

海藻酸钠固定化谷氨酰胺转氨酶 稳定性的研究

张春红, 陈海英, 韩晓芳, 刘长江
(沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要:研究了利用海藻酸钠固定化谷氨酰胺转氨酶的过程中戊二醛浓度、酶浓度对酶活的影响,并对固定化酶的性质进行了探讨。实验结果表明,当戊二醛浓度为1.0%、酶浓度为20%时,酶活回收率为37.8%,固定化酶的pH稳定性、热稳定性、操作稳定性及贮存稳定性都比游离酶显著提高。

关键词:谷氨酰胺转氨酶, 固定化, 海藻酸钠, 戊二醛, 稳定性

Abstract: A method is proposed to immobilize transglutaminase with calcium alginate. The effects of glutaraldehyde concentration and the concentration of transglutaminase on the immobilization are analyzed and the characteristics of the immobilized enzyme are discussed. Experiments show that the recovery rate of transglutaminase could be as high as 37.8% when 1.0% glutaraldehyde and 20% transglutaminase were used. The stabilities of the immobilized enzyme against pH value and heat, its operational stability and storage stability were obviously higher than those of native transglutaminase.

Key words: transglutaminase; immobilization; sodium alginate; glutaraldehyde; stability

中图分类号: TS201.2·5 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2006)09-0069-03

谷氨酰胺转氨酶作为一种新型酶制剂,能够催化蛋白质分子内、分子间的交联、蛋白质和氨基酸之间的连接以及蛋白质分子内谷氨酰胺基的水解,提高蛋白质的营养价值,改善蛋白质的功能性^[1,2]。因此,该酶在食品工业的应用研究受到越来越多的关注,有“超级黏合剂”的美誉。固定化酶与游离酶相比

具有许多优点,如易于和底物、产物分离;酶的稳定性增加,可以重复使用;酶的使用效率增加;成本显著降低^[3]等等。目前已经有多种固定化酶在食品工业中得到了应用,但对谷氨酰胺转氨酶进行固定的报道比较少。海藻酸钠是从海藻中提取的盐,是一种能使动物组织免受物理和化学损伤的保护剂,对人和动物没有毒副作用。本文以海藻酸钠为载体,通过戊二醛交联,对谷氨酰胺转氨酶进行了固定化尝试,研究了固定化酶的性质,并同游离酶进行了比较。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

谷氨酰胺转氨酶 江苏一鸣精细化工有限公司;海藻酸钠、戊二醛 国产分析纯。

RVA-3D型快速粘度分析仪 澳大利亚Newport科学仪器公司;1100型分光光度计 北京瑞利仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 谷氨酰胺转氨酶的固定化 将海藻酸钠与酶分别溶于缓冲液中,在37℃水浴中使海藻酸钠融化后,按一定比例与酶混合,静置一定时间,吸入注射器内,再逐滴滴入氯化钙溶液中固定化,然后过滤洗涤,加入戊二醛溶液交联,再洗涤,测定酶活。

1.2.2 固定化酶活力的测定

1.2.2.1 相对酶活的测定 采用RVA-3D型快速粘度分析仪测定经固定化酶作用后大豆分离蛋白的凝胶性,间接计算谷氨酰胺转氨酶的相对酶活。

1.2.2.2 固定化酶酶活测定 比色法^[4]。

2 结果与讨论

2.1 戊二醛浓度的影响

戊二醛是一种双官能团试剂,可以和载体上的氨基进行schiff反应,再与酶发生schiff反应。从图1

收稿日期: 2005-12-26

作者简介: 张春红(1968-),女,博士,副教授,主要从事植物蛋白质、酶工程方面的研究。

基金项目: 辽宁省科技厅科技攻关项目(2004205001);辽宁省教育厅项目(2005369);沈阳农业大学中、青年硕士导师项目资助。

结果可知,在戊二醛浓度低于 1.0% 时,相对酶活随戊二醛浓度的增加而增大,但进一步增加戊二醛浓度将导致相对酶活下降,这是因为酶分子活性基团被戊二醛过多的修饰。因此,确定最适戊二醛浓度为 1.0%。

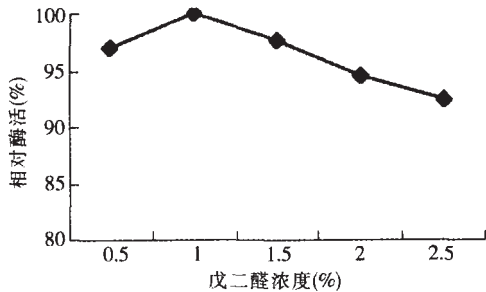


图 1 戊二醛浓度对固定化酶相对酶活的影响

2.2 酶浓度对固定化酶活性的影响

一定量海藻酸钠的活性基团是一定的。在结合位点未饱和前,固定化酶相对酶活随酶浓度的增加而升高,当结合位点饱和后,增加酶浓度并不能增加固定化酶的相对酶活。结果如图 2 所示,在本实验条件下,酶浓度为 20% 时,相对酶活最高。

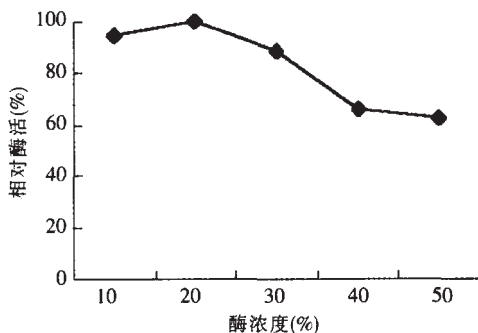


图 2 酶浓度对固定化酶相对酶活的影响

2.3 固定化酶的热稳定性

取一定量的固定化酶和游离酶,分别加入 pH 7.0 的缓冲液,在不同温度下处理 30min,测定其酶活。从图 3 可以看出,酶经固定化后热稳定性较游离酶显著提高。这可能是酶——载体的结合影响了酶的热稳定性,酶经载体吸附和戊二醛交联后,增加酶构型的牢固程度,同时酶蛋白在固定化后,限制了酶分子之间的相互作用,阻止了酶的自溶,从而明显增加了酶

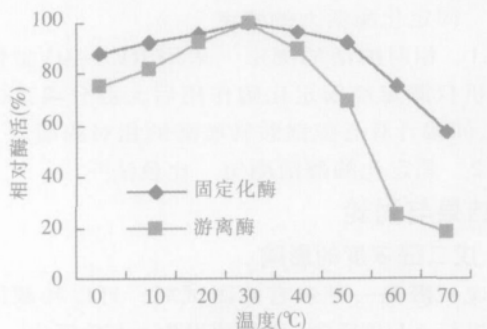


图 3 固定化酶和游离酶的热稳定性

的稳定性。

2.4 固定化酶的最适反应温度

在不同的温度下分别测定固定化酶和游离酶的酶活。从图 4 可以看出,固定化没有改变谷氨酰胺转氨酶的最适作用温度。随着温度的升高,固定化酶和游离酶的酶活不断增加,当温度达到 50°C 时均达到最大值,然后随着温度的升高,酶活下降。这是因为温度过高就会使酶变性,从而大大降低酶的活力。

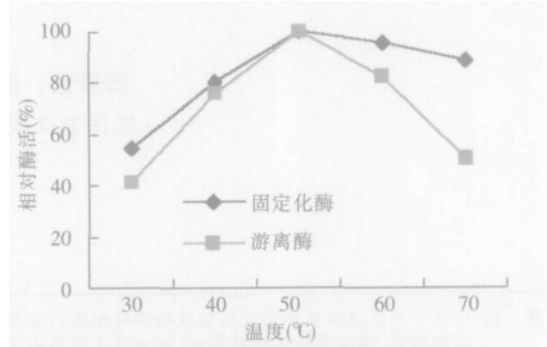


图 4 固定化酶和游离酶的最适反应温度

2.5 固定化酶的 pH 稳定性

取一定量的固定化酶和游离酶,在不同的 pH 下分别处理 30min,测定其酶活。从图 5 可以看出,游离酶的 pH 稳定性范围是 6.0~7.0,固定化酶的 pH 稳定性范围是 5.0~8.0,在实验条件下固定化酶 pH 稳定性提高。这可能是由于固定化后酶所处的微环境发生了变化,其活性中心受到载体的影响,活性基团的解离性发生了变化所致。

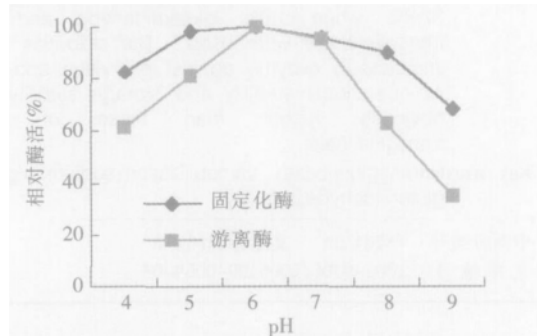


图 5 固定化酶和游离酶的 pH 稳定性

2.6 固定化酶的最适 pH

在不同的 pH 条件下分别测定固定化酶和游离酶的酶活。从图 6 可以看出,固定化酶的最适 pH 为 6.0,而游离酶的最适 pH 为 7.0,可见酶经固定化以后最佳反应 pH 和游离酶相比发生了较小的偏移。

2.7 固定化酶的操作稳定性

游离酶无法从反应体系中分离,因此不能重复利用。而固定化酶则可以从反应体系中分离,可以重复使用。用 pH 6.0 的缓冲液浸泡固定化酶,在 50°C 放置 30min(模拟与底物反应),重复测定固定化酶的酶活。从图 7 中可以看出,固定化酶连续反应 6 次,

