

HELSINGIN YLIOPISTO

Elintarvikealan koulutusohjelman tutkimuksia

EKT-sarja 1299

MALLIPROTEIINIEN RISTISITOMINEN
LAKKAASILLA, TYROSINAASILLA JA TRANSGLUTAMINAASILLA

Antti Knaapila

Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos

Helsinki 2003

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen		Laitos — Institution — Department Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos	
Tekijä — Författare — Author Antti Knaapila			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Malliproteiinien ristositominen lakkaasilla, tyrosinaasilla ja transglutaminaasilla			
Oppiaine — Läroämne — Subject Elintarvikekemia			
Työn laji — Arbetets art — Level Pro gradu -tutkielma		Aika — Datum — Month and year Lokakuu 2003	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 108
Tiivistelmä — Referat — Abstract			
<p>Tutkielman kirjallisuudessa tarkasteltiin transglutaminaasin esiintymistä, rakenteita, sen katalysoimia reaktioita, aktiivisuuteen vaikuttavia tekijöitä, biologista merkitystä ja käyttösovelluksia. Kokeellisen osan tavoitteena oli selvittää lakkaasin ja tyrosinaasin kykyä ristositoa valittuja malliproteiineja sekä selvittää transglutaminaasin kykyä ristositoa vehnän glutenin gluteniineja ja gliadiineja.</p> <p>Malliproteiineja käsiteltiin <i>Trametes hirsuta</i>- ja <i>Melanocarpus albomyces</i> -homeiden lakkaaseilla ja <i>Agaricus bisporus</i> -sienen tyrosinaasilla fenolisten happojen läsnä ollessa ja ilman niitä. <i>Streptovercillium mobaraense</i> -bakteerin transglutaminaasilla käsiteltiin gliadiinia ja gluteniinia, jotka eristettiin gluteenista uuttamalla. Reaktiotuotteita analysoitiin natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE) ja geelisuodatuskromatografiolla (GPC). Fenolisten happojen toimimisesta lakkaasin ja tyrosinaasin substraatteina varmistuttiin hapenkulutuskokein. <i>T. hirsuta</i> -lakkaasin kykyä hapettaa kysteiniä kystiiniä analysoitiin nestekromatografia-massaspektrometrialla (LC-MS).</p> <p>Lakkaasit ja tyrosinaasi eivät saaneet aikaan kauraproteiinien eivätkä kaseiinin ristositoutumisesta kertovaa molekyylimassan suurenemista SDS-PAGE:lla tutkittuna. LC-MS -analyysin perusteella <i>T. hirsuta</i> -lakkaasi kuitenkin muodosti disulfididisidoksen kahden vapaan kysteiniin molekyylin välille. Ferula-, kahvi-, vanilliini- tai <i>p</i>-kumariinihapon läsnä ollessa <i>T. hirsuta</i> -lakkaasi aiheutti kauraproteiinien ristositoutumista. Ferulahapon kanssa sama todettiin kaseiinilla ja naudan seerumin albumiinilla (BSA). Ferulahapon kanssa myös tyrosinaasi aikaansai BSA:n ristositoutumista, mutta tehottomammin kuin lakkaasi. Transglutaminaasin vaikutuksesta gluteniiniin sekä pienen että suuren molekyylimassan alayksiköt ristositoutuivat mutta gliadiinit eivät juuri ollenkaan. Proteiinien niukkaliukoisuus häytti entsyymi-reaktioseosten analysointia GPC:llä.</p> <p>Lakkaasit ja tyrosinaasi eivät ristositoneet tutkittuja malliproteiineja ilman fenolisen hapon läsnäoloa reaktioseoksessa. Sen sijaan fenolisen hapon kanssa malliproteiinien ristositoutumista tapahtui kaikissa tutkituissa tapauksissa. Muodostuneet ristosidokset eivät ole disulfididisidoksia, mutta niiden tarkkaa rakennetta ei voitu päätellä. Transglutaminaasi ristositoi gluteniinia tehokkaammin kuin gliadiinia.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Proteiinit, entsyymit, ristositominen, lakkaasi, tyrosinaasi, transglutaminaasi			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Viikin tiedekirjasto			
Muuta tietoa — Övriga uppgifter — Further information EKT-sarja 1299			

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Dept. of Applied Chemistry and Microbiology	
Tekijä — Författare — Author Antti Knaapila			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Cross-linking of the Model Proteins by Laccase, Tyrosinase, and Transglutaminase			
Oppiaine — Läroämne — Subject Food Chemistry			
Työn laji — Arbetets art — Level M. Sc. Thesis		Aika — Datum — Month and year October 2003	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 108
Tiivistelmä — Referat — Abstract			
<p>The literature review deals with structures and occurrence of transglutaminases, reactions catalyzed by them, factors influencing their activity, and their biological significance as well as applications. The objectives of the experimental study were to examine the ability of laccase and tyrosinase to cross-link selected model proteins, and to examine the ability of transglutaminase to cross-link the glutenins and the gliadins of wheat gluten.</p> <p>Model proteins were incubated with fungal laccases from <i>Trametes hirsuta</i> and <i>Melanocarpus albomyces</i>, and with tyrosinase from mushroom <i>Agaricus bisporus</i>. The effect of phenolic acids was also tested. Gliadin and glutenin were extracted from gluten and incubated with bacterial transglutaminase from <i>Streptoverticillium mobaraense</i>. Reaction products were analyzed with sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and gel permeation chromatography (GPC). In order to confirm the ability of the laccases and the tyrosinase to use phenolic acids as substrates, oxygen consumption experiments were carried out. The potential of <i>T. hirsuta</i> laccase to oxidize cysteine to cystine was examined with liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).</p> <p>SDS-PAGE showed that the laccases and the tyrosinase did not induce any increment in the molecular masses of oat proteins and casein. This suggested that no cross-links were formed in spite of the results from the LC-MS, which showed that <i>T. hirsuta</i> laccase formed disulphide bond containing cystine from free cysteine. In the presence of ferulic, caffeic, vanillic or <i>p</i>-coumaric acid <i>T. hirsuta</i> laccase induced the cross-linking of oat proteins. The same effect was seen in the presence of ferulic acid in the case of casein and bovine serum albumin (BSA). In the presence of ferulic acid also the tyrosinase induced cross-links to BSA, but not as efficiently as laccase. Both the low and high molecular weight subunits of glutenin were cross-linked by the transglutaminase, but gliadins only very inefficiently. The poor solubility of the substrate proteins in water disturbed the analysis of the reaction mixtures with GPC.</p> <p>The laccases and the tyrosinase did not cross-link tested model proteins unless phenolic acid was present in the reaction mixture. All the phenolic acids tested induced cross-linking. The cross-links were not disulphide bonds, but the exact structure of the bonds could not be deduced. The transglutaminase cross-linked glutenin more efficiently than gliadin.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Proteins, enzymes, cross-linking, laccase, tyrosinase, transglutaminase			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Viikki Science Library			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information EKT-series 1299			

ESIPUHE

Tätä pro gradu -tutkielmaa tehdessäni pysähdyin monta kertaa ihailemaan luontoa ja luonnon ilmiöitä. Paitsi niiden kauneus ja johdonmukaisuus, minuun teki vaikutuksen myös luonnon tasapuolisuus: luonnonlait ovat kaikille kaikkialla samat ihmisten – tutkijoidenkin – tahdosta riippumatta. Luonnonjärjestelmiin verrattuna ihmisen luomat järjestelmät kuten johtamis-, tieto-, analyysi- ja varsinkin talousjärjestelmät häiriöineen vaikuttivatkin usein kömpelöiltä. Kuitenkin ihmisten itsensä käyttäytymisessä saattoi havaita yhtäläisyyksiä luonnonjärjestelmien toiminnalle. Niin molekyylien kuin ihmistenkin välillä esiintyi erilaisia vuorovaikutuksia, reaktioita, sidoksia ja tasapainotiloja.

Tahdon kiittää kaikkia tutkielmani valmistumista edistäneitä ihmisiä. Kunnioittavimmat kiitokseni osoitan työni valvojalle elintarvikekemian professori Vieno Piroselle neuvoista ja opastuksesta tutkielman teossa sekä koko opiskeluaikani saamastani asiantuntevasta ja selkeästä opetuksesta. Varsinkin tieteellisen viestinnän opeista oli paljon hyötyä tutkielmaa kirjoittaessani.

Työn kokeellinen osuus suoritettiin 1.1.-30.6.2003 Valtion teknillisen tutkimuskeskuksen biotekniikan tutkimusyksikön (VTT Biotekniikka) entsyymitekniikan tutkimusryhmässä. Työ oli osa EU-tutkimusprojektia *Novel cross-linking enzymes and their consumer acceptance for structure engineering of foods* (CROSSENZ; QLRT-2001-02208). Kiitän ryhmäpäällikkö FT Tapani Reinikaista mahdollisuudesta työskennellä entsyymitekniikkaryhmässä sekä toimimisesta työni ohjausryhmässä.

Työni varsinaista ohjaajaa erikoistutkija TkT Kristiina Kruusia kiitän vauhdikkaasta ja vaativasta ohjauksesta sekä monipuolisista ja vaihtelevista haasteista. Ilman niitä en olisi oppinut tutkielmantekoprosessin aikana yhtä paljon kemiaa enkä elämää.

VTT:n ohjausryhmääni kuuluneista tahdon kiittää erityisesti erikoistutkija TkT Marja-Leena Niku-Paavolaa ja erikoistutkija FM Raija Lanttoa. He jäivät mieleeni hyväntuulisina, kannustavina ja idearikkaina osajina, joiden asiantuntemus riitti myös ideoiden käytännön toteuttamisen järkipäiseen suunnitteluun. Marja-Leena herätti alunperin kiinnostukseni entsyymeitä ja VTT Biotekniikkaa kohtaan luennoissaan yliopistolla elintarvike-entsymologian kurssia. Hän toimi minulle erinomaisena opettajana myös gradutyötä tehdessäni. Raijalle olen kiitollinen etenkin moniin menestyksellisiin kokeisiin johtaneista ideoista sekä työhöni liittyneistä tarkoista ja oikeaan osuneista huomioista. Kiitän myös tutkimuspäällikkö TkT Johanna Buchertia ja ryhmäpäällikkö FT Karin Autiota toimimisesta työni ohjausryhmässä ja kiinnostuksesta työtäni kohtaan.

Yliopistonlehtori ETT Tuula Sontag-Strohmia kiitän tutkielmaa tehdessäni saamastani asiantuntija-avusta etenkin viljaproteiineihin liittyneissä asioissa ja monista hyödyllisistä neuvoista tutkielman kirjoitusvaiheessa.

Tutkija FM Helena Simolinia kiitän työni nestekromatografi-massaspektrometri -analyysien käytännön suorituksesta ja avusta tulosten tulkinnassa. Tutkija DI Martina Lilleä kiitän tutustuttamisestani viskositeettimittauksiin, vaikka työhöni liittyen tätä analytiikkaa ei valitettavasti ehdittykään kehittää esikokeita pidemmälle.

Työskentelyni VTT:llä ajoittui hetkeen, jolloin VTT:llä elettiin taloudellisesti vaikeita aikoja. Joissain yksiköissä henkilöstöä uhkasivat lomautukset ja irtisanomiset, ja myös VTT Biotek-

niikka joutui osallistumaan säästöihin. Saatoin vain ihailla laboratoriohenkilökunnan myönteisyyttä vaikeassakin tilanteessa. He jaksoivat kaikesta huolimatta aina opastaa minua käytännön laboratoriotyöskentelyssä, mistä tahdon kiittää lämpimästi heitä kaikkia. Erityiskiitokset ansaitsee tutkimusavustaja Outi Liehunen, joka perehdytti minut muun muassa elektroforeesi-, spektrofotometri- ja hapenmittauslaitteistojen käyttöön. Hänen asiantuntemuksensa, joustavuutensa, huumorinsa sekä kannustava, kypsä asenteensa asioihin oli monta kertaa aivan ratkaisevaa paitsi laboratoriotöittäni sujumisen myös työssäjaksamiseni kannalta.

Kiitän kaikkia entsyymitekniikkaryhmän jäseniä ja muutakin VTT Biotekniikan henkilökuntaa sekä yhteisessä kirjoitushuoneessamme, ns. B-talon Lastenkammarissa, ahertaneita opiskelijoita mukavasta ja välittömästä työskentelyilmapiiristä.

Tahdon kiittää myös kaikkia opettajiani hyvästä opetuksesta. Varsinkin soveltavan kemian ja mikrobiologian laitoksen sekä elintarviketeknologian laitoksen opettajilta saamani opetus antoi hyvät eväät tämän tutkielman tekoon. Yliopistonlehtori ETT Velimatti Ollilaista tahdon kiittää lisäksi innostavasta opinto-ohjauksesta.

Kotiväkeäni kiitän opiskeluaikani saamastani huollon tuesta. Kiitän myös siitä, että elintarviketieteiden opintoja suunnitellessani koettelitte ja siten vahvistitte uskoani niihin. Kummejani kiitän kiinnostuksesta opintojani kohtaan.

Ystäviäni ja opiskelijakollegoitani tutkija ETM Jarkko Hellströmiä, elintarviket. yo Aki Paasosta sekä elintarviket. ja fil. yo Petri Kylliä kiitän toimimisesta graduni "esitarkastajina". He lukivat tarkkaavaisesti tekstiäni ja tekivät siihen monia arvokkaita parannusehdotuksia.

Viimeisenä, mutta ei vähäisimpänä, kiitän LK Satu Kurkelaa gradukäsikirjoitukseni täsmällisestä tarkastelusta elintarviketieteisiin perehtymättömän tutkijan näkökulmasta sekä henkisesti tuesta tutkielman vaativan viimeistelyvaiheen aikana.

Pro gradu -tutkielman tekeminen oli minulle monella tavalla opettavainen kokemus. Mielikuvat tutkimuksesta vaihtuivat omakohtaiseen kokemukseen tutkimuskeskuksessa työskentelystä. Havaitsin, että aivan kuten ei tavallisessa arkielämässäkään, tutkimustyössäkään kaikki ei aina sujunut suunnitelmien mukaan, asioihin ei voinut vaikuttaa niin paljon kuin olisi halunut, eikä turhankaan työn tekemiseltä voinut kokonaan välttyä. Kaikki tutkimus ei ollut niin tieteellistä, ja tutkijatkin olivat lopulta ihmisiä siinä missä muutkin omine yksilöllisine toimintatapoineen ja tunteineen kaikkineen.

Helsingissä lokakuussa 2003

Antti Knaapila

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

ESIPUHE

1 JOHDANTO	8
2 KIRJALLISUUSKATSAUS: TRANSGLUTAMINAASI	11
2.1 Historia	11
2.2 Luokittelu, nimitykset ja esiintyminen	12
2.3 Katalysoidut reaktiot	14
2.4 Reaktiomekanismi	17
2.5 Rakenteet	19
2.6 Aktiivisuuteen vaikuttavat tekijät	22
2.6.1 Substraatit	22
2.6.2 Aktivaattorit	25
2.6.3 Inhibiittorit	25
2.6.4 Lämpötila ja vetyionipitoisuus	27
2.7 Biologinen merkitys	28
2.7.1 Verihyytymän vahvistaminen	29
2.7.2 Muita merkityksiä	30
2.8 Käyttösovelluksia	31
2.8.1 Maitoproteiinien muokkaus ja maitotuotteiden valmistus	31
Johdanto	
Kaseiinien muokkaus	
Heraproteiinien muokkaus	
Maitotuotteiden valmistus	
2.8.2 Lihaproteiinien muokkaus ja lihatuotteiden valmistus	37
2.8.3 Gelatiinin muokkaus	40
2.8.4 Kananmunan proteiinien muokkaus	41
2.8.5 Viljaproteiinien muokkaus ja viljatuotteiden valmistus	42
Johdanto	
Viljaproteiinien muokkaus	
Viljatuotteiden valmistus	
2.8.6 Soija- ja herneproteiinien muokkaus	50
2.8.7 Muita elintarvikesovelluksia	52
2.9 Käytön ravitsemuksellinen merkitys	54
2.10 Yhteenveto	55
3 KOKEELLINEN TUTKIMUS	57
3.1 Tavoitteet	57
3.2 Materiaalit ja menetelmät	57
3.2.1 Entsyymit	57
3.2.2 Substraatit	58
Proteiinit	
Peptidit	
Aminohapot ja fenoliset hapot	
3.2.3 Muut reagenssit	59

3.2.4	Laitteet ja välineet	60
3.2.5	Entsyymiaktiivisuusmääritykset	62
	Transglutaminaasiaktiivisuuden määrittäminen	
	Tyrosinaasiaktiivisuuden määrittäminen	
	Lakkaasiaktiivisuuden määrittäminen	
3.2.6	Proteiinipitoisuusmääritys	64
3.2.7	Substraattien valmistus	64
	Kauraproteiinien uutto	
	Gluteenin fraktiointi uuttamalla	
	Gluteniinin geelisuodatuskromatografinen fraktiointi	
3.2.8	Malliproteiinien entsymaattiset käsittelyt	67
3.2.9	Malliproteiinien reaktioseosten analyysimenetelmät	68
	Natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (SDS-PAGE)	
	Geelisuodatuskromatografia (GPC)	
3.2.10	Lakkaasin ja tyrosinaasin katalysoimien reaktioiden seuranta happielektrodilla	72
3.2.11	Lakkaasin ja tyrosinaasin katalysoimien reaktioiden reaktiotuotteiden analysointi nestekromatografia-massaspektrometrialla (LC-MS) ja UV/VIS-spektrofotometrialla	73
	Nestekromatografia-massaspektrometria (LC-MS)	
	UV/VIS-spektrofotometria	
3.3	Tulokset	74
3.3.1	Proteiinien eristys	74
	Kauraproteiinit	
	Gluteniini ja gliadiini	
3.3.2	Lakkaasin ja tyrosinaasin vaikutukset malliproteiineihin ilman fenolisia happoja	76
3.3.3	Lakkaasin ja tyrosinaasin vaikutukset aminohappoihin ja peptideihin	78
	Kysteiinin hapettuminen kystiiniksi lakkaasin vaikutuksesta	
	Synteettisten peptidien hapettuminen tyrosinaasin vaikutuksesta	
3.3.4	Lakkaasin ja tyrosinaasin vaikutukset malliproteiineihin fenolisten happojen läsnä ollessa	80
	Fenolisten happojen hapettuminen	
	Malliproteiinien ristositoutuminen fenolisten happojen läsnä ollessa	
3.3.5	Transglutaminaasin vaikutukset gluteniiniin ja gliadiiniin	85
3.4	Pohdinta	86
3.4.1	Malliproteiinien valmistus	88
3.4.2	Malliproteiinien ristositominen lakkaasilla ja tyrosinaasilla	90
3.4.3	Gluteniinin ja gliadiinin ristositominen transglutaminaasilla	97
4	PÄÄTELMÄT	99
	LÄHDELUETTELO	100

1 JOHDANTO

Entsyymit ovat proteiineja, jotka spesifisesti katalysoivat kemiallisia reaktioita. Useat elämälle välttämättömät kemialliset reaktiot tapahtuvat eliöissä riittävän nopeasti juuri entsyymien ansiosta. Entsyymejä esiintyykin kaikissa eliöissä. Elintarvikeraaka-aineiden luontaiset entsyymit vaikuttavat elintarvikkeiden laatuun, ja niitä voidaan myös tietoisesti hyödyntää elintarvikkeiden valmistuksessa (Whitaker, 1996). Elintarvikkeiden valmistusprosesseissa voidaan haluttujen vaikutusten aikaansaamiseksi käyttää myös kasvi- tai eläinperäisistä materiaaleista eristettyjä tai bioteknisesti mikrobeilla tuotettuja entsyymejä (James ja Simpson, 1996).

Bioteknisesti tuotettuja entsyymejä alettiin käyttää elintarviketeollisuudessa 1900-luvulla. Niiden avulla voidaan muun muassa hajottaa laktoosi maidosta (laktaasilla), juoksettaa juustoa (kymosiinilla), kirkastaa hedelmämehuja (pektinaaseilla), valmistaa tärkkelyksestä siirappia (amylaaseilla) tai tehdä suklaakonvehdin sisuksesta miellyttävän pehmeä (invertaasilla) (James ja Simpson, 1996). Elintarvikeraaka-aineiden ominaisuuksia ja elintarvikkeiden rakennetta voidaan muokata myös ristisidoksia muodostavilla entsyymeillä. Ristisitovat entsyymit katalysoivat kovalenttisten ristisidosten muodostumista biopolymeereihin, kuten proteiineihin (Gerrard, 2002). Proteiinien ristisitomisen suhteen kiinnostavia entsyymejä ovat muun muassa transglutaminaasi, tyrosinaasi ja lakkaasi.

Transglutaminaasi (EC 2.3.2.13) on transferaasientsyymi, joka katalysoi primaaristen amiinien liittymistä proteiinien glutamiinitähteisiin. Primaarisista amiinisubstraateista transglutaminaasi suosii peptidiketjuun liitetyn lysiinin sivuketjun aminoryhmää. Luonnossa pääasiallinen transglutaminaasin katalysoima reaktio onkin proteiinien glutamiini- ja lysiinitähteiden sivuketjujen liittyminen yhteen. Tällä tavoin proteiinien välille muodostuvat isopeptidiristisidokset lisäävät proteiinien lujuutta muun muassa verihyytymässä, ihossa ja hiuksissa (Folk ja Finlayson, 1977). Transglutaminaaseja on eristetty niin eläimistä, kasveista kuin mikrobeistakin (Serafini-Fracassini ym., 1995).

Transglutaminaasin on havaittu ristisitovan useimpia elintarvikeproteiineja (Seguro ym., 1996a). Glutamiini- ja lysiinitähteitä ympäröivien alueiden aminohappojärjestyksen on havaittu vaikuttavan ristisidoksen muodostumisnopeuteen (Folk, 1983). Proteiinin kelpoisuutta transglutaminaasin substraatiksi ei kuitenkaan voida ennustaa pelkästään substraattiproteiinin primaarirakenteen perusteella (Aeschlimann ja Paulsson, 1994), eikä edelleenkään täysin tunnetta mekanismeja, joilla transglutaminaasit tunnistavat substraattinsa (Ariëns ym., 2002).

Lakkaasi (EC 1.10.3.2) on määritelmän mukaan *para*-difenoleja hapettava oksidoreduktaasi. Lakkaasin substraattina toimivat difenolit voivat olla myös substituoituja, ja jotkin sienilakkaasit hapettavat myös substituoituja monofenoleja. Siten hyvin monet fenoliset yhdisteet ovat lakkaasin substraatteja. Tyrosiini ei kuitenkaan ole lakkaasin substraatti. Lakkaasin katalysoimassa reaktiossa molekulaarinen happi toimii elektroniakseptorina ja pelkistyy vedeksi fenolisen yhdisteen hapettuessa. Lakkaasi hapettaa difenolin semikinoniksi, vapaaksi fenoksidiradikaaliksi, joka on erittäin reaktiivinen ja voi reagoida edelleen ei-entsymaattisesti hyvin monien yhdisteiden kanssa. Lakkaasi voi myös hapettaa semikinonin edelleen kinoniksi (Mayer ja Staples, 2002; Flurkey, 2003). Fenolisten yhdisteiden lisäksi lakkaasi hapettaa muitakin yhdisteitä, kuten diamiineja (Thurston, 1994).

Lakkaasit voidaan karkeasti jakaa toisistaan poikkeaviin sienten ja kasvien lakkaaseihin, joista sienten lakkaaseja on tutkittu enemmän. Sienissä lakkaaseja esiintyy yleisesti, mutta korkeammissa kasveissa paljon rajoitetummin. Kasveissa lakkaasi on mukana soluseinien lignifikaatiossa, joskin entsyymin merkitystä siinä ei tarkasti tunneta. Valkolahottajasienten lakkaasit osallistuvat puiden ligniinin hajottamiseen, ja kasvitauteja aiheuttavien sienten lakkaasit suojaavat sieniä kasvien puolustusaineenvaihduntatuotteilta (Mayer ja Staples, 2002).

Lakkaasin sovellukset perustuvat usein lakkaasin kykyyn muodostaa vapaita radikaaleja, jotka reagoivat hyvin monenlaisten yhdisteiden kanssa ja siten mahdollistavat lakkaasin monipuolisen soveltamisen. Bioteknisesti tuotetun lakkaasin käyttöä on tutkittu muun muassa sellun valkaisussa ja väriaineiden poistossa jätevesistä (Mayer ja Staples, 2002). Elintarvikkeiden valmistuksessa lakkaasin soveltamista on tutkittu muun muassa viinin varastoinninaikaisten värin- ja maunmuutosten ehkäisyyn, oluen, viinin ja mehujen varastoinninaikaisen samentumisen ehkäisyyn, sokerijuurikaspektiinin geeliyttämiseen ja leivontaan (Minussi ym., 2002). Sokerijuurikaspektiinin geeliyttämisessä (Norsker ym., 2000; Kuuva ym., 2003) ja leivonnassa (Labat ym., 2001) lakkaasin arvellaan vaikuttavan lopputuotteeseen muodostamalla ristisidoksia polysakkarideihin fenolisen yhdisteen, ferulahapon, välityksellä. Sen sijaan lakkaasin kykyä muodostaa ristisidoksia proteiineihin on tutkittu vain vähän.

Tyrosinaasilla on kahdenlaista entsymaattista aktiivisuutta: monofenolien hapettaminen *orto*-difenoleiksi (EC 1.14.18.1) ja *orto*-difenolien hapettaminen edelleen *orto*-kinoneiksi (EC 1.10.3.1). Kummassakin reaktiossa fenolien hapettuessa molekulaarinen happi pelkistyy vedeksi. Muodostuneet kinonit ovat reaktiivisia ja voivat reagoida edelleen ei-entsymaattisesti (Ramírez ym., 2003). Yleinen tyrosinaasin substraatti on tyrosiini, josta tyrosinaasin toimin-

nan ja sen jälkeisten ei-entsymaattisten reaktioiden kautta muodostuu keltaisia ja punaisia feomelaniineja sekä ruskeita ja mustia eumelaniineja (Marmol ja Beermann, 1996).

Tyrosinaasia esiintyy monissa kasveissa, sienissä ja eläimissä, kuten ihmisessä ja muissa nisäkkäissä. Tyrosinaasi aiheuttaa nisäkkäiden ruskettumista ja hedelmien ruskistumista (Marmol ja Beermann, 1996; Ramírez ym., 2003). Joidenkin hedelmien, kuten omenien ja banaanien, korjuun, varastoinnin ja prosessoinnin aiheuttamat mekaaniset vauriot edistävät tyrosinaasin ja sen substraattien pääsyä toistensa luo ja siten hedelmien ja niistä tehtyjen tuotteiden, kuten mehujen, ruskistumista. Ei-toivottua ruskistumista voidaan ehkäistä muun muassa hapen poistolla sekä kuumennuskäsittelyllä tyrosinaasin inaktivoimiseksi. Joidenkin tuotteiden, kuten kahvin, teen, kaakaon, rusinoiden ja kuivattujen luumujen valmistuksessa tyrosinaasin aiheuttama ruskistuminen on kuitenkin toivottua (Ramírez ym., 2003).

Tyrosinaasin on havaittu hapettavan myös proteiinien tyrosiinitähteitä, kunhan ne ovat tyrosinaasin saavutettavissa olevissa asemissa (Cory ja Frieden, 1967). Tyrosinaasin toiminnan tuloksena on lisäksi jo kauan sitten ehdotettu muodostuvan ristisidoksia proteiinien välille (Dabbous, 1966). Ristisidosten on esitetty muodostuvan proteiineihin tyrosinaasin vaikutuksesta siten, että tyrosinaasi hapettaa ensin proteiinin tyrosiinitähteen *orto*-difenoliksi ja edelleen *orto*-kinoniksi, joka voi reagoida ei-entsymaattisesti lysiinitähteen aminoryhmän tai kysteiinitähteen sulfhydryyliryhmän kanssa muodostaen ristisidoksen (Matheis ja Whitaker, 1984). Ristisidoksen muodostuminen tyrosiini- ja kysteiinitähteiden välille on myöhemmin osoitettu (Takasaki ja Kawakishi, 1997). Ristisidos voi tyrosinaasin vaikutuksesta muodostua myös pienimolekyylisen fenolisen yhdisteen kiinnittyessä proteiinimolekyylien väliin. Tällöin tyrosinaasi hapettaa ensin fenolisen yhdisteen kinonimuotoon, joka sitten reagoi ei-entsymaattisesti proteiinimolekyylien kanssa jääden niihin kiinni (Matheis ja Whitaker, 1984). Monia proteiineja on ristisidottu tyrosinaasilla sopivan fenolisen yhdisteen läsnä ollessa, mutta ilman sitä vain harvoja, esimerkiksi α -laktalbumiinia (Thalmann ja Lötzbeyer, 2002).

Tutkielman kirjallisuusosan tavoitteena oli tehdä katsaus transglutaminaasista ja sen käytöstä elintarvikeproteiinien muokkaamisessa. Kokeellisen osan tavoitteena oli selvittää lakkaasin ja tyrosinaasin kykyä muodostaa kovalenttisia ristisidoksia proteiinimolekyylien välille. Lisäksi tavoitteena oli selvittää transglutaminaasin kykyä ristisitoa vehnän gluteenin gliadiineja ja gluteniineja.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS: TRANSGLUTAMINAASI

2.1 Historia

Jo 1950-luvulla havaittiin joissain eläinkudoksissa entsyymiaktiivisuutta, joka kalsiumionien läsnä ollessa liitti amiineja proteiineihin (Clarke, 1959). Mycek ym. (1959) nimesivät tämän ”amiinia liittävän systeemin” transglutaminaasiksi. Marsun maksa osoittautui jo varhain erityisen hyväksi transglutaminaasin lähteeksi (Clarke, 1959). Siksi suuri osa transglutaminaasin perustutkimuksesta tehtiin 1960-, 1970- ja 1980-luvuilla marsun maksan transglutaminaasilla. Toinen paljon tutkittu transglutaminaasi on entsyymi, joka tunnetaan myös nimellä veren hyytymistekijä XIII (Folk ja Chung, 1973; Folk ja Finlayson, 1977; Folk, 1983).

Pisano ym. (1968) todistivat aiemmin esitetyt epäilyt siitä, että verihyytymän fibriniin muodostuu ϵ -(γ -glutamyyli)lysiiniristisidoksia hyytymistekijä XIII:n vaikutuksesta. Myöhemmin samoja ristisidoksia on havaittu lukuisista muistakin proteiineista, minkä perusteella myös transglutaminaasia on oletettu esiintyvän eliökunnassa laajasti (Folk, 1980). ϵ -(γ -glutamyyli)lysiiniristisidoksia ei ilmeisesti muodostu elävissä eliöissä ilman entsyymaattista katalyysia (Loewy, 1984).

Nisäkäsperäisiä transglutaminaaseja, marsun maksasta eristettyä transglutaminaasia ja naudan veren hyytymistekijä XIII:a, käytettiin transglutaminaasin sovellustenkin tutkimisessa aina 1990-luvun alkuvuosiin asti. Vuonna 1991 julkaistussa katsauksessaan Singh (1991) totesi transglutaminaasin pääasiallisen lähteen olevan marsun maksa ja transglutaminaasin niukkuuden rajoittavan tutkimusta. Vielä vuonna 1993 julkaistussa artikkelissaan Alexandre ym. (1993) tutkivat vehnän gliadiinin käsittelyä naudan veren hyytymistekijä XIII:lla ja totesivat transglutaminaasin heikon saatavuuden olevan rajoite heidän esittämälleen sovellukselle vehnäproteiinien muokkaamisesta transglutaminaasilla.

Jo aivan varhaisimmissa transglutaminaasin toimintaan liittyneissä tutkimuksissa 1950-luvulla havaittiin kaseiinin olevan hyvä substraatti transglutaminaasille (Clarke, 1959). Seuraavina vuosikymmeninä nisäkästransglutaminaaseilla saadut lupaavat tulokset elintarvikeproteiinien ominaisuuksien parantamisesta transglutaminaasilla kannustivat transglutaminaasia tuottavien mikrobien etsintään ja transglutaminaasin bioteknisen massatuotannon aloittamiseen (Motoki ja Seguro, 1998). Ando ym. (1989) seuloivatkin transglutaminaasintuottokykyä yli 5000 maaperämikrobista ja havaitsivat *Streptoverticillium* -sukuun kuuluvan bakteerikannan kasvulie-messä voimakasta transglutaminaasiaktiivisuutta. Tämä oli ensimmäinen mikrobitransgluta-

minaasi, joka puhdistettiin ja jonka aktiivisuuden riippuvuutta olosuhteista selvitettiin (Ando ym., 1989). Myöhemmin myös entsyymien primaarirakenne selvitettiin (Kanaji ym., 1993), sitä tuottanut mikrobikanta tunnistettiin *Streptoverticillium mobaraense* -bakteeriksi (Washizu ym., 1994) ja entsyymi kiteytettiin ja sen kolmiulotteinen rakenne selvitettiin (Kashiwagi ym., 2002).

S. mobaraense -transglutaminaasista tuli ensimmäinen teollisuusmittakaavan käyttöön soveltuva kaupallinen transglutaminaasi. 1990-luvulla japanilainen Ajinomoto Co yhdessä Amano Pharmaceutical Co:n kanssa aloitti ensimmäisenä maailmassa transglutaminaasin bioteknisen massatuotannon fermentaatiotekniikalla *S. mobaraense* -bakteerin avulla (Kuraishi ym., 1996). Transglutaminaasi on ollut Japanissa markkinoilla kevästä 1993 lähtien (Nielsen, 1995) ja myöhemmin Euroopassa, myös Suomessa. Vielä 2000-luvun alussa Ajinomoton tuote oli ainoa kaupallinen teollisuuskäyttöön tarkoitettu transglutaminaasi (Kuraishi ym., 2001). Bioteknisesti tuotettua transglutaminaasia alettiin käyttää elintarviketeollisuudessa ensimmäiseksi surimi-kalahyytelön valmistukseen Japanissa (Kuraishi ym., 2001). Myöhemmin mikrobi-transglutaminaasia on hyödynnetty lukuisissa erilaisissa elintarvikesovelluksissa (Gerrard, 2002; de Jong ja Koppelman, 2002) ja transglutaminaasin käyttöön perustuvia elintarvikkeiden valmistusmenetelmiä on patentoitu kymmenittäin (Nielsen, 1995).

2.2 Luokittelu, nimitykset ja esiintyminen

Transglutaminaasin systemaattinen nimi on proteiini-glutamiini: amiini γ -glutamyyli transferaasi. Systemaattisen nimen määrittelemiä aminoasyylitransferaaseja kutsutaan muun muassa yleisnimityksellä transglutaminaasi (taulukko 1), mutta luonnossa esiintyville rakenteeltaan ja ominaisuuksiltaan erilaisille transglutaminaasimuodoille on myös omia tarkempia nimityksiään (Folk ja Finlayson, 1977; Aeschlimann ja Paulsson, 1994; Griffin ym., 2002).

Taulukko 1. Transglutaminaasinimityksiä.

EC-numero ⁽¹⁾	EC 2.3.2.13
CAS-numero ⁽²⁾	80146-85-6
Systemaattinen nimi	Proteiini-glutamiini: amiini γ -glutamyyli transferaasi
Muita nimiä	Proteiini-glutamiini γ -glutamyyli transferaasi
	<i>R</i> -glutaminyyli-peptidi: amiini γ -glutamyyli transferaasi
	Transglutaminaasi
	TGaasi
	TG

⁽¹⁾ Enzyme Commission, ⁽²⁾ Chemical Abstract Service.

Transglutaminaasit ovat luonnossa yleisesti esiintyviä entsyymejä, joita tavataan usein varsinkin eläinkudoksissa (Folk, 1983). Transglutaminaaseja on havaittu muun muassa plasmassa, verihiutaleissa, maksassa ja ihossa (Folk ja Finlayson, 1977). Nisäkkäistä on eristetty ja karakterisoitu kuusi erilaista transglutaminaasia (taulukko 2), joiden lisäksi kaksi muuta (transglutaminaasit Y ja Z) on tunnistettu genomien perusteella (Griffin ym., 2002). Transglutaminaaseja on havaittu myös selkärangattomissa (Aeschlimann ja Paulsson, 1994), kasveissa (Serafini-Fracassini ym., 1995) ja mikrobeissa. Transglutaminaasia tuottaviksi mikrobeiksi on todettu eräät *Streptovorticillium* (Ando ym., 1989; Tsai ym., 1996; Duran ym., 1998) ja *Bacillus* (Kobayashi ym., 1998; Suzuki ym., 2000; de Barros Soares ym., 2003) -sukujen bakteerit sekä eräät *Physarum* (Klein ym., 1992), *Pythium* (Bech ym., 2002) ja *Phytophthora* (Brunner ym., 2002) -sukujen homeet ja *Saccharomyces cerevisiae* -hiiva (Iranzo ym., 2002).

Taulukko 2. Nisäkästransglutaminaasien nimityksiä.

Transglutaminaasityyppi	Synonyymejä ja lyhennyksiä
Plasman transglutaminaasi	(Veren hyytymis)tekijä XIIIa ⁽¹⁾ Fibriiniä stabiloiva tekijä Fibrinoligaasi
Keratinosyyttien transglutaminaasi	I tyypin transglutaminaasi TGaasi 1, TG 1, TG _K
Kudosten transglutaminaasi	II tyypin transglutaminaasi Sytosolinen transglutaminaasi Maksan transglutaminaasi Endoteelin transglutaminaasi Erytrosyyttien transglutaminaasi TGaasi 2, TG 2, TG _C
Epidermaalinen transglutaminaasi	III tyypin transglutaminaasi Hiustupen transglutaminaasi TGaasi 3, TG 3, TG _E
Eturauhasen transglutaminaasi	IV tyypin transglutaminaasi Dorsaalinen eturauhasproteiini 1 Vesikulaasi TGaasi 4, TG 4, TG _P
Transglutaminaasi X	V tyypin transglutaminaasi TGaasi 5, TG 5

⁽¹⁾ Tekijä XIIIa:n inaktiivista esiastetta kutsutaan tekijä XIII:ksi. Myös muualla elimistössä kuin vapaana plasmassa esiintyvistä samankaltaisista transglutaminaaseista ja niiden esiasteista käytetään vastaavasti nimityksiä tekijä XIIIa ja tekijä XIII.

2.3 Katalysoidut reaktiot

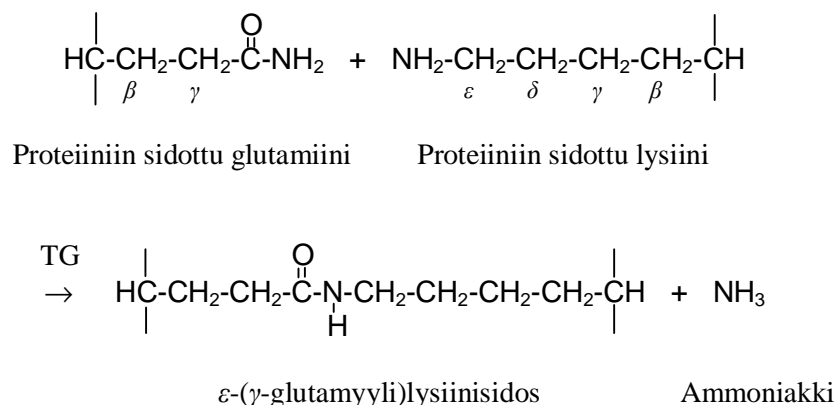
Transglutaminaasi katalysoi asyyliiryhmänsiirtoreaktioita, joissa on aina kaksi eri substraattia. Toinen substraatti on asyylidonori eli asyyliiryhmän luovuttaja ja toinen asyyliakseptori eli asyyliiryhmän vastaanottaja. Reaktiossa syntyvä tuote sisältää usein ristsidoksen ja sivutuotteenä muodostuu lähes poikkeuksetta ammoniakkia. Tyypillisesti, joskaan ei aina, transglutaminaasin katalysoiman reaktion tuloksena muodostuu isopeptidiristsidoksia peptidiketjuissa esiintyvien glutamiini- ja lysiniinitähteiden välille (Folk ja Finlayson, 1977; Folk, 1980).

Transglutaminaasin katalysoimissa reaktioissa asyylidonorina toimii tavallisesti peptidiketjuun sidotun glutamiinitähteen sivuketjun γ -karboksamidiryhmä ja asyyliakseptorina sopiva primaarinen amiini (Folk, 1980). Vapaa glutamiini ei ole substraatti transglutaminaasille, vaan glutamiinin on oltava peptidiketjun osana. Tämä piirre erottaa transglutaminaasin muista glutamiinin γ -karboksamidiryhmän reaktioita katalysoivista entsyymeistä (Folk, 1983). Lisäksi glutamiinitähteen on oltava riittävän pitkän peptidiketjun osana, jotta glutamiini voisi toimia substraattina transglutaminaasille. Esimerkiksi tripeptidi glysiini-glutamiini-glysiini ei Andon ym. (1989) mukaan ollut substraatti marsun maksan eikä *Streptoverticillium mobaraense* -bakteerin transglutaminaasille. Peptidiketjuun sitoutumisen lisäksi glutamiinin on oltava L-isomeeriä kelvataksena substraatiksi transglutaminaasille (Folk, 1983).

Transglutaminaasin substraatiksi ei kelpaa myöskään peptidiin sidottu asparagiini, jonka rakenteessa ainoa ero glutamiiniin verrattuna on yhtä metyleeniryhmää ($-\text{CH}_2-$) lyhyempi sivuketju (Folk ja Finlayson, 1977). Eristetyn transglutaminaasin on laboratoriokokeissa (*in vitro*) havaittu käyttävän asyylidonorina myös joitakin alifaattisia amideja ja estereitä (Folk ja Chung, 1973; Folk ja Finlayson, 1977; Folk, 1983). Kuitenkin eliöissä (*in vivo*) transglutaminaasin katalysoimissa reaktioissa asyylidonorina toimii todennäköisesti ainoastaan peptidiketjuun sidottu L-glutamiini (Folk, 1983).

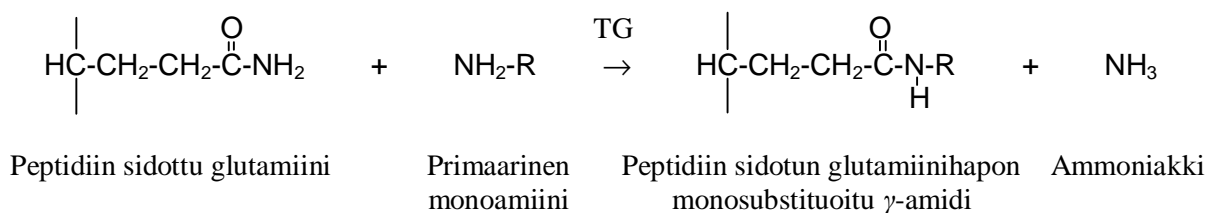
Transglutaminaasin substraattispesifisyys asyyliakseptoreita kohtaan ei ole yhtä ehdotonta kuin asyylidonoreja kohtaan. Asyyliakseptorina voi toimia peptidiketjuun sidotun lysiniinitähteen sivuketjun ϵ -aminoryhmä sekä monet primaariset amiinit, diamiinit ja polyamiinit (Folk, 1980; Folk, 1983). Myös vapaan lysiinin sekä L- että D-isomeerit kelpaavat asyyliakseptoreiksi, mutta muut aminohapot eivät (Clarke ym., 1959). Monista vaihtoehtoista ilmeisesti biologisesti tärkein ja paras akseptorisubstraatti transglutaminaasille on kuitenkin peptidiketjuun sidottu L-lysiini (Folk ja Finlayson, 1977; Folk, 1980). Siten transglutaminaasin biologisesti

keskeisimmässä reaktiossa proteiinin peptidiketjuun sidottu L-glutamiini reagoi saman tai toisen proteiinimolekyylin peptidiketjuun sidotun L-lysiinin kanssa. Lysiinin ei tarvitse olla yhtä ehdottomasti L-isomeeriä kuin glutamiinin, mutta transglutaminaasi kuitenkin suosii L-lysiiniä substraattina D-lysiiniin verrattuna, kun lysiiini on peptidiketjuun sidottu (Folk, 1983). Peptidiketjuun sidotun glutamiinin γ -karboksamidiryhmän reagoidessa peptidiketjuun sidotun lysii-
nin ϵ -aminoryhmän kanssa muodostuu aminohappotähteiden välille ϵ -(γ -glutamyyli)lysiini-
isopeptidisidos ja vapautuu ammoniakkia (kuva 1) (Folk ja Finlayson, 1977; Loewy, 1984).



Kuva 1. Biologisesti tärkein transglutaminaasin (TG) katalysoima reaktio, ϵ -(γ -glutamyyli)lysiinisidoksen muodostuminen proteiiniin sidottujen glutamiinin ja lysiiinin välille.

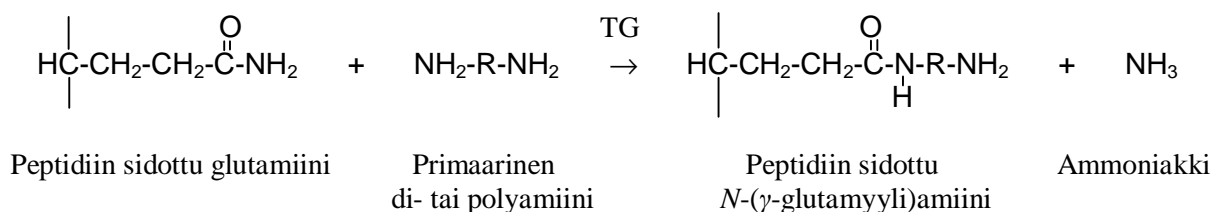
Laboratoriokokeissa peptidiketjuun sidottuun glutamiiniin on marsun maksan transglutaminaasin avulla onnistuttu liittämään myös monia primaarisia mono-, di- ja polyamiineja (Folk, 1980). Monet primaariset amiinit ovat myös mikrobitransglutaminaasien substraatteja. Esimerkiksi hydroksyyliamiinin, kadaveriinin ja histamiinin on *in vitro* havaittu olevan *Streptovorticillium cinnamoneum* -bakteerin transglutaminaasin substraatteja (Duran ym., 1998). Luontaisten amiiniyhdisteiden putreskiinin, spermidiinin ja spermiinin on havaittu toimivan transglutaminaasin substraatteina myös biologisissa järjestelmissä (Serafini-Fracassini ym., 1995). Primaaristen monoamiinien reagoidessa peptidiketjuun sidotun glutamiinin kanssa syntyy peptidiketjuun sidotun glutamiinihapon monosubstituoituja γ -amideja ja vapautuu ammoniakkia (kuva 2), mutta ristsidosta toisen peptidiketjun kanssa ei muodostu (Folk, 1980).



