

文章编号:1673-1689(2006)02-0008-05

转谷氨酰胺酶 (mTG) 改性明胶的物理性质研究

丁克毅^{1,3}, 刘军^{*2}, Eleanor M. Brown³, Maryann M. Taylor³

(1. 西南民族大学化学与环保工程学院, 四川 成都 610041; 2. 四川大学高分子科学与工程学院, 四川 成都 610065; 3. 美国农业部东部地区研究中心, Wyndmoor, PA 19038, USA)

摘要: 用来源于微生物的转谷氨酰胺酶(mTG)对不同品级和不同类型的明胶进行改性,并考察了改性产物的物理性质与酶用量的关系。结果表明:随着酶用量的增加,低强度明胶改性产物的凝胶强度有所提高,而高强度明胶改性产物的凝胶强度保持不变甚至有所降低;所有改性明胶的熔点都随酶用量的增加而提高,有些甚至达到90℃;所有改性产物在60℃时的粘度都随酶用量的增加而提高;改性产物的凝胶温度不仅受酶用量的影响,而且与明胶的品级和种类有关。这一实验结果显示出自微生物的转谷氨酰胺酶在提高低品级明胶的使用性能及更充分利用制革废弃物等方面都有广阔的应用前景。

关键词: 转谷氨酰胺酶;明胶;物理性质

中图分类号: Q 555

文献标识码: A

Research on the Physical Properties of Gelatins Modified via Microbial Transglutaminase

DING Ke-yi^{1,3}, LIU Jun^{*2}, Eleanor M. Brown³, Maryann M. Taylor³

(1. College of Chemistry & Environmental Protection Engineering, Southwest University For Nationalities, Chengdu 610041, China; 2. Department of Polymer Sciences & Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 3. Eastern Regional Research Center, ARS, USDA, Wyndmoor, PA 19038, USA)

Abstract: Microbial transglutaminase (mTG) was applied to modify different quality and different type of gelatins, and the physical properties of the modified gelatin were studied. When mTG was used to modify gelatin, the physical properties, such as gel strength, melting point and viscosity would change. The gel strength of low Bloom gelatins could improve with increase of enzyme concentrations, whereas the gel strength of higher Bloom gelatins either stayed at the same level or even decreased with increase of enzyme concentration. All gelatins had higher melting points with the increase enzyme amounts, some even was higher than 90℃. Viscosities, measured at 60℃, increased with the increase of the enzyme concentrations. These data indicated that the gelation temperature increase related with not only the quality of the gelatins but also the enzyme concentrations. The results of this research demonstrated the feasibility of using mTG to upgrade the lower quality gelatins and alter the physical properties of gelatin by-products from leather industry and thus increasing the potential markets for new value-added

收稿日期:2005-04-13; 修回日期:2005-06-02.

基金项目:国家公派留学基金项目(2003851019).

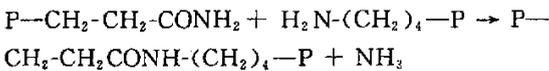
作者简介:丁克毅(1966-),男,湖北仙桃人,教授,工学博士;*通讯作者.

products.

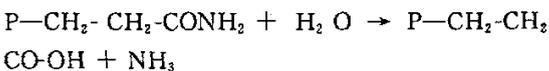
Key words: microbial transglutaminase; gelatin; physical properties

由于明胶的 α 胶原分子侧链上存在种类和数量众多的活性基团,因此,可以通过化学改性的方法——一般是通过在其胶原分子侧链之间产生交联(crosslinks)的方法来提高其使用性能。关于这方面的研究工作已经比较深入^[1],作者所在实验室(Fats, Oils and Animal Co-products Research Unit)在以前曾经用戊二醛、乙二醛、脂肪族二胺等作为交联剂,对不同品质的市售明胶及实验室制备的明胶进行改性,显著改善了其物理性能^[2]。但是,这种传统的化学改性方法存在一些缺点,比如成本较高、交联剂有毒性等等,限制了其广泛应用。

转谷氨酰胺酶(EC 2.3.2.13)可以在许多蛋白质的分子内或分子间产生交联作用。其原理是这种酶可以催化肽段中谷氨酰胺残基的 γ 酰胺基团作为酰胺提供者发生酰胺转移反应,伯胺可以作为酰胺受体。比如当肽段中赖氨酰胺残基侧链上的 ϵ -胺基作为受体时,就会形成 ϵ -(γ -谷氨酰)赖氨酸交联:



