

利用 TGase 结合微滤技术从乳清粉中分离纯化 CGMP 的研究

李博智, 阎亚丽, 陈庆森*

(天津市食品生物技术重点实验室, 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

摘 要: 利用谷氨酰胺转氨酶(TGase)结合微滤技术从乳清中分离纯化酪蛋白糖巨肽(CGMP)。结合微滤技术考察底物浓度、TGase 浓度、pH 值、温度和反应时间对分离纯化的影响。通过实验得出最佳酶反应条件为底物浓度 8%、TGase 酶浓度 7U/g、pH6.5、温度 39℃、反应时间 80min、微滤浓缩循环 6 次, 最后经微滤可得到纯度为 70% 左右的 CGMP。

关键词: 酪蛋白糖巨肽; 谷氨酰胺转氨酶; 微滤; 乳清粉

Transglutaminase (TGase)-catalyzed Cross-linking Combined with Microfiltration for Separation of Casein Glycomacropeptide (CGMP) from Whey Powder

LI Bo-zhi, YAN Ya-li, CHEN Qing-sen*

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: The present study aimed to develop a new technology of combined TGase-catalyzed cross-linking and microfiltration for the separation of CGMP from whey powder. The main technological parameters of TGase-catalyzed cross-linking were studied. Subsequently, the productivity, purity and amino acid composition of CGMP product were analyzed. Results showed that a CGMP product with about 70% purity was obtained through 80 min TGase-catalyzed cross-linking with a substrate concentration of 8% and a TGase dose of 7 U/g at pH 6.5, 39 °C followed by microfiltration for 6 cycles.

Key words: casein glycomacropeptide (CGMP); transglutaminase (TGase); microfiltration; whey powder

中图分类号: Q514

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)20-0094-07

酪蛋白糖巨肽(CGMP)最早在 1953 年由 Alais 等发现, 在经凝乳酶处理的牛乳以及酪蛋白盐溶液中, 12% 三氯乙酸(TCA)溶液的可溶性氮含量明显增加^[1]。1965 年 Delfour 等发现, 凝乳酶在 κ -酪蛋白的 105 苯丙氨酸 106 蛋氨酸肽键专一水解产生不溶的副 κ -酪蛋白和可溶性的多肽——CGMP^[2]。由酶解 κ -酪蛋白释放的 CGMP 的氨基酸序列已清楚, 即从 κ -酪蛋白的 N 末端 106 位氨基酸(Met)开始至 169 位 C 末端(Val)结束的 64 个氨基酸残基构成的^[3]。David 等研究指出, 在凝乳酶凝集乳酪制造过程产生的乳清中含有大量的 CGMP, 甜乳清中其含量约为 1.2~1.5g/L, 估计相当于总乳清蛋白含量的 15%~

25% 左右^[4]。

大量研究已经证实, 乳清中的 CGMP 具有重要的生物功能, 如: 促进益生菌增殖, 改善肠道微生物菌群的结构和组成; 保护胃黏膜; 因含唾液酸具有抑制病毒和毒素的感染; 控制胃肠蠕动和胃液分泌等。特别该产品不含 Phe, 则可作为优质的 PKU 病人的专用蛋白补剂。因此 CGMP 的分离纯化技术受到国内外的广泛关注。目前, 国内外主要研究以乳清为原料分离纯化 CGMP。其分离手段主要采用沉淀法、凝胶过滤、离子交换、超滤等方法^[5-9]。Tolkach 等利用谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, TGase)交联和膜分离技术相结合

收稿日期: 2009-06-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771524); 天津市重点支撑项目(09ZCKFNC00700)

作者简介: 李博智(1985—), 男, 硕士研究生, 主要从事发酵生物技术及生物活性物质开发研究。

E-mail: dazhiandyee@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 陈庆森(1957—), 男, 教授, 硕士, 主要从事发酵生物技术、酶工程与蛋白质资源开发研究。

E-mail: chqsen@tjcu.edu.cn

的方法对 CGMP 的分离做出了初步研究^[10], 为 CGMP 的分离纯化提出了新的思路。

谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, EC2.3.2.13, 以下简称 TGase) 一词是 Waelsch 及其合作者在 1959 年首次提出的, Waelsch 等用它来描述豚鼠肝及别的组织中需 Ca^{2+} 激活的一种转胺基作用。谷氨酰胺转氨酶能催化酰基转移反应, 从而在蛋白质、多肽以及伯胺之间导入共价键。如果蛋白质中赖氨酸残基的 ϵ -氨基作为酰基受体, 可在分子间以及分子内会形成 ϵ -(γ -Glu)-Lys 键^[11]。它的催化反应在图 1 中进行描述, 其中反应 b 主要发生在蛋白之间的交联。由于 CGMP 的氨基酸序列中含有 Gln 和 Lys, 所以它可以成为 TGase 的理想底物。

