

文章编号 :1009-038X(2002)06-0564-05

谷氨酰胺转胺酶的分离纯化及酶学性质

鲁时瑛, 周楠迪, 堵国成, 李华钟, 陈坚

(江南大学 生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036)

摘 要: 茂原链轮丝菌 *Streptoverticillium mobaraense* 所产生的谷氨酰胺转胺酶发酵液通过抽滤、超滤、乙醇沉淀、离心和冷冻干燥,制得粗酶粉的酶活约为 1 033 U/g. 对粗酶研究发现,该酶的最适反应温度为 52 ℃,最适 pH 为 6.0. 粗酶的 pH 稳定范围在 4~8,温度稳定范围在 20~40 ℃,离子强度对该酶的活性稍有影响. 粗酶经 CM-纤维素层析和 Sephadex G-75 凝胶过滤层析后得到较纯的酶,通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检验蛋白质纯度,得到较弱的单一区带. 其中,CM-纤维素层析的纯化倍数为 4.5,收率质量分数约为 78.8%;凝胶过滤层析纯化倍数为 1.11,收率质量分数为 50%. 用凝胶过滤法测得谷氨酰胺转胺酶的相对分子质量为 40 092.

关键词: 谷氨酰胺转胺酶;纯化;酶学性质

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Purification of Transglutaminase and Properties of Crude Enzyme

LU Shi-ying, ZHOU Nan-di, DU Guo-cheng, LI Hua-zhong, CHEN Jian

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Transglutaminase (TGase) was isolated and purified from the culture filtrate of a strain of *Streptoverticillium mobaraense*. The properties of the crude enzyme were studied. The crude enzyme was prepared by filtration, ultrafiltration, precipitation by 95% alcohol, centrifugation and freeze-drying. The specific activity of the crude enzyme was about 794 U/g. The optimal temperature and pH were 52 ℃ and 6.0, respectively. The crude enzyme was stable below 40 ℃ and within pH 4.0~8.0. The ionic strength had a little effect on the activity of TGase. The crude enzyme was purified to homogeneity by chromatography on CM-cellulose and Sephadex G-75. The apparent purity was examined by SDS-PAGE. The molecular mass of TGase was 40 092 determined by gel filtration chromatography on Sephadex G-75. The specific activity of TGase was about 4.5 times as that of crude enzyme.

Key words: transglutaminase; purification; properties

谷氨酰胺转胺酶(TGase, EC2.3.2.13)以肽链中谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基作为酰基供体,酰基

受体可以是多肽链中赖氨酸残基的 ϵ -氨基、伯胺基或水. 谷氨酰胺转胺酶能催化许多食品中蛋白质的

收稿日期 2002-04-15; 修订日期 2002-08-28.

基金项目 国家“十五”科技攻关项目(2001 BA 708B03-05).

作者简介 鲁时瑛(1978-),女,浙江绍兴人,环境工程硕士研究生.

交联反应,在很大程度上改善蛋白质的功能性质,提高蛋白质的营养价值,因而在食品工业中具有广泛的用途^[1,2].此外,谷氨酰胺转胺酶还可应用于医药、分析检测和生物工程等方面.

谷氨酰胺转胺酶存在于动物、植物和微生物中.来自动物(豚鼠、几内亚猪等)的谷氨酰胺转胺酶由于来源稀少,分离纯化工艺复杂,导致该酶的价格十分昂贵,不能应用于食品工业;来自植物体(豌豆种子、羽扇豆种子等)的谷氨酰胺转胺酶的分离纯化工艺也不适合工业化生产.20 世纪 80 年代末,Audo 和 Motoki 等人^[3,4]报道了微生物发酵法生产谷氨酰胺转胺酶的结果,Gerber^[5]对下游技术进行了改进.

本实验利用 *Streptoverticillium mobaraense* 以淀粉为原料生产谷氨酰胺转胺酶,探索低成本高效率的提取方法,并研究其酶学性质,以便为该酶的进一步工业化生产和在食品工业中的应用创造良好的条件.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验原料 茂原链轮丝菌 *Streptoverticillium mobaraense* WSH-Z2 用 5 L 发酵罐发酵产生的谷氨酰胺转胺酶发酵液和 30 L 发酵罐发酵产生的发酵液^[6].

