

# 预热处理对谷氨酰胺转氨酶催化羊乳热稳定性的影响

陈思<sup>1</sup>, 张富新<sup>1\*</sup>, 王毕妮<sup>1</sup>, 邵玉宇<sup>1</sup>, 曹斌云<sup>2</sup>

1(陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 陕西 西安, 710119) 2(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌, 712100)

**摘 要** 研究了羊乳经预热处理后谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, TGase)诱导催化羊乳热稳定性的影响。结果表明, 随着预热处理温度的提高和处理时间的延长, 羊乳热凝固时间(heat coagulation time, HCT)显著增加( $P < 0.05$ ); 羊乳经 60~70 °C/60 min 或 80~90 °C/30 min 预热处理可使羊乳中天然 TGase 抑制剂完全灭活; 预热处理可使羊乳中乳清蛋白变性, 且随着处理温度的升高, 乳清蛋白变性程度增大, 这有利于 TGase 对乳蛋白的交联; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)进一步证实了羊乳中存在天然 TGase 抑制剂, 预热处理可使羊乳中  $\kappa$ -酪蛋白在 TGase 作用下交联度提高, 防止  $\kappa$ -酪蛋白从酪蛋白胶束中解离, 进一步提高羊乳的热稳定性。

**关键词** 羊乳; 预热处理; 谷氨酰胺转氨酶(TGase); 热稳定性

羊乳富含蛋白质、脂肪、乳糖、矿物质、维生素以及多种生物活性物质, 营养组成更接近母乳, 是一种易被人体消化吸收的天然营养食品。由于羊乳的蛋白质组成与牛乳有较大差别, 在加工过程中存在一定难度, 尤其是在超高温瞬时灭菌(ultra-high temperature instantaneous sterilization, UHT)处理过程中, 蛋白质稳定性差, 易出现蛋白质沉淀现象<sup>[1]</sup>。为了提高羊乳的热稳定性, 通常采用添加稳定性盐<sup>[2]</sup>、调节蛋白质组成<sup>[3]</sup>等方法进行处理, 这些方法虽然对羊乳热稳定性有明显改善, 但也会存在一定的安全隐患。随着生物技术的发展, 人们发现谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, TGase)处理也可有效提高羊乳的热稳定性。

TGase 是一种能催化蛋白质间酰基转移反应的酶, 在蛋白质间形成共价键, 促进蛋白质的交联<sup>[4]</sup>, 可改善蛋白质食品的保水性、黏弹性、稳定性等功能特性, 已在肉制品、乳制品、水产品、大豆制品等富含蛋白食品中广泛应用<sup>[5-6]</sup>。乳中蛋白是 TGase 的良好底物<sup>[7]</sup>, 通过 TGase 交联可有效改善乳制品的热稳定性、凝胶化、持水性、黏度、乳化性等功能性<sup>[8]</sup>。TGase 交联作用受乳成分的影响较大, 乳中的蛋白质

主要由酪蛋白和乳清蛋白组成, 酪蛋白由于其开放结构, 易被 TGase 交联, 而乳清蛋白的球状结构不易被交联, 但对乳清蛋白适当的变性处理, 可显著提高 TGase 的交联作用<sup>[9]</sup>。同时乳中还存在天然 TGase 抑制剂<sup>[10-11]</sup>, 能够抑制 TGase 的活性, 这种抑制剂对热敏感, 通过热处理可有效清除。热处理是目前乳制品加工的必经过程, 不但可杀灭食品中有害微生物, 保障食品安全, 同时可使乳中乳清蛋白变性, 灭活乳中的天然抑制剂。因此, 本文通过研究羊乳的预热处理促进 TGase 对羊乳蛋白的交联, 提高羊乳的热稳定性, 进而为液态羊乳产品的开发提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

羊乳, 西北农林科技大学试验农场新鲜羊乳; 谷氨酰胺转氨酶(活性 100 u/g), 江苏一鸣生物科技有限公司; N $\alpha$ -CBZ-Gln-Gly 和 L-谷氨酸- $\gamma$ -单羟氧肟酸, 美国 Sigma 公司; SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒, Solarbio 公司。

