

谷氨酰胺转氨酶交联对 牦牛乳曲拉酪蛋白功能性质的影响

史莹^{1,2}, 杨敏^{2,3,*}, 梁琪^{1,2}, 文鹏程^{1,2}, 张卫兵^{1,2}, 张炎^{1,2}

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070;

2. 甘肃省功能乳品工程实验室, 甘肃兰州 730070;

3. 甘肃农业大学理学院, 甘肃兰州 730070)

摘要:以曲拉和荷斯坦牛乳酪蛋白为原料, 利用安全、高效的谷氨酰胺转氨酶对其进行交联修饰, 研究谷氨酰胺转氨酶对酪蛋白功能性质的影响, 测定交联前后样品的持水性、持油性、热稳定性、黏度、起泡性。结果表明, 牦牛乳曲拉酪蛋白和荷斯坦牛乳酪蛋白经过谷氨酰胺转氨酶交联后, 两种酪蛋白的交联度分别可达到20.04% ($p < 0.05$) 和25.15% ($p < 0.05$), 曲拉酪蛋白的持水性、热稳定性、黏度和泡沫稳定性显著增加 ($p < 0.05$), 荷斯坦酪蛋白的黏度和热稳定性显著增加 ($p < 0.05$), 其余性质均无显著差异。研究结果能为酶法改性酪蛋白的工业化生产提供理论依据。

关键词:谷氨酰胺转氨酶, 酪蛋白, 交联, 功能性质

Effect of transglutaminase cross-linking on the functional properties of kurut casein from yak milk

SHI Ying^{1,2}, YANG Min^{2,3,*}, LIANG Qi^{1,2}, WEN Peng-cheng^{1,2}, ZHANG Wei-bing^{1,2}, ZHANG Yan^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Functional Dairy Product Engineering Lab of Gansu, Lanzhou 730070, China;

3. College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Kurut caseins and cow caseins as the research object were modified with safe and effective transglutaminase. Effect of transglutaminase cross-linking on the functional properties of casein were investigated. Water-holding capacity, fat-binding capacity, heat stability, viscosity and foaming properties were measured in this study. The results showed that the free amino groups of kurut caseins and cow caseins respectively decrease by 20.04% ($p < 0.05$) and 25.15% ($p < 0.05$) after transglutaminase cross-linking. Water-holding capacity, heat stability, viscosity and foam stability of kurut caseins significantly increased ($p < 0.05$). Viscosity and heat stability of cow caseins significantly increased ($p < 0.05$). The other properties was no obvious different. The results provided theoretical basis for industrial production of enzymatic modification with casein.

Key words: transglutaminase; casein; cross-linking; functional properties

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)08-0176-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.08.031

酪蛋白(casein)是蛋白质中的一种, 占牛乳蛋白质总量的80%左右, 由 α_1 -、 α_2 -、 β -、 κ -酪蛋白四种单体组成。酪蛋白具有很高的营养价值和多种功能性质, 使其广泛应用于食品工业、医药工业、油漆工业、纺织工业、造纸工业等^[1-2]。曲拉, 是藏区牧民将牦牛乳脱脂、煮开、接种发酵使乳蛋白凝固, 经脱水干燥所得的奶干渣, 主要成分为酪蛋白。众多研究表明, 牦牛乳曲拉酪蛋白和荷斯坦牛乳酪蛋白在组成及含量上均存在差异^[3-4]。

在实际生产中, 由于酪蛋白的部分性质不理想而限制了其应用, 如在等电点附近溶解性差, 在酸性饮料业中应用受限; 热稳定性差, 在加工过程中会发生变质等。为了获得更好的功能性质, 可以对其进行酶法交联, 改善部分功能性质。谷氨酰胺转氨酶(TG)是酶法交联蛋白质中应用最为广泛的酶制剂, 可显著改善蛋白质的部分理化及功能性质^[5-7]。Babiker指出TG交联导致大豆蛋白的溶解性、乳化性、起泡性得到改善^[8]。Siu等报道了TG交联燕麦球蛋白, 交联后在部分pH时溶解性有所增加^[9]。O'Sullivan等指出, 交联后的酪蛋白热稳定性和高压稳定性均显著增强^[10]。国内, 对于TG交联牦牛乳曲拉酪蛋白的报道较为罕见。

