737.
- [6] 袁 斌, 吕桂善. 蛋白质水解度的简易测定方法[J]. 广西农业生物科学, 2002, 2(2): 113-115.
- [7] 荣建华, 李小定, 谢笔钧. 大豆肽体外抗氧化效果的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(11): 118-119.

(下转第 179 页)

[参考文献]

- [1] Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF) [J]. *Development Biology*, 1965, 12 (3) :394-407.
- [2] 孙同柱,付小兵,顾小曼,等. 重组人表皮生长因子促进兔烫伤创面愈合的实验研究[J]. *实验动物科学与管理*, 2000, 17 (4) :12-14.
- [3] Yu Z L, Shen B D. The study of human epidermal growth factor in treating peptic ulcer [J]. *Chin J Dig*, 1994, 14 (2) :119-120.
- [4] Zhou L, Wang S L, Ma J L, et al. Recombinant human epidermal growth factor in treatment of 100 cases of burn wounds [J]. *Chin New Drug J*, 2000, 9 (6) :399-401.
- [5] Tang Y H, Wang Q X, Tang Z M. Human epidermal growth factor and its protection in skin [J]. *Chin J Med Aesth Cosmetol*, 2004, 10 (1) :53-55.
- [6] 黄秉仁,蔡良琬,王欣,等. 甲基营养型酵母表达的重组人表皮生长因子的纯化及其性质鉴定[J]. *中国医学科学院学报*, 2001, 23 (2) :106-110.
- [7] 胡大海,陈壁,陈军,等. hEGF cDNA 倒入培养的人角朊细胞及其表达[J]. *第四军医大学学报*, 2000, 21 (5) :642-645.
- [8] 汪炬,余榕捷,徐丽慧,等. 人表皮生长因子融合蛋白在大肠杆菌表达的研究[J]. *安徽大学学报:自然科学版*, 2004, 28 (2) :71-74.
- [9] 颜新敏,孙怀昌,于可响,等. 人表皮生长因子 cDNA 的克隆、原核表达和抗体制备[J]. *扬州大学学报:农业与生命科学版*, 2004, 25 (2) :52-54.
- [10] 智庆文,李前,王淑豪,等. 谷胱甘肽-S-转移酶-人表皮生长因子融合蛋白基因的表达及其产物的生物活性[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2005, 19 (2) :113-117.
- [11] Swartz J R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12 (2) :195-201.
- [12] 王保莉,吴方丽,张涌,等. 人表皮生长因子的基因克隆与原核表达[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2004, 32 (2) :83-86.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆[M]. 2 版. 金冬雁,黎孟枫,译. 北京:科学出版社,1995.
- [14] 路凡,赵忠良,陈南春,等. 底物诱导重组人表皮生长因子的复性[J]. *细胞与分子生物学杂志*, 1998, 14 (3) :228.
- [15] 赵忠良,路凡,陈南春,等. 人表皮生长因子在大肠杆菌中的融合表达与活性分析[J]. *第四军医大学学报*, 1997, 18 (5) :497-498.

(上接第 174 页)

- [8] He Y, Sbdbidi F. Antioxidant activity of green tea and its catechins in a fish meat model system [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45 :4262-4265.
- [9] Kinya W, Keiichi A, Satoshi K, et al. Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* and its expression in *Streptomyces lividans* [J]. *Biosci Biotech Bichem*, 1994, 58 (1) :82-87.
- [10] Shino T, Kinya W, Keiichi A, et al. Chemical synthesis of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* and its expression in *Escherichia coli* [J]. *Biosci Biotech Bichem*, 1994, 58 (1) :88-92.
- [11] Kristjansson M M, Kinsella J E. Protein and enzyme stability: structural, thermodynamic and experimental aspects [J]. *Adv Food Nutr Res*, 1991, 35 :237-316.
- [12] Shortle D. The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability [J]. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1996, 10 :27-34.
- [13] Shinto, Toru, Hiraki, et al. Enzyme stabilization with poly-L-lysine. United States, 5674726 [P], 1997-10-07.
- [14] 蒲首丞,王金水,王亚平,等. 复合蛋白酶水解谷朊粉制备生物活性肽的研究[J]. *食品科技*, 2005, 16 (4) :23-25.