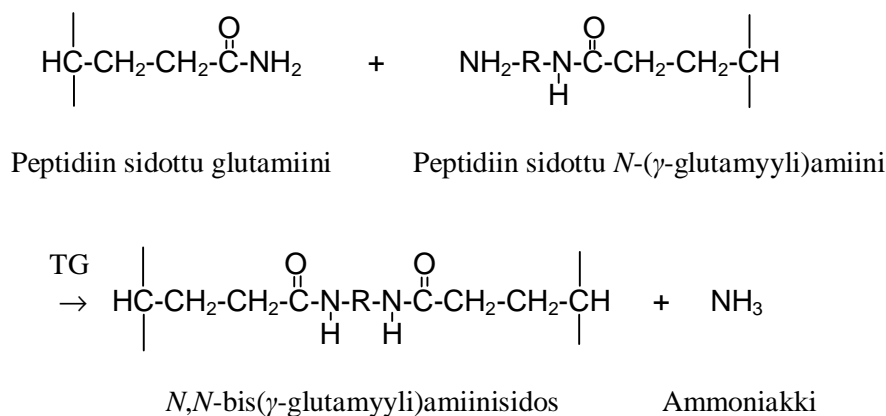
Kuva 2. Primaarisen monoamiinin liittyminen peptidiketjuun sidottuun glutamiiniin transglutaminaasin (TG) katalysoimana.

Primaaristen di- ja polyamiinien liittyessä vain yhden aminoryhmänsä avulla peptidiketjuun sidottuun glutamiiniin syntyy peptidiin sidottuja *N*-(γ -glutamyyli)amiineja ja ammoniakkia vapautuu (kuva 3, reaktio a). Jos muodostuneet peptidiketjuun sidotut *N*-(γ -glutamyyli)amiinit reagoivat vapaan aminoryhmänsä kanssa edelleen toisen peptidiketjuun sidotun glutamiinin kanssa, peptidiketjujen välille syntyy *N,N*-bis(γ -glutamyyli)amiinisidos eli (γ -glutamyyli)polyamiinisidos (kuva 3, reaktio b) (Folk, 1980).

a)



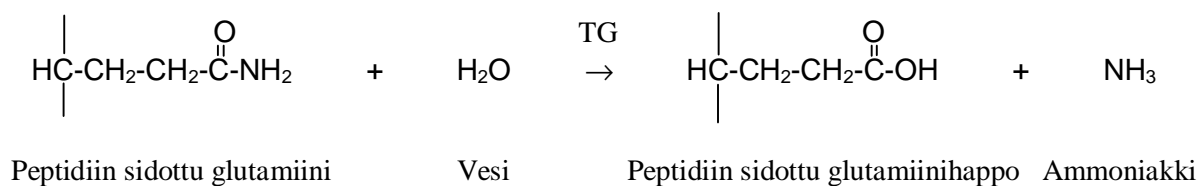
b)



Putreskiini: R = -(CH₂)₄-
 Spermiidiini: R = -(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-
 Spermiini: R = -(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-NH-(CH₂)₃-

Kuva 3. Transglutaminaasin (TG) katalysoima primaaristen di- ja polyamiinien liittyminen peptidiketjuun sidottuun glutamiiniin (a) ja muodostuneen *N*-(γ -glutamyyli)amiinin liittyminen edelleen toiseen peptidiketjuun sidottuun glutamiiniin, jolloin peptidiketjujen välille muodostuu *N,N*-bis(γ -glutamyyli)amiinisidos (b).

Mikäli sopivaa primaarista amiinia ei ole läsnä riittävästi, myös vesi voi toimia reaktiossa asyyliakseptorina. Veden reagoidessa peptidiketjuun sidotun glutamiinin kanssa transglutaminaasin vaikutuksesta glutamiini deamidoituu (hydrolysoituu) glutamiinihapoksi ja ammoniakkia vapautuu (kuva 4) (Folk ja Chung, 1985).



Kuva 4. Peptidiketjuun sidotun glutamiinin deamidoituminen glutamiinihapoksi transglutaminaasin (TG) katalysoimana.

Laboratoriokokeissa transglutaminaasin on havaittu katalysoivan myös reaktioita, joissa asyyli-donorina toimii peptidiketjuun sidotun glutamiinin sijasta sopiva alifaattinen amiini (kuva 5, reaktiot a ja b), esteri (kuva 5, reaktiot c ja d) tai niin sanottu aktiivinen esteri (kuva 5, reaktiot e ja f). Kussakin tapauksessa asyyliakseptorina voi toimia primaarinen amiini (aminolyysi) tai vesi (hydrolyysi) (Folk, 1983).

- a) $\text{R}^1\text{-CO-NH}_2 + \text{R}^4\text{-NH}_2 \rightarrow \text{R}^1\text{-CO-NH-R}^4 + \text{NH}_3$
- b) $\text{R}^1\text{-CO-NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R}^1\text{-COOH} + \text{NH}_3$
- c) $\text{R}^1\text{-CO-O-R}^2 + \text{R}^4\text{-NH}_2 \rightarrow \text{R}^1\text{-CO-NH-R}^4 + \text{R}^2\text{-OH}$
- d) $\text{R}^1\text{-CO-O-R}^2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R}^1\text{-COOH} + \text{R}^2\text{-OH}$
- e) $\text{R}^3\text{-CO-O-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2 + \text{R}^4\text{-NH}_2 \rightarrow \text{R}^3\text{-CO-NH-R}^4 + \text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2$
- f) $\text{R}^3\text{-CO-O-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R}^3\text{-COOH} + \text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2$

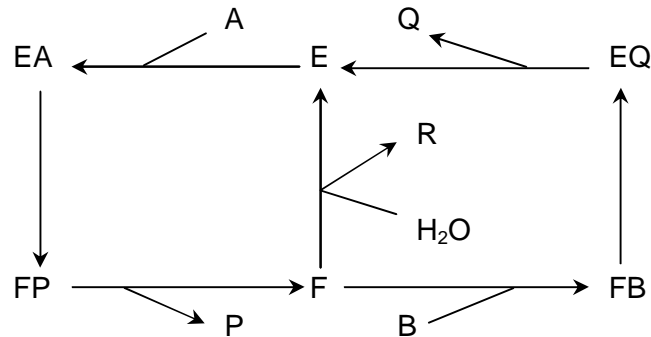
Kuva 5. Transglutaminaasin (TG) *in vitro* katalysoimia pienimolekyylisten substraattien aminolyysi- ja hydrolyysireaktioita (C_6H_4 = 1,4-asemasta sidottu aromaattinen rengas).

Marsun maksan ja *Physarum polycephalum* -homeen transglutaminaaseilla on havaittu olevan myös GTP:n (guanosiditrifosfaatti) fosfaattiosia hydrolysoivaa aktiivisuutta (Wada ym., 2002). Kudostransglutaminaasi (TG 2) pystyy myös ainakin *in vitro* hydrolysoimaan ϵ -(γ -glutamyyli)lysiinisidoksesta glutamiinihapon ja lysiinin vapaiksi (Fesus ja Piacentini, 2002).

2.4 Reaktiomekanismi

Marsun maksan transglutaminaasin ja tekijä XIIIa:n katalysoimien reaktioiden on havaittu kunkin reaktion tapauksessa tapahtuvan muunnetulla double displacement eli ping pong -mekanismilla. Reaktio käsittää kaksi vaihetta. Ensimmäisessä vaiheessa entsyymi muodostaa väliuotteen ensimmäisen substraatin kanssa ja samalla vapautuu ensimmäinen tuote (reaktion

sivutuote). Toisessa vaiheessa ensimmäisessä vaiheessa muodostunut entsyymi-substraatti-välituote reagoi toisen substraatin kanssa, jolloin muodostuu toinen tuote (reaktion varsinainen tuote) ja entsyymi vapautuu (kuva 6) (Folk, 1983).



E = entsyymi
 A = asyylidonori
 F = asyyli-entsyymi -välituote
 P = ensimmäinen tuote (yleensä NH_3)
 B = asyyliakseptori (muu kuin H_2O)
 Q = isopeptididoksen sisältävä tuote
 R = hydrolyysituote

Kuva 6. Transglutaminaasin reaktiomekanismi. Jos muuta asyyliakseptoria kuin vettä (B) on tarpeeksi, reaktio kulkee kuvion ulkokehää pitkin. Veden toimiessa asyyliakseptorina reaktio kulkee kuvion vasenta osakehää pitkin ja toisena tuotteena syntyy isopeptididoksen sisältävän tuotteen (Q) sijasta hydrolyysituotetta (R). Kaksikirjaimiset merkinnät tarkoittavat kyseisten yhdisteiden ei-kovalenttista sitoutumista.

Reaktion ensimmäisessä vaiheessa vapaan transglutaminaasientsyymien amidinsitomiskohtaan liittyy asyylidonori, esimerkiksi peptidiketjuun sidottu glutamiini. Transglutaminaasin katalyyttisen kohdan vapaa sulfhydryyliryhmä ($-\text{SH}$) reagoi glutamiinitähteen γ -karboksamidiryhmän kanssa, jolloin muodostuu kovalenttisesti sidottu asyyli-entsyymi -välituote ja ensimmäinen tuote (kokonaisreaktion sivutuote) ammoniakki vapautuu. Transglutaminaasiin sidottu ensimmäisen substraatin (asyylidonorin) asyyliosaa vaikuttaa entsyymien kykyyn sitoa toinen substraatti siten, että asyyliakseptorina toimiva toinen substraatti voi sitoutua entsyymiin vastan jälkeen kun entsyymi-asyyli -välituote on muodostunut ja ensimmäinen tuote vapautunut. Mikäli sopivaa primaarista amiinia on läsnä, amiini toimii asyyliakseptorina ja sitoutuu transglutaminaasin (asyyli-entsyymi -välituotteen) amiininsitomiskohtaan. Sen jälkeen asyylidonorin ja -akseptorin välille muodostuu isopeptididosis ($-\text{CO}-\text{NH}-$), sidoksen sisältävä yhdiste (varsinainen reaktiotuote) vapautuu ja entsyymi palaa alkuperäiseen vapaaseen tilaansa (Folk, 1983; Aeschlimann ja Paulsson, 1994).

Jos transglutaminaasille sopivaa primaarista amiinia ei ole läsnä, asyyli-entsyymi -välituote reagoi veden kanssa, jolloin muodostuu asyylidonorin hydrolyysituote ja entsyymi vapautuu. Esimerkiksi proteiiniin sidotun glutamiinin tapauksessa glutamiinitähde deamidoituu glutamiinihappotähteeksi. Asyyli-entsyymi -välituotetta ei voi vesiliuoksissa kerääntyä, sillä vesi toimii tarvittaessa asyyliakseptorina transglutaminaasin kaikkien asyylidonorien tapauksessa (Folk, 1983).

2.5 Rakenteet

Transglutaminaasin molekyyli muodot vaihtelevat monomeerisistä entsyymeistä moniyksikköisiin entsyymikomplekseihin ja sellaisenaan aktiivisista entsyymeistä spesifisen proteolysin kautta aktivoituihin proentsyymeihin. Transglutaminaaseilla on kuitenkin myös yhteisiä rakennepiirteitä. Kaikilla transglutaminaaseilla on katalyyttisessä keskuksessaan transglutamiinaasiaktiivisuudelle välttämätön vapaan sulphydryyliryhmän omaava kysteiinitähde (Folk, 1980). Nisäkästransglutaminaaseilla katalyyttisen keskuksen kysteiinitähden ympäristön aminohappojärjestys on hyvin konservoitunut ja yleisesti glysiini-glutamiini-kysteiini-tryptofaani-valiini-fenyyialaniini (Ha ja Iuchi, 2003). Toistaiseksi vain harvojen mikrobitransglutamiinaasien primaarirakenne on selvitetty, mutta niidenkin on päätelty sisältävän katalyyttiselle aktiivisuudelle välttämättömän kysteiinitähden, koska sen kanssa palautumattomasti reagoivat kemikaalit inhiboivat entsyymin (Kanaji ym., 1993).

Plasmassa esiintyvä veren hyytymistekijä XIII (tekijä XIII) on tetrameeri, joka koostuu kahdesta identtisestä pallomaisesta a-alayksiköstä ja kahdesta identtisestä nauhamaisesta b-alayksiköstä, jotka ovat kietoutuneet a-alayksikköjen ympärille. Tetrameeristä, joka on inaktiivinen proentsyymi, käytetään merkitä a_2b_2 . Sen a-alayksiköt voidaan spesifisellä proteolyyysillä muuttaa katalyyttisesti aktiiviseen muotoon, joista käytetään merkintää a'_2 . Katalyyttisesti inaktiiviset b-alayksiköt stabiloivat a-alayksikköjä ja veren hyytymisessä erkanevat a-alayksiköistä niiden aktivoinnin jälkeen kalsiumionien (Ca^{2+}) vaikutuksesta. Aktivoidusta tekijä XIII:sta käytetään merkintää XIIIa. Myös muualla kuin plasmassa esiintyy transglutaminaaseja, joiden rakenne on plasman tekijä XIII:ssa esiintyvän a-alayksiköistä muodostuneen dimeerin kaltainen. Siksi näitä esimerkiksi verihiutaleissa ja istukassa esiintyviä transglutaminaasimuotoja kutsutaan myös tekijä XIII:ksi (Folk, 1983; Ichinose ym., 1990; Aeschlimann ja Paulsson, 1994; Muszbek ym., 1999).

Ihmisen tekijä XIII:n a-alayksiköt koostuvat 731 aminohappotähteestä ja ovat molekyyli­mas­saltaan noin 83 kDa. Plasmassa, verihiutaleissa ja istukassa esiintyvät muodot ovat kooltaan identtisiä. a-alayksiköt sisältävät yhdeksän kysteiinitähdettä, joista mitkään eivät ilmeisesti ole mukana disulfidisidoksissa. Yksiköt eivät sisällä myöskään hiilihydraattiosia, vaikka mahdol­lisia N-glykosylaatiokohtia on kuusi (Ichinose ym., 1990). Tekijä XIII:n b-alayksiköt koostu­vat 641 aminohappotähteestä ja sisältävät 8,5 % hiilihydraattia. Hiilihydraattiosineen kunkin b-alayksikön massa on noin 79,7 kDa. b-alayksiköt sisältävät myös disulfidisidoksia ja solun ulkopuolelle eritettävälle proteiineille tyypillisen leadersekvenssin, jota a-alayksiköt eivät si­sällä. a-alayksiköistä koostuneet tekijä XIII:t pysyvätkin solulimassa esimerkiksi verihiuta­leissa. Jotkin kudokset kuitenkin erittävät a-alayksiköitä suoraan vereen mekanismilla, jota ei tunneta (Ichinose, 1990; Aeschlimann ja Paulsson, 1994).

Kudosten transglutaminaasi (TG_C) on yhdestä 685-691 aminohappotähdettä käsittävästä poly­peptidiketjusta muodostunut entsyymi, jonka molekyyli­massa on noin 77 kDa. Entsyymi ei si­sällä disulfidisidoksia eikä hiilihydraattiosia. Vaikka entsyymi ei sisällä myöskään leadersek­venssiä, entsyymin erittymisestä solunulkoiseen tilaan on viitteitä (Aeschlimann ja Paulsson, 1994).

Keratinosyyttien transglutaminaasi (TG_K) on noin 820 aminohappotähteestä koostunut mono­meerinen entsyymi, jonka molekyyli­massa on noin 89-90 kDa. Entsyymi esiintyy keratino­syyttien solukalvossa soluliman puolella ja on kiinnittynyt solukalvoon rakenteeseensa liitty­neiden rasvahappojen avulla. Epidermaalinen transglutaminaasi (TG_E) käsittää ihmisellä ja hiirellä 692 aminohappoyksikköä ja on molekyyli­massaltaan noin 77 kDa. Entsyymi on mo­nomeerinen ja vaatii proteolyyttistä aktivaatiota toisin kuin keratinosyyttien transglutaminaa­si. Eturauhasen transglutaminaasin (TG_P) on rotalla havaittu olevan kahdesta 668 aminohap­potähdettä käsittävästä alayksiköstä koostuva homodimeeri, jonka kokonaismolekyyli­massa on noin 150 kDa (Greenberg ym., 1991; Aeschlimann ja Paulsson, 1994).

Kanajin ym. (1993) mukaan *Streptovorticillium mobaraense* -bakteerin transglutaminaasi on yhdestä 331 aminohappotähdettä käsittävästä polypeptidiketjusta koostunut monomeerinen entsyymi, jonka molekyyli­massa on noin 38 kDa. Entsyymissä ei ole disulfidisidoksia ja se si­sältää vain yhden kysteiinitähteen, joka on vapaa ja välttämätön entsyymin aktiivisuudelle. Entsyymissä ei myöskään ole hiilihydraattiosia, vaikka siinä on kaksi mahdollista N-glykosy­laatiokohtaa. Vaikka *S. mobaraense* -transglutaminaasin primaarirakenne on hyvin erilainen kuin nisäkästransglutaminaasien, entsyymien katalyyttisten keskusten sekundaarirakenteet

muistuttavat toisiaan (Kanaji ym., 1993). Pasternack ym. (1998) havaitsivat *S. mobaraense* -bakteerin erittävän transglutaminaasinsa kasvuliemeen inaktiivisena esiasteena. Bakteerin havaittiin myös erittävän proteaasia, joka kasvuliemessä aktivoi transglutaminaasin irrottamalla siitä 45 aminohapon pituisen aktivaatiopeptidin *N*-terminaalista. Kashiwagi ym. (2002) selvittivät *S. mobaraense* -transglutaminaasin kolmiulotteisen rakenteen ja havaitsivat sen olevan tiivis ja kiekkomainen ja sisältävän 11 α -heeliksiä ja 8 β -laskosta.

Tsai ym. (1996) puhdistivat *Streptovercillium ladakanum* -bakteerin tuottaman, monomeeriseksi olettamansa transglutaminaasin ja määrittivät sille molekyylipainoksi 30,5 ja 37,5 kDa määritystavasta riippuen. Myöhemmin myös Ho ym. (2000) eristivät molekyylimassaltaan noin 40 kDa:in kokoisen *S. ladakanum* -transglutaminaasin, mutta eivät tutkineet sen muita rakenneomaisuuksia. Duran ym. (1998) havaitsivat *Streptovercillium cinnamoneum* -bakteerin transglutaminaasin olevan monomeerinen, yhdestä 330 aminohappotähdettä sisältävästä polypeptidiketjusta koostunut entsyymi, jonka primaarirakenne muistutti *S. mobaraense* -transglutaminaasin rakennetta. *S. cinnamoneum* -transglutaminaasin molekyylimassaksi määritettiin noin 38 kDa ja sen havaittiin sisältävän vain yhden kysteiinitähteen.

Klein ym. (1992) puhdistivat *Physarum polycephalum* -homeen tuottaman transglutaminaasin, jonka havaittiin olevan molekyylimassaltaan noin 77 kDa:in kokoinen dimeeri. Sen monomeeristen yksiköiden todettiin liikkuvan elektroforeesissa identtisesti ja olevan molekyylimassoiltaan noin 40 kDa:in kokoisia. Kuitenkin Mottahedeh ja Marsh (1998) eristivät *P. polycephalum* -homeen tuottaman monomeerisen transglutaminaasin, jonka molekyylimassaksi määritettiin noin 100 kDa. Mottahedeh ja Marsh uskoivat myös, että Kleinin ym. havaitsema 40 kDa:in transglutaminaasimonomeeri olisikin ollut transglutaminaasin hajoamistuote tai epäpuhtaus, ja totesivat, että Kleinin ym. havaitsema transglutaminaasidimeeri saattoi sen sijaan vastata heidän eristämäänsä transglutaminaasimonomeeria. Myöhemmin Wada ym. (2002) eristivät *P. polycephalum* -homeen tuottaman, molekyylikooltaan noin 100 kDa:in monomeerisen transglutaminaasin, jonka arvioitiin olevan sama kuin Mottahedehin ja Marshin (1998) eristämä. Wada ym. (2002) havaitsivat *P. polycephalum* -transglutaminaasin muistuttavan primaarirakenteeltaan nisäkästransglutaminaaseja, varsinkin eturauhasen transglutaminaasia (TG 4). Vaikka *P. polycephalum* -transglutaminaasin aminohappojärjestys ei yleisesti ottaen ole kovin samanlainen kuin nisäkästransglutaminaasien, sen katalyyttistä keskusta, kalsiumionien sitomiskohtaa ja GTP:n sitomiskohtaa vastaavien alueiden havaittiin olevan hyvin samankaltaisia nisäkästransglutaminaasien kanssa. Sen sijaan *P. polycephalum* -transglutami-

naasin primaarirakenteesta ei havaittu yhtään bakteeritransglutaminaasien kanssa samankaltaista aluetta.

Brunner ym. (2002) osoittivat *Phytophthora sojae* -kasvipatogeenisienen soluseinän erään glykoproteiinin transglutaminaasiksi, jonka molekyylimassaksi määritettiin noin 42 kDa. Vastaavankaltaisia proteiineja havaittiin esiintyvän myös seuraavissa *Phytophthora* -suvun sienissä: *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamoni*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. infestans*, *P. nicotianae*, *P. palmivora* ja *P. parasitica*. Brunnerin ym. mukaan *Phytophthora* -transglutaminaasien primaarirakenne eroaa muista tähän asti tutkituista transglutaminaaseista muuten paitsi katalyyttisen keskuksen kysteiinitähteen ympäristöltään, jonka aminohappojärjestys muistuttaa jonkin verran nisäkästransglutaminaasien vastaavaa.

Suzuki ym. (2000) eristivät *Bacillus subtilis* -bakteerin itiöistä kaksi transglutaminaasia, joiden molempien molekyylimassaksi määritettiin 29 kDa. De Barros Soares ym. (2003) eristivät *Bacillus circulans* -bakteerin transglutaminaasin, jonka molekyylilikooksi määritettiin 45 kDa. Bakteeriperäiset transglutaminaasit ovat yleisesti molekyylimassaltaan pienempiä kuin nisäkästransglutaminaasit. Homeiden transglutaminaasit muistuttavat molekyylimassaltaan yleisesti ottaen enemmän nisäkä- kuin bakteeritransglutaminaaseja. Yhteenveto transglutaminaasien rakennepiirteistä on taulukossa 3.

2.6 Aktiivisuuden vaikuttavat tekijät

2.6.1 Substraatit

Transglutaminaasin katalysoimien reaktioiden reaktionopeuteen vaikuttaa sekä asyylidonorin että -akseptorin rakenne. Peptidiketjuun sidottujen substraattien tapauksessa myös niiden vierisillä aminohappotähteillä on vaikutusta (Folk, 1983). Eri transglutaminaasit voivat käyttää saman proteiinin eri glutamiinitähteitä substraatikseen eri tehokkuuksilla, eivätkä kaikki glutamiinia ja lysiiniä sisältävät proteiinit toimi lainkaan substraatteina transglutaminaasille (Aeschlimann ja Paulsson, 1994). Denaturoituminen ja proteolyysi saattavat kuitenkin edistää proteiinien toimimista transglutaminaasin substraatteina (Greenberg ym., 1991).

Entsyymien ja makromolekulaaristen substraattiproteiinien välisten vuorovaikutusten seuraukset eivät kuitenkaan välttämättä tule esiin pienimolekyylisillä peptideillä, joilla substraattien rakenteen vaikutusta reaktionopeuteen on paljon tutkittu (Folk, 1983). Ariëns ym. (2002) toteivat, että vaikka pienillä peptideillä tehdyt tutkimukset ovat antaneet tietoa yksittäisten gluta-

miini- ja lysiinitähteiden vieressä olevien aminohappotähteiden vaikutuksesta reaktioon, eivät vuorovaikutukset, jotka ohjaavat kolmen makromolekyylin (kaksi substraattimolekyyliä ja entsyymi) asettumista ristisidoksen muodostumiseen johtavalla tavalla, ole selvillä. Myös Aeschlimann ja Paulsson (1994) huomauttivat, että vaikka proteiinin kelpoisuuteen substraattiksi transglutaminaasille vaikuttaa ainakin jonkin verran glutamiinitähteiden lähistön aminohappojärjestys, ei järjestyksessä ole voitu tutkittujen proteiinien perusteella havaita mitään yleistä säännönmukaisuutta. Transglutaminaasille reaktiivisen glutamiinitähteen ympäristön aminohappojärjestys voi olla monenlainen (taulukko 4), mutta silti kaikki glutamiinitähteet eivät natiiveissa proteiineissa välttämättä reagoi transglutaminaasin kanssa. Esimerkiksi kaseiineissa Cristensenin ym. (1996) mukaan α_{S1} - ja α_{S2} -kaseiinien 15 glutamiinitähteestä 4, β -kaseiinin 14 glutamiinitähteestä 4 ja κ -kaseiinin 21 glutamiinitähteestä 5 reagoi transglutaminaasin kanssa.

Taulukko 3. Transglutaminaasien rakennepiirteitä.

Transglutaminaasityyppi	Alayksikkö-rakenne	Molekyyli-massa (kDa)	Monomeerin aminohappotähteiden lukumäärä	Isoelekt-roninen piste (pI)	Proteaasi-aktivaation tarve
Nisäkästransglutaminaaseja					
Tekijä XIII					
Plasma	Tetrameeri (a ₂ b ₂)	320	a: 731; b: 641	-	Kyllä
Verihiutale	Dimeeri (a ₂)	166	731	-	Kyllä
Kudosten transglutaminaasi	Monomeeri	77	685-691	-	Ei
Keratinosyyttien transglutaminaasi	Monomeeri	90	820	-	Ei
Epidermaalinen transglutaminaasi	Monomeeri	77	692	-	Kyllä
Eturauhasen transglutaminaasi	Dimeeri	150	668	-	-
Mikrobitransglutaminaaseja					
<i>Streptovercillium mobaraense</i>	Monomeeri	37,9 ⁽¹⁾	331	8,9	Kyllä ⁽⁴⁾
<i>Streptovercillium ladakanum</i>	Monomeeri	30,5 ⁽²⁾ ; 37,5 ⁽³⁾	-	7,9	-
<i>Streptovercillium cinnamoneum</i>	Monomeeri	37,6 ⁽¹⁾	330	> 9	-
<i>Bacillus subtilis</i>	Monomeeri	29 ⁽³⁾	-	-	-
<i>Bacillus circulans</i>	Monomeeri	45 ⁽³⁾	-	6,3	-
<i>Physarum polycephalum</i>	Dimeeri	77 ⁽²⁾	-	-	-
<i>Physarum polycephalum</i>	Monomeeri	96 ⁽²⁾ ; 101 ⁽³⁾	-	-	-
<i>Phytophthora sojae</i>	Monomeeri	42 ⁽³⁾	-	-	-

⁽¹⁾ Määritetty massaspektrometrisesti.

⁽²⁾ Määritetty geelisuodatuskromatografisesti.

⁽³⁾ Määritetty natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE).

⁽⁴⁾ Mikrobi erittää itse proteaasiaktivaatiossa tarvittavan proteaasin.

- = ei tietoa.

Taulukko 4. Transglutaminaasille reaktiivisen glutamiinitähteen (lihavoitu) ympäristön aminohappojärjestys joissakin transglutaminaasin substraattiproteiineissa.

Proteiini	Aminohappojärjestys reaktiivisen glutamiinitähteen ympärillä
Kaseiineja ⁽¹⁾	
α_{S1} -kaseiini	Glu-Gly-Ile-His-Ala- Gln -Gln-Lys Tyr-Lys-Val-Pro- Gln -Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser His-Gln-Gly-Leu-Pro- Gln -Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-Leu Glu-Pro-Met-Ile-Gly-Val-Asn- Gln -Glu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro
α_{S2} -kaseiini	Lys-Ile-Ser- Gln -Arg His-Tyr- Gln -Lys Thr-Val-Tyr- Gln -His- Gln -Lys
β -kaseiini	Ala-Val-Pro-Tyr-Pro- Gln -Arg Ala- Gln -Thr- Gln -Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro Ser-Leu-Pro- Gln -Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr- Gln -Thr-Pro-Val-Val
κ -kaseiini	Val- Gln -Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val Tyr-Tyr-Gln- Gln -Lys-Pro-Val-Ala-Leu Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn- Gln -Asp-Lys-Thr-Glu-Ile-Pro Lys-Ile-Ala-Lys-Tyr-Ile-Pro-Ile- Gln -Tyr-Val-Leu
Muita proteiineja ⁽²⁾	
Aktiini	Ile-Val-Gly-Arg-Pro-Arg-His- Gln -Gly-Val-Met-Val-Gly-Met-Gly
Kollageeni III aminopeptidi	Gly-Gly-Cys-Ser-His-Leu-Gly- Gln -Ser-Tyr-Ala-Asp-Arg-Asp-Val
Hemoglobiini (lämpödenaturoitu α -ketju)	Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala- Gln -Val-Lys-Gly-His-Gly-Lys-Lys
Glukagoni	His-Ser- Gln -Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala- Gln -Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met
Insuliini (A-ketju)	Gly-Ile-Val-Glu- Gln -Cys-Cys-Ala-Ser-Val-Cys-Ser Ala-Ser-Val-Cys-Ser-Leu-Tyr- Gln -Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn
β -endorfiini	Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser- Gln -Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe
Fosfoglyseraattikinaasi (His ³⁸⁸ → Gln -mutantti)	Gly-Val-Thr-Asp-Lys-Ile-Ser- Gln -Val-Ser-Thr-Gly-Gly-Gly-Ala

⁽¹⁾ Cristensen ym., 1996, ⁽²⁾ Coussons ym., 1991.

Primaarisessa amiinissa aminoryhmän lähellä olevien ryhmien hydrofobisuuden on havaittu edistävän amiinin toimimista transglutaminaasin substraattina. Duran ym. (1998) havaitsivat *Streptovercillium cinnamoneum* -transglutaminaasilla tekemissään tutkimuksissa sellaisten primaaristen amiinien olevan hyviä substraatteja transglutaminaasille, joissa amiiniryhmään oli liittynyt neljästä kuuteen metyleeniryhmää sisältävä hiilivetyketju. Tällaisia ovat esimerkiksi lysiini, spermiini, spermidiini, kadaveriini, butyyliamiini ja heksyyliamiini. Samoin hyd-

rofobisen aromaattisen ryhmän sisältävien amiinien kuten bentsyyliamiinin ja fenyylityyliamiinin havaittiin olevan hyviä substraatteja, kun taas negatiivisesti varatun ryhmän aminoryhmän lähellä sisältävät yhdisteet kuten glysiini ja 4-aminovoihappo eivät toimineet substraatteina ollenkaan.

2.6.2 Aktivaattorit

Nisäkkäiden transglutaminaasit tarvitsevat yleisesti aktivaattoreikseen kalsiumioneja (Ca^{2+}), mutta kasvien ja mikrobien transglutaminaaseista vain jotkin (Aeschlimann ja Paulsson, 1994). Ainakin marsun maksan transglutaminaasin tapauksessa kalsiumionit voitiin Clarcken ym. (1959) mukaan korvata strontiumioneilla (Sr^{2+}) ja vähäisemmässä määrin myös mangaani- (Mn^{2+}), barium- (Ba^{2+}) ja magnesiumioneilla (Mg^{2+}). Kasvien transglutaminaasien kalsiumionien tarve vaihtelee entsyymistä toiseen (Serafini-Fracassini ym., 1995). Myös mikrobitransglutaminaasit eroavat toisistaan kalsiumionien tarpeen suhteen. *Physarum polycephalum*- (Klein ym., 1992; Mottahedeh ja Marsh, 1998) ja *Phytophthora sojae* -homeiden (Brunner ym., 2002) transglutaminaasien aktiivisuus on ehdottoman riippuvainen kalsiumioneista. Kalsium- ja magnesiumionit aktivoivat myös *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan transglutaminaasia (Iranzo ym., 2002). Sen sijaan transglutaminaasit *Streptovercillium* -suvun bakteereista *S. mobaraense* (Ando ym., 1989), *S. ladakanum* (Tsai ym., 1996) ja *S. cinnamomeum* (Duran ym., 1998) eivät tarvitse kalsiumioneja aktivaattoreikseen, kuten eivät myöskään *Bacillus* -suvun bakteerien *B. subtilis* (Suzuki ym., 2000) ja *B. circulans* (de Barros Soares ym., 2003) transglutaminaasit.

2.6.3 Inhibiittorit

Yleisesti ottaen transglutaminaasin katalyyttisen keskuksen sulfhydryyliryhmän hapettavat ja siihen kiinnittyvät yhdisteet inhiboivat transglutaminaasin, kun taas sulfhydryyliryhmän vapaaksi pelkistävät pelkistimet, kuten merkaptetaanoli ja ditiotreitoli, ylläpitävät transglutaminaasin aktiivisuutta (Ha ja Iuchi, 2003). Esimerkiksi alkyyli-isosyanaatit (R-N=C=O) inhiboivat transglutaminaasin reagoimalla spesifisesti sen katalyyttisen keskuksen kysteiinitähteen vapaan sulfhydryyliryhmän kanssa ja kiinnittymällä tioesterisidoksella entsyymiin (Folk ja Finlayson, 1977). Jodoasetamidi (2 mM) ja *p*-kloromerkuribentseenisulfonihappo (1 mM) inhiboivat marsun maksan transglutaminaasin täydellisesti (Clarke ym. 1959). Andon ym. (1989) mukaan *N*-etyylimaleimidi, monojodiasetaatti ja *p*-kloromerkuribentsoehappo inhiboivat sekä marsun maksan transglutaminaasia että *S. mobaraense* -bakteerin transglutaminaasia ja Tsain ym. (1996) mukaan myös *S. ladakanum* -bakteerin transglutaminaasia. Muun muassa

N-etyylimaleimidi inhiboi myös *S. cinnamoneum*- (Duran ym., 1998), *B. subtilis*- (Suzuki ym., 2000), ja *B. circulans* (de Barros Soares ym., 2003) -bakteerien sekä *P. polycephalum* -homeen (Klein ym., 1992; Mottahedeh ja Marsh, 1998) transglutaminaasit palautumattomasti.

Clarke ym. (1959) havaitsivat, että jotkin metalli-ionit, kuten kupari- (Cu^{2+}), elohopea- (Hg^{2+}), sinkki- (Zn^{2+}) ja rautaionit (Fe^{2+}), inhiboivat marsun maksan transglutaminaasia kalsiumionien läsnä ollessakin. Kupari-ionien on havaittu inhiboivan kudosten transglutaminaasia hapettamalla sen vapaita sulfhydryyliryhmiä molekyylinsisäisiin disulfidisidoksiin, kun taas sinkki-ionien on todettu inhiboivan tekijä XIIIa:ta ja kudosten transglutaminaasia kilpailemalla kalsiumionien kanssa. Sinkki- ja kalsiumionipitoisuuksien suhteella saattaa olla merkitystä transglutaminaasiaktiivisuuden säätelyssä eliöissä (Aeschlimann ja Paulsson, 1994). Tsain ym. (1996) mukaan *S. ladakanum* -transglutaminaasi inhiboitui lyijy- (Pb^{2+}), sinkki- ja kupari-ioneista yleisesti ottaen voimakkaammin kuin *S. mobaraense* -transglutaminaasi.

Kalsiumioneita sitovat yhdisteet kuten sitraatti, fosfaatti ja EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo) inhiboivat kalsiumioneista riippuvaisia transglutaminaaseja, mutta inhibiittorivaikutus voidaan kumota ylimäärällä kalsiumioneja (Clarke ym., 1959; Ha ja Iuchi, 2003). Sen sijaan *S. mobaraense* -transglutaminaasin havaittiin olevan yhtä aktiivinen kalsiumionien läsnä ollessa kuin ilman niitä, eikä EDTA:lla ollut inhiboivaa vaikutusta tähän transglutaminaasiin (Ando ym., 1989), kuten ei myöskään *S. ladakanum*- (Tsai ym., 1996; Ho ym., 2000), *B. subtilis*- (Suzuki ym., 2000) eikä *B. circulans* (de Barros Soares ym., 2003) -transglutaminaaseihin.

Transglutaminaasin ϵ -(γ -glutamyyli)lysiinisidosten muodostamiskyvyn suhteen voidaan joitain primaarisia amiineja, kuten hydroksyyliamiinia, monodansyylikadaveriinia, putreskiinia, spermiidiiniä ja spermiiniä, pitää transglutaminaasien kompetitiivisina inhibiittoreina (Ha ja Iuchi, 2003). Klein ym. (1992) havaitsivat suurten putreskiini-, spermiini- ja spermiidiinipitoisuuksien aiheuttavan myös transglutaminaasin substraatti-inhibitiota. Lisäksi jotkin synteettiset yhdisteet, kuten 2-(3-[diallyyliamino]-propionyyli)bentsotiofeeni, inhiboivat transglutaminaaseja non-kompetitiivisesti (Ha ja Iuchi, 2003).

Nukleosiditrifosfaatit, kuten GTP ja ATP (adenosiinitrifosfaatti) inhiboivat nisäkkäiden kudostransglutaminaasia (TG 2), nukleosididifosfaatit ja -monofosfaatit sen sijaan vain heikosti tai eivät ollenkaan (Ha ja Iuchi, 2003). Wada ym. (2002) havaitsivat saman pätevän myös

P. polycephalum -homeen transglutaminaasille. Lisäksi GTP:n inhiboivan vaikutuksen havaittiin olevan riippuvainen kalsiumionipitoisuudesta siten, että mitä pienempi kalsiumionipitoisuus oli, sitä suurempi oli GTP:n inhiboiva vaikutus.

2.6.4 Lämpötila ja vetyionipitoisuus

Aitotumallisten eliöiden (eukaryoottien), kuten nisäkkäiden ja homeiden, transglutaminaasien optimilämpötilat ovat yleensä matalampia kuin alkeistumallisten eliöiden (prokaryoottien), kuten bakteerien, transglutaminaasien (taulukko 5). Tämä tarkoittaa sitä, että alkeistumallisten eliöiden transglutaminaasit ovat yleisesti lämmönkestävämpiä kuin aitotumallisten. Clarke ym. (1959) määrittivät marsun maksan transglutaminaasin optimilämpötilaksi noin 30 °C, Mottahedeh ja Marsh (1998) *Physarum polycephalum* -homeen transglutaminaasin optimilämpötilaksi 37 °C ja Bech ym. (2002) *Phytophthora cactorum* -homeen transglutaminaasin optimilämpötilaksi 45 °C. Ando ym. (1989) määrittivät *S. mobaraense* -transglutaminaasin optimilämpötilaksi noin 50 °C sekä Tsai ym. (1996) saman *S. ladakanum* -transglutaminaasille ja Duran ym. (1998) *S. cinnamomeum* -transglutaminaasille. Ho ym. (2000) määrittivät kuitenkin *S. ladakanum* -transglutaminaasin optimilämpötilaksi vain 40 °C. De Barros Soares ym. (2003) määrittivät *B. circulans* -transglutaminaasille optimilämpötilaksi 47 °C ja Suzuki ym. (2000) *B. subtilis* -bakteerin itiöiden transglutaminaaseille jopa 60 °C.

Eläinten, kasvien ja aitotumallisten mikrobien, kuten homeiden, transglutaminaasien optimiaktiivisuus havaitaan yleensä lievästi emäksisissä oloissa. Bakteerien transglutaminaasien optimiaktiivisuus sen sijaan saavutetaan tavallisesti neutraalissa tai lievästi happamassa (taulukko 5). Clarcken ym. (1959) mukaan marsun maksan transglutaminaasin optimi-pH-arvo oli substraattista riippuen alueella 7,8-8,3. Kasvien transglutaminaasien optimi-pH-arvot ovat alueella 7,6-8,5 (Serafini-Fracassini ym., 1995). Ando ym. (1989) määrittivät optimi-pH-alueeksi *S. mobaraense* -transglutaminaasille alueen 6-7, Tsai ym. (1996) *S. ladakanum* -transglutaminaasille alueen 5-7 ja Duran ym. (1998) *S. cinnamomeum* -transglutaminaasille alueen 5,5-6. De Barros Soares ym. (2003) määrittivät *B. circulans* -transglutaminaasin optimi-pH-arvoksi 7. Suzuki ym. (2000) määrittivät eristämilleen *B. subtilis* -bakteerin itiöiden transglutaminaaseille bakteeritransglutaminaaseille poikkeuksellisen, emäksisellä alueella olevan optimi-pH-arvon 8,2. Mottahedeh ja Marsh (1998) määrittivät *P. polycephalum* -homeen transglutaminaasin optimi-pH-arvoksi 7,5. Bechin ym. (2002) tutkimien *Pythium*- ja *Phytophthora* -sienien transglutaminaasien optimi-pH-arvot vaihtelivat välillä 7,5-8,5.

Taulukko 5. Transglutaminaasien aktiivisuuden riippuvuus lämpötilasta ja vetyionipitoisuudesta. Prosenttiosuudet viittaavat osuuksiin enimmäisaktiivisuudesta. Suluissa tietoja määrittäolosuhteista. k_D = lämpöinaktivoitumisen nopeusvakio, hl = huoneenlämpötila.

Transglutaminaasi	Optimilämpötila	Lämpöstabiili- suus	Optimi-pH	pH-stabiilisuus
Marsun maksan transglutaminaasi ⁽¹⁾	n. 30 °C	-	7,8-8,3	-
Mikrobitransglutaminaaseja				
<i>Streptovercillium mobaraense</i> ⁽²⁾	n. 50 °C (10 min, pH 6,0)	100 %: 40 °C 74 %: 50 °C (10 min, pH 7,0)	6-7 (37 °C)	5-9 (10 min, 37 °C)
<i>Streptovercillium ladakanum</i> ⁽³⁾	50 °C (10 min, pH 6,0)	$k_D = 6,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (50 °C)	5-7 (25 °C)	> 90 %: 5-7 (30 min, 25 °C)
<i>Streptovercillium ladakanum</i> ⁽⁴⁾	40 °C (10 min, pH 6,0)	> 80 %: 40 °C > 50 %: 50 °C (30 min, pH 6,0)	5,5 (37 °C)	> 80 %: 5-7,5 (30 min)
<i>Streptovercillium cinnamoneum</i> ⁽⁵⁾	50 °C (20 min, pH 6,0)	-	5,5-6,0	-
<i>Bacillus subtilis</i> ⁽⁶⁾	60 °C (pH 7,5)	-	8,2 (37 °C)	-
<i>Bacillus circulans</i> ⁽⁷⁾	47 °C (5 min)	> 90 %: 52 °C (5 min)	7	> 90 %: 6-8
<i>Physarum polycephalum</i> ⁽⁸⁾	37 °C (30 min, pH 7,5)	64 %: 44 °C 22 %: 51 °C (30 min, pH 7,5)	7,5 (23 °C)	> 60 %: 6-8,5 (23 °C)
<i>Pythium irregulare</i> ⁽⁹⁾	-	-	8,5 (60 min, hl)	-
<i>Pythium intermedium</i> ⁽⁹⁾	-	-	7,5 (60 min, hl)	-
<i>Pythium ultimum</i> ⁽⁹⁾	-	-	8,0 (60 min, hl)	-
<i>Phytophthora cactorum</i> ⁽⁹⁾	45 °C (pH 7,9)	-	8,5 (60 min, hl)	-
<i>Phytophthora cryptogea</i> ⁽⁹⁾	-	-	7,5 (60 min, hl)	-

⁽¹⁾ Clarke ym. (1959), ⁽²⁾ Ando ym. (1989), ⁽³⁾ Tsai ym. (1996), ⁽⁴⁾ Ho ym. (2000), ⁽⁵⁾ Duran ym. (1998),

⁽⁶⁾ Suzuki ym. (2000), ⁽⁷⁾ de Barros Soares ym. (2003), ⁽⁸⁾ Mottahedeh ja Marsh (1998), ⁽⁹⁾ Bech ym. (2002),

- = ei tietoa.

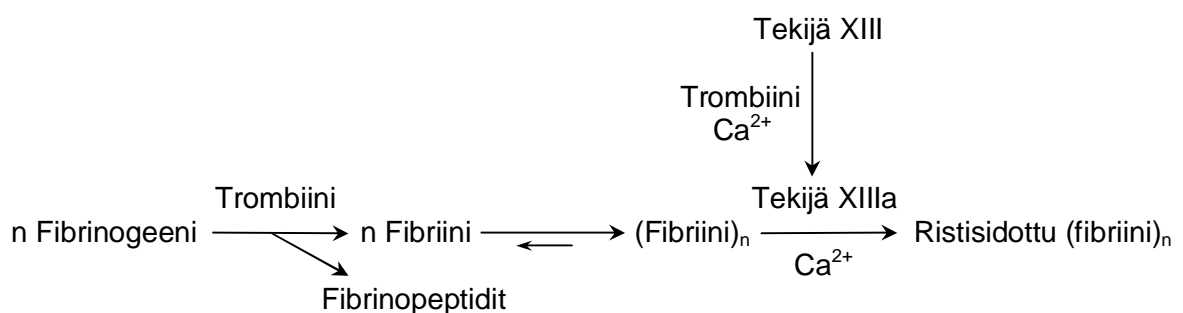
2.7 Biologinen merkitys

Nisäkästransglutaminaaseilla on monia erilaisia biologisia tehtäviä, joista veren hyytymisteki-
jä XIII:n toiminnot tunnetaan parhaiten. *S. mobaraense* -bakteerin kaltaisten mikrobien trans-
glutaminaasien tarkka biologinen merkitys on tuntematon (Kanaji ym., 1993), mutta niiden
arvellaan liittyvän solujen kasvuun ja erilaistumiseen (Pasternack ym., 1998). Kobayashi ym.
(1998) päättelivät *Bacillus subtilis* -bakteerin transglutaminaasin vahvistavan bakteerin itiöi-
den kuorta ja Iranzo ym. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan transglutaminaasin vahvis-
tavan hiivan soluseinää proteiineja ristikotomalla.