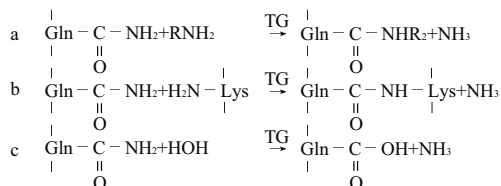


图 1 谷氨酰胺转氨酶反应^[12]

Fig.1 TGase-catalyzed cross-linking reactions

本实验主要利用谷氨酰胺转氨酶(TGase)结合微滤技术对 CGMP 的分离纯化过程中各种条件的影响因素进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

D90 乳清粉 天津海河乳业有限公司; 谷氨酰胺转氨酶 TG-B 泰兴一鸣生物公司; CGMP 样品(纯度 70% 左右) 上海统园食品技术有限公司; 盐酸(分析纯)、Tris(分析纯) 天津市北方天医化学试剂厂; 无水乙醇(分析纯)、冰醋酸(分析纯) 天津市化学试剂厂; 唾液酸测定试剂盒 南京建成生物工程公司; 甘油 天津市北方天医化学试剂厂; 巯基乙醇 天津市光复精细化工研究所; 溴酚蓝 天津市蓟县长城化学试剂厂; Tris、SDS、丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺、过硫酸铵、TEMED、甘氨酸、考马斯亮蓝 G250(国外进口国内分装)。

1.2 仪器与设备

FA-2004A 电子天平 上海精天电子仪器有限公司; BECKMAN 离心机; 恒温水浴锅 北京安捷来化学仪器设备有限公司; UV-752 紫外可见分光光度计 上海欣茂仪器有限公司; ChemiDoc XRS 化学发光成像系统(Bio-Rad); DYCZ-24DN 迷你双垂直电泳槽、DYY-2C 型双稳定时电泳仪电源 北京市六一仪器厂; 实验型超滤装置、MIF-503 中空纤维微滤膜 天津膜天膜工程技术有

限公司; L8900 氨基酸分析仪 日立公司。

1.3 方法

分离纯化的流程主要包括 CGMP 的交联和微滤两大部分, 工艺流程如下。

乳清粉经 TGase 交联处理 \rightarrow 0.1 μm 微滤膜微滤 \rightarrow
 \rightarrow 滤过液 \rightarrow 不含有 CGMP 的乳清蛋白浓缩物。
 \rightarrow 截留物 \rightarrow CGMP 交联物

由于 CGMP 的氨基酸序列中含有 Gln 和 Lys, 所以它可以成为 TGase 的理想底物。而乳清中的主要蛋白 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白, 由于其结构是球形蛋白, 只有在加热或者加入还原剂使其变性时才能发生交联反应, 所以 TGase 可以专一性地与 CGMP 反应。交联之后的 CGMP 由于其分子量变大, 用 0.1 μm 微滤膜微滤即可获得纯化的 CGMP。

1.3.1 乳清成分测定

蛋白质含量测定: 采用考马斯亮蓝染色法; 总糖测定: 采用 3,5-二硝基水杨酸法; 脂肪测定: 采用索氏提取法; 灰分测定: 采用干法灰化。

1.3.2 检测方法

1.3.2.1 唾液酸试剂盒使用方法

本实验采用南京建成生物工程公司的唾液酸测定试剂盒进行检测, 方法见产品说明书。

1.3.2.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

SDS-PAGE 电泳参照 Laemmli 的方法, 凝胶染色以及脱色后, 于 ChemiDoc XRS 化学发光成像系统进行成像处理, 用 Quantity One 软件进行总光密度扫描分析。

1.3.3 TGase 催化 CGMP 交联的动力学条件的研究

1.3.3.1 TGase 催化 CGMP 交联的最佳条件的选择

将乳清粉溶于 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液, 选择不同的 TGase 浓度(0~11 U/g)、底物浓度(2%~12%)、温度(36~48 $^{\circ}\text{C}$)、pH(6.0~8.0)分别进行催化反应 2h。反应后留取一部分反应液进行 SDS-PAGE, 其余反应液用 0.1 μm 片式微滤膜微滤, 滤过液用唾液酸试剂盒进行检测。