1.1.2 主要试剂 N_{α} -CBZ-Gln-Gly (SIGMA 公司产品),三羟甲基氨基甲烷 (Tris) (中国医药上海化学试剂公司产品),谷胱甘肽 (华美生物工程公司产品,B.R.),牛血清白蛋白、卵清白蛋白、胰蛋白酶、胃蛋白酶 (上海丽珠东风生物技术有限公司产品),CM-纤维素 (上海试剂二厂产品),Sephadex G-75

(上海化学试剂分装厂产品),聚乙二醇 20000 (中国医药集团上海化学试剂公司产品),其余试剂均为分析纯.

1.1.3 主要仪器与设备 HL-1 型恒流泵 BS-100A 型自动分布收集器,上海沪西仪器厂生产;M750UVIS-A 型紫外分光光度计,江苏泰州无线电仪器厂生产;2210 型记录仪,瑞典 LKB 公司生产;超滤膜,AIL 1010,Asihi Chemical Industry Co. 生产;透析袋,华美生物工程公司上海分公司生产;色谱柱,上海锦华仪器厂生产;DYY-III 电泳仪,北京六一仪器厂生产.

1.2 实验方法

1.2.1 谷氨酰胺转胺酶酶活测定方法^[7] N_{α} -CBZ-Gln-Gly 为作用底物,以 L-谷氨酸 γ -单羟肟酸 (SIGMA 公司产品)作标准曲线.一个单位谷氨酰胺转胺酶酶活定义 37℃ 时每分钟催化形成 1 μ mol L-谷氨酸 γ -单羟肟酸的酶量.

1.2.2 谷氨酰胺转胺酶粗酶溶液蛋白质质量分数的测定 Folin-酚法^[8].

1.2.3 酶的纯化方法 发酵液→抽滤→超滤→体积分数 95%乙醇沉淀,3℃离心→冷冻干燥→粗酶→透析→CM-纤维素层析→Sephadex G-75 凝胶过滤层析→SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[9]检验纯度.

2 结果与讨论

2.1 谷氨酰胺转胺酶的粗分离

2.1.1 抽滤酶活损失情况 谷氨酰胺转胺酶系胞外酶,发酵液经布氏漏斗抽滤后,收集菌体并洗涤,分别测定滤出液和洗涤液的酶活,计算酶活损失情况,实验结果见表 1 (处理前发酵液体积 2 510 mL).

表 1 抽滤酶活损失情况
Tab.1 TGase activity loss by filtration

样 品	发酵液 体积/mL	酶活/ (U/mL)	蛋白质质量 分数/(mg/mL)	比酶活/ (U/g)	总酶活/ U
抽滤液	1824	3.10	8.85	350.2	5658.05
菌体洗涤液	790	0.93	4.39	211.8	737.05

由表 1 可知,抽滤酶活损失较大,约占发酵液总酶活的 11.52%,故在除去菌体过程中用少量水对菌体进行洗涤是非常必要的.在进一步纯化过程中,将抽滤液和菌体洗涤液合并进行超滤.

2.1.2 超滤浓缩倍数与浓缩时间和收率的关系 发酵液进行超滤,操作压力 0.1 MPa,研究超滤浓缩倍数与浓缩时间和收率的关系.在不同时间取样,

并记下此时的滤出液体积,算出浓缩倍数,测定酶活,计算浓缩倍数和收率,绘制关系曲线.结果显示 (见图 1)随着浓缩倍数的增加,一开始滤出速率保持平稳,达到一定的浓缩倍数后再继续超滤,滤出速率即下降,所需的时间有所增加,且泡沫增多.随浓缩倍数的增加酶活收率呈直线下降,但到后期下降有所减慢,故超滤时间控制在 100~150 min 较合适.