收稿日期: 2013-08-05 * 通讯联系人

作者简介: 史莹(1988-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 乳品科学与技术。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960260)。

本文研究了TG交联牦牛乳曲拉和荷斯坦牛乳酪蛋白,分析交联前后酪蛋白持水性、持油性、热稳定性、黏度、起泡性的变化,探讨酶法交联牦牛乳酪蛋白与荷斯坦牛乳酪蛋白在一些功能性质上的异同,为酶法改性酪蛋白工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

谷氨酰胺转氨酶(TG, 100U/g) 江苏一鸣生物制品有限公司;曲拉酪蛋白 甘肃省甘南牧区;荷斯坦牛乳 甘肃农业大学牛场;邻苯二甲醛 上海中泰化学试剂有限公司;其他试剂 均为分析纯试剂。

HWS26型恒温水浴锅 上海一恒科技有限公司;TGL-20M型高速台式冷冻离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司;pH计 上海仪电科学仪器股份有限公司;754PC型紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;LVDV粘度计 上海方瑞仪器有限公司;XHF-D高速分散器 宁波新芝生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酪蛋白的制备

1.2.1.1 曲拉的除杂 曲拉粉碎过100目筛,与水按1:20的比例混合溶解,于40℃的磁力搅拌器中加热并搅拌,用2mol/L NaOH调节pH使其稳定在7.0,继续搅拌30min。冷却至室温,4000r/min离心20min后纱布过滤,上清液加入1mol/L的盐酸迅速调节pH至4.6,酪蛋白沉淀析出,4000r/min离心20min后过滤真空冷冻干燥备用^[2],测得除杂后曲拉中酪蛋白含量为88.85%。

1.2.1.2 荷斯坦牛乳酪蛋白制备 荷斯坦牛乳在4000r/min离心20min后纱布过滤,除掉牛乳中的脂肪,上清液加入1mol/L的盐酸迅速调节pH至4.6,酪蛋白沉淀析出,4000r/min离心20min后过滤真空冷冻干燥备用。

1.2.2 TG交联 分别配制浓度为5mg/mL的荷斯坦牛乳酪蛋白和曲拉酪蛋白溶液,调节pH至7.0,在47℃下添加TG (15U/g)与酪蛋白反应135min。反应结束后,在85℃水浴锅中灭活5min,冷却后将溶液的pH调至4.6,酪蛋白沉淀。离心后真空冷冻干燥备用。

1.2.3 游离氨基的变化 交联前后酪蛋白溶液的游离氨基含量的变化采用邻苯二甲醛法测定^[11]。3mL交联前后的酪蛋白溶液与3mL邻苯二甲醛溶液完全混合后,在340nm下测定吸光度。

1.2.4 持水性的测定 酪蛋白和TG交联后酪蛋白的持水性测定方法参考Tomotake^[12]的方法。准确称取交联前后样品0.5g,加入5mL蒸馏水于已知质量的离心管中,涡旋混合5min,室温下静置2h后,离心(3000g)20min,将上清液轻轻倒出,称离心管和沉淀的质量。

$$\text{持水性 (g/g)} = (W_2 - W_1) / W_0$$

式中: W_0 : 干样品的质量(g); W_1 : 离心管和干样品的质量(g); W_2 : 离心管和沉淀的质量。

1.2.5 持油性的测定 酪蛋白持油性参考Tomotake^[12]的方法测定。称取0.5g样品和5mL植物油于称过质量的10mL离心管中涡旋5min混合后,静置2h,3000g下离心20min,将上清液轻轻倒出,称量离心管和沉淀的质量。

