

文章编号:1673-1689(2006)04-0024-05

谷氨酰胺转移酶对大豆分离蛋白成膜性能的影响

姜燕, 温其标, 唐传核*, 杨晓泉

(华南理工大学 轻工与食品学院, 广东 广州 510641)

摘要:研究了谷氨酰胺转移酶(TGase)对大豆蛋白膜特性的影响。研究表明:在成膜溶液中加入 TGase(4 U/g)可以使膜的抗拉强度增加 16.7%,表面疏水性增加 39.2%,同时也明显降低了膜的断裂伸长率、水分含量、总可溶性物质质量及透光率,但是对水蒸气转移速率几无影响。扫描电镜(SEM)显示,酶法交联膜的表面比对照膜略为粗糙,断面却更为均匀致密。SDS-PAGE 分析表明,TGase 催化 SPI 产生了共价交联。

关键词:谷氨酰胺转移酶;大豆分离蛋白;蛋白质膜

中图分类号:TS 201.2

文献标识码:A

Effects of Transglutaminase on Properties of Soy Protein Isolates Cast Films

JIANG Yan, WEN Qi-biao, TANG Chuan-he*, YANG Xiao-quan

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, GuangZhou 510640, China)

Abstract: Effects of transglutaminase (TGase) treatment on properties of soy protein isolates (SPI) cast films were investigated. Tensile strength (TS), elongation at break (EB), water vapor transmission rate (WVTR), water vapor permeability (WVP), moisture content (MC), total soluble matter (TSM), surface hydrophobicity (S_0) as well as transparency of TGase-treated films and control films were evaluated after conditioning film specimens at 25 °C and 50% relative humidity (RH) for 48 h. TGase treatment significantly increased ($p \leq 0.05$) the TS and S_0 values of SPI films by 16.7% and 39.2% respectively, and simultaneously decreased the EB, MC, TSM and transparency values. TGase treatment had no effect on the WVTR values. Scanning electric microscopy (SEM) showed that the TGase-treated films had rougher surfaces compared with that of the control, but more homogeneous and compact cross-sections. SDS-PAGE analyses confirmed the occurrence of cross-linking induced by TGase, which may account for the higher TS, S_0 and lower TSM values (as compared with those of control).

Key words: Transglutaminase (TGase); soy protein isolates; protein film

可食膜是指由可食材料构成的连续薄层,可以用作涂层或薄膜置于食品组分之间,起到防止质量传递的作用^[1]。近年来消费者对高品质、长货架期食品的需求日益增长,但同时由于废弃包装数量与

日俱增而导致的环保问题也成为公众关注的焦点。于是,从农产品发展可食的涂层和薄膜已经成为国内外科研工作者研究的热点。蛋白质膜具有营养价值高、口感好、隔油、隔气性能好等特点,因而开

收稿日期:2005-09-09; 修回日期:2005-12-21.

基金项目:国家自然科学基金项目(20306008).

作者简介:姜燕(1973-),女,四川南充人,食品科学博士研究生.* 通讯作者.

发以天然生物材料制成的可食性蛋白包装膜具有广阔应用前景。但与合成膜相比,蛋白质膜的机械强度低、透水性高,这已成为限制其工业化生产和实际商业应用的原因。

改善蛋白膜特性的一种有效途径是采用化学方法或酶学方法使蛋白质之间产生共价交联。谷氨酰胺转移酶(TGase; EC2. 3. 2. 13; 全称为蛋白质-谷氨酰胺 γ -谷氨酰胺基转胺酶)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^[2]。TGase 可通过胺的导入、交联及脱胺 3 种途径改性蛋白质。作者以大豆分离蛋白(SPI)为原料,研究谷氨酰胺转移酶改性对大豆分离蛋白性能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

谷氨酰胺转移酶(TG-B):泰兴市一鸣精细化工有限公司产品; CBZ-l-glutaminylglycine 和 L-Gluamic acid *r*-monohydroxamate; Sigma 公司产品;大豆分离蛋白(蛋白质含量 85.2%);山东万得福科技公司产品;甘油为分析级。

