采用激光光散射技术研究转谷氨酰胺酶催化的β-乳球蛋白交联反应

刘付，王昌盛，唐传核

（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：采用体积排阻色谱（SEC）联合多角度激光光散射法(MALLS)技术研究了由微生物转谷氨酰胺酶（MTGase）诱导的 β-乳球蛋白的体外交联反应。结果表明，在 20 mM 二硫苏糖醇（DTT）的存在时，用 MTGase 处理大约 11 h，会逐渐形成高分子量的高聚物或寡聚体，同时 β-乳球蛋白会由二聚体向单体转变。在 DTT 不存在时，同样有这种转变。上述结果表明，MTGase 处理可作为一种很有潜力的技术，可于调控许多球蛋白的热稳定性。

关键词：β-乳球蛋白；微生物转谷氨酰胺酶（MTGase）；交联；激光光散射

文章编号：1673-9078(2010)1-14-5

A Laser Light Scattering Study of Transglutaminase-induced Cross-linking Reaction

LIU Fu, WANG Chang-sheng, TANG Chuan-he

(South China University of Technology, College of Light Industry and Food Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The *in situ* cross-linking reaction of β-lactoglobulin (β-LG) induced by microbial transglutaminase (MTGase) was investigated using size-exclusion chromatography (SEC) combined with multi-angle laser light scattering (MALLS). The results indicated that, in the presence of 20 mM dithiothreitol (DTT), the MTGase treatment up to about 11 h gradually resulted in the formation of biopolymers or oligomers with higher molecular weight (MW), and the transformation of dimeric form of β-LG to its monomeric form. This transformation was also observed in the absence of DTT. These data suggested that MTGase treatment could be utilized as a potential technique to modulate the thermal stability of many globular proteins.

Keywords: β-Lactoglobulin; Microbial translgutaminase (MTGase); Cross-linking; Laser light scattering

酶促交联或聚合反应被证明能够改善食品蛋白质的一些功能性质，包括水化性质、热性质和其他与表面相关的性质[1-3]。转谷氨酰胺酶（TGase；EC 2.3.2.13），特别是微生物来源的 TGase，能够催化不同蛋白质的赖氨酸上残基和谷氨酸残基之间发生转酰基反应以形成 ε-（γ-谷氨酰基）赖氨酸键，从而导致蛋白质之间发生聚合或凝胶化[1,2,4]。

乳清蛋白由于能够赋予食品许多优良的功能性质，如乳化性，凝胶性，持水性，溶解性，起泡性和增稠性等，因而被广泛地应用于配方食品[5]。此类蛋白的一些功能性质可以通过酶促交联得以改变。β-乳球蛋白（β-LG），作为乳清蛋白中含量最丰富的蛋白质，对乳清蛋白的性质起着主要的贡献。尽管每个 β-乳球蛋白分子含有 9-15 个谷氨酸和赖氨酸残基，但此蛋白却不是 MTGase 的合适底物，除非在还原剂的存在下（如DTT）[6,7]或酶处理前进行热处理[8,9]。

热稳定性是乳清蛋白（特别是β-LG）的一种很重要的性质。β-LG是一种研究比较透彻的球蛋白，分子量为36.6 kDa，含有两个二硫键基团和一个游离的埋藏在内部的半胱氨酸残基[10,11]。以前的许多研究都表明，在TGase作用下发生的蛋白质聚合可以很好地改善β-LG的热稳定性[5,8]。例如，与未处理的β-LG相比，在10 mM DTT存在条件下及TGase处理后得到的β-LG高聚物，在pH 7.0表现出较高的热稳定性[5]。β-LG高聚物较高的热稳定性与其紧密的结构密切相关。近来，还有学者观测到变性的β-LG在MTGase（DTT存在条件下）的作用下会形成有紧密结构的聚合β-LG分子，这是因为酶促交联反应影响了脂肪族氨基酸的暴露程度和疏水性相互作用[8,12]。