$$\text{持油性 (g/g)} = (F_2 - F_1) / F_0$$

式中: F_0 : 干样品的质量(g); F_1 : 离心管和干样品的质量(g); F_2 : 离心管和沉淀的质量。

1.2.6 黏度的测定 溶解质量浓度为10mg/mL的交联前后酪蛋白,采用LVDV数显粘度计测量,0号转子,测定样品溶液的黏度三次,取其平均值^[13]。

1.2.7 热稳定性的测定 将浓度为2mg/mL、pH7.0的曲拉酪蛋白和交联后的酪蛋白溶液30mL,分别在40~90℃下加热20min,冷却至室温后,10000g/min条件下离心35min,稀释后280nm下测定上清液的吸光度,根据吸光度值的大小判定溶液的热稳定性^[9]。

1.2.8 起泡性的测定 起泡性通过测定起泡能力和泡沫稳定性表示。配制质量浓度为10mg/mL的样品溶液,取100mL溶液置于250mL的烧杯中,在20000r/min下高速搅打1min。迅速小心地将泡沫转移至量筒中,测定最初的泡沫体积和静置30min时保留的泡沫体积。通过相对溢出量和静置后稳定的泡沫体积比评价样品的起泡能力和泡沫稳定性^[14]。

$$\text{相对溢出量 (\%)} = V_0 / 100$$

$$\text{泡沫稳定性} = V_{30} / V_0$$

式中, V_0 和 V_{30} 分别为起泡0min和30min时的泡沫体积。

2 结果与分析

2.1 游离氨基含量的变化

酪蛋白交联前后氨基含量测定结果如图1所示。曲拉酪蛋白、交联曲拉酪蛋白、荷斯坦牛乳酪蛋白、交联荷斯坦牛乳酪蛋白的游离氨基含量分别为77.20、61.73、65.13、48.75 $\mu\text{g}/\text{mg}$,经过TG交联后曲拉酪蛋白交联度为20.04%,而荷斯坦牛乳酪蛋白的交联度可达到25.15%,比曲拉酪蛋白高,这是由于不同牛乳来源的酪蛋白结构存在差异,如酪蛋白的平均粒径、四种单体含量不同等因素均影响酪蛋白的结构^[4]。TG交联后,两种样品中游离氨基含量显著减少($p < 0.05$)。

TG可以催化赖氨酸侧链中的 ϵ -氨基和谷氨酰胺残基反应,生成 ϵ -(γ -谷酰基)赖氨酸异肽键和高分子量聚合物,导致蛋白质分子之间发生共价交联,使游离氨基含量减少^[5]。酪蛋白经过TG交联后,游离氨基含量的减少证实其发生了交联。实验结果和Wilcox^[15]

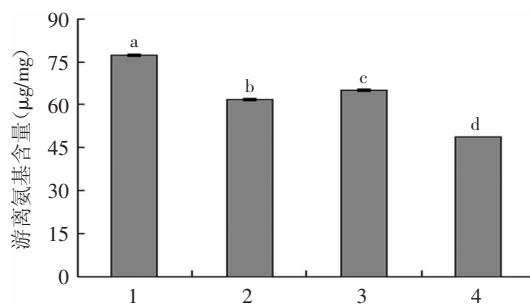


图1 TG交联对游离氨基含量的影响

Fig.1 Effect of TG cross-linking on free amino groups of the casein

注: 不同字母表示差异显著($p < 0.05$); 1-曲拉酪蛋白; 2-交联曲拉酪蛋白; 3-荷斯坦牛乳酪蛋白; 4-荷斯坦交联牛乳酪蛋白, 表1、表2、图2、图3同。

报道的一致。

2.2 持水性、持油性

持水性是蛋白质膨胀并吸收水分的能力,持油性是指蛋白质保持油的能力,在食品加工中起着重要的作用。蛋白质结合脂肪的能力受疏水性、变性程度,蛋白质的大小和结构等影响^[12]。如表1所示,曲拉酪蛋白和荷斯坦酪蛋白的持水性分别为4.43、2.18g/g,持油性分别为4.03、1.49g/g,经过交联后的两种酪蛋白持水性和持油性分别为6.69、2.33g/g和4.98、1.74g/g,均高于原始酪蛋白。曲拉酪蛋白的持水性和持油性与荷斯坦酪蛋白差异显著($p<0.05$)。

