

转谷氨酰胺酶在聚丙烯微孔膜上的固定化

刘颖, 范婷婷, 张丹丹, 张鹤, 张帅, 石彦国
(哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:研究了转谷氨酰胺酶在聚丙烯微孔膜上的化学固定化的影响因素, 确定了最佳固定化工艺条件, 即为: 第一步光照反应 6 min, 单体质量分数为 20%, 第二步光照时间 25 min, 接枝率最高可达 35.2%; 己二胺质量分数为 25%, 胺烷基化时间 150 min, 胺烷基化温度 60℃; 戊二醛质量分数 3%, 戊二醛作用时间 45 min; 酶液浓度 10 mg/mL, 固定化时间 20 h, 固定化温度 4℃, 固定化酶膜的活力最高可达游离酶的 45%。并研究了温度、pH、金属离子对固定化酶膜的酶学性质的影响, 其贮存性能和操作稳定性也做了初步研究。

关键词:转谷氨酰胺酶; 固定化; 酶学性质

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2009)12-0049-04

Immobilization of transglutaminase on polypropylene membrane

LIU Ying, FAN Ting-ting, ZHANG Dan-dan, ZHANG He, ZHANG Shuai, SHI Yan-guo

(College of Food Engineering Harbin Commercial University, Harbin 150076, China)

Abstract: The influencing factors of chemical immobilization of transglutaminase on polypropylene membrane are studied, and the optimal conditions of immobilization are determined by experiments: ① after the first photoreaction for 10 minutes with the monomer mass fraction of 20%, and the second photoreacton for 25 minutes, the grafting degree can reach 35.2%; ② with the hexamethylene diamine mass fraction of 25%, the alkylate reaction for 150 minutes at 60℃, 3% of glutaraldehyde solution and the glutaraldehyde labilization for 45 minutes, the activity of enzyme can be 10 mg/mL, and after enzyme immobilized for 20 hours at 4℃, the highest activity of the membrane can be 45% of that of free enzyme. The temperature, pH value, the influence of metallic ions on the enzymatic properties of membrane with enzyme immobilized, the storage performance and operational stability are also studied.

Key words: transglutaminase; immobilization; enzymatic property

转谷氨酰胺酶(TGase; EC2.3.2.13; 全称为蛋白质-谷氨酰胺 γ -谷氨酰胺基转移酶)是一种能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(酰基受体)之间的酰基转移反应的酶^[1]。它可通过胺的导入、交联以及脱胺 3 种途径改性蛋白质, 使蛋白质的功能特性得到改善, 是发展新型蛋白质最有希望的方法之一^[2]。Nonaka 等^[3]最早报道了微生物转谷氨酰胺酶能催化大豆球蛋白聚合以及胶凝, 之后相继有很多学者研究了微生物转谷氨酰胺酶催化植物蛋白的交联反应^[4-5]。但由于游离酶本身不稳定、重复利用率低等缺点使其难以应用到工业化生产中。将转谷氨酰胺酶进行固定化, 可达到降低成本的目的。聚丙烯微孔膜具有化学稳定性好、无毒、机械性能优异等特点, 笔者通过紫外光引发甲基丙烯酸甲酯的接枝聚合, 在膜表面引入反应性基团, 进而与己二胺作用引

入间隔臂, 最后通过戊二醛与转谷氨酰胺酶结合, 实现转谷氨酰胺酶在化学惰性的聚丙烯膜上的共价固定化, 研究了固定化酶的酶学性质, 并模拟改性大豆蛋白环境, 验证了微生物转谷氨酰胺酶操作中的稳定性。

1 实验部分

1.1 主要材料及设备

转谷氨酰胺酶, 江苏一鸣精细化工有限公司; 还原型谷胱甘肽、*N*- α -CBZ-Gln-Gly, Sigma 公司; *L*-谷氨酸 γ -单羟肟酸, Sigma 公司; 聚丙烯微孔膜, 上海绿鸟科技发展有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。500 W 紫外光引发装置为实验室自制; Spectrum 721E 型可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司。

1.2 转谷氨酰胺酶在聚丙烯微孔膜上的固定化

将经丙酮预处理的聚丙烯平板膜经两步光照法

收稿日期: 2009-08-02; 修回日期: 2009-10-30

基金项目: 国家“863”课题(2006AA10Z329)