2.7.1 Verihyytymän vahvistaminen

Veren hyytyminen on monimutkainen tapahtumasarja, jonka aikana aktivoituu veren hyytymistekijöiksi kutsuttuja entsyymejä. Reaktioketjun alkuvaiheissa yhden tekijän aktivoituminen saa sen pilkkomaan toisesta tekijästä pois osan, jonka seurauksena tämä toinen tekijä aktivoituu ja aktivoi vastaavasti kolmannen tekijän ja niin edelleen (Nienstedt ym., 1999). Veren hyytymistekijä XIII on verenkierrossa kulkeva plasman transglutaminaasi, joka aktivoituna osallistuu veren hyytymisen viimeiseen vaiheeseen, verihyytymän vahvistamiseen (Lorand, 2001).

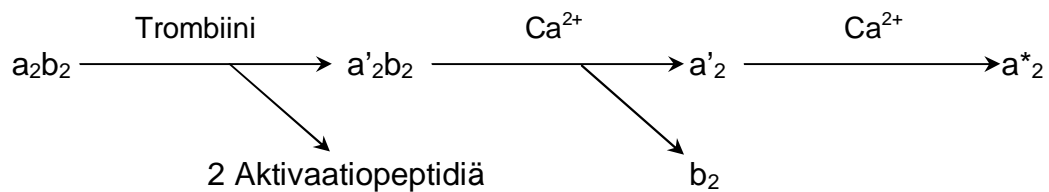
Veren hyytymisen alkuvaiheet johtavat trombiinin syntymiseen protrombiinista (Nienstedt ym., 1999). Trombiini on entsyymi, joka muodostaa fibriniä fibrinogeenistä pilkkomalla siitä pois fibrinopeptidejä ja joka yhdessä kalsiumionien kanssa aktivoi hyytymistekijä XIII:n. Fibrinogeeni on plasman proteiini, josta trombiinin toiminnan tuloksena syntyvä fibrini muodostaa verihyytymän verkkomaisen rungon, johon jää kiinni veren soluja. Muodostuttuaan fibrinimonomeerit alkavat itsestään muodostaa polymeeristä fibriniverkostoa, joka kuitenkin on aluksi löyhä, ennen kuin aktivoitu tekijä XIII, tekijä XIIIa, katalysoi ϵ -(γ -glutamyyli)lysiiniristisidosten syntymistä fibriniäiskeisiin. Ristisidokset vahvistavat fibriniverkostoa ja tekevät siitä liukenemattoman (kuva 7) (Nienstedt ym., 1999; Lorand, 2001). Ariënsin ym. (2002) mukaan fibrinimolekyyleissä on monia mahdollisia ϵ -(γ -glutamyyli)lysiiniristisidosten muodostumispaikkoja ja fibrinihyytymän rakenne sekä tekijä XIIIa:n vaikutukset siihen ovat erittäin monimutkaisia.



Kuva 7. Veren hyytymisen loppuvaiheet. Veren hyytymisen alkuvaiheet johtavat trombiinin muodostumiseen. Trombiini aktivoi kalsiumionien kanssa tekijä XIII:n ja muodostaa fibrinogeenistä fibriniä. Fibrini muodostaa verihyytymän, joka on aluksi löyhä ja pysymätön. Tekijä XIIIa:n toiminnan tuloksena fibriniin syntyy ristisidoksia ja hyytymä kiinteytyy.

Tekijä XIII:n aktivoimisessa on kolme vaihetta. Ensin trombiini hydrolysoi tekijä XIII:n alalayksikköjen arginiini-37:n ja glysiini-38:n välisen peptidisidoksen. Fibrini, aktivoitunut teki-

jä XIII:n substraatti, kiihdyttää huomattavasti näiden niin sanottujen aktivaatiopeptidien leikkaamista (Lorand, 2001). Aiemmin aktivaatiopeptidien oletettiin irtoavan a-alayksikköjen yhteydestä, mutta myös vastakkaisesta on saatu viitteitä. Aktivaatiopeptidien leikkaaminen on välttämätöntä tekijä XIII:n aktivoimiseksi, mutta peptidien irtoamisesta a-alayksikköjen yhteydestä ei ole varmaa tietoa (Ariëns ym., 2002). Seuraavassa vaiheessa tekijä XIII:n a-alayksiköt ja b-alayksiköt erkanevat toisistaan kalsiumionien vaikutuksesta. Lopuksi kalsiumionit aiheuttavat a-alayksikköiden katalyyttisen keskuksen kysteiinin sulfhydryyliryhmän paljastumisen, jolloin muodostuu entsymaattisesti aktiivista tekijä XIIIa:ta (kuva 8) (Lorand, 2001).



Kuva 8. Tekijä XIII:n aktivoituminen veren hyytymisessä. Aluksi trombiini pilkkoo tetrameerisen tekijä XIII:n (a_2b_2) kummastakin a-alayksiköstä aktivaatiopeptidin. Sen jälkeen kalsiumionit aiheuttavat a'_2 - ja b_2 -dimeerien erkanemisen toisistaan ja a' -alayksikköjen katalyyttisten keskusten sulfhydryyliryhmien paljastumisen, jolloin muodostuu entsymaattisesti aktiivista tekijä XIIIa:ta (a^*_2).

Trombiini, fibrini ja tekijä XIII toimivat veren hyytymisen loppuvaiheessa kiinteässä vuorovaikutuksessa keskenään. Kun trombiini on muuttanut 1-2 % fibrinogeenistä fibriniksi, tekijä XIII:n aktivoiminen trombiinilla voi käynnistyä. Tekijä XIIIa alkaa stabiloida fibrinipolymeerejä jo ennen kuin näkyvää verihyytymää on muodostunut, ja yli 90 % tekijä XIIIa:sta jää verihyytymään (Ariëns ym., 2002). Kalsiumionit ovat oleellisia sekä tekijä XIII:n aktivoimisessa että aktivoituneen muodon toiminnassa (Lorand, 2001) sekä monessa veren hyytymisen aikaisemmassa vaiheessa. Jos kalsium sidotaan verestä esimerkiksi etyleenidiamiinitetraetikkahapolla (EDTA), veren hyytymistä ei tapahdu (Nienstedt ym., 1999).

2.7.2 Muita merkityksiä

Muiden transglutaminaasityyppien kuin tekijä XIII:n biologiset tehtävät eivät ole täysin selvillä. Vaikka kudosten transglutaminaasi oli ensimmäinen transglutaminaasi, jonka ominaisuudet selvitettiin, ja vaikka sitä esiintyy merkittäviä määriä useissa selkärankaisten kudoksissa, on sen biologinen merkitys epäselvä (Aeschlimann ja Paulsson, 1994). Kudosten transglutaminaasia todennäköisesti erittyy säädellysti solunulkoiseen tilaan, vaikka entsyymissä ei ole eritettävälle proteiineille tyypillistä leadersekvenssiä. Monien solun sisäisten ja ulkoisten pro-

teiniin on havaittu *in vitro* olevan substraatteja kudostransglutaminaasille. Sen on todettu olevan mukana myös apoptoosissa eli ohjelmoidussa solukuolemassa (Aeschlimann ja Paulsson, 1994; Griffin ym., 2002). Keratinosyyttien ja epidermaalisen transglutaminaasin on havaittu osallistuvan epiteelisolujen erilaistumiseen. Näiden entsyymien toiminnan tuloksena syntyneet isopeptidirisidokset todennäköisesti lujittavat ihon ja karvojen proteiineja yhdessä disulfididisidosten kanssa (Aeschlimann ja Paulsson, 1994).

Elimistössä normaalia pienempi tai suurempi transglutaminaasiaktiivisuus voi aiheuttaa erilaisia tautitiloja. Mutaatioista johtuva tekijä XIII:n aktiivisuuden puute aiheuttaa veren hyytymisajan pitenemistä. Kudosten transglutaminaasin poikkeuksellisen suurta aktiivisuutta on havaittu monien sairauksien yhteydessä. Tällaisia ovat esimerkiksi harmaakaihi, keliakia ja monet hermostosairaudet, kuten Alzheimerin tauti ja Parkinsonin tauti. Usein ei kuitenkaan ole selvää, mikä merkitys epänormaalilla transglutaminaasiaktiivisuudella on (Cooper ym., 2002; Kim ym., 2002).

2.8 Käyttösovelluksia

2.8.1 Maitoproteiinien muokkaus ja maitotuotteiden valmistus

Johdanto

Maidon kaseiinien muokkauksesta transglutaminaasilla lienee julkaistu enemmän tutkimustuloksia kuin minkään muun elintarvikeproteiiniryhmän transglutaminaasikäsittelyistä. Kaseiinin havaittiin olevan hyvä substraatti transglutaminaasille jo 1950-luvulla (Clarke ym., 1959), ja transglutaminaasin käyttöä kaseiinin muokkauksessa ja kaseiinia sisältävien tuotteiden valmistuksessa tutkittiin vilkkaasti varsinkin kaupallisen mikrobitransglutaminaasin markkinoilletulon jälkeen 1990-luvulla (Lorenzen, 2002). Seuraavassa tarkastellaan transglutaminaasin vaikutuksia maidon proteiineihin ja lyhyesti myös transglutaminaasin käyttöä maitotuotteiden valmistuksessa. Laajemmin transglutaminaasin käyttöä maitotuotesovelluksissa ovat käsitelleet muun muassa Lorenzen ja Schlimme (1998) ja Lorenzen (2002).

Maidon proteiinit luokitellaan kaseiineihin ja heraproteiineihin. Kaseiinit luokitellaan edelleen α_{S1} -, α_{S2} -, β -, γ ja κ -kaseiineihin. Heraproteiineja ovat puolestaan α -laktalbumiinit, β -laktoglobuliinit, proteoosipeptonit, immunoglobuliinit ja seerumin albumiini. α_{S1} -, α_{S2} -, β - ja κ -kaseiinit sekä α -laktalbumiinit ja β -laktoglobuliinit syntetisoidaan maitorauhasessa, kun taas immunoglobuliinit ja seerumin albumiini siirtyvät maitoon verenkierrosta. γ -kaseiinit ja proteo-

sipeptonit ovat β -kaseiinien proteolyysituotteita, jotka syntyvät maidon luontaisen proteaasin, plasmiinin, vaikutuksesta. Kaseinaatit, esimerkiksi natriumkaseinaatti, on valmistettu hapolla saostetusta kaseiinista neutraloimalla sitä emäksellä ennen kuivausta (Swaisgood, 1996).

Maidon proteiineista 80 % on kaseiineja ja loput 20 % heraproteiineja. Kaseiinit ja heraproteiinit voidaan erottaa toisistaan liukoisuuden perusteella. Toisin kuin heraproteiinit, kaseiinit saostuvat happamassa (pH 4,6), minkä takia esimerkiksi juuston valmistuksessa kaseiinit muodostavat saostuman, kun taas heraproteiinit jäävät liukoisina heraan. Kaseiinit esiintyvät maidossa kalsiumfosfaatin kanssa pallomaisina miselleinä, jotka aikaansaavat maidon valkoisuuden. Kaseiinimisellien pintaosissa on enimmäkseen κ -kaseiineja ja sisäosissa α - ja β -kaseiineja. α_{s1} -, α_{s2} - ja β -kaseiinit ovat kalsiumionien läsnä ollessa erittäin niukkaliukoisia, koska ne, toisin kuin κ -kaseiinit, sisältävät kalsiumioneja sitovia fosfoseriinitähteitä. Kaikkien tärkeimpien maitoproteiinien primaarirakenne on selvitetty (Swaisgood, 1996).

Kaseiinien muokkaus

Transglutaminaasin on havaittu ristisitovan eri kaseiineja ja vaikuttavan kaseiinia sisältävien liuosten ominaisuuksiin (taulukko 6). Eri kaseiinityyppien välillä on havaittu eroja niiden toimimisessa transglutaminaasin substraatina. Ikura ym. (1980a) havaitsi marsun maksan transglutaminaasin ristisitovan tehokkaammin α_{s1} - ja β -kaseiineja kuin κ -kaseiinia mutta Traoré ja Meunier (1991) puolestaan tekijä XIIIa:n ristisitovan β - ja κ -kaseiinia tehokkaammin kuin α -kaseiinia. Traoré ja Meunier ehdottivat erojen johtuvan entsyymien erilaisuudesta. Sharma ym. (2001) tutkivat *S. mobaraense* -transglutaminaasin vaikutuksia kaseiineihin niiden luonnollisessa olotilassa maidossa ja havaitsivat κ -kaseiinin ristisitoutuvan tehokkaimmin ja β -kaseiinin toiseksi tehokkaimmin lämpökäsittlemättömässä maidossa. Sharma ym. esittivät κ -kaseiinin reaktiivisuuden johtuvan sen sijainnista kaseiinimisellien pintaosissa.

Taulukko 6. Transglutaminaasin (TG) vaikutuksia kaseiineihin.

Tutkimus	TG ⁽¹⁾	Käsitelty proteiinit	Keskeisimmät TG-käsittelyn vaikutukset
Ikura ym., 1980a	1	α_{S1} -, β - ja κ -kaseiinit	Kaikki kaseiinit polymeroituivat, mutta α_{S1} -, β -kaseiinit paljon tehokkaammin kuin κ -kaseiini.
Motoki ym., 1984	1	α_{S1} - ja κ -kaseiinit	α_{S1} -kaseiinin liukoisuus parani pH-alueella 4-6. κ -kaseiinin liukoisuus ei muuttunut. Emulsion stabiilisuus huononi kummankin kaseiinin tapauksessa.
Nio ym., 1985	1	α_{S1} -kaseiini	α_{S1} -kaseiiniliuoksen viskositeetti suureni, kun kaseiinipitoisuus oli 3 % tai yli.
Nio ym., 1986a	1	α_{S1} -kaseiini	TG-annosta suurennettaessa 5-prosenttisen α_{S1} -kaseiiniliuoksen viskositeetti suureni. Tarpeeksi suurella TG-annoksella liuos geeliytyi. Geeli ei hajonnut 100 °C:ssa. Kaseiini, jonka ε -aminoryhmien reagointi TG:n kanssa oli estetty sukkinyloimalla ei geeliytynyt.
Nio ym., 1986b	1	α_{S1} -kaseiini	α_{S1} -kaseiinin ja soijaöljyn emulsio (5 % kaseiinia) geeliytyi. Emulsio, joka tehtiin kaseiinista, jonka lysiinitähteiden ε -aminoryhmien reagointi TG:n kanssa oli estetty asetyloimalla ei geeliytynyt.
Motoki ym., 1986	1	α_{S1} -kaseiini	α_{S1} -kaseiinin, jonka ε -aminoryhmien reagointi TG:n kanssa oli estetty sitrakonyloimalla, glutamiinitähteistä 80 % deamidoitui glutaminihappotähteiksi. Deamidointi laski kaseiinin isoelektristä pistettä ja paransi liukoisuutta pH-alueella 4,5-6.
Nonaka ym., 1989	2	α_{S1} -kaseiini	α_{S1} -kaseiini polymeroitui ja 50 mg/ml -liuoksena myös geeliytyi.
Traoré ja Meunier, 1991	3	α -, β - ja κ -kaseiinit	Kaikki kaseiinit polymeroituivat, mutta β - ja κ -kaseiinit tehokkaammin kuin α -kaseiini.
Nonaka ym., 1992	2	Natrium-kaseinaatti	12,5-prosenttinen kaseinaattiliuos sekä sen ja maissiöljyn emulsio geeliytyivät.
Sakamoto ym., 1994	2	Natrium-kaseinaatti	10-prosenttinen kaseinaattiliuos geeliytyi. Geelin vahvuus suureni TG-annosta lisättäessä, kunnes optimiannoksen jälkeen alkoi pienetä.
Dickinson ja Yamamoto, 1996	2	Natrium-kaseinaatti	8-prosenttinen kaseinaattiliuos ja 4 % kaseinaattia sisältänyt öljy-vesi-emulsio geeliytyivät. Kaseinaattipitoisuutta suurennettaessa geelien vahvuuden suurenivat huomattavasti.
Nonaka ym., 1997b	2	Natrium-kaseinaatti	Gelatiinin kanssa käsiteltynä kaseinaatin liukoisuus parani huomattavasti pH-alueella 3,5-5.
Færgemand ym., 1997a	2	Natrium-kaseinaatti, α_{S1} - ja β -kaseiinit	Kaseinaatin ja α_{S1} - ja β -kaseiinien ristositoutumista tapahtui emulsioiden öljy-vesi -rajapinnoilla, mikä vaikutti emulsioiden ominaisuuksiin. Myös TG:n lisäämisajankohdalla (ennen vai jälkeen emulsion muodostamisen) oli merkitystä.
Færgemand ja Murray, 1998	2	Natrium-kaseinaatti	Kaseinaatti ristositoutui öljy-vesi- ja ilma-vesi -rajapinnoille adsorboituneena.
Færgemand ym., 1998a	2	Natrium-kaseinaatti	Kaseinaattiliuoksesta ja öljystä valmistetun emulsion stabiilisuus parani, kunhan kaseinaatin ristositoutuminen ei ollut liiallista. Koalesenssi, kermoutuminen ja Ostwaldin kypsyminen vähenivät.
Færgemand ym., 1999a	2	Natrium-kaseinaatti, α_{S1} - ja β -kaseiinit	Kaseinaatista ja α_{S1} - ja β -kaseiineista valmistettujen emulsioiden vesi-öljy rajapinnoilla tapahtui ristositoutumista, mikä vaikutti emulsioiden ominaisuuksiin.

⁽¹⁾ 1 = marsun maksan transglutaminaasi, 2 = *Streptoverticillium mobaraense* -transglutaminaasi, 3 = tekijä XIIIa, 4 = *Streptomyces* -transglutaminaasi.

Taulukko 6 (jatkoa).

Tutkimus	TG ⁽¹⁾	Käsitelty proteiinit	Keskeisimmät TG-käsittelyn vaikutukset
Liu ja Damodaran, 1999	4	β -kaseiini	β -kaseiini polymeroitui sitä suuremmiksi tuotteiksi, mitä pidempi oli käsittelyaika. β -kaseiinin emulsionmuodostuskyky heikkeni, mutta emulsioiden stabiilisuus parani käsittelyajan pidentessä.
Schorsch ym., 2000a	2	Kaseiinimisellit	Kaseiinimisellit ristiksiteutuivat ja muodostivat geelin, kunhan olosuhteet olivat sopivat (lämpötila 50 °C ja pH alle 5,4). Happamuus pienensi TG:n aktiivisuutta, mutta vähensi myös misellinen pintavarausta ja siten elektrostaattista repulsiota ja helpotti näin geeliytymistä. Mitä suurempi oli kaseiinipitoisuus, sitä vahvempi geelistä tuli.
Schorsch ym., 2000b	2	Kaseiinimisellit	Verrattuna pelkästään glukonodeltalaktonilla hapattamalla aikaansaatuihin kaseiinimiselligeeleihin, TG:n lisäys aiheutti nopeamman geeliytymisen sekä vahvemman ja lämmönkestävän geelin muodostumisen, jonka huokokset olivat pienemmät ja synereesi vähäisempää.
Sharma ym., 2001	2	Kaseiinimisellit (maidossa)	TG-käsittelyä edeltänyt maidon lämpökäsittely (85 °C, 15 min) lisäsi kaseiinien polymeroitumista TG:n vaikutuksesta. Lämmittämättömässä maidossa κ -kaseiini ristiksiteutui tehokkaimmin, esilämmittelyssä β - ja κ -kaseiinit.

⁽¹⁾ 1 = marsun maksan transglutaminaasi, 2 = *Streptoverticillium mobaraense* -transglutaminaasi, 3 = tekijä XIIIa, 4 = *Streptomyces* -transglutaminaasi.

Maitoa ei voida geeliyttää sellaisenaan (pH 6,7) pelkällä transglutaminaasikäsittelyllä. Transglutaminaasin havaittiin geeliyttävän maitoa vain silloin, kun sen happamuutta lisättiin. Happamassa kaseiinimisellien varaus neutraloituu ja misellien elektrostaattinen repulsio vähenee, jolloin ne pääsevät lähemmäksi toisiaan (Schorsch ym., 2000a ja 2000b). Schorsch ym. (2000b) esittivät mallin transglutaminaasin toiminnasta kaseiinimisellidispersiossa. Sen mukaan neutraaliin liuokseen lisätty transglutaminaasi ristiksiteuttaa kaseiinimolekyyliä kaseiinimisellien pinnalla ja sisällä. Jos liuoksen pH-arvoa lasketaan liian nopeasti, transglutaminaasi ei ehdi ristiksiteuttaa misellien kaseiinia miselleissä ja geelistä tulee heikko. Vahvempi geeli muodostuu, jos transglutaminaasin annetaan toimia neutraalissa riittävän kauan tai jos liuos tehdään happamaksi hitaasti käyttämällä glukonodeltalaktonia. Transglutaminaasin toiminnalla voidaan lujittaa kaseiinimisellejä ja ehkäistä α - ja β -kaseiinien poistumista miselleistä liuoksen pH-arvon laskiessa. Kun liuoksen pH-arvo on tarpeeksi alhainen, misellien varaukset neutraloituvat ja transglutaminaasi alkaa muodostaa ristiksiteutuksia toistensa läheisyyteen tulneiden misellien välille. Schorsch ym. (2000b) mukaan transglutaminaasikäsittelyn seurauksena kaseiinigeeliin muodostuu kovalenttisia sidoksia ja siitä tulee sen vuoksi vahvempi kuin perinteisillä tavoilla hapattamalla tai juoksettamalla valmistetuista geeleistä, joiden muodostuessa syntyy vain heikkoja ei-kovalenttisia sidoksia.

Heraproteiinien muokkaus

Transglutaminaasilla on vaikutuksia myös heraproteiineihin (taulukko 7). Juuston ja kaseinaatin valmistuksessa sivutuotteena syntyvän heran kuiva-aineesta heraproteiineja on noin 15 %, ja kiinnostus niiden käytön tehostamiseen on suuri (Færgemand ym., 1997b). Transglutamiinaasin on kuitenkin havaittu ristisitovan heraproteiineja yleisesti ottaen heikommin kuin kaseiineja (Dickinson ja Yamamoto, 1996). Kaseiinien heraproteiineja parempaa reaktiivisuutta on selitetty kaseiinien epäsäännöllisillä ja joustavilla rakenteilla, joissa lyysiini- ja glutamiinitähtien reaktiivisten ryhmien otaksutaan olevan helpommin transglutaminaasin tavoitettavissa kuin tiiviin pallomaisissa heraproteiineissa (Tanimoto ja Kinsella, 1988). Toisin kuin heraproteiineissa, kaseiineissa ei juurikaan ole molekyyllinsisäisiä disulfidisidoksia: α_{S2} - ja κ -kaseiinit sisältävät niitä vain yhden, α_{S1} - ja β -kaseiinit eivät yhtäkään (Swaisgood, 1996).

Useissa tutkimuksissa heraproteiineja onnistuttiin ristisitomaan transglutaminaasilla vain silloin, kun reaktioseos sisälsi myös ditiotreitolia (Tanimoto ja Kinsella, 1988; Nonaka ym., 1989; Aboumahmoud ja Savello, 1990; Traoré ja Meunier, 1992). Ditiotreitoli, samoin kuin merkaptotaanoli, avaa proteiinien disulfidisidokset (-S-S-) pelkistämällä, jolloin sidoksen muodostamiseen osallistuneet sulfhydryyliryhmät (-SH) vapautuvat (Koningsberg, 1972). α -laktalbumiinin rakennetta stabiloi neljä molekyyllinsisäistä disulfidisidosta ja β -laktoglobuliinin kaksi (Evans ja Gordon, 1980). Heraproteiinien molekyyllinsisäisten disulfidisidosten hajottamisen ja siitä aiheutuvan proteiinin kolmiulotteisen rakenteen muuttumisen on arveltu olevan välttämätöntä, jotta lyysiini- ja glutamiinitähteet tulisivat transglutaminaasin ulottuville (Aboumahmoud ja Savello, 1990). Dickinson ja Yamamoto (1996) havaitsivat kuitenkin transglutaminaasin geelyttävän 13-prosenttisen β -laktoglobuliiniliuoksen ja 8 % β -laktoglobuliinia sisältävän öljy-vesi -emulsion ilman ditiotreitolin tai muun pelkistimen läsnäoloa. Vahvuudeltaan vastaavat geelit muodostuivat kuitenkin transglutaminaasikäsittelyllä jo 9-prosenttisesta natriumkaseinaattiliuoksesta ja 5 % natriumkaseinaattia sisältäneestä öljy-vesi -emulsiosta. Færgemand ym. (1997b) havaitsivat transglutaminaasin polymeroivan ilman pelkistintä heraproteiini-isolaatin α -laktalbumiinia, mutta ei β -laktoglobuliinia. Ditiotreitoli paransi huomattavasti kummankin proteiinin reaktiivisuutta.

Taulukko 7. Transglutaminaasin (TG) vaikutuksia heraproteiineihin.

Tutkimus	TG ⁽¹⁾	Käsitelty proteiini ⁽²⁾	Keskeisimmät TG-käsittelyn vaikutukset
Tanimoto ja Kinsella, 1988	1	β -LG	β -LG polymeroitui reaktioseoksen sisältäessä 10 mM ditiotreitolia. β -LG-liuoksen viskositeetti suureni, mutta vahvaa geeliä ei muodostunut. Ristisidottu β -LG ei saostunut kuumenttaessa kuten natiivi β -LG.
Nonaka ym., 1989	2	BSA	BSA polymeroitui, jos reaktioseoksessa oli myös ditiotreitolia (10 mM).
Aboumahmoud ja Savello, 1990	1	α -LA, β -LG	α -LA ja β -LG polymeroituivat, kun reaktioseos sisälsi 20 mM ditiotreitolia. TG-käsittelyä edeltävä lämpökäsittely (85 °C, 15 min) heikensi proteiinien reaktiivisuutta.
Traoré ja Meunier, 1992	3	α -LA, β -LG, BSA	α -LA, β -LG ja BSA polymeroituivat, jos reaktioseos sisälsi myös pelkistintä, kuten ditiotreitolia (10 mM). TG-käsittelyä edeltävän lämpökäsittelyn ei havaittu parantavan proteiinien reaktiivisuutta.
Dickinson ja Yamamoto, 1996	2	β -LG	13-prosenttinen β -LG-liuos ja 8 % β -LG:a sisältävä öljy-vesi -emulsio geeliytyivät ilman ditiotreitolin tai muun pelkistimen läsnäoloa.
Færgemand ym., 1997b	4	WPI, β -LG	WPI:n sisältämä α -LA polymeroitui jonkin verran ilman ditiotreitolia-kin, β -LG ei. Ditiotreitoli (20 mM) paransi huomattavasti α -LA:n ja β -LG:n reaktiivisuutta. 8-prosenttisen β -LG-liuos muuttui viskoosiksi ja lopulta geeliytyi ditiotreitolin läsnä ollessa.
Færgemand ja Qvist, 1999	4	β -LG	β -LG polymeroitui ja geeliytyi (ditiotreitolin läsnä ollessa) tehokkaammin ilman kalsiumionien läsnäoloa kuin niiden kanssa (5 mM).
Matsumura ym., 2000	1 ja 2	α -LA	α -LA:n polymeroiminen (ditiotreitolin läsnä ollessa) tapahtui aluksi nopeammin marsun maksan kuin <i>S. mobaraense</i> -bakteerin TG:llä, mutta lopulta jälkimmäinen muodosti molekyyli­massaltaan suurempia polymeerejä.
Wilcox ja Swaisgood, 2002	5	WPI	WPI:n proteiinit polymeroituivat, jos reaktioseoksessa oli myös ditiotreitolia (10 mM) tai natriumbisulfaattia (100 mM). 8-prosenttisen WPI-liuoksen viskositeetti suureni.

⁽¹⁾ 1 = marsun maksan transglutaminaasi, 2 = *Streptovercillium mobaraense* -transglutaminaasi, 3 = tekijä XIIIa, 4 = *Streptomyces lydicus* -transglutaminaasi, 5 = tarkemmin määrittelemätön mikrobitransglutaminaasi immobilisoituna.

⁽²⁾ α -LA = α -laktalbumiini, β -LG = β -laktoglobuliini, BSA = naudan seerumin albumiini, WPI = heraproteiini-isolaatti.

Færgemand ja Qvist (1999) havaitsivat kalsiumionien häiritsevän β -laktoglobuliinin polymeroimista ja geeliyttämistä mikrobitransglutaminaasilla, joka ei tarvinnut kalsiumioneja aktivaattoreikseen. Ditiotreitolin ja kalsiumionien yhteisvaikutuksesta β -laktoglobuliini saostui, mikä vaikeutti sen reagoimista transglutaminaasin kanssa. Vastaavasti Matsumura ym. (2000) havaitsivat ditiotreitolin ja kalsiumionien vaikutuksesta tapahtuvan α -laktalbumiinin aggregoitumisen haittaavan α -laktalbumiinin ristisitomista transglutaminaasilla. Færgemand ja Qvist (1999) esittivät, että aikaisemmissa kalsiumioneista riippuvaisilla transglutaminaaseilla tehdyissä tutkimuksissa havaittu β -laktoglobuliinin geeliytyminen johtui todennäköisesti pääasiassa ditiotreitolin ja kalsiumionien aiheuttamista ei-kovalenttisista vuorovaikutuksista eikä niinkään transglutaminaasin aikaansaamista kovalenttisista ristisidoksista.

Maitotuotteiden valmistus

Transglutaminaasin vaikutuksia maidon proteiineihin on tutkittu myös erilaisten tuotteiden, kuten jogurtin ja biohajoavien kalvojen valmistuksessa (taulukko 8). Kaseiinista (Motoki ym., 1987) ja heraproteiineista (Mahmoud ja Savello, 1993; Yildirim ja Hettiarachchy, 1998) havaittiin muodostuvan transglutaminaasin vaikutuksesta biohajoavia kalvoja, joiden liukoisuus veteen ja erilaisiin muihin liuottimiin oli vähäinen, mutta jotka hajosivat ruoansulatusentsyymien, kuten trypsiinin ja kymotrypsiinin, vaikutuksesta. Kalvojen valmistuksessa käytetty di-tiotreitoli kuitenkin estää näiden valmistusmenetelmien suoran soveltamisen elintarvikekäyttöön. Transglutaminaasin on havaittu ehkäisevän nesteen erottumista eli synereesiä jogurtista (Færgemand ym., 1999b; Lorenzen ym., 2002). Lorenzen ym. (2002) päättelivät sen johtuvan jogurtin proteiiniverkoston transglutaminaasin vaikutuksesta pienentyneestä huokoskoosta ja siten parantuneesta vedensidontakyvystä.

Transglutaminaasin havaittiin myös parantavan maidon lämpöstabiilisuutta ristiksiteomalla kaseiinimisellien proteiineja maidossa, mistä voisi olla hyötyä voimakasta kuumennusta vaativissa maitotuotteissa (O'Sullivan ym., 2002b). Esimerkiksi juuston valmistuksessa transglutaminaasista ei ehkä kuitenkaan ole hyötyä, koska transglutaminaasin aiheuttama κ -kaseiinin ristiksiteoutuminen vaikeutti juuston juoksettamista ja koska transglutaminaasi saattaa proteolyyysiä vaikeuttamalla haitata juuston normaalia kypsymistä (O'Sullivan ym., 2002a).

2.8.2 Lihaproteiinien muokkaus ja lihatuotteiden valmistus

Transglutaminaasin käyttö lihateollisuudessa on yksi transglutaminaasin tutkituimmista sovellusaloista (Nielsen, 1995). Seuraavassa tarkastellaan transglutaminaasin käyttöä lihaproteiinien muokkauksessa ja lihatuotteiden valmistuksessa kuitenkin vain lyhyesti. Laajemmin aiheetta käsittelevät muun muassa Nielsen (1995), Motoki ja Seguro (1998), Kuraishi ym. (2001) sekä de Jong ja Koppelman (2002).

Taulukko 8. Transglutaminaasin (TG) vaikutuksia maitoproteiinisovelluksissa.

Tutkimus	TG ⁽¹⁾	Tutkittu sovellus	Keskeisimmät TG-käsittelyn vaikutukset
Motoki ym., 1987	1	Biohajoava kalvo α_{S1} -kaseiinista	Yli 3-prosenttisesta kaseiiniliuoksesta muodostui kalvo, joka ei liennut käytettyihin liuottimiin (SDS, merkaptotaanoli, urea, guanidiinihydrokloridi) eikä kuumaan (100 °C) veteen, mutta hajosi kymotrypsiinilla.
Mahmoud ja Savello, 1993	1	Biohajoava kalvo heraproteiineista	3-prosenttisesta α -laktalbumiinista ja 5-prosenttisesta β -laktoglobuliinista muodostui glyserolin kanssa kalvot, joiden liukoisuus liuottimiin vaihteli ja jotka hajosivat trypsiinillä ja kymotrypsiinillä.
Yildirim ja Hettiarachchy, 1998	1	Biohajoava kalvo heraproteiini-isolaatista	5-prosenttisesta heraproteiini-isolaatista tehdyn kalvon liukoisuus veteen (pH 3-8), SDS:ään ja ureaan oli pienempi kuin ilman TG:a tehdyn, mutta hajoavuus trypsiinillä ja kymotrypsiinillä yhtä hyvä.
Færgemand ym., 1999b	2	Jogurtti	Jogurtin rakenne vahvistui ja nesteen erottuminen siitä väheni. Vähärasvaisen tai -proteiinisen jogurtin rakenteesta tuli aistinvaraisesti arvioituna samankaltainen kuin perinteisen jogurtin.
Imm ym., 2000	3	Rasvaton maitojauhe	TG-käsittelystä rasvattomasta maidosta valmistetusta maitojauheesta kuumentamalla tai hapattamalla tehdyt geelit olivat vahvempia ja sitoivat enemmän vettä kuin vertailumaitojauheesta tehdyt. Parhaat tulokset saatiin kohtuullisella TG-annoksella.
Lorenzen, 2000	3	Rasvaton maitojauhe, natriumkaseinaatti ja heraproteiini-isolaatti	Kaseinaatin vedensidontakyky suureni ja heraproteiini-isolaatin lämmönkestävyys parani. Kaseinaatin avulla tehdyn emulsion stabiilisuus parani. Tuotteiden vaahdonmuodostusominaisuudet eivät parantuneet.
Lauber ym., 2000	3	Jogurtti	Jogurtin rakenne vahvistui niin kauan kun kaseini polymeroitui (60 min).
Lorenzen ym., 2002	3	Jogurtti	Jogurtin rakenne vahvistui ja nesteen erottuminen siitä väheni. Jogurtin aistinvaraisesti arvioidut ominaisuudet muuttuivat vähemmän jogurtille tyypillisiksi.
O'Sullivan ym., 2002a	3	Maito (juuston valmistuksessa)	Kaseiinimisellit stabiloituivat. Juuston juoksettaminen hidastui, eikä onnistunut pitkän TG-käsittelyn jälkeen ollenkaan.
O'Sullivan ym., 2002b	3	Maito (lämpöstabiilisuus, hyytymisen estyminen kuumennettaessa)	Maidon lämpöstabiilisuus (pH >6,7) parani todennäköisesti κ -kaseinin ristositoutumisen ja kaseiinimiselleistä dissosioitumisen estymisen takia. Maidon lämpökäsittely (80 tai 90 °C:ssa) ennen TG-käsittelyä voimisti sen vaikutusta, koska tällöin TG ristosoi lämpödenaturoitunutta β -laktoglobuliinia kaseiniin.

⁽¹⁾ 1 = marsun maksan transglutaminaasi, 2 = *Phytophthora cactorum* -transglutaminaasi, 3 = *Streptoverticillium mobaraense* -transglutaminaasi.

Transglutaminaasilla voidaan ristosita lihan rakenneproteiineja, kuten myosiinia ja aktiinia (de Jong ja Koppelman, 2002). Nonaka ym. (1989) havaitsivat mikrobi-transglutaminaasin polymeroivan viileässä (10 °C) kuitenkin vain jäniksenlihan myosiinia, mutta ei aktiinia, ja myöhemmissäkin tutkimuksissa myosiinin on osoitettu olevan aktiinia parempi substraatti transglutaminaasille. Ristisidosten muodostamisella voidaan vahvistaa esimerkiksi makkaran proteiiniverkostoa, joskin liika ristosidostuminen johtaa liian lujan rakenteen muodostumiseen (de Jong ja Koppelman, 2002). Transglutaminaasin avulla voidaan vahvistaa myös kananlihaa sisältävien makkaroiden rakennetta. Transglutaminaasi toimii makkaramassassa, kunnes val-

mistusprosessissa tuotteen sisälämpötila ylittää 70 °C ja entsyymi inaktivoituu. Koska transglutaminaasin muodostamat ristisidokset ovat hyvin stabiileja, transglutaminaasin makkaran rakennetta vahvistava vaikutus säilyy myös makkaraa kuumennettaessa ja pakastettaessa. Leikkelekinkun valmistuksessa transglutaminaasin on havaittu helpottavan kinkun siivutusta, jolloin siivujen rikkoutuminen leikattaessa vähenee (Kuraishi ym. 2001).

Ramirez-Suarez ja Xiong (2002) tutkivat mikrobitransglutaminaasin vaikutuksia myofibrilli- ja heraproteiini-isolaatteihin ja niiden seokseen. Transglutaminaasi vahvisti myofibrilli-isolaattista lämmitettäessä muodostuvaa geeliä, mutta ei geeliyttänyt lainkaan heraproteiini-isolaattia. Proteiinien seoksesta transglutaminaasin ja lämmityksen vaikutuksesta muodostunut geeli oli myofibrilligeeliä heikompaa, kun sen valmistuksessa käytetty lämpötila oli alle 75 °C. Elektroforeesikokeiden perusteella pääteltiin, että transglutaminaasi ei muodosta ristisidoksia heraproteiinien ja lihasproteiinien välille. Lisäksi transglutaminaasikäsittelyn havaittiin tislatussa vedessä muodostavan lihasproteiineista tiiviimpiä, elektroforeesissa nopeammin liikkuvia molekyylejä. Tämän arveltiin johtuvan transglutaminaasin proteiineihin muodostamista molekyylinsisäisistä ristisidoksista. Vaikutus kuitenkin väheni asteittain reaktioseoksen suolapitoisuutta suurennettaessa, eikä sen havaittu vaikuttavan transglutaminaasin kykyyn muodostaa lihasproteiinien välille ristisidoksia ja vahvistaa lihasproteini-geeliä. Erityisesti myosiinin raskaan ketjun havaittiin toimivan hyvänä substraattina transglutaminaasille.

Transglutaminaasin avulla voidaan liittää pieniä lihanleikkuun tähdepaloja kestävästi yhteen. Transglutaminaasi ei kuitenkaan liitä lihanpaloja suoraan toisiinsa tarpeeksi lujasti ilman väliainetta. Kun kaseinaattia käsitellään transglutaminaasilla, siitä muodostuu viskoosi "liima", jonka avulla lihanpalat voidaan kiinnittää yhteen niin, että tuote kestää viipaloinnin, pakastamisen ja paistamisen (Kuraishi ym., 2001). Kuraishi ym. (1997) tutkivat sianlihapalojen liittämistä toisiinsa mikrobitransglutaminaasilla. Koska transglutaminaasikäsittelyllä lihanpaloja ei saatu kiinnitetyksi suoraan toisiinsa ilman huomattavaa suolamäärää (3 %), tutkittiin eri proteiiniliuosten käyttämistä kiinnittämisen apuna. Transglutaminaasi liitti lihanpalat toisiinsa kaseinaatin mutta ei soijaproteiini-isolaatin, gelatiinin tai heraproteiinien avulla. Paras tulos saavutettiin kaseinaattimäärällä 0,5-1,0 % ja 2-5 tunnin käsittelyajalla jääkaappilämpötilassa (+5 °C). On huomattavaa, että transglutaminaasikäsittely voitiin tehdä tuotteen mikrobiologista laatua ylläpitäen jääkaappilämpötilassa.

Kaseiinin toimimista transglutaminaasin vaikutuksesta hyvänä "liimana" lihapalojen yhteen liittämässä voidaan selittää sillä, että kaseiini on hyvä substraatti transglutaminaasille ja sen

on havaittu liittyvän tehokkaasti myosiiniin. Kurth ja Rogers (1984) tutkivat kaseiinin, glutteenin ja soijan globuliinien liittämistä myosiiniin naudan plasman transglutaminaasin avulla. Tehokkaimmin myosiiniin transglutaminaasin vaikutuksesta kiinnittyi kaseiini, mutta myös gluteenia ja soijan globuliinia onnistuttiin liittämään.

Japanilaisen surimi-kalahyytelön valmistuksessa kalan oman transglutaminaasiaktiivisuuden tiedetään vahvistavan geelin rakennetta ristiksidoksia muodostamalla. Geeliä voidaan edelleen vahvistaa lisätyllä transglutaminaasilla (Motoki ja Seguro, 1998; de Jong ja Koppelman, 2002). Joseph ym. (1994) havaitsivat marsun maksan transglutaminaasin geeliyttävän surimin aktomyosiinia, joka geeliytyi ilman lisättyä transglutaminaasia vain huonosti. Myös Lee ym. (1997a) havaitsivat kalan oman transglutaminaasin vaikuttavan kalageelin vahvuuteen ja lisätyllä mikrobitransglutaminaasilla voitavan edelleen lisätä kalan myosiinin polymeroitumista ja geelin vahvuutta. Lee ym. (1997b) totesivat myös sekä kalan endogeenisen että lisätyn mikrobitransglutaminaasin lisäävän kalaproteiinigeelien elastisuutta. Tsai ym. (1996) havaitsivat *S. ladakanum* -transglutaminaasin vahvistavan makrillisurimin rakennetta, mikäli entsyymiä ei käytetty liikaa, ja entsyymillä polymeroivan tehokkaammin myosiinia kuin aktiinia. Samoin Hsieh ym. (2002) havaitsivat mikrobitransglutaminaasin vahvistavan makrillista valmistetun surimin rakennetta ja lisäksi osoittivat elektroforeesianalyysien perusteella transglutaminaasin ristiksitovan lähinnä myosiinia eikä niinkään aktiinia.

Transglutaminaasin vaikutus surimiin riippuu siihen käytetystä kalalajista. Myös surimin valmistuksessa oikean kokoisen transglutaminaasiannoksen käyttö on tärkeää liiallisen ristiksitomisen välttämiseksi. Transglutaminaasi on laajasti käytössä surimituotteiden valmistuksessa Japanissa (Kuraishi ym., 2001).

Transglutaminaasin käytöllä voidaan korvata suolaa (natriumkloridia) ja fosfaatteja lihatuotteissa, sillä transglutaminaasi parantaa vähäsuolaisten ja fosfaatittomien lihatuotteiden rakennetta ja vedensitomiskykyä. Fosfaattia on kuitenkin vaikea kokonaan korvata transglutaminaasilla (Kuraishi ym., 2001). Myös makkaroiden rasvan korvaamista transglutaminaasilla ristiksidotulla kaseinaatilla on tutkittu (Nielsen, 1995).

2.8.3 Gelatiinin muokkaus

Gelatiinin lämmitetystä vesiliuoksesta muodostuu läpinäkyvä, elastinen geeli, kun liuoksen lämpötila laskee noin 35 °C:een alapuolelle. Uudelleen lämmitettäessä geeli hajoaa, mikä an-

taa gelatiinigeelille sen ainutlaatuisen ominaisuuden "sulaa" suussa. Suhteellisen pienestä lyysiinipitoisuudesta huolimatta gelatiini on hyvä substraatti transglutaminaasille gelatiinin molekulaarisen joustavuuden ansiosta, kunhan gelatiinin valmistuksen yhteydessä sen glutamiinitähteet eivät ole kemiallisesti muuttuneet glutamiinihappotähteiksi (Babin ja Dickinson, 2001). Sakamoto ym. (1994) havaitsivatkin *S. mobaraense* -transglutaminaasin vahvistavan gelatiinigeeliä, joskin geelin vahvuutta voitiin lisätä entsyymimäärää suurentamalla vain tiettyyn rajaan asti. Liiallinen ristisidostaminen teki geelistä hauraan.

Babin ja Dickinson (2001) tutkivat *Streptomyces lydicus* -transglutaminaasin vaikutuksia gelatiiniin ja havaitsivat transglutaminaasikäsittelyllä olevan joko gelatiinigeeliä vahvistava tai heikentävä vaikutus käytetyn transglutaminaasimäärän ja sen mukaan, tapahtuiko transglutaminaasin aiheuttama kovalenttisten ristisidosten muodostuminen pääasiassa ennen vai jälkeen gelatiinin luontaisen vetysidosten muodostumisen kautta tapahtuneen geeliytymisen. Jos gelatiiniliuosta lämpökäsiteltiin transglutaminaasin kanssa kauan ennen jäähdytystä, transglutaminaasin muodostamat ristisidokset häiritsivät jäähdytyksessä luontaisen vetysidoksellisen gelatiiniverkoston muodostumista, ja geelistä tuli heikompi kuin ilman transglutaminaasia tehdystä. Jos sen sijaan sopiva määrä transglutaminaasia lisättiin lämmitettyyn gelatiiniliuokseen vasta juuri ennen sen jäähdytystä, gelatiinin luontainen geeliytyminen tapahtui häiriöttä ja transglutaminaasi lisäsi muodostuneen geelin vahvuutta.