### 1.2 仪器与设备

HH-S4 型电热恒温水浴锅, 北京科伟永兴仪器有限公司; Z206A 台式离心机, 西安中团生物科技有限公司; BI-90Plus 激光粒度分析仪, 美国布鲁克海文仪器公司; EYEL4 真空冷冻干燥机, 上海爱朗仪器有限公司; MULTISKAN GO 全波长酶标仪, 美国热电公司; Power Pac<sup>TM</sup> 基础电泳仪电源和 Mini-Protean<sup>®</sup> Tetra Cell 电泳槽, 美国 BIO-RAD 公司; ChemiDoc-It<sup>®</sup> 510

第一作者: 硕士研究生(张富新教授为通讯作者, E-mail: fuxinzh@snnu.edu.cn)。

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(GK201806008, GK201703063, GK201603097); 陕西省科技成果转化专项资金(2016KTCG01-12); 陕西省科技计划项目(2012K02-06, 2016NY-207)

收稿日期: 2018-06-19, 改回日期: 2018-08-21

化学发光成像仪,美国 UVP 公司。

### 1.3 羊乳热稳定性的测定

羊乳热稳定性的测定采用 Fox<sup>[12]</sup> 毛细管法,用热凝固时间 (heat coagulation time, HCT) 表示。将羊乳在  $3\,500 \times g$  下离心 20 min 去除脂肪。取 60  $\mu\text{L}$  的样品密封于玻璃毛细管中,浸入 140  $^{\circ}\text{C}$  恒温油浴中加热,并不时旋转玻璃毛细管,记录从开始加热到羊乳沉淀出现挂壁现象所需的时间,即为羊乳的热凝固时间。

### 1.4 TGase 活性的测定

TGase 活性的测定采用 Crossowicz 比色法<sup>[13]</sup>。以  $\text{N}\alpha\text{-CBZ-Gln-Gly}$  为作用底物, $L$ -谷氨酸- $\gamma$ -单羟氧肟酸绘制标准曲线( $y = 0.061\,3x + 0.046\,8$ ,  $R^2 = 0.999\,2$ )。TGase 酶活定义为 37  $^{\circ}\text{C}$  时每分钟催化生产 1  $\mu\text{mol}$  的  $L$ -谷氨酸- $\gamma$ -单羟氧肟酸所需的酶量。

将预热处理的羊乳用 3 mol/L HCl 调 pH 至 4.2<sup>[14]</sup>,在  $15\,000 \times g$  下离心 15 min,去除沉淀的酪蛋白,将上清液用 10 kDa 滤膜 (Amicon) 超滤后,除去乳清蛋白<sup>[15]</sup>,得到无乳蛋白的上清液,用于 TGase 活性的测定。

将试剂 A (称 100 mg  $\text{N}\alpha\text{-CBZ-Gln-Gly}$  溶于 2 mL 0.2 mol/L NaOH 溶液中,加入 2 mL 0.1 mol/L 盐酸羟胺、2 mL 0.01 mol/L 还原型谷胱甘肽、4 mL 0.2 mol/L pH 6.0 Tris-HCl 缓冲液)、试剂 B (3 mol/L HCl、12% 三氯乙酸、5%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  按 1:1:1 体积比混合) 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下保温 15 min。取 0.4 mL 无乳蛋白上清液,配制成 0.01 g/mL 的 TGase 液,添加 1 mL 试剂 A 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下反应 10 min,然后加 0.4 mL 试剂 B 终止反应 5 min,  $4\,000 \times g$  离心 5 min,取上清液,在 525 nm 处比色,测定吸光值。用 TGase 酶活标准曲线计算 TGase 活性及残留酶活百分率。

$$U = \frac{(A - 0.046\,8) \times N}{0.061\,3 \times 10 \times V} \quad (1)$$

式中:  $U$ , 酶活,  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ;  $A$ , 525 nm 处的吸光度值;  $N$ , 酶稀释倍数; 10, 反应时间, min;  $V$ , 参加反应的酶体积, mL。

$$\text{残留酶活百分率} / \% = \frac{U_0}{U_i} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $U_0$ , 预处理前的 TGase 酶活,  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ;  $U_i$ , 预处理后的 TGase 酶活,  $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。

