

转谷氨酰胺酶途径的酶法糖基化修饰在蛋白质/多肽改性中的研究进展

王晓杰

(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院,黑龙江省玉米深加工理论与技术重点实验室,黑龙江齐齐哈尔161006)

摘要:为了拓展蛋白质的应用范围,常对蛋白质进行改性,其中转谷氨酰胺酶(TGase)催化的酶法糖基化反应已应用于多种蛋白质/多肽的改性中。为了对蛋白质/多肽的酶法糖基化技术的广泛应用提供参考,简述了TGase的来源、催化的反应类型和底物类型,重点阐述了糖基化蛋白/多肽糖基化程度的评价方法以及修饰产物功能性质的变化。目前,TGase主要来源于微生物,其可催化底物的交联、酰基转移(酶法糖基化)和脱酰基3种类型的反应。在TGase催化的酶法糖基化反应中,常用RP-HPLC、邻苯二甲醛(OPA)法和3,5-二硝基水杨酸(DNS)法评价糖基化程度。通过酶法糖基化反应,可以不同程度地改善底物的溶解性、乳化性、热稳定性等功能性质。TGase催化的酶法糖基化反应还存在反应体系复杂、糖基化效率低等问题,需要进一步研究解决。

关键词:转谷氨酰胺酶;糖基化;糖肽;功能性质

中图分类号:TS201.2;TQ93

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2022)10-0025-08

Progress on transglutaminase-catalyzed enzymatic glycosylation in protein/polypeptide modification

WANG Xiaojie

(Heilongjiang Key Laboratory of Corn Deep Processing Theory and Technology, College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

Abstract: In order to expand the application scope of proteins, proteins are often modified, and the enzymatic glycosylation reaction catalyzed by transglutaminase (TGase) has been applied in the modification of various proteins/polypeptides. In order to provide a reference for the wide application of enzymatic glycosylation of protein/polypeptide, the source of TGase, types of reaction and substrate catalyzed by TGase were briefly described, and the evaluation methods of the glycosylation degree of glycosylated protein/polypeptide and changes of main functional properties of modified product were highlighted. At present, TGase is mainly derived from microorganisms, and it can catalyze three types of reaction, including substrate cross-linking, acyl transfer (enzymatic glycosylation) and deamidation. In TGase-catalyzed enzymatic glycosylation reactions, RP-HPLC, ortho-phthalaldehyde (OPA) and 3,5-dinitrosalicylic acid methods are commonly used to evaluate the degree of glycosylation. Functional properties of product such as solubility, emulsification, and thermal stability of substrates can be improved to varying degrees through enzymatic glycosylation. The enzymatic glycosylation reaction catalyzed by TGase still has problems such as complex reaction system and low glycosylation efficiency, and further research is needed to solve it.

Key words: transglutaminase; glycosylation; glycopeptide; functional property

收稿日期:2021-07-28;修回日期:2022-04-26

基金项目:黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2020C111);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费青年创新人才科研项目(135509225)

作者简介:王晓杰(1980),女,教授,博士,研究方向为粮食、油脂与植物蛋白工程(E-mail) wangxiaojie80@163.com。

蛋白质不仅是一种重要的营养素,而且对食品的物理特性也起着重要的作用。随着技术人员、营

养学家和消费者对食品技术功能、营养功能和感官属性要求的不断提高,蛋白质的应用越来越受到限制,无法满足现代食品开发与加工的需求。因此,蛋白质的改性技术就成为使蛋白质达到所需品质的重要工具。

蛋白质的糖基化反应为糖或糖化物分子中还原末端的羰基与蛋白质、肽和氨基酸侧链上的游离氨基共价结合生成糖蛋白的反应^[1]。糖类具有较多的羟基亲水基团,蛋白质分子与糖类发生糖基化反应后,生成的糖蛋白分子中会引入大量的羟基,可使整个分子的溶解性得到提高,改善蛋白质的流变学、界面性能等加工特性;同时,蛋白质也能被赋予一些新的生理功能特性^[2-3]。

转谷氨酰胺酶(Transglutaminase, TGase), 全称为蛋白质-谷氨酰胺- γ -谷氨酰转移酶,属于转移酶类(EC 2.3.2.13)。根据酰基受体的不同, TGase 可以催化蛋白质的交联、酰基转移(酶法糖基化)和脱酰胺3种类型的反应,这3种反应均可以用于改善蛋白质的功能性质。相对于 TGase 催化的蛋白质交联反应的研究, TGase 催化的蛋白质酶法糖基化反应的研究起步较晚。但是,与美拉德反应的高温反应条件以及会产生致突变物的特性相比, TGase 途径的酶法糖基化反应条件更温和,产物更安全。因此, TGase 催化的酶法糖基化反应已经应用于多种蛋白质/多肽的改性研究中。

本文对 TGase 的来源、生产、催化的反应类型和底物类型、糖基化蛋白/多肽的糖基化程度的评价方法,以及糖基化蛋白/多肽的溶解性、表面疏水性、界面性能、流变学性质和生物活性等主要功能性质变化进行了综述,为蛋白质/多肽酶法糖基化技术的建立与广泛应用提供理论依据。

1 TGase 的概述

1.1 TGase 的来源

TGase 广泛分布于动植物组织和微生物细胞中。植物来源的 TGase 存在于叶绿体、类囊体、胞浆和细胞壁等部位,参与植物的抗菌免疫反应和光合作用^[4]。动物来源的 TGase 广泛分布于肝、肺、肠、毛囊、表皮、前列腺、胎盘和血液等中,是最早发现和应用的一类 TGase。动物来源的 TGase 是一种 Ca^{2+} 依赖性酶,只有在 Ca^{2+} 的存在下才能显示“开放”的构象,将目标蛋白质表面上的谷氨酰胺(Glutamine, Gln) 残基交联到小分子或大分子胺上。相反,在不存在 Ca^{2+} 的情况下, TGase 呈现“封闭”的氨基转移催化失活的构象^[5]。20世纪90年代, TGase 的唯一商业来源是豚鼠肝脏,复杂的分离和纯化方法导致

TGase 的价格十分昂贵(约 80 美元/U)^[6], 仅限于在基础研究中应用。与动植物来源的 TGase 相比,微生物来源的 TGase 具有活性高、不依赖 Ca^{2+} 、不需要特殊辅助因子的特点,这也是其用作酶制剂的理想性质^[7]。此外,微生物来源的 TGase 还具有良好的 pH 稳定性、热稳定性、底物特异性等多种特性^[8-9]。在 20 世纪 80 年代末, Ando 等^[10] 首先在茂原链轮丝菌(*Streptovorticillium mobaraense*) 发酵产物中分离提取出 TGase, 引发了该酶的商业化生产革命。1993 年,日本味之素公司实现了微生物来源的 TGase 的工业化生产,使 TGase 的工业应用具有可行性。1998 年, TGase 被美国食品和药物管理局(FDA) 认可为人类摄入的安全物质,这使得微生物来源的 TGase 具有在食品工业中应用的巨大潜力^[11]。

1.2 TGase 催化的反应类型及底物类型

1.2.1 TGase 催化的反应类型

TGase 可以催化蛋白质/多肽分子中 Gln 残基的 γ -酰胺基(酰基供体)和不同化合物的 ϵ -氨基(酰基受体)之间形成异肽键。依据酰基受体的不同, TGase 可以催化以下 3 种类型的反应。

1.2.1.1 交联反应

TGase 催化的交联反应分两步完成。首先, TGase 通过亲核活性的硫醇基(半胱氨酸的-SH) 攻击酰基供体形成中间体硫酯, 释放氨; 然后, 酰基受体亲核攻击中间体硫酯, 硫醇盐得以还原, 形成分子间或分子内交联的 ϵ -(γ -谷氨酰) 赖氨酸键, 该键可抵抗物理和化学降解^[12]。其中, 酰基供体由蛋白质/多肽分子中 Gln 残基的 γ -酰胺基提供, 酰基受体由蛋白质/多肽分子中含有伯氨基团的赖氨酸(Lysine, Lys) 残基提供。

1.2.1.2 酰基转移反应(酶法糖基化反应)

酰基供体由蛋白质/肽分子中 Gln 残基的 γ -酰胺基提供, 内蛋白质反应性 Lys 由含有伯氨基团的糖替代, 发生氨基糖与酰基供体的共价结合反应, 产物为糖蛋白/糖肽。由于 TGase 对 6 个碳的直链脂肪胺显示出高度亲和力^[13], 因此 D-氨基葡萄糖是糖基化反应的首选酰基受体。而壳寡糖是天然几丁质的脱乙酰产物, 由 D-氨基葡萄糖单体通过 β -(1 \rightarrow 4) 糖苷键连接而成^[14], 其糖苷重复单位中含有 1 个伯氨基团, 可通过与肽链中 Gln 的 γ -酰胺基形成酰胺键(-CO-NH-) 而与蛋白质共价结合。因此, 不同分子质量的壳寡糖也是 TGase 途径的酶法糖基化反应中常用的酰基受体。

TGase 催化酶法糖基化反应时,生成了以 Gln - 糖为基本单位的 N - 型糖蛋白/糖肽,该类糖蛋白/糖肽的基本结构与常见的 N - 型糖蛋白/糖肽(天冬氨酸的侧链酰胺基与乙酰氨基葡萄糖通过 1 个 β - N - 糖苷键连接构成)和 O - 型糖蛋白/糖肽(糖与肽链中的羟基氨基酸通过 O - 糖苷键相连)的基本结构均不同,与美拉德反应生成的席夫碱式糖蛋白/糖肽(碳水化合物的醛基与蛋白质的氨基缩合反应)也不同,是一类新型糖蛋白/糖肽。

1.2.1.3 脱酰基反应

酰基供体由蛋白质/肽分子中 Gln 残基的 γ - 酰胺基提供,受体由水分子提供,发生 Gln 的脱酰基反应,产物为含有谷氨酸(Glutamate, Glu)的蛋白质/多肽。脱酰基反应可以用于改善蛋白质的功能性质,例如采用 TGase 催化的脱酰基反应可以显著提高小麦醇溶蛋白的溶解度和乳化性^[15]。

1.2.2 TGase 催化的蛋白质底物类型

基于位于蛋白质表面的 Lys 和 Gln 残基的可及性^[16],TGase 催化的蛋白质底物可以分为以下 4 种类型:①Gln - Lys 型,其中 Gln 和 Lys 残基均参与交联;②Gln 型,只有 Gln 残基可用于反应;③Lys 型,只有 Lys 残基可用于反应;④非反应型,其中 Gln 和 Lys 残基均不用于反应。

2 TGase 催化的酶法糖基化反应

相对于 TGase 催化的蛋白质交联反应的研究,TGase 途径的蛋白质酶法糖基化修饰的研究起步较晚。自 2010 年,东北农业大学赵新淮教授课题组开始将 TGase 催化的酶法糖基化修饰应用于大豆蛋白和酪蛋白改性^[17],TGase 催化的酶法糖基化反应才逐渐进入研究者的视野,科技文献增多。目前,TGase 催化的酶法糖基化反应所涉及的底物蛋白质

主要包括酪蛋白^[18]、大豆蛋白^[17]、鸡肌动球蛋白^[19]、虾原肌球蛋白^[20]、黑豆蛋白^[21]、乳清蛋白^[22]、豌豆蛋白^[23]、玉米醇溶蛋白^[24]和玉米谷蛋白^[25]等。氨基糖的种类包括 D - 氨基葡萄糖^[17]、壳寡糖^[24]、壳聚糖降解物^[26]和 D - 氨基半乳糖^[27]等。

2.1 蛋白质酶法糖基化程度的评价方法

在 TGase 催化的酶法糖基化反应中,氨基糖的导入量即糖基化程度是影响改性蛋白质功能性质的主要因素,通常受多种因素的影响,如反应温度、反应 pH、底物浓度、加酶量和反应时间等。因此,可以通过调节反应条件来控制糖基化程度。利用 SDS - PAGE 的席夫试剂糖染色对糖基化产物进行定性评价。在糖基化过程中,糖连接到蛋白质分子上,产生的糖蛋白会被席夫试剂染成粉红色,这种方法适用于底物为大分子质量蛋白质的糖基化反应的定性评价^[18,28]。目前,定量评价蛋白质酶法糖基化程度的方法主要有 RP - HPLC 法、邻苯二甲醛(OPA)法和 3,5 - 二硝基水杨酸(DNS)法。在 RP - HPLC 法中,先对糖基化修饰产物进行酸水解,再将水解物与邻氨基苯甲酸于柱前衍生,利用反相色谱柱对衍生产物进行分离,最后根据衍生产物的峰面积与 D - 氨基葡萄糖标准曲线计算 D - 氨基葡萄糖接入量^[17,24]。OPA 法是测定游离氨基的含量,根据游离氨基的减少量计算氨基糖的接入量^[18,28]。在 DNS 法中,首先对糖基化修饰产物进行酸水解以释放还原糖,再将水解物与 DNS 试剂进行显色反应,最后根据 D - 氨基葡萄糖标准曲线计算 D - 氨基葡萄糖接入量^[23 - 27]。

目前,通过 TGase 酶法糖基化反应制备糖蛋白的研究中,氨基糖的接入量情况如表 1 所示。

表 1 酶法糖基化修饰产物中糖的接入量

蛋白质	氨基糖	糖接入量	测定方法	参考文献
酪蛋白	1 kDa 壳寡糖	6.86 g/kg	RP - HPLC	[29]
大豆蛋白	5 kDa 壳寡糖	13.60 g/kg	RP - HPLC	[30]
酪蛋白	5 kDa 壳寡糖	12.8 ~ 30.8 g/kg	RP - HPLC	[31]
大豆蛋白	壳聚糖降解物	19.40 g/kg	RP - HPLC	[26]
酪蛋白	壳聚糖降解物	12.77 g/kg	RP - HPLC	[32]
酪蛋白	D - 氨基葡萄糖	12.60 g/kg	RP - HPLC	[33]
大豆蛋白	D - 氨基葡萄糖	19.7 g/kg	RP - HPLC	[34]
酪蛋白	D - 氨基葡萄糖	1.15 mol/mol	RP - HPLC	[35]
大豆蛋白	D - 氨基葡萄糖	3.30 mol/mol	RP - HPLC	[17]
肌原纤维蛋白	D - 氨基葡萄糖	2.768 mg/g	RP - HPLC	[19]
大豆分离蛋白	1 kDa 壳寡糖	12.10 g/kg	RP - HPLC	[36]
乳清蛋白	1 kDa 壳寡糖	371.86 mg/g	RP - HPLC	[22]

续表 1

蛋白质	氨基糖	糖接入量	测定方法	参考文献
豌豆蛋白	980 Da 壳寡糖	29.35 mg/g	DNS	[23]
铁蛋白	1 kDa 壳寡糖	5.60 ~ 8.30 mg/g	HPLC	[37]
鱼肉香肠	壳寡糖	1.01 mg/g	HPLC	[38]
玉米谷蛋白	1 kDa 壳寡糖	392.57 mg/g	HPLC	[25]
玉米谷蛋白	3 kDa 壳寡糖	488.99 mg/g	HPLC	[39]
玉米醇溶蛋白	D-氨基葡萄糖	11.34 mg/g	HPLC	[40]
玉米醇溶蛋白	1.5 kDa 壳寡糖	97.48 mg/g	HPLC	[24]
玉米醇溶蛋白	D-氨基半乳糖	12.55 mg/g	DNS	[27]

由表 1 可知,在不同底物和不同氨基糖条件下,糖接入量的差异较大。糖接入量的变化一方面来源于酰基受体,鉴于壳寡糖分子中较高的伯氨基团可以与蛋白质上更多的反应位点结合,因此壳寡糖等多糖分子的糖基化程度高于单糖,这可以通过比较 D-氨基葡萄糖的含量来证实^[28-36];另一方面来源于底物蛋白质 Gln 含量的不同,如每摩尔大豆蛋白亚基(7S 和 11S)中含有 33 ~ 52 mol Gln,而每摩尔酪蛋白中含有 14 ~ 20 mol Gln,故大豆蛋白的糖接入量大于酪蛋白^[35]。

玉米蛋白含有较多的酰胺基氨基酸,其中谷氨酰胺含量约占氨基酸总量的 1/3。用 TGase 催化玉米蛋白的糖基化反应,糖基结合位点多,可控制的蛋白质糖基化度范围广,获得的糖蛋白的加工特性和生理功能特性的可调整空间大,因此玉米蛋白是 TGase 催化的酶法糖基化反应的优势原料。但是,除本课题组外,未见其他关于玉米蛋白 TGase 途径糖基化修饰的文献报道。本课题组自 2013 年采用 TGase 对玉米蛋白进行酶法糖基化修饰,建立了 D-氨基葡萄糖、D-氨基半乳糖和壳寡糖糖基化修饰玉米醇溶蛋白和谷蛋白的反应体系^[24-27,39-40],其糖接入量见表 1。

2.2 酶法糖基化修饰产物的功能性质

TGase 催化的蛋白质酶法糖基化反应能够不同程度地改善蛋白质的功能性质,包括溶解性、界面性质、热稳定性和生物活性等。

2.2.1 表面疏水性和溶解性

在 TGase 催化下,蛋白质与氨基糖发生共价结合反应,产物糖蛋白兼具蛋白质的大分子特性和糖类的亲水特性,使蛋白质的功能性质有不同程度的改善,尤其是溶解度低的植物蛋白的改善效果较好。

疏水力是一种非共价相互作用,有助于蛋白质四级结构的形成和稳定,对维持蛋白质的构象有重要影响。TGase 催化的交联反应和糖基化修饰对蛋白质的表面疏水性有不同程度的影响。TGase 催

的蛋白质交联反应可以导致底物蛋白质分子结构改变,使埋藏在分子内部的疏水性基团暴露于分子表面,因此交联反应可以使底物蛋白质的表面疏水性增加^[41]。Chen 等^[42]用 TGase 和 D-氨基葡萄糖修饰乳清蛋白,发现通过 TGase 交联反应形成了分子质量更大、结构更致密的乳清蛋白聚合物,该聚合物通过将其疏水性残基隐藏在聚集体内部,导致表面疏水性显著降低。糖类为含有一OH 和一NH₂等亲水性基团的水溶性分子,其通过 TGase 的催化作用与蛋白质分子共价结合,会增加蛋白质的表面亲水性。本课题组利用 TGase 催化玉米醇溶蛋白与壳寡糖(分子质量 1.5 kDa)发生糖基化反应时,玉米醇溶蛋白的表面疏水性从 555.71 下降到 273.20^[24],而交联玉米醇溶蛋白的表面疏水性增加至 638.06。Yuan 等^[20]以虾(*Metapenaeus ensis*)原肌球蛋白为底物,利用 TGase 和壳寡糖对其进行糖基化修饰,发现附着在蛋白质分子上的阳离子壳寡糖会改变蛋白质的电荷性质并影响蛋白质分子上芳香族氨基酸残基的折叠和掩埋,导致蛋白质的表面疏水性降低。

蛋白质的溶解性是其工业应用的关键功能属性。糖基化修饰诱导蛋白质表面疏水性/亲水性平衡的变化,引起蛋白质溶解度的改变,当亲水性氨基糖共价结合于蛋白质分子的疏水性表面时,蛋白质的水合作用或持水性增强,蛋白质的溶解性增加。另外,共价导入的糖基部分还可能进一步施加额外的空间位阻效应,阻止蛋白质分子尤其是在等电点附近的聚集,进而提高修饰底物的溶解性^[19]。因此,为了使蛋白质在广泛 pH 下有更好的溶解性,需要实现更程度的糖结合和更高水平的酶促糖基化反应。Colas 等^[43]用来源于猪肝脏的 TGase 催化豌豆球蛋白与氨基半乳糖甘露聚糖之间的糖基化反应,在 pH 5.5 时,糖基化修饰使豌豆球蛋白的溶解性从 12% 增加至 65.5%。Hrynets 等^[44]利用 TGase 催化鸡肌动球蛋白与 D-氨基葡萄糖发生糖基化反应,发现与未糖基化的肌动球蛋白相比,糖基化修饰肌

动球蛋白在等电点处的溶解性由 8.7% 增加至 34%。

2.2.2 乳化性

TGase 酶法糖基化修饰对蛋白质乳化性质的影响与底物蛋白质种类、氨基糖种类、反应条件等因素有关。TGase 催化的糖基化反应一方面使 Lys 残基嵌段的负电荷增加,有利于油滴的吸附;另一方面糖接枝物中疏水性的蛋白质部分会定向于非水相,而亲水性的糖基部分则定向于水相,油水界面中的糖蛋白分子可以结合更多的水分子,减慢了分散相油滴聚集和油脂分离的过程,改善了蛋白质乳状液的稳定性^[45-46]。Jiang 等^[47]用 TGase 催化酪蛋白与 D-氨基葡萄糖发生糖基化反应时,与原酪蛋白相比,糖基化修饰产物的乳化性和乳化稳定性分别增加 12% 和 20%。

TGase 催化糖基化反应时,副反应(交联反应)的发生程度也与糖蛋白的乳化性质有关。Chen 等^[42]研究了 TGase 催化的乳清蛋白与 D-氨基葡萄糖接枝物的乳化性质,发现 D-氨基葡萄糖的共价结合使乳清蛋白分子之间的交联反应降低,导致糖接枝物的乳化稳定性降低。

2.2.3 体外消化性能

目前研究表明,TGase 催化的糖基化反应对产物体外消化性能的影响主要与底物蛋白质分子间交联反应发生的程度有关。一般认为蛋白质分子间的交联反应会降低其体外消化能力,而糖基的接入有利于消化酶的作用。王小鹏等^[29]利用 TGase 和壳寡糖(1 kDa)对酪蛋白进行糖基化修饰,发现氨基糖的共价结合和蛋白质间的交联反应同时发生,交联反应生成的大分子质量聚合物屏蔽了消化酶的识别位点,使得糖基化修饰降低了酪蛋白的体外消化性能。采用壳寡糖对玉米谷蛋白进行糖基化修饰时,鉴于玉米谷蛋白分子内缺少 Lys,分子间的交联反应发生的概率低,糖基的导入使玉米谷蛋白的体外消化率由 57.17% 提高到 75.25%,在一定程度上提高了玉米谷蛋白的营养品质^[48]。

2.2.4 热稳定性

热稳定性是影响食品加工、存储和热加工中蛋白质性质的重要因素,也是蛋白质缔合和形成凝胶等网络结构的先决条件^[23]。Yang 等^[23]采用 TGase 和壳寡糖(分子质量 980 Da)修饰豌豆蛋白,发现当豌豆蛋白与壳寡糖物质的量比为 1:1 时,壳寡糖的共价结合可以覆盖豌豆蛋白并作为热处理的屏障,使糖蛋白的热变性温度与未处理豌豆相比显著升高,且随着糖接入量的增加,糖蛋白的热稳定性逐渐

增加。Yang 等^[37]采用 TGase 和壳寡糖(分子质量 1 kDa)修饰铁蛋白,发现壳寡糖可以共价连接于铁蛋白的外表面,糖基的连接通过氢键的形成增加了铁蛋白中 α -螺旋和 β -折叠的含量,同时使维持铁蛋白结构的疏水力增加,进而改善了铁蛋白的热稳定性。

2.2.5 生物学功能

目前,在对蛋白质进行 TGase 酶法糖基化改性的研究中,主要集中在对产物结构和理化性质的研究方面,而对产物生理功能性质的研究相对较少。本课题组采用分子质量为 1.5 kDa 的壳寡糖对玉米醇溶蛋白进行糖基化修饰,发现壳寡糖的共价结合使玉米醇溶蛋白的 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基清除能力,还原力和 Fe^{2+} 螯合能力显著提高,将糖基化修饰产物应用于 4℃ 贮存的生猪肉糜(肥瘦比 1:4)中,0.03% 的添加量可以有效地抑制生猪肉糜中脂肪的氧化^[24]。Yuan 等^[20,49]发现通过 TGase 处理的 D-氨基葡萄糖修饰作用可以使虾原肌球蛋白和牛奶 β -乳球蛋白的一级结构解折叠,而二级结构丢失,降低了虾制品和牛奶的抗原性和致敏性。Zhan 等^[50]用 TGase 和壳寡糖修饰泥蚶(*Tegillarca granosa*)血红蛋白,发现糖基化可以使泥蚶血红蛋白结构稳定,增强其抗氧化和补铁作用。

3 肽的 TGase 酶法糖基化修饰

为了改善蛋白质 TGase 酶法糖基化的效率,以及进一步提高改性蛋白质的功能性质,可以先采用蛋白酶对底物蛋白质进行限制性切割,使蛋白质分子质量变小,同时使分子内部的反应基团暴露出来,再加入 TGase 和氨基糖进行酶法糖基化修饰,氨基糖的接入量会增加;同时,与糖蛋白相比,糖肽具有更加突出的加工特性,如分子质量小、结构相对简单,是特别有潜力的食品工业原料。

自 2014 年以来,开始有通过 TGase 催化蛋白水解物与氨基糖合成糖肽的报道。Hong 等^[51]利用 TGase 催化鱼皮胶原蛋白肽和 D-氨基葡萄糖发生糖基化反应,在 25℃ 下反应 3.5 h 制备的糖肽显示出优于鱼皮胶原蛋白肽的抗氧化性能和抗菌活性。Gottardi 等^[52]利用 TGase 将 D-氨基葡萄糖导入到小麦谷蛋白水解物中,生成的糖肽的 DPPH 自由基清除能力和对大肠杆菌的抑菌活性显著增强。Cerneño 等^[53]将酪蛋白酸钠在水解前后与 TGase 一起孵育,发现经 TGase 处理后,水解产物在质量浓度为 0.5、1.0 mg/mL 时可以显著降低刀豆球蛋白 A 刺激 Jurkat T 细胞白细胞介素 6(IL-6)的产生,而在 TGase 处理前后样品的抗氧化活性之间差异不显

著。Hu 等^[54]利用 TGase 催化合成胶原蛋白肽-羧甲基壳聚糖,发现制备的糖基化胶原肽能促进小鼠成纤维细胞生长,显示了其在创伤敷料中的应用潜力。

本课题组也开展了有关玉米糖肽的研究工作^[55]。用 TGase 和 D-氨基葡萄糖修饰玉米六肽(Gln-Gln-Pro-Gln-Pro-Trp)时,糖基化修饰改善了玉米六肽的抗氧化活性和乙醇脱氢酶激活率。用 TGase 和 D-氨基葡萄糖修饰玉米醇溶蛋白源玉米肽制备玉米糖肽,与玉米肽相比,玉米糖肽的溶解性显著增加,而且具有更高的抗氧化活性及乙醇脱氢酶激活率,尤其是在拮抗酒精性肝损伤方面,玉米糖肽的有效剂量显著低于玉米肽^[56]。用 TGase 和 D-氨基葡萄糖修饰玉米蛋白水解产物时,产物玉米糖肽表现出对 DPPH 自由基和羟自由基的清除能力,以及对酒精诱导损伤的 LO2 细胞的保护作用^[57]。因此,利用蛋白酶水解与 TGase 催化的酶法糖基化反应对底物蛋白质进行协同改性,将有效改善蛋白质的功能性质,具有良好的发展前景。

4 TGase 酶法糖基化修饰的缺点

随着研究的深入,发现 TGase 途径的酶法糖基化修饰存在以下缺点:①当底物蛋白质同时含有 Gln 和 Lys 残基时,交联反应和糖基化反应同时发生,使反应体系中产物复杂,不利于对糖蛋白/糖肽进行构效关系的研究;②以蛋白质为底物时,由于蛋白质分子质量大,反应空间位阻大,且大分子质量蛋白质在水相中的溶解度低,一些反应基团深埋在蛋白质分子内部,影响了底物蛋白质与氨基糖之间的相互作用,进而降低了蛋白质功能性质的改善程度;③在酶法糖基化反应结束后,反应体系中未反应的氨基糖主要采用透析的方法去除,存在处理量小、效率低、不能工业化应用等缺点;④在糖基化反应结束时,一般采用 85℃ 热处理 5 min 的方式钝化 TGase,该过程会导致美拉德反应的发生,这又加剧了反应体系的复杂性。

5 结束语

TGase 是一种可以用于改善蛋白质/多肽功能特性的酶,改善程度与底物蛋白质的性质、氨基糖的性质以及副反应交联反应发生的程度等因素有关。同时,TGase 途径的酶法糖基化修饰具有反应专一性强、反应速度快、条件温和、生物安全性好等优势,是未来进行蛋白质/多肽糖基化修饰的研究方向。但是,在 TGase 催化的酶法糖基化反应中,存在糖基化效率低,糖基化反应体系复杂,反应体系中未反应的氨基糖主要采用透析的方法去除,不利于工业化

应用等问题。因此,虽然利用 TGase 催化的酶法糖基化反应对食品蛋白质/多肽进行改性取得了一些进展,但工艺还不成熟,需要进一步解决现存问题。总之,TGase 催化的酶法糖基化修饰途径已经吸引了很多研究者的关注,将来定会得到更广阔的应用。

参考文献:

- [1] 冯燕英,牟代臣,祁文磊,等. 蛋白质糖基化接枝改性研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(2): 190-195.
- [2] MACEDO-DA-SILVA J, SANTIAGO V F, ROSA-FERNANDES L, et al. Protein glycosylation in extracellular vesicles: structural characterization and biological functions [J]. Mol Immunol, 2021, 135: 226-246.
- [3] ZHANG A Q, CUI Q, ZHOU M, et al. Improving freeze-thaw stability of soy protein isolate-glucosamine emulsion by transglutaminase glycosylation [J]. Food Bioprod Process, 2021, 128: 77-83.
- [4] SERAFINI-FRACASSINI D, DRI-DUCA S. Transglutaminases: widespread cross-linking enzymes in plants[J]. Ann Botany, 2008, 102(2): 145-152.
- [5] D'ELETTO M, FARRACE M G, PIACENTINI M, et al. Assessing the catalytic activity of transglutaminases in the context of autophagic responses[J]. Mol Charact Autoph Resp, 2017, 587: 511-520.
- [6] ZHENG M Y, DU G C, CHEN J. pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptovercillium mobaraense* [J]. Enzyme Microb Technol, 2002, 31(4): 477-481.
- [7] DUARTE L, MATTE C R, BIZARRO C V, et al. Review transglutaminases: part II Industrial applications in food, biotechnology, textiles and leather products[J/OL]. World J Microbiol Biotechnol, 2019, 36: 11 [2021-07-01]. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2792-9>.
- [8] GIOSAFATTO C V L, FUSCO A, AI-ASMAR A, et al. Microbial transglutaminase as a tool to improve the features of hydrocolloid-based bioplastics[J/OL]. Int J Mol Sci, 2020, 21(10): 36569 [2021-07-01]. <https://doi.org/10.3390/ijms21103656>.
- [9] DUARTE L, MATTE C R, BIZARRO C V, et al. Transglutaminases: part I Origins, sources, and biotechnological characteristics[J/OL]. World J Microbiol Biotechnol, 2020, 36: 11 [2021-07-01]. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2791-x>.
- [10] ANDO H, ADACHI M, UMEDA K, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms [J]. Agric Biol Chem, 1989, 53: 2613-2617.

- [11] ERDEM N, BABAÖGLÜ A S, POÇCAN H B, et al. The effect of transglutaminase on some quality properties of beef, chicken, and turkey meatballs [J/OL]. *J Food Process Preserv*, 2020, 44: e14815 [2021-07-01]. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14815>.
- [12] SAVOCA M, TONOLI E, ATOBATELE A, et al. Biocatalysis by transglutaminases: a review of biotechnological applications [J/OL]. *Micromachines*, 2018, 9(11): 562 [2021-07-01]. <https://doi.org/10.3390/mi9110562>.
- [13] LORAND L, PARAMESWARAN K N, STENBERG P, et al. Specificity of guinea pig liver transglutaminase for amine substrates [J]. *Biochemistry*, 1979, 18: 1756-1765.
- [14] SUN T, YAO Q, ZHOU D X, et al. Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(21): 5774-5776.
- [15] CHOBERT J M, BRIAND L, GUÉGUEN J, et al. Recent advances in enzymatic modifications of food proteins for improving their functional properties [J]. *Food/Nahrung*, 1996, 40(4): 177-182.
- [16] MOSTAFA H S. Microbial transglutaminase: an overview of recent applications in food and packaging [J]. *Biocatal Biotransf*, 2020, 38: 1-17.
- [17] JIANG S J, ZHAO X H. Transglutaminase-induced cross-linking and glucosamine conjugation in soybean protein isolates and its impacts on some functional properties of the products [J]. *Eur Food Res Technol*, 2010, 231(5): 679-689.
- [18] SONG C L, ZHAO X H. The preparation of an oligochitosan-glycosylated and cross-linked caseinate obtained by a microbial transglutaminase and its functional properties [J]. *Int J Dairy Technol*, 2014, 67(1): 110-116.
- [19] XU Y J, ZHAO X, BIAN G L, et al. Structural and solubility properties of pale, soft and exudative (PSE)-like chicken breast myofibrillar protein: effect of glycosylation [J]. *LWT - Food Sci Technol*, 2018, 95: 209-215.
- [20] YUAN F Z, LV L T, LI Z X, et al. Effect of transglutaminase-catalyzed glycosylation on the allergenicity and conformational structure of shrimp (*Metapenaeus ensis*) tropomyosin [J]. *Food Chem*, 2017, 219: 215-222.
- [21] 张英蕾, 尹彦洋, 姚鑫森, 等. 转谷氨酰胺酶催化的糖基化修饰对黑豆蛋白抗氧化活性的影响 [J]. *中国食品添加剂*, 2019, 30(2): 77-84.
- [22] 马莹. 转谷氨酰胺酶协同壳寡糖修饰乳清蛋白性质研究 [D]. 辽宁大连: 大连工业大学, 2016.
- [23] YANG R, LIU M Y, LIU Y Q, et al. The structure and stability analysis of the pea seed legumin glycosylated by oligochitosan [J]. *J Sci Food Agric*, 2021, 101(3): 1065-1075.
- [24] WANG X J, ZHENG X Q, LIU X L, et al. Preparation of glycosylated zein and retarding effect on lipid oxidation of ground pork [J]. *Food Chem*, 2017, 227: 335-341.
- [25] 刘金玲, 刘晓兰, 郑喜群. 转谷氨酰胺酶催化壳寡糖糖基化修饰玉米谷蛋白 [J]. *食品科技*, 2015, 40(9): 7-11, 16.
- [26] 朱常月. 壳聚糖降解物与两种蛋白的酶法糖基化交联及产物性质 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- [27] 王晓杰, 刘晓兰, 丛万锁, 等. D-氨基半乳糖酶法糖基化修饰玉米醇溶蛋白的条件优化及产物部分功能性质研究 [J]. *中国调味品*, 2018, 43(5): 13-19.
- [28] 全越. 转谷氨酰胺酶对燕麦麸皮中球蛋白的结构修饰及其功能特性研究 [D]. 黑龙江大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2016.
- [29] 王小鹏, 赵新淮. 酶法糖基化修饰对酪蛋白体外消化能力的影响 [J]. *食品科学*, 2019, 40(20): 47-53.
- [30] FU M, ZHAO X H. Modified properties of a glycosylated and cross-linked soy protein isolate by transglutaminase and an oligochitosan of 5 kDa [J]. *J Sci Food Agric*, 2017, 97: 58-64.
- [31] FU M, ZHAO X H. Structure and property changes of transglutaminase-induced modification of sodium caseinate in the presence of oligochitosan of 5 kDa [J]. *Int J Food Prop*, 2016, 19: 1-28.
- [32] ZHU C Y, WANG X P, ZHAO X H. Property modification of caseinate responsible to transglutaminase-induced glycosylation and crosslinking in the presence of a degraded chitosan [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2015, 24(3): 843-850.
- [33] YAO X T, ZHAO X H. Pre-deamidation of soy protein isolate exerts impacts on transglutaminase-induced glucosamine glycation and cross-linking as well as properties of the products [J]. *J Sci Food Agric*, 2016, 96(7): 2418-2425.
- [34] 姚欣彤. 酪蛋白和大豆蛋白的脱酰胺和酶法糖基化交联修饰及产物性质 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- [35] JIANG S J, ZHAO X H. Transglutaminase-induced cross-linking and glucosamine conjugation of casein and some functional properties of the modified product [J]. *Int Dairy J*, 2011, 21(4): 198-205.
- [36] SONG C L, ZHAO X H. Structure and property modification of an oligochitosan-glycosylated and crosslinked soybean protein generated by microbial transglutaminase [J]. *Food Chem*, 2014, 163(11): 114-119.
- [37] YANG R, ZUO P, ZHANG M, et al. Transglutaminase