2.8.4 Kananmunan proteiinien muokkaus

Clarken (1959) mukaan marsun maksan transglutaminaasi ei kiinnittänyt amiiniyhdistettä (kadaveriiniä) kananmunan albumiiniin kuten ei naudan seerumin albumiinikaan, eli albumiinit eivät toimineet asyylidonorisubstraatteina transglutaminaasille. Ikura ym. (1984) asyloivat malonihappoanhydridillä (maleyloivat) ovalbumiinin aminoryhmät, jolloin ovalbumiinin rakenne muuttui niin, että glutamiinitähteet pääsivät paremmin esille. Maleyloinnin seurauksena ovalbumiinista tuli aminodonorisubstraatti transglutaminaasille, jonka avulla voitiin kiinnittää amiiniyhdistettä (histamiinia) ovalbumiiniin ja polymeroida sitä polyamiinin (spermiinin) kanssa.

Nonakan ym. (1989) mukaan konalbumiini, kuten naudan seerumin albumiinkin, polymeroitui transglutaminaasin vaikutuksesta vain ditiotreitolin läsnä ollessa. Ditiotreitolin vaikutuksen arveltiin johtuvan sen kyvystä hajottaa molekyylinsisäiset disulfidisidokset ja siten aiheuttaa albumiinien rakenteessa muutoksia, jotka tuovat suojattuna olleita glutamiini- ja lyysiinitäh-

teitä transglutaminaasin ulottuville. Myöhemmin Nonaka ym. (1997a) havaitsivat, että *S. mobaraense* -transglutaminaasi kiinnittää ovalbumiiniin, kuten myös naudan seerumin albumiiniin, amiiniyhdistettä (monodansyylikadaveriinia) korkeassa paineessa (400-600 mPa), mutta ei normaalipaineessa. Paineen arvioitiin vaikuttaneen albumiinien rakenteeseen niin, että glutamiinitähteitä altistui transglutaminaasille.

Kato ym. (1991) tutkivat *S. mobaraense* -transglutaminaasin vaikutuksia kananmunan valkuaisen ovomusiiniin, glykoproteiiniin, joka koostuu vähähiilihydraattisesta osasta, α -ovomusiinista ja runsashiilihydraattisesta osasta, β -ovomusiinista. Transglutaminaasin havaittiin polymeroivan kumpaakin ovomusiinikomponenttia. Lisäksi transglutaminaasikäsittelyn havaittiin parantavan ovomusiinin emulgoimisominaisuuksia sekä entuudestaan erinomaista vaahtovuutta.

Sakamoto ym. (1994) tutkivat *S. mobaraense* -transglutaminaasin vaikutusta kananmunan valkuaisesta ja keltuaisesta tehtyihin proteiinipitoisuudeltaan noin 10-prosenttisiin liuoksiin ja havaitsivat kummankin lujittuvan transglutaminaasin vaikutuksesta. Valkuaisliuoksesta tuli transglutaminaasikäsittelyn seurauksena keltuaisliuosta vahvempi, mutta ei niin vahvaa kuin 10-prosenttisesta gelatiiniliuoksesta muodostuneesta geelistä.

2.8.5 Viljaproteiinien muokkaus ja viljatuotteiden valmistus

Johdanto

Transglutaminaasin käyttö leipomotuotteiden valmistuksessa on suhteellisen uutta verrattuna hydrolysoivien entsyymien, kuten maltaan ja mikrobien α -amylaasin soveltamiseen, jota on tehty leipomoteollisuudessa jo vuosikymmeniä (Poza, 2002). Viljaproteiinien muokkausta transglutaminaasilla ja transglutaminaasin käyttöä leivonnassa on tutkittu enimmäkseen vasta 1990-luvulta lähtien. Useimmat viljaproteiinien muokkausta transglutaminaasilla käsitelleet tutkimukset ovat keskittyneet vehnän gluteeniproteiinien käsittelyyn. Tämä saattaa johtua siitä, että vehnätaikinaa leivottaessa gluteeniproteiinit muodostavat taikinaan gluteeniksi kutsutun verkoston, joka saa aikaan vehnätaikinan ainutlaatuiset leivontaominaisuudet (Shewry ym., 2003). Vaikka gluteeniproteiinit sisältävätkin erittäin paljon glutamiinia (kolmasosa tai enemmän kaikista aminohappotähteistä), useimmat niistä sisältävät vain hyvin niukasti lysiiniä (Kasarda ym., 1976).

Proteiinit voidaan jakaa niiden liukoisuuden perusteella neljään ryhmään. Albumiinit ovat vesiliukoisia proteiineja, globuliinit liukenevat laimeisiin suolaliuoksiin, gluteliinit laimeisiin happo- tai emäsluoksiin ja prolamiinit yli 50-prosenttisiin etanoliliuoksiin (Mahler ja Cordes, 1968). Vehnän proteiinien tapauksessa etanoliliuokseen liukenevia proteiineja kutsutaan gliadiineiksi ja happoliuokseen liukenevia gluteniineiksi. Kuitenkin gluteniineiksi lasketaan joskus kaikki veteen sekä suola- ja etanoliliuoksiin liukenemattomat vehnäproteiinit, vaikka ne eivät esimerkiksi laimeaan etikkahappoliuokseen liukenisikaan. Käsitettä gluteniini onkin vaikeaa määritellä yksinkertaisesti (Kasarda ym., 1976).

Gluteeni voidaan erottaa vehnän ydinjauhoista ja vedestä sekoitetusta taikinasta pesemällä sitä vedellä, jolloin tärkkelys irtaa veden mukana. Gluteenin kuivapainosta on noin 80 % proteiinia, 10-15 % hiilihydraatteja ja 5-10 % rasvaa (Kasarda ym., 1976). Gluteeniproteiinit on perinteisesti luokiteltu etanoliliuoksiin liukeneviin gliadiineihin ja etanoliliuoksiin liukenemattomiin gluteniineihin. Molemmat ryhmät sisältävät rakenteeltaan toisiaan muistuttavia proteiineja, ja ero niiden liukoisuudessa johtuu proteiinimolekyylien erilaisista vuorovaikutuksista: gliadiinien välillä on vain ei-kovalenttisia sidoksia, kun taas gluteniinimonomeerit muodostavat molekyylimassaltaan suuria polymeerejä kovalenttisin disulfidisidoksin. Monomeereikseen pelkistetyt gluteniinit ovat liukoisia etanoliliuoksiin aivan kuten gliadiinit ja voidaan sen vuoksi määritellä yhdessä gliadiinien kanssa myös prolamiineiksi (Shewry ym., 2003).

Gluteeniproteiineista yleensä suunnilleen yhtä paljon on gliadiineja ja gluteniineja, joskin niiden määrien suhde vaihtelee vehnäajikkeen ja kasvuolosuhteiden mukaan. Gliadiinit ja gluteniinit eivät ole yksittäisiä proteiineja, vaan proteiiniseoksia. Gluteeniproteiineja onkin yhteensä yli 50 erilaista, eikä niitä voi täydellisesti erottaa millään yksittäisellä menetelmällä, ei edes kaksisuuntaisella elektroforeesilla, jossa isoelektrinen fokusointi on yhdistetty geelielektroforeesiin. Gliadiinit on perinteisesti luokiteltu α -, β -, γ ja ω -gliadiineihin, joista α - ja β -gliadiinit ovat kuitenkin rakenteeltaan samankaltaisia ja nykyisin molemmat luokitellaankin tavallisesti α -gliadiineiksi (Shewry ym., 2003). Erotukseksi muista α -gliadiineista aggregoituvia α -gliadiineja nimitetään A-gliadiineiksi. Ne muodostavat ei-kovalenttisin sidoksin kuitumaisia aggregaatteja liuoksen pH-arvon ollessa yli 5 (Kasarda ym., 1976). Gluteeniinien alayksiköt luokitellaan kahteen pääryhmään, pienen ja suuren molekyylimassan alayksikköihin. Pienen molekyylimassan alayksiköt jaetaan edelleen B-, C- ja D-tyyppeihin. C-tyypin alayksiköt muistuttavat α - ja γ -gliadiineja ja D-tyypin alayksiköt ω -gliadiineja (Shewry ym., 2003).

Viljaproteiinien muokkaus

Ensimmäisiä tutkimuksia, jossa viljaproteiineja käsiteltiin transglutaminaasilla oli Ikuran ym. (1981) tutkimus, jossa tutkittiin muun muassa gluteenin ravitsemuksellista täydentämistä marsun maksan transglutaminaasin avulla. Koska lysiini on gluteenin ravitsemuksellista arvoa rajoittava aminohappo, gluteenia yritettiin täydentää kiinnittämällä siihen transglutaminaasin avulla vapaata lysiiniä. Vaikka gluteeni oli reaktio-oloissa (pH 7,5) lähes täydellisesti liukene-maton, transglutaminaasin havaittiin kiinnittävän lysiiniä tehokkaasti gluteeniin. Tämän arvel-tiin aiheutuvan glutamiinitähteiden suuresta osuudesta gluteenissa. Kahden ja puolen tunnin transglutaminaasikäsittelyn aikana gluteenin lysiinipitoisuus suurentui viisinkertaiseksi. Li-säksi transglutaminaasin havaittiin muodostavan ristsidoksia gluteenimolekyylien välille.

Kurth ja Rogers (1984) tutkivat muun muassa gluteenin liittämistä myosiiniin naudan plasman transglutaminaasilla. Toisin kuin muiden tutkittujen proteiinien tapauksessa, gluteeniin re-a-goimiseen myosiinin kanssa vaikutti selvästi reaktioseoksen happamuus. Mitä happamampi seos oli tutkitulla pH-alueella (5,5-7,0), sitä vähemmän gluteenia kiinnittyi myosiiniin trans-glutaminaasin vaikutuksesta.

Iwami ja Yasumoto (1986) selvittivät eri elintarvikeproteiinien kykyä toimia asyylidonoreina transglutaminaasin katalysoimassa reaktiossa. He käyttivät marsun maksan transglutaminaasia kiinnittämään proteiineihin fluoresoivaa monodansyylikadaveriiniä, joka toimii reaktiossa asyyliakseptorina. Monodansyylikadaveriinin kiinnittymistehokkuuden perusteella vehnän gliadiini oli tutkituista proteiineista paras asyylidonorisubstraatti transglutaminaasille ja veh-nän gluteeni kokonaisuutena lähes yhtä hyvä. Kaseiini ja soijaproteiini-isolaatti olivat melko hyviä asyylidonoreja, mutta ovalbumiini ja varsinkin gelatiini ja maissin tseiini toimivat asyylidonorisubstraatteina heikosti.

Myös Porta ym. (1990) tutkivat eri viljaproteiinien kykyä toimia asyylidonoreina transgluta-minaasin katalysoimassa reaktiossa. Hekin käyttivät marsun maksan transglutaminaasia, mut-ta tutkittaviin proteiineihin kiinnitettiin reaktiossa asyyliakseptorina toiminutta radioaktiivista spermidiiniä. Tulosten mukaan vehnän gluteliinit (gluteniinit) ja gliadiinit olivat parempia asyyli-ryhmän luovuttavia substraatteja transglutaminaasille kuin vehnän globuliinit tai kau-ran, maissin ja riisin prolamiinit. Porta ym. havaitsivat myös kaikkien tutkimiensa viljaproteii-nien ja niiden hydrolysaattien polymeroituvan transglutaminaasin vaikutuksesta spermidiinin läsnä ollessa. Tämä ei kuitenkaan todistanut proteiinien polymeroitumista transglutaminaasin

vaikutuksesta myös ilman spermiidiiniä, koska transglutaminaasi voi muodostaa spermiidiinin avulla polyamiiniristisidoksia proteiinimolekyylien välille.

Larré ym. (1993) havainnoivat marsun maksan transglutaminaasin vaikutuksia gliadiiniin. Transglutaminaasin havaittiin kiinnittävän tehokkaasti putreskiinia gliadiiniin ja siten gliadiiniin olevan hyvä asyylidonorisubstraatti transglutaminaasille. Ilman putreskiinia transglutaminaasin todettiin deamidoivan gliadiinin glutamiinitähteitä glutamiinihappotähteiksi. Deamidointi johti gliadiinin isoelektrisen pisteen siirtymiseen happamampaan päin ja gliadiinin vesiliukoisuuden paranemiseen. Deamidoinnin lisäksi transglutaminaasin havaittiin myös polymeroivan gliadiinia pH-alueella 5-9, tehottomimmin kuitenkin happamassa. Gliadiinin harvojen lysiinitähteiden pääteltiin voivan osallistua transglutaminaasin katalysoimaan ristisidoksen muodostusreaktioon.

Alexandre ym. (1993) tutkivat vehnän γ -gliadiinin muokkausta naudan veren hyytymistekijä XIII:lla. Myös tässä tutkimuksessa havaittiin gliadiinin deamidoitumista (puolen tunnin transglutaminaasikäsittelyssä) ja sen lisäksi polymeroitumista (24 tunnin käsittelyssä). Samoin gliadiinin deamidoitumisen todettiin tässäkin parantavan gliadiinin vesiliukoisuutta ja ristisidosten muodostumisen aiheuttavan sen polymeroitumista. Myös γ -gliadiinin tapauksessa sen kahden lysiinitähteen pääteltiin voivan toimia asyyliakseptorisubstraatteina transglutaminaasille.

Vehnän gluteenin ja sen komponenttien, gluteniinien ja gliadiinien, toimiminen hyvinä asyylidonoreina transglutaminaasin katalysoimassa reaktioissa Iwamin ja Yasumoton (1986), Portan ym. (1990), Larrén ym. (1993a) ja Alexandren ym. (1993) tutkimuksissa selittynee glutamiinitähteiden suhteellisen suurella osuudella näissä proteiineissa. Koska toisaalta lysiinitähteiden suhteellisen pieni osuus rajoittaa gluteeniproteiinien ravitsemuksellista arvoa, Iwami ja Yasumoto (1986) tutkivat lysiinin ja polylysiinin kiinnittämistä gliadiiniin transglutaminaasin avulla sekä kiinnitetyn lysiinin hyväksikäytettävyyttä. Transglutaminaasin havaittiin kiinnittävän gliadiiniin tehokkaasti polylysiiniä, mutta myös lysiiniä. Gliadiiniin liitetyn lysiinin pääteltiin rottakokeiden perusteella olevan myös ravitsemuksellisesti hyväksikäytettävissä.

Colas ym. (1993) tutkivat β -gliadiinin glykosyloimista marsun maksan transglutaminaasin avulla. Gliadiinin glutamiinitähteisiin liitettiin transglutaminaasilla alkyyliamiinimonosakkaridia (6-aminoheksyyli-1-tio- β -D-galaktopyronosidi). Kun β -gliadiinin aminoryhmät oli alkyloitu, sen glutamiinitähteistä glykosyloitui 15,7 %, mutta ilman alkylointia vain 6,1 %, koska

silloin glutamiinitähteet reagoivat myös lysiinitähteiden aminoryhmien kanssa. Glykosylointi paransi β -gliadiinin liukoisuutta varsinkin pH-alueella, joka oli isoelektrisen pisteen (pH 6,3) läheisyydessä, mutta ei tehnyt gliadiinista yli 85-prosenttisesti liukenevaa.

Larré ym. (1998) tutkivat *Streptoverticillium mobaraense* -bakteerilla tuotetun transglutaminaasin vaikutusta pelkistettyyn gluteeniin ja havaitsivat entsyymien polymeroivan gluteenin monomeerisia proteiiniyksiköitä. Gluteeniproteiineista transglutaminaasin todettiin vaikuttavan tehokkaimmin gluteeniin suuren molekyyli­massan alayksikköihin, minkä pääteltiin johtuvan näiden proteiiniyksiköiden suuremmasta lysiinipitoisuudesta verrattuna gluteeniin pienen molekyyli­massan alayksikköihin ja gliadiineihin. Polymeroitumisen havaittiin huonontavan gluteeniproteiinien liukoisuutta.

Myöhemmin Larré ym. (2000) tutkivat tarkemmin gluteenin eri komponenttien kykyä toimia *S. mobaraense* -transglutaminaasin substraattina. Tulokset vahvistivat aikaisemman havainnon, jonka mukaan kaikki gluteeniproteiinit ovat transglutaminaasin substraatteja, mutta gluteeniin suuren molekyyli­massan alayksiköt niistä parhaimpia. Voimakkaallakaan transglutaminaasikäsittelyllä ei kaikkia pienen molekyyli­massan alayksiköitä eikä α - ja β -gliadiineja saatu täysin ristisidottua. Myös Rosellin ym. (2003) tutkimusten tulokset osoittivat transglutaminaasin polymeroivan gluteeniproteiineista pääasiassa gluteiineja ja niistä erityisesti suuren molekyyli­massan alayksiköitä. Larré ym. (2000) tutkivat myös transglutaminaasikäsittelyn vaikutusta gluteenin reologisiin ominaisuuksiin ja havaitsivat transglutaminaasin avulla olevan mahdollista muuntaa hyvin heikko gluteeni hyvin vahvaksi. Lisäksi transglutaminaasilla käsitellyn gluteenin havaittiin olevan lämmönkestävämpää kuin käsittelemättömän.

Gerrard ym. (2001) ottivat uuden näkökulman tutkimuksessa eri vehnäproteiinien kelpoisuudesta transglutaminaasin substraatiksi. Siinä missä aikaisemmissa tutkimuksissa transglutaminaasin aiheuttamaa proteiinien polymeroitumista oli tutkittu analysoimalla transglutaminaasilla käsiteltyjä proteiiniliuoksia, Gerrard ym. leipoivat todelliset leipä- ja voisarvitaikinat mikrobiperäisen transglutaminaasin kanssa ja uuttivat sitten taikinoista proteiinit analyysiä varten. Tulokset vahvistivat aiemmat havainnot gluteeniin suuren molekyyli­massan alayksikköjen toimimisesta hyvinä substraatteina transglutaminaasille (Larré ym., 1998; Larré ym. 2000), mutta uutena havaintona myös albumiineissa ja globuliineissa havaittiin proteiineja, jotka polymeroituivat transglutaminaasin vaikutuksesta. Vaikka vehnän albumiinit ja globuliinit eivät ole yhtä oleellisia taikinan muodostumisessa kuin gluteeniproteiinit, Gerrardin ym. (2001)

mukaan näistä pienistä ja liukoista proteiineista transglutaminaasin vaikutuksesta muodostuvat aggregaatit saattavat olla hyödyllisiä lopputuotteen laadulle.

Babiker ym. (1996) tutkivat gluteenista happohydrolyysillä tai proteaasikäsittelyllä aikaansaadun peptidiseoksen polymeroimista *Streptovercillium cinnamoneum* -bakteerilla tuotetun transglutaminaasin avulla sekä polymeroinnin vaikutusta seosten toiminnallisiin ominaisuuksiin. Transglutaminaasin havaittiin polymeroivan happohydrolyysillä sekä pepsiini-, kymotrypsiini tai papaiinikäsittelyllä gluteenista valmistettuja peptidiseoksia. Transglutaminaasikäsittely paransi peptidiseosten liukoisuutta ja teki alunperin sameista liuoksista läpikuultavia. Happohydrolyysillä saatua seosta lukuun ottamatta seoksista tuli liukoisia laajalla pH-alueella (pH 2-12). Liukoisuuden paranemisen arveltiin johtuvan glutamiinitähteiden deamidoitumisesta glutamiinihappotähteiksi sekä hydrofobisten aminohappotähteiden suuntautumisesta polymeereissä niiden sisäosiin. Transglutaminaasikäsittelyn havaittiin myös parantavan peptidien muuten huonoja emulsion- ja vaahdonmuodostusominaisuuksia sekä poistavan peptidiseosten karvaan maun.

Basman ym. (2002) havainnoivat mikrobi-transglutaminaasin kykyä polymeroida vehnä-, kaura- ja soijajauhojen proteiineja. Jauhoja ja niiden seoksia (vehnä-kaura ja vehnä-soija) käsiteltiin vesiliuoksessa transglutaminaasin kanssa eri pituisia aikoja. Tulosten perusteella soijajauhon proteiinit olivat parempia substraatteja transglutaminaasille kuin vehnä- ja kaurajauhojen, joiden todettiin olevan kokonaisuutena yhtä hyviä. Vehnän gluteniinin suuren molekyyli-massan alayksiköiden havaittiin tässäkin tutkimuksessa olevan hyviä substraatteja transglutaminaasille. Ne eivät kuitenkaan vehnä- ja soijajauhojen sekoituksessa polymeroituneet yhtä nopeasti kuin puhtaassa vehnäjauhossa, minkä arveltiin johtuvan soijaproteiinien paremmasta kilpailukykyvyydestä substraattina toimimisessa. Transglutaminaasilla pääteltiin olevan erityisen voimakas kyky muokata molekyylikooltaan 66-84 kDa olevia soijan 7S-proteiineja. Ristisidosten muodostumista eri jauhoista peräisin olevien proteiinien välille pidettiin epävarmana ja todettiin, että asian selvittämiseksi tarvitaan lisätutkimusta.

Siu ym. (2002a) tutkivat *Streptovercillium mobaraense* -bakteerin transglutaminaasin vaikutuksia kauran globuliiniin ja havaitsivat transglutaminaasin polymeroivan sitä. Lisäksi globuliinimonomeerin alayksiköistä toisen, niin sanotun happaman polypeptidin (koko 36 kDa), havaittiin olevan parempi substraatti transglutaminaasille kuin toisen, niin sanotun emäksisen polypeptidin (koko 22 kDa). Eron alayksikköjen reaktiivisuuksissa arveltiin johtuvan globuliinin kolmiulotteisesta rakenteesta, jossa happamat polypeptidit peittävät emäksisiä polypepti-

dejä. Globuliinin polymeroitumisen transglutaminaasin läsnä ollessa osoitettiin tapahtuvan lyysiinitähteiden reagoimisen kautta, sillä transglutaminaasi ei polymeroinut globuliinia, jossa lyysiinitähteiden ε -aminoryhmien reagoiminen oli estetty sukkinylöimalla. Siten globuliinin polymeroituminen tapahtui todennäköisesti transglutaminaasin katalysoiman ε -(γ -glutamyyli)lysiiniristisidosten muodostumisen kautta. Muiden proteiinien, kuten kaseinin ja β -laktoglobuliinin, läsnäolon reaktioseoksessa havaittiin edistävän kauran globuliinin ja varsinkin sen happamien polypeptidien polymeroitumista. Transglutaminaasin aiheuttaman polymeroitumisen osoitettiin myös lisäävän kauran globuliinia sisältävän seoksen viskositeettia.

Siu ym. (2002b) tutkivat *S. mobaraense* -transglutaminaasin vaikutusta myös kauran globuliinin liukoisuuteen ja toiminnallisiin ominaisuuksiin. Transglutaminaasikäsittelyn havaittiin parantavan globuliinin liukoisuutta liuksissa, joiden pH-arvo oli 4 tai 5, mutta huonontavan liuksissa, joiden pH-arvo oli 6-12. Transglutaminaasin todettiin myös parantavan globuliinin veden- ja rasvansidontakykyä, mutta huonontavan emulsionmuodostamiskykyä ja emulsion stabiilisuutta. Samoin transglutaminaasin vaikutuksesta globuliinien vaahtoutuvuus parani, mutta vaahdon stabiilisuus huononi. Lisäksi transglutaminaasin avulla voitiin 10-prosenttisesti globuliiniliuksesta muodostaa geeli neutraaleissa oloissa, erotuksena lämmön avulla tapahtuvaan kauran globuliinien geeliyttämiseen, joka on mahdollista vain emäksisissä oloissa. Kuten kauraproteiinien geeliyttäminen lämmöllä, myös transglutaminaasiavusteinen geeliyttäminen vaati liukseen lisättyä suolaa (0,2 M NaCl).

Viljatuotteiden valmistus

Transglutaminaasin käytöstä on todettu olevan hyötyä joissain leivontasovelluksissa. Poza (2002) mainitsee tällaisiksi muun muassa pakastetaikinoiden leivonnan, emulgaattoreiden ja hapettimien korvaamisen leivonnassa ja runsaskuituisen leivän leivonnan. Transglutaminaasi ristisitoo gluteeniproteiineja ja vahvistaa gluteenia. Siten transglutaminaasia käyttäen leivotun pakastetaikinän gluteeni on kestävämpi jääkiteiden aiheuttamille vahingoille. Transglutaminaasia voidaan käyttää samojen ominaisuuksien saavuttamiseksi taikinassa kuin emulgaattoreita ja hapettimia, kuten kaliumbromaattia, ja siten korvata niiden käyttöä. Ruista sisältävän runsaskuituisen sekaleivän leivonnassa transglutaminaasin on havaittu muun muassa parantavan taikinän käsiteltävyyttä ja suurentavan leivän tilavuutta (Poza, 2002). Kuraishin ym. (2001) mukaan entsyymien käytöstä pastan valmistuksessa on raportoitu vain vähän tutkimustuloksia, vaikka transglutaminaasia käytetään Japanissa laajasti pastan ja nuudeleiden rakenteen parantamiseen.

Gerrard ym. (1998) tutkivat mikrobi-transglutaminaasin vaikutuksia vaalean vuokaleivän taikinaan ja paistettuun leipään. Transglutaminaasin havaittiin vähentävän taikinan muodostumiseen tarvittavan sekoitustyön määrää. Gerrardin ym. näkemyksen mukaan leivonnassa tehokasta sekoitusta tarvitaan disulfididisosten muodostumiseen taikinaan, joten ristsidosten muodostuessa toisella mekanismilla transglutaminaasin vaikutuksesta sekoitusta ei tarvita yhtä paljon, mistä aiheutuu kustannussäästöä. Transglutaminaasin havaittiin myös parantavan taikinan vedensidontakykyä, jonka arveltiin johtuvan ristsidosten takia muuttuneesta gluteenin rakenteesta tai gluteenin deamidaation vuoksi suurentuneesta hydrofiilisyydestä. Siten myös valmiin leivän kosteuspitoisuutta voitiin kasvattaa. Lisäksi transglutaminaasi teki leipien sisuksista vahvempia ja siten helpommin leikattavia ja voideltavia.

Myöhemmin Gerrard ym. (2000) tutkivat mikrobi-transglutaminaasin vaikutuksia myös kaulitusta voitaikinasta valmistettuihin rinkilöihin ja hiivalla kohotettuihin voisarviin. Transglutaminaasin havaittiin lisäävän huomattavasti molempien leivonnaisten tilavuutta, voisarvien tapauksessa tosin vain silloin kun taikinassa oli käytetty myös kokojyväjauhoja tai kun taikina oli ensin pakastettu. Gerrardin ym. käsityksen mukaan transglutaminaasin aiheuttama taikinan lujittuminen, joka aiheuttaa leivän tilavuuden pienenemistä, aiheuttikin kaulittujen voitaikinoiden tapauksessa paistettujen tuotteiden tilavuuden suurenemista. Gerrardin ym. mukaan voitaikinakerrosten kaksiulotteinen lujittuminen ei haittaa taikinoiden paistonaikaista nousemista sillä tavalla kuin leipätaikinan kolmiulotteinen lujittuminen. Transglutaminaasin vaikutus säilyi myös taikinan pakkasvarastoinnissa, sillä transglutaminaasin kanssa leivotusta ja pakastetusta taikinasta paistetun leivonnaisen tilavuus oli aina suurempi kuin vastaavan ilman transglutaminaasia leivotusta ja pakastetusta taikinasta leivotun leivonnaisen. Transglutaminaasin pääteltiin siten suojaavan pakastettuja taikinoita jääkiteiden vaikutuksilta.

Köksel ym. (2001) selvittivät bakteeriperäisen transglutaminaasin vaikutusta taikinan reologiaominaisuuksiin, kun jauhoissa oli *Eurygaster*-suvun hyönteisten proteaasien pilkkomaa gluteenia. Transglutaminaasin havaittiin vahvistavan hyönteisproteaasien heikentämää gluteenia ja parantavan taikinan reologiaominaisuuksia. Vaikutuksen pääteltiin johtuvan todennäköisesti transglutaminaasin kyvystä vaikuttaa gluteeniin suuren molekyyli-massan alayksiköihin, joihin myös hyönteisproteaasilla on suuri vaikutus. Transglutaminaasin pääteltiin siten parantavan mahdollisuuksia käyttää leivontaan siihen muuten kelpaamattomia, hyönteisten ennen sadonkorjuuta proteaaseillaan vioittamia vehnäjauhoja, mutta todettiin myös lopputuloksena saatavien leipien tutkimisen tarve.

Tseng ja Lai (2002) tutkivat mikrobi-transglutaminaasin vaikutusta taikinoihin, jotka oli leivottu vehnänjyvien eri osista saaduista jauhoista. Yleisesti ottaen transglutaminaasi lisäsi taikinoiden venytyskestävyyttä (engl. resistance to extension) ja vähensi niiden joustavuutta (engl. extensibility) ja tarttuvuutta (engl. stickiness). Muutosten määrissä oli jauhokohtaisia eroja, jotka todennäköisesti johtuivat jauhojen erilaisista koostumuksista. Lisäksi Tseng ja Lai tutkivat transglutaminaasin vaikutusta jyvän eri osista saaduista jauhoista eristettyihin gluteenifraktioihin ja havaitsivat transglutaminaasin polymeroivan kaikkien fraktioiden gluteenia.

2.8.6 Soija- ja herneproteiinien muokkaus

Myös soijan ja herneen eri proteiinien ristisitomista transglutaminaasilla on tutkittu, ja niiden on havaittu toimivan transglutaminaasin substraatteina vaihtelevassa määrin. Ikura ym. (1980b) tutkivat marsun maksan transglutaminaasin vaikutuksia soijapapujen päävarastoproteiineihin, 7S- ja 11S-proteiineihin ja niiden alayksikköihin. Transglutaminaasi vaikutti yleisesti ottaen tehokkaammin 11S-proteiineihin kuin 7S-proteiineihin. Elektroforeesianalyysien perusteella transglutaminaasi polymeroi kaikkia 7S-proteiinien pääalayksiköitä (52, 72 ja 80 kDa). 11S-proteiinien alayksiköistä transglutaminaasi ristisitoi kuitenkin vain happamia alayksiköitä (36 ja 40 kDa), mutta ei lainkaan emäksistä alayksikköä (20 kDa).

Nonaka ym. (1989) havaitsivat *S. mobaraense* -bakteerilla tuotetun transglutaminaasin polymeroivan soijan 7S- ja 11S-globuliineja ja geeliyttävän niitä sisältävät (50 mg/ml) liuokset. Sakamoton ym. (1994) mukaan *S. mobaraense* -transglutaminaasi geeliytti 10-prosenttisen soijaproteiini-isolaattiliuoksen, joka ei geeliytynyt pelkästä lämmityksestä edes 75 °C:ssa. Soijaproteiinigeeli oli kuitenkin paljon heikompi kuin proteiinipitoisuudeltaan vastaavista kaseinaatti- ja gelatiiniliuoksista transglutaminaasin avulla muodostetut geelit.

Kang ym. (1994) havaitsivat soijan glysiiniin (11S-proteiinien) kuumennuskäsittelyn (0,5-2 min 100 °C:ssa) lisäävän transglutaminaasin ulottuvilla olevien lysiini- ja glutamiinitähtien määrää glysiiniinissä ja transglutaminaasin muodostavan enemmän ϵ -(γ -glutamyyli)lysiiniristisidoksia kuumennuskäsittelyyn kuin käsittelemättömään glysiiniin. Glysiiniin happamien alayksiköiden havaittiin olevan parempia substraatteja transglutaminaasille kuin emäksisten, mutta kuumennuskäsittelyn parantavan molempien reaktiivisuutta. Glysiiniiniliuos myös geeliytyi transglutaminaasin muodostamien ristisidosten vaikutuksesta ja glysiiniin transglutaminaasikäsittelyä edeltävä kuumennuskäsittely vaikutti geelin ominaisuuksiin. Gly-

siniinistä ei muodostunut geeliä, jos sen lysiinitähteiden ϵ -aminoryhmien reagoiminen transglutaminaasin kanssa estettiin asetyloimalla tai sukkinyloimalla.

Walshin ym. (2003) tulokset vahvistivat aiemmat havainnot (Ikura ym., 1980b; Kang ym., 1994) siitä, että soijan 7S-globuliinit ja 11S-globuliinien happamat alayksiköt ovat hyviä substraatteja transglutaminaasille, mutta 11S-globuliinien emäksiset alayksiköt eivät. Walsh ym. pitivät tulosta odotettuna, sillä 11S-globuliinien happamat alayksiköt sisältävät suhteellisesti enemmän glutamiinia ja lysiiniä kuin emäksiset alayksiköt.

Babiker (2000) tutki mikrobi-transglutaminaasin vaikutuksia soijaproteiinin ja siitä kymotrypsiinillä valmistetun hydrolysaatin toiminnallisiin ominaisuuksiin. Transglutaminaasikäsittely vaikutti soijaproteiinin ja sen hydrolysaatin liukoisuuteen sekä emulsioiden ja vaahtojen ominaisuuksiin, mutta vaikutukset eivät olleet kovin suuria, paitsi transglutaminaasin parantaessa soijaproteiinista valmistetun vaahdon pysyvyyttä. Transglutaminaasin avulla voitiin myös valmistaa vahva geeli soijaproteiinista, mutta ei sen hydrolysaatista.

Mizuno ym. (2000) havaitsivat transglutaminaasikäsittelyn alentavan soijaproteiinin lasisiirtymälämpötilaa (T_g). Transglutaminaasilla ristisidotun soijaproteiinin lasisiirtymälämpötila oli kaikilla tutkituilla kosteuspitoisuuksilla alhaisempi kuin käsittelemättömän proteiinin. Transglutaminaasikäsittelyn soijaproteiinin havaittiin myös sisältävän suhteellisesti enemmän sidottua vettä kuin käsittelemättömän, minkä arvioitiin selittävän lasisiirtymälämpötilan laskun, vaikka ristisitoutuminen yleensä vaikuttaa päinvastaiseen suuntaan.

Walsh ym. (2003) tutkivat mikrobi-transglutaminaasi- ja proteinaasikäsittelyjen ja niiden yhdistelmien vaikutuksia soijaproteiini-isolaatin liukoisuuteen, joka määritettiin näytteen liukoisessa muodossa olevan typen määrän suhtena näytteen kokonaistypen määrään. Näin määritettynä soijaproteiini-isolaatti oli liukoista neutraalissa, mutta liukoisuus pieneni rajusti happamuuden kasvaessa. Liuoksissa, joiden pH-arvo oli alle 5, soijaproteiinin liukoisuus oli enää alle 20 % siitä, mitä se oli neutraalissa, eikä pelkkä transglutaminaasikäsittely juurikaan muuttanut liukoisuutta paitsi hyvin happamassa (pH 3), jossa se paransi sitä. Sen sijaan transglutaminaasi- ja hydrolyysikäsittelyjen yhdistelmät paransivat johdonmukaisesti soijaproteiini-isolaatin liukoisuutta happamissa liuoksissa (pH alle 5), joissa se oli käsittelyjen jälkeen 40-60 % käsittelemättömän soijaproteiini-isolaatin liukoisuudesta neutraalissa liuoksessa.

Larré ym. (1992) selvittivät marsun maksan transglutaminaasin vaikutuksia herneen 11S-proteiiniin (legumiiniin), joka on heksameeri, jonka monomeerit koostuvat disulfidisidoksella toisiinsa liittyneistä happamasta ja emäksisestä polypeptidistä. Vaikka legumiini sisältää suhteellisen paljon glutamiini- ja lysiinitähteitä, sen havaittiin olevan huono substraatti transglutaminaasille. Tämän arveltiin johtuvan legumiinin tiiviin pallomaisesta rakenteesta. Legumiinin sitrakonyloinnin (asyloinnin) havaittiin kuitenkin parantavan sen kykyä toimia asyylidonori-substraattina transglutaminaasille, koska sitrakonylointi aiheutti legumiinin dissosioitumisen monomeereiksi. Koska toisaalta asylointi estää legumiinin lysiinitähteiden reagoimista transglutaminaasin kanssa, transglutaminaasikäsittelyn seurauksena muodostui sitä vähemmän ristisidoksia, mitä suurempi oli legumiinin asylointiaste.

Myöhemmin Larré ym. (1993b) tutkivat tarkemmin legumiinin polymeroimista transglutaminaasilla ja havaitsivat dissosioitumattoman, heksameerisen legumiinin happamien polypeptidien olevan parempia substraatteja transglutaminaasille kuin emäksisten polypeptidien. Tämän arveltiin johtuvan legumiinin rakenteesta, jossa happamat polypeptidit peittävät emäksisiä. Sitrakonyloinnin seurauksena dissosioituneen legumiinin monomeerien happamat ja emäksiset polypeptidit ristisitoutuivat transglutaminaasin vaikutuksesta lähes yhtä hyvin.

2.8.7 Muita elintarvikesovelluksia

Transglutaminaasin soveltuvuutta on tutkittu myös muun muassa proteiinien ravitsemuksellisen arvon parantamiseen ja keskenään erilaisten proteiinien liittämiseen toisiinsa. Ikura ym. (1981) tutkivat mahdollisuutta täydentää elintarvikeproteiineja aminohapoilla marsun maksan transglutaminaasin avulla. Koska vapaiden aminohappojen α -karboksyyli-ryhmä estää niiden α -aminoryhmien toimimisen asyyliakseptorisubstraatteina transglutaminaasille ja siten aminohappojen liittämisen proteiineihin α -aminoryhmistään, käytettiin täydentämisessä L-metioniinin etyyliesteriä, joka toimii substraattina transglutaminaasille. Metioniini on ihmisen ravitsemuksessa välttämätön ja maito- sekä soijaproteiineissa niiden ravitsemuksellista arvoa rajoittava aminohappo. Siksi transglutaminaasilla yritettiin liittää metioniinin etyyliesteriä α_{S1} - ja β -kaseiineihin sekä soijan 7S- ja 11S-proteiineihin. Näiden proteiinien metioniinipitoisuudet suurenvat kahden tunnin transglutaminaasikäsittelyssä vastaavasti 2,0-, 1,5-, 2,4- ja 3,5-kertaisiksi. Samalla tapahtui kuitenkin myös proteiinien ristisitoutumista. Kaseiinit polymeroituivat tehokkaammin kuin soijaproteiinit.

Myöhemmin Ikura ym. (1984) tutkivat metioniinin etyyliesterin liittämistä marsun maksan transglutaminaasin avulla myös α_{S1} - ja β -kaseiineihin, joiden aminoryhmien reagoiminen transglutaminaasin kanssa oli estetty asyloimalla ne malonihappoanhydridillä (maleyloimal-la). Transglutaminaasi liitti maleyloituihin kaseiineihin enemmän metioniinin etyyliesteriä kuin maleyloimattomiin, eivätkä maleyloidut kaseiinit polymeroituneet transglutaminaasin vaikutuksesta.

Motoki ja Nio (1983) tutkivat eri elintarvikeproteiinien liittämistä asetyloituun α_{S1} -kaseiiniin marsun maksan transglutaminaasilla ja havaitsivat transglutaminaasin avulla olevan mahdollista ristisitoa eri lähteistä peräisin olevia proteiineja toisiinsa. Transglutaminaasi ei polymeroinut α_{S1} -kaseiinia, jonka ε -aminoryhmät oli asetyloitu eivätkä voineet siten toimia asyyliakseptorisubstraateina transglutaminaasille. Asetyloidun kaseiinin glutamiinitähteet toimivat kuitenkin asyylidonorisubstraatteina transglutaminaasille ja transglutaminaasilla voitiin polymeroida asetyloitua α_{S1} -kaseiinia κ -kaseiinin, β -laktoglobuliinin sekä soijan 7S- ja 11S-globuliinien kanssa, joiden lysiinitähteet toimivat reaktioissa asyyliakseptorisubstraatteina.

Kato ym. (1991) tutkivat kananmunan valkuaisen ovomusiinin liittämistä *S. mobaraense*-transglutaminaasin avulla α_{S1} -kaseiiniin ja soijan 11S-globuliiniin. Asetyloidut α_{S1} -kaseiini ja soijan 11S-globuliini, jotka eivät voi lysiinitähteiden ε -aminoryhmien asetyloinnin takia muodostaa transglutaminaasin vaikutuksesta homopolymeerejä, polymeroituivat kuitenkin transglutaminaasikäsittelyssä ovomusiinin kanssa. Muodostuneen ovomusiini-11S-globuliini-polymerin vaahtoutuvuus oli huomattavasti parempi kuin sen lähtöaineiden seoksen tai ovomusiini- α_{S1} -kaseiini -polymerin.

Yildirim ym. (1996) ja Yildirim ja Hettiarachchy (1997) tutkivat heraproteiinien ja soijan 11S-globuliinin liittämistä toisiinsa transglutaminaasin avulla ja muodostuneen polymerin toiminnallisia ominaisuuksia. Yildirim ym. (1996) käsittelivät marsun maksan transglutaminaasilla heraproteiini-isolaatin ja soijan 11S-globuliinin seosta ditiotreitolin läsnä ollessa ja havaitsivat varsinkin α -laktalbumiinin ja 11S-globuliinin happaman alayksikön polymeroituvan. Transglutaminaasin vaikutuksesta muodostuneiden polymerien emulsionmuodostuskyky ja emulsion stabiilisuus eivät olleet lähtöaineita parempia. Sen sijaan polymerin vaahdonmuodostuskyky oli hyvä ja etenkin vaahdon stabiilisuus lähtöaineita parempi, kananmunan albumiinin luokkaa. Myöhemmin Yildirim ja Hettiarachchy (1997) osoittivat, että transglutaminaasin avulla on todella mahdollista liittää 11S-globuliinin happamia alayksikköjä α -laktalbumiiniin

ja β -laktoglobuliiniin. Proteiinit, joiden lyysiinitähteiden ε -aminoryhmät oli asetyloitu, eivät polymeroituneet transglutaminaasin avulla, kuten asetyloimattomat proteiinit tekivät (ditio-treitolin läsnä ollessa). Asetyloidun 11S-globuliinin happamat alayksiköt kuitenkin polymeroituivat transglutaminaasin vaikutuksesta erikseen sekä α -laktalbumiinin että β -laktoglobuliinin kanssa. Muodostuneiden heteropolymeerien lämmönkestävyys oli lähtöaineita parempi, joten niiden otaksuttiin myös pysyvän liukoisina korkeammissa lämpötiloissa kuin lähtömaterialien. Siksi muodostuneen polymeerin arveltiin olevan hyödyllinen korkea lämpötilaa vaativissa elintarvikeprosesseissa.

2.9 Käytön ravitsemuksellinen merkitys

Mikrobitransglutaminaasin käytön yleistymisen on herättänyt kiinnostuksen myös käytön terveys- ja ravitsemusvaikutuksiin. Transglutaminaasientsyymi itsessään on todettu turvalliseksi. Sen ei havaittu olevan akuutisti toksinen eikä mutageeninen (Bernard ym., 1998). Elintarvikkeproteiinien isopeptidirisidoksilla ei ole myöskään havaittu olevan toksisia vaikutuksia, olivatpa ristisidokset sitten transglutaminaasin toiminnan (Seguro ym., 1996b) tai voimakkaan kuumennuskäsittelyn seurauksena muodostuneita (Otterburn, 1983). Motoki ja Seguro (1998) esittivät isopeptidisidosten turvallisuuden tueksi oletuksen, jonka mukaan ihminen on ruoan lämmittämisen keksimisestä lähtien saanut ravinnostaan isopeptidisidoksia, jotka ovat muodostuneet elintarvikeraaka-aineiden luontaisten transglutaminaasien toimiessa ruoanvalmistuksen aikana.

Transglutaminaasin katalysoimaan ristisidoksenmuodostusreaktioon osallistuvista aminohapoista kuitenkin toinen, lyysiini, on ihmiselle välttämätön aminohappo, jota on saatava ravinnosta hyväksikäytettävässä muodossa (Mutanen ja Voutilainen, 2000). Tavanomaiset ruoansulatusentsyymit eivät hajota ε -(γ -glutamyyli)lysiinirisidosta suolessa, mihin perustuen näiden isopeptidisidosten on esitetty huonontavan proteiinien sulavuutta ja lyysiinin hyväksikäytettävyyttä (Damodaran, 1996). Hurrell ym. (1976) havaitsivat voimakkaan kuumennuksen aiheuttamien isopeptidisidosten hidastavan proteiinien hajoamista rottien ruoansulatuksessa, mutta isopeptidisidosten lyysiinin olevan silti hyväksikäytettävissä yhtä hyvin kuin muut aminohapot. Yasumoton ja Suzukin (1990) mukaan ε -(γ -glutamyyli)lysiinidipeptidi imeytyi rotilla suolesta verenkiertoon ja hajotettiin pääasiassa munuaisissa. Seguro ym. (1996b) tutkivat mikrobitransglutaminaasilla ristisidotun kaseiinin lyysiinin hyväksikäytettävyyttä rotilla ja havaitsivat noin 99 % kaseiinin ε -(γ -glutamyyli)lysiinidipeptideistä imeytyvän. Lyysiinin arvel-

tiin vapautuvan dipeptideistä munuaisessa ja olevan hyväksikäytettävissä, koska ristiksidotulla kaseiinilla ruokitut rotat kasvoivat yhtä hyvin kuin tavanomaisella kaseiinilla ruokitut rotat.