作者简介: 刘颖(1968-), 女, 博士, 副教授, 主要从事食品生物技术方面研究, fanftt@163.com; 石彦国(1960-), 男, 硕士, 教授, 研究方向为食品植物蛋白油脂, 通讯联系人, 13603681425。

将甲基丙烯酸甲酯在膜表面紫外光引发接枝。将接枝成功的甲基丙烯酸甲酯膜浸入一定浓度的己二胺溶液中,于空气振荡器振荡一定时间,完成间隔臂引入的环节。将己二胺处理过的膜浸入一定浓度的戊二醛溶液中,于空气振荡器中振荡一定时间完成戊二醛活化环节。最后将表面活化的平板膜剪成小片,取一定量的膜片浸入 10 mL 酶溶液中,于 4℃ 反应数小时。将膜取出,用大量磷酸盐缓冲溶液冲洗,以除去表面粘附的酶液。将固定化酶膜浸入磷酸盐缓冲溶液中,于 4℃ 下储存备用。

通过对两步光照法的时间对接枝率的影响,间隔臂引入过程中的己二胺浓度、反应温度、反应时间对酶活力的影响,戊二醛活化过程中戊二醛浓度、反应时间对酶活力的影响及在酶固定化过程中酶液的浓度、固定化时间对酶活力的影响来完成转谷氨酰胺酶在聚丙烯微孔膜上固定化的研究。

1.3 转谷氨酰胺的酶活测定和表征

采用 Folk 和 Cole 报道的分光 Hydroxamate 分析法测定^[6]。L-谷氨酸 γ -单羟肟酸标准曲线的线性回归方程是 $y = 0.106x - 0.0153$, $R^2 = 0.99$, 其中 x 为 L-谷氨酸 γ -单羟肟酸的浓度 (mmol/mL), y 为 525 nm 处的吸光值。

2 结果与讨论

2.1 固定化条件的研究

结果显示,接枝率随着第一步光照时间的增加而增加,当光照时间在 6 min 之后,接枝率没有明显变化,所以第一步光照时间确定为 6 min。单体甲基丙烯酸甲酯质量分数为 20% 时,接枝率最大,而随着其质量分数的增加,接枝率不再有明显变化,所以将其确定为 20%。随着接枝反应时间及第二步光照时间的增加接枝率逐渐升高,直至 25 min 左右达到恒定值,而且用两步光照法接枝甲基丙烯酸甲酯,最高接枝率可达 35.2%。间隔臂引入的结果显示,当己二胺的质量分数在 25% 时,酶活性达到最大,并且随着其浓度的增加酶活性也变化不大,所以己二胺的质量分数控制在 25%;而当胺烷基化温度大于 60℃ 时,酶活性没有太大的变化,说明该温度下可以使胺烷基化反应进行完全,因此 60℃ 为胺烷基化最佳温度。在反应过程中,随着胺烷基化时间的延长,酶活性持续增加,当反应达到 150 min 时,酶活性最高,并且反应时间继续增加,酶活性也没有明显的变化,因此胺烷基化反应时间控制在 150 min。

在戊二醛活化的实验中,戊二醛浓度的增加并

不能使酶活性获得显著提高,综合各方面因素考虑,将戊二醛质量分数确定在 3%;而在 30℃ 下,随着戊二醛活化时间的增加,酶活性并没有出现显著的增长趋势,综合考虑,将戊二醛活化时间确定在 45 min。

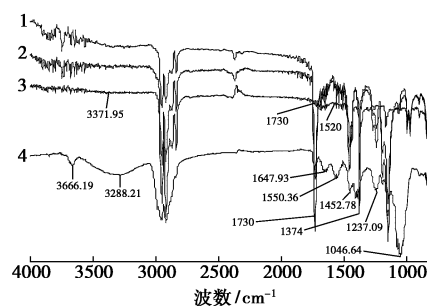
酶固定化的实验结果显示,将甲基丙烯酸甲酯膜浸入不同浓度的酶溶液中,随着酶溶液的浓度增加,酶活力也增强,当溶液浓度为 10 mg/mL 时,酶活力达到最大;而在 4℃ 下固定需要很长时间,当反应 20 h 后,反应较完全,酶活性增加不显著,因此将酶固定化时间控制在 20 h。