- induced oligochitosan glycosylation of ferritin as a novel nanocarrier for food bioactive molecules [J]. *Food Hydrocolloid*, 2019, 94: 500 – 509.
- [38] WANG J, ZOU L, YUAN F Z, et al. Inhibition of advanced glycation endproducts during fish sausage preparation by transglutaminase and chitosan oligosaccharides induced enzymatic glycosylation [J]. *Food Funct*, 2018, 9: 253 – 262.
- [39] 刘金玲, 刘晓兰, 徐晶, 等. TGase 催化玉米谷蛋白与壳寡糖糖基化修饰的研究[J]. *食品工业*, 2015, 36(9): 52 – 56.
- [40] 周利敏, 刘晓兰, 刘玥, 等. TGase 催化玉米醇溶蛋白糖基化改性[J]. *食品科学*, 2014, 35(24): 15 – 19.
- [41] CSIGHT A, NATH A, VOZÁRY E, et al. Investigating the texture and antioxidant capacity of papain and transglutaminase enzyme – treated yogurt with different carbohydrates – glucose, sucrose and maltodextrin [J]. *Period Polytech Chem Eng*, 2020, 64: 349 – 356.
- [42] CHEN L, ULLAH N, LI C, et al. Incorporated glucosamine adversely affects the emulsifying properties of whey protein isolate polymerized by transglutaminase [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(5): 3413 – 3423.
- [43] COLAS B, CEAR D, FOURNIER E. Transglutaminase – catalyzed glycosylation of vegetable proteins. Effect on solubility of pea legumin and wheat gliadins [J]. *J Agric Food Chem*, 1993, 41(11): 1811 – 1815.
- [44] HRYNETS Y, NDAGIJIMANA M, BETTI M. Transglutaminase – catalyzed glycosylation of natural actomyosin (NAM) using glucosamine as amine donor: functionality and gel microstructure [J]. *Food Hydrocolloid*, 2014, 36: 26 – 36.
- [45] ALI N A, AHMED S H, MOHAMED E A, et al. Changes in functional properties by transglutaminase cross linking as a function of pH of legumes protein isolate [J]. *Innov Roman Food Biotechnol*, 2010, 7: 12 – 20.
- [46] SOARES L H B, ALBUQUERQUE P M, ASSMANN F, et al. Physicochemical properties of three food proteins treated with transglutaminase [J]. *Ciência Rural*, 2004, 34: 1219 – 1223.
- [47] JIANG S J, ZHAO X H. Cross – linking and glucosamine conjugation of casein by transglutaminase and the emulsifying property and digestibility in vitro of the modified product [J]. *Int J Food Prop*, 2012, 15(6): 1286 – 1299.
- [48] 王晓杰, 刘晓兰, 林巍, 等. 体外消化对壳寡糖糖基化修饰玉米谷蛋白生物活性的影响 [J]. *食品工业*, 2018, 39(8): 133 – 137.
- [49] YUAN F Z, AHMED I, LV L T, et al. Impacts of glycation and transglutaminase – catalyzed glycosylation with glucosamine on the conformational structure and allergenicity of bovine *beta* – lactoglobulin [J]. *Food Funct*, 2018, 9: 3944 – 3955.
- [50] ZHAN J Q, LI G S, TAN B B. Optimization of hemoglobin chitosan glycosylation conditions and structural characteristics and functions of glycosylated hemoglobin after an in vitro digestion [J]. *J Aquatic Food Prod Technol*, 2021, 30(7): 794 – 805.
- [51] HONG P K, GOTTARDI D, NDAGIJIMANA M, et al. Glycation and transglutaminase mediated glycosylation of fish gelatin peptides with glucosamine enhance bioactivity [J]. *Food Chem*, 2014, 142: 285 – 293.
- [52] GOTTARDI D, HONG P K, NDAGIJIMANA M, et al. Conjugation of gluten hydrolysates with glucosamine at mild temperatures enhances antioxidant and antimicrobial properties [J]. *LWT – Food Sci Technol*, 2014, 57: 181 – 187.
- [53] CERMEÑO M, FITZGERALD R J, O'BRIEN N M. In vitro antioxidant and immunomodulatory activity of transglutaminase – treated sodium caseinate hydrolysates [J]. *Int Dairy J*, 2016, 63: 107 – 114.
- [54] HU W, LIU M, YANG X, et al. Modification of chitosan grafted with collagen peptide by enzyme crosslinking [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 206: 468 – 475.
- [55] 王晓杰, 刘晓兰, 丛万锁, 等. 玉米六肽的酶法糖基化修饰对产物生物活性的影响 [J]. *中国酿造*, 2018, 37(3): 78 – 83.
- [56] WANG X J, LIU X L, ZHENG X Q, et al. Preparation of corn glycopeptides and evaluation of their antagonistic effects on alcohol – induced liver injury in rats [J/OL]. *J Funct Foods*, 2020, 66: 103776 [2021 – 07 – 01]. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103776>.
- [57] LIU X L, SONG C L, CHEN J P, et al. Preparation and evaluation of new glycopeptides obtained by proteolysis from corn gluten meal followed by transglutaminase – induced glycosylation with glucosamine [J/OL]. *Foods*, 2020, 9(5): 555 [2021 – 07 – 01]. <https://doi.org/10.3390/foods9050555>.