据报道,荷斯坦牛乳酪蛋白平均粒径为175nm;牦牛乳酪蛋白的平均粒径为212nm,高于荷斯坦牛乳酪蛋白。从而导致荷斯坦牛乳酪蛋白交联前后酪蛋白持水性均小于牦牛乳酪蛋白^[4]。由于曲拉酪蛋白经过微生物发酵及酸沉等多次处理,导致酪蛋白单体解离,经TG交联后,在胶束内部形成网状结构,胶束间也发生共价交联,使得胶束形成更大的团簇,吸收更多的水分,导致其持水性增加($p<0.05$)。荷斯坦酪蛋白本身粒径较小,经过交联后可能分子量增加并不明显,导致持水性增加不显著。

持油性主要依靠酪蛋白分子结构对油的物理拦截作用,蛋白质体积密度越小,持油性越大^[9,10]。持油性还与疏水性、变形程度、蛋白质结构等有关。持水性和持油性增加也出现在TG交联的来自牛心的肌纤维蛋白和小麦蛋白^[17-18]。持水性、持油性的增加能提高酪蛋白在特定的食品行业的利用率。

表1 TG交联对酪蛋白持水性、持油性的影响

Table 1 Effect of TG cross-linking on water- and fat-binding capacity of casein

样品	持水性(g/g)	持油性(g/g)
1	4.43±0.27b	4.03±0.36b
2	6.69±0.91c	4.98±0.91b
3	2.18±0.05a	1.49±0.17a
4	2.33±0.01a	1.74±0.04a

注:同列不同小写字母代表差异显著($p<0.05$);表2同。

2.3 热稳定性

酪蛋白交联前后热稳定性变化如图2所示。热处理后蛋白质上清液吸光度值越大,表明蛋白质的稳定性越好。随着温度的升高,酪蛋白和交联后酪蛋白的吸光度都逐渐降低,当加热温度达到90℃时,曲拉、荷斯坦牛乳酪蛋白的吸光度分别为0.345和0.357,而交联后酪蛋白的吸光度分别是0.373和0.376,并且在各个温度下的吸光度都显著高于交联前酪蛋白($p<0.05$)。

加热处理能破坏酪蛋白分子间的氢键和疏水作用力等,使酪蛋白胶束发生解离或聚集,因而影响其稳定性。TG能催化蛋白质分子发生分子间的共价交联,形成具有更致密网状结构的聚合物,此外,随着加热温度的升高, κ -酪蛋白从酪蛋白胶束上水解,而TG交联能阻止 κ -酪蛋白从酪蛋白胶束上解离^[5],提高其稳定性。

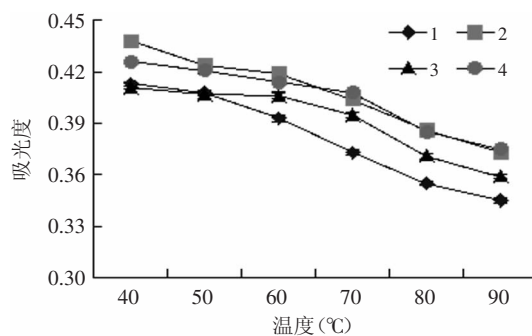


图2 TG交联对酪蛋白热稳定性的影响

Fig.2 Effect of TG cross-linking on heat stability of casein

2.4 黏度

黏度可以用来评价蛋白质的增稠性,在液体食品(汤,饮料,糊状物)和肉品的粉碎上可以体现其意义。蛋白质分散液都具有一定的黏度,其黏度主要是受蛋白质的流体力学性质影响,如:其分子或粒子的表观直径、分子量、分子形状、蛋白质与溶剂相互作用,以及蛋白质之间的聚集及解聚等相互作用^[13]。

