

EDWARD KOŁAKOWSKI, ZDZISŁAW E. SIKORSKI

TRANSGLUTAMINAZA I JEJ WYKORZYSTANIE W PRZEMYSŁE ŻYWNOŚCIOWYM

Streszczenie

Omówiono występowanie i właściwości transglutaminazy (EC 2.3.2.13) z uwzględnieniem wpływu różnych czynników katalizujących lub inhibitujących reakcję sieciowania białek. Przedstawiono główne kierunki zastosowania transglutaminazy w przemyśle żywnościowym i wartość biologiczną białek modyfikowanych przy jej udziale.

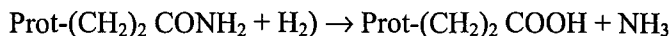
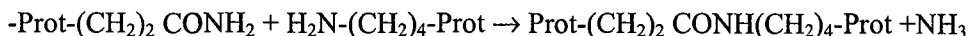
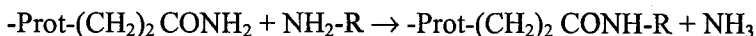
Wprowadzenie

Sensoryczne cechy oraz biologiczna wartość żywności zależą w dużej mierze od udziału i właściwości białek w różnych surowcach i produktach żywnościowych. Zachowanie się białek, w szczególności ich właściwości funkcjonalne oraz reaktywność biochemiczna i chemiczna, a także wartość biologiczna wynikają ze składu aminokwasowego, który determinuje wymiary, konformację i sztywność cząsteczek, wielkość i rozmieszczenie fragmentów hydrofilowych i hydrofobowych, usieciowanie wiązaniami o różnej energii oraz podatność na zmiany pod wpływem czynników środowiska. Wszystkie te właściwości zmieniają się w dużym stopniu w warunkach przetwarzania żywności. Można je także celowo modyfikować metodami chemicznymi i biochemicznymi. Na wymiary i giętkość cząsteczek można wpływać przez hydrolizę wiązań peptydowych, odszczepienie lub przyłączenie fragmentów sacharydowych, redukcję mostków disulfidowych lub wytworzenie nowych, śród- i międzycząsteczkowych wiązań sieciujących o różnej energii. Oddziaływania białek przy różnych odczynach środowiska i reakcje z jonami można modyfikować przez zwiększenie ujemnego ładunku cząsteczek w drodze acylowania, szczególnie bezwodnikami kwasów dikarboksylo-

wych, alkilowania lub usunięcia grup amidowych. Dodatni ładunek cząsteczek można zwiększyć przez przyłączenie zasadowych aminokwasów albo amin, a hydrofobowość przez przyłączenie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych lub hydrofobowych aminokwasów albo alkilowanie. Biochemiczną i chemiczną reaktywność białek można zmienić przede wszystkim przez związanie grup aminowych, tiolowych i hydroksylo- wych w resztach aminokwasów.

Enzymatyczne modyfikowanie składników żywności ma większe szanse dopusz- czenia do stosowania w przemyśle żywnościowym niż obróbka chemiczna. Największe zastosowanie mają dotychczas enzymy proteolityczne, wykorzystywane do wytwarza- nia hydrolizatów białkowych o różnych właściwościach, a także do modyfikowania składu aminokwasowego białek w reakcji plasteinowej. Ostatnio coraz szersze zainte- resowanie budzi transglutaminaza – (EC 2.3.2.13) (TGaza). Przy jej udziale można zmienić ładunek cząsteczek białka, przyłączyć pożądane reszty aminokwasów lub inne grupy, a przez katalizowanie powstawania kowalencyjnych wiązań sieciujących można wpływać na wymiary i giętkość cząsteczek białka.

TGaza katalizuje reakcje przeniesienia acylu, w których donorem jest grupa γ -karboksamidowa reszty glutaminy, a akceptorami mogą być pierwszorzędowe gru- py aminowe w różnych związkach:



gdzie: Prot – białko.

Jeśli akceptorem acylu jest wolna lizyna, białko ulega wzbogaceniu o ten amino- kwas związany jako reszta ϵ -N(γ -glutamyl)lizyny. Reakcja z wolną aminą umożliwia przyłączenie do cząsteczki białka hydrofobowych lub hydrofilowych fragmentów. TGaza ma duże powinowactwo do nierozgałęzionych amin alifatycznych o sześciu atomach węgla. Przeniesienie acylu na resztę lizyny związanej w łańcuchu polipepty- dowym powoduje wytworzenie wewnątrzcząsteczkowego lub międzycząsteczkowego, izopeptydowego wiązania sieciującego.

W każdym przypadku jednym z produktów jest wolny amoniak. Oznaczanie jego ilości może służyć do kontroli zaawansowania reakcji. Aktywność TGazy można rów- nież zmierzyć przez oznaczenie amin związanych w reakcji z resztą glutaminy, np. monodansylokadaweryny (MDC) lub oznaczenie dipeptydu ϵ -(γ -glutamyl)lizyny metodą HPLC. Sieciowanie białek lub peptydów może być także kontrolowane elek- troforetycznie przez oznaczenie masy cząsteczkowej polimerów białkowych albo re- ologicznie przez oznaczanie lepkości, momentu obrotowego lub parametrów tekstury.

