

谷氨酰胺转移酶对大豆分离蛋白膜性能的影响

姜燕¹, 唐传核², 温其标², 张宏梅¹

(1.广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006; 2.华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 研究注模前酶作用时间对谷氨酰胺转移酶(TGase)改性大豆分离蛋白(SPI)膜性能的影响。在注模之前, 将TGase(8U/g SPI)加入到成膜溶液中, 分别在磁力搅拌下作用0、30、60、120min, 然后注模成膜。利用质构仪检测蛋白膜的机械性能, 结合哈克流变仪的动态黏弹实验及SDS-PAGE实验进一步分析。注模前适度的酶作用($\leq 60\text{min}$)在一定程度上有利于TGase改性的SPI膜机械强度的提高, 特别是抗拉强度(TS)值; 但是, 时间不宜过长, 因为注模前的酶作用也会诱导SPI蛋白组分的聚沉反应, 从而降低成膜溶液中可溶解蛋白的含量。结果表明, TGase改性SPI膜时, 一方面会诱导蛋白交联; 另一方面, 交联过多又会导致沉淀; 在利用TGase提高SPI膜的机械性能时如何把握两者之间的关系, 在交联的同时抑制酶促聚沉非常重要。

关键词: 谷氨酰胺转移酶; 蛋白膜; 改性

Effect of Transglutaminase on Properties of Soy Protein Isolate Film

JIANG Yan¹, TANG Chuan-he², WEN Qi-biao², ZHANG Hong-mei¹

(1. Faculty of Light and Chemical Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China;

2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Effect of transglutaminase (TGase) reaction time on the properties of TGase-modified soy protein isolate (SPI) films before casting was studied. Moderate TGase reaction of film-forming solution ($\leq 60\text{ min}$) before casting facilitated the improvement of mechanical properties of SPI films, especially the tension strength (TS) value. However, TGase reaction time should not be excessively extended, because precasting TGase reaction could result in the aggregation of SPI components and decrease of soluble protein content. When TGase was used to modify SPI films, on the one hand, TGase reaction could induce the cross-linking of protein; on the other hand, excessive cross-linking could lead to the precipitation of protein. Therefore, appropriate reaction time for inhibiting aggregation induced by TGase during the cross-linking of protein is very important for TGase-modified SPI film.

Key words: transglutaminase; protein film; modification

中图分类号: TS201.2; Q555

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)05-0026-04

谷氨酰胺转移酶(TGase)可以催化蛋白质之间产生共价交联反应, 形成高相对分子质量的聚合物^[1-2]。在蛋白膜改性方面的研究表明, TGase的交联增加了蛋白膜的抗拉强度和应变, 降低了膜中蛋白的溶解度, 显示了它在改善蛋白膜性能上的潜力^[3-4]。然而, 在这项酶改性技术商业化应用于膜工业之前, 仍然有许多问题需要解决, 例如有关工艺参数的探讨。本实验主要研究注模前酶作用时间对TGase改性SPI膜性能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

TGase 泰兴市一鸣精细化工有限公司; CBZ-1-glutaminyglycine 和 L-Gluamic acid r-monohydroxamate 标准品 Sigma 公司; 大豆分离蛋白(SPI 蛋白含量 85.2%, 食品级) 山东万得福科技公司; 甘油(分析纯)。

丙烯酰胺(Acr)、N,N'-二甲叉双丙烯酰胺(Bis)、乙二胺(TEMED) MERCK-Schuchardt 公司; 其他电泳试剂 上海伯奥生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 TGase 酶活性的测定

参见文献[5]方法。

1.2.2 膜的制备

收稿日期: 2008-09-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(20306008); 广东工业大学“211工程”培育项目

作者简介: 姜燕(1973—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: cljy@163.com

将SPI(5%)和甘油(2%)溶于0.05mol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲溶液中,于70℃水浴加热30min,将成膜溶液冷却至室温(25±1)℃。在注模之前,将TGase(8U/g SPI)加入到已经冷却到室温的成膜溶液中,混合均匀,分别在磁力搅拌下作用0、30、60、120min。脱气后迅速薄摊在内衬有聚乙烯薄膜的玻璃器皿(37cm×21cm)中,然后放在室温(25℃)下干燥24h,揭膜。以不加TGase的膜作为对照。