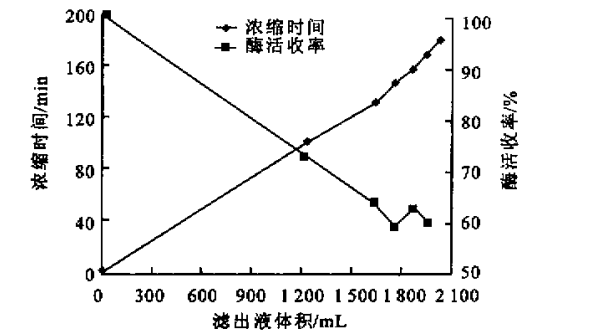


图 1 超滤浓缩倍数与浓缩时间和收率的关系

Fig.1 Relationship between concentration multiple as well as time and yield

2.1.3 乙醇用量对离心沉淀的影响 经超滤后的发酵液分别以 3 个体积分数比与体积分数为 95% 的乙醇混合沉淀：

$V(\text{发酵液}):V(\text{乙醇})=1:1;V(\text{发酵液}):V(\text{乙醇})=1:1.5;V(\text{发酵液}):V(\text{乙醇})=1:2.5$. 将混和液离心(3℃, 6 000 r/min, 7 min), 离心所得沉淀冷冻干燥后测定酶活. 从表 2 知, 乙醇用量少, 沉淀量少, 收率虽有下降, 但下降不多, 而所得酶粉比活力有显著提高. 综合两者考虑, 选用发酵液与乙醇体积分数比为 1:1~1.5 是比较合适的.

表 2 乙醇用量对离心沉淀的影响

Tab.2 Effect of alcohol on precipitation of TGase

$V(\text{发酵液}):V(\text{乙醇})$	(乙醇/mL) / (酶单位/U)	(乙醇/mL) / (蛋白质/g)	收率/%
1:1	0.5	82.4	80.6
1:1.5	0.7	123.6	75.9
1:2.5	1.2	206.1	86.0

2.2 粗酶酶学性质

2.2.1 温度对粗酶稳定性的影响 冷冻干燥后的粗酶制成酶液, 经 20, 30, 40, 50, 60℃ 温度处理后测定酶活, 以未经处理的酶液酶活为 100%. 实验结果(见图 2)显示, 粗酶在 20~40℃ 范围内性质较稳定, 高于 50℃ 则迅速失活.

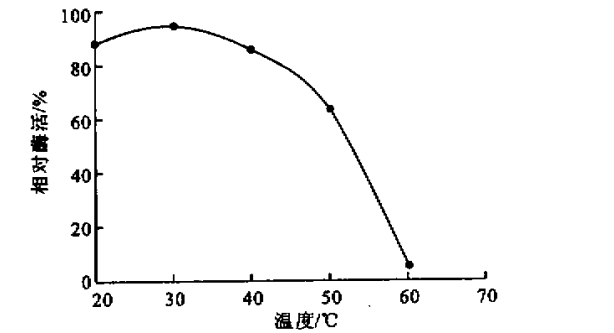


图 2 温度对粗酶稳定性的影响

Fig.2 Effect of temperature on stability of TGase

2.2.2 粗酶的最适温度 分别在不同的温度下测定酶活, 以最高点酶活为 100%, 测定结果(见图 3)表明, 粗酶在 52℃ 左右活性最高, 大于 57℃ 后活性急剧下降. 综合考虑粗酶的最适温度和温度稳定性, 40℃ 左右是该酶比较理想的作用温度.

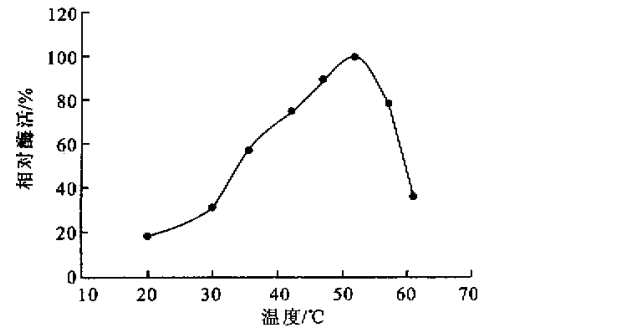


图 3 粗酶的最适温度

Fig.3 Optimal temperature of TGase activity

2.2.3 pH 对粗酶稳定性的影响 经不同 pH 值 (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.16) 处理后, 测定谷氨酰胺转氨酶酶活, 以未经处理的酶液酶活为 100%. 粗酶在 pH 5.0 左右稳定性最好(见图 4), 考虑到处理时间较长, pH 4~8 为其稳定范围.