Kahden entsyymin on todettu hajottavan *in vitro* glutamiinin ja lysiinin välisen sidoksen ϵ -(γ -glutamyyli)lysiinidipeptidissä ja vapauttavan lysiinin. Fink ym. (1980) havaitsivat puhdistamansa ja γ -glutamyyliamiinisyklotransferaasiksi nimeämänsä entsyymin hajottavan ϵ -(γ -glutamyyli)lysiinidipeptidin lysiiniksi ja 5-okso-L-proliiniksi (pyroglutamiinihappo, 5-pyrrolidoni-2-karboksyylihappo). Tutkituista jäniksen kudoksista munuainen sisälsi eniten γ -glutamyyliamiinisyklotransferaasiaktiivisuutta. Seguro ym. (1995) puolestaan havaitsivat γ -glutamyyli-transpeptidaasin (EC 2.3.2.2) pilkkovan ϵ -(γ -glutamyyli)lysiinidipeptidin lysiiniksi ja glutamiinihapoksi. Motoki ja Seguro (1998) päättelivätkin, että vaikka ruoansulatusentsyymit eivät hajotakaan suolistossa ϵ -(γ -glutamyyli)lysiini-isodipeptidejä, peptidit saattavat imeytyä ja niiden sisältämä lysiini vapautua suolen soluissa, munuaisissa tai muualla elimistössä γ -glutamyyliamiinisyklotransferaasin ja γ -glutamyyli-transpeptidaasin vaikutuksesta.

2.10 Yhteenveto

Transglutaminaasit ovat transferaasientsyymejä, joita esiintyy niin eläimissä, kasveissa kuin mikrobeissakin. Transglutaminaasi katalysoi ristiksidosten muodostumista proteiinien glutamiini- ja lysiinitähteiden välille. Muodostuvat ϵ -(γ -glutamyyli)lysiini-isopeptididisidokset antavat lujuutta proteiineille muun muassa verihyytymässä ja ihossa. Lisäksi transglutaminaasi katalysoi monien primaaristen mono-, di- ja polyamiinien liittymistä peptidiketjuun sidottuun glutamiiniin. Sopivan amiinin puuttuessa transglutaminaasi hydrolysoi peptidiin sidotun glutamiinin glutamiinihapoksi.

Transglutaminaasien rakenteissa on eroja, mutta kaikissa on aktiivisuudelle välttämätön kysteiinin vapaa sulfhydryyliryhmä katalyyttisessä keskuksessa. Nisäkkäiden ja aitotumallisten mikrobien transglutaminaasit muistuttavat toisiaan erityisesti siinä, että molemmat tarvitsevat aktivaattoreikseen kalsiumioneja. Alkeistumallisten mikrobien transglutaminaasit sen sijaan ovat kalsiumioneista riippumattomia, ja niiden optimaalinen aktiivisuus saavutetaan yleensä korkeammassa lämpötilassa ja matalammassa pH-arvossa kuin aitotumallisten eliöiden transglutaminaasien. Alkeistumallisten eliöiden transglutaminaasit ovat myös tavallisesti molekyylimassaltaan pienempiä kuin aitotumallisten.

Proteiinin toimimiseen transglutaminaasin substraattina vaikuttaa proteiinin lyysiini- ja glutamiinitähteiden määrän lisäksi proteiinin rakenne. Joustavien proteiinien, kuten kaseiinien, on havaittu olevan parempia substraatteja transglutaminaasille kuin tiiviin pallomaisten ja disulfidisidoksilla stabiloitujen proteiinien, kuten heraproteiinien. Transglutaminaasilla voidaan ristisitoa monia elintarvikeproteiineja ja vaikuttaa niiden toiminnallisiin ominaisuuksiin. Transglutaminaasin vaikutuksia elintarvikeproteiineihin on tutkittu paljon ja tutkimusta on ulotettu viime vuosina perustutkimuksesta sovelluksiin. Transglutaminaasilla ristisidottujen proteiinien lyysiinin on päätelty olevan elimistön hyväksikäytettävissä, vaikka ruoansulatusentsyymit eivät hajotakaan ϵ -(γ -glutamyyli)lysiinisidoksia suolessa.

3 KOKEELLINEN TUTKIMUS

3.1 Tavoitteet

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää lakkaasin ja tyrosinaasin kykyä muodostaa kovalenttisia ristsidoksia proteiinimolekyylien välille. Tavoitteena oli myös tutkia fenolisten happojen vaikutusta lakkaasin ja tyrosinaasin kykyyn ristisitoa proteiineja. Tavoitteena oli havainnoida lakkaasin ja tyrosinaasin kykyä ristisitoa valittuja malliproteiineja ja verrata näiden entsyymien kykyä ristisitoa proteiineja transglutaminaasin ristisitomiskykyyn. Aminohappoja ja peptidejä käyttämällä oli tavoitteena selvittää, voiko lakkaasi muodostaa ristsidoksen kahden kysteiinitähteen ja tyrosinaasi kahden tyrosiinitähteen välille. Lisäksi tavoitteena oli selvittää transglutaminaasin kykyä ristisitoa vehnän gluteenin gliadiineja ja gluteniineja.

3.2 Materiaalit ja menetelmät

3.2.1 Entsyymit

Tutkimuksessa käytettiin lakkaasia, tyrosinaasia ja transglutaminaasia (taulukko 9). Lakkaasit olivat VTT Biotekniikassa tuotettuja ja puhdistettuja, kun taas tyrosinaasit ja transglutaminaasi olivat kaupallisia tuotteita. Tyrosinaasivalmisteita käytettiin sellaisinaan 0,1 M natriumfosfaattipuskuriin (pH 7) liuotettuina. Käytetty transglutaminaasi oli sen sijaan puhdistettu kaupallisesta transglutaminaasivalmisteesta VTT Biotekniikassa geelisuodatuskromatografisesti.

Entsyymiliuoksista määritettiin ennen niiden käyttöä entsyymiaktiivisuudet (taulukko 9), joiden perusteella laskettiin entsyymaattisissa käsittelyissä tarvittavat entsyymimäärät. Entsyymiaktiivisuudet määritettiin kohdassa 3.2.5 kuvatuilla menetelmillä. Lakkaasiaktiivisuuksien määrittäminen ei kuitenkaan kuulunut tähän työhön. Entsyymiliuosten proteiinipitoisuudet (taulukko 9) oli valmiiksi määritetty tai laskettiin liuotetun entsyymimäärän perusteella. Entsyymiliuosten aktiivisuusmääritysten ja käytön välisen ajan liuoksia säilytettiin pakastettuina (-20 °C), paitsi lakkaasiliuoksia, joita säilytettiin jääkaappilämpötilassa (+8 °C).

Taulukko 9. Tutkimuksessa käytetyt entsyymit sekä käytettyjen entsyymiliuosten aktiivisuudet ja proteiinipitoisuudet.

Entsyymin nimi ja EC-numero(t)	Valmistaja ja valmistusmaa sekä tuotenimi tai -numero	Entsyymin alkuperä	Aktiivisuus (nkat/ml)	Proteiinipitoisuus (mg/ml)
Lakkaasi EC 1.10.3.2	VTT Biotekniikka, Suomi ThL / H 275 / fr 3 ⁽¹⁾	<i>Trametes hirsuta</i> -home	12370	5,1
Lakkaasi EC 1.10.3.2	VTT Biotekniikka, Suomi rMaL / G 465 / P2 ⁽²⁾	<i>Melanocarpus albomyces</i> -home ⁽⁵⁾	4910	10,1
Tyrosinaasi EC 1.10.3.1 ja EC 1.14.18.1	Sigma Chemical Co., USA T-7766 ⁽³⁾	<i>Agaricus bisporus</i> -sieni	420	8,3
Tyrosinaasi EC 1.10.3.1 ja EC 1.14.18.1	Fluka Chemie GmbH, Sveitsi 93989 ⁽³⁾	<i>Agaricus bisporus</i> -sieni	1460	5,0
Transglutaminaasi EC 2.3.2.13	Ajinomoto Co., Japani Activa [®] WM ⁽⁴⁾	<i>Streptovercillium mobaraense</i> -bakteeri	250	1,1

⁽¹⁾ Sitraattipuskurissa (pH 5).

⁽²⁾ Asetaattipuskurissa (pH 5).

⁽³⁾ Jauhemainen tuote liuotettiin ennen aktiivisuusmäärittystä 0,1 M natriumfosfaattipuskuriin (pH 7).

⁽⁴⁾ Kaupallista tuotetta puhdistettu VTT Biotekniikassa; puhdiste 50 mM tris-HCl:ssä (pH 7).

⁽⁵⁾ Entsyymi tuotettu siirtogeenisellä *Trichoderma reesei* -homeella.

3.2.2 Substraatit

Tutkimuksessa käytettiin entsyymeille seuraavia substraatteja:

Proteiinit

- Kauraproteiinit, jotka uutettiin kohdassa 3.2.7 kuvatulla tavalla kauraydinjauhoista (Polar-mills, Suomi)
- Gluteeniini ja gliadiini, jotka eristettiin kohdassa 3.2.7 kuvatulla tavalla kaupallisesta vehnä-gluteenista, joka sisälsi noin 80 % proteiinia ja 7 % rasvaa (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)
- Kaseiini; 98 % (CN biosciences, inc.; La Jolla, CA, USA)
- Naudan seerumin albumiini (BSA); 96-99 % (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)

Peptidit

Annettujen ohjeiden mukaan valmistetut synteettiset peptidit (Biokemis-Charlock Enterprises Ltd.; Pietari, Venäjä):

- Poly-L-tyrosiini; väh. 95 %, keskimääräinen polymeroitumisaste 90
- Seriini-tyrosiini-treoniini (Ser-Tyr-Thr)
- Tyrosiini-seriini-treoniini (Tyr-Ser-Thr)

Aminohapot ja fenoliset hapot

- L-tyrosiini (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)
- L-kysteiini (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)
- Ferulahappo (trans-4-hydroksi-3-metoksikanelihappo) (Extrasynthese; Genay, Ranska)
- Kahvihappo (3,4-dihydroksikanelihappo) (Extrasynthese; Genay, Ranska)
- Vanilliinihappo (4-hydroksi-3-metoksibentsoehappo) (Aldrich-Chemie; Steinheim, Saksa)
- *para*-kumariinihappo (*p*-kumariinihappo, 4-hydroksikanelihappo) (Sigma-Aldrich Co; St. Louis, MO, USA)

3.2.3 Muut reagenssit

Tutkimuksessa käytettiin entsyymien ja niiden substraattien lisäksi seuraavia reagensseja:

- Gliadiini (vertailugliadiini gluteenin fraktioinnin onnistumisen arvioinnissa); raakagliadiini vehnän gluteenista (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)
- Natriumtetraboraatti-10-hydraatti; väh. 99,5 % (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Saksa)
- Natriumdivetyfosfaattimonohydraatti; 99,0-102,0 % (Merck KGaA; Darmstadt, Saksa)
- Dinatriumvetyfosfaatti-12-hydraatti; 99-101 % (RdH Laborchemikalien GmbH & Co KG; Seelze, Saksa)
- Sitruunahappomonohydraatti; 99,5-101 % (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Saksa)
- Natriumkloridi; väh. 99,8 % (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Saksa)
- Etanoli; 94,0 % (96,1 til.-%), ETAX A (Primalco Oy; Rajamäki, Suomi)
- Etanoli; ETAX B Tekninen etanoli (Primalco Oy; Rajamäki, Suomi)
- Asetoni; väh. 99,5 % (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Saksa)
- Lowryn A-reagenssi (0,1 M natriumhydroksidia ja 0,19 M natriumkarbonaattia tislatussa vedessä)
- Bio-Rad DC Protein Assay -reagenssisarjan reagenssit:
 - Bio-Rad DC Protein Assay Reagent A (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)
 - Bio-Rad DC Protein Assay Reagent B (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)
- Polyakryyliamidigeelin värjäysliuos: Gel Code[®] Blue Stain Reagent (Pierce; Rockford, IL, USA)
- Molekyyliomassastandardit SDS-PAGE:ssa: Prestained Protein Marker, Broad Range, Pre-mixed Format, P7708S; sisältää seuraavia proteiineja (suluissa vastaava molekyyliomassa kilodaltonina): aprotiniini (6,5), lysotsyymi (16,5), β -laktoglobuliini A (25), trioosifosfaatti-isomeraasi (32,5), aldolaasi (47,5), glutamiinidehydrogenaasi (62), MBP-paramyosiini (83) ja MBP- β -galaktosidaasi (175) (New England BioLabs Inc.; Beverly, MA, USA)

- Molekyyli­massastandardit GPC:ssä (suluissa vastaava mole­kyyli­massa kilodalton­eina):
ribonukleaasi A (13,7), ovalbumiini (43), BSA (67), ferritiini (440) ja Blue dextran 2000 (2000) (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited; Buckinghamshire, Englanti)
- Merkaptotetanoli (2-merkaptotetanoli); >99 % (Fluka Chemie AG; Buchs, Sveitsi)
- Ditiotreitoli (DTT); väh. 98 % (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO, USA)
- Glyseroli; väh. 99,5 % (Merck KGaA; Darmstadt, Saksa)
- Bromofenolisininen (Merck KGaA; Darmstadt, Saksa)
- SDS (natriumdodekyyli­sulfaatti, lauryyli­sulfaatin natriumsuola); n. 95 % (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)
- Glysiini; väh. 99,7 % (Merck KGaA; Darmstadt, Saksa)
- Tris (tris(hydroksimetyyli)aminometaani); väh. 99,9 % (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)
- L-DOPA (L-3,4-dihydroksifenyyli­alaniini) (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO, USA)
- Karbobentsoksiglutaminyyli­glysiini (N α -CBZ-Gln-Gly) (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO, USA)
- Hydroksyyliamiini­hydrokloridi; väh. 99,8 % (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Saksa)
- Kalsiumklorididihydraatti; väh. 99 % (Riedel-de Hæn AG; Seelze, Saksa)
- EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo), n. 99 % (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)
- Rauta(III)kloridi; >98 % (Merck; Schuchardt, Saksa)
- Trikloorietikkahappo; väh. 99,5 % (Merck; Darmstadt, Saksa)
- Natriumhydroksidi (kiinteä); 98,9 % (Eka Chemicals AB; Bohus, Ruotsi)
- Natriumhydroksidi (liuos); 1,0 mol/l (Oy FF-Chemicals Ab; Yli-Ii, Suomi)
- Suolahappo; väh. 37 % (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Saksa)
- Suolahappo; 1,0 mol/l (Oy FF-Chemicals Ab; Yli-Ii, Suomi)
- Tislattu vesi (tehty Autostills four-plus -vedentislauslaitteella)
- Maxima ultra pure water (tehty maxima an -vedenkäsittelylaitteella; USF Elga; Bucks, Englanti)

3.2.4 Laitteet ja välineet

Tutkimuksessa käytettiin seuraavia laitteita ja välineitä:

- Lapasekoitin: Heidolph RZR 2101 electronic (Heidolph; Saksa)
- Sentrifuugi: Sorvall[®] RC 12 BP, roottorilla H-12000 (Sorvall Products, L.P.; Newtown, CT, USA)
- Sentrifuugi: Sorvall[®] Instruments RC-5C, roottoreilla GSA ja SS-34 (Du Pont Company; Newtown, CT, USA)
- Pöytäsentrifuugi: Biofuge stratos (Kendro Laboratory Products; Osterrode, Saksa)

- Mikrosentrifuugi (eppendorfputkia varten): Biofuge fresco (Heraeus Instruments; Osterode, Saksa)
- Mikrosentrifuugi (1,5 ml:n eppendorfputkia varten): Biofuge A (Heraeus Sepatech GmbH)
- Magneettisekoitin
- Spektrofotometri: Hitachi U-2000 Spectrophotometer (Hitachi)
- Spektrofotometri: Perkin Elmer Lambda 20 UV/VIS Spectrometer (Perkin-Elmer Corp.; Norwalk, CT, USA), liitettynä tietokoneeseen, jossa spektrofotometriä ohjaava ohjelma
- Elektroforeesiajokammio: Bio-Rad Ready Gel Cell (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)
- Elektroforeesivirtalähde: LKB Bromma 2301 macrodrive 1 Power Supply (LKB Produkter AB; Bromma, Ruotsi)
- Polyakryyliamidigeelit (SDS-PAGE:a varten): Bio-Rad Ready Gels, 12 % akryyliamidi tris-HCl:ssä, 10 kuoppaa/geeli, kuopan koko 30 µl (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)
- Tasoravistelijä: Heidolph DSG 304 (Heidolph; Saksa)
- Vakuumi-imulaitteisto
- Imusuodatuslaitteisto (Millipore; Bedford, MA, USA)
- Kalvosuodattimet ajoliuosten suodattamista varten: Durapore[®] membrane filters; 0,45 µm, HVLP (Millipore; Bedford, MA, USA)
- Suodatinpaperit: 597 1/2 Folded Filters; halk. 320 mm (Schleicher & Schuell GmbH; Dassel, Saksa)
- Imusuodatussuodatinpaperit: Whatman[®] filter papers 1; halk. 90 mm (Whatman International Ltd; Maidstone, Englanti)
- Ruiskusuodattimet: FP 30/0,45 CA-S; 0,45 µm (Schleicher & Schuell GmbH; Dassel, Saksa)
- Kalvosuodatusväkevöintilaitte: Amicon[®] 8050 (Amicon div.; Beverly, MA, USA)
- Kalvosuodatusväkevöintikalvot: Amicon[®] Ultrafiltration Membranes; polyeetterisulfoni, NMWL 10000, halk. 44,5 mm (Millipore Corporation; Bedford, MA, USA)
- Vesihaude:
 - Lämmitin: T Lauda (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co KG; Lauda-Köningshofen, Saksa)
 - Magneettisekoitin: Variomag[®] Electronicrührer Multipoint HP (H+P Labortechnik GmbH; München, Saksa)
- Geelisuodatuskromatografilaitteisto gluteeniin fraktioinnissa:
 - Pumppu: Pump P-50 (Pharmacia Biotech)
 - Pylväs: XK 50; halk. 5 cm, pit. 82 cm, tilav. n. 1600 ml (Pharmacia Biotech)
 - Pylvään täyte (geeli): Sephacryl S-100 HR; optimaalinen erotusalue 1000-100000 (pallomaisilla proteiineilla), stabiili pH-alueella 2-11 (Pharmacia LKB Biotechnology; Uppsala, Ruotsi)
 - UV-detektori: Single Path Monitor UV-1, Optical unit + Control unit (Pharmacia)
 - Piirturi (Pharmacia)

- Fraktionkerääjä: Waters Fraction Collector (Waters)
- Geelisuodatuskromatografilaitteisto entsyymireaktioseosten analysoinnissa:
 - Esipakattu pylväs: Superdex 200 HR 10/30; halk. 10 mm, pit. 300 mm, tilav. n. 24 ml, optimaalinen erotusalue 10000-600000 (pallomaisilla proteiineilla), stabiili pH-alueella 3-12 (Amersham Pharmacia Biotech AB; Uppsala, Ruotsi)
 - Äkta purifier -nestekromatografi: P-900 -pumppu, INV-907 -näytteenäyttävä ja UV-900 UV-detektori (Amersham Pharmacia Biotech AB; Uppsala, Ruotsi)
 - Tietokone, jossa laitteistoa ohjaava Unicorn 4.0 -ohjelma (Amersham Pharmacia Biotech AB; Uppsala, Ruotsi)
- Nestekromatografi-massaspektrometrilaitteisto:
 - Massaspektrometri: Quattro Micro -kolmoiskvadrupolimassaspektrometri (Micromass; UK)
 - HPLC-laitteisto: HT-Alliance 2795, PDA 996 -diodirividetektorilla (Waters; Milford, MA, USA) ja Xterra MS C18 -kolonnilla, halk. 2,1 mm, pit. 100 mm, partikkelikoko 3,5 µm (Waters)
- Hapenmittauslaitteisto: Orion DO Sensor Link Model PLM 800 varustettuna Orion DO Probe 081010 -elektrodilla (Orion Research, Inc.; Beverly, MA, USA), liitettynä tietokoneeseen, jossa laitteistoa ohjaava ohjelma
- Pyöröhaihdutin: Büchi Rotavapor-R (Büchi Laboratoriums-technik AB; Flävil, Sveitsi)
- Pakkaskuivain: Christ alpha 2-4 (Martin Christ; Osterode, Saksa) varustettuna Vacuubrand RZ 2 -vakuumipumpulla (Vacuubrand GmbH+CO; Wertheim, Saksa)
- Tasoskanneri: Hewlett Packard ScanJet 6200C (Hewlett Packard) liitettynä tietokoneeseen, jossa HP PrecisionScan Pro -kuvanskannausohjelma
- Densitometri: Bio-Rad GS-710 Calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad Laboratories) liitettynä tietokoneeseen, jossa laitetta ohjaava Quantity One 4.3 -ohjelma (Bio-Rad Laboratories)
- Geelienkuivauskehikko (SDS-PAGE -geelien kuivaamista varten): GelAir Drying Frame (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)
- Sellofaanikalvot (SDS-PAGE -geelien kuivaamista varten): GelAir Cellophane Support (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)

3.2.5 Entsyymiaktiivisuusmääritykset

Transglutaminaasiaktiivisuuden määrittäminen

Transglutaminaasiaktiivisuusmääritykset tehtiin VTT Biotekniikan transglutaminaasiaktiivisuuden määrittämisohjeen (VTT Biotekniikka, 2002a) mukaan. Transglutaminaasinäytteitä inkuboitii 37 °C:ssa karbobentsoksiglutaminyylyglysiiniä (N α -CBZ-Gln-Gly) ja hydroksyyliamiinia 50 mM tris-HCl -puskurissa (pH 6,0) sisältävän substraattiliuoksen kanssa 10 minuuttia, jonka jälkeen näytteisiin lisättiin hapanta ferrikloridireagenssia, jonka happamuus katkaisi entsyymireaktion. Ferrikloridireagenssi reagoi samalla reaktioseokseen transglutaminaasin vaikutuksesta karbobentsoksiglutaminyylyglysiinistä ja hydroksyyliamiinista syntyneen

hydroksamaatin kanssa, jolloin muodostui värillinen kompleksi, jonka absorbanssia mitattiin spektrofotometrillä (Hitachi U-2000) aallonpituudella 525 nm. Transglutaminaasiaktiivisuudet laskettiin saatujen absorbanssiarvojen perusteella kaavalla

$$\text{transglutaminaasiaktiivisuus (nkat/ml)} = \frac{A V_{\text{kok}} k}{\varepsilon \Delta t V_n l}$$

missä A = näytteen absorbanssi aallonpituudella 525 nm
 V_{kok} = reaktioseoksen kokonaistilavuus (1 ml)
 k = näytteen laimennuskerroin
 ε = reaktiotuotteen molaarinen absorptiokerroin (340 l / (mol*cm))
 Δt = reaktioaika (600 s)
 V_n = entsyyminäytteen tilavuus (0,1 ml)
 l = kyvetin leveys valotien kohdalla (1 cm).

Tyrosinaasiaktiivisuuden määrittäminen

Tyrosinaasiaktiivisuusmääritykset tehtiin VTT Biotekniikan tyrosinaasiaktiivisuuden määrittämissä ohjeissa (VTT Biotekniikka, 2002b) mukaan. Tyrosinaasinäytteitä inkuboitiin 40 °C:ssa L-DOPA:aa (L-3,4-dihydroksifenyylialaniini) 0,1 M natriumfosfaattipuskurissa sisältävän substrattiliuoksen (pH 7,0) kanssa, jolloin tyrosinaasi hapetti L-DOPA:n DOPA-kinoniksi, joka muuttui edelleen ei-entsymaattisesti värilliseksi dopakromiksi. Dopakromin muodostumista seurattiin spektrofotometrillä (Perkin Elmer Lambda 20) välittömästi entsyymilisäyksen jälkeen 20 sekunnin mittausvälein 3 minuutin ajan aallonpituudella 475 nm. Tulokset laskettiin sellaisten entsyymilaimennosten perusteella, jotka aiheuttivat 60 sekunnin aikana absorbanssin kasvun noin 0,2 absorbanssiyksiköllä. Absorbanssin kasvun lineaariselta osalta määritetyn absorbanssin kasvunopeuden perusteella tyrosinaasiaktiivisuus laskettiin kaavalla

$$\text{tyrosinaasiaktiivisuus (nkat/ml)} = \frac{\Delta A V_{\text{kok}} k}{\varepsilon \Delta t V_n l}$$

missä ΔA = näytteen absorbanssin lineaarinen muutos aallonpituudella 475 nm
 V_{kok} = reaktioseoksen kokonaistilavuus (ml)
 k = näytteen laimennuskerroin
 ε = reaktiotuotteen molaarinen absorptiokerroin (3400 l / (mol*cm))
 Δt = aika, jolta ΔA määritetty (s)
 V_n = entsyyminäytteen tilavuus (ml)
 l = kyvetin leveys valotien kohdalla (1 cm).

Lakkaasiaktiivisuuden määrittäminen

Lakkaasiaktiivisuusmääritykset tehtiin VTT Biotekniikan lakkaasiaktiivisuuden määrittämissuunnitelmaan (VTT Biotekniikka, 1992) mukaan. Määritys perustui lakkaasiäytteen käsittelyyn huoneenlämmössä 2,2'-atsinodietyylibentstiatsoliini-6-sulfonaatin (ABTS) kanssa 25 mM sukkinatitpuskurissa (pH 4,5), jolloin lakkaasi hapetti ABTS:n tummanvihreäksi kationiradikaaliksi, jonka aiheuttamaa valon absorptiota mitattiin spektrofotometrillä aallonpituudella 436 nm. Lakkaasiaktiivisuudet laskettiin saatujen absorbanssiarvojen perusteella. Lakkaasiaktiivisuusmääritysten suorittaminen ei kuulunut tähän työhön.

3.2.6 Proteiinipitoisuusmääritys

Kauraproteiiniuutteen ja gluteeniinieristuksen proteiinipitoisuudet määritettiin Bio-Rad DC Protein Assay -proteiinipitoisuudenmääritysreagenssisarjalla. Ennen määrittämistä näytteistä saostettiin proteiinit 10-15 % trikloorietikkahapolla. Trikloorietikkahappoa lisättiin näytteen siihen nähden kolminkertainen tilavuus, minkä jälkeen seoksen annettiin seistä jääkaappilämpötilassa 30 minuuttia. Tämän jälkeen saostuneet proteiinit otettiin talteen sentrifugomalla (Biofuge stratos; 15 min, 3000 rpm), ja proteiinisakka liuotettiin alkuperäistä näytetilavuutta vastaavaan tilavuuteen Lowryn A-reagenssia (sis. 0,1 M NaOH). Näin saadusta liuoksesta määritettiin proteiinipitoisuus reagenssisarjan ohjeiden mukaan, paitsi että kaikissa vaiheissa käytettiin ohjeisiin verrattuna puolia nestetilavuuksia.

Proteiinipitoisuuden määrittäminen reagenssisarjalla perustui värireaktioon, jonka voimakkuutta mitattiin spektrofotometrillä (Hitachi U-2000) aallonpituudella 750 nm. Menetelmässä pääasiassa proteiinien tyrosiini ja tryptofaani, mutta myös kysteiini, kystiini ja histidiini aiheuttavat värin muodostumista. Standardiproteiiniliuoksina käytettiin naudan seerumin albumiinista valmistettuja liuoksia (0,15; 0,3; 0,75 ja 1,5 mg/ml). Näytteiden proteiinipitoisuuksien laskemiseen käytettiin tulokset sellaisista näytelaimennoksista, joiden absorbanssi oli suunnilleen alueella 0,15-0,4 absorbanssiyksikköä. Proteiinipitoisuus laskettiin vähintään kahden rinnakkaismäärityksen keskiarvona.

3.2.7 Substraattien valmistus

Kauraproteiinien uutto

Kauraproteiiniuute valmistettiin uuttamalla 400 g kauraydinjauhoja kahdella litralla 10 mM natriumtetraboraattipuskuria (pH 9,1), joka sisälsi 1 M natriumkloridia. Jauhoja uutettiin puskuriliuoksella kaksi tuntia huoneenlämmössä lapasekoittimella sekoittaen (74 rpm), jonka jäl-

keen uute erotettiin seoksesta sentrifugoimalla (Sorvall® RC 12 BP roottorilla H-12000; 20 min, 4000 rpm). Sentrifugoimalla erotettu uute suodatettiin paperisuodattimella (Schleicher & Schuell 597 1/2 Folded Filters) ja pakastettiin (-20 °C). Uutteesta määritettiin proteiinipitoisuus reagenssisarjalla (Bio-Rad DC Protein Assay) kohdassa 3.2.6 kuvatulla tavalla.

Gluteenin fraktiointi uuttamalla

Gluteenia fraktioitiin pääkomponenteikseen gliadiiniksi ja gluteniiniksi kahdesti (fraktioinnit 1 ja 2). Kummankin fraktioinnin kaikki uutot tehtiin magneettisekoituksessa huoneenlämmössä. Lähtöaineena käytettiin kaupallista gluteenivalmistetta, joka sisälsi valmistajan mukaan noin 80 % proteiinia ja 7 % rasvaa. Fraktioinnista 1 otettiin talteen vain gluteniini, jonka alayksikköjä fraktioitiin edelleen geelisuodatuskromatografisesti. Fraktioinnista 2 otettiin talteen sekä gliadiini että gluteniini, joita molempia käsiteltiin transglutaminaasilla.

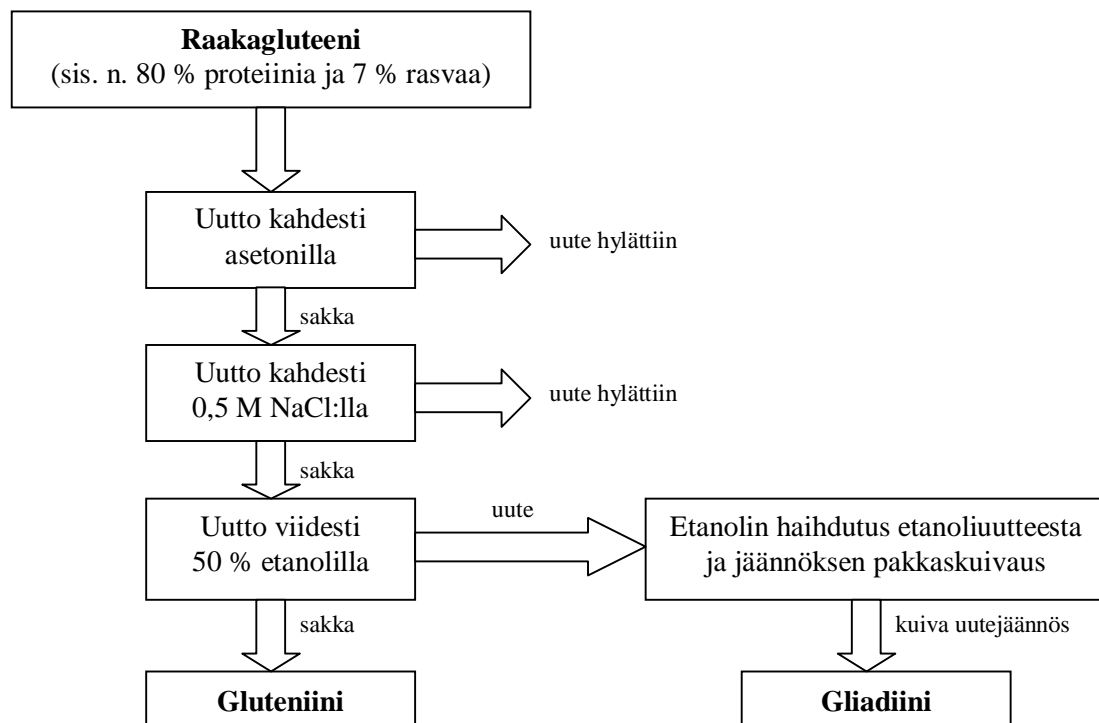
Fraktioinnissa 1 uutettiin 100 g gluteenia ensin 1250 ml:lla 0,5 M natriumkloridiliuosta yön yli. Seos sentrifugoitiin (Sorvall® Instruments RC-5C roottorilla GSA; 10 min, 4000 rpm) ja saatua sakkaa uutettiin 1000 ml:lla 0,5 M natriumkloridiliuosta kolme tuntia. Seos sentrifugoitiin (5 min, 3000 rpm), jonka jälkeen sakkaa alettiin uuttaa 50 % (v/v) etanoliliuoksella. Etanoliiutto tehtiin sakalle yhteensä viisi kertaa. Kullakin kerralla etanoliliuosta käytettiin 1000 ml. Uutot kestivät lyhimmillään 1 h 20 min ja pisimmillään yön yli. Uuttojen välissä seos sentrifugoitiin (5-30 min, 2000-4000 rpm; aika piteni ja kierrosnopeus suureni uuttojen edetessä), ja saatu sakka otettiin seuraavaan uuttoon. Viidennen etanoliiuuton jälkeen sentrifugoimalla saatua sakkaa pidettiin gluteniinina. Saatuun gluteniiniin lisättiin 1000 ml 0,1 M etikkahappoliuosta ja seos pakastettiin (-20 °C). Näin saatua gluteniiniliuosta käytettiin näytteenä gluteniinin geelisuodatuskromatografisessa fraktioinnissa.

Fraktioinnissa 2 uutettiin 5 g gluteenia ensin kahdesti 100 ml:lla asetonia. Ensimmäinen uutto kesti tunnin ja toinen kolme tuntia. Uuttojen jälkeen seos sentrifugoitiin (Sorvall® Instruments RC-5C roottorilla GSA; 5 min, 2000 rpm ja 10 min, 4000 rpm) ja sakka otettiin uuteen uuttoon. Jälkimmäisen asetoniuuton jälkeen sakkaa uutettiin vastaavasti kaksi kertaa 50 ml:lla 0,5 M natriumkloridiliuosta. Ensimmäinen natriumkloridiiutto kesti yön yli ja toinen seitsemän tuntia. Uuttojen jälkeen seos sentrifugoitiin (5 min, 2000 rpm) ja sakka otettiin uuteen uuttoon. Natriumkloridiiuttojen jälkeen sakkaa alettiin uuttaa 50 % (v/v) etanoliliuoksella. Etanoliiuttoa tehtiin yhteensä viisi, joista jokaisessa käytettiin 50 ml etanoliliuosta. Uutot kestivät lyhimmillään tunnin ja pisimmillään yön yli. Kunkin uuton jälkeen seos sentrifugoitiin.

tiin (5-15 min, 2500-6000 rpm; aika piteni ja kierrosnopeus suureni uuttojen edetessä). Sakka otettiin uuteen uuttoon ja etanoliuute kerättiin talteen. Viimeisen etanoliuuton jälkeen jäljelle jäänyttä sakkaa pidettiin gluteniinina.

Fraktioinnista 2 saadun gluteniinin proteiinipitoisuus määritettiin reagenssisarjalla (Bio-Rad DC Protein Assay) kohdassa 3.2.6 kuvatulla tavalla. Ennen proteiinipitoisuuden määrittystä gluteniini pelkistettiin 1 % (w/w) ditiotreitolilla. 50 µl gluteniiniliuosta lisättiin 5 ml:aan 0,1 M etikkahappoa, joka sisälsi 50 mg ditiotreitolia. Sen jälkeen seosta lämmitettiin kiehu- vassa vesihauteessa viisi minuuttia. Proteiinipitoisuus määritettiin näin saadusta liuoksesta.

Fraktioinnissa 2 kerätyistä etanoliuutteista haihdutettiin etanolia pois pyöröhaihduttimella 40 °C:ssa, jonka jälkeen jäännösluos pakastettiin (-80 °C). Jäätynyt liuos pakkaskuivattiin. Pakkaskuivauksella saatua kuivaa jäännöstä pidettiin puhtaana gliadiinina. Siitä tehtyjen liu- osten proteiinipitoisuus laskettiin liuotetun gliadiinin massan perusteella. Fraktioinnin 2 on- nistumista tutkittiin SDS-PAGE -analyysillä kohdassa 3.2.9 kuvatulla tavalla. Kaavamainen yhteenveto fraktioinnista 2 on esitetty kuvassa 9.



Kuva 9. Gluteenin fraktiointi gluteniiniksi ja gliadiiniksi (fraktiointi 2).

Gluteniinin geelisuodatuskromatografinen fraktiointi

Gluteenin fraktioinnista 1 saatua gluteniinia fraktioitiin edelleen geelisuodatuskromatografisesti. Ennen geelisuodatuskromatografiapylvääseen syöttöä gluteniini hajotettiin monomeereikseen katkaisemalla monomeerien väliset rikkisidokset pelkistämällä. 10 ml gluteniini-liuosta pelkistettiin lisäämällä se ditiotreitoliliuokseen (1 g ditiotreitolia 90 ml:ssa 0,1 M etikkahappoa [pH 2,8]) ja lämmittämällä seosta kiehuuassa vesihauteessa viisi minuuttia ja sen jälkeen 50 °C:een vesihauteessa kolme tuntia. Seoksessa oli siten 1 % (w/w) ditiotreitolia, joka vastaa ditiotreitolipitoisuutta 65 mM. Lämpökäsittelyn jälkeen seos sentrifugoitiin (Sorvall® Instruments RC-5C roottorilla SS-34; 16000 rpm, 15 min) ja liuos suodatettiin ruis-kusuodattimella (0,45 µm). Näin saatua liuosta imettiin pumpun kautta geelisuodatuspylvääseen 50 ml (n. 3 % pylvään tilavuudesta).

Geelisuodatuskromatografilaitteisto koostui pumpusta, geelisuodatuspylvästä (Pharmacia XK 50, pituus 82 cm, tilavuus n. 1600 ml, täyte Sephacryl S-100 HR), UV-detektorista, piirturista ja fraktionkerääjästä. Laitteistoa ohjattiin käsikäyttöisesti ja tulostiedot kerättiin piirturilla paperille. Geelisuodatuskromatografia-ajo tehtiin huoneenlämmössä. Ajoliuoksena käytettiin 0,1 M etikkahappoliuosta (pH n. 3), joka sisälsi 1 mM ditiotreitolia. Ajoliuoksen tekoon käytettiin puhdistettua vettä, liuos suodatettiin imusuodatuksella kalvosuodatinta (0,45 µm) käyttäen ja siitä poistettiin liuennutta ilmaa vakuumi-imulaitteistolla ennen käyttöä. Ajoliuoksen virtausnopeus oli 2,5 ml/min. Proteiinien detektointi tapahtui UV-detektorilla aallonpituudella 280 nm.

Kolonnin läpi tulleesta ajoliuoksesta alettiin kerätä fraktioita, kun näytteesyötön jälkeen 300 ml ajoliuosta (n. 20 % pylvään tilavuudesta) oli tullut pylvästä. Fraktioita kerättiin 120 kpl ja fraktion koko oli 10 ml (keräysaika 4 min/fraktio, yhteensä 8 h). Ajosta saadun kromatogrammin perusteella fraktiot 25-30, 31-37 ja 38-45 yhdistettiin. Yhdistettyjä fraktioita väkevöitiin kalvosuodatusväkevöinnillä noin kymmenkertaiseen väkevyyteen fraktioiden SDS-PAGE -analyysiä varten, joka tehtiin kohdassa 3.2.9 kuvatulla tavalla.

3.2.8 Malliproteiinien entsymaattiset käsittelyt

Malliproteiinien entsymaattiset käsittelyt ja reaktioseosten analysointitavat käyvät ilmi taulukosta 10. Entsyymeillä käsiteltiin joko pelkkää malliproteiinia tai sen ja fenolisen hapon seosta. Entsyymikäsittelyjen aikana näytteitä inkuboitiin vesihauteessa lämpötilassa 40 °C. Näytteitä sekoitettiin inkuboinnin aikana magneettisekoituksella (250 rpm). Lakkaasia sisältäneet

reaktioseokset puskuroitiin 0,1 M natriumsitraattipuskurilla pH-arvoon 5. Tyrosinaasia sisältäneet reaktioseokset puskuroitiin 0,1 M natriumfosfaattipuskurilla pH-arvoon 7, kuten myös transglutaminaasia sisältäneet reaktioseokset lukuun ottamatta gluteniinia tai gliadiinia sisältäneitä reaktioseoksia, jotka puskuroitiin 0,1 M natriumasetaattipuskurilla pH-arvoon 4,5. Vertailunäytteitä (substraattiliuoksia ilman entsyymiä) käsiteltiin kaikissa näytesarjoissa kuten vastaavia entsyymiä sisältäneitä näytteitä. Rinnakkaisnäytteitä ei tehty.

Gluteniini- ja gliadiiniliuokset pelkistettiin ennen niiden transglutaminaasikäsittelyä 1 % (w/w) ditiotreitolia sisältäneessä 0,1 M natriumasetaattipuskurissa (pH 4,5) kuumentamalla seosta kiehuvaan veteen vähintään viisi minuuttia. Muita substraatteja kuin gluteniinia ja gliadiinia käytettiin entsyymikäsittelyihin sellaisenaan. Substraattiproteiinipitoisuudet reaktioseoksissa olivat 1-3 mg/ml ja fenolisen hapon pitoisuudet 0,5-5 mM. Entsyymiannosten koko vaihteli välillä 100-10000 nkat entsyymiä / g substraattia. Vastaavat entsyymiliuosten käyttömäärät laskettiin määritettyjen entsyymiaktiivisuuksien (taulukko 9) perusteella. Näytteiden inkubointiajat vaihtelivat 15 minuutista 23 tuntiin. Heti inkuboinnin jälkeen näytteitä kuumentettiin kiehuvaan veteen viisi minuuttia entsyymien inaktivoimiseksi ja entsyymireaktioiden katkaisemiseksi. Reaktioseoksia analysoitiin entsyymikäsittelyjen jälkeen laimentamattomina.

3.2.9 Malliproteiinien reaktioseosten analyysimenetelmät

Natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelelektroforeesi (SDS-PAGE)

Näytteiden analysointi SDS-PAGE:lla tehtiin Laemmliin (1970) menetelmällä. Näytteet käsiteltiin SDS-PAGE -ajoa varten sekoittamalla yksi osa näytepuskuria ja kaksi osaa näytettä ja kuumentamalla seosta kiehuvaan vesihauteeseen vähintään viisi minuuttia. Myös molekyyli-massastandardi lämpökäsiteltiin, mutta siihen ei lisätty näytepuskuria. Lämpökäsittelyn jälkeen näyteputket sentrifugoitiin lyhyesti kaiken nesteen saamiseksi putkien pohjalle. Välittömästi sen jälkeen näytteet ja molekyyli-massastandardi pipetoitiin polyakryyliamidigeelille. Yhteen geelin kuoppaan pipetoitiin 18 µl näytettä tai 20 µl molekyyli-massastandardia. Elektroforeesiajoliuosta käytettiin ajolaitteessa 350 ml. Elektroforeesiajoissa jännitteen ylärajaasetus oli 200 V ja virran 100 mA. Ajoaika oli noin puoli tuntia. Rinnakkaisnäytteitä ei tehty.

Taulukko 10. Malliproteiineille tehtyt entsyymikäsittelyt ja reaktioseosten analysointitavat.

Malliproteiini	Malliproteiini-pitoisuus (mg/ml)	Fenolinen happo	Fenolisen hapon pitoisuudet (mM)	Entsyymi	Entsyymiannokset (nkat/g)	Reaktioseoksen pH	Reaktioajat (h)	Reaktioseoksen analysointitapa
Kauraproteiinit	1,25	-	-	ThL	100 ja 1000	5	2 ja 16	SDS-PAGE
Kauraproteiinit	1,25	-	-	MaL	100 ja 1000	5	2 ja 16	SDS-PAGE
Kauraproteiinit	1,25	-	-	TYR (S)	100 ja 1000	7	2 ja 16	SDS-PAGE
Kauraproteiinit	1,25	-	-	TG	1000 ja 10000	7	2 ja 16	SDS-PAGE
Kauraproteiinit	1,25	Ferulahappo	0,5 ja 5	ThL	1000	5	16	SDS-PAGE ja GPC
Kauraproteiinit	1,25	Kahvihappo	0,5 ja 5	ThL	1000	5	16	SDS-PAGE ja GPC
Kauraproteiinit	1,25	Vanilliinihappo	0,5 ja 5	ThL	1000	5	16	SDS-PAGE ja GPC
Kauraproteiinit	1,25	<i>p</i> -kumariinihappo	0,5 ja 5	ThL	1000	5	16	SDS-PAGE ja GPC
Kaseiini	1,25	-	-	ThL	1000	5	0,25; 2 ja 18	SDS-PAGE
Kaseiini	1,25	-	-	MaL	1000	5	0,25; 2 ja 18	SDS-PAGE
Kaseiini	1,25	-	-	TYR (S)	1000	7	0,25; 2 ja 18	SDS-PAGE
Kaseiini	1,25	-	-	TG	1000	7	0,25; 2 ja 18	SDS-PAGE
Kaseiini	1,25	Ferulahappo	0,5; 2 ja 5	ThL	1000	5	2 ja 20	SDS-PAGE
Kaseiini	1	Ferulahappo	0,5	ThL	1000	5	0,25; 0,5; 1; 2; 4 ja 22	SDS-PAGE ja GPC
BSA	1	-	-	ThL	1000	5	2 ja 20	SDS-PAGE
BSA	1	-	-	TYR (S)	1000	7	2 ja 20	SDS-PAGE
BSA	1	Ferulahappo	0,5	ThL	1000	5	2 ja 20	SDS-PAGE
BSA	1	Ferulahappo	0,5	TYR (S)	1000	7	2 ja 20	SDS-PAGE

ThL = *Trametes hirsuta* -lakkaasiMaL = *Melanocarpus albomyces* -lakkaasi

TYR (S) = tyrosinaasi (Sigman valmistama)

TG = transglutaminaasi

SDS-PAGE = natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi

GPC = geelisuodatuskromatografia

Taulukko 10 (jatkoa).