1.3.3.2 TGase 反应时间的确定

将乳清粉溶于 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH6.5), 配制成底物浓度为 8% 的溶液, 然后用 0.45 μm 微滤膜微滤去除不溶性颗粒与凝块。TGase 浓度 7 U/g, 在 39 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应。从加入酶液起开始计时, 每隔一段时间取出 1 ml 反应液, 用 0.01 ml 6 mol/L 的 HCl 终止酶反应。反应液用 0.1 μm 片式微滤膜微滤, 滤过液用唾液酸试剂盒进行检测。

1.3.4 微滤条件分析

将乳清粉溶于 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH6.5), 配

制成底物浓度为8%的溶液1L,用0.45 μm微滤膜微滤去除不溶性颗粒与凝块。在最适的TGase催化条件下反应2h。反应终止后,将反应液稀释一倍,然后采用0.1 μm的中空纤维膜进行微滤,当体积浓缩至原体积20%~30%时为浓缩一倍,再加水至原体积继续浓缩,反复10次,分别取10次样,用SDS-PAGE检测。最后浓缩液进行冷冻干燥,得CGMP交联产品。

1.3.5 产率及纯度分析

1.3.5.1 比色分析法

分别在210nm和280nm处测纯化后CGMP的光密度值^[13],按下式计算纯度。

$$\text{CGMP 纯度(\%)} = \frac{OD_{210} - OD_{280}}{OD_{210}} \times 100$$

1.3.5.2 氨基酸组成分析

采用GB/T 5009.124—2003对CGMP样品和分离出来的CGMP产品进行氨基酸组成分析。

2 结果与分析

2.1 乳清粉各成分的测定结果

测定结果表明,D90乳清粉中水分0.21%、蛋白质7.88%、总糖为91.34%、脂肪为0.50%、灰分含量为0.06%。

2.2 TGase催化交联CGMP的动力学特性的研究结果

2.2.1 不同TGase浓度对CGMP催化效果的分析

在底物浓度8%、pH7.0、39℃时分别选用不同TGase浓度反应2h,以确定最适酶浓度。底物中的CGMP经TGase催化处理后形成交联体,分子量增加,经0.1 μm微滤膜微滤即可被截留下来,而对其滤过液中的唾液酸变化情况进行检测则可以确定最佳的交联条件。

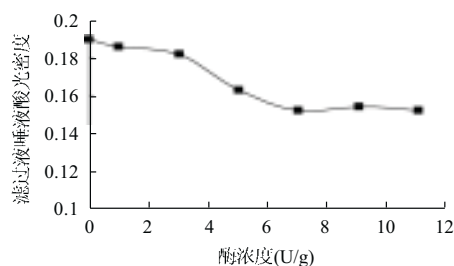


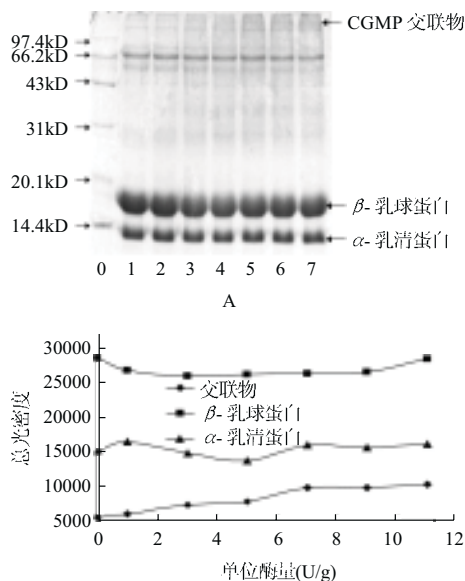
图2 不同酶浓度对滤过液中唾液酸的影响

Fig.2 Effect of TGase concentration on sialic acid content in microfiltration permeate

从图2可以看出,随着酶浓度的增加,滤过液中的唾液酸含量有着明显降低,当酶浓度达到7U/g时变化不再明显。由此可以反映CGMP可以作为TGase的理想底物,并且随着酶浓度的增加,CGMP的交联量也随