1.2 仪器

质构仪 TA-XT2i;英国 Stable Micro System 公司制造;22PC 分光光度仪:上海凌光科技公司制造;悬滴振荡流变仪 ODG 20 AMP:德国 Dataphysics Instruments GmbH 公司制造;环境电子扫描显微镜 XL 30;Philips Electromics, Mahwah N J 公司制造。

1.3 实验方法

1.3.1 TGase 酶活性的测定 TGase 酶活性采用 Folk 和 Cole(1965)^[3]报道的分光 Hydroxamamic acid 分析法测量。反应物(包含 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 6.0, 30 mmol/L CBZ-l-glutaminylglycine, 0.1 mol/L hydroxylamine)于 37 ℃ 与酶溶液反应 10 min 后,添加氯化铁/三氯醋酸试剂(0.7 g/dL)中止酶反应,8 000 r/min 离心 15 min,去除沉淀后,所形成的红色上清液于 525 nm 测定其吸光度,用 L-Glutamic acid *r*-monohydroxamic acid 作标准曲线。1 单位 TGase 活性(U)定义为在 37 ℃, pH 6.0 的条件下每分钟产生 1 μ mol hydroxamic acid 所需要的酶量。

1.3.2 膜的制备 将大豆分离蛋白(5 g/dL)和甘油(3%)溶于 Tris-HCl (pH 8.0)缓冲溶液中,于 70 ℃ 水浴锅中加热 30 min,待成膜溶液冷却至室温

后,加入 4 U/g TGase,搅拌均匀。脱气后迅速薄摊在内衬有聚乙烯薄膜的玻璃器皿(37 cm $\times$ 21 cm)中,然后放在室温(25 ℃)下干燥 24 h,揭膜。以不加 TGase 的膜作为对照。膜制好后裁切成需要的样品形状,立即放在相对湿度为 50%的环境中平衡 48 h 备用。

1.3.3 膜性能指标测定

1) 厚度测定:用螺旋测微器(精确到 0.001 mm)在裁切好的膜上均匀取 5 个点,测厚度,取平均值。

2) 机械性能测定:按 Rhim (1998)^[4]的方法,采用质构仪 TA-XT2i 测定各膜的抗拉强度(TS)和断裂伸长率(EB)。每种膜测定 6 个样,每个样品大小为 2.54 cm $\times$ 10 cm。

3) 水蒸气透过率测定:取直径 3 cm、深 4 cm 的圆形敞口塑料杯,加入 3 g 干燥的 CaCl₂,将裁切成直径 7 cm 的膜样品盖住杯口,膜与杯之间的接口用石蜡封住。而后将各杯置于底部加入 1 000 mL 蒸馏水的干燥器中(25 ℃,相对湿度 100%)。每 12 h 称量 1 次,持续 1 周。通过杯重的增加量确定水蒸气的透过量。按 ASTM 方法(E96-93, 1993)计算水蒸气转移速率(WVTR)和水蒸气透过率(WVP)。纯水在 25 ℃ 时的饱和水蒸气压为 3.167 1 kPa。

4) 水分含量(MC)和总可溶性物质质量(TSM)测定:将膜样(2 cm $\times$ 2 cm)在 105 ℃ 下干燥至恒重,称重后根据干重和湿重之差计算水分含量。然后将其放入盛有 30 mL 水的烧杯中,在室温下溶解 24 h,再将膜在 105 ℃ 条件下干燥至恒重,称重,根据两次干重之差计算水溶性。另一测定总可溶性物质质量的方法是取未经干燥的膜样直接放入盛有 30 mL 水的烧杯中,在室温下溶解 24 h,再将膜在 105 ℃ 下干燥至恒重,称重,以测定水分含量时测得的平均干重为样品初始干重计算水溶性。

5) 透光率测定:将膜裁成条状(1.2 cm $\times$ 4 cm),紧贴于比色皿的一侧,在 500 nm 波长下测定其透光率,以空比色皿作为对照。

6) 表面疏水性(*S*₀)的测定:表面疏水性以水滴与膜的接触角表示。接触角是采用悬滴振荡流变仪 ODG 20 AMP 根据 Larré(2000)^[6]方法测定。