Malliproteiini	Malliproteiini-pitoisuus (mg/ml)	Fenolinen happo	Fenolisen hapon pitoisuudet (mM)	Entsyymi	Entsyymiannokset (nkat/g)	Reaktio-seoksen pH	Reaktioajat (h)	Reaktioseoksen analysointitapa
Gluteniini	3	-	-	TG	1000	4,5	1 ja 22	SDS-PAGE
Gluteniini	3	-	-	TG	1000, 2000 ja 4000	4,5	16,5	SDS-PAGE
Gluteniini	3	-	-	TG	100 ja 1000	4,5	0,25; 1; 4 ja 23	SDS-PAGE
Gliadiini	3	-	-	TG	1000	4,5	1 ja 22	SDS-PAGE
Gliadiini	3	-	-	TG	1000, 2000 ja 4000	4,5	16,5	SDS-PAGE

ThL = *Trametes hirsuta* -lakkaasiMaL = *Melanocarpus albomyces* -lakkaasi

TYR (S) = tyrosinaasi (Sigman valmistama)

TG = transglutaminaasi

SDS-PAGE = natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi

GPC = geelisuodatuskromatografia

Näytepuskuria varten valmistettiin liuosta, joka sisälsi 30 % (v/v) glyserolia ja 0,003 % (w/w) bromofenolisinistä 0,367 M tris-HCl -puskuriliuoksessa (pH 6,8). Liuos pakastettiin ja tarvittava määrä sulatettiin käyttöpäivänä. Juuri ennen käyttöä 350 µl:aa liuosta kohti lisättiin 20 mg SDS:ää (natriumdodekyylisulfaattia) ja tarvittaessa pelkistimeksi 150 µl merkaptotaania. Elektroforeesiajoliuos valmistettiin juuri ennen ajoa tekemällä valmiista kantaliuoksesta kymmenkertainen laimennos tislattuun veteen. Laimennettu ajoliuos sisälsi 1,9 M glysiiniä, 0,25 M tris:iä (tris[hydroksimetyyli]aminometaania) ja 35 mM SDS:ää.

Elektroforeesiajon jälkeen geeliä pestiin tislatulla vedellä kolme kertaa vähintään viisi minuuttia. Vesipesun jälkeen geeli jätettiin värjäytymään Coomassie Blue -väriä sisältävään värjäysliuokseen yöksi. Värjäyksen jälkeen geelistä pestiin ylimääräinen taustaväri tislatulla vedellä useita kertoja vettä vaihtaen. Geeli jätettiin pesuun vielä seuraavaksi yöksi. Kaikki pesut ja värjäykset tehtiin tasoravistelussa. Ylimääräisen värin pois pesun jälkeen geeli skannattiin sekä tavallisella tasoskannerilla että densitometrillä. Lopuksi geeli kuivattiin huoneenlämmössä sellofaanikalvojen välissä geelienkuivauskehikkoa apuna käyttäen. Geelejä analysoitiin sekä silmämääräisesti että densitometrin avulla. Geelillä näkyneitä proteiinivyöhykkeitä vastaavat molekyyli-massat määritettiin geelin molekyyli-massastandardin vyöhykkeiden perusteella densitometrin ohjelmalla. Densitometrillä määritettiin myös vyöhykkeiden voimakkuuksia (optinen tiheys).

Geelisuodatuskromatografia (GPC)

Geelisuodatuskromatografilaitteisto koostui Äkta purifier -laitteiston pumpusta, näytteesyöttäjästä ja UV-detektorista, sekä laitteistoon kytketystä geelisuodatuspylvästä (esipakattu Superdex 200 HR 10/30). Laitteistoa ohjattiin ja tulostiedot kerättiin laitteistoon liitettyllä tietokoneella ja sen Unicorn 4.0 -ohjelmalla.

Ennen geelisuodatuspylvääseen injektointia kaikki näytteet suodatettiin 0,45 µm:n ruiskusuodattimilla. Jos näyte sellaisenaan tukki suodattimen, näyte sentrifugoitiin (eppendorfputkille Biofuge fresco, 10 min, 13000 rpm; koeputkille Biofuge stratos, 10 min, 4000 rpm) ja saatua liuosta suodatettiin ja käytettiin näytteenä. Injektointitilavuus oli 100 µl ja injektointi tapahtui 100 µl:n näytesilmukkaa käyttäen automaattisesti.

Ajoliuoksena käytettiin 0,1 M natriumasetaattipuskuria (pH 5), joka sisälsi 0,15 M natriumkloridia. Ajoliuoksen virtausnopeus oli 0,5 ml/min. Ajo päätettiin tarpeen mukaan 2-3 pyl-

vään tilavuutta vastaavan ajoliuosmäärän tultua pylvästä ulos näytteensyötön jälkeen. Ajoaika käytetyllä pylvällä ja virtausnopeudella oli siten 1 h 36 min - 2 h 24 min.

3.2.10 Lakkaasin ja tyrosinaasin katalysoimien reaktioiden seuranta happielektrodilla

Hapenkulutusmittauksissa seurattiin lakkaasin ja tyrosinaasin aiheuttamaa substraattiliuoksen happipitoisuuden pienenemistä entsyymilisäyksen jälkeen, kun ilman hapen liukeneminen reaktioseokseen oli estetty. Reaktioseoksen substraatin ja entsyymien määrät sekä mittausajat eri kokeissa on esitetty taulukossa 11. Reaktioseosten entsyymimäärät valittiin niin, että hapenkulutusnopeus oli kohtuullinen ja vakio riittävän kauan. Reaktioseosten substraattimäärät valittiin siten, että substraatin kulumisesta aiheutuva substraattipitoisuuden pieneneminen ei rajoittanut reaktiota kohtuulliseen aikaan.

Mittaukset suoritettiin happielektrodilla reaktioastiana käytetystä erlenmayerpullosta, joka ennen mittausta täytettiin ääriään myöten substraattiliuoksella ja suljettiin ilmatiiviisti muovikalvolla. Entsyymi lisättiin substraattiliuokseen elektrodin kauluksen kautta. Elektrodi asetettiin paikoilleen kaulukseensa ja happimittaus aloitettiin välittömästi entsyymilisäyksen jälkeen. Mittaukset tehtiin huoneenlämmössä ja reaktioseosta sekoitettiin mittausten aikana magneettisekoituksella (250 rpm). Happielektrodilla mitattuja reaktioseoksen happipitoisuusarvoja kerättiin automaattisesti 15 tai 30 s:n välein. Mitattujen happipitoisuuksien perusteella laskettiin entsyymien aiheuttama hapenkulutusnopeus aikaväliltä, jolla happipitoisuuden pienenemisnopeus (hapenkulutusnopeus) oli vakio. Rinnakkaismääryksiä ei tehty.

Taulukko 11. Lakkaasin ja tyrosinaasin katalysoimien reaktioiden seuranta happielektrodilla.

Substraatti	Substraattipitoisuus	Entsyymi	Entsyymiannokset	Reaktioseoksen pH	Mittausaika (entsyymien lisäyksestä)
Ferulahappo	5 mM	ThL	5 nkat/ml	5	30 min
Kahvihappo	5 mM	ThL	5 nkat/ml	5	30 min
Vanilliinihappo	5 mM	ThL	5 nkat/ml	5	30 min
<i>p</i> -kumariinihappo	5 mM	ThL	5 nkat/ml	5	30 min
L-kysteiini	5 mM	ThL	5, 10 ja 20 nkat/ml	5	30 min
Ferulahappo	5 mM	TYR (S)	5 nkat/ml	7	20 min
Poly-L-tyrosiini	1 mg/ml	TYR (S)	1000 nkat/g	7	60 min
L-tyrosiini	2,5 mM	TYR (F)	10 nkat/ml	7	45 min
Poly-L-tyrosiini	1 mg/ml	TYR (F)	20 nkat/ml	7	150 min

ThL = *Trametes hirsuta* -lakkaasi

TYR (S) = tyrosinaasi (Sigman valmistama)

TYR (F) = tyrosinaasi (Flukan valmistama)

3.2.11 Lakkaasin ja tyrosinaasin katalysoimien reaktioiden reaktiotuotteiden analysointi nestekromatografia-massaspektrometrialla (LC-MS) ja UV/VIS-spektrofotometrialla

Nestekromatografia-massaspektrometria (LC-MS)

LC-MS:llä analysoitiin lakkaasilla käsiteltyä L-kysteiiniä ja tyrosinaasilla käsiteltyjä synteettisiä tripeptidejä (taulukko 12). Lakkaasikäsitteilyt tehtiin 10 mM ammoniumasetatipuskurissa (pH 5) ja tyrosinaasikäsitteilyt 0,1 M natriumfosfaattipuskurissa. Entsyymikäsitteilyn jälkeen näytteistä osa lämpökäsiteltiin ja osaan lisättiin vahvaa emästä entsyymin inaktivoimiseksi. Synteettisiä tripeptidejä sisältäneitä reaktioseoksia ei käsitelty entsyymin inaktivoimiseksi. Näytteistä tehtiin tyypillisesti kaksi rinnakkaisnäytettä.

Ionisaatiotapana käytettiin kummassakin tapauksessa positiivista elektrosprayta, sumutuskaasuna typpeä (N_2) ja massa-alueena aluetta 50-400 m/z. Näytteet laimennettiin 0,1 % muura-haishappo - 50 % asetonitrililiuokseen. Kysteiiniä sisältäneitä reaktioseoksia analysoitiin massaspektrometrilla käyttäen näytteensyöttöön ruiskupumppua. Kysteiiniä sisältäneistä reaktioseoksista määritettiin kysteiinipitoisuus ja yhdessä kokeessa myös kystiinipitoisuus. Massaspektrometria käytettiin myös analysoitavien komponenttien tunnistukseen.

Synteettisiä tripeptidejä sisältäneitä reaktioseoksia analysoitiin LC-MS:llä käyttäen massaspektrometria yhdistettynä C18 -kolonnilla varustettuun HPLC-laitteistoon. Reaktioseosten komponentteja erotettiin toisistaan HPLC:llä (gradienttiao muura-haishappo-vesi-asetonitrili-seoksilla) ja tunnistettiin HPLC:hen liitettyllä massaspektrometrilla, jossa ionisaatiomenetelmänä käytettiin negatiivista elektrosprayta ja sumutuskaasuna typpeä. Massaspektri mitattiin alueelta 200-1200 m/z. LC-MS -analyysien käytännön suoritus ei kuulunut tähän työhön.

UV/VIS-spektrofotometria

UV/VIS-spektrofotometrilla analysoitiin tyrosinaasin vaikutusta synteettisiin tripeptideihin (taulukko 12). Tripeptidiliuoksista mitattiin 0,1 M natriumfosfaattipuskurissa (pH 7) tehdyn tyrosinaasikäsitteilyn jälkeen spektrofotometrillä (Perkin Elmer Lambda 20) valon absorptiospektri aallonpituusalueelta 190-1100 nm. Mittauksessa käytettiin kvartsikyvettejä ja laite nollattiin käytetyllä reaktiopuskurilla.

Taulukko 12. Reaktioseokset, joiden tuotteita analysoitiin nestekromatografia-massaspektrometrialla (LC-MS) ja UV/VIS-spektrofotometrialla.

Substraatti	Substraatti-pitoisuus (mM)	Entsyymi	Entsyymiannokset (nkat/ml)	Reaktioseoksen pH	Reaktioajat (h)	Reaktioseoksen analysointitapa
L-kysteiini	10	ThL	2 ja 20	5	n. 20	LC-MS
L-kysteiini	10	ThL	20 ja 100	5	20	LC-MS
L-kysteiini	10	ThL	200	5	18	LC-MS
Ser-Tyr-Thr	5	TYR (F)	10	7	18,5	UV/VIS ja LC-MS
Tyr-Ser-Thr	5	TYR (F)	10	7	18,5	UV/VIS ja LC-MS
Ser-Tyr-Thr ja Tyr-Ser-Thr	2,5 kumpaakin	TYR (F)	10	7	18,5	UV/VIS ja LC-MS

ThL = *Trametes hirsuta* -lakkaasi

TYR (F) = tyrosinaasi (Flukan valmistama)

3.3 Tulokset

3.3.1 Proteiinien eristys

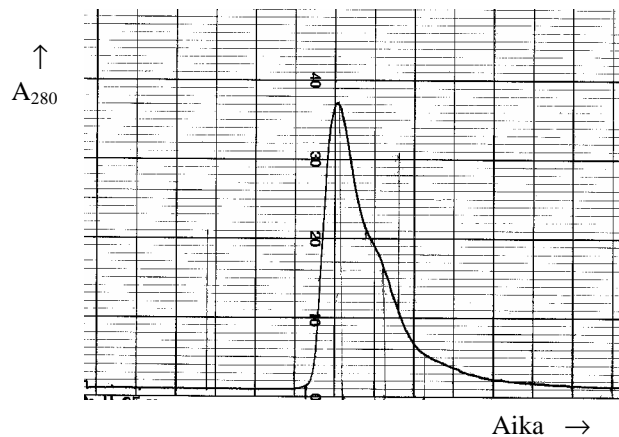
Kauraproteiinit

Kauraproteiiniuutetta saatiin talteen 1660 ml eli 83 % uuttoon käytetystä nestetilavuudesta. Uutteen proteiinipitoisuudeksi määritettiin 6,8 mg/ml. Siten proteiinia saatiin uutetuksi yhteensä 11,3 g, joka on 2,8 % lähtöaineena käytetyn kauraydinjauhon massasta (400 g). Jos jauhun oletetaan sisältäneen saman verran proteiinia kuin kaurahiutaleet eli 13,5 % (Oksman-Caldentey ym., 1999), jauhon proteiinista saatiin uutettua 21 %. Suodatettu uute oli kellertävää ja sameaa, mutta silmin tarkasteltuna homogeenista.

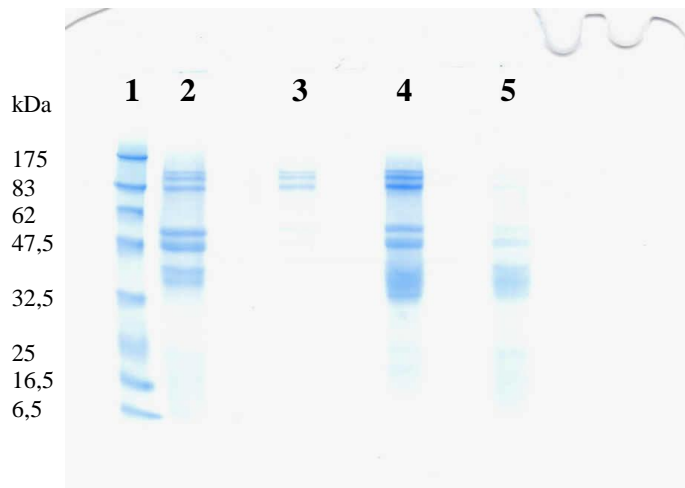
Gluteniini ja gliadiini

Kun gluteenin fraktioinnista 1 saatua gluteniinia fraktioitiin edelleen geelisuodatuskromatografisesti, gluteniinin alayksiköt erottuivat toisistaan vain vähän. GPC-kromatogrammissa gluteniinit antoivat vain yhden leveän piikin (kuva 10). Piikin eri osia vastanneet yhdistetyt fraktiot antoivat SDS-PAGE -analyysissä erilaiset alayksikköjen osuudet. Piikin alkuosaa vastaavassa yhdistetyssä fraktiossa (I yhdistetty fraktio) oli enemmän suuren molekyyli­massan alayksiköitä (vyöhykkeet 85, 109 ja 126 kDa) kuin piikin loppuosaa vastaavassa yhdistetyssä fraktiossa (III yhdistetty fraktio), mutta pienen (30-40 kDa) ja keskisuuren (vyöhykkeet 48 ja 54 kDa) molekyyli­massan alayksiköt puuttuivat. Piikin keskiosaa vastaava yhdistetty fraktio

(II yhdistetty fraktio) näyttää SDS-PAGE:ssa hyvin samantapaiselta kuin näytteenä käytetty pelkistetty gluteniini (kuva 11).



Kuva 10. Alayksiköikseen pelkistetyn gluteniinin GPC-kromatogrammi gluteniinin GPC-fraktioinnista.



Kuva 11. Pelkistetyn gluteniinin GPC-fraktioinnissa kerättyjen fraktioiden SDS-PAGE -analyysi. Näytteet käsitelty SDS-PAGE:ssa pelkistimen kanssa. 1 = molekyylimassastandardi, 2 = pelkistetty gluteniini (gluteniinin GPC-fraktioinnin lähtöaine), 3 = I yhdistetty fraktio (piikin alkuosaa vastaavat fraktiot 25-30), 4 = II yhdistetty fraktio (piikin keskiosaa vastaavat fraktiot 31-37), 5 = III yhdistetty fraktio (piikin loppuosaa vastaavat fraktiot 38-45).

Gluteenin fraktioinnissa 2 saatiin talteen 23 ml gluteniinijäännöstä, jonka proteiinipitoisuudeksi määritettiin 57 mg/ml. Olettaen uuttojäännöksen olleen puhdasta gluteniinia, saatiin gluteniinia talteen 1,3 g. Jos gluteenin fraktioinnin etanoliuutteiden pakkaskuivausjäännöksen oletetaan olleen puhdasta gliadiinia, saatiin gliadiinia talteen 0,67 g. Jos oletetaan, että fraktioinnin lähtöaineena käytetty gluteenivalmiste sisälsi yhtä paljon gluteniinia ja gliadiinia, kuten gluteeni yleensä suunnilleen sisältää (Shewry, 2003), fraktioinnissa gluteniinin saanto oli 65 % ja gliadiinin 34 %.

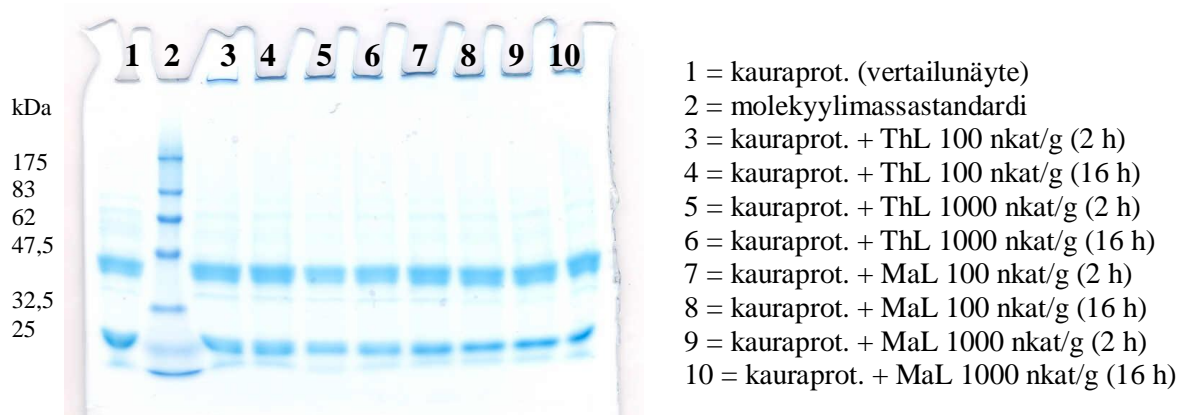
Gluteenin fraktioinnin 2 onnistumisen tutkimiseksi tehdyn SDS-PAGE -analyysin tulos on esitetty kuvassa 12. Eristetyssä gliadiinissa oli vähemmän suuren molekyylimassan alayksiköitä (85, 109 ja 126 kDa) kuin kaupallisessa gliadiinivalmisteesta. Eristetyssä gluteniinissa oli samansuuruisia alayksiköitä kuin lähtöaineena käytetyssä gluteenissa lukuunottamatta 59 kDa:n suuruista alayksiköä.



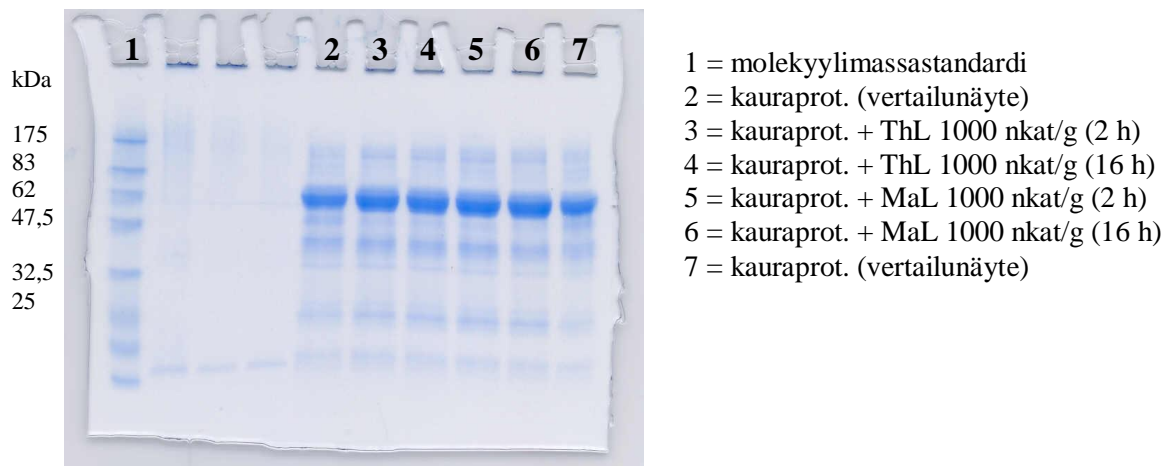
Kuva 12. Gluteenin fraktiointi 2:n SDS-PAGE -analyysi. Näytteet käsiteltä SDS-PAGE:ssa pelkistimen kanssa tai ilman.

3.3.2 Lakkaasin ja tyrosinaasin vaikutukset malliproteiineihin ilman fenolisia happoja

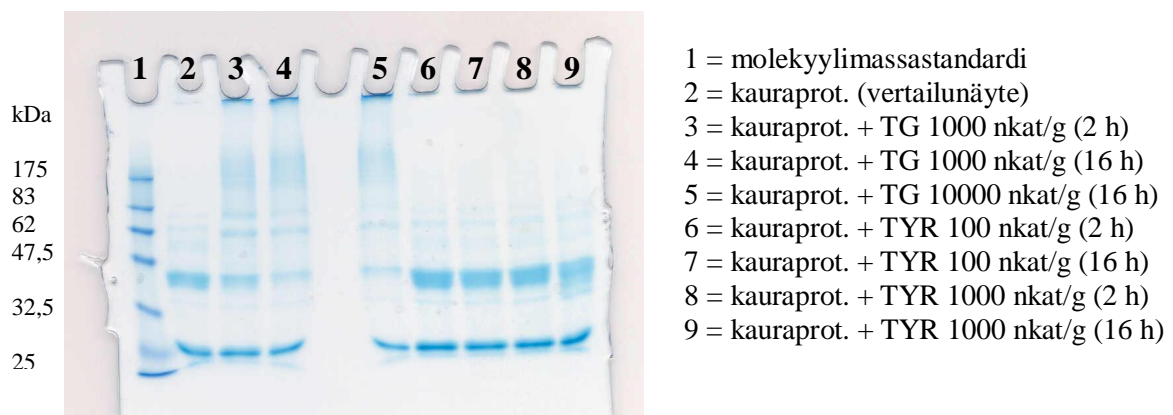
Tutkimuksessa käytetyt *T. hirsuta* ja *M. albomyces* -lakkaasit sekä *A. bisporus* -tyrosinaasi eivät saaneet aikaan käytettyjen malliproteiinien (kauraproteiinit, kaseiini ja BSA) ristisitoutumista kertovaa molekyylimassan kasvua SDS-PAGE:lla tutkittuna. Sekä pelkistimen (merkaptetanolin) kanssa että ilman pelkistintä tehty SDS-PAGE -analyysit antoivat ristisitoutumisen suhteen saman tuloksen. Sen sijaan näissä kokeissa vertailuentsyyminä käytetty transglutaminaasi aiheutti malliproteiinien ristisitoutumista kaikissa tutkituissa tapauksissa. Kauraproteiinien käsittelystä lakkaaseilla tehty SDS-PAGE -analyysi pelkistimen kanssa on esitetty kuvassa 13 ja ilman pelkistintä kuvassa 14. Kauraproteiinien käsittelystä tyrosinaasilla ja transglutaminaasilla pelkistimen kanssa tehty SDS-PAGE -analyysi on esitetty kuvassa 15. Yhteenveto kokeiden tuloksista on esitetty taulukossa 13.



Kuva 13. Lakkaaseilla käsiteltyjen kauraproteiinien SDS-PAGE -analyysi, kun näytteet käsitelty SDS-PAGE:ssa pelkistimen kanssa. ThL = *T. hirsuta* -lakkaasi, MaL = *M. albomyces* -lakkaasi.



Kuva 14. Lakkaaseilla käsiteltyjen kauraproteiinien SDS-PAGE -analyysi, kun näytteet käsitelty SDS-PAGE:ssa ilman pelkistintä. ThL = *T. hirsuta* -lakkaasi, MaL = *M. albomyces* -lakkaasi.



Kuva 15. Transglutaminaasilla ja tyrosinaasilla käsiteltyjen kauraproteiinien SDS-PAGE -analyysi, kun näytteet käsitelty SDS-PAGE:ssa pelkistimen kanssa. TG = transglutaminaasi, TYR = tyrosinaasi.

Taulukko 13. Malliproteiinien käsittely lakkaaseilla ja tyrosinaasilla (vertailuentsyyminä transglutaminaasi). Ristisidosten muodostuminen malliproteiinien välille pelkistimen kanssa tehdyn SDS-PAGE:n perusteella silmämääräisesti arvioituna: - = ei lainkaan, + = vähän, ++ = jonkin verran, +++ = paljon. Tyhjiä kohtia vastaavia käsittelyjä ei tehty.

Entsyymi	Entsyymi-annos (nkat/g)	Kauraproteiinien käsittely		Kaseiinin käsittely			BSA:n käsittely	
		2 h	16 h	0,25 h	2 h	18 h	2 h	20 h
<i>T. hirsuta</i> -lakkaasi	100	-	-					
<i>T. hirsuta</i> -lakkaasi	1000	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	-	-
<i>M. albomyces</i> -lakkaasi	100	-	-					
<i>M. albomyces</i> -lakkaasi	1000	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾		
Tyrosinaasi	100	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾					
Tyrosinaasi	1000	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	-	-	-	-	-
Transglutaminaasi	1000	++	++	++	+++	+++		
Transglutaminaasi	10000	⁽²⁾	++					

⁽¹⁾ Näytteestä tehtiin SDS-PAGE -analyysi myös ilman pelkistintä, mikä antoi saman tuloksen.

⁽²⁾ Näyte vahingoittui analyysissä.

3.3.3 Lakkaasin ja tyrosinaasin vaikutukset aminohappoihin ja peptideihin

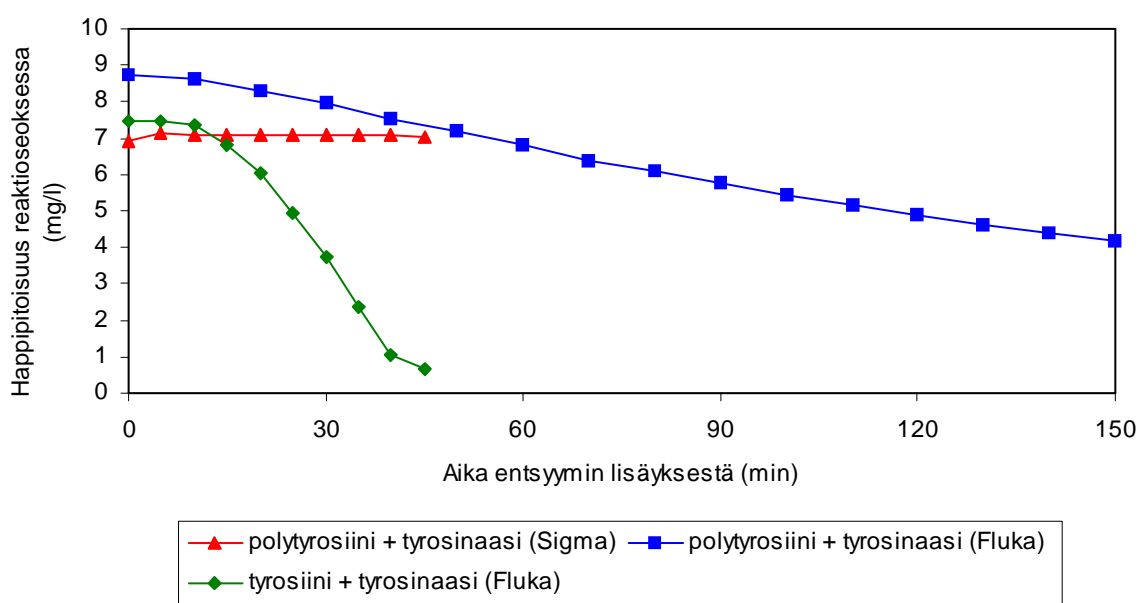
Kysteiinin hapettuminen kystiiniksi lakkaasin vaikutuksesta

T. hirsuta -lakkaasi aiheutti kysteiiniä sisältäneen reaktioseoksen happipitoisuuden hyvin hidasta pienenemistä. Käsiteltäessä 5 mM L-kysteiiniliuosta eri määrillä lakkaasia huoneenlämmössä hapenkulutussopeuksiksi määritettiin entsyymiannoksilla 5, 10 ja 20 nkat/ml vastavasti 0,9; 0,6 ja 2,2 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{l})$.

LC-MS -analyysien mukaan lakkaasi aiheutti reaktioseosten kysteiinipitoisuuden pienenemisen ja kysteiinin, kysteiinin dimeeriksi hapettuneen muodon, muodostumisen. Kokeessa jossa lakkaasiannos oli 200 nkat/ml, reaktioseokseen muodostui käsittelyn aikana sakkaa. Lakkaasia sisältäneen reaktioseoksen kysteiinipitoisuudeksi määritettiin 0,2 mM (2 % alkuperäisestä) ja lakkaasia sisältämättömän vertailunäytteen 8,6 mM (86 % alkuperäisestä). Sakasta mitattiin massaspekttri, jossa havaittiin piikki kysteiiniä (molekyyli massa 240,3) positiivisessa ionisatiossa vastaavalla massaluvulla 241. Kokeissa, joissa lakkaasiannos oli pienempi (2, 20 tai 100 nkat/ml), saatiin samansuuntaisia mutta ei yhtä selviä tuloksia.

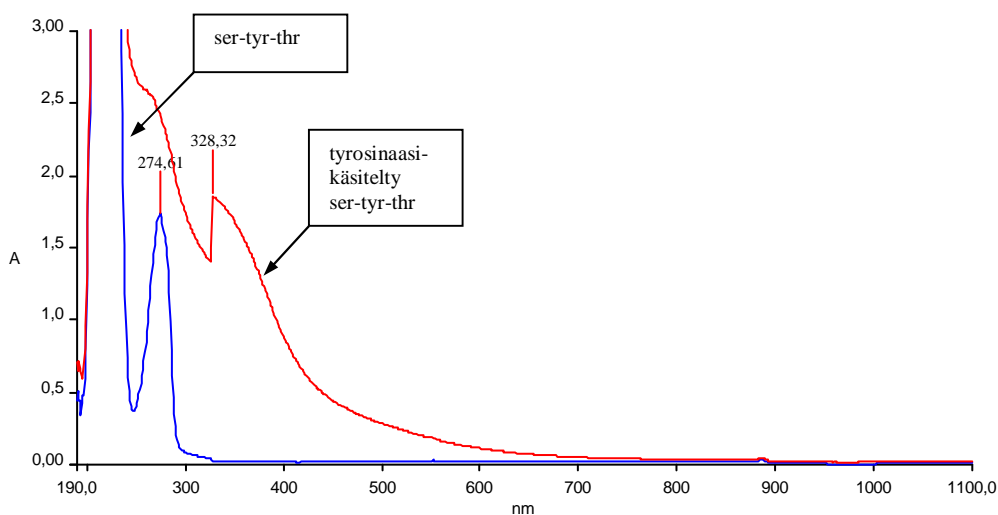
Synteettisten peptidien hapettuminen tyrosinaasin vaikutuksesta

Toinen tyrosinaasivalmisteista (Flukan) aiheutti 1 mg/ml poly-L-tyrosiinia sisältäneen reaktioseoksen happipitoisuuden hidasta pienenemistä, toinen (Sigman) ei. Flukan tyrosinaasi aikaansai 2,5 mM (0,453 mg/ml) vapaata L-tyrosiinia sisältäneessä reaktioseoksessa paljon nopeamman happipitoisuuden pienenemisen kuin poly-L-tyrosiinia sisältäneessä (kuva 16). Hapenkulutusnopeudeksi poly-L-tyrosiiniliuoksessa määritettiin $1,1 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{l})$ tyrosinaasiannoksella 20 nkat/ml. Puolta pienempi tyrosinaasiannos (10 nkat/ml) sai aikaan monomeerista L-tyrosiinia sisältäneessä liuoksessa happipitoisuuden pienenemisen nopeudella $8,1 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{l})$.



Kuva 16. Tyrosinaasien aiheuttama hapenkulutus polytyrosiinia ja tyrosiinia sisältäneissä liuoksissa.

Käsiteltäessä synteettisiä tripeptidejä (seriini-tyrosiini-treoniini ja tyrosiini-seriini-treoniini) sisältäviä liuoksia Flukan tyrosinaasilla reaktioseoksen väri muuttui vähitellen rusehtavaksi. Yön yli jatkuneen entsyymikäsittelyn jälkeen reaktioseoksista mitatuista UV/VIS-spektreistä havaittiin absorption siirtyminen selvästi näkyvän valon aallonpituusalueelle. Tyrosinaasin aiheuttama seriini-tyrosiini-treoniini -liuoksen absorption muutos on esitetty kuvassa 17. Tyrosiini-seriini-treoniini -liuoksen ja molempia tripeptidejä sisältäneen liuoksen absorption muutos tyrosinaasin vaikutuksesta oli vastaavanlainen.



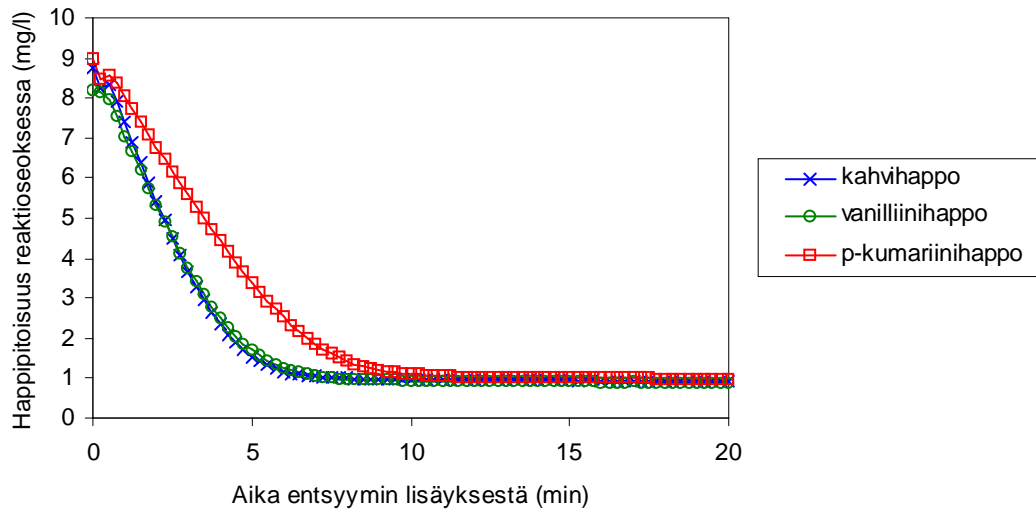
Kuva 17. Seriini-tyrosiini-treoniini -liuoksen ja vastaavan tyrosinaasikäsitellyn liuoksen UV/VIS-spektrit. Tyrosinaasikäsitelyn seurauksena liuos absorboi sähkömagneettista säteilyä myös näkyvän valon aallonpituusalueella (380-760 nm).

Synteettisten tripeptidien tyrosinaasilla käsitellyistä reaktioseoksista mitatuissa massaspektreissä ei havaittu peptididimeerejä vastaavilla massaluvuilla esiintyviä piikkejä, joiden signaalin voimakkuus olisi ollut suurempi kuin vertailunäytteissä. Siten LC-MS -analyysien perusteella missään tutkituista seoksista ei havaittu peptidien keskinäistä ristsitoutumista. Peptidin tyrosiini-seriini-treoniini tyrosiinilla käsitellyn reaktioseoksen kromatogrammissa näkyi vain lähtöaineen piikki. Sen sijaan peptidin seriini-tyrosiini-treoniini tapauksessa tyrosinaasilla käsitellystä reaktioseoksesta voitiin HPLC:llä erottaa kolme piikkiä (retentioajat 8,0; 8,4 ja 9,0 min), jotka massaspektrien perusteella sisälsivät vastaavasti pääasiassa molekyylimassaltaan 369,4; 381,4 ja 338,4 olevia yhdisteitä. Molekyylimassa 369,4 vastaa tarkasti seriini-tyrosiini-treoniini -tripeptidin alkuperäistä molekyylimassaa. Molekyylimassaltaan 381,4 ja 338,4 olleet yhdisteet olivat todennäköisesti tripeptidistä muodostuneita värillisiä hapettumistuotteita.

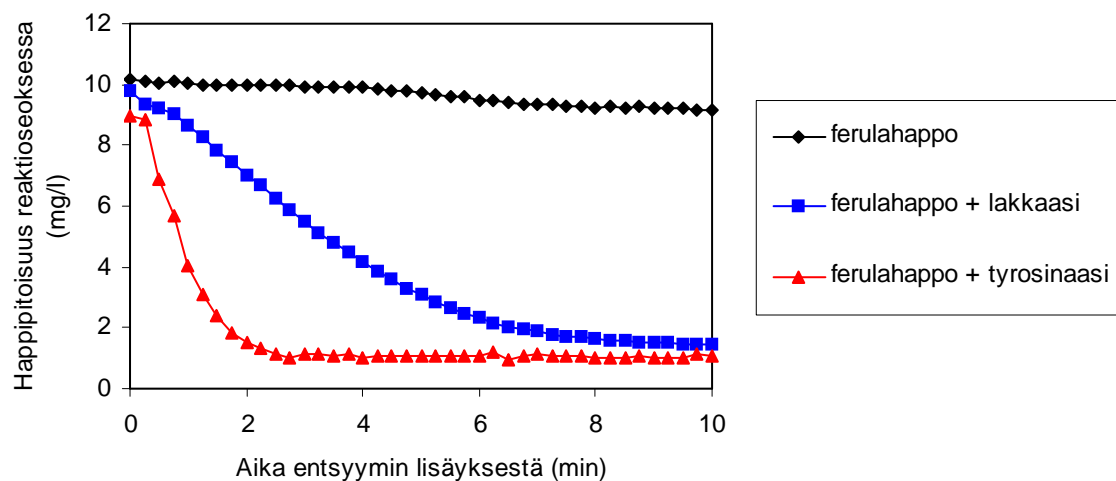
3.3.4 Lakkaasin ja tyrosinaasin vaikutukset malliproteiineihin fenolisten happojen läsnä ollessa

Fenolisten happojen hapettuminen

T. hirsuta -lakkaasi aiheutti liuenneen hapen nopeaa kulumista kahvihappoa, vanilliinihappoa ja *p*-kumariinihappoa sisältäneistä reaktioseoksista (kuva 18). *T. hirsuta* -lakkaasi ja *Sigman A. bisporus* -tyrosinaasi aiheuttivat nopean happipitoisuuden pienemisen ferulahappoa sisältäneistä reaktioseoksista (kuva 19). Happipitoisuuden pienemisen lineaariselta osalta laske-
tuista hapenkulutusnopeuksista on esitetty yhteenveto taulukossa 14.



Kuva 18. Happipitoisuuden pieneneminen lakkaasin (5 nkat/ml) vaikutuksesta kahvihappo-, vanilliinihappo- ja *p*-kumariinihappoliuoksissa.



Kuva 19. Happipitoisuuden pieneneminen lakkaasin ja tyrosinaasin vaikutuksesta ferulahappoliuoksessa. Entsyymiannos kummassakin tapauksessa 5 nkat/ml.

Taulukko 14. *T. hirsuta* -lakkaasin ja *A. bisporus* -tyrosinaasin aiheuttama hapenkulutus fenolisia happoja sisältäneissä reaktioseoksissa huoneenlämpötilassa.

Entsyymi ⁽¹⁾	Substraatti ⁽²⁾	Hapenkulutussnopeus ⁽³⁾ (μmol/(min*1))
Lakkaasi	Ferulahappo	47
Lakkaasi	Kahvihappo	53
Lakkaasi	Vanilliinihappo	47
Lakkaasi	<i>p</i> -kumariinihappo	38
Tyrosinaasi	Ferulahappo	161

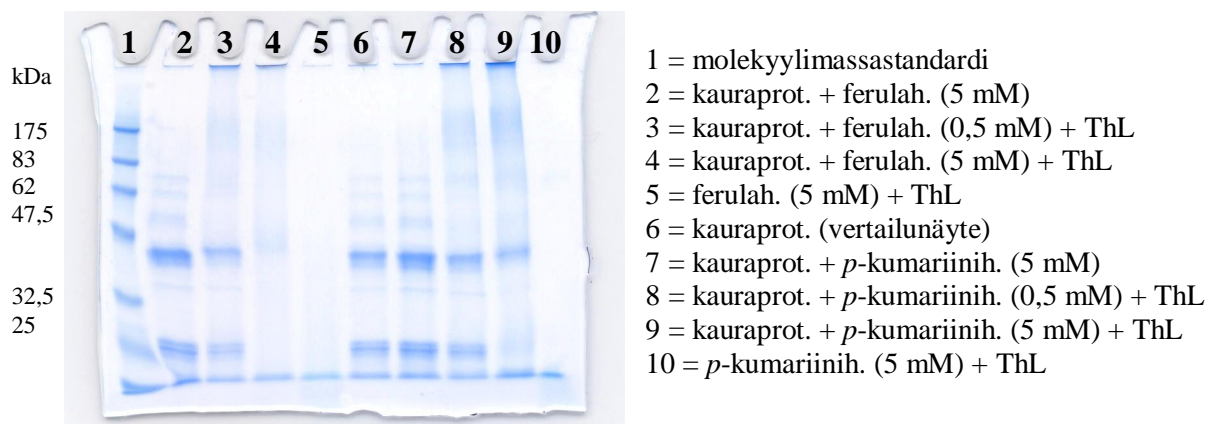
⁽¹⁾ Entsyymiannos 5 nkat/ml.

⁽²⁾ Substraattipitoisuus 5 mM.

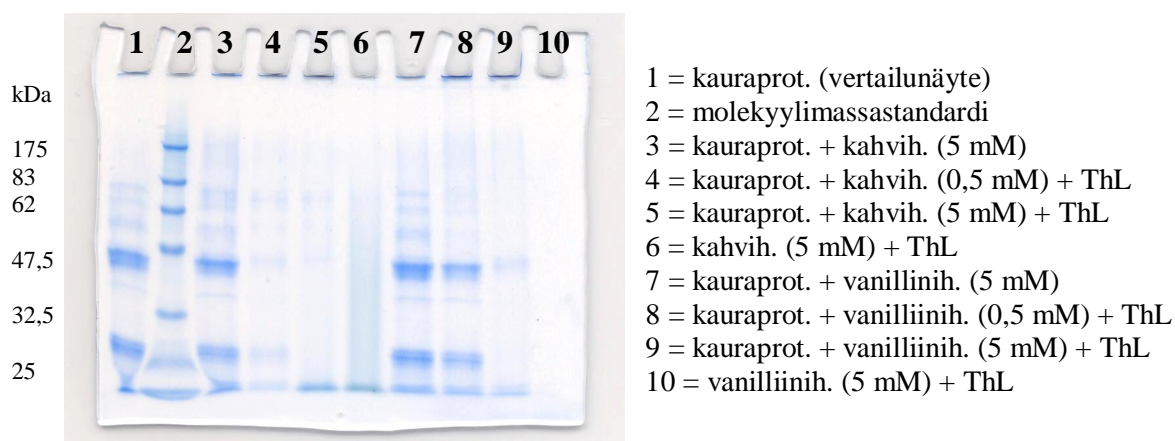
⁽³⁾ Määritetty reaktion osalta, jolla happipitoisuuden pienenemisnopeus vakio.

Malliproteiinien ristisitoutuminen fenolisten happojen läsnä ollessa

Malliproteiinien entsyymireaktioseosten SDS-PAGE -analyysien mukaan *T. hirsuta* -lakkaasi ristisitoi fenolisten happojen läsnä ollessa kaikkia tutkittuja malliproteiineja (kauraproteiinit, kaseiini, BSA). Kauraproteiinien tapauksessa lakkaasi aikaansai ristisitoutumista kaikkien tutkittujen fenolisten happojen (ferulahappo, kahvihappo, vanilliinihappo, *p*-kumariinihappo) läsnä ollessa, mutta kahvihappo ja ferulahappo vaikuttivat tehokkaimmin. Käsiteltäessä kauraproteiineja lakkaasilla kahvihapon kanssa, geeliin mahtuvia (molekyyli­massa alle 1000 kDa) kauraproteiineja ei havaittu juuri lainkaan käsittelyn jälkeen kummassakaan kahvihappoa sisältäneessä (0,5 ja 5 mM) reaktioseoksessa. Ferula- ja vanilliinihappojen tapauksessa alkuperäiset pelkistimen kanssa tehdyssä SDS-PAGE:ssa näkyvät kauraproteiinivyöhykkeet (25 ja 42 kDa) olivat hävinneet lähes kokonaan happopitoisuudella 5 mM, mutta eivät pitoisuudella 0,5 mM, ja *p*-kumariinihapon tapauksessa alkuperäisen kokoisia kauraproteiineja oli selvästi jäljellä molemmissa *p*-kumariinihappoa sisältäneissä reaktioseoksissa. Molekyyli­massaltaan 100-300 kDa:n kokoiseksi yhdistyneitä kauraproteiineja havaittiin eniten *p*-kumariinihapon ja ferulahapon kanssa lakkaasikäsitellyissä kauraproteiiniliuoksissa, mutta kahvihapon kanssa käsitellyissä ei juuri ollenkaan. Käytetyt fenoliset hapot eivät aiheuttaneet kauraproteiinien ristisitoutumista ilman lakkaasia (kuvat 20 ja 21).