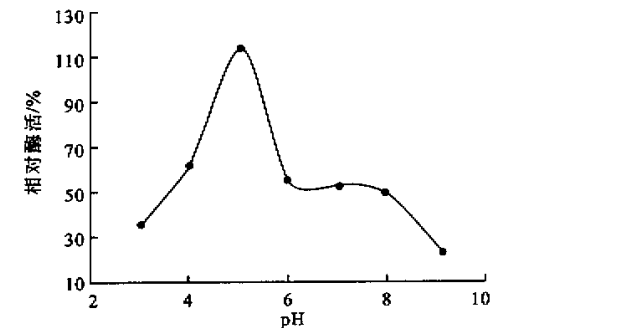


图 4 pH 对粗酶稳定性的影响

Fig.4 Effect of pH on Stability of TGase

2.2.4 粗酶的最适 pH 不同 pH 值下测定酶活, 发现 pH 6.0 为谷氨酰胺转氨酶粗酶的最适 pH(见图 5), 而在 pH 5~7 之间酶活较高. 综合考虑粗酶的最适 pH 和 pH 稳定性, pH 5~7 左右是该酶比较理想的作用范围.

2.2.5 离子强度对酶活的影响 在不同 NaCl 浓度下测定谷氨酰胺转氨酶粗酶酶活(见表 3). 离子强度的增加, 对酶活影响不大, Na^+ 的存在使酶活稍有下降.

2.3 酶的纯化

2.3.1 CM-纤维素层析 粗酶液经 pH 6.5 的磷酸缓冲液透析过夜, 上 CM-纤维素层析柱(D 2.6 cm

×20 cm)洗脱,以 0.02 mol/L~0.5 mol/L、pH 6.5 磷酸缓冲液进行梯度洗脱,流速约 1 mL/min,每管收集约 11 mL. 结果(见图 6)显示,有酶活的部分主要在第 4 个峰,其它几个峰没有酶活. 经过离子交换层析,酶被纯化了近 4.5 倍,除去了大量的杂蛋白,酶活收率为 78.8%(表 4).

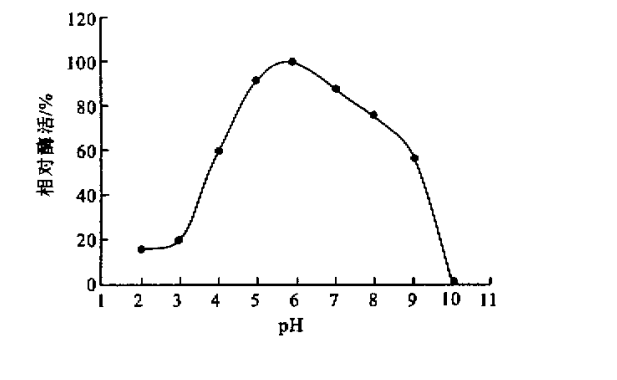


图 5 粗酶的最适 pH

Fig.5 Optimal pH of TGase activity

表 3 离子强度对酶活的影响

Tab.3 Effect of ionic strength on TGase activity

NaCl 浓度/(mol/L)	酶活/(U/mL)
0	1.62
0.1	1.50
0.2	1.53
0.5	1.57
1.0	1.51

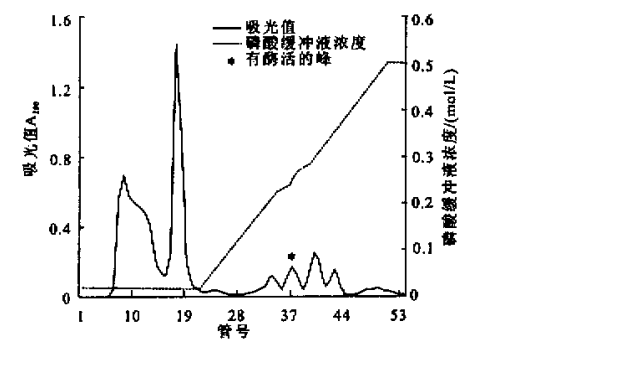


图 6 CM-纤维素层析

Fig.6 Chromatography of TGase on CM-cellulose

表 4 CM-纤维素层析的收率及纯化倍数

Tab.4 Yield and purification of TGase during CM-cellulose chromatography

样 品	总酶活/ U	比酶活/ (U/mg)	收率/ %	纯化 倍数
粗酶液	101.1	1.04		
透析后酶液	96.8	1.03	95.76	
离子交换后 所得活性峰	79.9	4.66	78.84	4.46