7) 透油性测定:将 5 mL 色拉油加入试管中,以待测膜封口,倒置于滤纸上,每 24 h 称量滤纸 1 次,持续 1 周。根据公式计算透油系数(*P*₀)。

$$P_0 = \frac{\Delta W \times F_T}{ST}$$

式中: P_O 为透油系数($\text{g} \cdot \text{mm}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$); ΔW 为滤纸质量变化(g); F_T 为膜厚 (mm); S 为膜面积(m^2); T 为时间(d); $\Delta W/T$ 为质量随时间变化曲线线性部分的斜率。

1.3.4 电镜扫描 将镀金后的样品置于环境电子扫描显微镜 XL 30 观察。

1.3.5 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 电泳是根据 Laemmli (1970) 的方法进行。SPI-TGase 反应液电泳:分别在 0、0.25、0.5、1、2、3、4 h 取蛋白质与酶的反应液 0.5 mL 于事先装有 0.5 mL 样品缓冲液的离心管中,充分混合。电泳前将各离心管煮沸 5 min,取 6 μL 进样。SPI 膜电泳:称取 5 mg 膜样品于离心管中,加入 1 mL 样品缓冲液(0.125 mol/L Tris-HCl, 2 g/dL SDS,体积分数 5%的 2-巯基乙醇),充分振荡后在室温(25 $^{\circ}\text{C}$)下放置 24 h,不时振荡。电泳前将各离心管离心 10 min(10 000 g),煮沸 5 min,取 6 μL 进样。

1.3.6 数据分析 采用 Microcal Origin V6.1 software 进行方差分析和显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 膜性能

由表 1 可以看到,TGase 处理显著($p \leq 0.05$)改变了 SPI 膜的各项性能指标(WVTR 除外)。

2.1.1 机械性能 在成膜溶液中加入 TGase 后,SPI 膜的抗拉强度比对照增加了 16.7%。这可能是因为 TGase 使蛋白质分子中产生了共价交联从而形成高分子聚合物的缘故。适度的共价交联可以提高膜的 TS 值,这与国内外的许多报道都相吻合^[6-9]。然而,TGase 处理使 SPI 膜的断裂伸长率下降了 33.8%。在大多数的共价交联的场合中,TS 值的升高往往伴随着 EB 值的降低^[7, 10-11]。

表 1 谷氨酰胺转移酶对大豆蛋白膜各项性能的影响^{*}
Tab.1 Effects of transglutaminase on properties of soy protein isolates films

性能指标	对照膜	TGase 改性膜
厚度/mm	0.094±0.005	0.105±0.003
抗拉强度 (TS)/MPa	2.21±0.25 ^a	2.58±0.28 ^b
断裂伸长率 (EB)/%	159.9±9.2 ^b	105.9±9.2 ^a
水蒸气转移速率 (WVTR)/(g/(h·m ²))	37.29±0.10 ^a	36.51±0.24 ^a

万方数据

续表 1		
性能指标	对照膜	TGase 改性膜
水蒸气透过率(WVP)/(g·mm/(kPa·h·m ²))	1.24±0.01 ^a	1.33±0.05 ^b
水分含量 (MC)/%	25.5±0.6 ^b	22.6±0.4 ^a
总可溶性物质质量 ¹ (TSM ¹)/%	37.3±0.2 ^{bc}	34.0±0.9 ^{ac}
总可溶性物质质量 ² (TSM ²)/%	41.8±0.5 ^{bd}	33.0±0.5 ^{ac}
透光率/%	77.3±1.5 ^b	68.4±1.7 ^a
接触角/ $^{\circ}$	25.5±5.6 ^a	35.5±4.7 ^b

* 每一个数值都是多次重复($n \geq 3$)的平均值加上标准偏差。a 和 b 表示各性能(同行)之间的显著性差异($p \leq 0.05$)。c 和 d 表示 TSM 两种测量方法(同列)之间的显著性差异($p \leq 0.05$)。

2.1.2 水蒸气透过率 TGase 改性 SPI 后,膜的水蒸气转移速率略有降低,但无显著性的差别;而膜的水蒸气透过率却有轻微且显著的增加,这可能与膜的厚度有关。TGase 膜明显比对照组膜厚,由公式 $WVP = WVTR \times T / \Delta P$ (T : 膜厚; ΔP : 压力差)可以看出,厚度增加使 WVP 值略有上升。