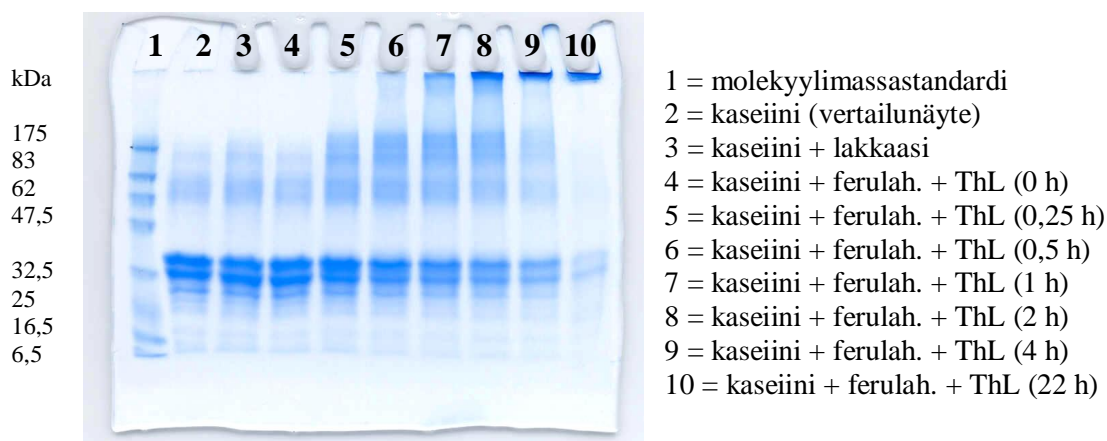


Kuva 20. *T. hirsuta* -lakkaasilla (ThL, 1000 nkat/g, 16 h) ferulahapon tai *p*-kumariinihapon läsnä ollessa käsiteltyjen kauraproteiinien SDS-PAGE -analyysi. Näytteet käsitelty SDS-PAGE:ssa pelkistimen kanssa.



Kuva 21. *T. hirsuta* -lakkaasilla (ThL, 1000 nkat/g, 16 h) kahvihapon tai vanilliinihapon läsnä ollessa käsiteltyjen kauraproteiinien SDS-PAGE -analyysi. Näytteet käsitelty SDS-PAGE:ssa pelkistimen kanssa.

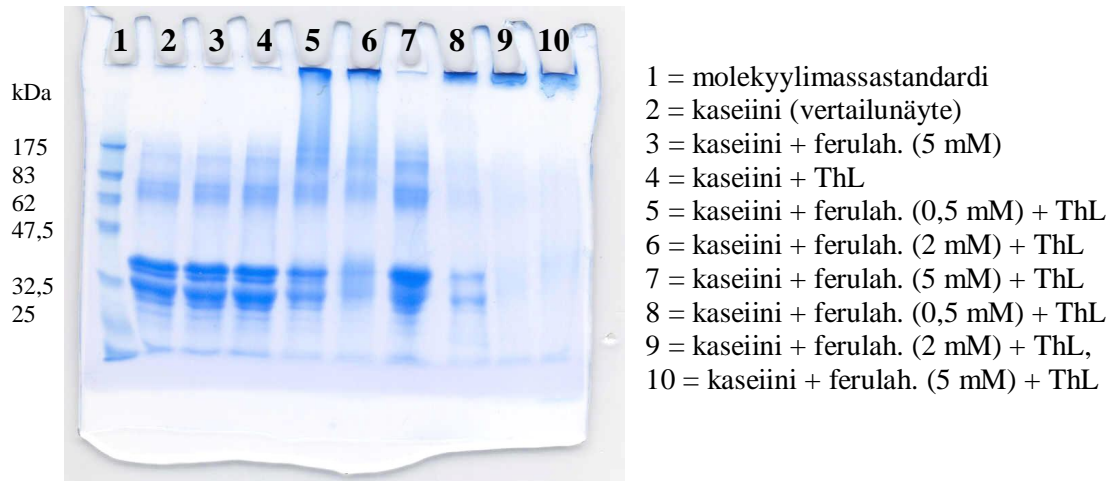
Käsiteltäessä kaseiinia *T. hirsuta* -lakkaasilla ferulahapon (0,5 mM) läsnä ollessa havaittiin SDS-PAGE -analyysissä kaseiinien (päävyöhykkeet 30, 34 ja 36 kDa) liittyvän ensin 100-200 kDa:in kokoisiksi oligomeereiksi ja edelleen käsittelyn jatkuessa niin suuriksi polymeereiksi, että ne eivät kulkeutuneet geeliin sisään (> 1000 kDa). Lakkaasin vaikutus kaseiniin riippui reaktioajasta siten, että reaktioseoksessa alkoi olla geelissä liikkumatonta kaseiinipolymeeriä 0,5 h:n käsittelyn jälkeen ja yön yli jatkuneen käsittelyn jälkeen lähes kaikki kaseiini oli polymeroitunut geeliin pääsemättömään kokoon (kuva 22).



Kuva 22. *T. hirsuta* -lakkaasilla (ThL, 1000 nkat/g) ferulahapon (0,5 mM) läsnä ollessa käsitellyn kaseiinin SDS-PAGE -analyysi: lakkaasin vaikutuksen riippuvuus reaktioajasta. Näytteet käsitelty SDS-PAGE:ssa pelkistimen kanssa.

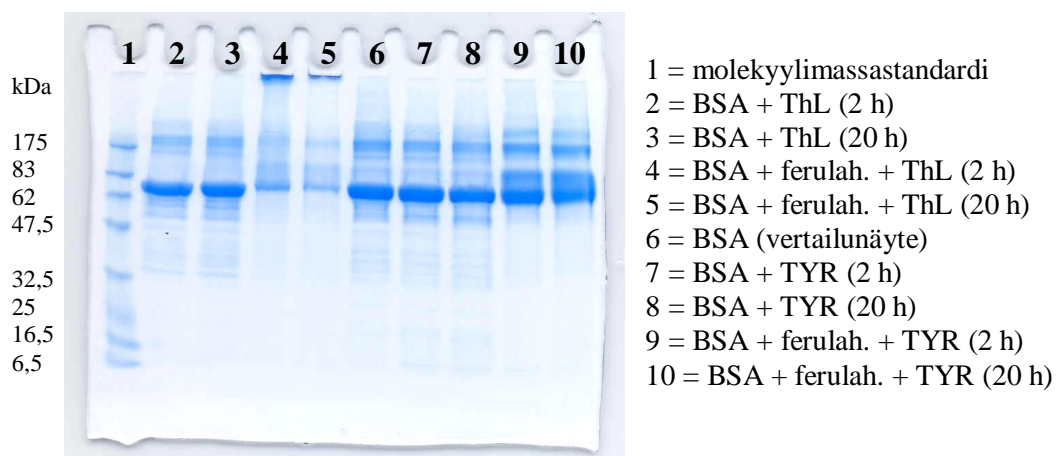
SDS-PAGE -analyysin mukaan reaktioseoksen ferulahappopitoisuus vaikutti *T. hirsuta* -lakkaasin kykyyn ristosita kaseiinia. Kolmesta käytetystä ferulahappomäärästä (0,5, 2 ja 5 mM) keskimmäinen edisti lakkaasin toimintaa tehokkaammin kuin pienin kummallakin käytetyistä

käsittelyajoista (2 h ja 22 h). Suurimmalla tutkitulla ferulahappomäärällä lakkaasi ei ristosito-
nut kaseiinia havaittavasti kahden tunnin entsyymikäsittelyn aikana, mutta 22 tunnin käsitte-
lyssä kylläkin. Ferulahappo ei aiheuttanut kaseiinin ristositoutumista ilman lakkaasia (kuva
23).



Kuva 23. *T. hirsuta* -lakkaasilla (ThL, 1000 nkat/g) ferulahapon läsnä ollessa käsitellyn kaseiinin SDS-PAGE -analyysi: lakkaasin vaikutuksen riippuvuus ferulahappopitoisuudesta ja reaktioajasta. Näytteet käsitelty SDS-PAGE:ssa pelkistimen kanssa.

SDS-PAGE:n perusteella sekä *T. hirsuta* -lakkaasi että *A. bisporus* -tyrosinaasi saivat aikaan BSA:n (65 kDa) ristositoutumista ferulahappoa sisältäneissä reaktioseoksissa. Lakkaasi aiheut-
ti BSA:n polymeroitumista niin suureksi, että reaktiotuote ei liikkunut geelissä. Tyrosinaasin
vaikutuksesta pienen molekyyli­massan alueella (20-50 kDa) vyöhykkeet heikkenivät ja suu-
ren molekyyli­massan vyöhykkeet (88, 190 ja 280 kDa) vahvistuivat (kuva 24).



Kuva 24. *T. hirsuta* -lakkaasilla (ThL, 1000 nkat/g) ja *A. bisporus* -tyrosinaasilla (TYR, 1000 nkat/g) ferulahapon (0,5 mM) kanssa käsitellyn BSA:n SDS-PAGE -analyysi. Näytteet käsitelty SDS-PAGE:ssa pelkistimen kanssa.

Yhteenveto malliproteiinien fenolisten happojen kanssa tehtyjen entsyymikäsittelyjen SDS-PAGE -analyysien tuloksista on esitetty taulukossa 15. Malliproteiinien niukkaliukoisuus haittasi entsyymireaktioseosten analysointia GPC:llä, ja reaktioseoksista tehtyjen GPC-analyysien tulokset olivat huonolaatuisia. *T. hirsuta* -lakkaasilla fenolisten happojen kanssa käsiteltyjen kauraproteiinien reaktioseoksista tehtyjen GPC-analyysien kromatogrammeissa hallitsevien piikkien retentioajat vastasivat hyvin pientä proteiinikokoa (alle 10 kDa), signaalit olivat heikkoja ja tulosten toistettavuus oli huono. Lakkaasilla ferulahapon kanssa käsitellyn kaseiinin reaktioseoksista tehtyjen GPC-ajojen kromatogrammeissa ei näy lainkaan kaseiinin molekyylikokoa vastaavia piikkejä, vaan muutama hyvin pientä molekyylikokoa (luokkaa 10 kDa) vastaava pieni piikki. Mitä kauemmin reaktioseosta oli lämpökäsitelty, sitä suurempi pylvääseen pidättymätöntä kokoa (yli 1000 kDa) vastaava piikki sen kromatogrammissa oli. Muut piikit kromatogrammeissa eivät kuitenkaan vastaavasti pienentyneet.

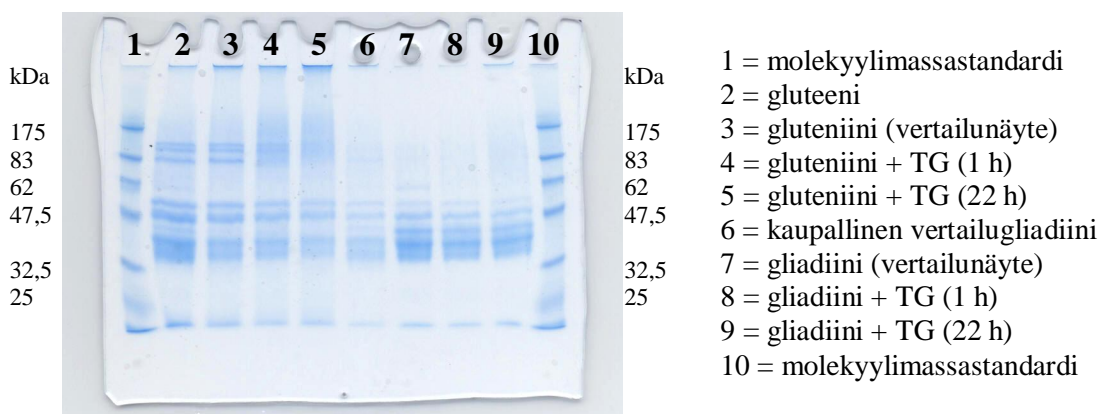
3.3.5 Transglutaminaasin vaikutukset gluteeniiniin ja gliadiiniin

Käsiteltäessä eristettyä gluteeniinia ja gliadiinia transglutaminaasilla havaittiin gluteeniinin olevan reaktiivisempaa kuin gliadiinin. SDS-PAGE -analyysissä gluteeniinin suuren molekyyli-massan alayksikköjä vastaavat vyöhykkeet (85, 109 ja 126 kDa) heikkenivät transglutaminaasin vaikutuksesta selvimmin (kuva 25). Varsinkin suurella entsyymiannoksella (4000 nkat/g) myös gluteeniinin pienen molekyyli-massan alayksikköjä vastaavat vyöhykkeet heikkenivät. Sen sijaan transglutaminaasilla ei ollut edes suurella entsyymiannoksella havaittavaa vaikutusta gliadiiniproteiineihin lukuun ottamatta 59 kDa:in kokoista alayksikköä, jota vastaava vyöhyke katosi (kuva 26).

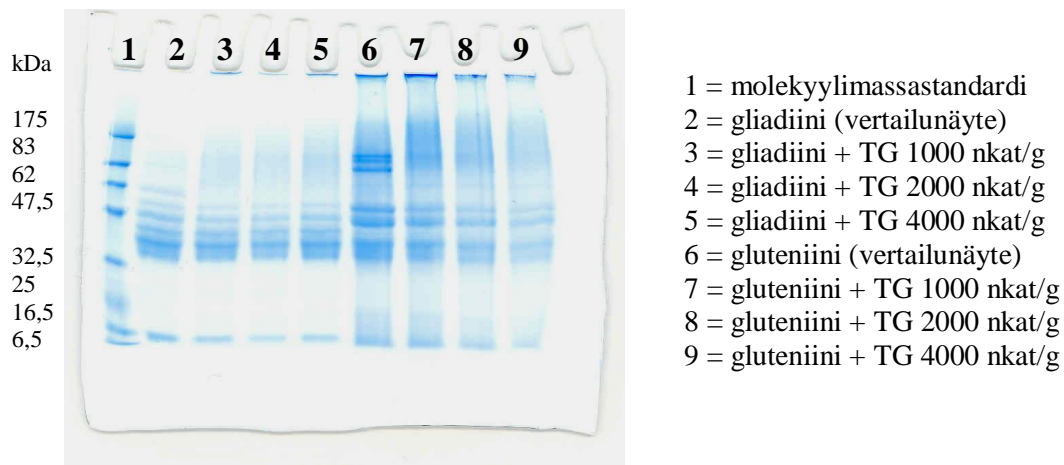
Taulukko 15. Malliproteiinien käsittely *T. hirsuta* -lakkaasilla ja *A. bisporus* -tyrosinaasilla fenolisten happojen läsnä ollessa. Ristisidosten muodostuminen malliproteiinien välille pelkistimen kanssa tehdyn SDS-PAGE:n perusteella silmämääräisesti arvioituna: - = ei lainkaan, + = vähän, ++ = jonkin verran, +++ = paljon. Tyhjiä kohtia vastaavia käsittelyjä ei tehty.

Malliproteiini	Fenolinen happo	Fenolisen hapon pitoisuus (mM)	Käsittelyaika (h)	Käsittely <i>T. hirsuta</i> -lakkaasilla (1000 nkat/ml)	Käsittely <i>A. bisporus</i> -tyrosinaasilla (1000 nkat/ml)
Kauraproteiinit	Ferulahappo	0,5	16	+ ⁽¹⁾	
Kauraproteiinit	Ferulahappo	5	16	++ ⁽¹⁾	
Kauraproteiinit	Kahvihappo	0,5	16	++ ⁽¹⁾	
Kauraproteiinit	Kahvihappo	5	16	++ ⁽¹⁾	
Kauraproteiinit	Vanilliinihappo	0,5	16	+ ⁽¹⁾	
Kauraproteiinit	Vanilliinihappo	5	16	++ ⁽¹⁾	
Kauraproteiinit	<i>p</i> -kumariinihappo	0,5	16	+ ⁽¹⁾	
Kauraproteiinit	<i>p</i> -kumariinihappo	5	16	+ ⁽¹⁾	
Kaseiini	Ferulahappo	0,5	2	+ ⁽¹⁾	
Kaseiini	Ferulahappo	0,5	20	++ ⁽¹⁾	
Kaseiini	Ferulahappo	2	2	++ ⁽¹⁾	
Kaseiini	Ferulahappo	2	20	+++ ⁽¹⁾	
Kaseiini	Ferulahappo	5	2	+ ⁽¹⁾	
Kaseiini	Ferulahappo	5	20	+++ ⁽¹⁾	
Kaseiini	Ferulahappo	0,5	0,25	-	
Kaseiini	Ferulahappo	0,5	0,5	+	
Kaseiini	Ferulahappo	0,5	1	+	
Kaseiini	Ferulahappo	0,5	2	++	
Kaseiini	Ferulahappo	0,5	4	++	
Kaseiini	Ferulahappo	0,5	22	+++	
BSA	Ferulahappo	0,5	2	++	+
BSA	Ferulahappo	0,5	20	++	+

⁽¹⁾ Kokeesta tehtiin SDS-PAGE -analyysi myös ilman pelkistintä, mikä antoi saman tuloksen.



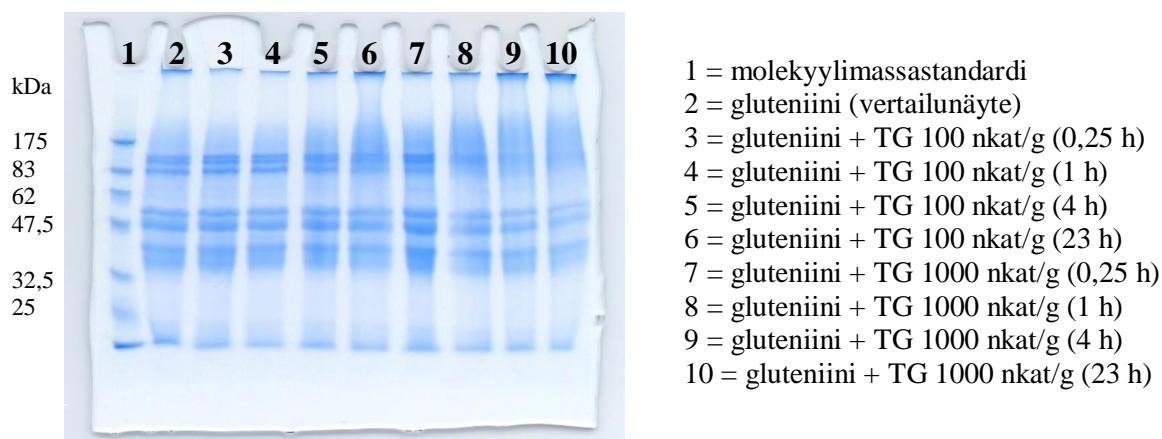
Kuva 25. Transglutaminaasilla (TG, 1000 nkat/g) käsitellyn gluteniinin ja gliadiinin SDS-PAGE -analyysi. Näytteet käsitelty SDS-PAGE:ssa pelkistimen kanssa.



Alayksikkö (kDa)	gliadiini				gluteniini			
	2	3	4	5	6	7	8	9
126	-	-	-	-	100	-	-	-
109	-	-	-	-	100	-	-	-
85	-	-	-	-	100	-	-	-
59	100	-	-	-	-	-	-	-
52	100	82	82	88	-	-	-	-
51	-	-	-	-	100	80	57	49
47	100	88	75	88	-	-	-	-
45	-	-	-	-	100	84	61	53
41	100	92	88	100	-	-	-	-
38	100	89	83	94	100	92	67	53
35	100	89	86	100	100	-	62	50

Kuva 26. Transglutaminaasin (TG) määrän vaikutus gluteniinin ja gliadiinin ristositoutumiseen (reaktioaika 17 h). Yllä pelkistimen kanssa tehty SDS-PAGE -analyysi ja alla geelin päävyöhykkeiden suhteelliset voimakkuudet (optinen tiheys) vertailunäytteeseen verrattuna (prosentteina vertailunäytteen vastaavan vyöhykkeen voimakkuudesta) densitometrianalyysin perusteella (- = vyöhyke ei erotu).

Transglutaminaasiannoksella ja käsittelyn kestoajalla oli SDS-PAGE:n perusteella selvä vaikutus gluteniiniproteiinien ristositoutumiseen. Käytettäessä transglutaminaasiannosta 100 nkat/g eivät edes gluteniinin suuren molekyyli­massan alayksiköjä vastaavat vyöhykkeet olleet kokonaan hävinneet 23 h:n transglutaminaasikäsittelyn jälkeen, kun taas annoksella 1000 nkat/g nämä vyöhykkeet olivat jo 1 h:n jälkeen lähes kokonaan kadonneet (kuva 27).



Alayksikkö (kDa)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
126	100	119	111	114	106	142	103	75	64
109	100	119	105	111	97	135	97	-	-
85	100	113	103	103	82	100	77	-	-
51	100	109	94	112	88	127	88	79	64
45	100	108	97	117	94	133	86	81	61
38	100	109	97	119	94	144	91	91	69
35	100	107	95	114	83	131	79	86	66

Kuva 27. Transglutaminaasin (TG) määrän ja reaktioajan vaikutus gluteniinin ristositoutumiseen. Yllä pelkistimen kanssa tehty SDS-PAGE -analyysi ja alla geelin päävyöhykkeiden suhteelliset voimakkuudet (optinen tiheys) vertailunäytteeseen verrattuna (prosentteina vertailunäytteen vastaavan vyöhykkeen voimakkuudesta) densitometrianalyysin perusteella (- = vyöhyke ei erotu).

3.4 Pohdinta

3.4.1 Malliproteiinien valmistus

Kauraydinjauhoista emäksisellä (pH 9,1) puskuriliuoksella uutetut ja liuokseen jääneet proteiinit olivat ilmeisesti pääosin kauran albumiineja, globuliineja ja prolamiineja. Man ja Harwalkarin (1984) mukaan kauran albumiineista ja globuliineista yli 95 % ja prolamiineistakin noin 90 % on liukoisena näin emäksisissä oloissa, mutta gluteliineista vain noin 35 %. Koska globuliinien osuus kauran proteiineista on noin 70-80 % (Oksman-Caldentey ym., 1999), uutteen proteiineista todennäköisesti valtaosa oli globuliineja.

Kauraproteiiniuutteen entsyymikäsittelyt tehtiin liuoksissa, joiden pH-arvot olivat 5 ja 7. Tällä pH-alueella kauran globuliineista on Man ja Harwalkarin (1984) mukaan liukoisena vain noin 10 %. Siten kauraproteiiniuutteesta reaktioseoksiin muodostunut sakka oli ilmeisesti saostunut kauran globuliinia. Reaktioseosten SDS-PAGE -analyysissä voitiin silti havaita vyöhykkeitä, joiden molekyyli­massat vastasivat kauran globuliineja. Kauran globuliinit ovat ra-

kenteeltaan heksameerejä, jotka koostuvat kuudesta molekyylikooltaan noin 50-70 kDa:in alayksiköstä. Nämä koostuvat edelleen α - ja β -alayksiköistä, joita kutsutaan myös happamaksi ja emäksiseksi polypeptidiksi ja joiden molekyyli­massat ovat vastaavasti noin 33-38 kDa ja 22-24 kDa (Oksman-Caldentey ym., 1999). Ilman pelkistintä tehdyissä SDS-PAGE -analyysissä havaittiin globuliinimonomeeria vastaava vyöhyke (noin 65 kDa) (kuva 14) ja pelkistimellä tehdyissä SDS-PAGE -analyysissä vastaavasti globuliinimonomeerin toisistaan irronneita α - ja β -alayksikköjä vastaavat vyöhykkeet (noin 25 ja 40 kDa) (kuva 13). Nämä muodostuivat todennäköisesti SDS-PAGE:n näy­tepuskurin pelkistimen (merkaptetaanoli) katkaistessa alayksiköiden välisen disulfidisidoksen. Havainnot vahvistivat käsitystä siitä, että tutkimuksessa käsitelty kauraproteiinit olivat pääasiassa kauran globuliineja.

Gluteenista eristetty gliadiini oli kaupallista gliadiinivalmistetta puhtaampaa, sillä SDS-PAGE -analyysin mukaan eristetty gliadiini ei sisältänyt gluteniinin suuren molekyyli­massan alayksiköitä kuten kaupallinen gliadiini (kuva 12). Gluteenin fraktioinnissa gluteniiniksi ja gliadiiniksi esiintyi kuitenkin joitain teknisiä ongelmia. Riippumatta siitä, oliko gluteenia uutettu ensin asetonilla rasvojen poistamiseksi, gluteenista muodostui ensimmäisen suolaliuoksella uut­ton jälkeisessä sentrifugoinnissa erittäin tiivis, kumimainen sakka. Koska sakka oli joustavaa ja sitkeää, sitä oli vaikea hajottaa lusikalla uuteen uuttoliuokseen. Etanoliuutot kuitenkin muuttivat vähitellen sakan rakennetta. Mitä useampaan kertaan gluteenia oli uutettu etanoli­liuoksella, sitä irtomaisemmaksi sakan rakenne tuli. Siksi suolaliuoksella uut­tojen ja ensimmäisten etanoliuut­tojen jälkeen sentrifugoinneissa käytettiin pienempiä kierrosnopeuksia ja lyhyempiä aikoja kuin viimeisten etanoliuut­tojen jälkeen. Etanoliuut­tojen myötä gluteenijään­nöksestä tuli myös yhä enemmän nestettä pidättävä. Viimeisissä (viidensissä) etanoliuutoissa gluteeni muodosti uuttoliuoksen kanssa niin puuromaisen seoksen, että sen pitäminen kaut­taaltaan liikkeessä magneettisekoituksella astian pohjalla pyörineen magneettisauvan avulla ei enää onnistunut. Tästä seoksesta oli myös vaikeaa saada nestettä erottumaan sentrifugoimalla, joten sakkaan, jota pidettiin gluteniinina, jäi paljon liuosta viimeisestä etanoliuutosta. Siksi gluteniinisakan proteiinipitoisuus määritettiin. Sen sijaan etanoliuutteen kuivattua jäännöstä pidettiin puhtaana proteiinina (gliadiinina), eikä sen pitoisuutta erikseen määritetty.

Gluteniinin proteiinipitoisuuden määrittämisessä oli niin ikään ongelmia. Gluteniini oli sellai­seenaan polymeerimuodossa erittäin niukkaliukoista, eikä liennut edes 0,1 M natriumhydrok­sidia sisältävään Lowryn A-reagenssiin. Käytetyllä reagenssisarjalla tehtävää proteiinipitoi­suusmäärittystä varten näytteen pitää kuitenkin olla liukoissa muodossa. Siksi gluteniinin liukoisuutta parannettiin hajottamalla gluteniini monomeereikseen pelkistämällä sitä ditiotrei-

tolilla 0,1 M etikkahappoliuoksessa lämmittäen. Tällöin gluteniini ilmeisesti pääosin liukeni, mutta liuoksen proteiinipitoisuutta ei voitu määrittää reagenssisarjalla suoraan tästä liuksesta, koska sen sisältämä ditiotreitoli (65 mM) häiritsi analyysiä erittäin voimakkaasti. Jotta ditiotreitolista olisi päästy eroon, proteiinit saostettiin liuksesta trikloorietikkahapolla. Saatu sakka onnistuttiin liuottamaan Lowryn A-reagenssiin ja tästä liuksesta mittaamaan proteiinipitoisuus reagenssisarjalla.

Gluteniinin niukkaliukoisuus oli ongelma myös gluteniinin geelisuodatuskromatografisessa analyysissä, koska geelisuodatuspylvääseen syötettävän näytteen on oltava ehdottomasti liukoissa muodossa. Gluteniinin alayksikköjen geelisuodatuskromatografista fraktiointia varten gluteniininäyte jouduttiin liukoisuuden parantamiseksi pelkistämään ditiotreitolilla etikkahappoliuokseen samalla tavalla kuin proteiinipitoisuuden määrittämistä varten. Jotta gluteniini olisi pysynyt liukoisena myös geelisuodatuspylväessä, ajoliuoksena käytettiin 1 mM ditiotreitolia sisältävää etikkahappoliuosta. Tämän ajoliuoksen happamuus (pH 2,8) kuitenkin asetti rajoituksia käytetylle geelisuodatushartsille, jonka oli kestävä kyseistä happamuutta, kuten käytetty pylväsmateriaali (Sephacryl S-100 HR) teki.

Käytetty menetelmä gluteniinin liuottamiseksi ja liukoisena pitämiseksi geelisuodatuskromatografia-ajossa osoittautui toimivaksi. Alunperin niukkaliukoinen näyte ei tukkinut geelisuodatuspylvästä, toisin kuin Virtanen (2000) raportoi analysoidessaan gluteenia ja Salminen (2002) analysoidessaan kauraproteiineja. Ditiotreitoli vaikuttaa paremmalta niukkaliukoisen proteiinin liukoisuuden parantamisessa kuin samaan tarkoitukseen käytetty 2-prosenttinen SDS, joka Virtasen (2000) mukaan aiheutti geelisuodatuspylvään tukkeutumista, tai DMSO (dimetyylisulfoksidi), joka Virtasen mukaan näkyi UV-detektiolla kromatogrammissa hyvin voimakkaana ja peitti varsinaiset gluteenipiikit.

Gluteniinin alayksiköitä ei onnistuttu täysin erottamaan toisistaan käytetyllä geelisuodatuskromatografisella menetelmällä, mutta jonkin verran erottumista kuitenkin tapahtui, mikä havaittiin pylvään läpi tulleesta ajoliuoksesta kerättyjen fraktioiden SDS-PAGE -analyysissä (kuva 11).

3.4.2 Malliproteiinien ristisitominen lakkaasilla ja tyrosinaasilla

T. hirsuta- ja *M. albomyces* -homeiden lakkaasit sekä *A. bisporus* -sienen eli herkkusienen tyrosinaasi eivät SDS-PAGE -analyysien perusteella ristisitoneet malliproteiineja ilman feno-

lisen hapon läsnäoloa reaktioseoksessa, vaikka olosuhteet (lämpötila ja happamuus) pidettiin kokeissa suotuisina entsyymien toiminnalle. Vertailuentsyyminä käytetty transglutaminaasi sen sijaan ristictoi odotetusti kauraproteiineja ja kaseiinia.

Malliproteiinien alkuperäisiä molekyyli-massoja vastaavien vyöhykkeiden heikkenemistä ja näitä suurempia molekyyli-massoja vastaavien vyöhykkeiden vahvistumista SDS-PAGE:ssa pidettiin osoituksena kovalenttisten risticidosten muodostumisesta proteiinimolekyylien välille, koska näytteet käsiteltiin SDS-PAGE -ajoa varten ei-kovalenttiset sidokset hajottavalla SDS:llä. Koska näytteenkäsittelyssä käytetty merkaptetaanoli hajottaa proteiinienvälisiä kovalenttisiä disulfididoksia, joita lakkaasin ajateltiin mahdollisesti muodostavan, SDS-PAGE -analyysijä tehtiin myös ilman merkaptetaanolia. Kuitenkin sekä pelkistimenä käytetyn merkaptetaanolin kanssa että ilman sitä tehdyt SDS-PAGE -analyysit antoivat risticitoutumisen suhteen saman tuloksen, joten lakkaasin ei havaittu muodostavan disulfididoksia malliproteiinien välille.

Lakkaasin kykyä muodostaa disulfididoksia kysteiinin sivuketjujen välille tutkittiin käsittelemällä lakkaasilla vapaata L-kysteiiniä. Hapenkulutuskokeissa *T. hirsuta* -lakkaasin todettiin pienentävän reaktioseoksen happipitoisuutta ja näin todennäköisesti hapettavan kysteiiniä, mutta erittäin hitaasti. Tulos oli odotettu, sillä myös Virtanen (2000) havaitsi *T. hirsuta* -lakkaasin kuluttavan happea kysteiiniä sisältävässä liuoksessa. Toisaalta Figueroa-Espinozan ym. (1998) tutkimusten mukaan kysteiini ei toiminut substraattina *Pycnopus cinnabarinus* -lakkaasille. Johanneksen ja Majcherzykin (2000) mukaan kysteiiniä oli vanhastaan pidetty jopa lakkaasin inhibiittorina, mutta he osoittivat, että käsitys oli virheellinen ja johtui kysteiinin aiheuttamista häiriöistä kolorimetrisissa lakkaasiaktiivisuusmäärittelyissä, jolloin niillä saatiin virheellisesti liian pieniä tuloksia.

LC-MS -analyysit tukivat havaintoa kysteiinin toimimisesta lakkaasin substraattina, vaikka tuloksissa olikin epävarmuutta analyyttisten ongelmien, muun muassa kysteiinin spontaanin hapettumisen vuoksi. Reaktioseosten kysteiinipitoisuuden havaittiin pienenevän lakkaasin vaikutuksesta, ja reaktioseoksiin muodostuvan sakkaa, jonka LC-MS osoitti kystiiniiksi. Siten LC-MS -analyysien tulosten perusteella todettiin lakkaasin hapettavan vapaata kysteiiniä dimeeriseksi kystiiniiksi, jossa kaksi kysteiinimolekyyliä on liittynyt toisiinsa disulfididoksella. Koska kuitenkin malliproteiinien välille ei SDS-PAGE -analyysissä havaittu syntyvän disulfididoksia lakkaasin vaikutuksesta, on todennäköistä, että malliproteiineissa ei ollut

kysteiinitähteiden vapaita sulfhydryyliryhmiä kohdissa, jotka olisivat olleet lakkaasin tavoitettavissa, tai lakkaasi ei pysty hapettamaan peptiketjuun sidottua kysteiiniä.

Thalmannin ja Lötzbeyerin (2002) mukaan tyrosinaasin on havaittu ristisitovan proteiineja lähinnä pienimolekyylisten fenolisten yhdisteiden läsnä ollessa ja omassa tutkimuksessaankin he osoittivat tyrosinaasin ristisitovan ilman fenolisen yhdisteen läsnäoloa käyttämistään malliproteiineista vain α -laktalbumiinia. Siten oli odotettavissa, että tässä työssä käytettyjä malliproteiineja ei onnistuttu ristisitomaan tyrosinaasilla ilman fenolista happoa. Tyrosinaasille substraattina toimivien tyrosiinitähteiden sivuketjut olivat malliproteiineissa todennäköisesti entsyymien ulottumattomissa tai hapetetut tyrosiinitähteet eivät jostain syystä reagoineet edelleen lysiini- eivätkä kysteiinitähteiden kanssa ristisidoksia muodostaen.

Synteettisiä mallipeptidejä käyttämällä selvitettiin tyrosinaasin kykyä hapettaa peptidiketjuun sidottua tyrosiinia. Hapenkulutuskokeiden mukaan tyrosinaasivalmiste, joka hapetti L-tyrosiinia, hapetti myös poly-L-tyrosiinia, joskin paljon hitaammin. Erot hapenkulutusnopeuksissa saattavat osaksi selittyä koeolosuhteiden eroilla ja polytyrosiinin niukkaliukoisuudella. Kuitenkin vaikuttaa siltä, että tyrosiinitähte voi toimia substraattina tyrosinaasille sekä vapaana että toisten tyrosiinitähteiden ympäröimänä.

Tyrosinaasivalmisteella, jolla oli aktiivisuutta tyrosiinia kohtaan, oli vaikutusta myös tyrosiinia sisältäneisiin synteettisiin tripeptideihin (Ser-Tyr-Thr ja Tyr-Ser-Thr). Peptidejä sisältäneet liuokset muuttuivat tyrosinaasikäsittelyssä värittömistä värillisiksi (rusehtaviksi). Tämä todettiin myös näytteistä mitatuista valon absorptiospektreistä. Vaikka tyrosinaasi biologisissa järjestelmissä aiheuttaakin ruskettumista ilmeisesti lähinnä vapaata L-tyrosiinia hapettamalla (Marmol ja Beermann, 1996), Jee ym. (2000) osoittivat tyrosinaasin aikaansaavan myös tyrosiinia sisältävästä lysiini-tyrosiini-lysiini -tripeptidistä ruskeata tuotetta. Siten tyrosiinia sisältäneiden tripeptidien muuttuminen rusehtaviksi tyrosinaasin vaikutuksesta tässä työssä oli odotettavissa. Tulos osoitti, että tyrosinaasi voi käyttää substraattinaan tyrosiinitähdettä, joka on hydrofiilisten aminohappojen seriinin ja treoniinin läheisyydessä sillä tavalla kuin työssä käytetyissä peptideissä.

Vaikka tyrosinaasikäsittely teki tripeptidiliuoksista värillisiä ilmeisesti tyrosiinitähteitä hapettamalla, LC-MS -analyyseissä ei kuitenkaan havaittu peptidien keskinäistä ristisitoutumista tyrosinaasin vaikutuksesta. Peptidien ei siis havaittu liittyvän toisiinsa tyrosiinitähteistä. Tulos on sopusoinnussa havaintojen kanssa, joiden mukaan proteiinin tyrosiinitähte voi muodostaa

ristisidoksen vain lysiini- (Matheis ja Whitaker, 1984) tai kysteiinitähteen (Takasaki ja Kawakishi, 1997) kanssa. Toisaalta Jee ym. (2000) käsittelivät tyrosinaasilla lysiini-tyrosiini-lysiini -peptidiä ja havaitsivat reaktiotuotteiden happohydrolysaatista dityrosiinia, kahden tyrosiinin toisiinsa kovalenttisesti sitoutunutta muotoa. Jee ym. mukaan aikaisemmin ei ollut raportoitu tyrosiinia sisältävien peptidien ristositomista, joten he olivat todennäköisesti ensimmäisiä, jotka esittivät dityrosiinisidoksia muodostuvan peptidien tyrosiinitähteen välille tyrosinaasin vaikutuksesta. Aiemmin dityrosiiniristosidoksia on havaittu lähinnä proteiineissa, joita on käsitelty peroksidaasilla (EC 1.11.1.7) vetyperoksidin kanssa (Matheis ja Whitaker, 1984). Tämän työn tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että tyrosinaasi voi käyttää tyrosiinia sisältäviä tripeptidejä substraattinaan ja muodostaa niistä värillisiä tuotteita ilman että peptidien välille muodostuu ristosidoksia.

Malliproteiinien lakkaasi- ja tyrosinaasikäsittelyissä käytettyjen fenolisten happojen toimisesta näiden entsyymien substraatteina varmistuttiin hapenkulutuskokein. *T. hirsuta* -lakkaasi hapetti kaikkia käytettyjä fenolisia happoja. Siten kahvi-, ferula-, vanilliini- ja *para*-kumariinihapon todettiin olevan lakkaasin substraatteja. Samoin tyrosinaasin havaittiin hapettavan tehokkaasti ferulahappoa, jonka siten todettiin olevan hyvä substraatti tyrosinaasille. Tulos oli lakkaasin osalta odotettu, sillä esimerkiksi Flurkey (2003) listasi kaikki edellä mainitut fenoliset hapot lakkaasin substraateiksi. Sen sijaan Matheis ja Whitaker (1984) eivät pitäneet ferulahappoa tyrosinaasin substraattina. Koska hapenkulutuskokeissa ei tehty rinnakkaismäärittäyksiä, tulosten toistettavuutta on vaikea arvioida. Siten myös fenolisten happojen paremmuusjärjestystä substraatteina voi hapenkulutuskokeiden perusteella pitää lähinnä suuntaa-antavana.

SDS-PAGE -analyysien mukaan yhdessä fenolisen hapon kanssa käytettynä *T. hirsuta* -lakkaasi aikaansai kaikkien malliproteiinien (kauraproteiinit, kaseiini ja BSA) molekyyli massasien suurenemista, mistä voitiin päätellä lakkaasin muodostavan proteiinimolekyylien välille kovalenttisia ristosidoksia.

SDS-PAGE -analyysien tuloksia ei kuitenkaan onnistuttu varmistamaan GPC:llä. Kauraproteiinit todennäköisesti suurimmaksi osaksi sakkautuivat reaktioseoksessa, minkä takia valtaosa niistä menetettiin GPC-analyysiä edeltäneessä näytteenkäsittelyssä (sentrifugoinnissa ja suodatuksessa). Tämä selittää kauraproteiinien tapauksessa epämääräiset GPC-tulokset. Kauran globuliinit ovat niukkaliukoisia (Ma ja Harwalkar, 1984), mikä odotetusti vaikeutti GPC-analyysiä. Siu ym. (2002a) totesivat, että he eivät käyttäneet GPC:tä transglutaminaasilla polyme-

roimiensa kauran globuliinien analysoimiseen, koska kauran globuliinien polymeerien liukoisuus oli erittäin pieni, eikä proteiinia voinut täydellisesti liuottaa edes 0,5 % SDS:ään tai 6 M ureaan. Myös Salminen (2002) raportoi ongelmista kauraproteiinien GPC-analyyseissä.

Kaseiinia sisältäneiden reaktioseosten tapauksessa vertailunäytteissä oli sakkaa, mutta lakkaasilla ferulahapon läsnä ollessa käsiteltyt kaseiiniliuokset olivat kuitenkin liukoisia. Kunkin entsyymireaktioseoksen GPC-kromatogrammissa havaittiin vain yksi merkittävä piikki, joka vastasi pylvääseen pidättymätöntä kokoa olevaa (> 1000 kDa) proteiinia, joka todennäköisesti johtui lakkaasin ja ferulahapon vaikutuksesta polymeroituneesta kaseiinista. Piikin suureneminen järjestelmällisesti näytteen entsyymikäsittelyn keston pidentessä saattoi johtua kaseiinipolymeeriin liittyneen ferulahapon määrän suurenemisesta. Koska kromatogrammeissa ei näkynyt muita piikkejä, on mahdollista, että polymeroitumaton kaseiini olisi hajonnut reaktioseokista niiden säilytyksen aikana.

Figuroa-Espinoza ym. (1998) esittivät hypoteesin, jonka mukaan lakkaasi voi välillisesti hapettaa kysteiinin kystiiniksi hapettamalla ensin ferulahapon vastaavaksi radikaaliksi, joka sitten hapettaa kaksi kysteiinimolekyyliä disulfididoksen sisältäväksi kystiiniksi. Tässä tutkimuksessa proteiinimolekyylien välille muodostuneet ristsidokset eivät kuitenkaan olleet ainaakaan pelkästään disulfididoksia, koska malliproteiinien polymeroituminen havaittiin mahdolliset disulfididokset pelkistämällä hajottavan pelkistimen (merkaptetaanolin) kanssa tehdyissä SDS-PAGE -analyyseissä.

Proteiinienväliset ristsidokset muodostuivat kuitenkin jollakin tapaa fenolisten happojen välittämänä, koska lakkaasi muodosti ristsidoksia vain silloin kun reaktioseoksessa oli lakkaasin substraateiksi todettuja fenolisia happoja. Figuroa-Espinozan ym. (1998) mukaan ferulahaposta lakkaasin vaikutuksesta muodostuva fenoksiradikaali ei kuitenkaan voi liittyä kysteiiniin, lysiiniin ja tyrosiiniin sivuketjujen tioli-, amino- ja tyrosyyliryhmiin. Lakkaasikäsittelyn aikaansaaman proteiinien välisen ristsidoksen rakennetta ei tiettävästi ole tutkittu, eikä rakennetta pystytä tämänkään työn tulosten perusteella täysin päättämään.

Proteiinien ristsitomista lakkaasilla on tutkittu varsin vähän. Færgemand ym. (1998b) tutkivat heraproteiinien ristsitomista *Polyporus pinsitus* -lakkaasilla ja havaitsivat lakkaasin aikaansaavan lähinnä α -laktalbumiinin polymeroitumista, mutta vain fenolisen hapon, klorogeenihapon, läsnä ollessa. Færgemandin ym. havainnot ovat siten yhdenmukaiset tämän tutkimuksen tulosten kanssa, vaikka he käyttivätkin eri malliproteiineja ja fenolista happoa. Myöskään

Færgemand ym. eivät ottaneet kantaa siihen, millä mekanismeilla lakkaasin aikaansaama proteiinien ristisitominen fenolisen hapon läsnä ollessa tapahtuu.

Lakkaasin aiheuttamaa ristisidosten muodostumista on tutkittu feruloituja arabinoksyylaaneja sisältävien mallisysteemien kanssa enemmän kuin puhtaasti proteiinimalleilla. Tämä johtunee siitä, että esimerkiksi vehnä ja ruis sisältävät runsaasti feruloitua arabinoksyylaania (Micard ym, 2000), hiilihydraattia, jossa on luonnostaan esteröitymällä kiinnittynyttä lakkaasin substraattina toimivaa ferulahappoa. Vehnän vedellä uuttuvaa arabinoksylaanifraktiota (water-extractable arabinoxylans, WEAX) onkin käsitelty lakkaasilla monissa tutkimuksissa, joista osassa on tutkittu myös mahdollisuutta ristisitoa feruloitua arabinoksyylaania proteiineihin. Figueroa-Espinoza ym. (1999) tutkivat WEAX:in geeliytymistä pelkistettyjen proteiinien läsnä ollessa *Pycnopus cinnabarinus* -lakkaasin avulla ja totesivat, ettei tulosten perusteella voi päätellä feruloitujen arabinoksylaanien kiinnittyvän proteiinien sulfhydryyliryhmiin lakkaasin vaikutuksesta. Lisäksi Figueroa-Espinoza ja Rouau (1999) totesivat, että kahvihappoa ei voi käyttää muodostamaan kovalenttista siltaa arabinoksylaaniin kiinnittyneen ferulahapon ja proteiinin kysteiinitähteen välille *P. cinnabarinus* -lakkaasin avulla. He päättelivät myös, että proteiinin tyrosiinitähteestä tyrosinaasin avulla muodostettua L-DOPA:aa ei onnistuta lakkaasin avulla kiinnittämään ferulahappoon feruloidussa arabinoksylaanissa. Myöskään Labat ym. (2001) eivät havainneet kovalenttisten ristisidosten muodostumista feruloitujen arabinoksylaanien ja vehnän gluteeniproteiinien välille käsiteltyään niitä *P. cinnabarinus* -lakkaasilla.