我们在前一工作中已指出，MTGase处理对热稳定性的影响取决于酶处理的时间，即无论是在DTT存在

收稿日期：2009-09-06

与否情况下，适度的MTGase处理（如6 h或9 h）会导致*β*-LG热稳定性的降低，而过度的处理（23 h）则又会使其热稳定性有明显的增加[13]。蛋白质热稳定性的改变可能是由于蛋白质结构的部分展开以及随后进行的构象重排。但是，这种假设到目前为止还没有被证实。

因此，本文旨在探索在DTT存在与否情况下，MTGase对*β*-LG的体外诱导交联反应。主要通过高效体积排阻色谱（HPSEC）结合多角度激光光散射法（MALLS）技术检测蛋白质分子量分布和高分子量聚合物的形成。

1 材料和方法

1.1 材料

β-乳球蛋白（*β*-LG）（L-3908，冻干粉末，纯度接近90%（电泳级））购于Sigma公司。MTGase购于常熟生物有限公司（江苏省）。该酶的纯化以及活力测定见我们之前的报道[14]。牛血清蛋白单体，购于Sigma公司。其他试剂均为分析纯或更高级。

高效体积排阻色谱系统：HP G1379A抽气装置，G1312泵，G1315紫外检测器，G1362折光检测器（美国Hewlett-Packard公司）。TSK柱：G4000 PWXL+TSK G6000 PWXL（日本TOSOH公司）

激光光散射装置：Dawn EOS光度计（Wyatt科技公司），ASTAR分析软件（Wyatt科技公司）

1.2 酶促交联反应

用0.05 M、pH 7.4的磷酸缓冲溶液配制5%（w/v）*β*-LG溶液，其中含有50 mM NaCl，5 mM NaN_3（以及20 mM DTT）。然后与MTGase溶液混合，酶蛋白比为10 U/g，并于37 ℃进行酶促反应。在不同时间，定量取出2 mL混合液，立即用5倍上述缓冲液（4 ℃）稀释到一定浓度（适合于UV和激光光散射测定）。残余酶活对实验的影响可以忽略不计。

1.3 HPSEC-MALLS 实验

本次试验中 HPSEC 和 MALLS 测量系统均与 ZHAO 等[15]所采用的一致。将两个 TSK 柱（G4000 PWXL+TSK G6000 PWXL）串联起来，其对蛋白质的分级范围是 2000~8000000。流动相（50 mM 磷酸缓冲液，pH 7.4，含有 50 mM NaCl）分别通过 0.2 μm（Whatman International Ltd., Maidstone, England）和 0.02 μm 的过滤器（Millipore Corp., Bedford, MA）。流速为 0.5 mL/min。

MALLS系统采用Dawn EOS光度计。通过两个辅助模拟输入即可以与外部检测器（如折光检测器和紫外检测器）相连。把仪器直接安放在折光（RI）检测器的前面、SEC柱和紫外（UV）检测器的后面，以避免折光池上的反压力。得到的色谱数据用ASTAR软件分析。用牛血清蛋白单体对不同检测器信号（相对于90 º检测器信号）进行标准化。

2 结果与讨论

2.1 SEC-UV 和 MALLS (90 º)分析

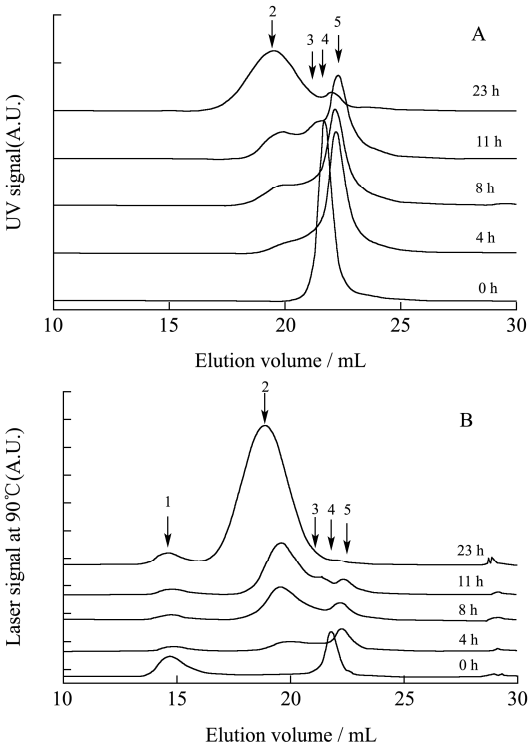

图1 MTGase 原位诱导的 *β*-LG 的 SEC-UV (A)和 MALLS 90 ℃ (B) 洗脱曲线

Fig.1. SEC-UV (A) and MALLS 90 °C (B) analyses of *β*-LG *in situ* induced by MTGase