之增加。当酶浓度达到7U/g时CGMP的交联量达到最大,即达到最佳酶添加量。

由于CGMP是TGase的理想底物,不同的酶浓度不仅影响CGMP的交联效率,而且对CGMP的交联状态也有影响。同时,乳清中的主要蛋白α-乳清蛋白和β-乳球蛋白变性后也能发生交联反应,所以研究尽量消除不同酶浓度对α-乳清蛋白和β-乳球蛋白的影响。



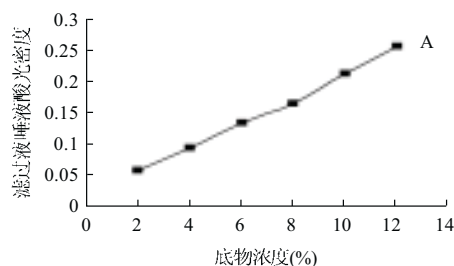
A. 1~7道分别为酶浓度0、1、3、5、7、9、11U/g的电泳带; B. 总光密度曲线。

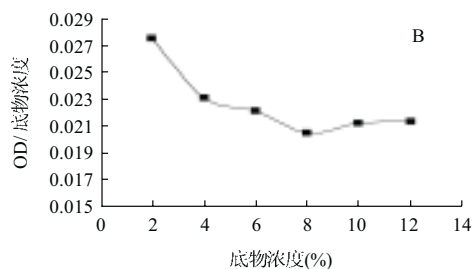
图3 不同酶浓度下乳清蛋白的SDS-PAGE图

Fig.3 SDS-PAGE patterns of different TGase dose treated whey protein

图3为不同酶浓度处理下乳清蛋白的SDS-PAGE图及总光密度曲线。从图中可以看出,随着酶浓度的增加CGMP的交联化程度成线性增加,在酶浓度为7U/g时CGMP的交联程度达到最大,而α-乳清蛋白和β-乳球蛋白并没有随着酶浓度的变化而有明显变化。可以看出,α-乳清蛋白和β-乳球蛋白在不做变性处理的情况下不会被TGase催化交联,利用TGase对CGMP进行催化反应有着比较好的效果。

2.2.2 不同底物浓度对CGMP催化效果的分析





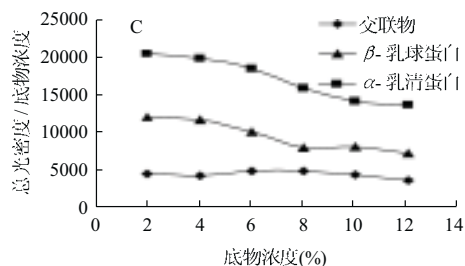
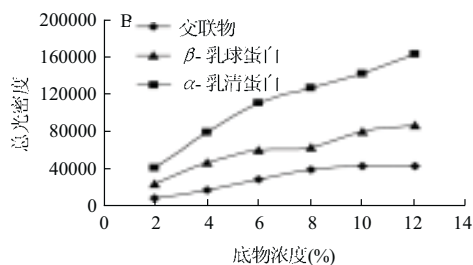
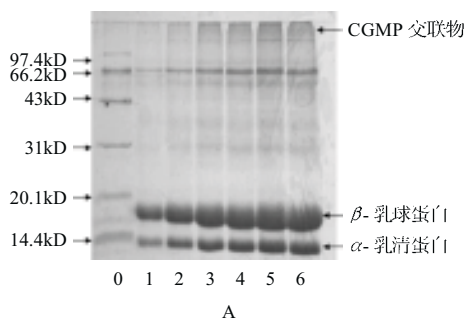
A. 不同底物浓度条件下滤过液唾液酸变化曲线;
B. 滤过液中唾液酸光密度与底物浓度比的曲线。

图4 不同底物浓度对滤过液中唾液酸的影响

Fig.4 Effect of whey powder concentration on sialic acid content in microfiltration permeate

在TGase 浓度7U/g、pH7.0、39℃时分别选用不同底物浓度反应2h，以确定最适底物浓度。一般来说，在相同酶量/底物比情况下，底物浓度越高则越有利于节约反应成本。然而底物有一定的溶解度，在溶液中存在一个临界浓度，底物浓度过高则会出现底物不能充分溶解的情况，而且不利于酶对底物的充分催化。