膜制好后裁切成所需要的样品形状,立即放在相对湿度为50%的环境中平衡48h备用。

1.2.3 膜性能指标测定

厚度、机械性能[抗拉强度(TS)和断裂伸长率(EB)]、表面疏水性(S₀)、水分含量(MC)、总可溶性物质质量(TSM)及透光率的测定见参考文献[5]。

1.2.4 成膜溶液在膜干燥过程中的流变特性

动态黏弹流变实验于哈克RS600流变仪中进行,所采用的平行板直径为27.83mm。样品分散液置于平行板之间,其间隙设置为1mm。要除去过量的样品,而且在样品裸露部位添加一薄层硅化油,以防止水分的蒸发。在不同时间记录储存在样品中抵制变形的能量(G')和样品变形时散失的能量(G'')。为了确保所有测量是在线性黏弹范围内进行的,首先要在剪切振荡频率为0.5Hz时进行第一次剪切应力范围扫描。

将SPI(7%)和甘油(2%)溶于0.05mol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲溶液中,于70℃水浴加热30min。待成膜溶液冷却至室温后,加入TGase(8U/g SPI),搅拌均匀,分别在磁力搅拌下作用5、30、60、90min后,立即装载于流变仪的平台,于25℃连续记录测量 G' 和 G'' 随催化时间(0~1440min)的变化。分析上样前SPI分散液与MTGase作用不同时间后的SPI成膜溶液随时间变化的流变特性。凝胶形成的时间定义为 $G' \geq 10.0\text{Pa}$ 所需时间。所采用的频率及应力分别为1Hz和0.5Pa。

1.2.5 成膜溶液中不溶聚集体含量的测定

将SPI(5%)和甘油(2%)溶于0.05mol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲溶液中,于70℃水浴加热30min。待成膜溶液冷却至室温后,加入TGase(8U/g SPI),搅拌均匀,分别在磁力搅拌下作用0、30、60、90、120、180、240min后,取样10mL,12000r/min离心15min。用凯氏定氮法测定上清液中蛋白质的质量,即成膜溶液中可溶解蛋白质质量。用总蛋白质量减去可溶解蛋白质质量得到成膜溶液中不溶聚集体质量。

1.2.6 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

将SPI(5%)和甘油(2%)溶于0.05mol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲溶液中,于70℃水浴加热30min。待成膜溶液冷却至室温后,加入TGase(8U/g SPI),搅拌均匀,分别在

磁力搅拌下作用0、30、60、90、120、180min后,取样10mL,12000r/min离心15min,得到沉淀,将沉淀分散于10mL Tris-HCl(pH8.0)缓冲溶液中。取0.5mL上述分散液加入已装有0.5mL样品缓冲液(0.125mol/L Tris-HCl, 2g/100mL SDS, 5% 2-巯基乙醇)的离心管中混合均匀,电泳前将各离心管煮沸5min,取6μL进样。

1.2.7 数据分析

采用Microcal Origin V.6.1 Software进行方差分析和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 注模前酶作用时间对TGase改性SPI膜性能的影响

2.1.1 注模前酶作用时间对TGase改性SPI膜宏观性能的影响

注模前酶作用可能在注模之前导致交联反应或聚沉反应,因此注模前酶作用也会影响TGase改性SPI膜的性能。注模前酶作用的时间对TGase改性SPI膜的各项性能的影响如表1所示。注模前的酶反应是在室温下,密闭容器中,不断搅拌下进行的。

表1 注模前酶作用时间对TGase改性SPI膜性能的影响
Table 1 Effect of precasting TGase reaction time on the properties of TGase-modified SPI film

