

谷氨酰胺转移酶对明胶-CaCO₃ 矿物质膜成膜性的影响

刘安军, 王跃猛, 王稳航, 郑捷, 李鑫, 祝传望, 朱红

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 本实验通过向明胶-碳酸钙矿物质膜中添加谷氨酰胺转移酶(TGase), 研究了谷氨酰胺转移酶对明胶-碳酸钙矿物质膜特性的影响, 对谷氨酰胺转移酶处理前后样品进行厚度、质构、水溶性、水蒸气透过系数、扫描电镜(SEM)、流变性、差示热量扫描(DSC)等方法表征。研究表明: 在成膜溶液中加入谷氨酰胺转移酶(6 U/g)可以使矿物质膜的厚度增加19.69%、成膜液凝胶强度增加17.24%、膜的抗拉强度增加28.05%、断裂伸长率增加21.27%, 而水溶性和水蒸气透过率没有显著改变; 扫描电镜表明, 谷氨酰胺转移酶交联的矿物质膜表面和断面与不加谷氨酰胺转移酶的矿物质膜相比更加粗糙; 流变性结果表明, 谷氨酰胺转移酶加入后成膜溶液的粘度显著增加; 差示热量扫描表明, 谷氨酰胺转移酶催化明胶-碳酸钙矿物膜产生了交联。

关键词: 谷氨酰胺转移酶; 明胶; 碳酸钙; 矿物质膜

文章编号: 1673-9078(2014)5-18-22

Effects of Transglutaminase on Properties of Gelatin-CaCO₃ Mineral Films

LIU An-jun, WANG Yue-meng, WANG Wen-hang, ZHENG Jie, LI Xin, ZHU Chuan-wang, ZHU Hong

(College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Transglutaminase (TGase) was added to gelatin-CaCO₃ mineral films and its effect on properties of gelatin-CaCO₃ mineral films were studied. Thickness, gel strength, tensile strength (TS), elongation at break (EAB), water solubility (WS) and water vapor permeability (WVP) were characterized by scanning electric microscopy (SEM), rheological study and differential scanning calorimetry (DSC). The results showed that TGase treatment significantly increased ($p \leq 0.05$) the thickness, gel strength, TS and EAB of gelatin-CaCO₃ mineral films by 19.69%, 17.24%, 28.05% and 21.27%, respectively; TGase treatment had no effect on the WS and WVP values of gelatin-CaCO₃ mineral films. The TGase-treated films had rougher surfaces and cross-sections compared with the films without TGase. Rheological study showed that TGase significantly increased the viscosity. DSC confirmed the occurrence of cross-linking induced by TGase.

Key words: transglutaminase; gelatin; calcium carbonate mineral film

可食膜是指由可食性材料形成的膜, 主要通过防止气体、水汽和溶质等的迁移来保证食品的质量, 延长食品的货架期。可食膜作为一种新型包装材料, 具有绿色环保、生物降解、无毒无害、能够提高食品的保质期和提高食品的质量等优点, 而且还具有营养价值^[1]。因此, 近年来国内外对可食膜的研究越来越多, 可食膜的应用范围也越来越广。然而与聚合物合成膜相比, 水蒸气阻隔率性差, 机械性能差^[2]。目前广泛应用的降低可食膜水蒸气透过率的方法是向成膜溶液中加入疏水性物质, 比如油脂类。其他用来改进

收稿日期: 2013-12-11

项目基金: 国家“863”计划项目(2013AA102204)

作者简介: 刘安军(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事水产品、畜产(副产)品高附加值的开发利用及功能性食品研究等

通讯作者: 王跃猛(1990-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品专用蛋白基料及功能食品的研究与开发

可食膜功能性质的方法通过聚合物链之间的交联, 改变聚合物的网络结构。目前改善可食膜的性能的有效方法可以通过化学方法或者酶法使明胶之间产生共价交联, 而相比化学方法处理, 酶法处理更能受到消费者的接受^[3]。谷氨酰胺转移酶(TGase)是一种催化多肽或蛋白质的谷氨酰胺残基的 γ -羟胺基团(酰基的供体)与许多伯胺化合物(酰基的受体)之间的酰胺转移反应的酶, TGase通过导入、交联和脱胺3种途径导致分子内和分子间共价交联的产生, 进而改变蛋白质性质, 该酶广泛分布于自然界中, 已被许多研究者用于食品专用蛋白基料的研究中^[4]。TGase处理的蛋白谷氨酰胺残基和伯胺化合物产生的共价交联能够提高蛋白质的熔点、凝胶温度以及凝胶强度, 进而提高蛋白质的各项性能指标^[5]。

TGase的来源包括动物和微生物, 但是动物来源的TGase由于产量很小以至于商业应用受到了限制。

相比动物来源的 TGase, 可以通过微生物发酵实现大规模的生产, 从而更广泛的应用于食品加工方面^[6-7]。

本文中, 作者以明胶、碳酸钙为主要原料制造矿物质膜。碳酸钙的加入既可以增强矿物质膜的机械性能, 提高阻水、阻气效果, 而且还可以降低明胶用量, 进而降低成本。本文通过 TGase 对矿物质膜进行交联处理, 对交联后的矿物质膜进行厚度、机械性能、水溶性、水蒸气透过率、扫描电镜、流变性、热分析等表征, 研究 TGase 对明胶-碳酸钙矿物质膜性能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

明胶, 阿拉丁试剂公司; 碳酸钙, 天津大学科威公司; 甘油, 天津大学科威公司; 谷氨酰胺转移酶(酶活为 100 U/g), 上海源叶生物科技公司。

1.2 实验设备

质构仪, TA-XT 2i, 英国 Stable Micro System 公司; 流变仪, DV-III+, 美国博力飞公司; 差示扫描量热仪, DSC204F1, 德国 NETZSCH; 扫描式电子显微镜, SU-1510, 日本日立公司。

1.3 实验方法

1.3.1 膜的制备

将明胶、碳酸钙、甘油(明胶 8%、碳酸钙 1%、甘油 40%(以明胶计))溶于 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲溶液中, 于 60 °C 水浴锅中加热 30 min 后将温度降低至 45 °C, 待成膜溶液冷却后, 加入 6 U/g(以明胶计)的 TGase, 搅拌均匀, 超声脱气后迅速薄摊在玻璃平板(11 cm×11 cm)上, 鼓风干燥 45 °C 条件下 2.5 h 后揭膜, 以不加 TGase 的矿物质膜作为对照。膜制好后立即放在相对湿度为 50% 的环境中平衡 48 h 备用。

1.3.2 矿物质膜厚度测定

用螺旋测微器(精确到 0.001 mm)在裁切好的膜上均匀取 10 个点, 测厚度, 取平均值。

1.3.3 成膜液凝胶强度测定

将明胶、碳酸钙、甘油(明胶 8%、碳酸钙 1%、甘油 40%(以明胶计))溶于 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲溶液中, 于 60 °C 水浴锅中加热 30 min 后将温度降低至 45 °C, 待成膜溶液冷却后, 6 U/g(以明胶计)的 TGase, 搅拌均匀, 超声脱气后于 45 °C 水浴中静置 1 h, 然后将其立即冰浴降温, 贮于 4 °C 下过夜,

测定其凝胶强度。

测定仪器使用 TA-XT2i 型质构分析仪, 质构的测定采取压缩模式。压缩变形为样品高度的 50%, 探头为 P/0.25S, 探头下行速度为 1.0 mm/s, 检测温度为室温。凝胶的最大破坏力(即曲线的最高值)作为凝胶强度。

1.3.4 矿物质膜机械性能测定

将膜切成大小为 2.0 cm×6.0 cm 长条形, 用物性质构仪测定其拉伸性能。触发力设 5 g, 夹具上下距离为 30 mm, 拉伸速度为 0.8 mm/min。厚度使用螺旋测微器(精确到 0.001 mm)随机测定膜上的 10 个位置, 其平均值作为其厚度。根据 ASTM(2000), 计算膜的拉伸强度, 断裂伸长率。

拉伸强度:

$$TS(\text{MPa}) = \frac{F \times 10^3}{a \times b}$$

注: F: 膜样品在断裂时所能承受的最大应力(N); a: 膜的厚度(μm); b: 膜的宽度(mm)。

断裂伸长率:

$$EAB/\% = \frac{L - L_0}{L_0} \times 100\%$$

注: L: 膜样品在断裂时所达到的长度(mm); L₀: 初始长度(mm)。

1.3.5 水溶性测定

将膜切成 40 mm×40 mm 的正方形, 在干燥器中干燥至恒重。称重后放入 300 mL 去离子水中, 于室温(25 °C)下溶解 24 h。再将膜在 60 °C 的条件下干燥至恒重, 称重。根据其重量变化计算水溶性。

$$WS/\% = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$$

注: m₁: 溶解前膜的质量/g; m₂: 溶解后膜的质量/g。

1.3.6 水蒸气透过系数测定

根据 GB 1037-70, 采用拟杯子法, 在 25 °C 温度条件下, 在杯子中放入无水 CaCl₂。把薄膜蒙在杯口, 密封, 再把杯子置于底部有一定量水的干燥器中, 使试样两侧保持一定的蒸汽压差, 测量通过试样的蒸汽量, 计算水蒸气透过系数。

水蒸气透过系数 WVP 按下式计算:

$$WVP[g \times mm / (h \times m^2 \times kPa)] = \frac{\Delta m \times d}{t \times S \times \Delta P}$$

注: Δm/t: 在稳定透过时, 单位时间内透湿杯增加重量的算术平均值(g/h); d: 试样厚度/mm, 本实验采用同一张膜 5 个以上不同部位测量值的平均值; S: 试样的试验面积, 本试验中薄膜面积 12.20 cm²; ΔP: 试样两侧的蒸汽压差/kPa。由于膜两侧的 RH 梯度为 100%。测定温度为 25 °C。故 ΔP 为 3.1671

kPa.

1.3.7 微观结构测定

TGase 处理矿物质膜微观结构通过扫描电镜观察,以不加 TGase 的矿物质膜做对照,利用液氮把膜脆断,将制好的样品粘在样品台上,喷金后进行矿物质膜表面和断面微观结构观察。

1.3.8 成膜液流变性测定

将待测样品(制作方法如 1.3.3)倾倒入 Brookfield DV-III+Rheometer 同心圆筒中,按照设定的程序,分别测定 3 h 内 TGase 处理样液与对照样液粘度变化。数据采集与记录由计算机自动完成。

1.3.9 差示热量扫描(DSC)测定

把矿物质膜切成小片,称取 3 mg 左右样品密封在铝盘内。加热温度范围从 20 °C 到 102 °C,升温速率为 10 °C/min。N₂ 流的速率为 20 mL/min。空样品铝盒作为对照。

1.3.10 数据分析

采用 Microcal Origin V6.1 software 进行方差分析和显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 矿物质膜性能

表 1 谷氨酰胺转移酶对明胶-碳酸钙矿物质膜各项性能的影响

Table 1 Effects of transglutaminase on properties of gelatin-CaCO₃ mineral films

性能指标	对照膜	TG 改性膜
膜厚/mm	0.127±0.004 ^b	0.152±0.005 ^a
凝胶强度(GS)/(N/mm ²)	87.00±5.49 ^b	102.00±2.35 ^a
抗拉强度(TS)/MPa	16.40±0.51 ^b	21.00±0.12 ^a
断裂伸长率(EAB)/%	111.40±0.56 ^b	135.10±0.73 ^a
水溶性(WS)/%	31.34±1.80 ^a	28.12±0.46 ^a
水蒸气透过系数 WVP/[g·mm/(h·m ² ·kPa)]	1.55±0.04 ^a	1.14±0.03 ^a

注: 每一个数值都是多次重复 (n≥3) 的平均值加上标准偏差。a 和 b 表示各性能(同行)之间的显著性差异 (p≤0.05)。

从表 1 可以看出, TGase 的加入显著 (P≤0.05) 改变了明胶-碳酸钙矿物质膜的各项性能指标。

2.1.1 厚度

由表 1 可以看出, TGase 改性的矿物质膜厚度显著性增加 (P≤0.05)。主要原因是适度的增加聚合物的交联度产生的共价键具有足够的柔韧性, 可以显著提高聚合物的分子质量, 导致 TGase 改性矿物质膜厚度显著性提高。

2.1.2 机械性能

由表 1 可以看出, 对照膜的凝胶强度、拉伸强度、断裂伸长率分别为 87.0 N/mm²、1.64 MPa、111.40%。相比对照膜, TGase 改性膜的凝胶强度、抗拉强度、断裂伸长率分别增加了 17.24%、28.05%、21.27%, 这可能是因为成膜溶液中加入 TGase 后, 二者可以发生更多的共价交联从而形成高分子聚合物, 导致膜的机械性能显著提高, 这与 A. Bigi^[8]等人的报道一致。

2.1.3 水溶性和水蒸气透过系数

发展明胶-碳酸钙矿物质膜的主要因素之一是提高阻隔性能。正因为如此, 本文对 TGase 改性膜和对照膜的水溶性和水蒸气透过系数进行表征, 由表 1 可以看出, TGase 改性的矿物质膜与对照组相比, 水溶性和水蒸气透过系数略有降低。TGase 改性造成矿物质膜的交联程度增加, 可能会导致低分子量组分的减少, 从而降低了薄膜的溶解度, 也有人曾报道^[9], TGase 交联后, 降低了明胶与水的结合能力, 从而导致薄膜的水溶性和水蒸气透过率降低。

2.2 矿物质膜微观结构

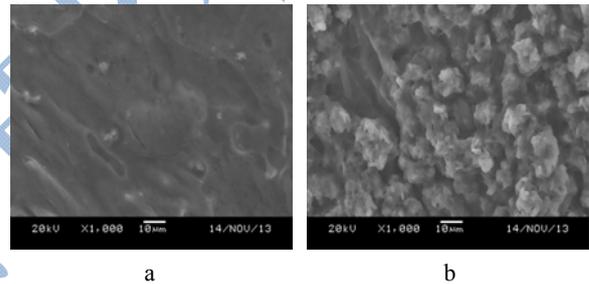


图 1 矿物质膜的表面电镜扫描图 (1000×)

Fig.1 SEM micrographs (at 1000×magnification) of surface of mineral films treated by TGase

注: a: 对照膜, b: TGase 处理膜。

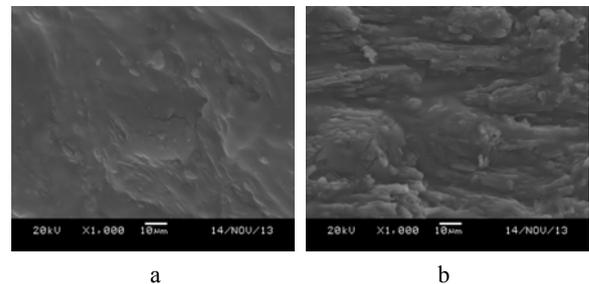


图 2 矿物质膜的断面电镜扫描图 (1000×)

Fig.2 SEM micrographs (at 1000×magnification) of cross-sections of mineral films treated by TGase

注: a: 对照膜, b: TGase 处理膜。

相比未加入 TGase 处理所形成明胶-碳酸钙共混膜的 SEM 图。经过 TGase 处理, 明胶-碳酸钙矿物质膜所成膜的微观结构发生了显著的变化。微观结构较为厚实, 聚集体变大而凸起增多, 膜平整性在下降,

同时脊梁变粗大^[10-11]。由于 TGase 的处理使得明胶分子之间产生了更多的交联。凝胶内部的结合力增大,从而使明胶-碳酸钙凝胶的凝胶强度、拉伸强度和断裂伸长率均显著增加。

2.3 成膜液流变性

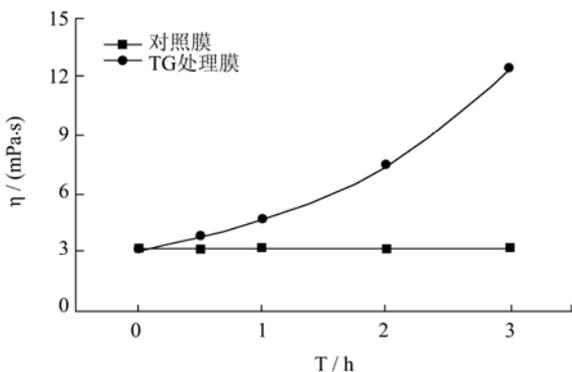


图3 45 °C, TGase 处理对成膜溶液粘度的影响

Fig.3 45 °C, Effects of transglutaminase on viscosity of the gel

图3为TGase改性成膜溶液与对照组的粘度在3 h内随时间变化趋势,加入 TGase 后,随着时间的延长, TGase 改性成膜溶液的粘度呈上升的趋势。1 h 内上升趋势较为平缓,1 h 后成膜溶液粘度上升趋势显著增强。而对对照组的粘度始终保持不变。

M McDermott 等人^[12]曾报道,明胶经过 TGase 改性后粘度从 1 Pa·s 上升为 100 Pa·s。此外,酸水解(A型)明胶相对碱水解(B型)明胶更容易产生共价交联,因为碱可以水解谷氨酰胺残基的酰胺基团,从而抑制酶交联的发生。

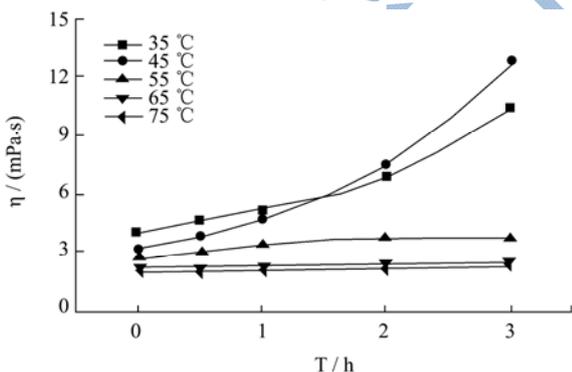


图4 温度对 TGase (6 U/g) 改性成膜溶液粘度的影响

Fig.4 Effects of temperature on viscosity of the gel modified by transglutaminase (6 U/g)

图4为加入 6 U/g TGase 的明胶-碳酸钙矿物质膜成膜溶液随温度的变化趋势,35 °C、45 °C条件下,随着时间的变化,各个温度所对应的粘度也逐渐增大,曲线整体呈上升趋势,但 45 °C 条件下上升趋势更明显, TGase 具有更大的酶活力。1.5 h 内, $\eta(35\text{ °C}) > \eta(45\text{ °C})$, 1.5 h 左右二者的粘度均达到 6 mPa·s 左右;

55 °C 条件下, TGase 酶活较小,明胶-碳酸钙成膜溶液的粘度变化趋势不显著,而当温度升高到 65 °C、75 °C 时, TGase 基本失活,明胶-碳酸钙成膜溶液的粘度基本不变。说明在一定温度范围内, TGase 酶活力随温度升高而升高,45 °C 左右时, TGase 具有较大的酶活力,而随着温度的逐渐升高,酶活逐渐降低直至失活^[13]。

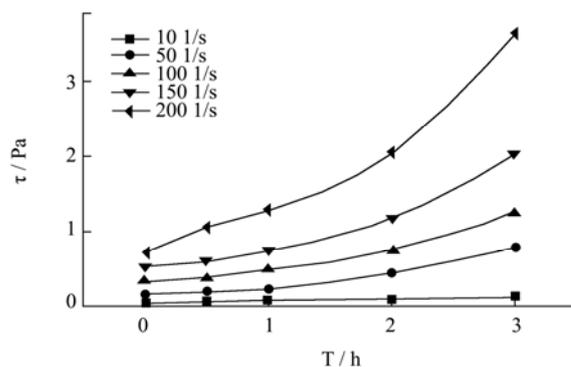


图5 剪切速率对 TGase (6 U/g) 改性成膜溶液剪切力的影响

Fig.5 Effects of shear rate on shear stress of the gel modified by transglutaminase (6U/g)

图5为45 °C,剪切速率对 TGase (6 U/g)改性成膜溶液剪切力的影响,随着剪切速率的增大剪切应力也随之增大,但各个曲线的上升趋势不同,剪切速率为 101/s 时,成膜溶液的剪切应力上升趋势不明显;而随着剪切速率的升高,成膜溶液的剪切应力上升趋势越明显^[14]。说明剪切速率对 TGase 酶活有一定的影响。这为明胶-碳酸钙矿物质膜的生产工艺的改进,控制矿物质膜的稳定性方面都具有重要的意义。

2.4 矿物质膜的热分析

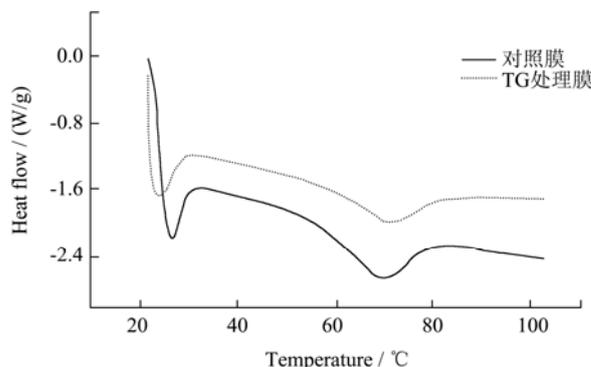


图6 TGase 处理的矿物质膜 DSC 曲线

Fig.6 DSC curves of mineral films crosslinked by TGase

由图6可以看出, TGase 改性的矿物质膜与对照组相比,由 69.79 °C 升高为 71.82 °C。熔点的升高进一步验证了 TGase 改性矿物质膜产生了更多的共价交联,分子内和分子间发生了聚合,从而使矿物质膜的各项性能指标明显改变。

3 结论

TGase 改性的明胶-矿物质膜的凝胶强度、抗拉强度、断裂伸长率、熔点比对照膜显著性 ($P \leq 0.05$) 提高, 而水溶性、水蒸气透过率与对照膜相比略有降低; TGase 改性的矿物质膜的成膜溶液粘度随时间变化呈上升趋势, 而对照膜的成膜溶液的粘度则保持不变; TGase 改性矿物质膜的微观结构相比对照膜较为厚实, 平整性下降。其作用机制是由于 TGase 能够催化明胶产生共价交联, 分子间发生聚合的原因。

参考文献

- [1] Ho J Bae, Duncan O Darby, Robert M, et al. Effects of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin-nanoclay composite film [J]. