

鲢内源性转谷氨酰胺酶的纯化及其性质

李金玲^{1,2} 叶蕾蕾¹ 尤娟^{1,2} 熊善柏^{1,2} 胡杨^{1,2} 安玥琦^{1,2}

1. 华中农业大学食品科学技术学院, 武汉 430070;

2. 国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心(武汉), 武汉 430070

摘要 以鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)肌肉为原料,采用硫酸铵盐析、凝胶过滤层析(Sephacryl S-300 HR)和阴离子交换层析(DEAE-Sephacryl FF)对鲢内源性转谷氨酰胺酶(TGase)分离纯化,并对其酶学性质进行研究。结果表明,酶液经多步纯化后可得单一酶蛋白,其分子质量为 100 ku,比活力为 126.7 U/mg,纯度提高 34.2 倍,该酶适宜的反应 pH 和温度分别为 8.0 和 50 °C。鲢内源性 TGase 具有 Ca²⁺ 依赖性,最适 Ca²⁺ 浓度为 3 mmol/L。DTT 在低浓度(0~5 mmol/L)范围能增加酶的活性,而高浓度的 DTT、EDTA 及 Mg²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Ba²⁺、Sn²⁺、Fe³⁺ 等金属离子则表现出抑制作用。鲢内源性 TGase 对鲢和草鱼肌球蛋白有较强的催化交联作用,能够诱导鲢、草鱼肌球蛋白交联形成多聚体,且对鲢肌球蛋白的催化交联作用更强。

关键词 鲢; 内源性转谷氨酰胺酶; 分离纯化; 酶学性质; 交联

中图分类号 Q 814 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)06-0105-08

转谷氨酰胺酶(transglutaminase, TGase)是一种催化蛋白质分子中的赖氨酸 ε-氨基与谷氨酸 γ-羟酰胺基发生酰基转移反应的酶。在鱼糜凝胶化的过程中鱼肉组织中的内源性 TGase 能催化肌原纤维蛋白分子间发生非二硫共价交联,形成三维网状的凝胶结构,提高鱼糜凝胶的硬度、弹性和持水性^[1-3]。已从动物、植物、微生物中分离纯化出 TGase,且不同来源的 TGase 在结构、理化性质、催化机制与催化能力上表现出较大差异^[4-6]。

TGase 的催化作用除受自身性质的影响外还受多种外部因素的影响。温度和 pH 对 TGase 活性的影响较大,其 pH 稳定性和热稳定性较差。TGase 具有 Ca²⁺ 依赖性且不同来源 TGase 的 Ca²⁺ 激活效应有差异。EDTA、EGTA、NH₄Cl 是 TGase 常见的抑制剂,它们通过对 Ca²⁺ 的螯合或增加体系中 NH₄⁺ 的浓度阻断转氨基反应的进行来抑制 TGase 的活性^[7]。孙静静等^[8]发现草鱼内源性 TGase 粗酶液在不同条件下活性差异较大, TGase 激活剂和抑制剂通过对 TGase 的激活或抑制作用进而对鱼糜凝胶强度产生影响。

研究人员从多种海洋生物包括淡水鱼类中分离

纯化出 TGase 并对其性质进行了研究^[9-14],而关于鲢内源性 TGase 的研究鲜见报道。笔者所在实验室前期研究表明,鲢内源性 TGase 活性是 7 种大宗淡水鱼肌肉中活性最高的。本研究以中国产量大、精深加工少的鲢为研究对象,研究鲢内源性 TGase 的分离纯化方法、酶学性质以及鲢内源性 TGase 对鲢、草鱼肌球蛋白催化交联特性的差异,旨在为淡水鱼糜的品质改良及内源性 TGase 在鱼糜加工中的应用提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

新鲜鲢、草鱼购于华中农业大学农贸市场,将其放入水箱中保活运至实验室后宰杀,随后去头、皮及内脏,取鱼肉备用。N,N-二甲基酪蛋白、单丹磺酰尸胺,分析纯, Sigma 公司;三羧甲基氨基甲烷,分析纯, Amresco 公司;硫酸铵、氯化钙、DTT、EDTA、SDS 等试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器

1750 型紫外可见光分光光度计,日本岛津公

收稿日期: 2017-08-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671884); 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-45-27)

李金玲, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工及贮藏. E-mail: 373794329@qq.com

通信作者: 熊善柏, 教授, 研究方向: 水产品加工及贮藏工程. E-mail: xionsgb@mail.hzau.edu.cn

司;Bio-Rad 电泳仪,美国伯乐公司;F-4600 型荧光光度计,日本日立公司;XK 16/20 空柱,美国 GE 公司;蛋白质凝胶成像色谱,美国伯乐公司;纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(ZEN3600),英国马尔文仪器有限公司。

1.3 试验方法

1) 蛋白质含量的测定。采用 Lowry 法,以牛血清白蛋白为标准蛋白^[15]。

2) TGase 酶活的测定。参照 Takagi 等^[16]和 Worratao 等^[17]的方法。

3) 肌球蛋白的提取。参照 Liu 等^[18]的方法。

4) TGase 的提取、分离与纯化。TGase 粗酶液提取:鱼肉中加 3 倍体积缓冲溶液(60 mmol/L Tris、40 mmol/L NaCl、5 mmol/L EDTA、2 mmol/L DTT、pH 7.5)后均质,离心得 TGase 粗酶液。