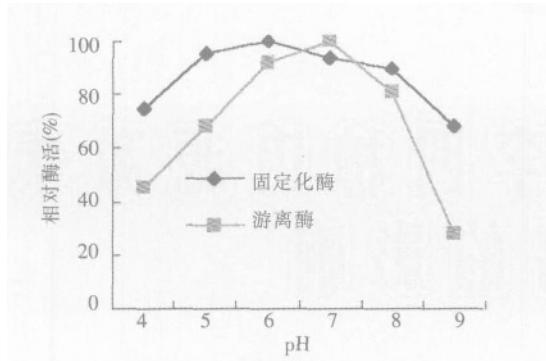


图6 固定化酶和游离酶的最适 pH

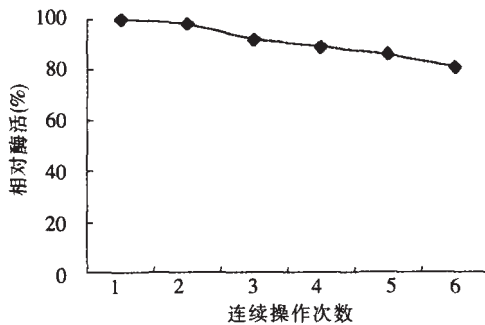


图7 操作稳定性

酶活仍维持在 80% 以上, 说明固定化酶具有较好的操作稳定性。

2.8 固定化酶的贮存稳定性

将游离酶与固定化酶在 4℃ 条件下贮存, 每隔 24h 取样测定酶活, 游离酶和固定化酶的活力随时间的增加而降低, 游离酶放置 10d 后即失活, 而固定化酶放置 42d 后仍能保持 85% 以上的酶活, 这与海藻酸钠和戊二醛交联使酶结构牢固有关。因此, 用海藻酸

(上接第 68 页)

>A>B>D, 最佳组合为 $A_3B_2C_2D_1$ 。提取麸皮蛋白所需最佳实验条件是: 将麸皮粉碎, 提取温度 50℃, pH 为 12, 固液比 1:15, 提取时间 1.5h, 按此条件下所提取的麸皮蛋白的提取率为 68.6%。

2.4 麸皮蛋白性能的研究

测定麸皮蛋白的乳化性为 76%, 乳化稳定性为 63%, 起泡性为 73%, 泡沫稳定性为 47%。

3 结论

碱法提取小麦麸皮蛋白工艺条件容易控制, 操作简单, 取得率较高, 便于大规模工业化生产。通过实验得出较适宜的提取条件为 pH12, 碱提取时间 1.5h, 碱提温度 50℃, 料液比 1:15, 在此条件下所得的麸皮蛋白的提取率为 68.6%。

测定麸皮蛋白的等电点为 pH4.8, 其乳化性为 76%, 乳化稳定性为 63%, 起泡性为 73%, 泡沫稳定性为 47%。

钠制备的固定化酶, 不仅具有较好的温度、pH 稳定性, 而且可以长期保存, 为连续化生产奠定了基础。

3 结论

在最佳条件下制得固定化谷氨酰胺转氨酶, 考察了谷氨酰胺转氨酶的部分性质, 如 pH 稳定性、热稳定性以及最适作用温度、pH、贮存稳定性、操作稳定性。实验结果表明, 谷氨酰胺转氨酶经固定化后, pH 稳定性、热稳定性、贮存稳定性、操作稳定性均有所提高。其酶促作用最佳温度没有变化, 而最适作用的 pH 发生了较小偏移。

4 讨论

本文仅对谷氨酰胺转氨酶的固定化进行了初步研究, 有关固定化谷氨酰胺转氨酶应用时的最佳条件及影响因素还有待进一步探讨。在操作稳定性的实验中, 采用 50℃ 反应 6 次后, 固定化酶破碎。如果适当增加固定化酶的用量, 降低反应温度, 固定化酶的重复操作次数会相应增加。

参考文献:

- [1] 梁海燕, 马丽珍. 谷氨酰胺转氨酶在肉制品加工中的应用[J]. 肉类研究, 2004(1): 50~52.
- [2] 张春红, 等. 改性大豆分离蛋白产品功能性及机理的研究[J]. 中国油脂, 2004(5): 52~54.
- [3] 周蕊, 余蓉, 杨继虞. 固定化胰蛋白酶的快速制备[J]. 生物技术, 2004(6): 26~27.
- [4] 唐传核, 等. 微生物转谷氨酰胺酶(MTGase)的蛋白质底物催化特性及其催化机理研究(I) MTGase 催化单底物蛋白质的聚合特性[J]. 食品科学, 2003(5): 19~24.

参考文献:

- [1] 江和源, 吕飞杰. 小麦胚和小麦麸皮的成分及其开发利用[J]. 粮食与饲料工业, 1999(10): 5~7.
- [2] 李昌文, 欧阳韶辉. 小麦麸皮的综合利用[J]. 粮油加工与食品机械, 2003(4): 55~56.
- [3] Woeman J H Satterlee L D. Extraction and Nutritive Quality of Wheat Protein Concentrate [J]. Food Tech, 1974(1): 50~52.
- [4] 万端极, 凌秀菊, 皮科武, 范明霞. 膜技术小麦面筋改性蛋白清洁生产工艺研究[J]. 工业水处理, 2005(11): 34~36.
- [5] 国家标准局. GB5497-85 GB5505 GB5511-85 GB5512-85 中华人民共和国国家标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1985.
- [6] 刘福玲, 戴行均. 食品的物理化学分析方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1987.