2.1.3 水分质量分数和总可溶性物质质量 TGase 改性显著降低了 SPI 膜的水分质量分数和总可溶性物质质量($p \leq 0.05$),膜的 MC 值、TSM¹ 值及 TSM² 值分别比对照降低了 11.4%、8.8% 和 21.1%。TGase 催化蛋白质交联使蛋白质膜的水分含量降低,这可能是因为交联使蛋白质的某些氨基酸残基,特别使赖氨酸残基和谷氨酰胺残基不能够通过氢键来吸附水分。如同 TS 值升高一样,TSM 值的降低也表明在 TGase 催化交联的 SPI 膜中产生了新的交联。由表 1 可以看到,两种测量方法在对照膜之间有显著性差异($p \leq 0.05$),其 TSM² 值大于 TSM¹ 值;而在 TGase 处理膜之间没有显著性差异。这可能是由于在第一种测量方法中,样品在浸入水中之前已被加热处理,使膜中增加了新的交联,从而降低了膜的溶解度的缘故^[10, 12]。因此,在以后的研究中,均采用第二种测量方法。

2.1.4 透光率 TGase 改性 SPI 后,膜的透过率比对照下降了 11.5%($p \leq 0.05$),这可能是由于 TGase 引起的蛋白质交联和聚集使成膜溶液的浊度增加的缘故。

2.1.5 表面疏水性 表面疏水性以水滴与膜的接触角表示,接触角越大表明膜的疏水性越强。由表 1 可以看到,TGase 处理 SPI 明显使膜的疏水性比对照提高了 39.2%($p \leq 0.05$)。这可能是因为 TGase 处理使 SPI 中更多的疏水核心或基团暴露

出来。唐传核等(2005)研究指出,在 TGase 诱导的 SPI 絮凝和凝胶实验中,球蛋白的碱性亚基和伴球蛋白的 β 亚基的疏水相互作用是 SPI 形成絮凝和凝胶的主要原因之一。

2.1.6 透油性 TGase 处理对 SPI 膜的透油性几乎无影响。蛋白质膜由于其固有的亲水性从而具有良好的隔油性和较差的隔水性,这与以前的许多报道结果相一致。

2.2 干燥曲线

由图 1 可见,在最初的 3 h 内,两种成膜溶液的失水速率都很高,而后来 3~10 h 失水速率减缓且基本恒定。这是由于随着干燥时间的增加,成膜溶液中自由水分减少但浓度增加的缘故。TGase 作用于 SPI,明显降低了溶液的失水速率,这是与接触角的增加相一致的,表明成膜溶液的失水速率降低与膜的表面疏水性的升高是相关的。干燥速率取决于溶液表面与内部的浓度差及自由水分从内部向表面扩散的速率。TGase 催化 SPI 交联可能降低了成膜溶液中水分的扩散速率。

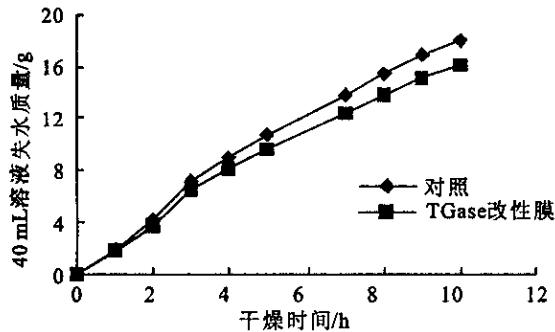
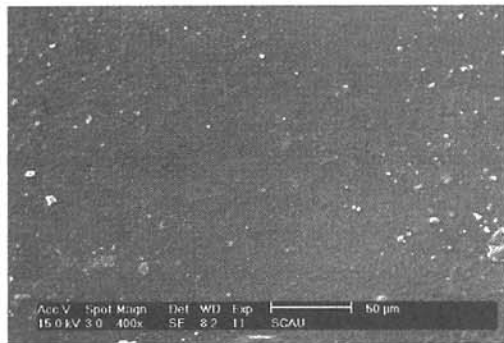