硫酸铵盐析:取 8 份 100 mL 粗酶液,加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至不同饱和度,将所得蛋白质沉淀用缓冲溶液复溶后测定各饱和度下蛋白质含量和酶活。

Sephacryl S-300 HR 凝胶过滤:将复溶后的酶液用 0.45 μm 滤膜过滤 2 次,取 4 mL 浓缩酶液进行凝胶过滤层析。平衡色谱柱后进样,用 Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl、0.15 mol/L NaCl、5 mmol/L EDTA、2 mmol/L DTT、pH 7.5)洗脱,流速 1.3 mL/min,每管收集 3 mL,测定 TGase 活性。

DEAE-Sepharose FF 离子交换层析:用 10 ku 超滤管对经 Sephacryl S-300 HR 纯化后的酶液浓缩,取浓缩酶液上 DEAE-Sepharose FF 柱。平衡色谱柱后进样,用 0~0.6 mol/L NaCl(20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5)进行线性梯度洗脱,流速 1 mL/min。每管收集 2 mL,测定 TGase 活性。

5) TGase 纯度鉴定。将收集的酶活组分用 SDS-PAGE 电泳进行纯度鉴定及分子质量测定。电泳条件:蛋白质溶液质量浓度 1 mg/mL,上样蛋白质约 10 μg ,分离胶质量分数 5%,浓缩胶质量分数 12%,电压 80 V,0.125%考马斯亮蓝 R-250 染色,甲醇(10%)、醋酸(10%)洗脱液。

6) TGase 基本酶学性质。将反应溶液分别置于 25、37、45、50、55、65、70 $^{\circ}\text{C}$ 下测定最适反应温度时酶活。测定最适反应 pH 时,配置不同的 pH 缓冲液,配制 pH 4.0~6.5 的缓冲液用 0.1 mol/L 的 Tris-acetate 缓冲液;配制 pH 7.0~7.5 的缓冲液用

0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液;配制 pH 8.0~9.0 的缓冲液用 0.5 mol/L 的 Tris-borate 缓冲液。 Ca^{2+} 的浓度调节为 3 mmol/L 时,测定 DTT、EDTA 及 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Fe^{3+} 等金属离子对酶活的影响。

7) 浊度、粒径的测定。添加不同比酶活(0、2、4、6、8 U/mg) TGase 于肌球蛋白溶液(0.5 mg/mL)中。以相应比酶活的 TGase 缓冲溶液作参比于 320 nm 下测吸光值。采用 ZEN3600 马尔文激光粒度仪测定其粒径分布,水溶剂粘度 0.887 3 mPa·S,介质折射率 1.33,物质折射率是 1.45(散射角度 173°)。

8) 紫外光谱扫描。添加不同比酶活(0、2、4、6、8 U/mg) TGase 于肌球蛋白溶液(0.2 mg/mL)中。采用 UV-1750 型紫外可见分光光度计在 230~350 nm 范围内进行扫描。

9) 游离氨基测定。参考 Habeeb^[19]的方法并略做修改。取 2 g 肌球蛋白溶于 18 mL 硼酸缓冲溶液,75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min 后 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h,4 000 r/min 离心 5 min,取 0.125 mL 上清液,加 1 mL 磷酸缓冲液、1 mL 0.1% TNBS,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min(铝箔避光),加 2 mL 0.1 mol/L HCl 终止反应,冷却后于 340 nm 波长下比色。

1.4 数据处理

试验重复 3 次,每次试验做 3 个平行。运用 Origin 8.0 软件和 Excel 作图。采用 SAS 8.0 软件对试验数据进行相关性分析和方差分析。

2 结果与分析

2.1 TGase 纯化及鉴定

1) 硫酸铵最佳质量分数。从图 1 可知,随着硫酸铵质量分数的增加,TGase 和蛋白质收率都增加。硫酸铵质量分数为 30% 时,TGase 和蛋白质收率都较低,当硫酸铵质量分数增加至 40% 时,TGase 收率增加幅度(36.2%) 远远高于蛋白质增加幅度(10.2%)。当硫酸铵质量分数继续增加,TGase 收率变化不大,而蛋白质收率显著增加,这表明 TGase 主要是在硫酸铵质量分数为 40% 时沉淀下来。在硫酸铵质量分数为 40% 时,TGase 比酶活为 15.5 U/mg,显著高于硫酸铵在其他质量分数下盐析蛋白中 TGase 活性,这说明在硫酸铵质量分数为 40% 时,蛋白中 TGase 纯度最高。

2) TGase 分离纯化结果。图 2A 显示酶液经

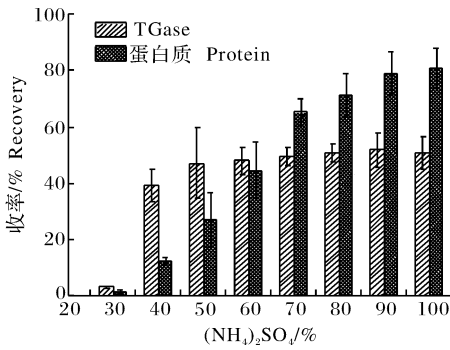


图 1 硫酸铵盐析

Fig.1 Ammonium sulphate precipitate

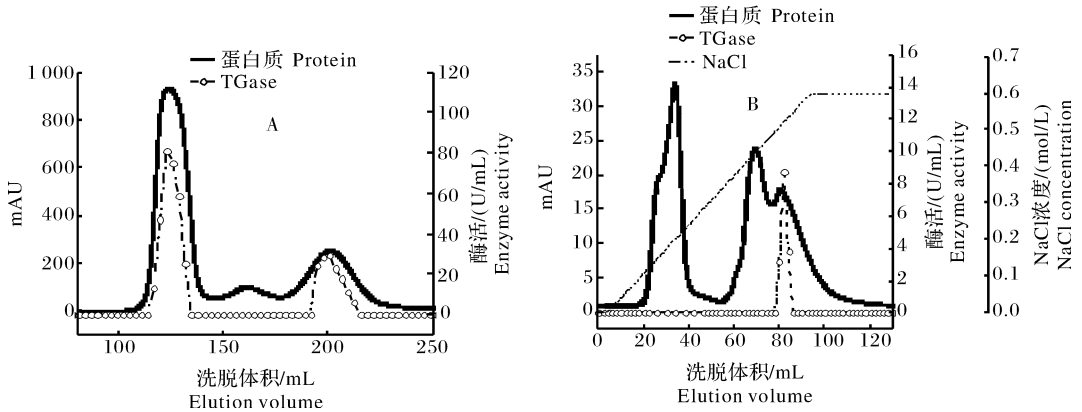


图 2 凝胶过滤及阴离子交换层析

Fig.2 Gelfiltration chromatography and exchange chromatography

DEAE-Sepharose FF 层析分离结果如图 2B 所示, 经 0~0.6 mol/L NaCl 线性梯度洗脱后出现了 3 个洗脱峰, 第 3 个峰有明显的内源性 TGase 活性。经此纯化步骤后比酶活提高至 126.7 U/mg, 较粗酶液纯度提高 34.2 倍。

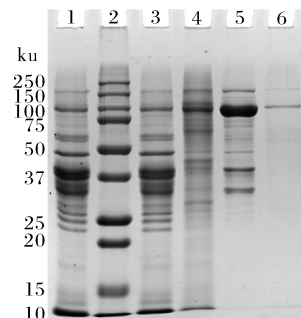
3) TGase 纯度鉴定。对各步所得酶液进行 SDS-PAGE 电泳(图 3), 硫酸铵盐析后样品中含有大量杂蛋白。Sephacryl S-300 HR 凝胶过滤后杂蛋白明显减少。DEAE-Sepharose FF 层析后在 100 ku 处出现纯度较高的单一条带, 即 TGase 条带。

2.2 TGase 基本酶学性质

1) 不同温度及 pH 条件下 TGase 活性及稳定性。由图 4A 可知, TGase 活性随着反应温度的升高显著升高, TGase 在 50 °C 时活性最高, 随着温度的继续升高, 酶活急剧下降。鳊、草鱼 TGase 最适酶活温度约为 45 °C, 罗非鱼、牡蛎为 37 ~ 50 °C^[16, 22-23], 不同种类鱼的 TGase 最适反应温度不同, 但其差异较小。TGase 的热稳定性如图 4B 所

Sephacryl S-300 HR 凝胶过滤后出现 3 个洗脱峰, 第 1 个峰和第 3 个峰有明显的内源性 TGase 活性, 经 SDS-PAGE 电泳分析发现, 第 1 个峰中杂蛋白较多, 大分子蛋白含量较高, 这可能是 TGase 的多聚体或硫酸铵沉淀过程中 TGase 与其他蛋白质聚集形成的大分子蛋白^[20-21], 其结果有待进一步的研究。第 3 个峰中分子质量 100 ku 处蛋白质大量浓缩, 文献报道内源性 TGase 分子质量约为 60~100 ku, 为小分子蛋白, 故单体内源性 TGase 存在于第 3 个峰^[4, 9, 12, 17, 22]。在该纯化步骤中 TGase 酶液较粗酶液纯度提高 19.2 倍, 比酶活增加为 71.1 U/mg。

示, 在最适酶活温度 50 °C 时, TGase 稳定性较差, 保温 10 min 即完全失活, 25、37 °C 下保温 2 h, 内源性 TGase 分别失活 60%、16%, 而在 4 °C 时酶活没有显著变化, 故在纯化及贮藏过程中要保持低温环境以保证内源性 TGase 活性。



1, 3: 粗酶液 Crude enzyme; 2: 标准蛋白 Marker; 4: 40% 硫酸铵沉淀 40% (NH₄)₂SO₄; 5: Sephacryl S-300 HR; 6: DEAE-Sepharose FF.