2.3.2 凝胶过滤层析 收集 CM-纤维素层析后的

活性峰,聚乙二醇 20000 浓缩后进行 Sephadex G-75 (D 1.6 cm×80 cm)过滤层析,用 0.05 mol/L、pH 6.0 的 Tris 缓冲液洗脱,分部收集,每管约 3 mL. 洗脱过程产生 3 个主要的峰(见图 7),其中活性峰集中在第 3 个峰,经凝胶过滤层析,又除去了一部分杂蛋白,但是由于酶失活的原因,纯化倍数较低,约为 1.1 倍(见表 5).

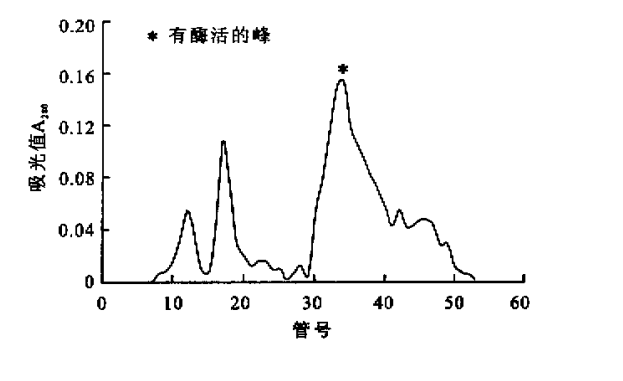


图 7 Sephadex G-75 层析的洗脱曲线

Fig.7 Chromatography of TGase on Sephadex G-75

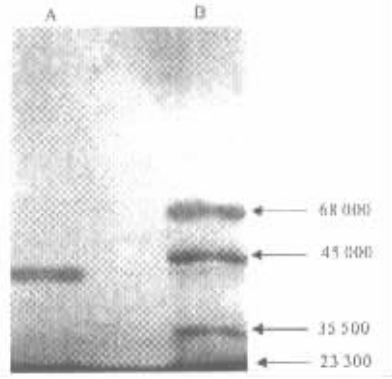
表 5 凝胶层析的收率及纯化倍数

Tab.5 Yield and purification of TGase after Chromatography on Sephadex G-75

样 品	总酶活/ U	比酶活/ (U/mg)	收率/ %	纯化 倍数
上柱前	30.5	3.83		
上柱后	15.1	4.23	49.6	1.11

2.3.3 谷氨酰胺转胺酶的纯度鉴定与相对分子质量的测定

1) 纯度鉴定:用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检验纯度. 结果(见图 8)显示,经过电泳后,相对分子质量标准有许多条带,纯化后的酶液有一条较明显的单一区带(A),与相对分子质量标准(B)对照,谷氨酰胺转胺酶相对分子质量约为 40 000,说明用此方法纯化谷氨酰胺转胺酶效果比较理想.



A. 纯化后酶液; B. 相对分子质量标准

图 8 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.8 SDS-PAGE of purified TGase

2) 相对分子质量的测定 :分别将卵清白蛋白 (bovine serum albumin)、大牛血清白蛋白 (egg albumin)、胃蛋白酶 (pepsin)、胰蛋白酶 (trypsin) 和谷氨酰胺转胺酶进行 Sephadex G-75 ($D\ 1.6\ \text{cm} \times 80\ \text{cm}$) 过滤层析,测定各洗脱体积 (见表 6),绘制 $\log M_r$ - V_e 标准曲线 (见图 9). 由回归方程得谷氨酰胺转胺酶的相对分子质量为 40 092,与前面凝胶电泳所得结果基本一致. 将该酶相对分子质量与其它微生物来源的谷氨酰胺转胺酶进行比较,它不同于从 *Bacillus subtilis* 孢子中提取的 TG1 和 TG2 (相对分子质量 29 000)^[10],与 Ando 报道的 BTGas 很类似 (相对分子质量为 40 000)^[3],也接近于从 *Streptovorticillium cinnamoneum* CBS 683.68 提纯的谷

表 6 相对分子质量测定结果

Tab.6 Measurement of protein molecular weight					
样 品	大牛血清白蛋白	卵清白蛋白	胃蛋白酶	胰蛋白酶	谷氨酰胺转胺酶
洗脱体积 $V_e(\text{mL})$	38.6	53.0	74.7	106.8	68.6
相对分子质量 M_r	68000	45000	35500	23300	
$\log M_r$	4.833	4.653	4.544	4.367	

3 结 论

1) 经过对 *Streptovorticillium mobaraense* 产生的谷氨酰胺转胺酶进行抽滤、超滤、乙醇溶析、冻干后得到粗酶. 其总酶活平均收率约为 70%, 从 160 L 发酵液 (酶活为 3 U/mL) 能制得 4 220 g 谷氨酰胺转胺酶 (80 U/g), 该粗酶经实验能满足食品的加工需要,初步说明了该提取方法的有效性. 对粗酶

参考文献:

[1] STEINKNAUS K H. Nutritional significance of fermented foods[J]. *Food Res International*, 1994, 27 :259 - 267.

[2] 周楠迪,陈坚,郑美英等. 谷氨酰胺转胺酶的功能性质及其在食品中的应用方法[J]. *中国食品添加剂*,2000, 1 :54 - 58.

[3] ANDO H, ADACHI M, UMEDA K, *et al.* Purification and characterization of a novel transglutaminase derived from microorganism[J]. *Agric Biol Chem*, 1989,53 :2613 - 2617.

[4] MOTOKI M, KIYAMA A, NONAKA, *et al.* JPN Kokai Kokkyo Koho[P]. 日本专利 :JP 0217471,1989.

[5] GERBER U, JUCKNISCHKE U, PUTZIEN S, *et al.* A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*[J]. *Biochem J*,1984, 299 :61 - 93.

[6] 郑美英,陈坚,堵国成等. *Streptovorticillium mobaraense* 分批发酵中温度对菌体生长和谷氨酰胺转胺酶生产的影响[J]. *无锡轻工大学学报*,1999,18(6) :82 - 86

[7] GROSSOWICZ N, WAINFAN E, BOREK E, *et al.* The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutaminase and asparagine[J]. *J Biol Chem*, 1950,187 :111 - 125.

[8] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951,193 :265 - 275.

[9] 何忠效. 电泳[M]. 北京 :科学出版社, 1999. 129 - 139.

[10] SUZUKI S, IZAWA Y, KOBAYASHI K, *et al.* Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64 :2344 - 2351.

[11] DURAN R, JUNQUA M, SCHMITTER J M, *et al.* Purification, characterization, and gene cloning of transglutaminase from *Streptovorticillium cinnamoneum* CBS 683.68[J]. *Biochimie*,1998, 80 :313 - 319.

万方数据

氨酰胺转胺酶 (相对分子质量 37 660)^[11].

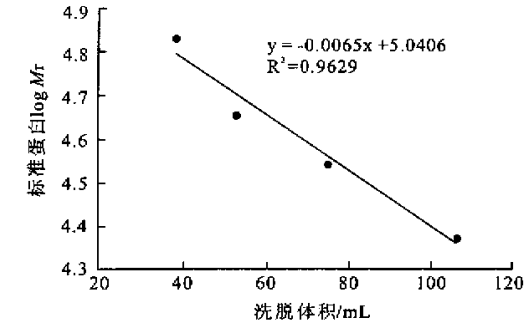


图 9 $\log M_r$ - V_e 标准曲线
Fig.9 $\log M_r$ - V_e

的基本性质进行研究,结果表明,酶反应最适温度和 pH 分别为 52 ℃ 和 6.0. 粗酶在 20~40 ℃ 稳定性较好,高于 50℃ 迅速失活; pH 5~7 之间,粗酶性质稳定,是较理想的使用范围.

2) 粗酶经过 CM-纤维素层析和 Sephadex G-75 凝胶过滤后得到较纯的酶,平均酶活收率为 40%,纯化倍数约为 5. 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检验蛋白质纯度,基本得到单一条带,谷氨酰胺转胺酶的相对分子质量为 40 092.

(责任编辑 杨 勇)