DOI:10.12441/spyswjs.20250506001 [文章编号] 1673-1689(2026)03-0011-12

转谷氨酰胺酶-多孔淀粉复合体系的制备与稳定性分析

张 莹[1,2] 缪 铭[1,2*]

(1. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】探究酶固定化策略对转谷氨酰胺酶(transglutaminase,TGase)热稳定性、pH适应性及储藏稳定性的影响,拓展其在食品工业等领域的应用范围。【方法】以酶法改性制备的多孔淀粉(porous starch,PS)为载体固定化TGase,采用响应面法优化固定化工艺,通过傅里叶变换红外光谱、差示扫描量热仪和酶学性质试验对TGase-PS复合体系进行结构表征及性能测试。【结果】最佳固定化条件为:PS质量分数12%、pH 7、TGase体积分数42%,TGase包埋率达73.93%。酶固定化显著提升了TGase的热稳定性、pH稳定性和储藏稳定性,TGase-PS复合体系在50 ℃保温1 h后的相对酶活力为69.99%(为游离TGase的3.41倍);25 ℃储存14 d后,其相对酶活力为71.01%(为游离TGase的1.84倍),在极端pH为10条件下放置2 h后相对酶活力仍达81.20%。【结论】该研究通过构建TGase-PS复合体系显著提升了TGase的稳定性,为TGase在高温或极端pH环境下的连续催化应用提供了高效、绿色的解决方案。

关键词:转谷氨酰胺酶;多孔淀粉;固定化;稳定性

Preparation and Stability Analysis of a Transglutaminase-porous Starch Composite System

ZHANG Ying[1,2] *MIAO Ming*[1,2*]

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aimed to investigate the impacts of enzymatic immobilization strategies on the thermal stability, pH tolerance, and storage stability of transglutaminase (TGase), thereby extending its application range in the food industry and related sectors. [**Method**] Porous starch (PS), prepared by enzymatic modification, was used as a carrier to immobilize TGase. The immobilization process was optimized by response surface methodology. Fourier transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, and enzymatic property experiments were employed to characterize the structure and test the performance of the TGase-PS composite system. [**Result**] Under optimal conditions (PS at a mass fraction of 12%, pH 7, and TGase at a volume fraction of 42%), the encapsulation efficiency of TGase was 73.93%. Immobilization significantly improved the thermal stability, pH stability, and storage stability of TGase. The TGase-PS composite system retained the relative activity of 69.99% (3.41 times that of free TGase) after incubation at 50 ℃ for 1 h. After 14 d of storage at 25 ℃, its relative activity was 71.01% (1.84 times that of free TGase). Furthermore, the relative activity was still 81.20% after the system was placed under pH 10 for 2 h. [**Conclusion**] This study significantly enhanced the stability of TGase by constructing a TGase-PS composite system, providing an efficient and green

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2022YFF1100101)。

通信作者:缪铭(1980—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事淀粉结构与功能调控设计研究。E-mail:miaoming@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2025-05-06 **修回日期:**2025-06-16

solution for the continuous catalytic application of TGase under high temperatures or extreme pH conditions.
Keywords: transglutaminase; porous starch; immobilization; stability

转谷氨酰胺酶（transglutaminase，TGase），即谷氨酰胺转氨酶（EC 2.3.2.13），属于转移酶家族[1]，可催化谷氨酰胺残基γ-羧酰胺基（酰基供体）与伯胺类化合物（酰基受体）的酰基转移反应[2]。TGase可催化蛋白质分子间和分子内共价键的形成，由此产生的共价交联可改变蛋白质的物理和化学性质[3]。TGase因其独特的蛋白质交联能力，在食品、医药、生物材料等多个工业领域得到广泛应用，尤其在食品加工中，其主要用于改善蛋白质的结构、增强食品的稳定性和提升产品的感官品质[4-6]。然而，TGase在高温和极端pH条件下容易失活，且重复利用率较低，导致其难以维持稳定的酶活力，难以满足工业化生产要求[7-9]。酶固定化是目前工业上提高酶热稳定性有效且应用广泛的策略之一。Shi等[10]采用UV诱导接枝将交联结晶型TGase固定在聚丙烯微孔膜上；Fatima等[11]将TGase固定于多壁碳纳米管上，显著增强了TGase的热稳定性和重复利用能力。酶固定化技术已在诸多研究中成功用于提高TGase的热稳定性和操作稳定性，为其在食品工业中的推广应用提供了有力支撑。不同的载体材料会直接影响固定化效果，因此选择合适的载体对提高TGase稳定性至关重要。

多孔淀粉（porous starch，PS）是一种通过对天然淀粉进行物理、化学或酶法改性处理后，在淀粉颗粒表面和内部形成大量孔洞结构的新型功能性淀粉材料[12]。PS具有高生物相容性、可生物降解性、高安全性及低成本优势[13]，使其能够作为益生菌、多酚类化合物、风味物质等多种活性物质的高效载体，广泛应用于食品、生物医药、化妆品等领域[14-17]。相较于传统载体，PS不仅具备生物相容性、可降解性和低成本优势，还可以通过保护酶活性位点和控制释放，有效增强酶在复杂环境中的稳定性[18]。这对于降低酶的使用成本、减少保护剂的添加量以及实现酶的工业化连续生产具有重要意义，同时符合现代绿色工业与可持续发展的理念。目前以PS作为酶载体的相关研究较少，但其在提高酶稳定性、延长使用寿命及降低工业成本方面的潜力已受到广泛关注[19-20]。

为了解决TGase在食品加工过程中的热稳定性、pH稳定性较差的问题，作者以PS为载体，制备TGase-PS复合体系。通过调控加酶量和反应时间制备不同孔隙结构的PS，然后制备TGase-PS复合体系，将TGase负载于高比表面积、孔道结构可调控的PS上，进而探究不同因素对TGase-PS复合体系中TGase包埋率的影响，开展制备工艺优化，最后对TGase-PS复合体系进行表征及稳定性分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

糖化酶（100 000 U/g）：上海源叶生物科技有限公司；醋酸钠、无水乙醇、三氯乙酸、考马斯亮蓝G250、牛血清白蛋白：国药集团化学试剂有限公司；转谷氨酰胺酶：江苏一鸣生物科技有限公司；盐酸羟胺：北京伊诺凯科技有限公司；还原型谷胱甘肽：北京沃凯生物科技有限公司；$FeCl_3·6H_2O$：上海泰坦科技股份有限公司；*L*-谷氨酸γ-单异羟肟酸、三羟甲基氨基甲烷、*N*-α-CBZ-Gln-Gly：德国Sigma-Aldrich试剂公司；其他试剂：上海麦克林生化科技股份有限公司。以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

冷场发射扫描电子显微镜：SU6700型，日本株式会社日立高新技术公司；傅里叶变换红外光谱仪：Antaris II型，美国Thermo Fisher Scientific公司；台式冷冻型离心机：Sorvall ST16R型，美国Thermo Fisher Scientific公司；多功能酶标仪：SpectraMax M2型，美国Molecular Devices公司；热重分析仪：TGA/DSC 3+型，瑞士Mettler Toledo公司。

1.3 方法

1.3.1 PS的制备

参照Han等[12]的方法制备PS并稍加调整。在25 g天然玉米淀粉（native starch，NS）中加入100 g醋酸钠缓冲液（0.1 mol/L，pH 5.2），制备质量分数25%的淀粉悬浮液。将淀粉悬浮液置于恒温酶反应器中，50 ℃磁力搅拌保温10 min。然后向淀粉悬浮液中分别加入200、400、600 U/g糖化酶（amyloglucosidase，AMG），在50 ℃下分别反应4、8、12 h。根据不同的酶解条件，PS样品分别命名

为PS 2-4、PS 2-8、PS 2-12、PS 4-4、PS 4-8、PS 4-12、PS 6-4、PS 6-8和PS 6-12。反应后快速加入15 mL体积分数95%的乙醇使酶失活，然后将淀粉-酶悬浮液于20 ℃、2 600 *g*离心10 min，倒去上清液，收集含有淀粉的沉淀物，45 ℃干燥36 h，研磨干燥后的淀粉样品并储存在干燥器中。

1.3.2　扫描电子显微镜

将干燥后的NS和PS样品通过黑色胶带固定在铜样品台上，在真空条件下进行镀金处理，使用扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM）在5 kV的加速电压下观察淀粉样品的微观结构，于5 000倍放大倍数下拍摄样品照片。

1.3.3　TGase-PS复合体系的制备

将NS和1.3.1中制备的多种PS样品配制成质量分数为12%的淀粉溶液，搅拌均匀，超声10 min使淀粉完全分散。在搅拌条件下，向淀粉溶液中缓慢加入体积分数50%的TGase酶液，调节体系pH至7，在4 ℃磁力搅拌2 h后于冰浴中超声20 min，得到TGase淀粉复合溶液。将溶液在4 ℃、2 600 *g*离心10 min，收集沉淀，将沉淀样品于-80 ℃冻干，得到TGase-PS复合体系，将其储存在4 ℃冰箱中。

1.3.4　TGase包埋率的测定

称取适量冻干TGase-PS复合体系样品，加入磷酸盐缓冲液，使用高速剪切机高速（10 000 r/min）剪切3 min，将TGase-PS复合体系中的TGase全部释放，在4 ℃条件下于5 000 *g*离心10 min。采用Bradford法测定体系蛋白质质量浓度，使用BSA标准溶液绘制标准曲线。根据标准曲线计算TGase质量，根据式（1）计算包埋率。

$$E=\frac{M_E}{M_F}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

E——TGase-PS复合体系中TGase的包埋率，%；

M_E——TGase-PS复合体系中TGase的质量，mg；

M_F——加入TGase的总质量，mg。

1.3.5　TGase-PS复合体系制备的条件优化

在淀粉质量分数12%、pH 7、TGase体积分数50%的条件下，分别考察在不同淀粉质量分数（6%、8%、10%、12%、14%、16%）、pH（5、6、7、8、9、10）、TGase体积分数（20%、30%、40%、50%、60%、70%）条件下，TGase-PS复合体系中TGase包埋率的变化。根据单因素试验结果，采用Box-Behnken设计响应面优化试验，以确定实现TGase-PS复合体系中最大TGase包埋率的最优工艺参数。

1.3.6　傅里叶变换红外光谱测定

所有光谱数据均使用配备ATR附件的傅里叶变换红外光谱仪（Fourier transform infrared spectrometer，FTIR）采集。将样品夹在金刚石晶体上进行分析。测定条件：扫描波数4 000~600 cm^{-1}，分辨率4 cm^{-1}，扫描次数32次。每次扫描时，通过扣除空气背景光谱获取样品特征光谱。

1.3.7　差式扫描量热法

使用差式扫描量热法（differential scanning calorimetry，DSC）测定TGase、PS和TGase-PS复合体系样品的综合特性。准确称量5 mg样品置于坩埚中，测定条件：升温范围30~200 ℃，升温速率10 ℃/min。

1.3.8　TGase活性测定

参照Shi等[10]的方法，采用催化*N*-*α*-CBZ-Gln-Gly底物形成羟肟酸的方法测定TGase活性。配制A试剂：0.2 mol/L Tris-HCl缓冲液（pH 6.0）、0.1 mol/L盐酸羟胺、0.01 mol/L还原型谷胱甘肽和0.03 mol/L *N*-*α*-CBZ-Gln-Gly的混合溶液；B试剂：3 mol/L HCl、120 g/L三氯乙酸与溶解于0.1 mol/L HCl中的50 g/L $FeCl_3\cdot 6H_2O$等体积混合。反应体系含1 mL A试剂和0.2 mL TGase酶液，37 ℃孵育10 min后，加入1 mL B试剂终止反应。在25 ℃、5 000 *g*离心5 min，取上清液，测定525 nm的吸光度。以*L*-谷氨酸*γ*-单异羟肟酸标准曲线对TGase活性进行定量，1个酶活力单位（U）指37 ℃条件下每分钟催化1.0 μmol底物（*N*-*α*-CBZ-Gln-Gly）转化生成1.0 μmol/L谷氨酸*γ*-单异羟肟酸所需的酶量。

1.3.9　TGase-PS复合体系稳定性分析

1）反应最适温度及热稳定性：在Tris-HCl缓冲液（0.2 mol/L，pH 6.0）体系下，分别在不同温度（30、35、40、45、50、55、60、65 ℃）下测定TGase活性，确定酶的最适反应温度。在pH 6.0条件下，将酶液分别在不同温度（30、35、40、45、50、55、60、65 ℃）下保温1 h，以未保温处理的TGase酶液酶活力为100%，计算相对酶活力，测定酶的热稳定性。

2）反应最适pH及pH稳定性：在37 ℃反应温度下，分别在不同pH（3、4、5、6、7、8、9、10）的Tris-HCl缓冲液（0.2 mol/L）体系中测定TGase活性，确定

酶的最适反应pH。将TGase分别在不同pH（3、4、5、6、7、8、9、10）的缓冲液中保存2 h，以未处理的TGase酶液酶活力为100%，计算相对酶活力，测定TGase的pH稳定性。

3）储存稳定性：将游离TGase和TGase-PS复合体系分别置于4、25 ℃下储存，并在14 d内测定其活性。以初始酶液酶活力为100%，计算相对酶活力，测定TGase的储存稳定性。

4）TGase-PS复合体系热失活动力学：在pH 6.0的0.2 mol/L Tris-HCl缓冲液中，探究TGase在不同温度（40、50、60 ℃）下的热稳定性。样品在适当的时间段内保温，分别在10、20、30、60、100、120 min时取等量样品，以未处理样品的酶活力为100%，测定相对酶活力（A）。以ln A为纵坐标、时间为横坐标，绘制拟合曲线，将指数衰减的失活过程转化为线性关系。TGase失活遵循一级动力学反应，根据拟合曲线，计算酶失活反应速率常数k和酶的半衰期。酶半衰期是指酶活力下降50%所需的时间，半衰期越长，说明酶的稳定性越好。