W przemyśle żywnościowym praktyczne zastosowanie znalazło sieciowanie białek przy udziale TGazy, zarówno endogennej, występującej w szczególności w mięsie ryb, jak i dodawanej celowo w procesach przetwórczych.

Występowanie i otrzymywanie TGazy

TGaza uczestniczy w wielu procesach fizjologicznych w organizmach zwierzęcych i roślinnych – jest czynnikiem powodującym krzepliwość krwi, bierze udział w obronnych reakcjach przeciwbakteryjnych i w fotosyntezie. Wykryto ją w tkankach i cieczach ustrojowych wielu kręgowców, bezkręgowców, roślin i drobnoustrojów. Najbardziej poznana jest TGaza z wątroby świni gwinejskiej, opisana po raz pierwszy przez Sarker'a i wsp. [31]. TGazę wykryto dotychczas m.in. w mięsie mintaja, sardynki, makreli pacyficznej, barakudy, ostroboka, terpugi, węgorza srebrzystego, łososia, kulbaka, pagrusa, karpia i pstrąga tęczowego. Ryby wykazują znaczne zróżnicowanie pod względem aktywności TGazy – od 0,1 jednostek/g tkanki mięśniowej (pstrąg tęczowy) do 2,4 (kulbak) [1].

Opracowano metody otrzymywania i oczyszczania Ca^{2+} – zależnej TGazy z wątroby świni gwinejskiej, z plazmy krwi bydłowej i świńskiej, z wątroby mintaja i z ostryg. TGazę pochodzenia mikrobiologicznego otrzymuje się głównie ze szczepów *Streptovorticillium* sp., *S. mobarense* i *S. lodakanum*, a także *Physarum* sp. i *P. polycephalum* oraz *Streptomyces* sp. Sklonowano również TGazę z pagrusa karaibskiego w komórkach *E. coli*. Przy wytwarzaniu zewnątrzkomórkowych TGaz pochodzenia mikrobiologicznego stosunkowo łatwa jest procedura ich oczyszczania.

Chemiczne i biochemiczne właściwości TGazy

TGaza występuje w postaci monomeru, dimeru, lub tetrameru, jako rozpuszczalna w cytosolu albo związana w mitochondriach lub w lizosomach. Enzym wykryty w plazmie jest tetramerem dysocjującym na dwie formy dimeryczne, z których jedna ma aktywność enzymatyczną. TGazy wyizolowane z tkanek świni morskiej, ryb i krewetek mają masę cząsteczkową w zakresie 75–85 kDa, homara 200 kDa, plazmy krwi 300–350 kDa, a enzymy pochodzenia mikrobiologicznego 37–77 kDa. TGaza aktywowana jonami wapnia zawiera 17–18 wolnych grup –SH, z których jedna znajduje się w centrum aktywnym. W temperaturze 40°C TGaza jest stabilna w obecności 15 mM Ca^{2+} , natomiast w temp. 60°C ulega prawie pełnej inaktywacji już po ok. 5 min. Energia jej cieplnej inaktywacji jest niższa (ok. 37 kJ·mol⁻¹) niż energia aktywacji (ok. 47 kJ·mol⁻¹) [27].

TGaza z *S. lodakanum* wykazuje optimum aktywności w temp. 50°C przy pH 6,0 i jest stabilna przy pH 5,0–7,0. Jest to enzym niezależny od jonów wapnia, również zawierający w centrum aktywnym cysteinę [35].

TGazy różnego pochodzenia różnią się wartościami punktu izoelektrycznego – na przykład pI enzymu z wątroby świni morskiej jest równy 4,5, a z *Streptovercillium* 8,9.

W reakcjach sieciowania białek TGaza wykazuje dużą specyficzność substratową – działa tylko na reszty glutaminy związane grupami α -aminowymi i α -karboksylowymi w łańcuchu polipeptydowym; obecność w pobliżu reszty amidowej, rozgałęzionych reszt aminokwasowych oraz reszt obdarzonych ładunkiem elektrycznym zmniejsza wydajność reakcji. Zatem białka zawierające dużo reszt amidowych, np. liczne białka roślinne, nie zawsze są dobrymi substratami w reakcjach sieciowania katalizowanych TGazą [3].

Czynniki wpływające na sieciowanie białek katalizowane transglutaminazą

Stężenie enzymu

Stężenie TGazy jest jednym z podstawowych czynników wywierających wpływ na efekt działania enzymu. Minimalne stężenie TGazy niezbędne do uzyskania żelu większości białek żywnościowych wynosi 10–40 jednostek/g białka [30]. Zwiększenie stężenia do 100 jednostek/g białka podnosi twardość i elastyczność żelu większości białek, lecz nieproporcjonalnie do stężenia enzymu. Żele z białka mleka otrzymane przy małym stężeniu TGazy mikrobiologicznej (25 jednostek/g białka) są mało spoiste i podatne na uszkodzenia mechaniczne, zaś żele otrzymane przy stężeniu TGazy równym 45 jednostek/g białka są twarde i kruche [23]. Można więc przyjąć, że stężenie TGazy optymalne do wywołania żelowania białek żywności waha się w granicach 30–50 jednostek/g białka. Przy wytwarzaniu szynek rybnych w rodzaju *kamaboko* lub *chikuwa* stosuje się co najmniej 0,01% TGazy o aktywności właściwej 1 jednostki/mg.