图 1 SPI 膜的干燥曲线

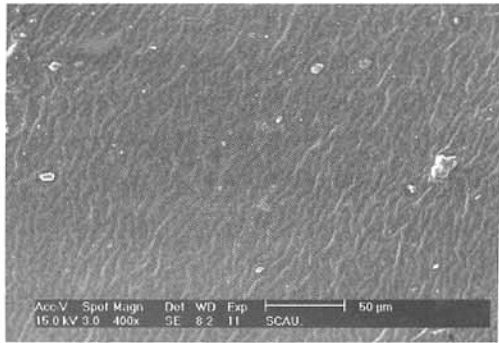
Fig. 1 Drying curves of soy protein isolates films

2.3 膜结构

由图 2 可见,对照膜表面较为平滑,而 TGase 交联膜的表面有条状突起。这可能是因为 TGase 处理使 SPI 中更多的疏水核心或基团暴露出来而聚集的缘故。TGase 交联膜表面结构的粗糙与表面疏水性的升高及成膜溶液的失水速率降低相一致。



(a) 对照膜

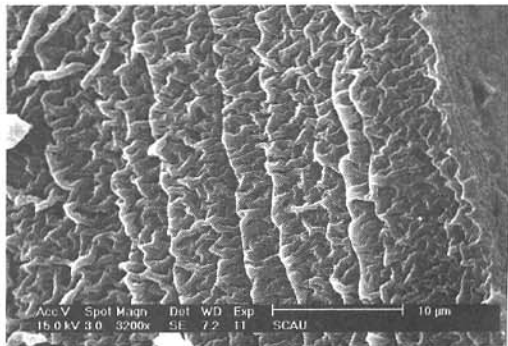


(b) TGase交联膜

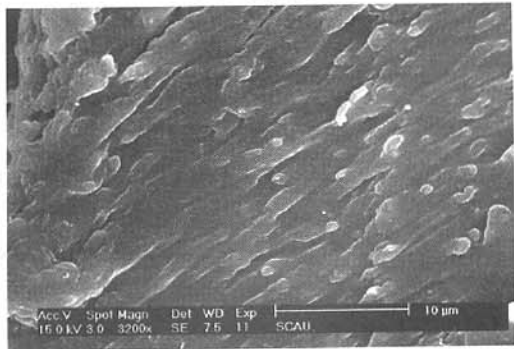
图 2 SPI 膜的表面电镜扫描图(400×)

Fig. 2 SEM micrographs (at 400× magnification) displaying effects of TGase on surfaces of SPI films

由图 3 可见,TGase 交联膜具有更加均匀致密的断面结构。这也许就是 TGase 交联膜比对照膜具有较高的抗拉强度,较低的断裂伸长率、水溶性和透光率的直接原因。



(a) 对照膜



(b) TGase交联膜

图 3 SPI 膜的表面电镜扫描图(3 200×)

Fig. 3 SEM micrographs (at 3200× magnification) displaying effects of TGase on cross-sections of SPI films

2.4 SDS-PAGE 分析

采用 SDS-PAGE 考察 TGase 与 SPI 作用的情况,结果见图 4。可见,在实验条件下(还原状态),SPI 能够被 TGase 催化聚合。随着催化反应的延长,各组分的量不断下降,几乎所有的 β -伴球蛋白和球蛋白的酸性亚基参与了酶的交联过程,部分球

蛋白的碱性亚基也被 TGase 交联而在浓缩胶与分离胶的界面出现越来越多不能进入分离胶的聚合物。由于 SDS-PAGE 是在变性剂(β -巯基乙醇)存在下进行的,于是可以断定新出现的聚合物是通过二硫键以外的共价键形成聚合的,而不是二硫键和非共价键所导致。SDS-PAGE 分析表明,TGase 能够催化 SPI 产生共价交联。