### 1.5 酪蛋白胶束粒径的测定

将处理后的乳样在  $3\,500 \times g$  下离心去除上层脂肪,取 10 mL 脱脂乳,用去离子水进行 1:10 稀释,用 BI-90Plus 激光粒度分析仪在 25  $^{\circ}\text{C}$  下测定乳样中的

胶束粒径。仪器参数设置为:分散介质:水;黏度:0.890 mPa $\cdot$ s;折光系数:1.330。

### 1.6 乳清蛋白变性率的测定

参照赵丽丽<sup>[16]</sup>的方法,将预热处理的乳样用 1 mol/L HCl 调整 pH 至 4.2,在室温下静置 10 min,然后在  $15\,000 \times g$  下离心 15 min 去除酪蛋白,上清液为无酪蛋白液。在无酪蛋白液中加入 15% 的三氯乙酸(质量浓度),使三氯乙酸最终浓度为 12%,在  $3\,500 \times g$  下离心使其乳清蛋白沉淀,上清液为非蛋白氮液。用自动凯氏定氮仪分别测定处理后的非酪蛋白氮(NCN)和非蛋白氮(NPN)的含量,然后计算乳清蛋白氮(WPN)和乳清蛋白变性率。

$$\text{WPN} = \text{NCN} - \text{NPN} \quad (3)$$

$$\text{乳清蛋白变性率} / \% = \frac{\text{WPN}_{\text{处理前}} - \text{WPN}_{\text{处理后}}}{\text{WPN}_{\text{处理前}}} \times 100 \quad (4)$$

### 1.7 SDS-PAGE

参照 LAEMMLI<sup>[17]</sup>的方法,通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析羊乳蛋白质的交联程度。将羊乳样品用双蒸水稀释 15 倍,取 1 份上样缓冲液与 3 份样品稀释液混合均匀,在沸水浴中加热 3~5 min 使蛋白质变性,在  $12\,000 \times g$  下离心 5 min,取上层溶液为上样液。配制 13.5% 的分离胶 (2.25 mL 30% 丙烯酰胺(质量浓度)、1.25 mL pH 8.8 三(羟甲基)氨基甲烷(tris-HCl)、50  $\mu\text{L}$  10% 十二烷基硫酸钠(SDS)(质量浓度)、50  $\mu\text{L}$  10% 过硫酸铵(APS)(质量浓度)、5  $\mu\text{L}$  四甲基乙二胺(TEMED)和 1.4 mL 双蒸水)和 3.75% 浓缩胶 (0.313 mL 30% 丙烯酰胺(质量浓度)、0.313 mL pH 6.8 tris-HCl、25  $\mu\text{L}$  10% SDS(质量浓度)、37.5  $\mu\text{L}$  10% APS(质量浓度)、3.75  $\mu\text{L}$  TEMED 和 1.813 mL 双蒸水),完成制胶阶段。在电泳槽内加入电极缓冲液 (3.03 g tris、18.7 g 甘氨酸、1 g SDS 定容至 1 L)。取 7  $\mu\text{L}$  上样液添加到上样孔中进行电泳,开始电泳电压为 75 V,当溴酚蓝进入分离胶后将电压调至 200 V,电泳 40 min。将凝胶从玻璃板取下,在水平摇床中用染色液 (1 g 考马斯亮蓝 R-250、450 mL 甲醇、100 mL 冰乙酸定容至 1 L) 染色 2 h。染色后的凝胶用脱色液 (甲醇:冰乙酸:双蒸水的体积比为 1:1:8) 摇床脱色,至蛋白质条带清晰为止,最后用 Chemi Doc-It 化学成像系统扫描进行灰度分析。

### 1.8 数据处理方法

采用 Excel 2016 对试验数据进行整理和图表编辑;采用 DPS 9.50 统计分析软件对试验数据进行显

著性分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 预热处理对羊乳热稳定性的影响

将羊乳在 60、70、80、90 °C 下分别处理 10 ~ 60 min, 添加 TGase 使羊乳中 TGase 浓度达到 3 u/g 蛋白质, 在 40 °C 保温 2 h, 测定其热凝固时间 (HCT), 结果见图 1。

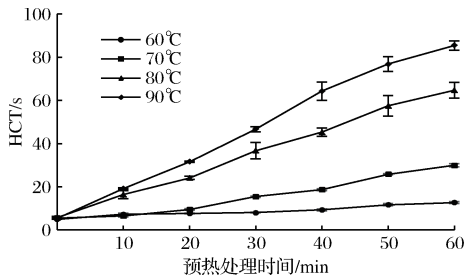


图1 预热处理对羊乳 HCT 的影响

Fig.1 Effect of preheat treatment on HCT of goat milk

由图 1 可知, 用 TGase 催化羊乳蛋白交联提高其热稳定性与预热处理条件密切相关, 随着预热处理温度的提高和处理时间的延长, 羊乳 HCT 值逐渐增加, 热稳定性提高。但预热处理条件对羊乳的热稳定性影响较大, 在 60 ~ 70 °C 预热处理时, 羊乳的 HCT 缓慢上升; 而当预热处理温度高于 80 °C 时, 羊乳的 HCT 显著提高, 表明预热处理可有效地提高羊乳的热稳定性。大量研究表明, 乳的热稳定性与 TGase 对乳蛋白的交联度有关, 乳蛋白交联程度越大, 乳的热稳定性越高<sup>[18]</sup>。但乳蛋白交联程度与乳蛋白存在状态有关, 尤其是乳中天然存在的球状乳清蛋白, 通常不易被 TGase 交联<sup>[7]</sup>。同时乳中存在天然的 TGase 抑制剂<sup>[19-20]</sup>, 影响 TGase 对乳蛋白的交联效果, 预热处理提高羊乳的热稳定性可能与 TGase 抑制剂和乳清蛋白变性有关。

### 2.2 预热处理对羊乳中 TGase 抑制剂的影响

将羊乳在 60、70、80、90 °C 分别处理 5、10、20、30、60 min 后, 在羊乳中添加 0.01 g/mL 的 TGase, 在 37 °C 下保温 15 min, 测定羊乳中 TGase 的活性, 计算残留酶活百分率, 并以未经预热处理的羊乳为对照, 结果如图 2。

由图 2 可知, 当羊乳未经预热处理时, 羊乳中残留 TGase 的活性仅为所添加 TGase 活性的 37.4%, 表明羊乳中存在天然的 TGase 抑制剂, 抑制 TGase 对乳蛋白的交联。然而羊乳经预热处理后, 残留的酶活性

显著提高, 当羊乳在 60、70、80、90 °C 下预热处理 5 min 后, 羊乳中残留酶活百分率分别达到 56.55%、61.27%、78.35%、83.75%, 与未经预热处理的对照组相比, 残留 TGase 活性分别提高了 19.15%、23.87%、40.95%、46.35%, 表明羊乳预热处理可有效灭活羊乳中 TGase 抑制剂。同时可以看出, 羊乳中 TGase 活性与预热处理温度和时间有关, 当羊乳在 80 ~ 90 °C 处理 30 min 时, 羊乳中残留 TGase 活性几乎达到 100%, 而在 60 ~ 70 °C 预热处理 60 min 时, 羊乳中残留 TGase 活性才能达到 100%, 这表明羊乳在 80 ~ 90 °C 处理 30 min 或在 60 ~ 70 °C 处理 60 min 才完全使羊乳中 TGase 抑制剂失活。DE JONG<sup>[10]</sup> 报道, 牛乳中 TGase 抑制剂对热处理敏感, 在 80 °C 以上热处理即可使 TGase 抑制剂灭活, 这与本研究结果一致。

