谷氨酰胺转氨酶对大豆蛋白游离伯胺含量的影响

张静洁，周争艳，陈军安，赵征
（天津科技大学食品工程与生物技术学院，天津 300457）

摘要：利用了在巯基乙醇作用下，邻苯二甲醛（OPA）试剂与伯胺可以发生荧光反应，使用荧光分光光度计快速检测溶液中游离伯胺含量。应用此方法研究了加酶量、反应温度、反应时间、及反应pH对谷氨酰胺转氨酶(TGase)作用于大豆分离蛋白后对其游离伯胺含量的影响，并对主要影响因素利用响应面发进行优化，找出TGase反应条件的最佳组合。实验结果表明：加酶量20 U/g，反应温度为52 ℃，反应时间60 min，反应pH 7为TGase最佳反应条件，改性后每克大豆分离蛋白伯胺含量由0.059 μmol减少为0.028 μmol。

关键词：谷氨酰胺转氨酶；大豆分离蛋白；游离伯胺；响应面；荧光分光光度计法

文章篇号：1673-9078(2013)5-998-1002

Effect of Transglutaminase on the Free Primary Amine of Soy Protein Isolate

ZHANG Jing-jie, ZHOU Zheng-yan, CHEN Jun-an, ZHAO Zheng
(College of Food Engineering and Bio-technology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457 China)

Abstract: The content of free primary amine in the solution was determined by spectrophotometric assay according to that o-phthaladehyde (OPA) reagent and primary amine could occur fluorescence reaction. The effect of dosage, reaction temperature, time and pH of transglutaminase (TGase) treatment on the free primary amine of soy protein isolate (SPI) was investigated with this method, and the influencial factors were optimized by response surface method. The results showed that the optimal reaction condition was TGase dosage 20 U/g, temperature 52 ℃, time 60 min and pH 7. After TGase-catalyzed modification, the free amine content of SPI were reduced from 0.059 μmol to 0.028 μmol.

Key word: transglutaminase; soy protein isolate; free primary amino groups; spectrophotometric assay

谷氨酰胺转氨酶（E.C. 2.3.2.13）也称转谷氨酰胺转氨酶，简称 TGase，是一种酰基转移酶，它可以催化肽链上的γ-羧基酰胺基的谷氨酰胺残基（GLN，酰基供体）与伯胺（酰基受体）发生转酰基反应，使得蛋白质分子间或分子内形成 ε-(γ-谷氨酰基)赖氨酸共价键[1~3]。谷氨酰胺转氨酶可催化大豆蛋白、酪蛋白、乳球蛋白、肌球蛋白等蛋白质从而改变蛋白质的结构和功能性质，赋予食品蛋白质特有的质构和口感[4]。Matheis 和 Whitaker[5]的研究表明，蛋白质之间发生交联后可以改善食品质构、溶解性、起泡性、乳化性等功能性质，同时赖氨酸受到保护，防止美拉德反应的发生。Elfadil[6]研究表明谷氨酰胺转氨酶改善大豆蛋白的功能性质优于化学改性的大豆蛋白，同时提出这种改善来源于大豆蛋白分子之间的交联作用。

胺是氨的氢原子被烃基代替后的有机化合物。氨分子中的一个氢原子被烃基取代而生成的化合物，分别称为伯胺（第一胺），它们的通式为：RNH_2-伯胺。胺类广泛存在于生物界，具有极重要的生理作用。氨基酸、肽类、蛋白质、核酸、许多激素、抗生素和生物碱，都含有氨基，是伯胺的复杂衍生物。伯胺可以进行多种化合反应，对有机合成具有重要意义。测定伯胺含量的改变，可以再一定程度上控制反应的进程。

在巯基乙醇的作用下，邻苯二甲醛（OPA）可以与伯胺形成荧光化合物 1-烷硫基-2-烷基异吲哚，因此使用荧光方法可以测定伯胺[7~8]。Swaisgood 和 Catignani[9]使用此方法测定出了谷氨酰胺转氨酶对酪蛋白的反应活性。

本实验以大豆蛋白分离蛋白为原料，应用荧光方法研究谷氨酰胺转氨酶对大豆蛋白分子间的交联作用，为谷氨酰胺转氨酶在蛋白改性应用上提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