图 3 TGase 纯化电泳结果

Fig.3 SDS-PAGE of TGase from silver carp during purification

pH 也是酶活最为敏感的影响因子之一,环境酸性过强或碱性过强均会使酶活降低。从图 4C 可以看出,pH 5.5~6.5 时,内源性 TGase 活性较低,之后随 pH 值增加,TGase 活性急剧升高,pH 为 8.0 时 TGase 活性最大,继续升高 pH 值,TGase 活性有所降低。水产品中内源性 TGase 适宜的 pH 一

般为 7.5~9.0,如鲤、鱿鱼、罗非鱼、金线鱼^[16,24-26]。最适 pH 与测定方法有关,单磺尸胺与酪蛋白在 pH 7.5~8.0 范围内结合能力最强,该性质可能会影响内源性 TGase 最适 pH 的测定^[27]。TGase 在 pH 中性时稳定性较好,保温 2 h 酶活无明显变化,偏离中性 pH 后稳定性变差。

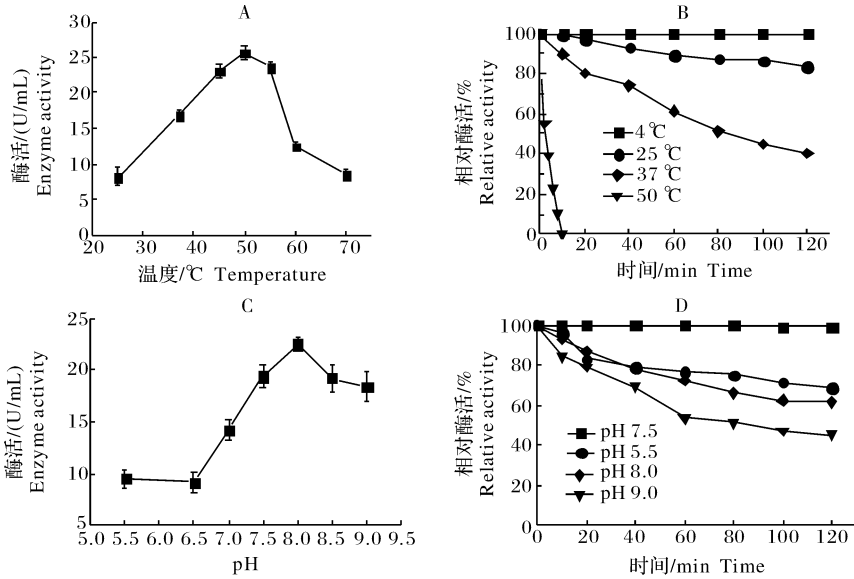


图 4 不同温度及 pH 条件下 TGase 活性及稳定性

Fig.4 Effects of temperature and pH on TGase activity and its stability

2) 外源添加物对 TGase 活性的影响。外源添加物对 TGase 活性有显著影响。由图 5A 可知,不添加 Ca^{2+} 时, TGase 无活性,说明 TGase 具有 Ca^{2+} 依赖性,且当 Ca^{2+} 浓度为 3 mmol/L 时酶活最高。这主要是由于 Ca^{2+} 能够结合到 TGase 上,改变内源性 TGase 的构象,使其暴露出半胱氨酸活性位点,与酰基酶、酰基供体形成酰基酶中间体,促进交联反应的进行^[28]。完全激活 TGase 所需的 Ca^{2+} 浓度与鱼种类有关。未经纯化的鲤和罗非鱼 TGase 最适 Ca^{2+} 浓度分别为 5 和 1.25 mmol/L,但其纯酶液最适 Ca^{2+} 浓度分别为 50 和 20 mmol/L^[17,29]。当 Ca^{2+} 浓度超过 20 mmol/L 时,内源性 TGase 活性急剧降低,表现出较强的抑制作用,草鱼、鳊中也出现了类似现象^[2,8],但是在海水鱼(如鱿鱼)中并没有发现类似的抑制作用。

由图 5B 可知,EDTA 对 TGase 具有强烈的抑制作用,随着 EDTA 浓度的增加, TGase 活性急剧降低,当 EDTA 浓度增加至 15 mmol/L 时,内源性 TGase 完全失活。这主要是由于 EDTA 能够螯合反应体系中的 Ca^{2+} ,并使内源性 TGase 的活性部位

烷基化,使其失活^[22,28]。

DTT 对 TGase 的作用如图 5C 所示。DTT 浓度在 0~5 mmol/L 时,对内源性 TGase 有微弱的激活作用。在对罗非鱼内源性 TGase 性质的研究中也发现类似的增强作用^[16],这可能是 DTT 作为一种强还原剂,能够保护酶活性中的巯基,防止其被氧化形成二硫键,还原状态的巯基能够促进酶与谷氨酰胺残基的 γ -羧基酰胺基结合并释放出氨^[30]。这一试验结果表明活性位置的巯基对 TGase 活性具有重要的作用。

3) 不同金属离子对 TGase 活性的影响。由表 1 可知,二价金属离子对 TGase 活性有较大的影响。10 mmol/L Mg^{2+} 能使鲢内源性 TGase 失活 22%,而相同浓度的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Fe^{3+} 则使内源性 TGase 完全失活,这可能是由于二价金属离子对巯基有较强的亲和作用,能够与 TGase 活性中心的巯基结合,从而抑制 TGase 的活性。