Właściwości białka jako substratu

Pierwszorzędowa struktura i konformacja białka jako substratu TGazy ma większe znaczenia dla aktywności enzymu niż ogólna zawartość lizyny i glutaminy. Konformacja białka i sekwencja aminokwasów decydują prawdopodobnie o dostępności reszt lizyny i glutaminy. Wśród 21 reszt glutaminy w β -kazeinie tylko 5 reszt ulega łatwo enzymatycznej modyfikacji. Czynniki determinujące możliwość reakcji katalizacyjnej są związane z sekwencją aminokwasów w sąsiedztwie reszty glutaminowej. Niektóre reszty są bardziej pożądane niż inne, przy czym w różnych białkach sekwencje sprzyjające reakcji nie powtarzają się. Istotne znaczenie mają również pewne reszty aminokwasów oddalone od reszty glutaminowej, lecz wpływające na konformację białka.

Białka globularne stają się bardziej podatne na polimeryzację katalizowaną TGazą po częściowym rozfałdowaniu, np. na granicy faz w emulsjach lub po odpowiedniej,

uprzedniej modyfikacji metodami biochemicznymi albo chemicznymi, np. po zniszczeniu sieciujących wiązań disulfidowych. Sieciowanie kazeiny o stosunkowo dużej giętkości cząsteczek zachodzi wydajniej niż globularnych białek serwatki [34]. Dekonformacja wywołana przez zmianę odczynu środowiska lub substancje redukujące zwiększa wydajność reakcji sieciowania białek serwatki. Wysokie ciśnienie, rzędu 250-300 Mpa, zastosowane przed inkubowaniem białka z TGazą, zwiększa podatność miozyny ryb na sieciowanie [2]. Potwierdzeniem istotnego znaczenia konformacji może być również wyższa zdolność wiązania MDC pod wpływem TGazy przez acetylowaną kazeinę niż przez aktomiozynę mięsa ryb, pomimo, że obydwa białka zawierają podobną ilość glutaminy [15].

Żelowanie rozdrobnionego mięsa ryb niektórych gatunków, niezależnie od stężenia rodzimej TGazy [25], może świadczyć o tym, że istotne znaczenie ma konformacja aktomiozyny specyficzna dla każdego gatunku. Być może tym samym należy wytłumaczyć małą podatność ciężkiego łańcucha miozyny drobiu na żelowanie pod wpływem TGazy. Małej aktywności TGazy w mięsie drobiu, świni i wołu odpowiada powolne jego żelowanie podczas osadzania się w temp. 30°C i niewielka sprężystość żelu. Współczynnik korelacji pomiędzy aktywnością TGazy, a wytrzymałością żelu aktomiozynowego mięsa 16 gatunków ryb oraz kury, świni i wołu wynosił zaledwie 0,34–0,36, w zależności od czasu jego osadzania w temp. 30°C [22]. Różnice te świadczą o tym, że oprócz stężenia endogennej TGazy, na żelowanie rozdrobnionego mięsa podczas osadzania się mają wpływ jeszcze inne czynniki, m.in. stężenie wapnia oraz podatność białek mięśniowych na agregację i synerzę.

W mięsie karpia, sieciujące działanie TGazy dotyczy głównie ciężkiego łańcucha miozyny, który w optymalnych warunkach wiąże ponad 50% MDC. Pozostała ilość odczynnika ulega związaniu przez aktywną, troponinę T, oligomery ciężkiego łańcucha miozyny i nizidentyfikowane białka o masie cząsteczkowej 80 i 55 kDa. Tropomiozyna, troponina I, troponina C i titina są natomiast słabymi substratami reakcji sieciowania przy udziale TGazy [15]. Przypuszcza się, że na powierzchni ciężkiego łańcucha miozyny znajdują się tylko dwie łatwo dostępne grupy glutaminy. Kołakowski i wsp. [16, 17] wykazali, że częściowa hydroliza ciężkiego łańcucha miozyny ryb przez trypsynę i papainę sprzyja żelowaniu białek mięśniowych pod wpływem TGazy. Frakcja 11S białek sojowych tworzy w obecności TGazy nierozpuszczalne żele nawet przy małych stężeniach białka, natomiast produkty reakcji frakcji 7S i polimerów α_{S1} -kazeiny oraz κ -kazeiny są zwykle ciekłe przy niskich stężeniach.