从图4A 可以看到，随着底物浓度的增加，滤过液中的唾液酸浓度也随之增加。这主要是因为除了CGMP 含有唾液酸外，乳清中的其他蛋白上也存在唾液酸，如免疫球蛋白；还有一部分唾液酸以游离形式存在于乳清中。然而从图4B 可以看出，随着底物浓度的增加滤过液中单位底物浓度的唾液酸光密度有明显下降。这是因为当底物浓度过低时，TGase 与CGMP 不能充分接触发生催化反应，随着底物浓度的增加，TGase 与CGMP 得以充分结合，使催化反应得以充分进行。当底物浓度达到8%时光密度/浓度比达到最低，TGase 对乳清中的CGMP 催化效率达到最大，这主要是由于乳清粉在此浓度下达到最大溶解度。当底物浓度大于8%时TGase 对CGMP 的催化效率开始降低，在实验中可以明显观察到，在不进行均质或加热的情况下，底物浓度超过8%时有明显的不溶物。



A. 1至6道分别为底物浓度2%、4%、6%、8%、10%、12%的电泳带; B. 总光密度曲线; C. 总光密度/底物浓度比的曲线。

图5 不同底物浓度下乳清蛋白的SDS-PAGE图

Fig.5 SDS-PAGE patterns of whey proteins in different concentration whey powder solutions treated with 7 U/g TGase

从图5 可以看到，在不进行均质或加热处理下，随着底物浓度的增加， α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白的溶解能力明显降低。底物浓度在2%~6%时CGMP 交联物的总光密度/底物浓度比随着底物浓度的增加而上升，当底物浓度在6%~8%时TGase 的催化效率达到最大，此结果与唾液酸检测的结果相一致，故最佳底物浓度确定为8%。

2.2.3 不同温度对CGMP 催化效果的分析

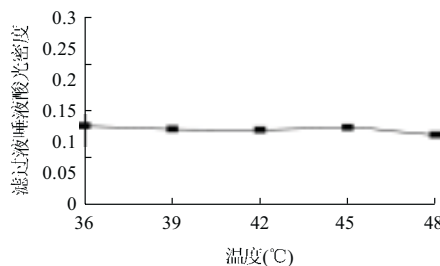


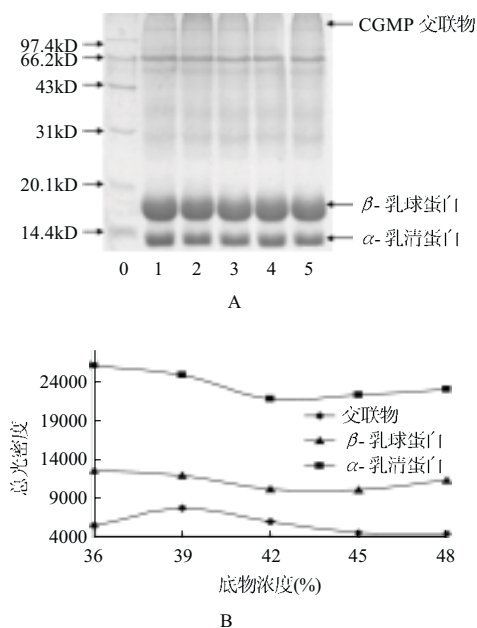
图6 不同温度对滤过液中唾液酸的影响

Fig.6 Effect of cross-linking temperature on sialic acid content in microfiltration permeate

在TGase 浓度7U/g、底物浓度8%、pH7.0时分别选用不同温度反应2h，以确定交联CGMP 的最适温度。本实验所采用的TGase 为TG-B，其最适温度在50℃左右，在45~55℃范围内都有较高的活性。考虑到乳清中 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白不能与CGMP 同时发生交

联反应, 选择一个合适温度对于实现该技术手段分离纯化 CGMP 尤为重要。所以, 在确定 TGase 的最适温度的前提下还要同时考虑到 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白热稳定性。

从图 6 可以看出, 在 36~48℃ 范围内滤过液中唾液酸没有很大变化。说明在此温度范围内, 温度对 CGMP 的总交联量没有很大影响。然而与此同时还要考虑 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白的变化情况。



A. 1 至 5 道分别为 36、39、42、45、48℃ 的电泳带; B. 总光密度曲线。

图 7 不同温度条件下乳清蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig.7 SDS-PAGE patterns of whey protein treated with TGase at different temperatures

从图 7 可以看出, 在 39℃ 时 CGMP 的最大分子量交联物达到最高, 交联程度达到最大。随着温度的上升 TGase 的活性开始增加, 然而 CGMP 交联程度却下降。这主要是因为温度在超过 40℃ 后 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白的球形结构被破坏, 其中的 TGase 作用位点暴露在外。由于 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白是乳清中的主要蛋白组分, 其含量大大高于 CGMP, 当其结构破坏后 TGase 优先以 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白作为底物进行交联反应, 温度在超过 40℃ 时 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白含量明显降低。所以温度在 39℃ 时既可以使 TGase 达到尽量高的活性, 又可以避免 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白变性。

2.2.4 不同 pH 值对 CGMP 催化效果的分析

在 TGase 浓度 7U/g、底物浓度 8%、39℃ 时分别选用不同 pH 值条件反应 2h 进行催化分析。

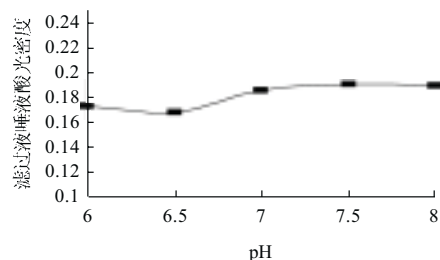
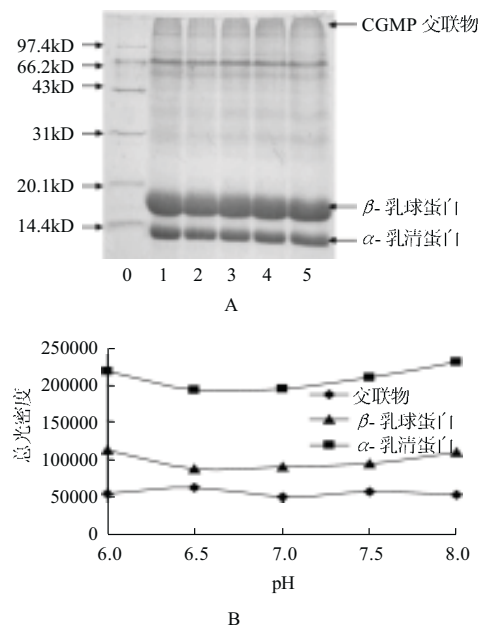


图 8 不同 pH 值对滤过液中唾液酸的影响

Fig.8 Effect of pH value on sialic acid content in microfiltration permeate

从图 8 可以看出, pH 值对酶的活性有显著的影响, 本实验所采用的 TGase 在弱酸性条件下有着较高的活性, pH6.5 时滤过液中唾液酸降到最低, TGase 活性达到最大。



A. 1 至 5 道分别为 pH6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的电泳带; B. 总光密度曲线。

图 9 不同 pH 值条件下乳清蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig.9 SDS-PAGE patterns of whey protein treated with TGase at different pHs

从图 9 可以看出, 在 pH6.5 时 CGMP 交联程度达到最大。与此同时 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白也有少量被交联, 但考虑到在 pH6.5 时 TGase 对 CGMP 的交联量有明显的提高, 所以选择 pH6.5 为最佳 pH 值条件。

2.2.5 不同时间对 CGMP 催化交联效果的影响

确定最佳交联时间对最大限度地从乳清中分离纯化 CGMP 为一个重要条件。从图 10 可以看到, 在 0~40min 内滤过液唾液酸含量以较快速度降低, TGase 在这段时

问范围内对 CGMP 的催化效率达到最高, 在 40~80min 内 TGase 催化速率降低。80min 后滤过液唾液酸基本停止变化, CGMP 的截留率能达到最高。若继续进行反应, CGMP 的交联化程度会随着时间的增加而上升, 但是对 CGMP 的收率没有影响。所以选用 80min 为酶反应最佳时间。

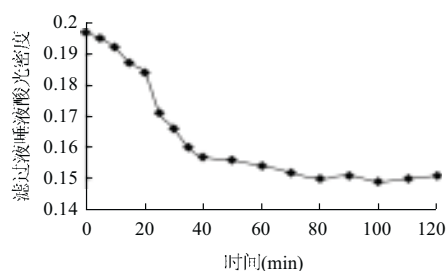
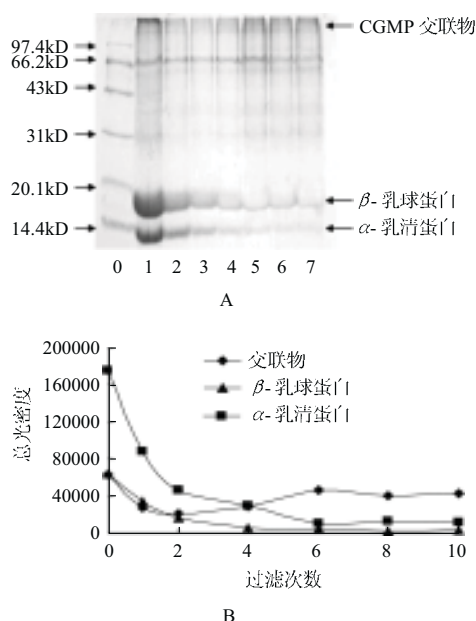


图 10 不同反应时间对滤过液中唾液酸的影响
Fig.10 Effect of reaction time on sialic acid content in microfiltration permeate

2.3 TGase 交联后微滤分离效果的分析



A. 第 1 道为未稀释的乳清交联液电泳带, 第 2~7 道分别为第 1、2、4、6、8、10 次浓缩的乳清交联液电泳带; B. 总光密度曲线。

图 11 不同浓缩次数浓缩液的 SDS-PAGE 图

Fig.11 SDS-PAGE patterns of whey protein in retentate at different microfiltration cycles

酶法交联后的产物, 采用微滤技术进行分离。微滤的作用是在截留住 CGMP 交联物的基础上去除乳清中的杂质, 其中主要包括乳糖、 α -乳清蛋白、 β -乳球蛋白和其他一些小分子肽。从图 11 可以看出, 随着微

滤次数的增加浓缩液中 α -乳清蛋白、 β -乳球蛋白的浓度逐渐降低。在第 4 次浓缩后 α -乳清蛋白的浓度趋于平稳, 变化不再明显; 而 β -乳球蛋白在第 6 次浓缩后浓度降到了最低。CGMP 交联物的浓度随着浓缩次数的增加浓度逐渐上升, 在第 6 次时达到最大。由于在第 6 次微滤后浓缩液中的 CGMP 交联物、 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白的变化不再明显, 所以微滤进行 6 次循环即可达到要求。

2.4 分离纯化 CGMP 的纯度及产率分析

2.4.1 CGMP 产品的光密度分析

CGMP 纯度(%)=($OD_{210} - OD_{280}$)/ $OD_{210} \times 100 = (0.638 - 0.149)/0.638 \times 100 = 76.64\%$

2.4.2 CGMP 产品的氨基酸组成分析

对市场购买的纯度在 70% 左右的 CGMP 样品和本技术所分离的 CGMP 产品进行氨基酸组成分析, 结果见表 1 和图 12、13。

表 1 氨基酸组成分析(%)

Table 1 Amino acid composition analysis of commercial CGMP sample and CGMP product prepared in this study (%)

氨基酸	CGMP 氨基酸 理论组成比例	CGMP 样品氨 基酸组成比例	CGMP 产品氨 基酸组成比例
Asp+Asn	6.25	8.72	8.82
Thr	15.63	13.58	12.55
Ser	9.38	8.63	8.25
Glu+Gln	15.63	18.83	18.36
Gly	1.56	2.50	2.56
Ala	10.16	6.78	6.94
Cys	—	0.09	0.20
Val	9.38	7.75	7.53
Met	1.56	1.00	0.94
Ile	11.72	9.08	8.68
Leu	1.56	4.76	5.93
Tyr	—	0.49	0.82
Phe	—	1.36	1.61
Lys	4.69	5.84	6.30
His	—	0.89	1.03
Arg	—	0.87	1.13
Pro	12.50	8.83	8.34

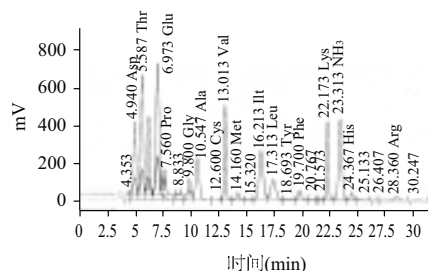


图 12 市场购买的 CGMP 样品氨基酸组成分析图

Fig.12 Chromatogram of amino acids in commercial CGMP sample

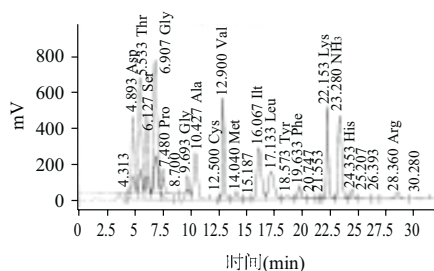


图13 CGMP产品氨基酸组成分析图

Fig.13 Chromatogram of amino acids in CGMP product prepared in this study

从表1的数据看出,市场购买的CGMP样品和分离的CGMP产品的氨基酸组成比例与CGMP氨基酸理论组成比例都不相对应,但大致比例趋势接近,说明其中都含有一定比例的杂蛋白。由于本实验采用TGase交联CGMP的方法进行分离纯化,在交联过程中不可避免的会有其他杂蛋白共同参与反应。其主要原因是本实验所采用的原料是乳清粉,乳清粉在生产过程中经灭菌、喷雾干燥等工序时经历高温,不可避免的造成 α -乳清蛋白、 β -乳球蛋白等蛋白的变性,使交联反应的特异性降低。所以,如果将刚生产的干酪所得的乳清直接进行TGase交联反应,则CGMP的纯度会有进一步提高。

将纯度70%左右的CGMP样品与分离所得的产品进行对比,分离所得产品的氨基酸组分比例与样品比例非常相近,苯丙氨酸的含量为1.61%。另外,证实了分离所得的CGMP纯度的分析结果与光密度所测得的CGMP纯度结果基本一致。

2.4.3 产率分析

将1L浓度为8%乳清溶液经过交联、浓缩、冻干后所得冻干粉质量为1.49g,故可从1g乳清粉中分离得到19mg纯度为76.64%的CGMP。

3 结论

通过实验得出最佳分离条件为底物浓度8%、TGase酶浓度7U/g、pH6.5、温度39℃、反应时间80min、微滤浓缩循环6次。此方法可得到纯度为70%左右的CGMP。

本分离方法步骤简单、分离周期短、成本较低,

易于扩大生产。但是由于所得的CGMP为交联体,其生物作用的变化尚不明确,所以应对交联体CGMP的解交联方法做出进一步研究。

参考文献:

- [1] ALAIS C, MOCQUOT G, NITSCHMANN H. Das lab und seine wirkung auf das casein der milch. VII. U ber die absaltung von nicht-protein-stickstoff (NPN) aus casein durch lab und ihre beziehung zur primärreaktion der labgerinnung der milch[J]. Helvetica Chimica Acta, 1953, 36: 1955-1968.
- [2] DELFOUR A, JOLLES J, ALAIS C. Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionin residue and of the N-terminal sequence[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1965, 19(4): 452-455.
- [3] FARRELL H M, JIMENEZ-FLORES R, BLECK G T. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision[J]. Dairy Science, 2004, 87: 1641-1674.
- [4] WAUGH D F, von HIPPEL H. κ -Casein and the stabilization of casein micelles[J]. American Chemical Society, 1956, 78(18): 4576-4582.
- [5] SAITO T, YAMAJI A, ITOH T. New isolation method of GMP from sweet whey[J]. Dairy Science, 1991, 74: 2831-2837.
- [6] MARTÍN-DIANA A, FRAGA M, FONTECHA J. Isolation and characterisation of caseinmacropeptide from bovine, ovine, and caprine cheese whey[J]. European Food Research and Technology, 2002, 214(4): 282-286.
- [7] HOLLAR C M, LAW A J R, BROWN R J. Separation of major casein fractions using cation-exchange fast protein liquid chromatography[J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74: 2403-2409.
- [8] TANIMOTO M, KAWASAKI Y, SHINMOTO H, et al. Process for producing κ -Casein glycomacropeptide: United States, 5075424[P]. 1991.
- [9] KAWASAKI YOSHIHIRO, DOSAKO SHUNICHI. Process of producing κ -casein glycomacropeptides: United States, 5278288[P]. 1994.
- [10] TOLKACH A, KULOZIK U. Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques[J]. Journal of Food Engineering, 2005, 67(1): 13-20.
- [11] MOTOKI M, SEGURO K. Transglutaminase and its use for food processing[J]. Trends in Food Science & Technology, 1998, 9(5): 204-210.
- [12] SEGURO K. Microbial transglutaminase and ϵ -(γ -Glutamyl)lysine crosslink effects on elastic properties of kamaboko gels[J]. Journal of Food Science, 2006, 60(2): 305-311.
- [13] ETGEL W N. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision [J]. Dairy Science, 1984, 67: 1599-1631.