作用时间/min	膜厚/mm	TSMPa	EB%	MC%	TSM%	接触角/(°)
0(对照)	0.088 ± 0.002	3.75 ± 0.30 ^{ab}	124.5 ± 11.8 ^a	21.3 ± 0.3 ^a	31.3 ± 0.4 ^a	50.0 ± 5.7 ^a
30	0.096 ± 0.004	3.92 ± 0.25 ^a	106.9 ± 14.0 ^a	22.4 ± 0.6 ^a	32.8 ± 0.4 ^a	57.8 ± 4.0 ^a
60	0.116 ± 0.003	4.17 ± 0.19 ^a	64.3 ± 9.9 ^b	22.0 ± 0.4 ^a	32.1 ± 1.2 ^a	58.7 ± 4.6 ^a
120	0.125 ± 0.006	2.57 ± 0.20 ^b	55.3 ± 7.6 ^b	21.8 ± 0.5 ^a	32.3 ± 0.8 ^a	60.1 ± 6.2 ^a

注:同列字母肩标不同表示差异显著($P \leq 0.05$);每一个数据都是多次重复3~10次的 $\bar{x} \pm s$ 。

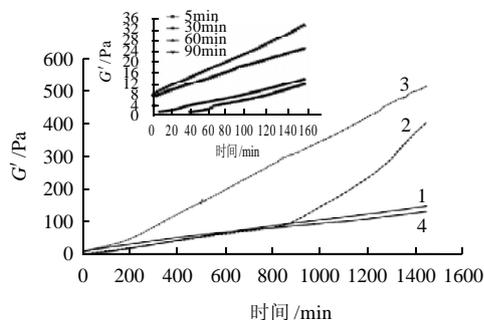
由表1可见,注模前适度的酶作用时间(30~60min),提高了SPI膜的TS值,而长时间的酶作用反而会降低TS值(与未经注模前酶作用的对照膜相比)。随着注模前酶作用时间的增加(0~120min),SPI膜的EB值也逐渐降低。这个结果说明注模前成膜溶液中适度的酶作用在一定程度上有利于TGase改性的SPI膜机械强度的提高,特别是TS值。另一方面,注模前的酶作用也会导致TGase诱导SPI蛋白组分的聚沉反应。因此,时间不宜过长。

注模前酶作用对TGase改性SPI膜的MC值和TSM值几乎没有影响(表1)。然而,膜作用时间超过30min时,显著提高了TGase改性SPI膜的表面疏水性($P \leq 0.05$)。这一现象反应了注模前酶作用增加了SPI中疏水性基团暴露的程度。

2.1.2 注模前酶作用不同时间后成膜溶液在膜干燥过程中的流变特性

为了更好地了解注模前酶作用对 TGase 改性 SPI 膜成膜过程的影响,从微观的角度观测注模前酶作用对成膜过程中 G' 和 G'' 的影响。

G' 是储存在样品中抵制变形的能量,反映的是机械性质未消耗的部分,即凝胶的弹性性质,是对凝胶强度的测量; G'' 是样品变形时散失的能量,反映的是机械性质消耗的部分,即凝胶的黏性性质。在所有的测试条件下, G'' (图略), G' (图 1) 随催化时间变化模式基本相同。但是, G' 值的增加幅度远远高于 G'' 值,说明了已经形成了以弹性为主的凝胶。因此,在这里主要讨论 G' 值。



1~4. 分别作用 5、30、60、90min; 图中小图为催化 0~160min 的局部图。

图 1 注模前 SPI 与 TGase 作用不同时间储能模量(或弹性模量)随催化时间的变化

Fig.1 Change of storage modulus (G') during precasting reaction between TGase and SPI

图 1 显示了 TGase 诱导 SPI 交联胶凝的过程及最初凝胶形成时间与上样前的酶作用有很大关系。随着作用时间由 5min 增加至 60min, G' 值显著增加,这说明所形成的凝胶具有较好的弹性,即凝胶具有良好的网络结构;但是,作用时间的进一步增加却显著降低了 G' 值,说明上样前酶作用时间过长不利于凝胶形成良好的网络结构。从凝胶形成的时间也能观测到相同的趋势。随着作用时间由 5min 增加至 60min,凝胶时间($G' = 10.0\text{Pa}$ 所需时间)明显降低,由 141.9min 减少至 15.36min,说明上样前适度的酶作用有利于促进凝胶的形成;而作用时间的进一步增加至 90min,则导致凝胶时间的上升(与作用 60min 时相比),说明上样前酶作用时间过长不利于凝胶的形成。蛋白膜的形成首先是形成水凝胶而后凝胶失水成膜,因此该实验可以看作是在流变仪上模拟蛋白膜的形成。该实验结果与 2.1.1 节的结果能够很好吻合,可能是由于注模或上样前的酶作用在诱导交联的同时,也会引起蛋白的聚沉反应,如何把握两者之间的关系,在交联的同时抑制酶促聚沉,则需进一步研究。

2.2 TGase 诱导 SPI 产生聚集反应

以上从宏观和微观两个角度研究了注模前的酶作用对 TGase 改性 SPI 膜的影响。在以往的研究表明:1)低浓度的酶浓度改性可显著增加 SPI 膜的 TS 值。而当酶浓度过高时, TGase 改性膜的 TS 值开始下降。这可能是低酶浓度的条件下, TGase 诱导 SPI 共价交联产生比对照膜致密的结构;而高酶浓度则使蛋白质聚沉,从而导致形成不紧密和不均一的结构。2)成膜溶液的 pH 值显著影响 TGase 改性 SPI 膜的成膜特性。pH10.0 时的 TS 值是所研究的 pH 值范围内最高的。然而在 pH10.0 时, TGase 的活性是所研究 pH 值中最低的。这个结果在某种程度上也说明 TGase 持续而缓慢地交联可以有助于 SPI 在成膜过程中形成致密的网络结构。3)在研究干燥温度对 TGase 改性 SPI 膜的影响时,发现在 18℃ 干燥所得 SPI 膜的 TS 值和 EB 值明显高于其他较高温度干燥所得膜($P \leq 0.05$)。温度越低酶活力越低而稳定性越高,这一结果也说明了 TGase 在低活力下长时间改性可以显著提高 SPI 膜的机械性能。同时也说明了较低的干燥温度有利于 TGase 改性的 SPI 膜形成比较致密的网络结构。这些研究结果与注模前的酶作用对 TGase 改性 SPI 膜的影响的研究结果相吻合,都表明只有适度而缓慢的酶交联有利于提高 TGase 改性 SPI 膜的 TS 值而过度的交联反而会产生负面的效果,负面效果可能是由于 TGase 诱导 SPI 产生聚集反应。

2.2.1 成膜溶液中不溶聚集体随酶作用时间的变化

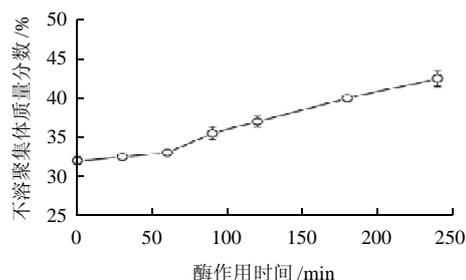


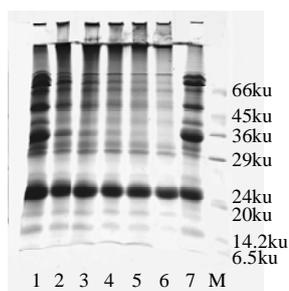
图 2 成膜溶液中不溶聚集体随酶作用时间的变化

Fig.2 Change of insoluble aggregates in film-forming solution during precasting reaction between TGase and SPI

为了进一步证实 TGase 诱导 SPI 聚沉的出现和聚沉对 SPI 特性的影响,本实验专门研究了在成膜溶液中 TGase 诱导的 SPI 聚沉。图 2 显示了在注模前 TGase 作用过程中 SPI 成膜溶液中形成的不溶聚集体的变化模式。这些不溶聚集体包括两部分:一部分是在商品级 SPI 中原先存在的不溶聚集体;另一部分是 TGase 诱导形成的不溶聚集体。原先存在于 SPI 成膜溶液中的不溶聚集体大约占总蛋白的 32%。在加入 TGase 之后,随

着酶作用时间的增加(0~240min), 溶液中的不溶聚集体逐渐增加(图2)。特别是酶作用90min后, 所形成的不溶聚集体显著高于未作用时($P \leq 0.05$)。这个结果表明注模前 TGase 作用对 SPI 膜 TS 值的影响可能是由于 TGase 诱导 SPI 蛋白组分聚沉的缘故。

2.2.2 成膜溶液中沉淀的 SDS-PAGE 分析



1~6 道分别代表注模前酶作用 0、30、60、90、120、180min 后成膜溶液中的沉淀; 第 M 道和第 7 道分别代表蛋白分子质量标准和 SPI。

图3 成膜溶液中沉淀的 SDS-PAGE 图

Fig.3 SDS-PAGE patterns of precipitates in film-forming solution with different precasting reaction time

由图3可见, 随着注模前酶作用时间的增加, 沉淀中球蛋白的酸性亚基和 β - 伴球蛋白的 β - 亚基降低的速度最快, 其次是 β - 伴球蛋白的 α - 和 α' - 亚基, 而且随着时间的延长部分球蛋白的碱性亚基也逐渐减少; 在浓缩胶和分离胶的交界处, 高分子聚集物增多。结果表明沉淀的组成主要是球蛋白的碱性亚基和高分子聚集物。

在以上的两个实验中证明了 TGase 诱导 SPI 蛋白组分聚沉而产生沉淀的存在, 并通过 SDS-PAGE 分析发现沉淀的组成主要是球蛋白的碱性亚基和高分子聚集物(图3)。这说明 TGase 的作用一方面会诱导蛋白交联; 另一方面, 交联过多又会导致沉淀。在利用 TGase 提高 SPI 膜的机械性能时如何把握两者之间的关系, 在交联的同时抑制酶促聚沉, 则需进一步研究。

3 结论

3.1 注模前成膜溶液中适度的酶作用(≤ 60 min)在一定程度上有利于 TGase 改性的 SPI 膜机械强度的提高, 特别是 TS 值。但是, 时间不宜过长, 因为注模前的酶作用也会诱导 SPI 蛋白组分的聚沉反应, 从而降低成膜溶液中可溶解蛋白的含量。

3.2 注模前酶作用不同时间后成膜溶液在膜干燥过程中的流变特性显示随着作用时间由 5min 增加至 60min, G' 值显著增加, 即所形成的凝胶弹性随之明显增加, 凝胶具有很好的网络结构; 但是, 作用时间的进一步增加却显著降低了 G' 值, 说明上样前酶作用时间过长不利于凝胶形成良好的网络结构。

3.3 实验中证明 TGase 诱导 SPI 蛋白组分聚沉而产生沉淀的存在, SDS-PAGE 分析发现沉淀的组成主要是球蛋白的碱性亚基和高分子聚集物。

3.4 分析实验结果可得, 在利用 TGase 改性大豆蛋白膜时, TGase 的作用一方面会诱导蛋白交联, 另一方面, 交联过多又会导致沉淀, 在利用 TGase 提高 SPI 膜的机械性能时如何把握两者之间的关系, 在交联的同时抑制酶促聚沉非常重要。

参考文献:

- [1] CUQ B, AYMARD C, CUQ J L, et al. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties[J]. J Food Sci, 1995, 60: 1369-1374.
- [2] GOUNGA M E G, XU S Y, WANG Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 83: 521-530.
- [3] 姜燕, 唐传核, 温其标, 等. 谷氨酰胺转移酶对生物蛋白质成膜性能的影响[J]. 华南理工大学学报, 2006(8): 110-115.
- [4] KRISTO E, BILLADERIS C G. Water sorption and thermo-mechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: caseinate-pullulan bilayers and blends[J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20: 1057-1071.
- [5] 姜燕, 唐传核, 温其标, 等. 增塑剂对大豆蛋白可食膜特性的影响[J]. 食品发酵与工业, 2005(11): 112-116.