在没有伯胺作为受体时,转谷氨酰胺酶还可以催化谷氨酰胺残基发生脱氨基反应,此时 H_2O 为酰胺的受体:



转谷氨酰胺酶的这一特性早在20世纪50年代就引起了人们的兴趣,其反应机理在20世纪70年代被搞清楚并开始在各类蛋白质食品的改性中进行试验性应用。但是,早期的转谷氨酰胺酶是从哺乳动物(主要是 guinea pig 的心脏和淋巴组织)获得,是一种钙依赖性(calium-dependent)酶,价格高且原料来源有限,不可能批量生产,因此也就不可能被大量使用。1989年,H. Ando 等人^[3]从一种 *Streptovorticillium* 的微生物中分离出了转谷氨酰胺酶(microbial transglutaminase, 简称 mTG); mTG 的分子是一个单肽链,肽链上半胱氨酰胺残基侧链的巯基为起催化作用的基团;其相对分子质量约38 000,为从几内亚猪心中提取的同类产品的一半^[3]。mTG 与从哺乳动物组织中获得的产品相比有许多优点:它是一种非钙依赖性(calium-independent)酶,由于可以用微生物发酵的方法大

批量生产,其原料来源丰富,价格也低得多。1992年,Ajinomoto 有限公司和 Amano 制药有限公司在 H. Ando 等人的研究工作基础上联合申请了发明专利^[4]并开始用发酵的方法大批量生产 mTG,转谷氨酰胺酶才开始大量用于食品工业,比如用来对动物蛋白、大豆蛋白、乳清蛋白、酪蛋白进行功能化改性等^[5-7]。

作者用 mTG 对 Bloom 强度为 75 g、95 g 及 240 g 之间的市售 B 型食用明胶,以及分别用碱和胰蛋白酶从制革废弃物中提取的 Bloom 强度分别为 90 g 和 1 g 的明胶进行改性,并研究了改性方法对产物的强度、粘度、凝胶的熔点等物理性质的影响。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器及试剂

凝胶强度测定仪:TA. XT2 Texture Analyzer, Texture Technologies Corporation, NY, USA; 粘度测定仪:Model LV 2000 Canon Rotary Viscometer, State College, PA, USA。

微生物型转谷氨酰胺酶(mTG):Activa TG-TI, 活力为 100 U/g,美国 Ajinomoto 有限公司(Teaneck, NJ)提供;B型牛皮食用明胶:Bloom 强度分别为 75 g、95 g 及 240 g, Sigma (St Louis) 公司产品;自制明胶:Bloom 强度为 90 g,用碱性方法从制革废弃物中提取,实验室制备^[2,8]。自制明胶:Bloom 强度为 1 g,用胰蛋白酶从制革废弃物中提取,实验室制备^[2,8]。

1.2 实验方法

1.2.1 试样的准备 Bloom 强度分别为 75, 95, 240 g 的市售明胶样品与 Bloom 强度分别为 90, 1 g 的实验室制备明胶(经过去离子处理并冷冻干燥)在冷水中浸泡 4 h 使其膨胀,然后在 65 °C 的水浴中溶解,用 1 mol/L NaOH 或 HCl 溶液调 pH 值至 6.5。配制一系列不同浓度的 mTG 溶液各 10 mL,在磁力搅拌下将 mTG 溶液加入到已溶解好的明胶溶液中,并使明胶溶液的最终质量分数为 6.67% (如无特别说明,本文中的明胶溶液质量分数均为 6.67%)。混合溶液在 50 °C 的水浴振荡器中反应 4 h 后,在 95 °C 水浴中放置 10 min 使酶失活,然后在室温下自然冷却^[9]。

1.2.2 测试方法

1) 凝胶强度的测定 将被测样品溶液盛于直径为 39 mm 的广口瓶中,置于 10 ℃ 的恒温水浴中 17~18 h,然后放在测试台上。用直径为 1.27 cm 的不锈钢测试头以 1 mm/s 速度向下插入样品中 4 mm 深。计算机自动将测试头插入时的阻力换算成 Bloom 值(g)用以表征凝胶的强度。每份样品重复测定 2 次,取 3 次测定结果的平均值。

2) 凝胶熔点的测定 将被测明胶溶液倒入直径为 15 mm 的试管中(使样品高度为 50 mm 左右),置于 10 ℃ 的水浴中 17~18 h 使其形成凝胶。加入 2~3 滴溴甲酚蓝指示剂,顶部放入一个直径为 5 mm 的玻璃球。以 0.5 ℃/min 的速率将水浴升温,当玻璃球下降到样品高度一半时的温度即作为凝胶的熔点。每份样品重复测定 2 次,取 3 次测定结果的平均值。