2.3 TGase 催化特性

1) TGase 对肌球蛋白浊度、粒径及游离氨基的影响。浊度一定程度上可以表征肌球蛋白尾部聚集

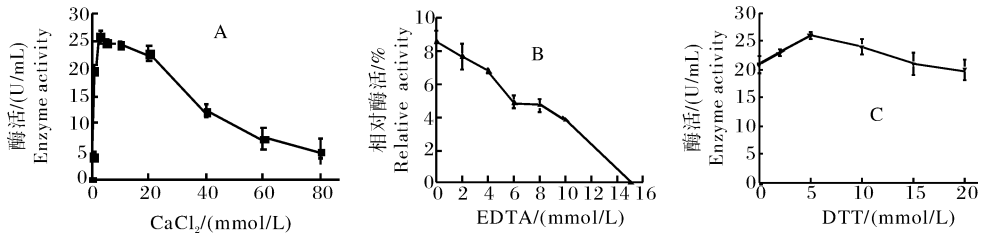


图 5 CaCl₂、EDTA、DTT 对 TGase 活性的影响

Fig.5 Effects of CaCl₂, EDTA, DTT on TGase activity

表 1 不同金属离子对 TGase 活性的影响

Table 1 Effects of metal ions on TGase activity

金属离子 Metal ions	添加量/(mmol/L) Concentration	相对酶活/% Relative activity
酶液 Enzyme	0	100
Mg ²⁺	10	78
Cu ²⁺	10	0
Zn ²⁺	10	0
Ba ²⁺	10	0
Sn ²⁺	10	0
Fe ³⁺	10	0

的程度,一般浊度值增加表明蛋白质聚集体的不断形成,但当蛋白质颗粒较大时可能会发生散射^[31]。从图 6A 可知,鲢、草鱼肌球蛋白浊度随着 TGase 添加量的增加而增加,但两者之间无显著区别 ($P > 0.05$),这表明 TGase 能够诱导鲢、草鱼肌球蛋白的尾部发生聚集且其聚集程度随酶量的增加而增大。由图 6B 可知,随着 TGase 添加量增加,肌球蛋白粒径逐渐增大,鲢肌球蛋白粒径由 694.2 nm 增大至 1 893.3 nm,草鱼肌球蛋白粒径由 672.5 nm 增大到 1 504.3 nm,这表明肌球蛋白之间发生了交联,这与浊度试验结果一致^[32]。0~4 U/mg TGase 诱导鲢、草鱼肌球蛋白交联差异性不大 ($P > 0.05$),当 TGase 添加量增加至 6~8 U/mg 时,鲢肌球蛋白粒径显著大于草鱼肌球蛋白的粒径 ($P < 0.05$),这说明鲢内源性 TGase 诱导鲢鱼肌球蛋白交联作用强于草鱼肌球蛋白。

TGase 诱导的交联反应主要是催化蛋白侧链上的谷氨酸的 γ -羧基酰胺基和赖氨酸的 ϵ -氨基发生反应,形成 ϵ -(γ -Glu)-Lys 异肽键,反应体系中多聚体蛋白中自由氨基的含量会下降,可以通过测定反应前后氨基含量的变化反映交联反应进行的程度,表征蛋白质的交联度^[33]。从图 6C 可以看出,添加 TGase 后肌球蛋白凝胶中游离氨基的含量显著低于未添加 TGase 的肌球蛋白凝胶,表明 TGase 催化鲢和草鱼肌球蛋白交联形成了 ϵ -(γ -Glu)-Lys 异肽

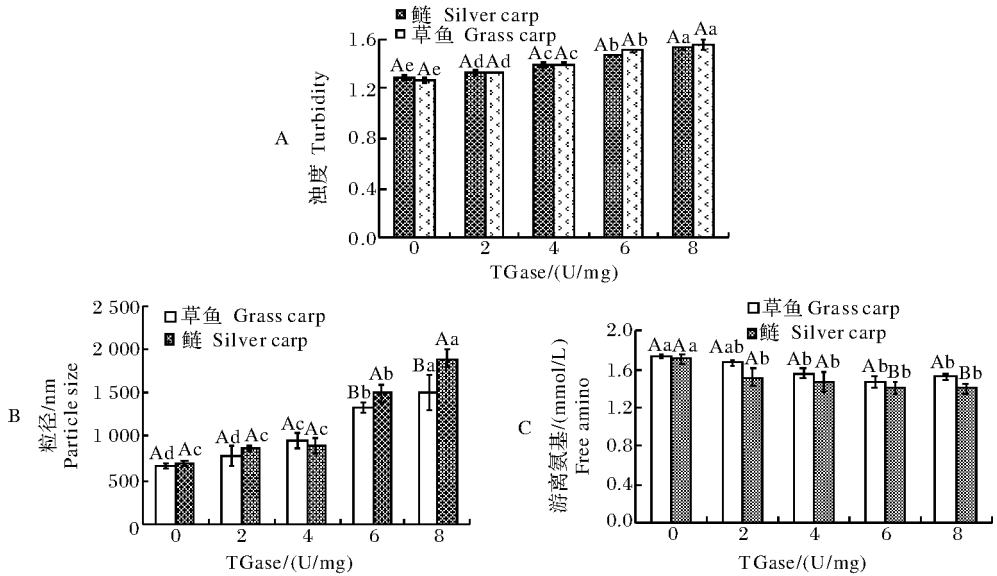
键,使反应体系中游离氨基含量减少。且游离氨基含量随 TGase 添加量的增加而降低,TGase 催化肌球蛋白交联度逐渐增加,进一步证明鱼糜凝胶化过程内源性 TGase 能够促进蛋白凝胶网络结构的形成,增强鱼糜凝胶的品质。且当 TGase 添加量为 6~8 U/mg 时,鲢游离氨基低于草鱼 ($P < 0.05$),表明鲢肌球蛋白交联度高于草鱼肌球蛋白。