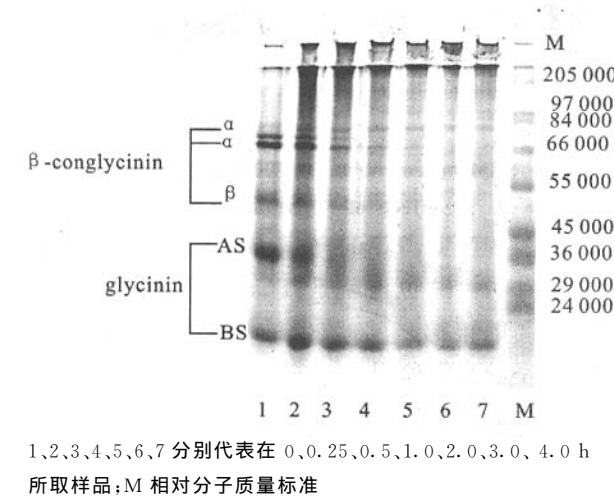


图 4 TGase 催化 SPI 交联的 SDS-PAGE 图 (pH 8.0, 25 ℃)

Fig. 4 SDS-PAGE profiles of SPI modified by TGase

参考文献:

[1] Mahmoud R, Savello P A. Solubility and hydrolysability of films produced by transglutaminase catalytic crosslinking of whey protein[J]. *J Dairy Sci*, 1993, 76: 29—35.

[2] Motoki M, Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing[J]. *Trends Food Sci Technol*, 1998, (9): 204—210.

[3] 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.

[4] Rhim J W, Gennadios A, Weller C L, et al. Soy protein isolate-dialdehyde starch films[J]. *Ind Crops Prod*, 1998, 8: 195—203.

[5] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680—685.

[6] Larré C, Desserme C, Barbot J. Properties of deamidated gluten films enzymatically cross-linked[J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 5444—5449.

[7] Mariniello L, Pierro P D, Esposito C, et al. Preparation and mechanical properties of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of transglutminase[J]. *J Biotechnol*, 2003, 102: 191—198.

[8] 李红. 利用谷氨酰胺转氨酶生产大豆蛋白食用保鲜膜的研究[J]. *食品科学*, 2001, 22(1): 73—75.

[9] 彭海萍, 彭红卫. 利用酶法修饰小麦面筋蛋白制备食用包装膜研究[J]. *粮食与油脂*, 2003, (6): 3—5.

[10] Rhim J W, Gennadios A, Fu D, et al. Properties of ultraviolet irradiated protein films[J]. *Lebensm Wiss U Technol*, 1999, 32: 129—133.

[11] Gu guen J, Viroben G, Noireaux P, et al. Influence of plasticizers and treatments on the properties of films from pea proteins[J]. *Ind Crops Prod*, 1998, 7: 149—157.

[12] Rangavajhyala N, Ghorpade V, Hanna M. Solubility and molecular properties of heat-cured soy protein films[J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 4204—4208.

由图 5 可见,对照膜几乎完全溶于含有 SDS 和 2-巯基乙醇的样品缓冲液中,而 TGase 交联膜几乎完全不溶。可见 TGase 作用明显降低了 SPI 膜在水溶液中的溶解性。

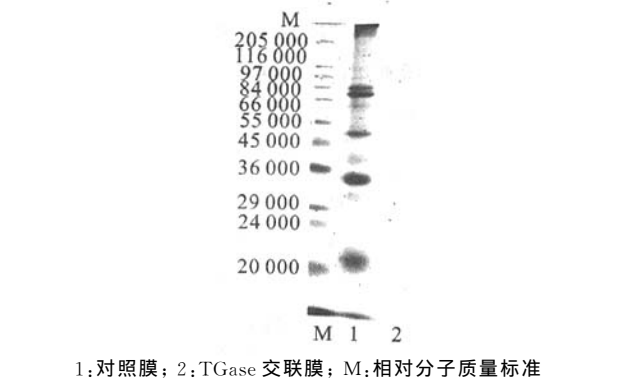


图 5 SPI 膜的 SDS-PAGE 图

Fig. 5 SDS-PAGE profiles of SPI films

3 结 论

SDS-PAGE 分析表明,TGase 催化 SPI 产生了共价交联。TGase 作用于 SPI,可显著增加($p \leq 0.05$)蛋白膜的抗拉强度和表面疏水性,同时也明显降低了($p \leq 0.05$)膜的断裂伸长率、水分含量、总可溶性物质质量及透光率。

(责任编辑:李春丽)