酪蛋白交联前后黏度变化如图3所示。经过TG交联修饰后的曲拉酪蛋白和荷斯坦牛乳酪蛋白的黏度都显著增加,分别提高了1.9倍和2.2倍,四种样品间存在显著差异($p<0.05$)。酪蛋白经过TG交联后,分子之间相互作用进行交联,形成大分子的聚合物,分子量增加,表观直径增加,最终导致样品的黏度增加^[19]。另外,荷斯坦牛乳酪蛋白的黏度比曲拉酪蛋白小,是由于其粒径较小。

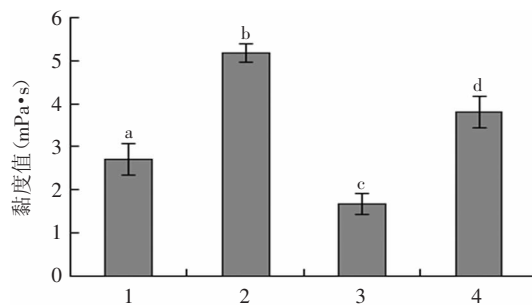


图3 TG交联对酪蛋白黏度的影响

Fig.3 Effect of TG cross-linking on viscosity of casein

2.5 起泡性

起泡性测定结果如表2所示。曲拉酪蛋白和交联后酪蛋白的起泡性分别为68%和75%,泡沫稳定性分别为8%和17%。和原始曲拉酪蛋白相比,交联后的酪蛋白的起泡性略有增加,但泡沫稳定性增加显著($p<0.05$);TG交联前后荷斯坦牛乳酪蛋白的起泡性质差异不显著($p>0.05$),与其本身结构有关。酪蛋白经过TG交联后,聚合物的高分子量和结构增加了形成界面蛋白膜的能力,交联过程中由于氨基含量减小引起的静电斥力减小,使蛋白质分子的相互作用增强,并且更易于吸附到界面,导致起泡性增加。由于交联程度较低,所以起泡性增加并不明显^[5]。此外,还可能由于酪蛋白经过TG交联后,三级、四级结构展

开,有利于酪蛋白分子快速分散至气-水界面,界面张力下降,导致起泡性增加。泡沫稳定性的增加与流体力学半径和分子量的增加有关,还与带电基团的减少有关^[9,20]。

表2 TG交联对酪蛋白起泡性及泡沫稳定性的影响
Table 2 Effect of TG cross-linking on foamability and foam stability of casein

样品	起泡性(%)	泡沫稳定性(%)
1	68%±0.03a	8%±0.02a
2	75%±0.05a	17%±0.03b
3	67%±0.03a	25%±0.04b
4	68%±0.03a	21%±0.02b

3 结论

牦牛乳曲拉酪蛋白和荷斯坦牛乳酪蛋白经过TG交联后,游离氨基含量均减少,表明谷氨酰胺残基和赖氨酸残基发生交联,生成高分子聚合物。曲拉酪蛋白经过TG交联后,持水性、黏度、热稳定性和泡沫稳定性均显著增加($p<0.05$),持油性、起泡性稍有增加($p>0.05$);交联后荷斯坦酪蛋白的黏度和热稳定性显著增加($p<0.05$),持水性、持油性、起泡性无显著影响。交联前后曲拉酪蛋白的性质与荷斯坦酪蛋白存在差异,这是由于其本身结构(如单体含量、平均粒径、矿物质含量、氨基酸含量)存在差异,致使酶法交联后其性质变化程度不同。综上所述,酶法交联酪蛋白因其较高的热稳定性在食品工业中具有潜在的应用价值。