2) TGase 对肌球蛋白的紫外吸收光谱影响。TGase 对鲢、草鱼肌球蛋白的紫外吸收光谱如图 7 所示。随着 TGase 添加量增加,鲢、草鱼肌球蛋白紫外吸收光谱吸收值明显增大,而 Tang 等^[34]却报道 MTG 会使干酪素钠紫外吸收强度降低。肌球蛋白是一种与干酪素钠溶解性不同的盐溶性蛋白。在盐溶液中 Ca^{2+} 会促进肌球蛋白中 α -螺旋结构解旋,使肌球蛋白进一步伸展开来,暴露出更多的活性位点和非极性芳香残基,有利于 TGase 的催化交联^[35]。而 TGase 的催化交联可能会进一步促进 α -螺旋的解旋,使肌球蛋白更大程度的伸展,从而使其紫外吸收强度增大。

3) TGase 对肌球蛋白交联度的影响。图 8 电泳结果显示随着内源性 TGase 添加量增加,鲢、草鱼肌球蛋白重链含量逐渐减少,进样口处蛋白质含量逐渐增加,表明 TGase 诱导鲢和草鱼肌球蛋白交联形成了 ϵ -(γ -Glu)-Lys 异肽键,这与游离氨基结果一致。且当 TGase 添加量增加时,37~50 ku 处出现 1 条新的蛋白条带,这可能是由于肌球蛋白轻链发生了交联。

3 讨论

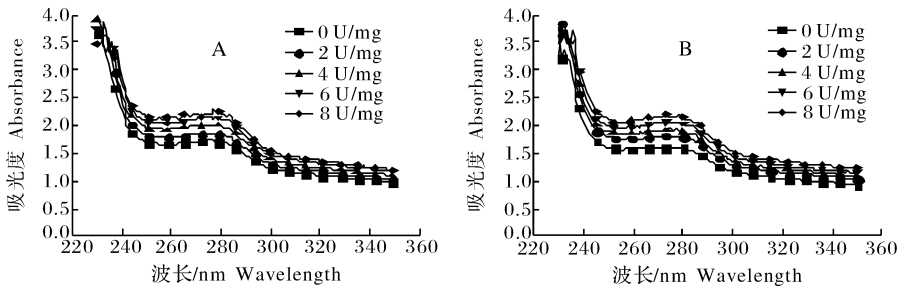
鲢内源性 TGase 粗酶液经 40% 硫酸铵沉淀、Sephacryl S-300 HR 凝胶过滤和 DEAE-Sephrose FF 阴离子交换层析后得鲢内源性 TGase 纯化酶,其纯度提高 34.2 倍,比活力提高至 126.7 U/mg, SDS-PAGE 电泳法测得其分子质量为 100 ku。



不同大写字母表示相同 TGase 比酶活下鲢和草鱼肌球蛋白浊度差异显著 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示鲢、草鱼肌球蛋白浊度在不同 TGase 比酶活下差异显著 ($P < 0.05$)。Different capital letters indicate significant differences between silver carp and grass carp myosin turbidity in the same TGase concentration ($P < 0.05$). Different lowercase letters indicate significant differences in myosin turbidity of silver carp and grass carp myosin in different TGase concentration ($P < 0.05$).

图 6 TGase 对肌球蛋白浊度、粒径及游离氨基的影响

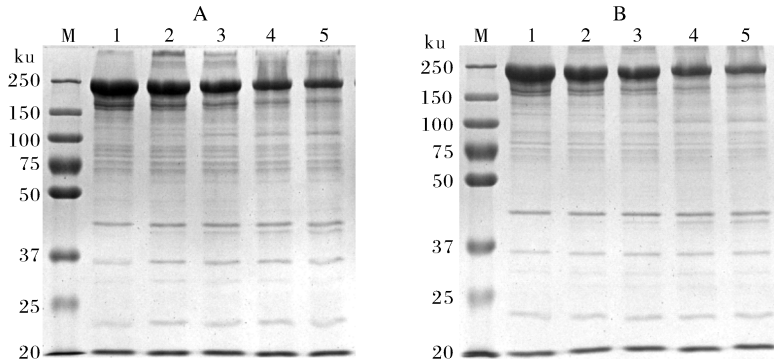
Fig.6 Effects of endogenous TGase on turbidity, particle size and free amino of myosin solutions



A: 鲢 Silver carp; B: 草鱼 Grass carp.

图 7 TGase 对肌球蛋白紫外吸收光谱的影响

Fig.7 Effects of endogenous TGase on UV absorption spectra of myosin solutions



A: 鲢 Silver carp; B: 草鱼 Grass carp; M: 标准蛋白 Marker; 1~5: 表示 TGase 的添加量分别为 0, 2, 4, 6, 8 U/mg。1-5 shows the volume of TGase addition is 0, 2, 4, 6, 8 U/mg, respectively.