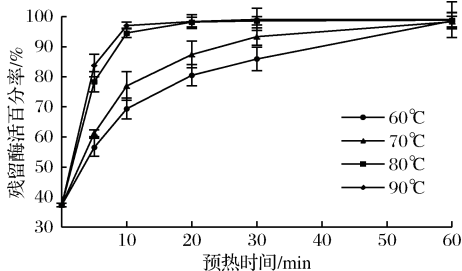


图2 预热处理对羊乳中 TGase 残留酶活的影响

Fig.2 Effect of preheat treatment on residual TGase activity in goat milk

### 2.3 预热处理对羊乳乳清蛋白变性率的影响

将羊乳在 60、70、80、90 °C 下分别预热处理 30 min, 测定其乳清蛋白变性率, 结果见图 3。

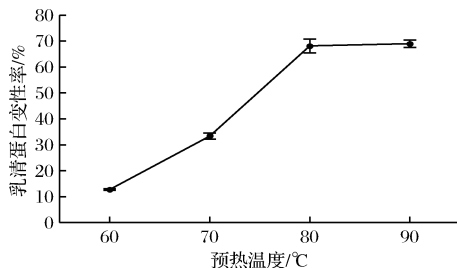


图3 预热处理对羊乳乳清蛋白变性率的影响

Fig.3 Effect of preheat on the denaturation of whey protein in goat milk

由图 3 可知, 预热处理温度对羊乳乳清蛋白变性率有显著的影响, 随着预热温度的升高, 乳清蛋白变性程度显著提高 ( $P < 0.05$ )。羊乳经 60 °C 预热处理后有 12.77% 的乳清蛋白变性, 而在 80 °C 预热处理后有 68.1% 的乳清蛋白变性, 80 ~ 90 °C 处理乳清蛋

白变性程度变化不大( $P > 0.05$ )。乳中的乳清蛋白是一种热敏性蛋白质,在  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  以上热处理时极易变性,同时变性的乳清蛋白会与酪蛋白胶束结合,加速乳清蛋白的变性,这种变性的乳清蛋白更有利于 TGase 的交联<sup>[21]</sup>,提高羊乳的热稳定性。

## 2.4 预处理对羊乳酪蛋白胶束粒径的影响

将羊乳分别在  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  下预处理 30 min 后立即冷却至  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,添加 TGase 使其浓度达到  $3\text{ u/g}$  蛋白质,在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保温 2 h,测定羊乳中酪蛋白胶束粒径,结果如图 4 所示。

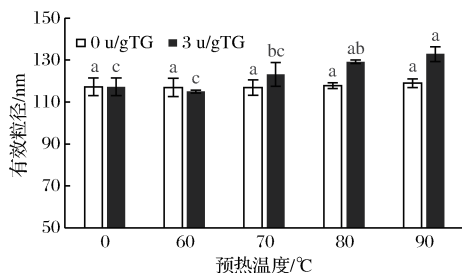


图4 预处理对羊乳酪蛋白胶束粒径的影响

Fig. 4 Effect of preheat on the size of casein micelles of goat milk

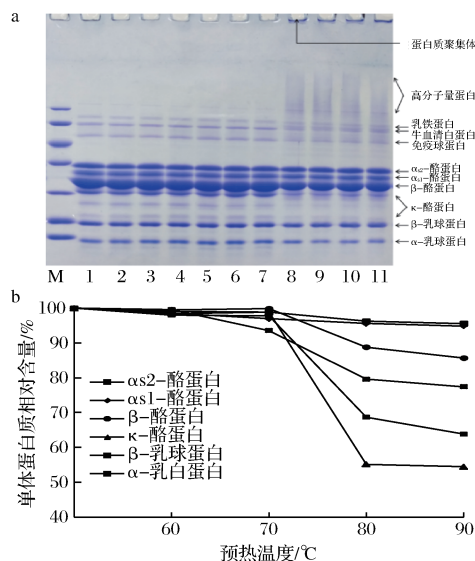
由图 4 可以看出,未经 TGase 处理的羊乳酪蛋白胶束平均为  $117.6\text{ nm}$ ,且不受预处理的影响( $P > 0.05$ ),但羊乳经  $60\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$  预处理后,TGase 对羊乳中酪蛋白胶束粒径影响较大,且随着预处理温度的升高,酪蛋白胶束粒径逐渐增大( $P < 0.05$ ),MARTIN<sup>[22]</sup>研究表明,乳中酪蛋白在 TGase 交联时,仅发生分子内交联,酪蛋白胶束粒径无明显变化,而羊乳经预处理时,由于乳清蛋白变性与酪蛋白胶束结合会形成较大的胶束<sup>[23]</sup>,使 TGase 交联后酪蛋白粒径增大。

## 2.5 预处理对羊乳蛋白质交联的影响

将羊乳在  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  下分别预处理 5 min 和 30 min,添加 TGase 使其浓度为  $3\text{ u/g}$  蛋白质, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温 2 h,用还原性 SDS-PAGE 电泳分析预处理对 TGase 催化羊乳蛋白质交联的影响。

乳的热稳定性与乳中酪蛋白胶束状态有关,酪蛋白胶束是由  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白、 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白构成的复合物,其中  $\kappa$ -酪蛋白位于胶束表面,对胶束稳定性起关键作用<sup>[24]</sup>,当乳经热处理时,位于表面的  $\kappa$ -酪蛋白易解离,使乳的稳定性降低<sup>[21]</sup>,但当酪蛋白胶束经 TGase 交联后,可使  $\kappa$ -酪蛋白胶束在受热时稳定,不易从胶束表面脱离,从而提高乳的热稳定性。SDS-PAGE 电泳是将交联后的酪蛋白胶束解离

成单体酪蛋白,反映乳蛋白的交联程度。羊乳蛋白质在 TGase 作用下的交联情况见图 5。



a-SDS-PAGE 电泳图;b-预处理温度对单体蛋白质相对含量的影响

图5 预处理对 TGase 交联羊乳蛋白质的影响

Fig. 5 Effect of preheat treatment on cross-linked goat milk protein with TGase

注:M 为标准分子量,范围是  $14.4\sim 116\text{ kDa}$ ;1 为未经预处理和未经 TGase 处理的脱脂羊乳;2 为未预处理,但经过  $3\text{ u/g}$  TGase 在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  下处理 2 h 的羊乳;3 为未经 TGase 处理,但经过  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 min 预处理的羊乳;4、5 分别为  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  预热 5、30 min,  $3\text{ u/g}$  TGase 在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  下处理 2 h 的羊乳;6、7 分别为  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  预热 5、30 min,  $3\text{ u/g}$  TGase 在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  下处理 2 h 的羊乳;8、9 分别为  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  预热 5、30 min,  $3\text{ u/g}$  TGase 在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  下处理 2 h 的羊乳;10、11 分别为  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  预热 5、30 min,  $3\text{ u/g}$  TGase 在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  下处理 2 h 的羊乳。

由图 5 可以看出,羊乳中的 4 种酪蛋白( $\alpha_{s1}$ -酪蛋白、 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白)和 2 种乳清蛋白( $\alpha$ -乳白蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白)在 SDS-PAGE 电泳中,可明显分离,形成清晰的条带。同时可以看出,经预处理后,TGase 交联形成的高分子质量蛋白条带。未经预处理和未经 TGase 处理的羊乳(条带 1)与未经预处理、但经 TGase 处理的羊乳(条带 2)相比,其 4 种酪蛋白和 2 种乳清蛋白条带的色度无明显变化,也未见高分子质量蛋白条带的形成,同时未经 TGase 处理、但经预处理的羊乳(条带 3)同样没有高分子质量蛋白条带的形成,这进一步证实羊乳中存在天然的 TGase 抑制剂,抑制 TGase 对乳蛋白的交联。但经预热和 TGase 同时处理的羊乳中蛋白质组成和高分子质量蛋白条带有一定变化,表明预处理可促进乳蛋白的交联。

当羊乳经预热处理后, TGase 对羊乳中蛋白的交联程度有一定的差别, 尤其是当羊乳经 80 ℃ 以上预热处理后(条带 8、9、10、11),  $\kappa$ -酪蛋白条带色度明显降低, 同时发现形成的高分子质量条带明显增多, 而  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白、 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白和  $\beta$ -酪蛋白条带色度变化不大。同时发现乳清蛋白中的  $\alpha$ -乳白蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白的色度有不同程度的降低, 经条带灰度分析, 羊乳经 80 ℃ 预热处理 30 min 时,  $\kappa$ -酪蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白分别降低 44.86%、31.33% 和 21.39%, 这表明 TGase 对羊乳中蛋白交联是有选择性的, 主要交联羊乳酪蛋白中的  $\kappa$ -酪蛋白和乳清蛋白中的  $\alpha$ -乳白蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白。RODRIGUEZ-NOGALES<sup>[25]</sup> 研究表明, 乳中酪蛋白对 TGase 交联敏感性不同, 其中  $\kappa$ -酪蛋白处于酪蛋白胶束表面, 易被 TGase 交联, 而位于酪蛋白胶束内部的  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白、 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白和  $\beta$ -酪蛋白交联程度较低, 这与本研究结果一致。关于乳清蛋白, 由于其球状结构, 通常不易被 TGase 交联, 但经热处理时乳清蛋白变性, TGase 可使其交联<sup>[26]</sup>。RODRIGUEZNOGALES<sup>[9]</sup> 研究表明, 当乳经热处理后, 变性的  $\alpha$ -乳白蛋白会与  $\beta$ -乳球蛋白形成复合物, 然后再与  $\kappa$ -酪蛋白形成聚合物, TGase 作用于  $\kappa$ -酪蛋白时, 同时也稳定了酪蛋白胶束, 提高羊乳的热稳定性。

### 3 结论

羊乳经预热处理后, 用 TGase 对乳蛋白交联, 可显著提高羊乳的热稳定性, 羊乳中存在天然的 TGase 抑制剂, 在 60 ~ 70 ℃ 预热处理 60 min 或 80 ~ 90 ℃ 预热处理 30 min 可使羊乳中 TGase 抑制剂完全失活, 同时, 预热处理可使羊乳中乳清蛋白变性, 促使乳蛋白的交联, 提高羊乳的热稳定性。SDS-PAGE 电泳结果显示, 预热处理可促进 TGase 与羊乳中  $\kappa$ -酪蛋白的交联, 使  $\kappa$ -酪蛋白在热处理时不易从酪蛋白胶束表面解离, 从而提高羊乳的热稳定性。

### 参 考 文 献

- [1] RAYNAL-LJUTOVAC K, PARK Y W, GAUCHERON F, et al. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk[J]. Small Ruminant Research, 2007, 68(1): 207–220.
- [2] WANG C, ZHU Y, WANG J. Comparative study on the heat stability of goat milk and cow milk[J]. Indian Journal of Animal Research, 2015, 50(4): 610–613.
- [3] 乔星, 张富新, 乌素, 等. 羊奶热稳定因素的研究[J].