Stężenie białka

Stężenie białka w substracie jest jednym z głównych czynników żelowania pod wpływem TGazy. Przy niskich stężeniach białka, TGaza powoduje zwiększenie lepkości roztworu, ale nie wywołuje żelowania. Stężenie białka niezbędne do powstawania

żelu wynosi w przypadku globulin sojowych 11S i 7S powyżej 8%, α_{s1} -kazeiny powyżej 3% [21], a białek miofibrylarnych mięsa ryb powyżej 1% [37]. Zagęszczenie białek, np. poprzez odcisnięcie lub odwirowanie, znacznie zwiększa zdolność jego żelowania.

Odczyn środowiska

Krzywa aktywności TGazy w funkcji pH ma kształt dzwonu w zakresie od pH 7,5 do 8,5, z optimum przy pH 8,0 [33]. Optymalne pH żelowania białek, katalizowanego Tgaza, zależy w znacznym stopniu od rodzaju substratu. W przypadku syntetycznych substratów, a także białka jaja i żelatyny, optymalne pH wynosi ok. 6,0, a białek mięsniowych pH ok. 7,5. Kazeina- α_{s1} , kazeinian sodu, izolaty białka sojowego i białko żółtka jaja wytwarzają najsilniejsze żele przy pH 9,0, a efektywny zakres żelowania mieści się w zakresie pH od 7,0 do 10,0. Frakcja 7S białek sojowych najszybciej żeluje w pH 6–7, słabiej w pH 8,0, a przy pH 9,0 już nie żeluje.

Temperatura

TGaza może być praktycznie wykorzystywana w stosunkowo niskiej temperaturze (5–20°C), chociaż maksymalną aktywność osiąga dopiero w temp. ok. 50°C [18]. Jednakże wydajność sieciowania białek w mięsie niektórych ryb w podwyższonej temperaturze może być mniejsza niż w niższej temperaturze, jeśli nastąpi uaktywnienie obecnych w surowcu ciepłoopornych proteinaz serynowych. Enzym pochodzenia mikrobiologicznego ma większą stabilność cieplną niż TGaza z tkanek zwierzęcych. Do związania miozyny owcy z białkiem sojowym, kazeiną lub glutenem, przy użyciu TGazy z plazmy krwi bydłowej, niezbędny czas inkubacji w temp. 4–5°C wynosi 16 h [19]. W temp. 20–40°C optymalny czas inkubacji surimi rybnego z dodatkiem TGazy wynosi 1–5 h [26]. Izolat białka sojowego, kazeinian sodu i żelatyna, inkubowane z TGazą mikrobiologiczną przez 1–4 h, tworzą najtwardsze żele w temperaturze 50°C, a białko jaja w temp. 65°C [30]. Przy sieciowaniu glicyny sojowej korzystne okazało się bardzo krótkie ogrzewanie (30–120 s) mieszaniny w temp. 100°C [14].

Jony metali

Niektóre TGazy pochodzenia roślinnego są bezwzględnie niezależne od jonów wapnia, natomiast enzymy pochodzenia mikrobiologicznego, na ogół również niezależne od Ca^{2+} , są w stosunku do pewnych substratów aktywowane jonami wapnia. TGazy zwierzęce są ściśle zależne od stężenia Ca^{2+} . Aktywująca rola jonów wapnia polega na nieznacznej zmianie konformacji cząsteczki enzymu, lecz bez sieciowania jej łańcuchów. Po związaniu Ca^{2+} cząsteczka TGazy ulega częściowej dekonformacji, zwiększając swoją długość z 3 do 3,9 nm i odsłaniając centrum aktywne. Mechanizm aktywacji jonami wapnia opisali m.in. Casadio i wsp. [5].

TGazy z płytek krwi ludzkiej i żołądka mięśniowego kury są zależne zarówno od jonów wapnia, jak i od kalmoduliny, podczas gdy TGaza z surowicy krwi jest niezależna od kalmoduliny. Tanimoto i Kinsella [33] wykazali, że kalmodulina wzmacnia aktywność TGazy tylko przy wysokich stężeniach jonów wapnia (10–100 mM).

Optymalne stężenie wapnia dla TGazy pochodzenia zwierzęcego zależy od warunków reakcji, a głównie od rodzaju substratu, stąd dane spotykane w literaturze są dość rozbieżne. Mięso większości ryb zawiera wystarczającą ilość wapnia do uaktywnienia endogennej TGazy. W mechanicznie odkostnionym mięsie stężenie wapnia może być jeszcze większe z powodu jego przedostawania się z uszkodzonych kości i ości. Przemycanie mechanicznie odkostnionego mięsa ryb nie usuwa całkowicie TGazy pomimo, że jest ona enzymem typowo cytoplazmatycznym. Po 1-krotnym przemyciu rozdrobnionego mięsa karpia buforem o pH 7,5 pozostaje ok. 50%, a po 4-krotnym ok. 7% pierwotnej aktywności TGazy. Wg Wan i wsp. [39] mrożone surimi z mintaja maksymalnie żeluje po obróbce cieplnej przy stężeniu wapnia 2–5 mM, a wg Saeki i wsp. [29] przy stężeniu 10 mM/kg. Jabłonowska [11] wykazała, że siła żelowania rozdrobnionego mięsa z leszcza, parowanego po rozmrożeniu, wzrastała ze stężeniem Ca^{2+} w zakresie do 15 mM/kg, po czym malała w miarę dalszego wzrostu stężenia aż do 100 mM/kg. Te rozbieżności dotyczące wpływu dodatku wapnia na aktywność TGazy, można prawdopodobnie tłumaczyć gatunkowymi różnicami w konformacji miozyny poszczególnych zwierząt. Potwierdzeniem tego przypuszczenia może być bardzo zróżnicowany wzrost aktywności TGazy mięsa ryb niektórych gatunków po dodaniu 0,1% CaCl_2 . W mięsie sardynki o bardzo wysokiej aktywności endogennej TGazy (powyżej 2,5 jednostek/g mięsa) wzrost aktywności spowodowany dodatkiem jonów wapnia wynosił tylko ok. 7%, podczas gdy w mięsie karpia o małej aktywności enzymu ok. 45%, a pacyficznej makreli o średniej aktywności TGazy był ponad 5-krotny [36]. Ogólnie można więc przyjąć, że optymalne stężenie Ca^{2+} do uaktywnienia TGazy zwierzęcej wynosi 5–10 mM, w zależności od rodzaju substratu białkowego.

Z innych metali dwuwartościowych znaczny wpływ aktywujący na TGazę zwierzęcą wywiera Sr^{2+} , a nieznaczny Mn^{2+} , natomiast Mg^{2+} nie wpływa na jej aktywność.

TGaza pochodzenia mikrobiologicznego jest silnie inhibowana przez Zn^{2+} , Cu^{2+} i Pb^{2+} wiążące się z grupą tiolową w centrum aktywnym enzymu [3, 35].

Chlorek sodu przy niewielkich stężeniach zwykle zwiększa, a przy dużych stężeniach zmniejsza aktywność TGazy, przy czym jego działanie zależy od rodzaju substratu. W stosunku do acetylowanej kazeiny aktywność enzymu nie zmienia się w funkcji stężenia NaCl, natomiast w stosunku do miozyny ryb wzrasta ze stężeniem NaCl zwykle do ok. 0,4 M, a aktywność i troponiny T do 0,6–0,7 M [15]. Chlorek sodu ułatwia również sieciowanie subfragmentów i polimerów ciężkiego łańcucha miozyny. Najtwardsze żele z surimi traktowanego TGazą uzyskuje się przy stężeniu 0,2–0,4 M NaCl [40]. Może to oznaczać, że rozpuszczone lub częściowo rozpuszczone białko

miofibrilarnie jest bardziej dostępnym substratem dla TGazy niż w stanie naturalnym. Jednak chlorek potasu, który w podanych stężeniach również zwiększa rozpuszczalność białek miofibrilarnych podobnie jak chlorek sodu, nie powoduje zwiększenia wydajności reakcji sieciowania, a nawet zmniejsza sprężystość żelu aktomiozynowego. Zauważono również, że KCl w stężeniu 0,1–0,4 M wyraźnie hamuje sieciowanie ciężkiego łańcucha miozyny katalizowane TGazą podczas osadzania się surimi, natomiast niewielki efekt katalizujący przy wyższych stężeniach KCl (ok. 0,8 M) wiąże się raczej z sieciowaniem białek o masie cząsteczkowej ok. 80 kDa [40].

Inhibitory TGazy

Aktywność Ca^{2+} – zależnej TGazy wyraźnie hamują związki wiążące jony wapnia, które nie mają praktycznie żadnego wpływu na aktywność enzymu pochodzenia mikrobiologicznego. Oba enzymy są natomiast inhibowane przez substancje blokujące wolne grupy aminowe w substracie białkowym. Wyraźne hamowanie aktywności obu rodzajów TGaz przez związki tiolowe świadczy o tym, że niezależnie od pochodzenia, w centrum aktywnym tych enzymów występuje cysteina.

Chlorek amonu wyraźnie obniża aktywność Ca^{2+} – zależnej TGazy już w małych stężeniach (0,1–0,2 M). Chlorek metylaminy także wyraźnie hamuje aktywność TGazy [24]. Inhibujące działanie chlorowodoru lizyny na TGazę pochodzenia zwierzęcego, opisane przez Kamath [13], nie potwierdziło się w naszych badaniach, dotyczących teksturowania farszów rybnych metodą kierunkowego zamrażania [17]. Otrzymano nawet wręcz przeciwne rezultaty, świadczące o katalizującym działaniu chlorowodoru lizyny na sieciowanie białek. Mięso niektórych ryb, mało przydatnych do wytwarzania szynki rybnych w rodzaju *kamaboko*, np. kety, zawiera dużo anseryny, która zapobiega sieciowaniu aktomiozyny przy udziale endogennej TGazy. Aktywność niektórych TGaz ulega zmniejszeniu w obecności guanozynotrifosforanu już w bardzo małych stężeniach. Niekorzystny wpływ na żelowanie białek ryb wywiera również dodatek niektórych białek pszenicy i soi.

Biologiczna wartość białek modyfikowanych przy użyciu TGazy

Sieciujące wiązania izopeptydowe powstają w białkach przy udziale endogennej TGazy w wielu produktach żywnościowych, szczególnie rybnych. Od dawna wiadomo, że tworzą się one m. in. w mięsie suszonych ryb, wpływając istotnie na reologiczne właściwości wyrobów. Wiązania glutaminowo-lizynowe wytworzone przy udziale TGazy są *in vivo* łatwo i całkowicie rozszczepiane w przewodzie pokarmowym, a ich wpływ na przyswajalność białek jest żaden lub tylko marginalny. Normalną dostępność reszty lizyny związanej izopeptydowo potwierdzono także w pracach żywieniowych na szczurach [28]. Enzymem odpowiedzialnym za hydrolizę wiązań izopepty-

dowych, zarówno w wolnych peptydach jak i usieciowanych w białku, jest γ -glutamino-cyklotransferaza [7].

Zastosowania TGazy

Zastosowanie TGazy rozwiązuje wiele problemów technologicznych związanych z otrzymywaniem żeli białkowych. Białka, które nie żelują po obróbce cieplnej lub nie tworzą żelu o wymaganych właściwościach reologicznych mogą być zżelowane przy użyciu TGazy. Również żele wykazujące tendencję do topnienia mogą być pozbawione takich wad przez enzymatyczne sieciowanie. Lista zastosowań TGazy w przemyśle żywnościowym wciąż się wydłuża. TGaza okazała się przydatną do sieciowania białek sojowych, kazeiny i innych białek mleka, glutenu, białek mięsa ryb, wołowiny i innych białek produktów żywnościowych.

Przy wytwarzaniu szynki rybnych typu *kamaboko* wykorzystuje się zjawisko spontanicznego żelowania rozdrobnionego mięsa ryb, zawierającego 2–4% soli, w temperaturze 4–40°C w okresie kilkugodzinnego osadzania. W tym czasie zachodzi w nasolonym farszu sieciowanie ciężkich łańcuchów miozyny przy udziale endogennej TGazy. Żele, otrzymane po obróbce cieplnej z takiego farszu, są bardziej sprężyste niż produkty wytworzone z pominięciem osadzania. Mięso ryb z wielu mało wykorzystanych gatunków ma zbyt małą zdolność żelowania i w związku z tym nie jest przydatne do wytwarzania szynki rybnych. Dodając do surimi z takiego surowca substancji redukujących celem zniszczenia mostków disulfidowych w miozynie, inhibitorów proteinaz cysteinowych celem zapobieżenia osłabianiu żelu wskutek hydrolizy białek oraz TGazy pochodzenia mikrobiologicznego celem wytworzenia pożądanych wiązań sieciujących, można uzyskać żele o postulowanych właściwościach reologicznych [12]. Mikrobiologiczną TGazę zastosowano m.in. do żelowania pasty z kryła antarktycznego [38], do wytwarzania szynki rybnych z rozdrobnionego mięsa mintaja [9], otrzymywania analogów płetw rekina z żelatyny, kolagenu lub mieszaniny tych białek [32] oraz spulchniania pieczywa [8]. Inkubowanie mleka z TGazą zwiększa wytrzymałość mechaniczną jogurtu wytwarzanego z tego mleka lub z proszku mlecznego [10, 20]. W wyniku 150 minutowego działania enzymu w stężeniu 3 jednostek/g białka, w temp. 40°C powstają wyłącznie międzycząsteczkowe wiązania izopeptydowe w kazeinie, a wytrzymałość jogurtu zwiększa się ok. dwukrotnie. Reologiczne właściwości żeli uzyskanych przy udziale TGazy zależą m. in. od kształtu sieciowanych cząsteczek lub podjednostek białkowych. Sieciowanie liniowych polimerów prowadzi do powstawania twardych, sprężystych żeli, a małych agregatów glicyniny sojowej do miękkich, lepkich galaretek [14]. Przyłączenie fragmentów glikozylowych do legumin grochu i gliadyn pszenicy zwiększa rozpuszczalność tych białek w punkcie izoelektrycznym. Wydajność reakcji zwiększa się przez uprzednie zablokowanie w substratach wolnych grup aminowych [6]. Firma Novo Nordisk A/S proponuje zastosowanie TGazy do

produkcji zamienników tłuszczu, wytwarzanych z enzymatycznie modyfikowanej żelatyny, kazeiny, białek serwatki i białek ryb. Zamienniki te można dodawać do kremów, deserów, dresingów, majonezu, a także do szynki i wędlin z mięsa zwierząt rzeźnych i ryb.

Zastosowanie TGazy umożliwia łączenie surowców białkowych w kombinacje bardziej wartościowe pod względem żywieniowym i użytkowym. Mniej cenne mięsa mogą być łączone z glutenem lub z kazeiną, tworząc odpowiednio spoiste bloki, nawet w stosunkowo niskiej temperaturze (4–5°C) przez pozostawienie masy na noc. Duże nadzieje upatruje się w wykorzystaniu TGazy do uzupełniania właściwości żywieniowych niepełnowartościowych białek poprzez wbudowywanie do nich odpowiednich aminokwasów i peptydów. Proponuje się również wykorzystanie enzymu do blokowania alergennych, opornych na proteolizę, peptydów w białkach sojowych [4].