图1显示了20 mM DTT存在时MTGase处理后的*β*-LG的典型的UV和MALLS（90 º）洗脱曲线。还原剂（如DTT）会破坏维持分子结构的二硫键，从而把埋藏在分子内部的催化位点暴露出来，以利于酶的作用[16]。在UV曲线中，未处理的*β*-LG仅在21.8 mL处显示出一个峰（峰4），表明蛋白质具有很高的纯度；在LS曲线中，14.7 mL处出现的另一峰（峰1）（接近于柱的空体积）表明蛋白质出现了大的聚集体，但数量很少。通过UV和LS信号计算出该蛋白的分子量约为32 kDa，这与未处理的*β*-LG二聚体的分子量一致。数据表明，尽管DTT能够打断*β*-LG二硫键并使蛋白变性，但是这并没有影响到*β*-LG的单体和二聚体之间的平衡。

从图 1 还看出，在 MTGase 处理过程中，*β*-LG（二聚体形式）的数量随着作用时间的延长而逐渐减少，并且在 18~20 mL 处逐渐出现了一宽峰（峰 2）。同时，

随着主峰（峰 4）逐渐减少，在 22.3 mL 处出现的新峰（峰 5）在不断增加。通过计算，峰 5 对应产物的分子量为 20 kDa，表明此时的 β-LG 主要是以单体形式存在。在 TGase 酶的进一步作用下（23 h），峰 5 变成了 18 mL 处的峰 2，该峰对应于具有较高分子量的 β-LG 聚合物。这表明，在 DTT 存在时，MTGase 诱导的 β-LG 的交联涉及了两个过程。在第一过程中，MTGase 主要导致了 β-LG 单体的释放，而在第二个过程中，MTGase 使这些单体很容易发生聚合，进而形成 β-LG 寡聚体甚至高聚物。由 MTGase 诱导的 β-LG 交联的机理之前还没有人提出过。

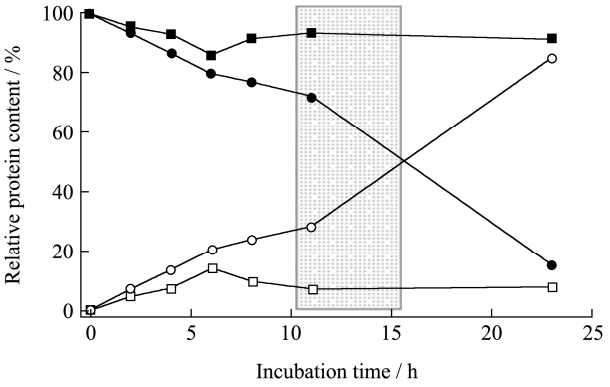

图 2 转谷氨酰胺酶作用时间对 β-LG 组分相对含量的影响

Fig.2 Influence of transglutaminase incubation time on the relative content of β-LG fractions

注：组分 I（>21 mL；○，□），组分 II（<21 mL；●，■）。圆圈表示 20 mM DTT 存在，方框表示 20 mM DTT 不存在；框内区域代表交联 β-LG 产物结构可能发生了重排。

为了确定 DTT 存在时 MTGase 诱导 β-LG 交联的动力学，我们通过 UV 记录下了 β-LG 交联产物组分（I，>21 mL；II，<21 mL）的相对蛋白质含量与处理时间的关系，结果见图 2。组分 I 包含了 β-LG 的单体和二聚体形式（未交联的和交联的），组分 II 则包含了 β-LG 交联后的寡聚体形式（聚合度 n>3）。与预期的一致，随着酶作用时间的增加，组分 I 的相对含量在增加，组分 II 的相对含量在减少，但这种变化取决于酶处理的时间。在 MTGase 作用的前 6 h，交联产物（组分 II）含量减少的速率和组分 I 含量增加的速率几乎相同。在 MTGase 处理至 12 h 时，组分 I 相对含量的增加变慢了，而在 12 h 后又变得很快。这可能是由于交联的 β-LG 产物在结构上发生了重排以及 MTGase 处理过程中 β-LG 单体的释放。