3) 明胶溶液粘度的测定 将 18 mL 质量分数为 6.67% 的被测明胶溶液置于样品筒内,在 60 ℃ 下平衡 15 min,调整 Model LV 2000 Canon 旋转粘度计到恰当的档位即可测得粘度值。每份样品重复测定 2 次,取 3 次测定结果的平均值^[10]。

2 结果与讨论

2.1 mTG 处理对不同品级明胶强度的影响

M. Nonaka 等人的研究表明,通过 mTG 处理可以影响某些蛋白质凝胶的强度;某些不能自然形成凝胶的蛋白质经过 mTG 处理后也可以形成凝胶。图 1 是 Bloom 强度分别为 75,95,240 g 的市售 B 型食用明胶经过不同添加量(0~50 U/g,以干明胶计)的 mTG 处理后强度的变化趋势。

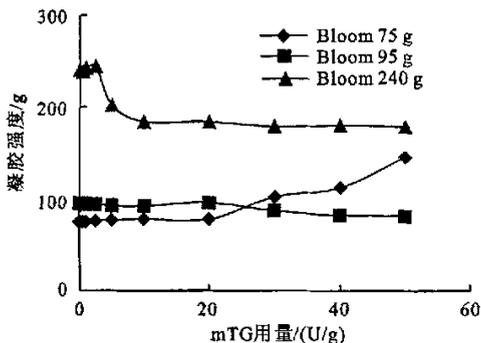


图 1 不同品级的 B 型食用明胶经 mTG 改性后的凝胶强度

Fig. 1 Gel strength of different quality type B edible gelatins modified with mTG

图 1 可以看出,随着 mTG 用量的增大,强度为 75 g 的 B 型食用明胶的强度逐渐增大到 145 g;而

万方数据

强度为 95 g 的 B 型食用明胶除了在 mTG 用量为 10 U/g 附近时强度略有提高外,其强度反而随酶用量的增加而下降,这与 H. Sakamoto 等人的研究结果吻合。H. Sakamoto 等人认为这是由于过多的 ϵ -(γ -谷氨酰) 赖氨酸交联键产生后,凝胶开始断裂的结果^[9]。对强度为 240 g 的高品级明胶而言,少量的 mTG 就可以对其强度产生影响:当 2.5 U/g 的酶加入后,其强度略升高到 244 g,但此后随着酶用量的增加,其凝胶的强度迅速下降,当酶用量达到 50 U/g 时,其强度下降到 178 g。

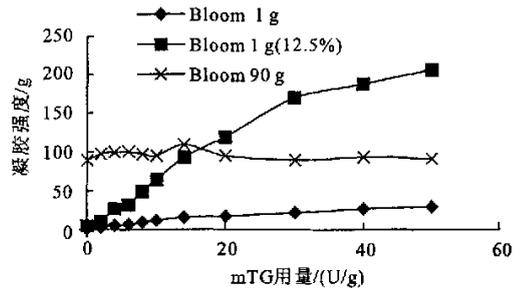


图 2 不同强度的自制明胶经 mTG 改性后的凝胶强度
Fig. 2 Gel strength of different Quality experimental gelatins modified with mTG

图 2 是从制革废弃物中提取的明胶经过不同用量 mTG 处理后的情形。对于用胰蛋白酶从制革废弃物中提取的强度为 1 g 的明胶(因为其强度太低,严格地说应该称之为胶状蛋白质),用 50 U/g 的酶处理后,其凝胶强度提高了 30 倍,达到了 30 g。当再提高明胶质量分数到 12.5% 后,用 mTG 进行处理的结果表明,在酶用量分别为 25 U/g 和 50 U/g 时,此种胶状蛋白质的凝胶强度从 4.6 g 分别提高到 145 g 和 207 g。两者相对照可以看出,明胶溶液的质量分数对其强度的影响是非常大的。用碱性氧化物(MgO)从制革废弃物中提取的强度为 90 g 的明胶,经过不同添加量的 mTG 处理后的情形与强度为 95 g 的 B 型食用明胶类似。经过低添加量的 mTG 处理后其强度略有提高,当酶用量达到 14 U/g 时,凝胶强度增大到 114 g;此后随着酶用量的增加,其凝胶的强度缓慢下降,但始终高于未经酶处理的试样,这一点与强度为 95 g 的 B 型食用明胶有所不同。