Obecnie istnieje duże zainteresowanie biodegradowalnymi błonami z mniej cennych surowców pochodzenia rolniczego. Prowadzone badania dotyczą przede wszystkim poznania zależności pomiędzy strukturą, a właściwościami błon oraz czynników, umożliwiających otrzymywanie z danych surowców błon o wymaganej wytrzymałości mechanicznej, pożądanej przepuszczalności pary wodnej i gazów oraz określonej odporności na warunki środowiska. Jest wiele możliwości zastosowania takich błon - jako nośniki enzymów, a także jako materiały opakowaniowe do świeżych owoców i warzyw oraz różnych, przetworzonych produktów żywnościowych. Wytwarzanie błon białkowych polega zazwyczaj na stworzeniu warunków sprzyjających denaturacji białka, a następnie utworzeniu odpowiednich wiązań sieciujących, odpowiedzialnych za funkcjonalne właściwości błon. Sieciowanie błon białkowych przeprowadza się w wielu przypadkach przy użyciu transglutaminazy [41].

LITERATURA

- [1] Araki H., Seki N.: Comparison of reactivity of transglutaminase to various fish actomyosins. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **59**, 1993, 711.
- [2] Ashie I.N.A., Lanier T.C.: High pressure effects on gelation of surimi and turkey breast muscle enhanced by microbial transglutaminase. *J. Food Sci.*, **64**, 1999, 704.
- [3] Ashie I.N.A., Lanier T.C.: Transglutaminases in seafood processing. In: *Seafood Enzymes. Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. N. F. Haard and B. K. Simpson, eds, Marcel Dekker, New York and Basel, 2000, pp. 147.
- [4] Babiker E.F.E., Matsudomi N., Kato A.: Masking of antigen structure of soybean protein by conjugation with polysaccharide and cross-linkage with microbial transglutaminase. *Nahrung*, **42**, 1998, 158.
- [5] Casadio R., Polverini E., Mariani P., Spinozzi F., Carsughi F., Fontana A., Polverino de Laureto P., Matteucci G., Bergamini C.M.: The structural basis for the regulation of tissue transglutaminase. *Eur. J. Biochem.*, **262**, 1999, 672.

- [6] Colas B., Caer D., Fournier E.: Transglutaminase-catalysed glycosylation of vegetable proteins. Effect on solubility of pea legumin and wheat gliadins. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1993, 1811.
- [7] Fink M.L., Chung S.I., Folk J.E.: γ -Glutamylamine cyclotransferase: specificity toward ϵ -(L- γ -glutamyl)-L-lysine and related compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 1980, 4564.
- [8] Gerrard J.A., Newberry M.P., Ross M., Wilson A.J., Fayle S.E., Kavale S.: Pastry lift and croissant volume as affected by microbial transglutaminase. *J. Food Sci.*, **65**, 2000, 312.
- [9] Ichihara Y., Wakameda A., Motoki M.: Fish meat paste products containing transglutaminase and their manufacture. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, J.P. 02186961, 1990.
- [10] Imm J.Y., Lian P., Lee C.M.: Gelation and water binding properties of transglutaminase-treated skim milk powder. *J. Food Sci.*, **65**, 2000, 200.
- [11] Jabłonowska I.: Wpływ czynników technologicznych na teksturowanie rozdrobnionego mięsa z leszcza metodą kierunkowego zamrażania. Praca doktorska. Akademia Rolnicza w Szczecinie, 2000.
- [12] Jiang S.T., Hsieh J.E., Ho M.I., Chung Y.C.: Combination effects of microbial transglutaminase, reducing agent, and protease inhibitor on the quality of hairtail surimi. *J. Food Sci.*, **65**, 2000, 241.
- [13] Kamath M.: Investigation of physicochemical basis for the unique „setting” phenomenon of Alaska pollock and Atlantic croaker surimi. Ph.D. Thesis. North Carolina State University. Raleigh, 1990, p. 113.
- [14] Kang I.J., Matsumura Y., Ikura K., Motoki M., Sakamoto H., Mori T.: Gelation and gel properties of soybean glycinin in a transglutaminase-catalyzed system. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1994, 159.
- [15] Kishi H., Nozawa H., Seki N.: Reactivity of muscle transglutaminase on carp myofibrils and myosin B. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **57**, 1991, 1203.
- [16] Kołakowski E., Wianecki M., Bortnowska G., Bednarczyk B.: Use of proteolytic enzymes to improve freeze texturization of minced fish. W: Book of Abstracts. 19th Intern. Congress of Refrigeration, The Hague, The Netherlands, August 20-25, 1995, 56.
- [17] Kołakowski E., Wianecki M., Bortnowska G., Jarosz R.: Trypsin treatment to improve freeze texturization of minced bream. *J. Food Sci.*, **62**, 1997, 737.
- [18] Kumazawa Y., Nakanishi K., Yasueda H., Motoki M.: Purification and characterization of transglutaminase from Walleye Pollack liver. *Fisheries Sci.*, **62**, 1996, 959.
- [19] Kurth L., Rogers P.J.: Transglutaminase catalyzed cross-linking of myosin to soya protein, casein and gluten. *J. Food Sci.*, **49**, 1984, 573.
- [20] Lauber S., Henle T., Klostermeyer H.: Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *Eur. Food Res. Technol.*, **210**, 2000, 305.
- [21] Nio N., Motoki M., Takinami K.: Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1985, 2283.
- [22] Niwa E., Suzumura T., Nowsad AKM A., Kanoh S.: Setting of actomyosin paste containing few amount of transglutaminase. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **59**, 1993, 2043.
- [23] Nonaka M., Sakamoto H., Toiguchi S., Kawajiri H., Soeda T., Motoki M.: Sodium caseinate and skim milk gels formed by incubation with microbial transglutaminase. *J. Food Sci.*, **57**, 1992, 1214, 1241.
- [24] Nowsad A. AKM., Kanoh S., Niwa E.: Effects of amine salts on the elasticity of suwari gel from Alaska pollock. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **59**, 1993, 1017.
- [25] Nowsad A. AKM., Kanoh S., Niwa E.: Setting of transglutaminase-free actomyosin paste prepared from Alaska pollock surimi. *Fisheries Sci.*, **60**, 1994, 295.
- [26] Nowsad A. AKM., Katoh E., Kanoh S., Niwa E., 1996. Contribution of transglutaminase to the setting of fish pastes at various temperatures. *Fisheries Sci.*, **62**, 94.
- [27] Nury S., Meunier J.C., Mouranche A.: The kinetics of the thermal deactivation of transglutaminase from guinea-pig liver. *Eur. J. Biochem.*, **180**, 1989, 161.