谷氨酰胺转氨酶，浙江一名精细化工；大豆分离蛋白（SPI），谷神生物科技集团有限公司；羟胺、还

收稿日期：2013-01-04

作者简介：张静洁（1987-），女，农学硕士，食品加工技术

通讯作者：赵征（1949-），男，教授，食品加工技术

原型谷胱甘肽、Z-Gln-Gly、L-谷氨酸 γ-单氧肟酸、N-α-乙酰-L-赖氨酸购有 sigma 公司；其他试剂均为分析纯级。

荧光光度计(RF-5301)，日本岛津公司；高速离心机，TDL-5-A 上海安亭科学仪器厂。

1.2 酶活的测定

依据 Folk 和 Cole 报道的 Hydroxamate 分析法[10]测定，略有改动。

1.2.1 测定方法

底物溶液（试剂 A）：含有 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 6.0)、0.1 mol/L 羟胺、0.01 mol/L 还原型谷胱甘肽及 0.03 mol/L Z-Gln-Gly 的混合溶液；

终止溶液（试剂 B）：将 3 mol/L 盐酸、12%三氯乙酸及 5% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$(溶解于 0.1 mol/L 盐酸中)等体积混合。

取 0.2 mL 待测酶液（梯度稀释到适宜浓度）加入 2 mL 试剂 A，在 37 ℃下反应 10 min，加入 2 mL 试剂 B，终止反应并形成红色铁化合物。1500 r/min 离心 10 min 后取上清液于 525 nm 处测定吸光值，使用失活的酶液作为对照。

1.2.2 标准曲线的绘制

分别配制 0、2、4、8、16、32 μmol/mL 的 L-谷氨酸 γ-单氧肟酸，取各浓度溶液 0.2 mL，分别加入 2 mL 试剂 A，在 37 ℃下反应 10 min 后加入试剂 B，1500 r/min 离心 10 min 后取上清液 525 nm 处测定吸光值，制定标准曲线。

1.2.3 酶活的定义

在 37 ℃、pH 6.0 的条件下反应 1 min 生成 1 μmol L-谷氨酸 γ-单氧肟酸的量定义为 1 个活力单位。

1.3 谷氨酰胺转氨酶作用大豆蛋白条件的研究

1.3.1 加酶量对大豆蛋白游离伯胺含量的影响

配制 1%（*m*/*V*）大豆分离蛋白分散液，调整 pH 至 7.5，添加谷氨酰胺转氨酶量分别为 4、8、12、16、20、24 U/g SPI，反应物于 55 ℃下反应 60 min。取 0.05 mL 样品加入 2 mL OPA 反应液室温反应 2 min，用于试验测定。

1.3.2 反应温度对谷氨酰胺转氨酶反应的影响

配制 1%（*m*/*V*）大豆分离蛋白分散液，pH 调至 7.5，添加谷氨酰胺转氨酶量 16 U/g SPI，反应物于 25、35、45、55、65、75 ℃下反应 60 min，其他操作参照 1.3.1。

1.3.3 反应时间对大豆蛋白游离伯胺含量的影响

配制 1%（*m*/*V*）大豆分离蛋白分散液，pH 调至 7.5，添加谷氨酰胺转氨酶量为 16 U/g SPI，反应物于 55 ℃下反应 20、40、60、80、100、120 min。其他操作参照 1.3.1。

1.3.4 反应 pH 对大豆蛋白游离伯胺含量的影响

配制 1 %（*m*/*V*）大豆分离蛋白分散液，pH 调至 5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5，添加谷氨酰胺转氨酶量 16 U/g SPI，反应物于 55 ℃下反应 60 min。其他操作参照 1.3.1。

1.3.5 谷氨酰胺转氨酶反应条件优化

对酶谷氨酰胺转氨酶反应条件进行优化。以加酶量、反应温度、反应时间，反应 pH 四个因素为研究对象，取单因素试验中效果较好的的水平作为零水平，确定各因素的间距，水平因素编码表见表 1。

1.4 游离伯胺测定方法

OPA 试剂：80 mg OPA（溶于 2 mL 95 % 乙醇）、50 mL 0.1 M 四硼酸钠（pH 9.5）、5 mL 20 % SDS、50 mL pH 9.5 硼砂缓冲溶液，定容至 100 mL[5]。