图 2 也可反映，在 DTT 存在的条件下，β-LG 在 MTGase 作用下的交联反应中两组分的变化情况。在 MTGase 酶处理的最初 6 h 中，组分 I 的相对含量也是逐渐增加的，但增加的速率稍低于 DTT 存在时的情况。而在 6 h 之后，大约有 14%的 β-LG 交联形成高分子量的寡聚体（主要是三聚体或四聚体）。然而在 MTGase 作用至 12 h 时，组分 I 的相对含量减少到 7%。在这之后，相对含量没有发生明显的变化。组分 II 的减少可归因于所形成的寡聚体中的 β-LG 单体的释放。这些数据表明，在没有 DTT 情况下，一些二聚体 β-LG 会通过疏水作用发生联合，并转变成通过共价键交联的二聚体 β-LG。这或许可以解释为什么在没有 DTT 的情况下 MTGase 处理同样会显著地影响 β-LG 的热稳定性[13]。

2.2 MTGase 处理过程中的分子量变化

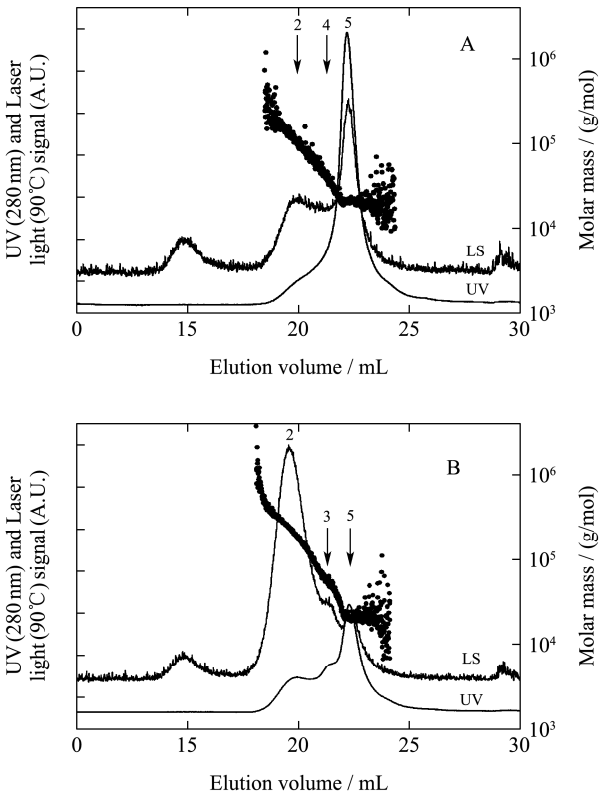

图 3 不同流出体积 SEC-MALLS (90 ℃)-UV (280 nm)信号和分子量分布图

Fig.3 SEC-MALLS (at 90 ºC)-UV (280 nm) signal and molecular weight distributions (dotted line) as a function of elution volume for β-LG incubated with MTGase

注：A 图为 MTGase 处理 4 h，B 图为 MTGase 处理 11 h

未用酶处理的β-LG的分子量约为32.0 kDa，表明即使是在20 mM DTT存在时β-LG也是以二聚体形式存在的。图3表明在20 mM DTT存在时，用MTGase分别处理4 h和11 h 的β-LG的SEC-MALLS-UV曲线和分子量分布（由MALLS和 UV数据计算得出）。由图3-A可看出，用MTGase处理β-LG 4 h时会出现分子量为60~130

kDa的肩形峰（峰2）。这表明该过程有β-LG寡聚体的形成。图3-B中的两个主要峰（峰2和峰3），其分子量分别估计约为100~350 kDa和60~90 kDa，此两峰的出现表明在用MTGase处理11 h后，有更多的寡聚体形成。