综上,转谷氨酰胺酶在聚丙烯微孔膜上固定化的最佳条件是:第一步光照反应 6 min,单体质量分数为 20%,第二步光照时间 25 min,接枝率最高可达 35.2%;己二胺质量分数为 25%,胺烷基化时间 150 min,胺烷基化温度 60℃;戊二醛质量分数 3%,戊二醛作用时间 45 min;酶液质量浓度 10 mg/mL,固定化时间 20 h,固定化温度 4℃,固定化酶膜的活力最高可达游离酶的 45%。

2.2 固定化酶膜表面化学结构的表征

2.2.1 衰减全反射傅里叶变换红外(ATR-IR)分析

聚丙烯膜表面的 ATR/FT-IR 分析如图 1。



1—未经接枝的聚丙烯平板膜;2—经紫外接枝后的甲基丙烯酸甲酯-聚丙烯微孔膜;3—胺烷基化后的平板膜;4—转谷氨酰胺酶固定化酶膜

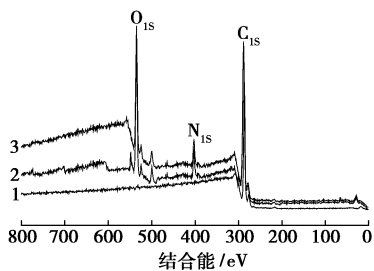
图 1 固定化酶膜的 ATR-IR 图谱

甲基丙烯酸甲酯接枝到聚丙烯膜上以后,1 734 cm^{-1} 处出现了新峰,这是酯基中 C=O 的伸缩振动(谱线 2)。进一步胺烷基化后,1 734 cm^{-1} 处有所减弱,说明部分酯基发生了酰胺化反应。而 1 648、1 550 cm^{-1} 的新吸收峰,分别是酰胺结构中的 C=O 的伸缩振动和 N-H 弯曲振动。此外约 3 371 cm^{-1} 处有所增强,这是 N-H 伸缩振动(谱线 2)。膜表面进一步用戊二醛处理后,原有的 1 647、1 550 cm^{-1} 与新引入的 C=N 的伸缩振动、醛基中 C=O 的伸缩振动相互叠加,在 1 520 ~ 1 730 cm^{-1} 间形成

了一个宽的峰包(谱线3)。最后,将酶键合到膜上以后,ATR/FT-IR谱中又出现了一些转谷氨酰胺酶分子的特征吸收峰(谱线4)。与转谷氨酰胺酶粉的红外谱图(压片法,图略)比较,可发现转谷氨酰胺酶分子在 $3\ 368$ 、 $1\ 028\ \text{cm}^{-1}$ 处的特征吸收在图1中均有出现,只是分别迁移到了 $3\ 666$ 、 $1\ 046\ \text{cm}^{-1}$ 。而且固定化酶分子在 $1\ 157\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰与固定化之前膜在该处的吸收峰相叠加,形成了一个很强的吸收带。此外酶键合到膜上后,约 $3\ 373\ \text{cm}^{-1}$ 处也进一步增强,且有蓝移的趋势,这是固定化酶分子中N—H伸缩振动引起的。

2.2.2 X射线光电子能谱分析(XPS)

固定化前后膜的表面XPS分析如图2。未改性的聚丙烯膜在 $285.1\ \text{eV}$ 处出现了较强的 $\text{C}_{1\text{S}}$ 的信号峰, $532.75\ \text{eV}$ 处出现的非常微弱的 $\text{O}_{1\text{S}}$ 信号峰可以归因于膜表面的氧污染(谱线1)。膜表面经甲基丙烯酸甲酯接枝,并用己二胺胺烷基化以后, $\text{C}_{1\text{S}}$ 信号峰减弱,而 $\text{O}_{1\text{S}}$ 信号峰有所增强,这说明了酰基氧原子的存在。此外,由于膜表面引入的氨基的量相对较少,因而 $\text{N}_{1\text{S}}$ 峰并不明显(谱线2)。膜表面用戊二醛将酶分子固定上以后, $\text{C}_{1\text{S}}$ 信号峰进一步减弱,而 $\text{O}_{1\text{S}}$ 信号峰进一步增强,且在 $400.375\ \text{eV}$ 处出现了明显的 $\text{N}_{1\text{S}}$ 峰,这主要是由酶蛋白中氨基酸残基氮元素所引起的(谱线3)。