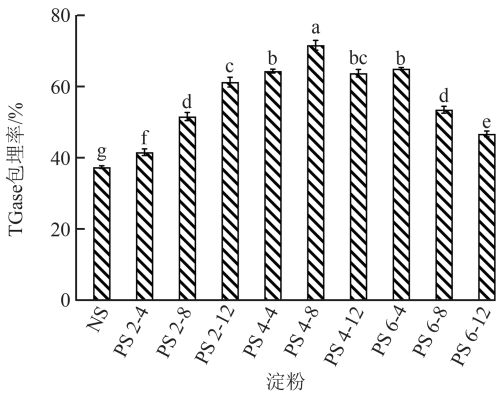
1.4 数据处理

所有的试验均经过3次及以上重复，试验结果以平均值±标准偏差形式表示。试验数据采用SPSS软件进行单因素方差分析（P<0.05）。使用GraphPad Prism 10.2软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 不同淀粉对TGase-淀粉复合体系中TGase包埋率的影响

如图1所示，不同淀粉体系对TGase-淀粉复合体系中TGase包埋率产生了显著影响，其核心机制与酶解程度调控的孔隙结构及颗粒完整性密切相关。NS及PS的表面结构特性见图2。NS因其表面光滑、孔隙结构少[21]，限制了对TGase的吸附，包埋率仅为37.32%。相比之下，经AMG酶解后的PS的TGase包埋率升高，其中酶解适度的PS 4-8的TGase包埋率（71.48%）最高。酶解处理的PS形成了规整的孔隙结构，使其与TGase分子尺寸匹配，为TGase提供了稳定的包埋空间。相比之下，酶解程度不足的PS 2-4和PS 2-8由于孔隙数量或深度有限，导致负载空间不足；而PS 6-12的孔隙虽然较多，但由SEM图可以看出，过度酶解会使PS颗粒结构坍塌，骨架的支撑能力丧失[22]，进而导致其包埋空间和稳定性下降，使其TGase包埋率下降至46.62%。研究表明，优化酶解条件需要平衡孔隙生成与结构完整性的关系，通过精准调控孔隙与TGase尺寸的适配性及骨架稳定性，可进一步提升酶的固定化效率，拓展TGase-淀粉复合体系的应用潜力。



图中不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

图1 不同淀粉对TGase包埋率的影响

Fig. 1 Effects of various starch on the encapsulation efficiency of TGase

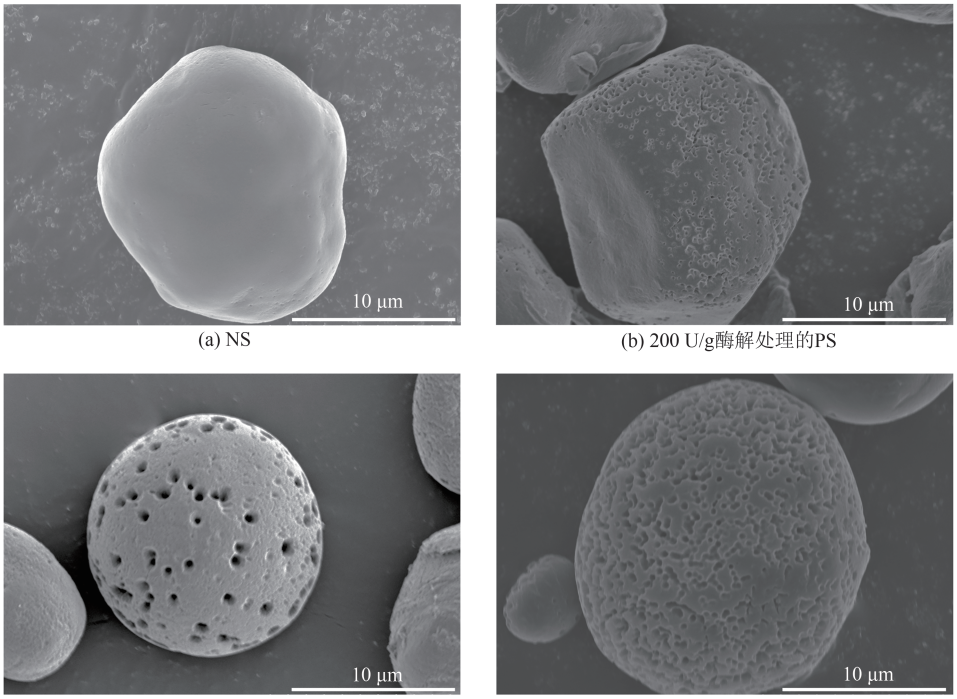
2.2 单因素试验分析

2.2.1 PS质量分数对TGase包埋率的影响

从图3（a）可知，PS质量分数对TGase-PS复合体系TGase包埋率的影响显著。当PS质量分数由6%提升至12%时，TGase包埋率明显增加，最大值达70.97%；当PS质量分数超过12%时，TGase包埋率呈下降趋势。这可能是因为适度提高PS质量分数可增加接触面积与负载空间，促进了TGase的包埋；但PS质量分数过高会增加体系黏度，阻碍酶分子的扩散与传质，导致TGase包埋率下降。当PS质量分数为6%~12%时，对TGase包埋率的提升效果显著，过度提高PS质量分数不仅会导致TGase包埋率下降，还可能造成载体浪费，并增加工艺的操作复杂性。因此，PS质量分数12%可作为工艺优化基准值，在保证经济性的同时，也为后续通过精细化调控进一步提升TGase包埋率提供了可行方案。

2.2.2 pH对TGase包埋率的影响

如图3（b）所示，pH对TGase-PS复合体系的TGase包埋率有明显影响。当体系pH由5升至7时，TGase包埋率显著增加；当pH为7时，TGase包埋率达到最大值（72.69%）；当pH>7时，TGase包



(a) NS　(b) 200 U/g酶解处理的PS　(c) 400 U/g酶解处理的PS　(d) 600 U/g酶解处理的PS

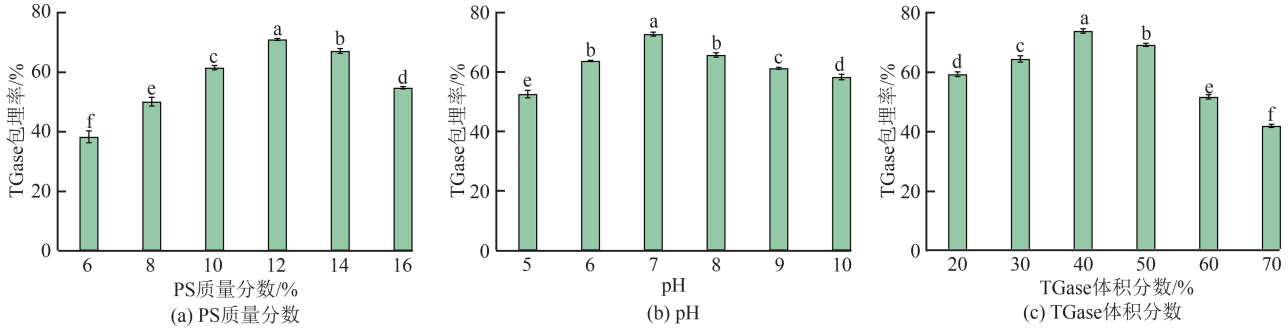
图2　NS和PS的SEM图

Fig. 2　SEM images of NS and PS

埋率随pH升高显著下降。其原因在于TGase与PS的表面电荷相互作用，PS表面带负电，当pH约为7时，TGase通常带正电，可与PS产生较强的静电吸附，促进了酶分子在载体孔隙中的高效固定[23-24]；在低pH条件下，尽管TGase正电荷增多，但大量H^+会中和PS表面的负电荷，削弱吸附驱动力；而当pH增大到超过TGase的等电点（本研究中测定的结果为7.6）时，TGase带负电，酶和载体间的电荷斥力增加，导致酶构象变化及结合效率降低。因此，当体系pH为7时，电荷协同效应既能维持酶活力与结构稳定，也能实现包埋效率最大化。

2.2.3　TGase体积分数对TGase包埋率的影响

如图3（c）所示，TGase体积分数对TGase-PS复合体系TGase包埋率影响显著。TGase-PS复合体系包埋率随TGase体积分数增加呈先升高后降低的趋势。当TGase体积分数由20%增至40%时，TGase包埋率升至峰值（73.89%）；当TGase体积分数继续提升至70%时，TGase包埋率相较于峰值下降了31.83%。这说明当TGase体积分数较低时，PS具备充足的负载空间和接触面积来保持较高的TGase包埋率；当TGase比例超过PS提供



(a) PS质量分数　(b) pH　(c) TGase体积分数

图中不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

图3　不同因素对TGase包埋率的影响

Fig. 3　Effects of various factors on the encapsulation efficiency of TGase

负载空间的上限时，过量的TGase分子因空间位阻及表面竞争效应使TGase包埋率降低；而TGase体积分数过低也会使溶液中酶水平不足，导致结合效率偏低。结果表明，当TGase体积分数为40%时，TGase-PS复合体系能充分利用载体孔隙并避免酶过量，获得较高的包埋效率。

2.3 TGase-PS复合体系制备工艺的响应面优化结果分析

2.3.1 模型方程建立与响应面分析

基于单因素试验结果，采用Design Expert 12.0软件的Box-Behnken，设计响应面试验，因素水平见表1，试验方案及结果见表2。以PS质量分数（A）、pH（B）和TGase体积分数（C）为自变量、包埋率（Y）为响应值，采用Design-Expert 12.0软件对试验结果进行多元回归拟合，得到TGase-PS复合体系制备工艺参数的多元二次回归方程为：$Y=71.13+8.05A+2.00B-3.88C+2.60AB-2.72AC+1.76BC-10.51A^2-7.15B^2-13.20C^2$。

表1 TGase-PS复合体系制备工艺的响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment on the preparation process of the TGase-PS composite system

水平	PS 质量分数/%	pH	TGase 体积分数/%
−1	8	6	30
0	12	7	45
1	14	8	60

响应面模型的方差分析和可信度分析结果见表3。方差分析结果显示，二次回归模型极其显著（$F=109.61$，$P<0.01$），失拟项$P>0.05$；相关系数$R^2=0.993\ 0$、调整后$R^2_{Adj}=0.983\ 9$，CV=2.7%，说明模型拟合度和预测能力良好，重现性高，能较好地反映各影响因素与TGase包埋率之间的关系。显著性分析结果表明，PS质量分数、pH、TGase体积分数对包埋率均有极显著影响（$P<0.01$），影响程度依次为$A>C>B$；交互项AB影响显著，交互项AC影响极显著，交互项BC影响不显著；二次项A^2、B^2、C^2影响极显著。因此，该模型能准确反映并预测各因素与响应值的关系，为工艺优化提供了可靠依据。

2.3.2 交互作用对包埋率的影响

三维响应曲面图通过曲面坡度与等高线特征反映因素的影响程度，等高线代表水平切面。坡度越大、等高线越密，说明因素对响应指标的影响越显著；等高线呈椭圆形时表示两因素存在显著交互作用，等高线呈圆形时则表示交互作用不明显[25]。PS质量分数与pH的等高线呈椭圆形，表明两者交互作用显著，对TGase包埋率影响较大。PS质量分数与TGase体积分数的等高线呈椭圆形且最为密集，表明其交互作用最显著，对TGase包埋率影响最大。pH与TGase体积分数的等高线最不密集，说明交互作用最弱，见图4。

表2 响应面优化试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results of response surface methodology optimization

序号	PS 质量分数/%	pH	TGase 体积分数/%	包埋率/%
1	11	7	45	71.37
2	11	6	30	53.93
3	11	7	45	71.25
4	8	8	45	43.92
5	8	6	45	47.28
6	14	8	45	64.87
7	14	7	30	61.66
8	8	7	30	39.77
9	11	7	45	69.85
10	11	6	60	41.46
11	14	6	45	57.83
12	11	8	30	56.57
13	11	8	60	51.16
14	11	7	45	70.63
15	8	7	60	38.62
16	14	7	60	49.64
17	11	7	45	72.55