Kauraproteiinien molekyyliainemassojen muuttumisen tehokkuus lakkaasin ja fenolisen hapon vaikutuksesta oli suoraan verrannollinen lakkaasin aiheuttamaan hapenkulutuksenopeuteen fenolista happoa hapetettaessa. Kahvihappo, jonka tapauksessa hapenkulutuksenopeus oli suurin (taulukko 14), sai lakkaasin vaikuttamaan kauraproteiineihin tehokkaimmin: SDS-PAGE:ssa kauraproteiinien alkuperäiset vyöhykkeet olivat kokonaan kadonneet kummallakin käytetyllä kahvihappopitoisuudella (0,5 ja 5 mM) (kuva 21). Sen sijaan ferulahapon ja vanilliinihapon tapauksessa kauraproteiinien alkuperäiset vyöhykkeet olivat hävinneet vain pitoisuudella 5 mM (kuvat 20 ja 21). *p*-kumariinihappo, jonka tapauksessa hapenkulutuksenopeus oli pienin, ei aiheuttanut kauraproteiinien lakkaasikäsittelyssä alkuperäisten kauraproteiinivyöhykkeiden katoamista edes pitoisuudella 5 mM (kuva 20). Siten fenolisen hapon pääteltiin tehostavan lakkaasin aikaansaamaa proteiinien ristisitomista sitä tehokkaammin, mitä parempi substraatti fenolinen happo oli lakkaasille. Muiden malliproteiinien lakkaasikäsittelyihin valittiin kuitenkin vain ferulahappo.

Tyrosinaasi aikaansai ferulahapon kanssa BSA:n ja mahdollisesti käytetyn BSA-valmisteen epäpuhtauksina sisältämien muiden proteiinien ristositoutumista. Toisin kuin lakkaasi, joka aiheutti malliproteiinien polymeroitumista lopulta niin suuriksi, etteivät ne SDS-PAGE:ssa päässeet geeliin sisään, tyrosinaasin vaikutuksesta muodostui vain oligomeerejä, jotka liikkuvat geelissä (kuva 24). Ero lakkaasin ja tyrosinaasin vaikutuksissa saattaa selittyä entsyymien erilaisilla toimintamekanismeilla. Lakkaasi muodostaa fenolisesta substraatistaan, tässä tapauksessa ferulahaposta, radikaalin (Flurkey, 2003), joka reagoi proteiinin kanssa todennäköisesti rajummin ja epäspesifisemmin kuin ferulahaposta tyrosinaasin vaikutuksesta muodostuva kinoni, joka reagoinee lähinnä vain proteiinien amino- ja sulfhydryyliryhmien kanssa (Matheis ja Whitaker, 1984).

Toisin kuin lakkaasin, tyrosinaasin on osoitettu ristositovan proteiineja ilman fenolisen yhdisteen läsnäoloa (Matheis ja Whitaker, 1984; Thalmann ja Lötzbeyer, 2002). Tiettyjä proteiineja, kuten β -laktoglobuliinia, lysotsyymiä (Thalmann ja Lötzbeyer, 2002) ja tämän tutkimuksen perusteella BSA:ta onnistuttiin kuitenkin ristositomaan tyrosinaasilla vain fenolisen hapon läsnä ollessa. Tyrosinaasi hapettama fenolinen yhdiste kytkeytyy ei-entsymaattisessa reaktiossa kovalenttisesti proteiinimolekyylien väliin (Matheis ja Whitaker, 1984; Strauss ja Gibson, 2003), jolloin proteiinimolekyylien ei tarvitse tulla niin lähelle toisiaan kuin silloin jos niiden välille muodostuisi ristosidos suoraan aminohappotähteiden sivuketjujen kautta. Tämä todennäköisesti helpottaa ristosidosten muodostumista.

Sopivat fenoliset yhdisteet vaikuttavat olevan välttämättömiä tai ainakin hyödyllisiä elintarvikkeproteiinien ristositomiseksi lakkaasilla ja tyrosinaasilla. Elintarvikeraaka-aineiden luonnostaan sisältämät fenoliset yhdisteet saatavat mahdollistaa lakkaasin ja tyrosinaasin toiminnan proteiinien ristositomiseksi elintarvikkeissa ilman lisäaineita. Straussin ja Gibsonin (2003) tutkimuksessa kahvin ja rypälemehun fenolisten yhdisteiden pääteltiin muodostavan ristosidoksia gelatiiniin ilman entsyymejäkin, kun seoksia hapetettiin kuplittamalla niitä happikaasulla.

Lakkaasin ja tyrosinaasin elintarvikekäyttöä ajateltaessa on proteiinien ristositomisen lisäksi huomattava myös näiden hapettavien entsyymien muut mahdolliset vaikutukset elintarvikkeissa. Lakkaasi ja tyrosinaasi saattavat fenolisia yhdisteitä hapettaessaan muodostaa värillisiä tuotteita, mikä huomattiin tässäkin työssä reaktioseosten värin muuttumisena. Myös Flurkey (2003) huomautti, että lakkaasi voi fenolisia yhdisteitä hapettamalla aiheuttaa ruskistumista, joka vähentää tuotteen miellyttävyyttä. Lisäksi entsyymit saattavat hapettaa elintarvikkeen ravitsemuksellisesti tärkeitä yhdisteitä tai aikaansaada tuotteeseen virrehajuja ja -makuja. Feno-

lisen yhdisteen puuttuessa lakkaasi esimerkiksi hapettaa askorbiinihappoa (C-vitamiini) (Flurkey, 2003). Varsinkin lakkaasin katalysoiman hapetusreaktion primaarisina tuotteina syntyvät vapaat fenoksiradikaalit ovat erittäin reaktiivisia ja saattavat käynnistää rasvojen hapettumiseen johtavan autoksidaatioketjureaktion. Norsker ym. (2000) raportoivat sokerijuurikaspektiinin geeliyttämiseen käytetyn lakkaasin aiheuttaneen muun muassa maitotuotteessa virrehajun, jonka epäiltiin aiheutuneen lipidien hapettumisesta. Tyrosinaasi lieneekin lakkaasia haittattomampi epäspesifisen hapettumisen suhteen, sillä tyrosinaasin katalysoimassa reaktiossa ei synny vapaita radikaaleja.

3.4.3 Gluteniinin ja gliadiinin ristisitominen transglutaminaasilla

Gluteniini ja gliadiini pyrittiin saamaan mahdollisimman hyvin liuotettua entsyymireaktioseoksiin, jotta substraattien liukenemattomuus ei häiritse entsyymin toimintaa. Esikokeiden perusteella gluteniinin pystyi liuottamaan pelkistämällä 0,1 M etikkahappoliuokseen, jonka pH oli noin 3, mutta liuoksen pH-arvoa nostettaessa gluteniinin liukoisuus selvästi huononi. Transglutaminaasilla ei kuitenkaan ole aktiivisuutta liuoksessa, jonka pH on 3 (Seguro ym., 1996a), joten transglutaminaasikäsittely oli tehtävä vähemmän happamassa liuoksessa senkin uhalla, että tällöin substraattien liukenemattomuus saattaisi häiritä entsyymireaktioita. Kompromissina päädyttiin tekemään transglutaminaasikäsittelyt gluteniinille ja gliadiinille natriumasetaatipuskuriliuoksessa, jonka pH oli 4,5. Tässä happamuudessa transglutaminaasin aktiivisuus oli vain noin puolet siitä, mitä se on parhaimmillaan neutraalissa liuoksessa (Seguro ym., 1996a) ja gluteniinista liuenneena vain osa laskennallisesti reaktioseoksessa käytetystä proteiinimäärästä (3 mg/ml).

Gluteniinin pelkistämiseen käytetyn ja reaktioseokseen jääneen ditiotreitolin vaikutus transglutaminaasin aktiivisuuteen tarkistettiin ja todettiin, että reaktioseoksen sisältämä 65 mM ditiotreitoli ei vähentänyt transglutaminaasin aktiivisuutta, vaan pikemminkin hivenen lisäsi sitä. Tämä saattaa johtua ditiotreitolin kyvystä pelkistää transglutaminaasin katalyyttiselle aktiivisuudelle välttämätön sulfhydryyliryhmä vapaaksi mahdollisista siihen kiinnittyneistä entsyymistä inaktivoivista yhdisteistä. Samankaltaisen päätelmän tekivät myös Wilcox ja Swaisgood (2002) 10 mM ditiotreitolin vaikutuksesta transglutaminaasin aktiivisuuteen.

Vaikka reaktioseoksen happamuus ja gluteniinin huonoliukoisuus todennäköisesti häirtasi transglutaminaasin toimintaa, voitiin SDS-PAGE:lla kuitenkin havaita transglutaminaasin vaikutuksia substraatteihin (kuvat 25, 26 ja 27). Gluteniinin havaittiin olevan transglutaminaasil-

le reaktiivisempaa kuin gliadiinin, mikä havaittiin geeleistä sekä silmämääräisesti tarkasteltuna että densitometrillä mitattujen vyöhykkeiden intensiteettien (optinen tiheys) perusteella. Gluteeniinin suuren molekyyli­massan alayksikköjä vastaavat vyöhykkeet (85, 109 ja 126 kDa) heikkenivät transglutaminaasin vaikutuksesta nopeimmin ja selvimmin.

Densitometrianalyysiin toi kuitenkin epävarmuutta vaihtelu geelille pipetoidun näytteen määrässä ja näytekaistaleen leveydessä. Vyöhykkeet olivat eri levyisiä eri kaistaleissa, mikä vaikutti vyöhykkeiden intensiteetteihin. Lisäksi vyöhykkeet kaareutuivat varsinkin geelin laitimaisissa kaistaleissa. Vain selvästi erottuneiden ja tunnistettujen vyöhykkeiden intensiteetin vertailu on mielekästä, koska esimerkiksi epämääräiset ja hyvin laajalle levittyvät vyöhykkeet geelin yläosassa (suurta molekyyli­massaa vastaavalla alueella) alkuperäisten gluteeniinin suuren molekyyli­massan alayksikköjen kohdalla saattoivat tässä tapauksessa olla peräisin pienen molekyyli­massan alayksikköjen polymeroitumisesta. Koska SDS-PAGE:ssa ei tehty rinnakkaismäärittelyksiä, densitometrillä määritettyjen vyöhykkeiden intensiteettien hajontaa ei tiedetä, eikä tuloksia ole mielekästä käsitellä tilastollisesti. Siten densitometrianalyysin tuloksia (kuvat 26 ja 27) voidaan pitää lähinnä suuntaa-antavina ja geelien silmämääräistä analyysiä tukevinä.

Larrén ym. (2000) mukaan gluteeniinin suuren molekyyli­massan alayksiköt ovat parempia substraatteja transglutaminaasille kuin gluteeniinin pienen molekyyli­massan alayksiköt ja gliadiini. He päättelivät, että gluteeniinin suuren molekyyli­massan alayksiköt olivat parempia substraatteja transglutaminaasille kuin pienen molekyyli­massan alayksiköt sen vuoksi, että suuren molekyyli­massan alayksiköt sisältävät enemmän lysiniä. Gluteeniinin suuren molekyyli­massan alayksikköjen on havaittu olevan hyviä substraatteja transglutaminaasille myös muissa muissa gluteenia, vehnäjauhoja tai siitä leivottua taikinaa analysoineissa tutkimuksissa (Larré ym. 1998; Gerrard ym., 2001; Basman ym., 2002; Rosell ym., 2003). Samoin kuin Larré ym. (2000), havaittiin myös tässä työssä transglutaminaasin vaikutuksen olevan sitä voimakkaampi, mitä suurempi oli entsyymiannos (kuva 26) ja käsittelyaika (kuva 27).

4 PÄÄTELMÄT

Trametes hirsuta- ja *Melanocarpus albomyces* -homeiden lakkaasit sekä *Agaricus bisporus* -sienen eli herkkusienen tyrosinaasi eivät yksinään saaneet aikaan kovalenttisia ristisidoksia kauran globuliiniin, maidon kaseiiniin eivätkä naudan seerumin albumiiniin (BSA). Ferulahappo, kahvihappo, vanilliinihappo ja *para*-kumariinihappo ovat *T. hirsuta* -lakkaasin substraatteja ja yhdessä jokaisen niistä kanssa lakkaasi muodosti ristisidoksia kauran globuliiniin. Ferulahapon läsnä ollessa *T. hirsuta* -lakkaasi ristisittoi myös kaseiinia ja BSA:ta. Ferulahappo on *A. bisporus* -tyrosinaasin substraatti ja yhdessä sen kanssa tyrosinaasi ristisittoi BSA:ta.

T. hirsuta -lakkaasi ristisittoi proteiineja substraattinaan toimineen fenolisen hapon läsnä ollessa kaikissa tutkituissa tapauksissa. Siten on todennäköistä, että lakkaasit yleisestikin muodostavat ristisidoksia proteiinimolekyylien välille, jos lakkaasia käytetään yhdessä sellaisen fenolisen yhdisteen kanssa, joka on sen substraatti. Lakkaasin ja fenolisen hapon yhteisvaikutuksena proteiinimolekyylien välille muodostuneet ristisidokset eivät olleet ainakaan pelkästään disulfididisidoksia. On mahdollista, että lakkaasin hapettama fenolinen yhdiste aikaansaa proteiinien ristisitoutumisen hapettamalla ne toisiinsa kiinnittyviksi molekyyleiksi tai kiinnittymällä itse proteiinimolekyylien väliin. Ristisidoksen tarkan rakenteen ja muodostumismekanismin selvittämiseksi tarvitaan kuitenkin jatkotutkimuksia.

Tutkitut lakkaasit ja tyrosinaasi ovat ristisitovina entsyymeinä samanlaisia sen suhteen, että ne eivät, toisin kuin transglutaminaasi, sellaisenaan muodostaneet ristisidoksia tutkittujen malliproteiinien välille. BSA:n ja ferulahapon kanssa tutkittuna lakkaasin aiheuttama ristisitominen oli tehokkaampaa kuin tyrosinaasin, mikä johtunee entsyymien erilaisista toimintamekanismeista. Tyrosinaasin ja varsinkin lakkaasin elintarvikekäyttöä harkittaessa on huomioitava sopivan fenolisen yhdisteen tarve proteiinien ristisitomiseksi. Lisäksi on huomioitava näiden hapettavien entsyymien mahdolliset haitalliset sivuvaikutukset elintarvikkeissa, kuten värinmuutokset, virrehajujen muodostuminen ja ravitsemuksellisesti arvokkaiden yhdisteiden hapettuminen.

Streptoverticillium mobaraense -bakteerin transglutaminaasi ristisittoi vehnän gluteeniproteiineista tehokkaammin gluteeniineja kuin gliadiineja. Transglutaminaasi ristisittoi tehokkaasti sekä gluteeniinin pienen että suuren molekyylimassan alayksiköitä, mutta ei juuri lainkaan gliadiineja.

LÄHDELUETTELO

- Aboumahmoud, R. ja Savello, P. 1990. Crosslinking of whey protein by transglutaminase. *Journal of Dairy Science*. 73(2): 256-263.
- Aeschlimann, D. ja Paulsson, M. 1994. Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Thrombosis and Haemostasis*. 71(4): 402-415.
- Alexandre, M.-C., Popineau, Y., Viroben, G., Chiarello, M., Lelion, A. ja Gueguen, J. 1993. Wheat γ -gliadin as substrate for bovine plasma factor XIII. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41(11): 2208-2214.
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. ja Motoki, M. 1989. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*. 53(10): 2613-2617.
- Ariëns, R.A.S., Lai, T.-S., Weisel, J.W., Greenberg, C.S. ja Grant, P.J. 2002. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood*. 100(3): 743-754.
- Babiker, E.E., Fujisawa, N., Matsudomi, N. ja Kato, A. 1996. Improvement in the functional properties of gluten by protease digestion or acid hydrolysis followed by microbial transglutaminase treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(12): 3746-3750.
- Babiker, E.E. 2000. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. *Food Chemistry*. 70(2): 139-145.
- Babin, H. ja Dickinson, E. 2001. Influence of transglutaminase treatment on the thermo-reversible gelation of gelatin. *Food Hydrocolloids*. 15(3): 271-276.
- de Barros Soares, L.H., Assmann, F. ja Ayub, M.A.Z. 2003. Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 37(3): 295-299.
- Basman, A., Köksel, H. ja Ng, P.K.W. 2002. Effects of transglutaminase on SDS-PAGE patterns of wheat, soy, and barley proteins and their blends. *Journal of Food Science*. 67(7): 2654-2658.
- Bech, L., Rasmussen, G., Halkier, T., Okada, M., Andersen, L.N., Kauppinen, M., Sandal, T. 2002. Transglutaminase from oomycetes. United States Patent 6,428,993.
- Bernard, B.K., Tsubuku, S. ja Shioya, S. 1998. Acute toxicity and genotoxicity studies of a microbial transglutaminase. *International Journal of Toxicology*. 17(6): 703-721.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Gailer, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D. ja Nürnberger, T. 2002. Pep-13, a plant defence-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *The EMBO Journal*. 21(24): 6681-6688.
- Christensen, B.M., Sørensen, E.S., Højrup, P., Petersen, T.E. ja Rasmussen, L.K. 1996. Localization of potential transglutaminase cross-linking sites in bovine caseins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(7): 1943-1947.
- Clarke, D.D., Mycek, M.J., Neidle, A. ja Waelsch, H. 1959. The incorporation of amines into protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 79: 338-354.
- Colas, B., Caer, D. ja Fournier, E. 1993. Transglutaminase-catalyzed glycosylation of vegetable proteins. Effect on solubility of pea legumin and wheat gliadins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41(11): 1811-1815.
- Cooper, A.J.L., Jeitner, T.M. ja Blass, J.P. 2002. The role of transglutaminases in neuro-degenerative diseases: overview. *Neurochemistry International* 40(1): 1-5.
- Cory, J.G. ja Frieden, E. 1967. Differential reactivities of tyrosinase residues of proteins to tyrosinase. *Biochemistry*. 6(1): 121-126.
- Coussons, P.J., Kelly, S.M., Price, N.C., Johnson, C.M., Smith, B. ja Sawyer, L. 1991. Selective modification by transglutaminase of a glutamine side chain in the hinge region of the histidine-388→glutamine mutant of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemical Journal*. 273: 73-78.

- Dabbous, M.K. 1966. Inter- and intramolecular cross-linking in tyrosinase-treated tropocollagen. *The Journal of Biological Chemistry*. 241(22): 5307-5312.
- Damodaran, S. 1996. Amino acids, peptides, and proteins. Teoksessa: *Food Chemistry*, O.R. Fennema (toim.), 3. painos, s. 321-429. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Dickinson, E. ja Yamamoto, Y. 1996. Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(6): 1371-1377.
- Duran, R., Junqua, M., Schmitter, J.M., Gancet, C. ja Goulas, P. 1998. Purification, characterisation, and gene cloning of transglutaminase from *Streptoverticillium cinnamomeum* CBS 683.68. *Biochimie*. 80(4): 313-319.
- Evans, M.T.A. ja Gordon, J.F. 1980. Whey proteins. Teoksessa: *Applied Protein Chemistry*, R.A. Grant (toim.), s. 31-67. Applied Science Publishers Ltd., Lontoo.
- Færgemand, M., Murray, B.S. ja Dickinson, E. 1997a. Cross-linking of milk proteins with transglutaminase at the oil-water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(7): 2514-2519.
- Færgemand, M., Otte, J. ja Qvist, K.B. 1997b. Enzymatic cross-linking of whey proteins by a Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. *Food Hydrocolloids*. 11(1): 19-25.
- Færgemand, M. ja Murray, B.S. 1998. Interfacial dilatational properties of milk proteins cross-linked by transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(3): 884-890.
- Færgemand, M., Otte, J. ja Qvist, K.B. 1998a. Emulsifying properties of milk proteins cross-linked with microbial transglutaminase. *International Dairy Journal*. 8(8): 715-723.
- Færgemand, M., Otte, J. ja Qvist, K.B. 1998b. Cross-Linking of Whey Proteins by Enzymatic Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(4): 1326-1333.
- Færgemand, M. ja Qvist, K.B. 1999. On the importance of using a Ca^{2+} independent transglutaminase for cross-linking of β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*. 13(3): 199-201.
- Færgemand, M., Murray, B.S., Dickinson, E. ja Qvist, K.B. 1999a. Cross-linking of adsorbed casein films with transglutaminase. *International Dairy Journal*. 9(3-6): 343-346.
- Færgemand, M., Sørensen, M.V., Jørgensen, U., Budolfsen, G. ja Qvist, K.B. 1999b. Transglutaminase: effect on instrumental and sensory texture of set style yoghurt. *Milchwissenschaft*. 54(10): 563-566.
- Fesus, L. ja Piacentini, M. 2002. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends in biochemical Sciences*. 27(10): 534-539.
- Figuerola-Espinoza, M.-C., Morel, M.-H. ja Rouau, X. 1998. Effect of lysine, tyrosine, cysteine, and glutathione on the oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans by a fungal laccase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(7): 2583-2589.
- Figuerola-Espinoza, M.C. ja Rouau, X. 1999. Effect of cysteinyl caffeic acid, caffeic acid, and L-dopa on the oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans by a fungal laccase. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*. 47(2): 497-503.
- Fink, M.L., Chung, S.I. ja Folk, J.E. 1980. γ -Glutamylamine cyclotransferase: specificity toward ϵ -(L- γ -glutamyl)-L-lysine and related compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77(8): 4564-4568.
- Flurkey, W.H. 2003. Laccase. Teoksessa: *Handbook of Food Enzymology*, J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen ja D.W.S. Wong (toim.), s. 525-537. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Folk, J.E. ja Chung, S.I. 1973. Molecular and catalytic properties of transglutaminases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 38: 109-191.
- Folk, J.E. ja Finlayson, J.S. 1977. The ϵ -(γ -glutamyl)lysine crosslink and the catalytical role of transglutaminases. *Advances in Protein Chemistry*. 31: 1-133.
- Folk, J.E. 1980. Transglutaminases. *Annual Review of Biochemistry*. 49: 517-531.

- Folk, J.E. 1983. Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed ϵ -(γ -glutamyl) lysine bond formation. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 54: 1-56.
- Folk, J.E. ja Chung, S.I. 1985. Transglutaminases. *Methods in Enzymology*. 113: 358-375.
- Gerrard, J.A., Fayle, S.E., Wilson, A.J., Newberry, M.P., Ross, M. ja Kavale, S. 1998. Dough properties and crumb strength of white pan bread as affected by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*. 63(3): 472-475.
- Gerrard, J.A., Newberry, M.P., Ross, M., Wilson, A.J., Fayle, S.E. ja Kavale, S. 2000. Pastry lift and croissant volume as affected by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*. 65(2): 312-314.
- Gerrard, J.A., Fayle, S.E., Brown, P.A., Sutton, K.H., Simmons, L. ja Rasiah, I. 2001. Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant dough. *Journal of Food Science*. 66(6): 782-786.
- Gerrard, J.A. 2002. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science & Technology*. 13(12): 389-397.
- Greenberg, C.S., Birckbichler, P.J. ja Rice, R.H. 1991. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB Journal*. 5(15): 3071-3077.
- Griffin, M., Casadio, R. ja Bergamini, C.M. 2002. Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochemical Journal*. 368(2): 377-396.
- Ha, C.-R. ja Iuchi, I. 2003. Transglutaminase. Teoksessa: *Handbook of Food Enzymology*, J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen ja D.W.S. Wong (toim.), s. 637-655. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Ho, M.-L., Leu, S.-Z., Hsieh, J.-F. ja Jiang, S.-T. 2000. Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from *Streptovorticillium ladakanum*. *Journal of Food Science*. 65(1): 76-80.
- Hsieh, J.-F., Tsai, G.-J. ja Jiang, S.-T. 2002. Microbial transglutaminase and recombinant cystatin effects on improving the quality of mackerel surimi. *Journal of Food Science*. 67(8): 3120-3125.
- Hurrell, R.F., Carpenter, K.J., Sinclair, W.J., Otterburn, M.S. ja Asquith, R.S. 1976. Mechanisms of heat damage in proteins. 7. The significance of lysine-containing isopeptides and lanthionine in heated proteins. *British Journal of Nutrition*. 35(3): 383-395.
- Ichinose, A., Bottenus, R.E. ja Davie, E.W. 1990. Structure of transglutaminases. *The Journal of Biological Chemistry*. 265(23): 13411-13414.
- Ikura, K., Kometani, T., Yoshikawa, M., Sasaki, R. ja Chiba, H. 1980a. Crosslinking of casein components by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 44(7): 1567-1573.
- Ikura, K., Kometani, T., Sasaki, R. ja Chiba, H. 1980b. Crosslinking of soybean 7S and 11S proteins by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 44(12): 2979-2984.
- Ikura, K., Yoshikawa, M., Sasaki, R. ja Chiba, H. 1981. Incorporation of amino acids into food proteins by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 45(11): 2587-2592.
- Ikura, K., Goto, M., Yoshikawa, M., Sasaki, R. ja Chiba, H. 1984. Use of transglutaminase. Reversible blocking of amino groups in substrate proteins for a high yield of specific products. *Agricultural and Biological Chemistry*. 48(9): 2347-2354.
- Imm, J.Y., Lian, P. ja Lee, C.M. 2000. Gelation and water binding properties of transglutaminase-treated skim milk powder. *Journal of Food Science*. 65(2): 200-205.
- Iranzo, M., Aguado, C., Pallotti, C., Cañizares, J.V. ja Mormeneo, S. 2002. Transglutaminase activity is involved in *Saccharomyces cerevisiae* wall construction. *Microbiology*. 148(5): 1329-1334.
- Iwami, K. ja Yasumoto, K. 1986. Amine-binding capacities of food proteins in transglutaminase reaction and digestibility of wheat gliadin with ϵ -attached lysine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 37(5): 495-503.

- James, J. ja Simpson, B.K. 1996. Application of enzymes in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 36(5): 437-463.
- Jee, J.-G., Park, S.-J. ja Kim, H.-J. 2000. Tyrosinase-induced cross-linking of tyrosine-containing peptides investigated by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 14(16):1563-1567.
- Johannes, C. ja Majcherczyk, A. 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*. 78(2): 193-199.
- de Jong, G.A.H. ja Koppelman, S.J. 2002. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. *Journal of Food Science*. 67(8): 2798-2805.
- Joseph, D., Lanier, T.C. ja Hamann, D.D. 1994. Temperature and pH affect transglutaminase-catalyzed "setting" of crude fish actomyosin. *Journal of Food Science*. 59(5): 1018-1023, 1036.
- Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, H., Ide, H., Motoki, M. ja Shimonishi, Y. 1993. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* sp. strain s-8112. *The Journal of Biological Chemistry*. 268(16): 11565-11572.
- Kang, I.J., Matsumura, Y., Ikura, K., Motoki, M., Sakamoto, H. ja Mori, T. 1994. Gelation and gel properties of soybean glycinin in a transglutaminase-catalyzed system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42(1): 159-165.
- Kasarda, D.D., Bernardin, J.E. ja Nimmo, C.C. 1976. Wheat proteins. *Advances in Cereal Science and Technology*. 1: 158-236.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. ja Suzuki, E. 2002. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(46): 44252-44260.
- Kato, A., Wada, T., Kobayashi, K., Seguro, K. ja Motoki, M. 1991. Ovomucin-food protein conjugates prepared through the transglutaminase reaction. *Agricultural and Biological Chemistry*. 55(4): 1027-1031.
- Kim, S.-Y., Jeitner, T.M. ja Steiner, P.M. 2002. Transglutaminases in disease. *Neurochemistry International*. 40(1): 85-103.
- Klein, J.D., Guzman, E. ja Kuehn, G.D. 1992. Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*. *Journal of Bacteriology*. 174(8): 2599-2605.
- Kobayashi, K., Suzuki, S., Izawa, Y., Yokozeki, K., Miza, K. ja Yamanaka, S. 1998. Transglutaminase in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Journal of General and Applied Microbiology*. 44(1): 85-91.
- Koningsberg, W. 1972. Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol. *Methods in Enzymology*. 25(B): 185-188.
- Kuraishi, C., Sakamoto, J. ja Soeda, T. 1996. The usefulness of transglutaminase for food processing. *American Chemical Society Symposium Series*. 637: 29-38.
- Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa Y., Kuhara, C. ja Soeda, T. 1997. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal of Food Science*. 62(3): 488-490, 515.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K. ja Susa, Y. 2001. Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Reviews International*. 17(2): 221-246.
- Kurth, L. ja Rogers, P.I. 1984. Transglutaminase catalyzed cross-linking of myosin to soya protein, casein and gluten. *Journal of Food Science*. 49(2): 573-576, 589.
- Kuuva, T., Lantto, R., Reinikainen, T., Buchert, J. ja Autio, K. 2003. Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels. *Food Hydrocolloids*. 17(5): 679-684.
- Köksel, H., Sivri, D., Ng, P.K.W. ja Steffe, J.F. 2001. Effects of transglutaminase enzyme on fundamental rheological properties of sound and bug-damaged wheat flour doughs. *Cereal Chemistry*. 78(1): 26-30.

- Labat, E., Morel, M.H. ja Rouau, X. 2001. Effect of laccase and manganese peroxidase on wheat gluten and pentosans during mixing. *Food Hydrocolloids*. 15(1): 47-52.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Larré, C., Kedzior, Z.M., Chenu, M.G., Viroben, G. ja Gueguen, J. 1992. Action of transglutaminase on an 11S seed protein (pea legumin): influence of the substrate conformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40(7): 1121-1126.
- Larré, C., Chiarello, M., Blanloeil, Y., Chenu, M. ja Gueguen, J. 1993a. Gliadin modifications catalyzed by guinea pig liver transglutaminase. *Journal of Food Biochemistry*. 17(4): 267-282.
- Larré, C., Chiarello, M., Dudek, S., Chenu, M. ja Gueguen, J. 1993b. Action of transglutaminase on the constitutive polypeptides of pea legumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41(11): 1816-1820.
- Larré, C., Deshayes, G., Lefebvre, J. ja Popineau, Y. 1998. Hydrated gluten modified by a transglutaminase. *Nahrung*. 42(3/4): 155-157.
- Larré, C., Denery-Papini, S., Popineau, Y., Deshayes, G., Desserme, C. ja Lefebvre, J. 2000. Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. *Cereal Chemistry*. 77(2): 121-127.
- Lauber, S., Henle, T. ja Klostermeyer, H. 2000. Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and gel strength of yoghurt. *European Food Research and Technology*. 210(5): 305-309.
- Lee, H.G., Lanier, T.C. ja Hamann, D.D. 1997a. Covalent cross-linking effects on thermorheological profiles of fish protein gels. *Journal of Food Science*. 62(1): 25-28, 32.
- Lee, H.G., Lanier, T.C., Hamann, D.D. ja Knopp, J.A. 1997b. Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *Journal of Food Science*. 62(1): 20-24.
- Liu, M. ja Damodaran, S. 1999. Effect of transglutaminase-catalyzed polymerization of β -casein on its emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(4): 1514-1519.
- Loewy, A.G. 1984. The N^{ϵ} -(γ -glutamic)lysine cross-link: method of analysis, occurrence in extracellular and cellular proteins. *Methods in Enzymology*. 107: 241-257.
- Lorand, L. 2001. Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 936: 291-311.
- Lorenzen, P.C. ja Schlimme, E. 1998. Properties and potential fields of application of transglutaminase preparations in dairying. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 332: 47-53.
- Lorenzen, P.C. 2000. Techno-functional properties of transglutaminase-treated milk proteins. *Milchwissenschaft*. 55(12): 667-670.
- Lorenzen, P.C. 2002. Enzymatic crosslinking of dairy proteins. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 374: 30-36.
- Lorenzen, P.C., Neve, H., Mautner, A. ja Schlimme, E. 2002. Effect of enzymatic crosslinking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*. 55(3): 152-157.
- Ma, C.-Y. ja Harwalkar, V.R. 1984. Chemical characterization and functionality assessment of oat protein fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 32(1): 144-149.
- Mahler, H.R. ja Cordes, E.H. 1968. *Biological Chemistry*. Harper & Row, New York.
- Mahmoud, R. ja Savello, P.A. 1993. Solubility and hydrolyzability of films produced by transglutaminase catalytic crosslinking of whey protein. *Journal of Dairy Science*. 76(1): 29-35.
- Marmol, V. del ja Beermann, F. 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Letters*. 381(3): 165-168.
- Matheis, G. ja Whitaker, J. R. 1984. Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *Journal of Food Biochemistry*. 8(3): 137-162.

- Matsumura, Y., Lee, D.-S. ja Mori, T. 2000. Molecular weight distributions of α -lactalbumin polymers formed by mammalian and microbial transglutaminases. *Food Hydrocolloids*. 14(1): 49-59.
- Mayer, A.M. ja Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60(6): 551-565.
- Micard, V., Saulnier, L., Thibault, J.-F. ja Rouau, X. 2000. Covalent gels from oxidative coupling of feruloylated macromolecules. Teoksessa: *Proceedings of the Polymerix 2000, Biopolymers: food & cosmetic applications* (7.-8.6.2000, Rennes, Ranska), s. 93-103. Centre de Biotechnologies en Bretagne, Rennes, Ranska.
- Mizuno, A., Mitsuiki, M. ja Motoki, M. 2000. Effect of transglutaminase treatment on the glass transition of soy protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(8): 3286-3291.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., Durán, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 13(6-7): 205-216.
- Motoki, M. ja Nio, N. 1983. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. *Journal of Food Science*. 48(2): 561-566.
- Motoki, M., Nio, N. ja Takinami, K. 1984. Functional properties of food proteins polymerized by Transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 48(5): 1257-1261.
- Motoki, M., Seguro, K., Nio, N. ja Takinami, K. 1986. Glutamine-specific deamidation of α_{s1} -casein by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 50(12): 3025-3030.
- Motoki, M., Aso, H., Seguro, K. ja Nio, N. 1987. α_{s1} -Casein film prepared using transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 51(4): 993-996.
- Motoki, M. ja Seguro, K. 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*. 9(5): 204-210.
- Mottahedeh, J. ja Marsh, R. 1998. Characterization of 101-kDa transglutaminase from *Physarum polycephalum* and identification of LAV1-2 as substrate. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(45): 29888-29895.
- Muszbek, L., Yee, V.C. ja Hevessy, Z. 1999. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thrombosis Research*. 94(5): 271-305.
- Mutanen, M. ja Voutilainen, E. 2000. Energiaravintoaineet, ravintokuitu ja alkoholi. Teoksessa: *Ravitsemustiede*, A. Aro, M. Mutanen ja M. Uusitupa (toim.), s. 104-137. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki.
- Mycek, M.J., Clarke, D.D., Neidle, A ja Waelsch, H. 1959. Amine incorporation into insulin as catalyzed by transglutaminase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 84: 528-540.
- Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A. ja Björkqvist, S.-E. 1999. *Ihmisen fysiologia ja anatomia*. 12. uudistettu painos. Werner Söderström Osakeyhtiö, Porvoo.
- Nielsen, P.M. 1995. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. *Food Biotechnology*. 9(3): 119-156.
- Nio, N., Motoki, M. ja Takinami, K. 1985. Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 49(8): 2283-2286.
- Nio, N., Motoki, M. ja Takinami, K. 1986a. Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 50(4): 851-855.
- Nio, N., Motoki, M. ja Takinami, K. 1986b. Gelation of protein emulsion by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 50(6): 1409-1412.
- Nonaka, M., Tanaka, H., Okiyama, A., Motoki, M., Ando, H., Umeda, K. ja Matsuura, A. 1989. Polymerization of several proteins by Ca^{2+} -independent transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*. 53(10): 2619-2623.
- Nonaka, M., Sakamoto, H., Toiguchi, S., Kawajiri, H., Soeda, T. ja Motoki, M. 1992. Sodium caseinate and skim milk gels formed by incubation with microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*. 57(5): 1214-1218, 1241.

- Nonaka, M., Ito, R., Sawa, A., Motoki, M. ja Nio, N. 1997a. Modification of several proteins by using Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase with high-pressure treatment. *Food Hydrocolloids*. 11(3): 351-353.
- Nonaka, M., Matsuura, Y., Nakano, K. ja Motoki, M. 1997b. Improvement of the pH-solubility profile of sodium caseinate by using Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase with gelatin. *Food Hydrocolloids*. 11(3): 347-349.
- Norsker, M., Jensen, M. ja Adler-Nissen, J. 2000. Enzymatic gelation of sugar beet pectin in food products. *Food Hydrocolloids*. 14(3): 237-243.
- Oksman-Caldentey, K.-M., Laitila, A., Wilhelmson, A., Heiniö, R.-L., Outinen, M., Kaukovirta-Norja, A., Lehtinen, P., Plaami, S., Sontag-Strohm, T., Mikola, M. ja Poutanen, K. 1999. Kaura elintarvikeraaka-aineena. VTT Tiedotteita 1986.
- O'Sullivan, M.M., Kelly, A.L. ja Fox, P.F. 2002a. Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. *Journal of Dairy Research*. 69(3): 433-442.
- O'Sullivan, M.M., Kelly, A.L. ja Fox, P.F. 2002b. Effect of transglutaminase on the heat stability of milk: a possible mechanism. *Journal of Dairy Science*. 85(1): 1-7.
- Otterburn, M.S. 1983. Isopeptides: the occurrence and significance of natural and xenobiotic crosslinks in proteins. *American Chemical Society Symposium Series*. 234: 221-232.
- Pasternack, R., Dorsch, S., Otterbach, J.T., Robenek, I.R., Wolf, S. ja Fuchsbaue, H.-L. 1998. Bacterial pro-transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. Purification, characterisation and sequence of the zymogen. *European Journal of Biochemistry*. 257(3): 570-576.
- Pisano, J.J., Finlayson, J.S. ja Peyton, P. 1968. Cross-link in fibrin polymerized by factor XIII: ϵ -(γ -glutamyl)lysine. *Science*. 160: 892-893.
- Porta, R., Gentile, V., Esposito, C., Mariniello, L. ja Auricchio, S. 1990. Cereal dietary proteins with sites for cross-linking by transglutaminase. *Phytochemistry*. 29(9): 2801-2804.
- Poza, O.D. 2002. Transglutaminase in baking applications. *Cereal Foods World*. 47(3): 93-95.
- Ramirez-Suarez, J.C. ja Xiong Y.L. 2002. Transglutaminase cross-linking of whey/myofibrillar proteins and the effect on protein gelation. *Journal of Food Science*. 67(8): 2885-2891.
- Ramírez, E.C., Whitaker, J.R. ja Virador, V.M. 2003. Polyphenol oxidase. Teoksessa: *Handbook of Food Enzymology*, J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen ja D.W.S. Wong (toim.), s. 509-523. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Rosell, C.M., Wang, J., Aja, S., Bean, S. ja Lookhart, G. 2003. Wheat flour proteins as affected by transglutaminase and glucose oxidase. *Cereal Chemistry*. 80(1): 52-55.
- Sakamoto, H., Kumazawa, Y. ja Motoki, M. 1994. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. *Journal of Food Science*. 59(4): 866-871.
- Salminen, H. 2002. Elintarvikeproteiinien muokkaus ristsidoksia muodostavilla entsyymeillä. EKT-sarja 1256. Pro gradu -tutkielma, Helsingin yliopisto, Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos, Helsinki.
- Schorsch, C., Carrie, H., Clark, A.H. ja Norton, I.T. 2000a. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: conditions for formation of transglutaminase induced gels. *International Dairy Journal*. 10(8): 519-528.
- Schorsch, C., Carrie, H. ja Norton, I.T. 2000b. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation. *International Dairy Journal*. 10(8): 529-539.
- Seguro, K., Kumazawa, Y., Ohtsuka, T., Ide, H., Nio, N., Motoki, M. ja Kubota, K. 1995. ϵ -(γ -Glutamyl)lysine: hydrolysis by γ -glutamyltransferase of different origins, when free or protein bound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(8): 1977-1981.

- Seguro, K., Nio, N. ja Motoki, M. 1996a. Some characteristics of a microbial protein cross-linking enzyme: transglutaminase. American Chemical Society Symposium Series. 650: 271-280.
- Seguro, K., Kumazawa, Y., Kuraishi, C., Sakamoto, H. ja Motoki, M. 1996b. The ϵ -(γ -glutamyl)lysine moiety in crosslinked casein is available source of lysine for rats. Journal of Nutrition. 126(10): 2557-2562.
- Serafini-Fracassini, D., Del Duca, S. ja Beninati, S. 1995. Plant transglutaminases. Phytochemistry. 40(2): 355-365.
- Sharma, R., Lorenzen, P.C. ja Qvist, K.B. 2001. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of ϵ -(γ -glutamyl)lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. International Dairy Journal. 11(10): 785-793.
- Shewry, P.R., Halford, N.G., Tatham, A.S., Popineau, Y., Lafiandra, D. ja Belton, P.S. 2003. The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. Advances in Food and Nutrition Research. 45: 119-302.
- Singh, H. 1991. Modification of food proteins by covalent crosslinking. Trends in Food Science & Technology. 2(8): 196-200.
- Siu, N.-C., Ma, Y.-Y. ja Mine, Y. 2002a. Physicochemical and structural properties of oat globulin polymers formed by a microbial transglutaminase. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(9): 2660-2665.
- Siu, N.-C., Ma, Y.-Y., Mock, W.-Y. ja Mine, Y. 2002b. Functional properties of oat globulin modified by a calcium-independent microbial transglutaminase. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(9): 2666-2672.
- Strauss, G. ja Gibson, S.M. 2003. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. Food Hydrocolloids. (in press)
- Suzuki, S., Izawa, Y., Kobayashi, K., Eto, Y., Yamanaka, S., Kubota, K. ja Yokozeki, K. 2000. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 64(11): 2344-2351.
- Swaigood, H.E. 1996. Characteristics of milk. Teoksessa: *Food Chemistry*, O.R. Fennema (toim.), 3. painos, s. 841-878. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Takasaki, S. ja Kawakishi, S. 1997. Formation of protein-bound 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-S-cysteinyl-3,4-dihydroxyphenylalanine as new cross-linkers in gluten. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45(9): 3472-3475.
- Tanimoto, S.-Y. ja Kinsella, J.E. 1988. Enzymatic modification of proteins: effects of transglutaminase cross-linking on some physical properties of β -lactoglobulin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 36(2): 281-285.
- Thalmann, C.R., Lötzbeier, T. 2002. Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase. European Food Research and Technology. 214(4): 276-281.
- Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology. 140: 19-26.
- Traoré, F. ja Meunier, J.-C. 1991. Cross-linking of caseins by human placental factor XIIIa. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 39(10): 1892-1896.
- Traoré, F. ja Meunier, J.-C. 1992. Cross-linking activity of placental F XIIIa on whey proteins and caseins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40(3): 399-402.
- Tsai, G.-J., Lin, S.-M. ja Jiang, S.-T. 1996. Transglutaminase from *Streptoverticillium ladakanum* and application to minced fish product. Journal of Food Science. 61(6): 1234-1238.
- Tseng, C.-S. ja Lai, H.-M. 2002. Physicochemical properties of wheat flour dough modified by microbial transglutaminase. Journal of Food Science. 67(2): 750-755.
- Virtanen, S. 2000. Hapettavat entsyymit vehnän gluteenin muokkauksessa. EKT-sarja 1186. Pro gradu -tutkielma, Helsingin yliopisto, Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos, Helsinki.
- VTT Bioteekniikka. 1992. Lakkaasimääritys. Menetelmäohje. VTT Bioteekniikka, Espoo.

- VTT Biotekniikka. 2002a. Transglutaminaasiaktiivisuuden määrittäminen. Menetelmäohje. VTT Biotekniikka, Espoo.
- VTT Biotekniikka. 2002b. Tyrosinaasimääritys L-DOPA substraattina. Menetelmäohje. VTT Biotekniikka, Espoo.
- Wada, F., Nakamura, A., Masutani, T., Ikura, K., Maki, M. ja Hitomi, K. 2002. Identification of mammalian-type transglutaminase in *Physarum polycephalum*. *European Journal of Biochemistry*. 269(14): 3451-3460.
- Walsh, D.J., Cleary, D., McCarthy, E., Murphy, S. ja FitzGerald, R.J. 2003. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. *Food Research International*. 36(7): 677-683.
- Washizu, K., Ando, K., Koikeda, S., Hirose, S., Matsuura, A., Takagi, H., Motoki, M. ja Takeuchi, K. 1994. Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 58(1):82-87.
- Whitaker, J.R. 1996. Enzymes. Teoksessa: *Food Chemistry*, O.R. Fennema (toim.), 3. painos, s. 431-530. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Wilcox, C.P. ja Swaisgood, H.E. 2002. Modification of the rheological properties of whey protein isolate through the use of an immobilized microbial transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(20): 5546-5551.
- Yasumoto, K. ja Suzuki, F. 1990. Aspartyl- and glutamyl-lysine crosslinks formation and their nutritional availability. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 36(4): S71-S77.
- Yildirim, M., Hettiarachchy, N.S. ja Kalapathy, U. 1996. Properties of biopolymers from cross-linking whey protein isolate and soybean 11S globulin. *Journal of Food Science*. 61(6): 1129-1131, 1164.
- Yildirim, M. ja Hettiarachchy, N.S. 1997. Biopolymers produced by cross-linking soybean 11S globulin with whey proteins using transglutaminase. *Journal of Food Science*. 62(2): 270-275.
- Yildirim, M. ja Hettiarachchy, N.S. 1998. Properties of film produced by cross-linking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase. *Journal of Food Science*. 63(2): 248-252.