1—未改性;2—经甲基丙烯酸甲酯接枝及己二胺胺烷基化;
3—用戊二醛固定酶分子

图2 酶固定化前后膜表面的XPS图谱

根据峰面积计算得到的膜表面各元素的摩尔比例列于表1。聚丙烯膜表面胺烷基化以后碳比例下降,而氧比例明显上升,且显示出少量氮的存在

表1 固定化酶膜表面元素比例表

膜	摩尔分数/%		
	C	N	O
平板膜	99.39	0.00	0.61
接枝膜	87.89	1.18	10.83
固定化酶膜	63.58	7.41	27.98

(摩尔分数1.18%)。酶固定到膜上后,氧和氮的比例都有进一步提高。

2.3 固定化酶膜与游离酶酶学性质的比较

由图3(a)可看出,转谷氨酰胺酶经化学固定化以后,最适温度由 45℃ 提高到了 55℃ ,耐热性能显著增加。将一定量的游离酶和固定化酶膜浸入 30 、 35 、 37 、 40 、 45 、 50 、 55℃ 水浴中保温 $120\ \text{min}$,取出放置室温,再进行酶活的测定,通过图3(b)可看出,酶经过固定化后,热稳定性有了显著提高。这主要是由于固定化稳定了酶分子构象,从而减少了其热致构象变化的可能性,提高了酶分子的抗热失活能力。

从图3(c)可以看出,游离酶反应的最适pH为7,而经过固定化后反应的最适pH为6左右,固定化酶的最适pH明显地向酸性方向移动,类似的现象也被陈海英等^[7]报道过。由图1(d)可看出,游离酶在 $\text{pH}=5\sim 7$ 的环境中较稳定,而固定化酶膜对pH的稳定域发生的偏移为 $4\sim 7$,说明经膜固定化后,酶对酸碱的稳定性有所增强。

图3(e)显示,与游离酶相比, Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 离子的激活作用相对下降, Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 离子的抑制作用也在下降,而 Na^+ 、 K^+ 离子的激活作用几乎无改变。

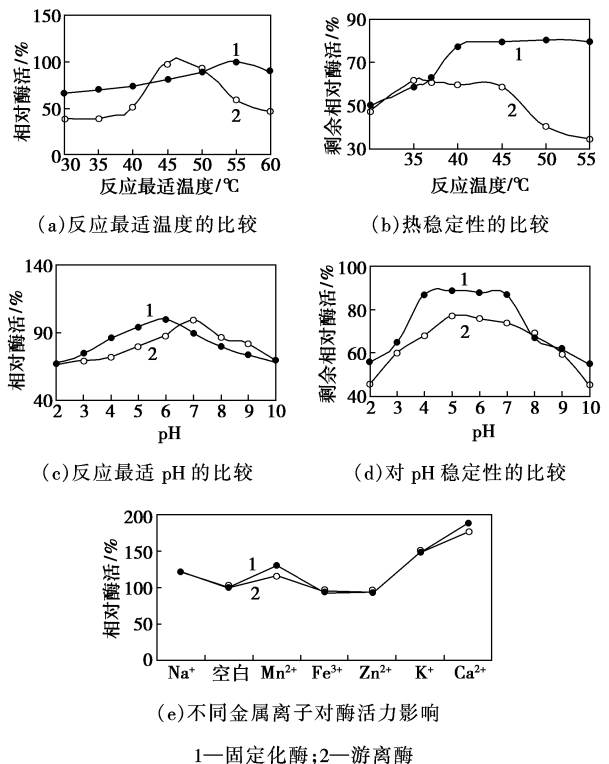


图3 固定化前后酶学性质的比较

由图4可看出,经过 $30\ \text{d}$ 的实验,固定化酶膜活力下降的速度明显低于游离酶活力的下降速度,直接将固定化酶膜放于磷酸盐缓冲溶液中在 4℃ 冰

箱中保存即可,30 d 之后剩余酶活保持在 75% 左右。

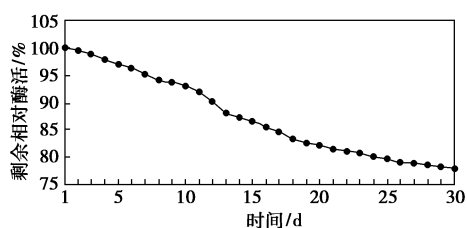
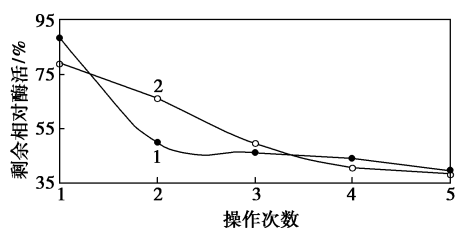