参考文献

- [1] Cui L, Fan X R, Wang P, *et al.* Casein and transglutaminase-mediated modification of wool surface[J]. *English Life Science*, 2011, 11(2): 201-206.
- [2] 甘伯中, 常海军, 余群力, 等. 牦牛曲拉干酪素脱色工艺优化[J]. *农业工程学报*, 2006, 22(10): 203-207.
- [3] Mao X Y, Cheng X, Wang X. Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effort of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis[J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(2): 484-490.
- [4] Wang P J, Liu H N, Wen P C, *et al.* The composition, size and hydration of yak casein micelles[J]. *International Dairy Journal*, 2013, 31(2): 107-110.
- [5] Nahid A A, Salma H A, ElShazali A M, *et al.* Effect of Transglutaminase Cross Linking on the Functional Properties as a Function of NaCl Concentration of Legumes Protein Isolate[J]. *International Journal of Biological and Life Sciences*, 2010, 6(1): 8-13.
- [6] Flanagan J, FitzGerald R J. Functional properties of *Bacillus* proteinase hydrolysates of sodium caseinate incubated with transglutaminase pre- and post-hydrolysis[J]. *International Dairy Journal*, 2003, 13(2-3): 135-143.
- [7] Elvan Ö. The use of transglutaminase in dairy products[J].

International Journal of Dairy Technology, 2006, 59(1): 1-7.

- [8] Babiker F E E, Khan M A S, Naotoshi M, *et al.* Polymerization of soy protein digests by microbial transglutaminase for improvement of the functional properties[J]. *Food Research International*, 1996, 29(7): 627-634.
- [9] Siu N C, Ma C Y, Mock W Y, *et al.* Functional Properties of Oat Globulin Modified by a Calcium-Independent Microbial Transglutaminase[J]. *Journal Agricultural and Food Chemical*, 2002, 50(9): 2666-2672.
- [10] O'Sullivan M M, Kelly A L, Fox P F. Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk[J]. *Dairy Research*, 2002, 69(3): 433-442.
- [11] Caterina D, Maria T G, Rocco R, *et al.* Spectrophotometric assay using o-phtaldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein[J]. *Food Chemistry*, 2002, 78(3): 363-368.
- [12] Tomotake H, Shimaoka I, Kayashita J, *et al.* Physicochemical and Functional Properties of Buckwheat Protein Product[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(7): 2125-2129.
- [13] Zheng H G, Yang X Q, Tang C H, *et al.* Preparation of soluble soybean protein aggregates(SSPA) from insoluble soybean protein concentrates(SPC) and its functional properties[J]. *Food Research International*, 2008, 41(2): 154-164.
- [14] Jiang S J, Zhao X H. Transglutaminase-induced cross-linking and glucosamine conjugation of casein and some functional properties of the modified product[J]. *International Dairy Journal*, 2011, 21(4): 198-205.
- [15] Christopher P W, Debra A C, Valentineval W, *et al.* Immobilization and Utilization of the Recombinant Fusion Proteins Trypsin-Streptavidin and Streptavidin-Transglutaminase for Modification of Whey Protein Isolate Functionality[J]. *Agric Food Chem*, 2002, 50(13): 3723-3730.
- [16] Ahn H J, Kim J H, Ng P K W, *et al.* Functional and Thermal Properties of Wheat, Barley, and Soy Flours and Their Blends Treated with a Microbial Transglutaminase[J]. *Journal of Food Science*, 2005, 70(6): 380-386.
- [17] Ionescu A, Aprodu I, Daraba A, *et al.* The effects of transglutaminase on the functional properties of the myofibrillar protein concentrate obtained from beef heart[J]. *Meat Science*, 2008, 79(2): 278-284.
- [18] Wang J S, Zhao M M, Yang X Q, *et al.* Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by transglutaminase cross-linking reaction[J]. *Food Hydrocolloids*, 2007, 21(2): 174-179.
- [19] Lorenzen P C. Effects of varying time/temperature-conditions of preheating and enzymatic cross-linking on techno-functional properties of reconstituted dairy ingredients[J]. *Food Research International*, 2007, 40(6): 700-708.
- [20] Yildirim M, Hettiarachchy N S, Kalapathy U. Properties of Biopolymers from Cross-linking Whey Protein Isolate and Soybean 11S Globulin[J]. *Journal of Food Science*, 1996, 61(6): 1129-1132.