

# 谷氨酰胺转胺酶作用的酸奶超微结构电镜观察

马 微<sup>1</sup>, 杨会琴<sup>2</sup>, 王海波<sup>1</sup>, 张兰威<sup>3,\*</sup>

(1.东宁出入境检验检疫局, 黑龙江 东宁 157200; 2.河北经贸大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050061; 3.哈尔滨工业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:** 本实验主要利用扫描电镜对加酶酸奶的超微结构进行了观察和分析, 并与不加酶酸奶的结构进行了对比, 探索了该酶的催化特性, 以及与酸奶质构的相关性。

**关键词:** 谷氨酰胺转胺酶; 酸奶; 超微结构; 电镜

## Investigation by EM on the Ultrastructure of Yoghurt with Transglutaminase Added

MA Wei<sup>1</sup>, YANG Hui-qin<sup>2</sup>, WANG Hai-bo<sup>1</sup>, ZHANG Lan-wei<sup>3,\*</sup>

(1.Dongning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dongning 157200, China; 2.College of Life Sciences and Technology, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China; 3.College of Food, Harbin Institute of Technology, Harbin 150030, China)

**Abstract :** This paper mainly studied the ultrastructure of yoghurt with transglutaminase added by electron microscope(EM). In comparison with yoghurt without transglutaminase, the effects of enzymatic cross-linking of milk proteins and the relativity of yoghurt structure and quality were investigated.

**Key words:** transglutaminase; yoghurt; ultrastructure; electron microscope(EM)

中图分类号: TS201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0104-04

收稿日期: 2005-01-14

\* 通讯作者

作者简介: 马微(1978-), 女, 硕士, 研究方向为发酵食品。

- a review[J]. *J Dairy Sci*, 1973, 56: 531-543.
- [3] Pieter W. Dairy chemistry and physics[M]. New York: A Wiley-Interscience Publication, 1984.
- [4] Moldoveanu Z, Tenovuo J, Mestecky J, et al. Human milk peroxidase is derived from milk leukocytes [J]. *Biochim et Bioph Acta*, 1982, 718: 103-108.
- [5] Langbakk B, Flatmark T. Lactoperoxidase from human colostrum[J]. *Biochem J*, 1989, 259: 627-631.
- [6] Oram J D, Reiter B. The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide[J]. *Biochem J*, 1966, 100: 382-388.
- [7] Hogg D M, Jago G R. The antibacterial action of lactoperoxidase[J]. *Biochem J*, 1970, 117: 779-790.
- [8] Bjoerck L, Claesson O. Correlation between concentration of hypothiocyanate and antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Escherichia coli*[J]. *J Dairy Sci*, 1980, 63: 919-922.
- [9] Kussendrager K. Lactoferrin, lactoperoxidase. Bio-active milk proteins [J]. *International Food Ingredients*, 1993, (6): 17-21.
- [10] Girgis E S, Ismail A A. Isolation, purification and characterisation of buffaloes' and cows' milk lactoperoxidase[J]. *Egyptian J of Food Sci*, 2001, 29(2): 215-232.
- [11] 卢蓉蓉, 许时婴, 王璋, 等. 预分离初乳中乳铁蛋白的超滤工艺[J]. *食品与生物技术*, 2002, 21(1): 67-70.
- [12] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] Chiu C K, Etzel M R. Fraction of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine whey using a cation exchange membrane[J]. *J Food Sci*, 1997, 62(5): 996-1000.
- [14] Yoshida S. Isolation of some minor milk proteins, distributes in acid whey from approximately 100000 to 250000 Daltons of particle size [J]. *J Dairy Sci*, 1988, 71(1): 1-9.
- [15] Dubois E. Process for separate from whey or from milk proteins of high molecular mass such as immunoglobulins or lactoferrin[P]. 1988, FR 2605322.
- [16] Sato K. Process for the production of biologically active substances from milk and related raw materials[P]. 1993, EP 0556083.
- [17] Nuyens. Isolation of lactoferrin from milk[P]. 1998, US 5,849,885
- [18] 王璋. 食品酶学[M]. 北京: 轻工业出版社, 1990. 238-240.
- [19] 王璋, 许时婴, 汤坚. 食品化学[M]. 北京: 轻工业出版社, 1999. 200-208.
- [20] Yamamoto H Y, Steinberg M P, Nelson A I. Kinetic studies on the heat inactivation of peroxidase in sweet corn[J]. *J of Food Sci*, 1961, 27(2): 113-119.

谷氨酰胺转氨酶是一种催化酰基转移反应的转移酶，它可使蛋白分子间和分子内产生共价交联反应，从而可进一步改善蛋白质的弹性、发泡性、溶解性、乳化性、持水性及乳化稳定性等功能特性。乳中的酪蛋白、乳清蛋白、乳球蛋白等都是谷氨酰胺转氨酶作用的良好底物，所以将该酶应用于酸奶的加工中具有很高的应用价值。

尽管该酶具有如此的催化特性，人们将其应用到肉制品，水产品的报道很多，而将谷氨酰胺转氨酶应用到乳品中，国外于二十世纪90年代才刚刚起步，目前仍有许多未明之处需要进一步研究探讨，特别是在酸奶加工的应用研究(加酶酸奶微观结构与它的粘度，持水性等宏观物理性质的关系)在国内更是显见报道。因此，本实验主要利用电子显微镜对谷氨酰胺转氨酶作用的酸奶超微结构进行观察和分析，进一步探索了该酶的催化特性以及加酶量对酸奶质构的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

保加利亚乳杆菌 嗜热链球菌 东北农业大学保藏菌种；脱脂奶粉 新西兰乳品原料(中国)有限公司；新鲜全脂牛乳 哈尔滨市售；谷氨酰胺转氨酶(TG-K) 日本味之素公司；戊二醛、乙酸异戊酯、乙醇、液氮 均为分析纯。

1.2 仪器设备

DHP-9272 型电热恒温培养箱 上海一恒科技有限公司；JFC-1600 离子溅射仪，JSM-5610LV 扫描电镜 日本 JSM 公司；HCP-2 CO<sub>2</sub> 超临界干燥仪 日本 HITACHI 公司；NDJ-1 型旋转式粘度计 上海昌吉地质仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 酸奶生产工艺流程<sup>[4]</sup>

原料乳→净化→标准化→预热加糖→均质→杀菌→冷却→添加发酵剂和酶→分装→保温发酵→冷却→后熟→冷藏

1.3.2 酸乳质构的测评方法

1.3.2.1 表观粘度(Apparent Viscosity, AV)<sup>[1]</sup>

调水温至4℃，将酸乳样品100ml 侵入夹层杯中，每30s 取值一次，测定2min。

1.3.2.2 持水力(Water-Holding Capacity, WHC)<sup>[1]</sup>

取酸乳样品20g，10℃下13500r/min 离心30min，倾去上清液体，然后将离心管倒置10min 后，立即称重。

$$\text{WHC}\% = \frac{\text{离心沉淀物重量}}{\text{样品重量}} \times 100\%$$

1.3.2.3 乳清析出量<sup>[1]</sup>

测定酸乳胶体脱水收缩作用的敏感性(Susceptibility to Syneresis, STS)：在6℃下，将100ml 的酸乳小心倾入到一个120 目不锈钢丝网筛中，2h 后收集沥出的乳清，用100ml 量筒量出体积。

$$\text{STS}\% = \frac{\text{乳清体积}}{\text{样品体积}} \times 100\%$$

1.3.2.4 感官评分(Sensitive Evaluation, SE)

对产品的色泽、风味、组织状态、口感、乳清析出量进行评价。以1 分制填写评分，0.9~1.0(很好)、0.7~0.8(较好)、0.5~0.6(一般)、0.3~0.4(较差)，0.1~0.2(很差)。

表1 感官评价标准  
Table 1 Sensitive evaluation standard

分值	色泽、风味、组织状态、口感、乳清析出量等评价
0.1~0.2	颜色发暗的乳白色、酸奶香味不纯正、组织状态很不好、口感极差、乳清大量析出
0.3~0.4	颜色发暗的白色、酸奶香味较纯正、组织状态差、口感差、乳清析出量较多
0.5~0.6	乳白色、酸奶香味纯正、组织状态较差、口感一般、乳清析出量较少
0.7~0.8	乳白色、酸奶香味纯正、组织状态较好、口感细腻、乳清析出量少
0.9~1.0	乳白色、酸奶香味纯正、组织状态好、凝乳结实、口感细腻滑润、几乎无乳清析出

1.3.3 电镜样品的制备过程<sup>[5]</sup>

取样→固定→清洗→冷冻割断→脱水→置换→超临界干燥→镀膜

1.3.4 操作要点

- (1)取样：用药勺挑取酸奶中心的凝块若干个；
- (2)固定：凝块放在2.5% 的戊二醛溶液中，4℃ 固定12h；
- (3)清洗：pH7.2 的磷酸缓冲液清洗三次，每次10 min；
- (4)冷冻割断：液氮迅速冷却样品后，用锤子轻轻锤击，使之自然断裂；
- (5)脱水：采用梯度脱水法(30%、50%、70%、90%、100%)乙醇分别脱水10 min；
- (6)置换：用乙酸异戊酯置换乙醇10 min；
- (7)超临界干燥：用CO<sub>2</sub> 超临界干燥仪干燥1.5h(32℃、73 个大气压)；
- (8)镀膜：采用离子溅射仪镀铂金膜。

2 结果与讨论

2.1 谷氨酰胺转氨酶的添加量对酸奶质构的影响

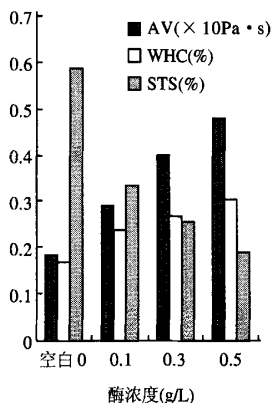


图1 不同添加量的酸奶各指标值

Fig.1 Various indexes of yoghurt with enzyme were added by different amounts

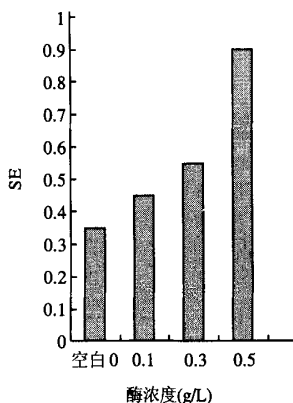


图2 不同添加量的酸奶感官评价

Fig.2 Sensitive evaluation of yoghurt with enzyme were added by different amounts

从图1可以看出,加酶酸奶无论从表观粘度值、乳清析出量,还是持水力上都比不加酶酸奶有了很大的提高,随着酶添加量的加大,酸奶的粘度值和持水力都得到了很大的提高,酶加量为0.5g/L的酸奶粘度值比不加酶的提高110%多,持水力也提高了80%多,胶体的脱水收缩作用的敏感性降低了70%多,大大的改善了酸奶的品质;同时,图2显示了不同添加量的酸奶感官评价变化情况,对酸奶的色泽、风味、组织状态、口感、乳清析出量进行评价,酶加量为0.5g/L的酸奶感官评价最高,得到大家的一致好评。

并且我们还可以了解到该酶在pH值4.0~6.0,温度为40~50℃的活力很高,催化作用效果很好,这个特性对于应用于酸奶的加工中非常适用。

导致这种结果的原因是在酸奶的生产中,乳酸菌在乳中生长繁殖,分解乳糖形成乳酸,乳的pH值随之下降,使乳中的酪蛋白在等电点4.6附近形成沉淀凝集

物,成为凝胶状态。这种凝胶体系是靠很弱的非共价键,主要是氢键来维持的,而乳清蛋白较难形成凝胶。乳清晰出的直接原因就是在生产过程中,乳中的蛋白质酪蛋白胶粒的网状结构被破坏,水合作用降低,使形成的凝胶体产生脱水收缩现象,即乳清析出。Ikura K等报道过乳中的 $\alpha$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白、 $\kappa$ -酪蛋白以及 $\alpha$ -乳清蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白等都是谷氨酰胺转氨酶的良好底物<sup>[2]</sup>。加入谷氨酰胺转氨酶后,可在乳蛋白质的分子内或分子间形成 $\epsilon$ -( $\gamma$ -谷氨酰基)赖氨酸异肽键,此键性质稳定,在加工处理过程中不会断裂。由于引入了新的共价键,蛋白质分子内或分子间网络结构增强,会使通常条件下不能形成凝胶的乳蛋白质形成凝胶,会使凝胶的特性发生很大作用,表现在凝胶强度提高,凝胶的水合作用增强,从而防止了乳清析出,改善了酸奶的品质。Chelorenzen等也报道了将该酶加入到凝固型酸奶中,大大提高的酸奶的粘度和保水性<sup>[3]</sup>。

酸奶的持水力也代表了酸奶凝胶结合水的能力。酸奶经谷氨酰胺转氨酶处理后,乳中蛋白质的网络结构增强,对水分的包容能力,束缚能力也增强,使酸奶中的水分不易析出,这样就增强了酸奶的持水力。

酸奶的表观粘度增大是由于经该酶的催化作用,使乳酪蛋白质交联成很大的聚合物,使蛋白质的分子量增加,从而增加蛋白质溶液的粘度。尽管乳清蛋白并不是谷氨酰胺转氨酶的良好底物,是由于它的天然状态具有紧密的球形空间四级结构,不易接近谷氨酰胺转氨酶的催化位点,但有报道说乳经过灭菌加热后,使乳清蛋白打开其空间四级结构,谷氨酰胺转氨酶对此类底物的活力将大为提高,也可以使乳清蛋白发生交聚作用,这可能也是表观粘度提高的原因之一。

## 2.2 谷氨酰胺转氨酶不同添加量的酸奶凝胶结构

将谷氨酰胺转氨酶TG-K各添加量的酸奶样品经处理后,放于扫描电镜下观察,探讨加酶量对酸奶质构的微观影响。结果如图3、图4、图5和图6所示(放大倍数为5000倍)。

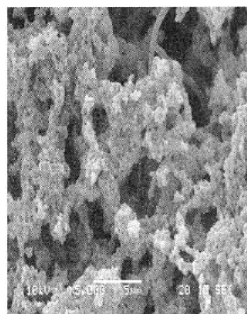


图3 不加酶的酸奶(空白样)

Fig.3 Not adding enzyme yoghurt (blank)

由图3可以看出,没有加酶的酸凝乳含有大孔径的纤维网络结构,这些网络结构是由变性的酪蛋白微粒以丛状、链状连接在一起形堆积成的。在这种网络结构中含有一些空隙,一些亲水性片段被限制在其中,这些微孔的直径一般为 $1\sim 30\mu\text{m}$ ,孔隙呈六棱形结构<sup>[5]</sup>;图3清楚的呈现出,保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌镶嵌在这种立体网络结构中。由这种微观的大孔径网络结构可以清晰的解释出未加酶酸奶在宏观上所表现出的物理性质(表观粘度和持水力)。

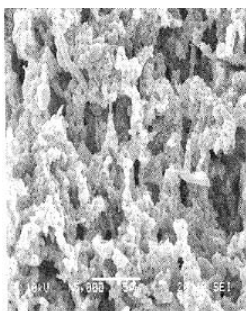


图4 添加量为0.1g/L的酸奶  
Fig.4 Yoghurt of adding 0.1g/L

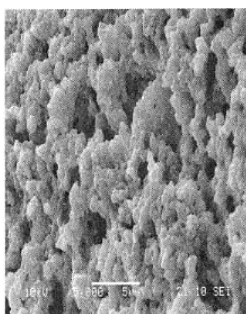


图5 添加量为0.3g/L的酸奶  
Fig.5 Yoghurt of adding 0.3g/L

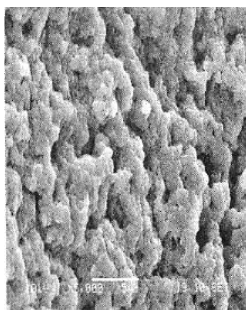


图6 添加量为0.5g/L的酸奶  
Fig.6 Yoghurt of adding 0.5g/L

从图4~6中可以清楚的看到,添加了谷氨酰胺转

胺酶的酸奶凝胶结构发生了很大的变化,那种大孔径的网络结构变得非常致密,孔隙随着酶添加量的加大也逐渐变得很小,其直径变为 $0.01\sim 1\mu\text{m}$ ,比未加酶酸奶的孔隙缩小了约100倍之多,网络结构变得非常致密。当TG-K的添加量为0.1g/L时,酸奶的网络结构变化较小,只是有一定程度的交联;而当TG-K的添加量为0.5g/L时,酸奶的超微结构变化非常大,呈片层状重叠,孔隙很小,结构变得非常致密。这与Chelorenzen等报道的结果完全相符<sup>[3]</sup>。

并且将图3、图4、图5和图6进行对比,就可以从微观上的解释出加酶酸奶的表观粘度值,和持水力比未加酶酸奶提高的原因。加酶后不但会使变性酪蛋白交联成更紧密的网络结构,而且还能将通常条件下不能形成凝胶的乳蛋白质形成凝胶,会使凝胶的特性发生很大作用,表现在凝胶强度提高,凝胶的水合作用增强。出现这种结果的原因是由于乳中的酪蛋白是谷氨酰胺转胺酶的良好底物,它含有大量的天冬酰胺残基和赖氨酸残基,为谷氨酰胺转胺酶的催化作用提供了基础;尽管谷氨酰胺转胺酶对乳清蛋白的催化特性要差的多,因为它的天然状态具有紧密的球形空间四级结构,不易接近谷氨酰胺转胺酶的催化位点,但是经过灭菌后一些乳清蛋白由于热变性,使乳清蛋白打开其空间四级结构,谷氨酰胺转胺酶对此类底物的活力将大为提高;乳白蛋白也可在该酶的直接作用下形成多聚体<sup>[7]</sup>。

### 3 结 论

谷氨酰胺转胺酶作用酸奶的超微结构是一种纤维网状结构,随着酶添加量的加大,这种网状结构变得越来越致密,孔隙越来越小,直径缩小了大概50多倍,并且酸奶的粘度和持水力等宏观物理性质也比不加酶酸奶大大提高了,它们之间呈正相关性,改善了酸奶的品质。

### 参考文献:

- [1] A N Hassan, J F Frank, K A Schmidt, et al. Texture property of yogurt made with encapsulated nonropy lactic culture[J]. Dairy sci, 1996, 79: 2098-2103.
- [2] Ikura K, Komitani T, Yoshikawa M. Crosslinking of casein component by transglutaminase[J]. Agric Bio Chem, 1980, 44(7): 1567-1573.
- [3] P Chelorenzen, H Neve, A Mautner, et al. Effect of enzymatic crosslinking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt[J]. Soceity of Dairy Technology, 2002, 55(3): 152-157.
- [4] 吴祖兴. 凝胶型酸奶的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(9): 62-65.
- [5] 励建荣, 苏虎. 酸奶凝胶的组织特性与物理特性[J]. 食品工业科技, 2004, 25(4): 157-160.
- [6] 马力, 张国栋, 谢林. 酸凝乳超微结构电镜观察[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 63-66.
- [7] P Chr Loren, H Neve. 11.9-enzymatic crosslinking of proteins in the manufacture of fermented milk[J]. International Dairy Federation, 2004, 16(7): 241-248.