图 8 TGase 对肌球蛋白交联度的影响

Fig.8 Effects of endogenous TGase on cross-linkage from myosin

纯化后的鲢内源性 TGase 最适反应温度和 pH 分别为 50 °C 和 8.0; EDTA 及 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Fe^{3+} 对内源性 TGase 有强烈的抑制作用, 15 mmol/L EDTA 能使其完全失活; 1 ~ 5 mmol/L DTT 对酶有微弱的激活作用; TGase 对 Ca^{2+} 具有依赖性, 最佳 Ca^{2+} 浓度为 3 mmol/L。一般随着 Ca^{2+} 浓度增加, TGase 会被完全激活, 进一步增加浓度, 酶活无显著变化。本研究发现, 3 mmol/L 的 $CaCl_2$ 能够完全激活 TGase 的活性, 进一步提高 Ca^{2+} 浓度时表现出强烈的抑制作用, 孙静静等^[8]、娄忠纬^[22] 也发现高浓度 Ca^{2+} 会抑制草鱼和鳙内源性 TGase 活性。

鲢内源性 TGase 对鲢和草鱼肌球蛋白有较强的催化交联作用, 能够诱导鲢、草鱼肌球蛋白交联形成多聚体, 且对鲢肌球蛋白的催化交联作用更强。Binsi 等^[28] 发现大眼鲷、罗非鱼、鲑鱼和鲤鱼肌肉内源性 TGase 都能提高比目鱼鱼糜凝胶的弹性模量, 且相同酶活条件下, 罗非鱼、鲑鱼和鲤内源性 TGase 的交联能力强于大眼鲷。这表明 TGase 对不同来源的肌球蛋白均有交联作用, 但其交联能力存在差异。内源性 TGase 对同来源的肌球蛋白的交联能力是否强于其他不同来源的肌球蛋白以及内源性 TGase 对肌球蛋白的交联机制和作用位点都尚不清楚, 有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] YAMASHITA M, KONAGAVA S. Purification and characterization of cathepsin L from the white muscle of salmon, *Oncorhynchus keta* [J]. Comparative biochemistry and physiology, 1990, 96: 247-252.

[2] 娄忠纬, 徐坤华, 王潇, 等. 鳙内源性转谷氨酰胺酶特性的研究 [J]. 南方水产科学, 2014, 10(6): 72-77.

[3] 安玥琦, 熊善柏. 肌原纤维蛋白转谷氨酰胺酶交联程度对鱼糜凝胶及其风味释放影响的研究进展 [J]. 食品科学, 2015, 36(7): 235-239.

[4] HEMUNG B, YONGSAWATDIGUL J. Partial purification and characterization of transglutaminase from threadfin bream (*Nemipterus* sp.) liver [J]. Journal of food biochemistry, 2008, 32(2): 182-200.

[5] 郭永, 李党生. 超级黏合剂-微生物谷氨酰胺转氨酶的研究进展 [J]. 中国酿造, 2010, 29(9): 18-21.

[6] NAKAHARA C, NOZAWA H, SEKI N. A comparison of cross-linking of fish myofibrillar proteins by endogenous and microbial transglutaminases [J]. Fisheries science, 1999, 65(1): 138-144.

[7] NOZAWA H, MORI T, SEKI N. Different effects of NaCl on activities of transglutaminases from marine and freshwater

shellfish muscles [J]. Fisheries science, 2001, 67(2): 383-385.

[8] 孙静静, 罗自生, 吴翔, 等. 草鱼中内源性转谷氨酰胺酶特性的研究 [J]. 中国食品学报, 2012, 12(9): 67-72.

[9] KUMAZAWA Y, NAKANISHI K, YASUEDA H, et al. Purification and characterization of transglutaminase from walleye pollack liver [J]. Fisheries science, 1996, 62(6): 959-964.

[10] NOZAWA H, SEKI N. Purification of transglutaminase from scallop striated adductor muscle and NaCl-induced inactivation [J]. Fisheries science, 2001, 67(3): 493-499.

[11] WORRATAO A, YONGSAWATDIGUL J. Cross-linking of actomyosin by crude tilapia (*Oreochromis niloticus*) transglutaminase [J]. Journal of food biochemistry, 2003, 27(1): 35-51.

[12] KUMAZAWA Y, SANO K, SEGURO K, et al. Purification and characterization of transglutaminase from Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1997, 45(3): 604-610.

[13] NOZAWA H, MAMEGOSHI S I, SEKI N. Effect of neutral salts on activity and stability of transglutaminase from scallop adductor muscle [J]. Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology, 1999, 124(2): 181-186.

[14] YASUEDA H, KUMAZAWA Y, MOTOKI M. Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*) [J]. Bioscience biotechnology and biochemistry, 1994, 58(11): 2041-2045.

[15] 徐秀兰. 生物化学实验与指导 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 27-30.

[16] TAKAGI J, SAITO Y, KIKUCHI T, et al. Modification of transglutaminase assay: use of ammonium sulfate to stop the reaction [J]. Analytical biochemistry, 1986, 153: 295-298.