- [28] Raczyński G., Snochowski M., Buraczewski S.: Metabolism of ϵ -(γ -L-glutamyl)-L-lysine in the rats. *Br. J. Nutr.*, **34**, 1975, 291.
- [29] Saeki H., Shoji T., Hirata F., Nonaka M., Arai K.: Effect of CaCl_2 on gel forming ability and cross-linking reaction of myosin heavy chain in salt-ground meat of shipjack tuna, carp, and walleye pollock. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **58**, 1992, 2137.
- [30] Sakamoto H., Kumazawa Y., Motoki M.: Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. *J. Food Sci.*, **59**, 1994, 866.
- [31] Sarkar N.K., Clarke D.D., Waelsch H.: Enzymatically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochem. Biophys. Acta*, **25**, 1957, 451.
- [32] Tani T., Iwamoto K., Motoki M., Toiguchi S.: Manufacture of shark fin imitation food. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, J.P. 02171160, 1990.
- [33] Tanimoto S.Y., Kinsella J.E.: Enzymatic modification of proteins: effects of transglutaminase cross-linking on some physical properties of β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1988, 281.
- [34] Traoré F., Meunier J.-C.: Cross-linking activity of placental F XIIIa on whey proteins and caseins. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1992, 399.
- [35] Tsai G.-J., Lin S.-M., Jiang S.-T.: Transglutaminase from *Streptovercillium ladakanum* and application to minced fish product. *J. Food Sci.*, **61**, 1996, 1234.
- [36] Tsukamasa Y., Shimizu Y.: Factors affecting the transglutaminase-associated setting phenomenon in fish meat sol. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **57**, 1991, 535.
- [37] Tsukamasa Y., Sato K., Shimizu Y., Imai Ch., Sugiyama M., Minegishi Y., Kawabata M.: ϵ -(γ -Glutamyl)lysine crosslink formation in sardine myofibril sol during setting at 25°C. *J. Food Sci.*, **58**, 1993, 785.
- [38] Wakameda A., Ichihara Y., Motoki M.: Transglutaminase-containing krill meat paste and its manufacture. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, J.P. 02100654, 1990.
- [39] Wan J., Kimura I., Satake M., Seki N.: Effect of calcium ion concentration on the gelling properties and transglutaminase activity of walleye pollock surimi paste. *Fisheries Sci.*, **60**, 1994, 107.
- [40] Wan J., Miura J., Seki N.: Effect of monovalent cations on cross-linking of myosin heavy chain in suwari gel from walleye pollack. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **58**, 1992, 583.
- [41] Yildirim M., Hettiarachchy N.S.: Biopolymers produced by cross-linking soybean 11S globulin with whey proteins using transglutaminase. *J. Food Sci.*, **62**, 1997, 270.

TRANSGLUTAMINASE AND ITS APPLICATIONS IN FOOD INDUSTRY

S u m m a r y

A description of incidence and properties of transglutaminase (EC 2.3.2.13) {TGase} is given, with including of different catalytic or inhibitory factors effecting of protein crosslinking phenomenon. The main applications of TGase in food industry and biological value of proteins modified by this enzyme are presented. ☒