2.3.3 最佳工艺参数及验证试验

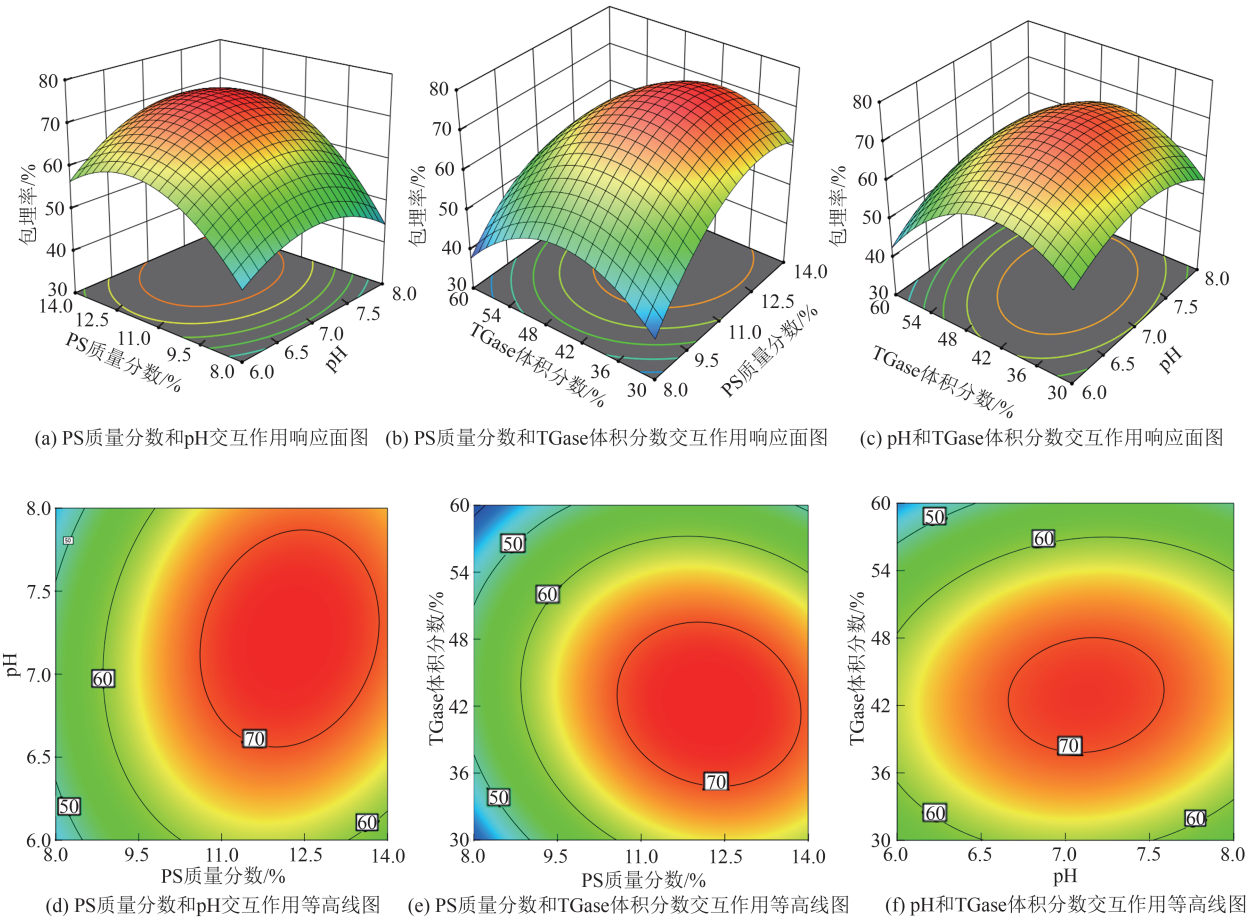
通过回归模型预测最佳TGase-PS复合体系制备条件为：PS质量分数12.29%、pH 7.20、TGase体积分数42.33%，在该条件下的TGase包埋率为73.41%。为验证该响应面法的可行性，同时便于实际操作，将理论值调整为：PS质量分数12%、pH 7、TGase体积分数42%。采用该制备条件进行3次重复试验，测得TGase-PS复合体系中TGase包埋率为73.93%，与理论值偏差仅为0.52%。该结果表明回归模型拟合良好，通过响应面法优化的工艺参数可靠且具有实用价值。

表3　回归模型的方差分析

Table 3　ANOVA for the regression model

差异来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*	显著性
模型	2 307.28	9	256.36	109.61	<0.000 1	**
A	518.58	1	518.58	221.71	<0.000 1	**
B	32.08	1	32.08	13.72	0.007 6	**
C	120.51	1	120.51	51.52	0.000 2	**
AB	27.04	1	27.04	11.56	0.011 4	*
AC	29.54	1	29.54	12.63	0.009 3	**
BC	12.46	1	12.46	5.33	0.054 3	
A^2	464.76	1	464.76	198.70	<0.000 1	**
B^2	215.18	1	215.18	92.00	<0.000 1	**
C^2	733.78	1	733.78	313.72	<0.000 1	**
残差	16.37	7	2.34			
失拟项	12.40	3	4.13	4.16	0.101 2	
纯误差	3.98	4	0.99			
校正总和	2 323.65	16				

注：“*”代表差异显著（*P*<0.05）；“**”代表差异极显著（*P*<0.01）。



(a) PS质量分数和pH交互作用响应面图　(b) PS质量分数和TGase体积分数交互作用响应面图　(c) pH和TGase体积分数交互作用响应面图

(d) PS质量分数和pH交互作用等高线图　(e) PS质量分数和TGase体积分数交互作用等高线图　(f) pH和TGase体积分数交互作用等高线图

图4　各因素交互作用对TGase包埋率的影响

Fig. 4　Effects of interactions between various factors on the encapsulation efficiency of TGase

2.4 TGase-PS 复合体系结构特征分析

2.4.1 FTIR 分析

如图 5 所示，游离 TGase 在 3 400~3 200 cm^{-1}（O—H 伸缩）和 1 650、1 540 cm^{-1}（蛋白质 Amide I、II）附近出现强吸收峰[26]。PS 则在 3 400~3 200 cm^{-1}（O—H 伸缩）和 1 200~950 cm^{-1}（C—O—C 振动、C—O 振动）出现强吸收峰[27]。蛋白质各特征峰对应的二级结构如下：1 640~1 610 cm^{-1} 处为 β 折叠，1 650~1 640 cm^{-1} 处为无规卷曲，1 658~1 650 cm^{-1} 处为 α 螺旋，1 700~1 660 cm^{-1} 处为 β 转角[28]。蛋白质二级结构 α 螺旋和 β 折叠是常见的二级结构，而 β 转角和无规卷曲表现出相对无序。TGase-PS 复合体系表现出 TGase 和 PS 的特征吸收峰，但在 1 660 cm^{-1} 处的吸收峰明显减弱，说明了酶结构有序状态增加。此外，TGase-PS 复合体系在 1 200 cm^{-1} 处的吸收峰发生偏移，在 3 600~3 200 cm^{-1} 处的峰区域加宽，发生红移，说明 PS 表面的羟基与 TGase 的 N—H 和 O—H 形成了氢键结构，表明两者存在氢键、静电力主导的非共价相互作用[29]。PS 表面的羟基与孔隙通过吸附 TGase 极性基团引发了光谱叠加与峰形改变，同时酶分子嵌入载体孔隙形成了物理保护，由此建立了能够维持酶稳定的氢键网络结构。TGase-PS 复合体系在 1 047 cm^{-1} 与 1 022 cm^{-1} 处吸收峰强度的比值（0.64）相较于游离 TGase（0.69）略有下降，说明 TGase 的负载破坏了 PS 的部分有序结构，导致其结晶度下降，这可能是由于 TGase 分子的物理嵌入作用，使 PS 的部分结晶区转变为无序状态[21]。TGase-PS 复合体系未出现新的化学键信号，证实 TGase 的负载既维持了酶与载体化学结构的完整性，又通过物理缔合实现了高效固定，为 TGase-PS 复合体系稳定性提升提供了分子机制支撑。

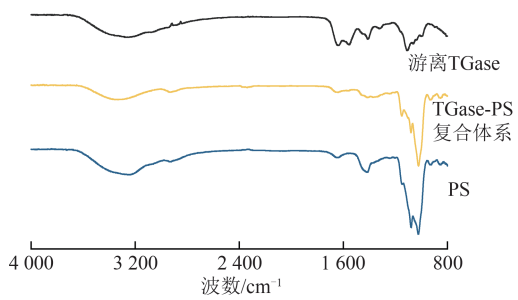


图 5 游离 TGase、PS 和 TGase-PS 复合体系的 FTIR 图谱

Fig. 5 FTIR spectra of free TGase, PS, and TGase-PS composite system

2.4.2 DSC 分析

DSC 能够反映 TGase 与 PS 载体的综合特性。如图 6 所示，游离 TGase 的吸热峰出现在 82.50 ℃，是热变形蛋白质构象变化的吸热峰[30]。PS 在 117.50 ℃处有较宽的热吸收区域。TGase-PS 复合体系的吸热峰在 94.17 ℃处，高于游离 TGase 吸热峰温度。TGase-PS 复合体系仅表现出单独的吸热峰，说明了 TGase 被 PS 有效包封。此外，TGase-PS 复合体系的焓值低于 PS，这是因为酶的介入降低了淀粉本身的有序度，从而使加热过程中所需能量降低。淀粉有序结构变化与 FTIR 光谱一致。因此，结合其他研究结论，推断 PS 主要通过氢键和静电相互作用固定化 TGase，提高了其耐温性[31]。

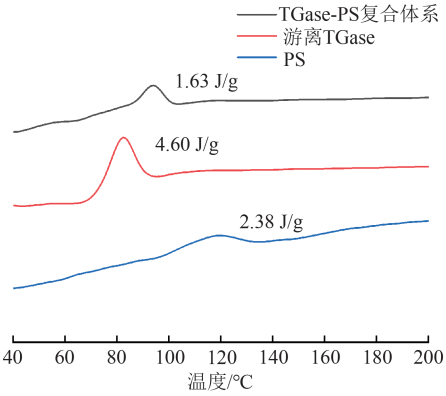


图 6 游离 TGase、PS 和 TGase-PS 复合体系的 DSC 图

Fig. 6 DSC of free TGase, PS, and TGase-PS composite system

2.5 TGase-PS 复合体系稳定性分析结果

2.5.1 最佳反应温度及热稳定性分析结果

如图 7（a）所示，游离 TGase 和 TGase-PS 复合体系的相对酶活力在 40~55 ℃范围内均较高，且在 50 ℃时达到峰值。低温下 TGase-PS 复合体系的相对酶活力略低于游离 TGase，可能由于酶在孔隙中受限，接触效率降低；随着温度升高，酶分子热运动增强，被限制的 TGase 得以逐渐释放或充分伸展，表现出更高的酶活力。此外，TGase-PS 复合体系的相对酶活力在较高温度下优于游离 TGase，说明载体对酶结构起到一定的保护作用，使其在更高的温度下仍能保持较高的酶活力。由图 7（b）可知，随着温度的升高，游离 TGase 的酶活力快速衰减。当温度为 50 ℃时，游离 TGase 相对酶活力迅速下降至

20.52%，而TGase-PS复合体系的相对酶活力为69.99%，比游离TGase提升了2.41倍。PS通过空间位阻效应减弱了外界高温对酶分子的直接作用，保持了酶在微孔中的稳定构象，氢键及静电相互作用也稳固了酶结构。TGase-PS复合体系在最适温度和热稳定性方面均优于游离TGase：一方面，TGase-PS复合体系可在合适的温度区间内保持较高的酶活力；另一方面，TGase-PS复合体系在高温条件下具有显著的抗热变性能力。

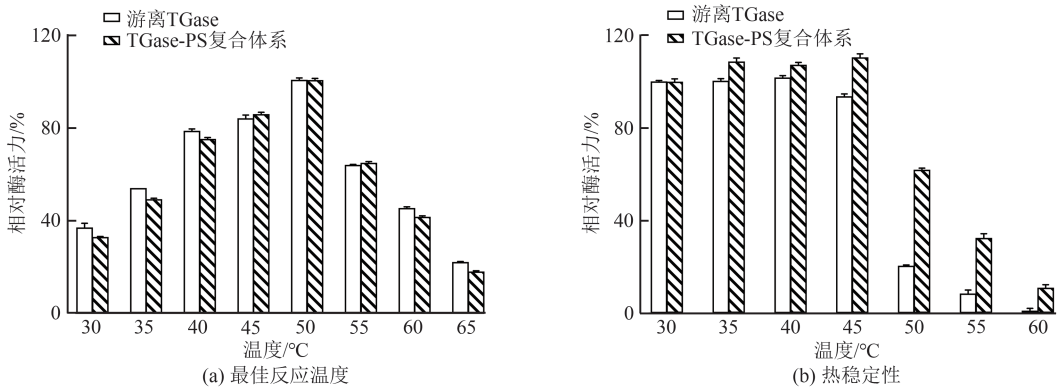


图7　TGase-PS复合体系最佳反应温度及热稳定性

Fig. 7　Optimal reaction temperature and thermal stability of the TGase-PS composite system

2.5.2　最佳反应pH及pH稳定性分析结果

如图8(a)所示，TGase-PS复合体系与游离TGase在pH 6~8时均保持了较高的稳定性，并在pH为8时的相对酶活力达到最大值；在反应pH为3~4时，TGase-PS复合体系和游离TGase的相对酶活力均显著降低，这可能是由于该pH环境限制了酶与底物的结合[32]。值得注意的是，当在偏碱性环境下，TGase-PS复合体系的酶活力衰减幅度大于游离TGase，可能是由于在碱性环境中底物难以进入PS孔洞，从而导致TGase活力降低。由图8(b)可知，TGase-PS复合体系能在pH为4~9时保持较高的相对酶活力，在pH 10时相对酶活力仍有81.20%，而游离TGase在pH 10时相对酶活力仅有62.94%。PS表面的负电性与孔道结构可减弱极端pH对酶活性中心的直接冲击，维持酶分子的构象稳定[33]。同时，载体的负电位点与酶表面的正电位点相互吸引，有助于抵抗过酸或过碱导致的电荷失调，从而延缓酶的变性或失活。这些特征使得TGase-PS复合体系在更广的pH区间内依然能保持较高的酶活力，提升了TGase在各类加工或反应环境中的灵活性。

2.5.3　储存稳定性分析结果

如图9所示，在25 ℃储存条件下，游离TGase与TGase-PS复合体系的相对酶活力均随时间的延长而逐渐下降，但衰减幅度存在明显差异。在4 ℃条件下，两者在14 d内的相对酶活力基本都能保持在较高水平，表明低温显著

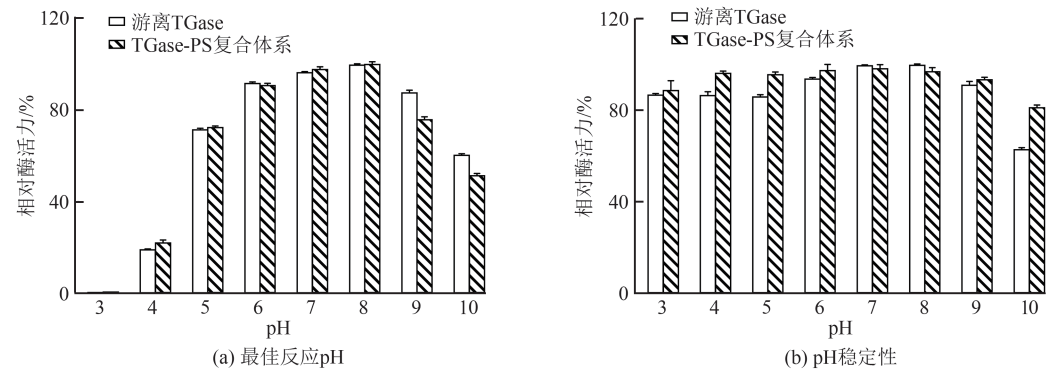


图8　TGase-PS复合体系最佳反应pH及pH稳定性

Fig. 8　Optimal reaction pH and pH stability of the TGase-PS composite system

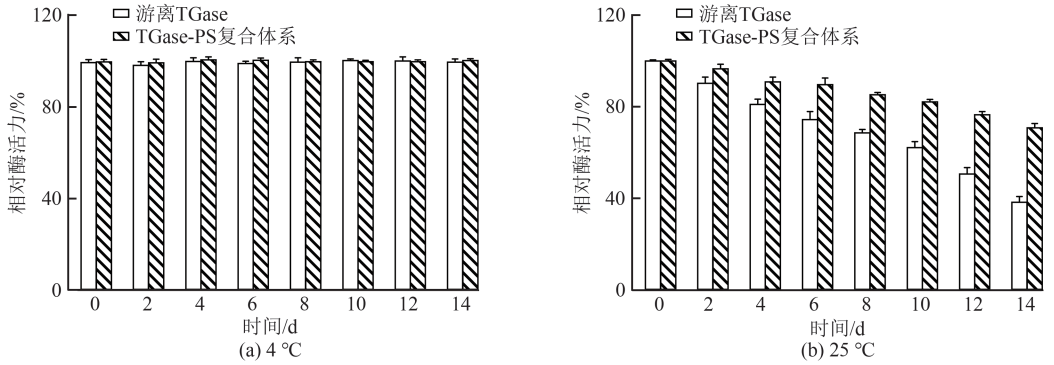


图 9　TGase-PS 复合体系在 4 ℃和 25 ℃下的储存稳定性

Fig. 9　Storage stability of the TGase-PS composite system at 4 ℃ and 25 ℃

减缓了酶的失活速率，TGase-PS 复合体系的载体保护作用不显著。而在 25 ℃储存时，游离 TGase 与 TGase-PS 复合体系的相对酶活力均呈多阶段衰减趋势，而两者相对酶活力的阶段性差异证明了 PS 对 TGase 的保护作用。储存 14 d 时，游离 TGase 的相对酶活力仅为 38.64%，而 TGase-PS 复合体系的相对酶活力达 71.01%，为游离 TGase 的 1.84 倍。这是由于 PS 的孔隙结构与表面极性基团为 TGase 提供了微环境保护作用，有效减弱了外界温度及水分波动对酶分子构象的干扰，从而在室温条件下显著提升了 TGase 的储存稳定性。

2.5.4　热失活动力学

酶在不同温度下的热失活速率可以通过线性回归拟合曲线的斜率差异来区分[34]。由图 10 可知，TGase-PS 复合体系在 40~60 ℃内的热稳定性明显优于游离 TGase。当温度为 60 ℃时，游离 TGase 的酶活力随时间的延长急剧衰减（拟合曲线陡峭），而 TGase-PS 复合体系失活速率明显减缓（斜率绝对值降低）；当温度为 40 ℃和 50 ℃时，两者拟合曲线的斜率差异减小。酶热失活的原因主要是天然构象的丧失，活性三级蛋白质结构展开为无序多肽，这是由高温下分子迁移率增加导致的[35]。线性拟合结果表明，TGase-PS 复合体系在各温度下的热失活速率常数（k）均低于游离 TGase，且半衰期延长。随着温度的升高，游离 TGase 倾向于形成聚集体，这些聚集体的形成会导致游离 TGase 活力的丧失[36]。而 PS 载体能在一定程度上抵御热能对酶分子的破坏，限制聚集体的形成，使 TGase-PS 复合体系具有更高的表观热稳定性。

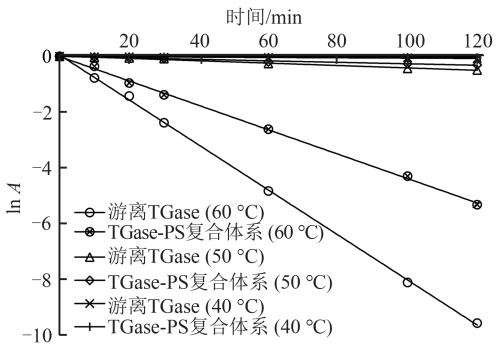


图 10　TGase-PS 复合体系的热失活动力学结果

Fig. 10　Thermal inactivation kinetics results of the TGase-PS composite system

游离 TGase 和 TGase-PS 复合体系在不同温度下的半衰期见表 4。在不同温度下，TGase-PS 复合体系的半衰期均大于游离 TGase。TGase-PS 复合体系在 40、50、60 ℃的半衰期较游离 TGase 分别延长了 87.87%、63.43% 与 83.01%。这表明 PS 载体在 40 ℃和 60 ℃条件下均能有效减缓 TGase 的热失活，并在 50 ℃时仍能将失活速率降低约 2/3。在高温下，酶分子的热运动加剧，容易发生聚集和沉淀，而 PS 的包埋可有效抑制这一过程，从而维持酶的分散性和溶解性，延长其在高温下的使用寿命。

表 4　游离 TGase 与 TGase-PS 复合体系的半衰期

Table 4　Half-life of free TGase and TGase-PS composite system

温度/℃	半衰期/min	
	游离 TGase	TGase-PS 复合体系
40	1 814.00±21.50	3 408.00±3.51
50	231.60±1.40	378.50±1.30
60	12.42±0.04	22.73±0.10

3 结论

以酶法制备的多孔淀粉（PS）为载体，构建了TGase-PS复合体系，该体系通过控制反应条件来调控PS孔道尺寸以匹配TGase，从而提升TGase的包埋率与稳定性。响应面优化试验结果表明，TGase-PS复合体系的最佳制备条件为：PS质量分数12%、pH 7、TGase体积分数42%，TGase-PS复合体系的最适温度和pH分别为50 ℃和8，此时TGase包埋率达73.93%。相较于游离TGase，TGase-PS复合体系热稳定性显著提升，50 ℃保温1 h后的相对酶活力达69.99%，是游离TGase的3.41倍；25 ℃储存14 d后的相对酶活力仍达71.01%，为游离TGase的1.84倍，表明TGase-PS复合体系具备良好的耐温性和操作稳定性。本研究表明通过PS可有效缓解外部条件对TGase活力的影响，提高了TGase的热稳定性与pH稳定性，为其在高温或极端pH条件下的连续催化应用提供了绿色、高效的固定化策略。与传统无机或合成高分子载体相比，PS具有成本低、生物相容性好、结构可调、生物可降解等优点，是一种兼具环境友好性与工业适配性的优质酶固定化载体。未来还应进一步研究微观作用机制，开展载体结构优化与工业化工艺适配研究，以推动PS载体固定化TGase在食品加工等领域的规模化应用。

参考文献

[1] KIELISZEK M，MISIEWICZ A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review[J]. Folia Microbiologica，2014，59(3)：241-250.

[2] WANG L M，YU B，WANG R X，et al. Biotechnological routes for transglutaminase production：recent achievements，perspectives and limits[J]. Trends in Food Science & Technology，2018，81：116-120.

[3] RAY R C，ROSELL C M. Microbial enzyme technology in food applications[M]. Boca Raton：CRC Press，2017：180-198.

[4] AKBARI M，RAZAVI S H，KIELISZEK M. Recent advances in microbial transglutaminase biosynthesis and its application in the food industry[J]. Trends in Food Science & Technology，2021，110：458-469.

[5] ROMEIH E，WALKER G. Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application[J]. Trends in Food Science & Technology，2017，62：133-140.

[6] SANTHI D，KALAIKANNAN A，MALAIRAJ P，et al. Application of microbial transglutaminase in meat foods：a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2017，57(10)：2071-2076.

[7] YUAN F，LI G Y，LI Z L，et al. Efficient biosynthesis of transglutaminase in *Streptomyces mobaraensis via* systematic engineering strategies[J]. Current Research in Food Science，2024，8：100756.

[8] SAVOCA M P，TONOLI E，ATOBATELE A G，et al. Biocatalysis by transglutaminases：a review of biotechnological applications[J]. Micromachines，2018，9(11)：562.

[9] SILVA C，MARTINS M，JING S，et al. Practical insights on enzyme stabilization[J]. Critical Reviews in Biotechnology，2018，38(3)：335-350.

[10] SHI Y G，QIAN L，ZHANG N，et al. Changes in morphology and activity of transglutaminase following cross-linking and immobilization on a polypropylene microporous membrane[J]. Molecules，2011，16(12)：10046-10058.

[11] FATIMA S W，BARUA S，SARDAR M，et al. Immobilization of transglutaminase on multi-walled carbon nanotubes and its application as bioinspired hydrogel scaffolds[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2020，163：1747-1758.

[12] HAN X Y，WEN H L，LUO Y，et al. Effects of α-amylase and glucoamylase on the characterization and function of maize porous starches[J]. Food Hydrocolloids，2021，116：106661.

[13] WAHAB M，JANASWAMY S. Porous corn starch granules as effective host matrices for encapsulation and sustained release of curcumin and resveratrol[J]. Carbohydrate Polymers，2024，333：121967.

[14] QIAN J Q，YANG H Y，MO C H，et al. Preparation of porous starch from native starch by using fungal amylase and evaluation of its adsorption property on natural pharmacodynamic compounds[J]. Polymers for Advanced Technologies，2022，33(7)：2244-2253.

[15] LI C N，AN F P，SUN S H，et al. Micro-encapsulation of garlic oil using esterified-wheat porous starch and whey protein isolate：physicochemical properties，release behavior during *in vitro* digestion[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2024，272(1)：132843.

[16] 曹俊英，徐超，章中. 改性多孔淀粉包埋肉桂精油和焦亚硫酸钠微胶囊的制备及性质研究[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(4)：74-83.
CAO J Y，XU C，ZHANG Z. Preparation and properties of modified porous starch embedded cinnamon essential oil and sodium metabisulfite microcapsules[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(4)：74-83.

（in Chinese）

[17] 韩秀英. 基于酶法制备三种改性玉米多孔淀粉的表征及其包载姜黄素的应用[D]. 南昌:南昌大学,2022.

[18] BAI H T, YU D, DU X W. Review of porous microspheres for enzyme immobilization: strategies, applications, and prospects[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2025,295:139627.

[19] ZHANG Z W, ZHAO F, MENG Y L, et al. Microencapsulation of the enzyme breaker by double-layer embedding method[J]. SPE Journal, 2023, 28(2): 908-916.

[20] LUO Z G, FU X. Immobilization of urease on dialdehyde porous starch[J]. Starch-Stärke,2010,62(12):652-657.

[21] JIANG K L, WANG W X, MA Q Y, et al. Microwave-assisted enzymatic hydrolysis as a novel efficient way to prepare porous starch[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 301:120306.

[22] BENAVENT-GIL Y, ROSELL C M. Comparison of porous starches obtained from different enzyme types and levels[J]. Carbohydrate Polymers,2017,157:533-540.

[23] SATHYAN S, NISHA P. Optimization and characterization of porous starch from corn starch and application studies in emulsion stabilization[J]. Food and Bioprocess Technology,2022,15(9):2084-2099.

[24] CUI L, DU G C, ZHANG D X, et al. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*[J]. Food Chemistry, 2007, 105(2):612-618.

[25] 赵利娜,周娅丽,兰晨,等. 汉逊德巴利酵母冻干菌剂制备条件的优化及其对草莓采后软腐病的控制[J]. 食品与生物技术学报,2024,43(8):20-30.
ZHAO L N, ZHOU Y L, LAN C, et al. Optimization of preparation conditions of lyophilized *Debaryomyces hansenii* yeast formulation and its control on postharvest soft rot of strawberry[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2024,43(8):20-30.(in Chinese)

[26] ZHU P N, HUANG W J, CHEN L Y. Develop and characterize thermally reversible transparent gels from pea protein isolate and study the gel formation mechanisms [J]. Food Hydrocolloids,2022,125:107373.

[27] WARREN F J, GIDLEY M J, FLANAGAN B M. Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure: a joint FTIR-ATR, NMR, XRD and DSC study[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 139: 35-42.

[28] JIANG J Q, FAN H L, ZHOU J, et al. *In vitro* inhibitory effect of five natural sweeteners on *α*-glucosidase and *α*-amylase[J]. Food & Function, 2024, 15(4): 2234-2248.

[29] HU N N, QI W H, ZHU J Y, et al. Postharvest ripening of newly harvested corn: weakened interactions between starch and protein[J]. Food Chemistry,2024,451:139450.

[30] DI MATTEO P, LUZIATELLI F, BORTOLAMI M, et al. Differential scanning calorimetry (DSC) as a tool for studying thermal properties of a crude cellulase cocktail [J]. Chemical Papers,2023,77(5):2689-2696.

[31] GENTILE L. Protein-polysaccharide interactions and aggregates in food formulations[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science,2020,48:18-27.

[32] ZOU D, JIANG X D, JIANG C, et al. Identification of a transglutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens*: gene mining, protein expression, mechanism analysis and enzymatic characterization[J]. Results in Engineering, 2024,24:102888.

[33] ZAGHBIB I, ABDULLAH J A A, HASSOUNA M, et al. Purification and characterization of transglutaminase isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) flesh waste [J]. Polymers,2025,17(4):510.

[34] CUI L, DU G C, ZHANG D X, et al. Thermal stability and conformational changes of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*[J]. Bioresource Technology,2008,99(9):3794-3800.

[35] KLIBANOV A M. Stabilization of enzymes against thermal inactivation [J]. Advances in Applied Microbiology,1983,29:1-28.

[36] DE SOUZA C F V, FACCIN D J L, MERTINS O, et al. Kinetics of thermal inactivation of transglutaminase from a newly isolated *Bacillus circulans* BL32[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2009, 84(10): 1567-1575.