2.2 mTG 处理对不同品级明胶的凝胶熔点的影响

从理论上分析, mTG 如果催化明胶的分子链之间产生交联,就意味着明胶相对分子质量的增大,凝胶的熔点自然会提高。这一点对制备可食性明胶包装膜很有意义,因为具有高于室温的凝胶熔点是可食性明胶包装膜必须具备的性质。作者试

验了不同品级的明胶经过不同添加量的 mTG 作用后凝胶熔点的变化情况,结果见表 1 及图 3。

表 1 mTG 改性明胶的凝胶熔点

Tab. 1 Melting Point of Gelatins Modified with mTG

mTG 用量/ (U/g)	Bloom 强度/g		
	90	95	240
0	27.7	29.4	32.6
1.0	29.3	—	32.9
2.0	>90.0	—	33.4
2.5	—	29.5	34.0
3.0	—	—	35.7
4.0	>90.0	—	—
5.0	>90.0	30.0	36.4
7.5	>90.0	30.8	>90.0
10.0	>90.0	31.6	>90.0
20.0	>90.0	>90.0	>90.0
30.0	>90.0	>90.0	>90.0
40.0	>90.0	>90.0	>90.0
50.0	>90.0	>90.0	>90.0

从表 1 可以看出,对于强度为 95 g 的 B 型食用明胶而言,当 mTG 用量达到 10 U/g 时,其凝胶熔点提高了 3 °C;当 mTG 用量达到 20 U/g 以上时,其凝胶熔点将高于 90 °C;对于强度为 240 g 的 B 型食用明胶而言,当 mTG 用量达到 5 U/g 时,其凝胶熔点就达到 90 °C 甚至更高。随着明胶品级的提高,提高凝胶熔点所需要的 mTG 的量大大降低。但用碱从制革废弃物中提取的 Bloom 强度为 90 g 的明胶却不符合这一规律,从表 1 可以看出,只需要 2 U/g 的酶即可将其凝胶熔点提高到 90 °C 以上。由此来看,在 mTG 的作用下,Bloom 强度为 90 g 的自制明胶在强度的变化趋势上与强度相近的 B 型食用明胶相似,而其凝胶熔点对 mTG 的敏感性却类似于甚至超过品级比其高得多(Bloom 强度为 240 g)的 B 型食用明胶。

图 3 给出了品级更低一些的明胶经过 mTG 作用后凝胶熔点的变化趋势。从中可以看出,Bloom 强度为 75 g 的 B 型食用明胶,当酶用量达到 50 U/g 时,其凝胶熔点从 27.4 °C 升高到 46.0 °C。用胰蛋白酶从制革废弃物中提取的 Bloom 强度为 1 g 的明胶,经过酶的作用,虽然不像高品级的明胶那样凝胶熔点急剧上升,但是与参照样相比还是有较明显的提高,因为参照样即使在 10 °C 下冷却 17 h 后仍然不凝固(即没有凝胶熔点)。当 mTG 用量达到 10 U/g 时,其凝胶熔点达到 24.7 °C;即使 mTG 用量达到 50 U/g,其凝胶熔点也仅能达到 26.7 °C;从

图 3 还可以看出,强度 1 g 的自制明胶在溶液浓度为 12.5% 时,熔点为 23 °C;经过 25,50 U/g 的 mTG 作用后,其熔点分别升高到 28.7 °C 和 35.9 °C。