- 农产品加工(学刊), 2012(1): 46–48.
- [4] KASHIWAGI T, YOKOYAMA K, ISHIKAWA K, et al. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptococcus mobaraense*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(46): 44 252–44 260.
- [5] 司晶星, 张瑾, 翟付群. 谷氨酰胺转氨酶生产及研究进展[J]. 商业文化(下半月), 2009(6): 229.
- [6] 寇明钰, 赵国华, 阚健全. 谷氨酰胺转氨酶及其在食品工业中的作用[J]. 中国食品添加剂, 2004(5): 81–84, 88.
- [7] O'SULLIVAN M M, LORENZEN P C, O'CONNELL J E, et al. Short communication: influence of transglutaminase on the heat stability of milk[J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84(6): 1 331–1 334.
- [8] ROMEIH E, WALKER G. Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 62: 133–140.
- [9] RODRIGUEZNOGALES J M. Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cows' milk: A statistical approach[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(1): 26–32.
- [10] DE JONG G A H, WIJNGAARDS G, KOPPELMAN S J. Transglutaminase inhibitor from milk[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(3): 820–825.
- [11] BÖNISCH M P, TOLKACH A, KUŁOZIK U. Inactivation of an indigenous transglutaminase inhibitor in milk serum by means of UHT-treatment and membrane separation techniques[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(6): 669–678.
- [12] O'CONNELL J E, FOX P F. Heat-induced coagulation of milk[M]. Boston, MA: Springer US, 2003: 879–945.
- [13] GROSSOWICZ N, WAINFAN E, BOREK E, et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine[J]. Journal of Biological Chemistry, 1950, 187(1): 111–25.
- [14] ANEMA S G, STANLEY D J. Heat-induced, pH-dependent behaviour of protein in caprine milk[J]. International Dairy Journal, 1998, 8(10): 917–923.
- [15] DE JONG G A H, WIJNGAARDS G, KOPPELMAN AND S J. Transglutaminase inhibitor from milk[J]. Food Chemistry and Toxicology, 2003, 68(3): 820–825.
- [16] 赵丽丽. 羊乳热稳定性及凝胶特性的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [17] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5 259): 680–685.

- [18] O'SULLIVAN M M, KELLY A L, FOX P F. Effect of transglutaminase on the heat stability of milk: A possible mechanism[J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85(1): 1–7.
- [19] AALTONEN T, HUUMONEN I, MYLLÄRINEN P. Controlled transglutaminase treatment in Edam cheese-making[J]. International Dairy Journal, 2014, 38(2): 179–182.
- [20] IKURA K, MINAMI K, OTOMO C, et al. High molecular weight transglutaminase inhibitor produced by a microorganism (*Streptomyces lavendulae* Y-200) [J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2000, 64(1): 116–124.
- [21] RAJAKARI K. Structure modification of sour milk products by transglutaminase[D]. Helsinki: Aalto University, 2015.
- [22] MP B N, M H, K W, et al. Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties [J]. International Dairy Journal, 2007, 17(11): 1 360–1 371.
- [23] TATERKA H, CASTILLO M. The effect of whey protein denaturation on light backscatter and particle size of the casein micelle as a function of pH and heat-treatment temperature[J]. International Dairy Journal, 2015, 48(3): 53–59.
- [24] WALSTRA P. On the stability of casein micelles 1 [J]. Journal of Dairy Science, 1990, 73(8): 1 965–1 979.
- [25] RODRIGUEZ-NOGALES J M. Effect of preheat treatment on the transglutaminase-catalyzed cross-linking of goat milk proteins[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(2): 430–437.
- [26] SHARMA R, LORENZEN P C, QVIST K B. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of epsilon-(gamma-glutamyl) lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking [J]. International Dairy Journal, 2001, 11(10): 785–793.

## Effect of heat pretreatment on thermostability of goat milk catalyzed by transglutaminase

CHEN Si<sup>1</sup>, ZHANG Fuxin<sup>1\*</sup>, WANG Bini<sup>1</sup>, SHAO Yuyu<sup>1</sup>, CAO binyun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

<sup>2</sup>(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

**ABSTRACT** The effect of transglutaminase (TGase) on the thermostability of goat milk after heat pretreatment was studied. The results showed that the heat coagulation time (HCT) of goat milk significantly increased by increasing temperature and time ( $P < 0.05$ ). Pretreatment of goat milk at 60-70°C for 60 min or at 80-90°C for 30 min could completely inactivate the natural TGase inhibitor in the goat milk and could denature the milk protein. Additionally, the higher temperature the more milk protein was denatured, which was benefit for the cross-linking of milk protein by TGase. The existence of natural TGase inhibitor in the goat milk was further confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Heat pretreatment could increase the cross-linking degree of  $\kappa$ -casein mediated by TGase, which also prevented the dissociation of  $\kappa$ -casein from casein micelles and further improved the thermostability of the goat milk.

**Key words** goat milk; preheat treatment; transglutaminase (TGase); heat stability