图 4 固定化酶膜贮存性能的研究

如图 5 所示,固定化酶膜在 37℃ 的半衰期为 8 h,而在 50℃ 时的半衰期为 6 h。虽然经过 5 次重复操作后所剩酶活与曾经研究过的海藻酸钠固定化酶 5 次重复操作后所剩酶活几乎相同,但是酶膜不存在壁材溶解的问题,即不存在破损的问题。在不考虑可操作性的假设下,固定化酶膜的酶活下降趋势与海藻酸钠固定化酶相比是缓慢的,在工业应用方面的前景要好于后者。



1—37℃ 间歇式反应 20 h; 2—50℃ 间歇式反应 10 h

图 5 固定化酶膜操作稳定性的研究

3 结语

以聚丙烯膜为载体,采用两步光照法进行紫外引发接枝,然后通过间隔臂的引入,向甲基丙烯酸甲酯膜上接入间隔臂己二胺,在进行戊二醛活化过程完成膜的修饰过程,然后将转谷氨酰胺酶固定在已修饰好的甲基丙烯酸甲酯聚丙烯微孔膜上,完成了

固定化的实验。实验室确定了最佳固定化条件:第一步光照反应 6 min,单体浓度为 20%,第二步光照时间 25 min,接枝率最高可达 35.2%;己二胺浓度为 25%,胺烷基化时间 150 min,胺烷基化温度 60℃;戊二醛质量分数 3%,戊二醛作用时间 45 min;酶液质量浓度 10 mg/mL,固定化时间 20 h,固定化温度 4℃,固定化酶膜的活力最高可达游离酶的 45%。对固定化酶膜的酶学性质进行了初步的研究,发现固定化酶膜耐热性好,对热稳定性增强,贮存时间长,操作稳定性强。但是跟包埋、交联等相比,紫外光引发接枝化学固定化的可操作性仍存在问题,而且耗时长,这对于企业的应用是一个挑战,尚需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] Motoki M, Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing[J]. *Trend Food Sci Technol*, 1998(9): 204 - 210.
- [2] 周楠迪,陈坚,郑美英,等. 谷氨酰胺转氨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 - 59.
- [3] Nonaka M, Yokoyama K, Nio N, et al. Polymerization of several proteins by Ca^{2+} -independent transglutaminase derived from microorganisms [J]. *Agric Biol Chem*, 1989, 53: 2619 - 2623.
- [4] Renzetti S, Bello F D, Arendt E K. Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase[J]. *Cereal Science*, 2008 (6): 33 - 45.
- [5] Jiang Yan, Tang Chuan-He, Wen Qi-Biao, et al. Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films[J]. *Food Science and Emerging Technologies*, 2007(8): 218 - 225.
- [6] Folk J E, Ando H, Adadi M, et al. Structural requirements of specific substrates for guinea pig liver transglutaminase[J]. *J Biol Chem*, 1965, 240: 2951 - 2960.
- [7] 陈海英,张春红,韩晓芳,等. 以海藻酸钙为载体固定化谷氨酰胺转氨酶及其性质的研究[J]. *食品科技*, 2006, 10(27): 69 - 71. ■

《现代化工》入选中国科学引文数据库核心期刊

《现代化工》创刊于 1980 年,为中国化工信息中心主办的综合性化工技术类期刊。经过近 30 年的发展,《现代化工》已经在化工领域有了很大的影响力,一直入编《中文核心期刊要目总览》。今年,《现代化工》入编《2009—2010 年中国科学引文数据库核心期刊》。目前,《现代化工》既是中文核心期刊也是科学引文数据库核心期刊。读者可在中科院中国科学文献服务系统网站(<http://sdb.csdl.ac.cn/>),点左下角“中国科学数据库来源期刊”查证。

——《现代化工》编辑部