表1 不同时间 β-LG 及其寡聚体的分子量的变化（20 mM DTT 存在时）

Table 1 Changes in molecular weight (M_w) of β-LG and its formed oligomers with incubation with MTGase for various time intervals in the presence of 20 mM DTT

处理时间(h)	M_w (kDa)	
	β-LG 二聚体(峰 4 或 5)	β-LG 寡聚体(峰 2)
对照	32.0	- [a]
2	27.9	-
4	21.0	93.0
6	19.5	143.7
8	22.4	189.3
11	20.9	216.2
23	-	267.4

注：a 没有检测到（由于 LS 和 UV 信号很弱）。

表1显示，在DTT存在时，β-LG二聚体（峰4或峰5）和寡聚体（峰2）在随酶处理时间的增加而发生的分子量改变。在酶开始处理至6 h时，β-LG二聚体（峰4或峰5）的分子量由32.0 kDa逐渐减为20 kDa，随后保持不变。这证实了在交联反应中有β-LG单体从二聚体中释放出来。由表1还可看出，当酶处理时间从4 h至23 h时，寡聚体组分（峰2）的分子量也由93.0 kDa逐渐增加至267.4 kDa，这表明在还原剂存在时，经MTGase处理的β-LG发生了广泛的交联反应。而这又是与DTT诱导的蛋白质结构的展开是密切相关的。

3 结论

本文用 SEC-MALLS 对 MTGase 诱导的 β-LG 的交联反应进行了研究。研究发现，在还原剂（如 DTT）存在时，酶处理不仅会导致具有较高分子量二聚体或寡聚体的形成，还会使二聚体向单体转变。这种转变在 DTT 不存在时也同样会产生。这些结果都表明，酶处理可以用来改变 β-LG 或其他球蛋白的性质，特别是与构象改变相关的性质。

参考文献

[1] ZHU Y, RINZEMA A, TRAMPLER J, BOL J. Microbial transglutaminase - a review of its production and application in food processing[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995,44: 277-282.

[2] YOKOYAMA N N, KIKUCHI Y. Properties and applications of microbial transglutaminase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64: 447-454.

[3] JAROS D, PARTSCHEFELD C, HENLE T, ROHM H. Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications[J]. Journal of Texture Studies, 2006,37: 113-155.

[4] 杨慧林,包莹玲,潘力.片段化全基因组体外诱变选育转谷氨酰胺酶高产菌株的研究[J].现代食品科技,2009,25(1): 34-37

[5] DE WIT K.J. Nutritional and functional characteristics of whey protein in food products[J]. Journal of Dairy Science, 1998, 81: 579-608.

[6] TANIMOTO S Y, KINESSELLA J E. Enzymatic modification of proteins: Effect of transglutaminase cross-linking on some physical properties of β-lactoglobulin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988, 36: 281-285.

[7] ABOUMAHMOUD R M, SAVELLO P A. Cross-linking of whey protein by transglutaminase[J]. Journal of Dairy Science, 1990, 73: 256-263.

[8] ESSIA A S, BISRAM S, KHAN S A. Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 53: 5010-5017.

[9] RODRIGUEZ-NOGALES J.M. Effect of preheat treatment on the transglutaminase-catalyzed cross-linking of goat milk proteins[J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 430-437.

[10] SCHOKKER E P, SINGH H, PINDER D N, et al. Characterization of intermediates formed during heat-induced aggregation of β-lactoglobulin AB at neutral pH[J]. International Dairy Journal, 1999, 9: 791-800.

[11] UNTERHASLBERGER G., SCHMITT C, SANCHEZ C, et al. Heat denaturation and aggregation of β-lactoglobulin enriched WPI in the presence of arginine HCl, NaCl and guanidinium HCl at pH 4.0 and 7.0[J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20: 1006-1019.

[12] ESSIA A S, PUHL C, KADLA J.F, KHAN S A. Enzymatic cross-linking of β-lactoglobulin: conformational properties using FTIR spectroscopy[J]. Biomacromolecules, 2006, 7: 1707-1713.

[13] TANG C H, MA CY. Modulation of the thermal stability of β-lactoglobulin by transglutaminase treatment[J]. European Food Research and Technology, 2007, 225: 649-652.

（转第 62 页）