[17] WORRATAO A, YONGSAWATDIGUL J. Purification and characterization of transglutaminase from Tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Food chemistry, 2005, 93(4): 651-658.

[18] LIU R, ZHAO S M, LIU Y M, et al. Effect of pH on the gel properties and secondary structure of fish myosin [J]. Food chemistry, 2010, 121: 196-202.

[19] HABEED A F. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. Analytical biochemistry, 1966, 14(3): 328-336.

[20] WILHELM B, MEINHARDT A, SEITZ J. Transglutaminase: purification and activity assays [J]. Journal chromatography B: biomedical applications, 1996, 684(1/2): 163-177.

[21] NAKAHARA C, NOZAWA H, SEKI N. A comparison of cross-linking of fish myofibrillar proteins by endogenous and microbial transglutaminases [J]. Fisheries science, 1999, 65(1): 138-144.

[22] 娄忠纬. 鳙鱼中转谷氨酰胺酶性质的研究及其对鱼糜凝胶化的影响 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2015.

[23] KUMAZAWA Y, SANO K, SEGURO K, et al. Purification and characterization of transglutaminase from Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Journal of agricultural and food chem-

- istry, 1997, 45(3): 604-610.
- [24] PIYADHAMMAVIBOON P, YONGSAWATDGUL J. Protein cross-linking ability of sarcoplasmic proteins extracted from threadfin bream [J]. LWT- food science technology, 2009, 42(1): 37-43.
- [25] HWMUNG B, YONGSAWATDGUL J. Partial purification and characterization of transglutaminase from threadfin bream (*Nemipterus* sp.) liver [J]. Journal of food biochemistry, 2008, 32(2): 182-200.
- [26] NOZAWA H, MAMEGOSHI S, SEKI N. Partial purification and characterization of six transglutaminases from ordinary muscles of various fishes and marine invertebrates [J]. Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology, 1997, 118(2): 313-317.
- [27] NOZAWA H, CHO S Y, SEKI N. Purification and characterization of transglutaminase from squid gill [J]. Fisheries science, 2001, 408(3): 311-314.
- [28] BINSI P K, SHAMASUNDAR B A. Purification and characterization of transglutaminase from four fish species: effect of added transglutaminase on the viscoelastic behaviour of fish mince [J]. Food chemistry, 2012, 132(4): 1922-1929.
- [29] KISHI H, NOZAWA H, SEKI N. Reactivity of muscle transglutaminase on carp myofibrils and myosin B [J]. Nippon suisan gakkaiishi, 1991, 57(6): 1203-1210.
- [30] BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, CHANTASUWAN C. Effect of high-temperature setting on gelling characteristic of surimi from some tropical fish [J]. International journal of food science and technology, 2004, 39(6): 671-680.
- [31] GILL T A, CHAN J K, PHONCHAREON K F, et al. Effect of salt concentration and temperature on heat-induced aggregation and gelation of fish myosin [J]. Food research international, 1992, 25(5): 333-341.
- [32] ARFAT Y A, BENJAKUL S. Impact of zinc salts on heat-induced aggregation of natural actomyosin from yellow stripe trevally [J]. Food chemistry, 2012, 135(4): 2721-2727.
- [33] 郭秀瑾, 胡杨, 尤娟, 等. 转谷氨酰胺酶诱导下鲢鱼糜凝胶的结构演化规律 [J]. 食品科学, 2016, 37(5): 6-11.
- [34] TANG C H, YANG X Q, CHEN Z, et al. Physicochemical and structure characteristics of sodium caseinate biopolymers induced by microbial transglutaminase [J]. Journal of food biochemistry, 2005, 29(4): 402-421.
- [35] JIA D, YOU J, HU Y, et al. Effect of CaCl₂ on denaturation and aggregation of silver carp myosin during setting [J]. Food chemistry, 2015, 185: 212-218.

Purification and some enzymatic properties of transglutaminase from silver carp

LI Jinling^{1,2} YE Leilei¹ YOU Juan^{1,2} XIONG Shanbai^{1,2} HU Yang^{1,2} AN Yueqi^{1,2}

1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. National R&D Branch Center for Conventional Freshwater Fish Processing (Wuhan), Wuhan 430070, China

Abstract Transglutaminase (TGase) from silver carp was purified with ammonium sulfate precipitation, gel filtration on Sephacryl S-300 high resolution and DEAE-Sephacryl fast flow ion-exchange chromatography. Some kinetic properties of transglutaminase purified were studied. The results showed that the molecular mass of the purified enzyme was 100 ku. The enzyme exhibited final purification fold of 34.2, specific activity of 126.7 U/mg. Results of further assaying enzymatic characterization showed that the purified enzyme had maximal activity at 30 °C and pH 7.5. The activity of transglutaminase was slightly activated by Ca²⁺ and dithiothreitol (DTT) and strongly inhibited by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The metal ions Mg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺, Sn²⁺, Fe³⁺ strongly inhibited transglutaminase activity as well. The transglutaminase can catalyze covalent cross-linking of myosin heavy chain (MHC) from silver carp and grass carp. The effects of the transglutaminase on myosin from silver carp were more noticeable than that from grass carp.

Keywords silver carp; endogenous transglutaminase; separation and purification; enzymatic characterization; cross-linking