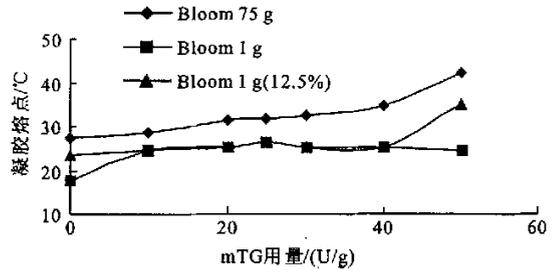


图 3 mTG 用量对低品级明胶凝胶熔点的影响

Fig. 3 Effect of mTG conc. on the melting point of lower quality gelatin

2.3 mTG 处理对不同类型明胶的粘度的影响

明胶的粘度也是衡量其在可食性包装膜中应用的一个重要指标。mTG 催化明胶分子链之间产生交联而增大其相对分子质量之后,其溶液的粘度也理应增大。图 4 是用通用方法^[12]测量的 B 食用明胶和自制明胶在 60 °C 时,溶液粘度随 mTG 用量而变化的情况。从图中可以看出,溶液的粘度的变化不仅与酶的用量有关,而且与明胶的品级和种类也有关系。一般来说,各类明胶的粘度都随着酶用量的递增而提高,而且明胶的品级越高,将粘度提高到相同值所需的酶用量就越少;但是,用碱性方法从制革废弃物中提取的 Bloom 强度为 90 g 的明胶,表现出一定的特殊性:这种明胶溶液的粘度对 mTG 的敏感性比 Bloom 强度为 240 g 的 B 型食用明胶还要大:2 U/g 的酶用量就会使其在 60 °C 时产生凝胶而导致粘度无法测量;但是对于 Bloom 强度为 240 g 的 B 型食用明胶,需要 5 U/g 的酶用量才能达到同样的效果;对于 Bloom 强度为 95 g 的 B 型食用明胶,更是需要 30 U/g 的酶用量。

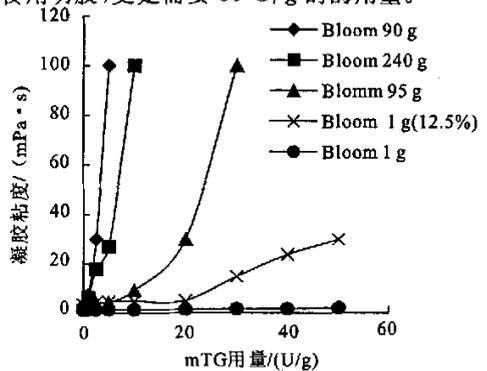


图 4 mTG 用量对明胶粘度的影响

Fig. 4 Affection of mTG conc. on the viscosity of gelatin solutions

从图4中还可以看出,用胰蛋白酶从制革废弃物中提取的 Bloom 强度为 1 g 的自制明胶,当溶液质量分数为 6.67% 时,其粘度受酶的影响要小的多,即使 mTG 用量为 50 U/g 时,其粘度也才达到 4.4 mPa·s;但是对于质量分数为 12.5% 的同种溶液, mTG 用量为 50 U/g 时,其粘度将达到 38 mPa·s. 这也说明了明胶质量分数对其粘度的影响是相当大的。

3 结 论

用从微生物中分离出了转谷氨酰胺酶(mTG)

改性明胶时,其强度、凝胶熔点及溶液粘度等物理性质将产生变化。随着酶用量的增加,低强度的明胶,其改性产物的凝胶强度有所提高,而高强度的明胶其改性产物的凝胶强度保持不变甚至有所降低;所有改性明胶的熔点都得到提高,有些甚至达到 90 ℃;所有改性产物在 60 ℃ 时的粘度都有所提高;改性产物的凝胶温度不仅受酶用量的影响,而且与明胶的品级和种类有关。

参考文献:

- [1] Clark R C, Courts A. The Chemical Reactivity of Gelatin[M]. New York: Academic Press, 1977.
- [2] Taylor M M, Cabeza L, Brown E M, et al. Chemical modification of protein products isolated from chromium-containing solid tannery waste and resultant influence on physical and functional properties[J]. *J Amer Leather Chem Assoc*, 1999, 94:171-181.
- [3] Ando H, Adachi M, Umeda K, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms[J]. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(10):2613-2617.
- [4] Motoki M, Ohiyama A, Ando H, et al. Transglutaminase[P]. 美国专利:USP 5 156 956, 1992-10-20.
- [5] Nielsen P M. Reaction and potential industry applications of transglutaminase. Review of literature and patents[J]. *Food Biotechnol*, 1995, 9(3):119-156.
- [6] Babiker E E, Fujisawa N, Matsudomi N, et al. Improvement in the functional properties of gluten by protease digestion or acid hydrolysis followed by microbial transglutaminase treatment[J]. *J Agr Food Chem*, 1996, 44:2746-2750.
- [7] Babiker E E. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein[J]. *Food Chem*, 2000, 70:139-145.
- [8] Taylor M M, Diefendorf E J, Marmer W N. Effects of various alkalinity-inducing agents on chemical and physical properties of protein products isolated from chromium-containing leather waste[J]. *J Amer Leather Chem Assoc*, 1994, 89:221-228.
- [9] Sakamoto H, Kumazawa Y, Motokai M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions[J]. *J Food Sci*, 1994, 59(4):866-871.
- [10] GMIA. Standard Methods for the Sampling and Testing of Gelatins[M]. New York: GMIA, 1986.
- [11] Nonaka M, Tanaka H, Okiyama A, et al. Polymerization of several proteins by Ca²⁺-independent transglutaminase derived from microorganisms[J]. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(10):2619-2623.

(责任编辑:朱明)