与反应液 0.05 mL 加入 2 mL OPA 试剂，涡流混匀，反应 2 min 后迅速测定样品的荧光强度（FI），本实验中激发波长 λ_{ex}=336 nm，λ_{em}=453 nm。以 N-α-乙酰-L-赖氨酸绘制标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 N-α-乙酰-L-赖氨酸标准曲线的绘制

根据 1.4 的方法绘制出 N-α-乙酰-L-赖氨酸的标准曲线见图 1。

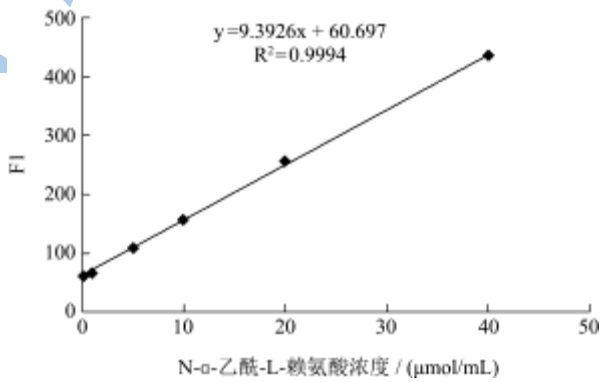


图 1 N-α-乙酰-L-赖氨酸的标准曲线

Fig.1 The standard curve of the N-α-acetyl-L-lysine

2.2 单因素实验结果

2.2.1 加酶量对大豆蛋白游离伯胺的影响

由图 2 看出，随着加酶量增加，大豆蛋白中游离伯胺显著减少，在 20 U/g 时，含量最小，大约减少了 50%；随着加酶量继续增加，伯胺含量有所增加。在 TGase 酶的作用下，谷氨酰胺残基与伯胺发生转酰基作用，形成 ε-(γ-谷氨酰基) 赖氨酸共价键，使得蛋白质分子链发生交联作用。而过多的酶量不利于蛋白质分子空间网络。可能原因是：蛋白质分子表面的作用位点很快被反应，分子内形成交联几率增加，而使得

一部分伯胺被包裹在分子内无法与酶接触，因而降低酶作用效果[11~12]。

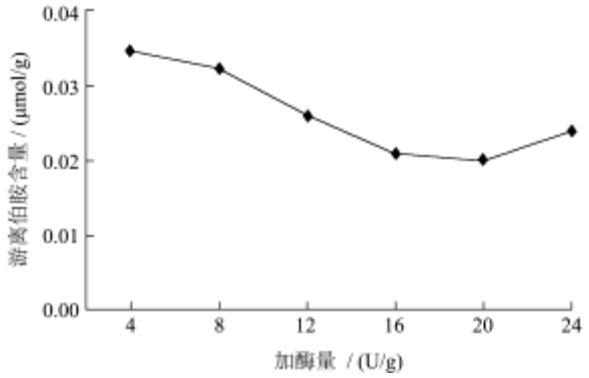


图 2 加酶量对大豆蛋白游离伯胺的影响

Fig.2 Effect of enzyme dosage on free primary amine of SPI

2.2.2 反应温度对大豆蛋白游离伯胺的影响

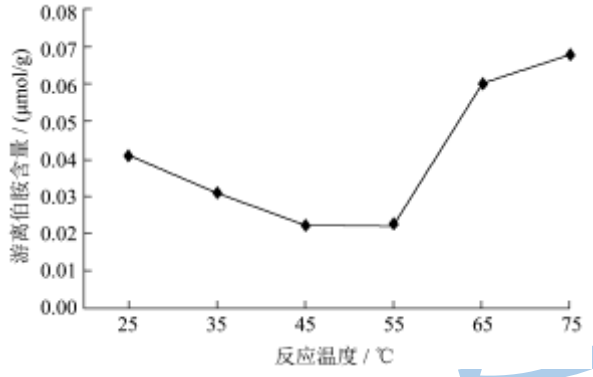


图 3 反应温度对大豆蛋白游离伯胺的影响

Fig.3 Effect of reaction temperature on free primary amine of SPI

由图 3 看出，随着反应温度由 25 ℃升高至 45 ℃时，大豆蛋白中游离伯胺含量显著减少；在 45 ℃~55 ℃时，含量变化不明显；温度继续升高，大豆蛋白中游离伯胺含量又显著增加。Ando[13]等人和 Motoki 等人[14]曾报道，微生物 TGase 酶在 pH=7.0 时，酶的最适反应温度为 40 ℃~55 ℃，本实验与上述结论基本相符合。

2.2.3 反应时间对大豆蛋白游离伯胺的影响

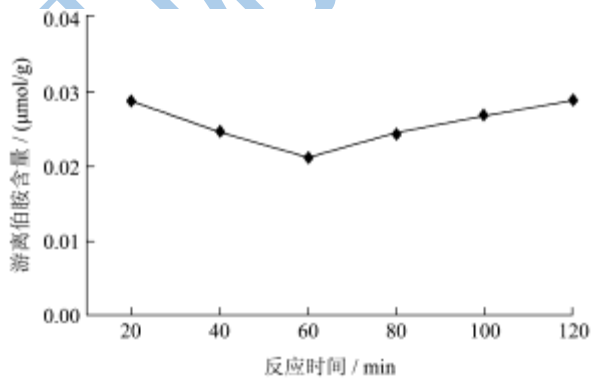


图 4 反应时间对大豆蛋白游离伯胺的影响

Fig.4 The effect of reaction time on free primary amine of SPI

由图 4 可知，反应时间在 20 min~60 min 之间，大豆蛋白中游离伯胺含量显著减少，在 60 min 时，大豆蛋白中游离伯胺含量最低，大约减少了 55%；温度继续升高，大豆蛋白中游离伯胺含量又增加。反应时间对酶促反应有重要影响，随着酶促反应时间延长，底物不断消耗，其浓度逐渐降低，酶也逐渐失活。所以，达到一定程度后催化速度必然减慢。但是，温度对蛋白质也有变性作用，随着反应时间的延长，蛋白质分子被破坏，反应物中伯胺含量有所增加。

2.2.4 反应时间对大豆蛋白游离伯胺的影响

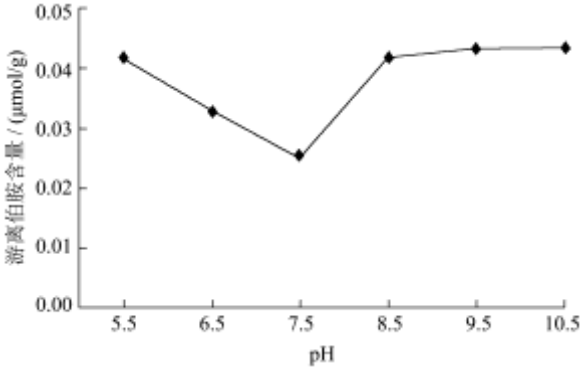


图 5 反应 pH 对大豆蛋白游离伯胺的影响

Fig.5 Effect of reaction pH on free primary amine of SPI

由图 5 可看出，在 pH 5.5~7.5 范围内，随着 pH 值的增加，大豆蛋白中游离伯胺含量显著将低；在达到 pH 7.5 时，大豆蛋白中游离伯胺含量最低；之后，随着 pH 值继续增加，大豆蛋白中有伯胺含量显著增加。研究表明：TGase 酶的最适 pH 值范围是 6.0~7.5，本实验结果与之基本一致。体系 pH 值改变一方面影响酶活性和稳定性，另一方面影响大豆蛋白的溶解性，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。在极端 pH 值条件下，酶蛋白不稳定发生空间构象改而丧失活性；而 pH 值处于大豆蛋白的等电点(4~5)附近时，蛋白质分子所带净电荷较少，易凝结成块，无法于酶发生正常反应[15]。

2.3 谷氨酰胺转氨酶反应条件优化

响应面实验结果如表 2 所示，利用 Design Expert 软件对表 2 数据进行多元回归拟合，得到每克大豆分离蛋白中游离伯胺的含量（Y）对自变量加酶量（X_1）、反应温度（X_2）、反应时间（X_3）和反应 pH（X_4）的二次多项回归模型方程：

$$Y=0.029-2.846\times10^{-3}X_1+0.013X_2+3.691\times10^{-3}X_3+9.649\times10^{-3}X_4+2.277\times10^{-4}X_1X_2-1.082\times10^{-3}X_1X_3-2.277\times10^{-4}X_1X_4-1.452\times10^{-3}X_2X_3+2.467\times10^{-3}X_2X_4+5.692\times10^{-4}X_3X_4+7.328\times10^{-3}X_1^2+0.025X_2^2+0.011X_3^2+8.339\times10^{-3}X_4^2$$

对该模型进行方差分析，结果如表 3 所示。

表 1 响应面设计实验因素水平表

Table 1 Test factors and levels of respond surface analysis

编码水平	X_1 [加酶量 /(U/L)]	X_2 (反应温度/℃)	X_3 (反应时间/min)	X_4 (反应 pH)
1	12	45	30	6.5
0	16	55	60	7.5
-1	20	65	90	8.5

表 2 响应面设计表及实验结果

Table 2 Experimental design and results of RSA

实验	X_1	X_2	X_3	X_4	Y/μmol
1	1	0	0	-1	0.032
2	0	0	1	1	0.061
3	0	0	0	0	0.028
4	0	0	0	0	0.029
5	1	0	-1	0	0.041
6	1	-1	0	0	0.046
7	0	1	0	1	0.087
8	1	0	1	0	0.047
9	0	-1	0	1	0.059
10	1	1	0	0	0.074
11	0	0	-1	1	0.054
12	-1	0	0	-1	0.039
13	-1	0	1	0	0.053
14	0	-1	-1	0	0.047
15	-1	1	0	0	0.080
16	0	0	0	0	0.031
17	0	-1	0	-1	0.042
18	0	0	0	0	0.029
19	0	1	1	0	0.081
20	0	1	0	-1	0.060
21	-1	-1	0	0	0.053
22	0	0	0	0	0.030
23	0	0	1	-1	0.043
24	-1	0	-1	0	0.043
25	0	0	-1	-1	0.039
26	-1	0	0	1	0.059
27	0	1	-1	0	0.075
28	0	-1	1	0	0.059
29	1	0	0	1	0.051

由表 3 方差分析（ANOVA）可以看出，模型 $F=133.82>F_{0.01}(14,21)$，失拟项 $P<0.0001$，表明模型方程极显著，不同处理间的差异极显著；模型的决定系数 $R^2=0.9926$，校正决定系数 Adj $R^2=0.9852$，说明该模型能解释 98.52%响应值的变化，说明该模型拟合程度良好，试验误差小，该模型是合适的，可以用此模型分析和预测反应液吸光度。

从四因素对游离伯胺含量的影响来看，模型一次项 X_1、X_2、X_3、X_4 极显著；二次项 X_1^2、X_2^2、X_3^2、X_4^2 极显著；交互项 X_2X_4 显著，其他均有影响但不显著。数据中没有异常点，不需引入更高次的项，模型恰当。

响应面分析的等高线图和立体图如图 6~11 所示。

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance for regression model

方差来源	偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F 值	P 值
模型	0.0078	14	5.573×10^{-4}	133.8165	<0.0001**
X_1	9.7214×10^{-5}	1	9.7214×10^{-5}	23.3431	0.0003**
X_2	0.0019	1	0.0019	457.4168	<0.0001**
X_3	1.6345×10^{-4}	1	1.6345×10^{-4}	39.2478	<0.0001**
X_4	0.0011	1	0.0011	268.2606	<0.0001**
X_1X_2	2.0743×10^{-7}	1	2.0743×10^{-7}	0.0498	0.8266
X_1X_3	4.6792×10^{-7}	1	4.6792×10^{-6}	1.1236	0.3071
X_1X_4	2.0739×10^{-7}	1	2.0738×10^{-7}	0.0498	0.8266
X_2X_3	8.4289×10^{-6}	1	8.4289×10^{-6}	2.0239	0.1767
X_2X_4	2.4527×10^{-5}	1	2.4527×10^{-5}	5.8894	0.0293*
X_3X_4	1.2961×10^{-6}	1	1.2961×10^{-6}	0.3112	0.5857
X_{12}	3.4833×10^{-4}	1	3.4833×10^{-4}	83.6426	<0.0001**
X_{22}	0.0042	1	0.0042	1009.5184	<0.0001**
X_{32}	7.1537×10^{-4}	1	0.0007	171.7748	<0.0001**
X_{42}	5.8304×10^{-5}	1	0.0005	108.2979	<0.0001**
残差	5.3208×10^{-5}	14	4.1646×10^{-6}		
失拟项	5.0964×10^{-5}	10	5.3207×10^{-6}	4.1761	0.0904
纯误差	0.0079	4	1.2741×10^{-6}		
所有项	0.0077	28			

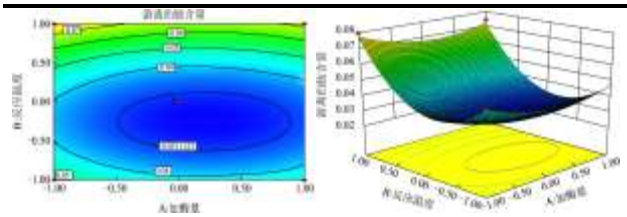


图 6 加酶量和反应温度的等高线图和立体图

Fig.6 Cubic graph and contour line graph of response surface of enzyme dosage and temperature

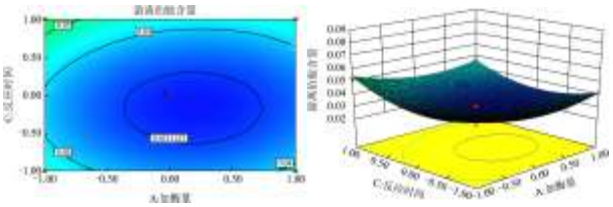


图 7 加酶量和反应时间的等高线图和立体图

Fig.7 Cubic graph and contour line graph of response surface of enzyme dosage and reaction time

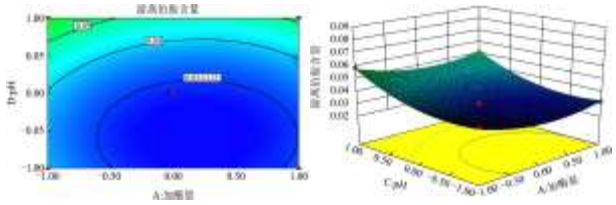


图 8 加酶量和反应 pH 的等高线图和立体图

Fig.8 Cubic graph and contour line graph of response surface of enzyme dosage and reaction pH

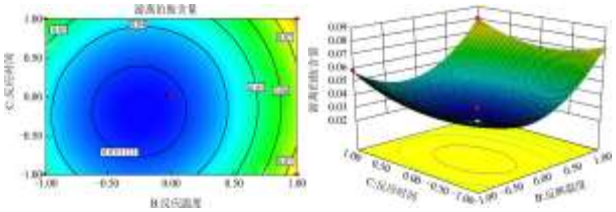


图 9 反应温度和反应时间的等高线图和立体图

Fig.9 Cubic graph and contour line graph of response surface of reaction temperature and time

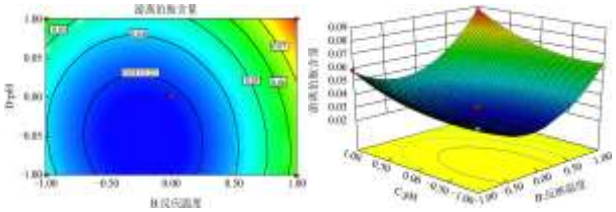


图 10 反应温度和反应 pH 的等高线图和立体图

Fig.10 Cubic graph and contour line graph of response surface of reaction temperature and pH

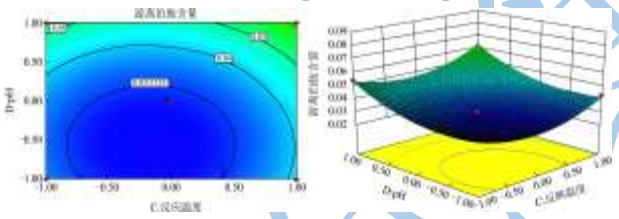


图 11 反应时间和反应 pH 的等高线图和立体图

Fig.11 Cubic graph and contour line graph of response surface of reaction time and pH

由图 6~11 可以看出 X_1、X_2、X_3、X_4 存在极值点，4 个主要因素的最佳水平值分别为加酶量 20 U/g，反应温度为 52.78 ℃，反应时间 53.18 min，反应 pH 6.9，估计响应值 0.0349。考虑到实验的实际情况，故加酶量 20 U/g，反应温度为 53 ℃，反应时间 60 min，反应 pH=7。结果表明，验证试验所得到的游离伯胺含量 0.0356 μmol/g，与回归方程所得的估计响应值 0.0349 接近。说明回归方程能够比较真实地反映各因素对反应液吸光度的影响，由回归方程和验证试验得出酶量 20 U/g，反应温度为 52 ℃，反应时间 60 min，反应 pH 7 为最佳酶反应条件。

3 结论

3.1 由单因素实验得到谷氨酰胺转氨酶转氨酶与 1%大豆分离蛋白反应，最佳条件为：加酶量加酶量 20 U/g，反应温度为 45 ℃，反应时间 60 min，反应 pH 7.5。

3.2 采用响应面优化谷氨酰胺转氨酶转氨酶与 1%大豆分离蛋白反应条件，得到每克大豆分离蛋白中游离伯胺的含量（Y）对自变量加酶量（X_1）、反应温度（X_2）、反应时间（X_3）和反应 pH（X_4）的二次多项回归模型方程：

$$Y=0.029-2.846\times10^{-3}X_1+0.013X_2+3.691\times10^{-3}X_3+9.649\times10^{-3}X_4+2.277\times10^{-4}X_1X_2-1.082\times10^{-3}X_1X_3-2.277\times10^{-4}X_1X_4-1.452\times10^{-3}X_2X_3+2.467\times10^{-3}X_2X_4+5.692\times10^{-4}X_3X_4+7.328\times10^{-3}X_1^2+0.025X_2^2+0.011X_3^2+8.339\times10^{-3}X_4^2$$

由回归方程和验证实验得出加酶量 20 U/g，反应温度为 52 ℃，反应时间 60 min，反应 pH7 为最佳酶反应条件。该实验结果与单因素实验结果基本一致。

3.3 本实验研究实验了大豆分离蛋白在谷氨酰胺转氨酶作用下，伯胺与谷氨酰胺残基发生转酰基作用，蛋白质分子间发生交联。为改性前每克大豆分离蛋白伯胺含量约为 0.059 μmol，改性后伯胺含量减少为 0.028 μmol，为食品开发和谷氨酰胺转氨酶进一步研究提供参考。

参考文献

[1] Folk J E, Chung S I. Transglutaminase. In A. Meister(Ed.), Glutamate, glutamine, glutathione, and related compounds, methods in enzymology [M]. New York: Academic Press, 1985

[2] 王君立,唐传核,周志红,等.加工条件对微生物转谷氨酰胺酶(MTGase)酶促豆腐凝胶质构性质的影响[J].现代食品科技,2006,22(2):1-3

[3] 韩春然,李可,王强,等.利用微生物转谷氨酰胺酶回收大豆乳清废水[J].现代食品科技,2011,27(10):1210-1213

[4] ZHU Y, RINZEMA A, TRAMPER J. Microbial transglutaminase-a review of its production and application to food processing [J]. Appl Microbial Biotech, 1995, 44: 277-282

[5] MATHEIS G, WHITAKER J R. Enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods [J]. Food Biochem, 1987, 11: 309-327

[6] Elfadil Elfadl Babiker. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein [J]. Food Chemistry, 2000, 70: 139-145

[7] Caterina Dinnella, Maria Teresa Gargaro, Rocco Rossano. Erminio Monteleone. Spectrophotometric assay using

o-phtaldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein [J]. Food Chemistry, 2002, 78: 363-368

[8] Porter D H, Swaisgood H E, Catignani G L. A rapid fluorimetric assay for measurement of peptidase activity [J]. Analytical Biochemistry, 1982, 123: 41-45

[9] Church F C, Swaisgood H E, Porter D H, et al. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins [J]. Journal of Dairy Science, 1993, 66: 1219-1227

[10] Grosswicz N, wainfan E, Borek E. The enzymatic formation of hydroxmic acids from glutamine and asparagines [J]. Biol Chen, 1950, 1870: 111-125

[11] 安静,于国萍,初云斌.转谷氨酰胺酶催化对不同大豆蛋白凝胶性的影响[J].食品科学,2011,32(6):32-37

[12] 田少君,梁华民.转谷氨酰胺酶对大豆分离蛋白的改性研究[J].粮油加工与食品机械,2005,6:54-59

[13] ANDO H, ADACHI M, UMEDA K. Purification and characteristics of a novel trans-lutaminase derived from microorganisms [J]. Agric Biol Chem, 1989, 53: 2613-2617

[14] Motoki M, Kiyama A, Nonaka M, et al. Kokai Kokkyo Koho.1989, J P 0217471

[15] 艾杰,张根生,王东,等.转谷氨酰胺酶酶解大豆浓缩蛋白工艺研究[J].食品与机械,2010,26(1):5-8

现代食品科技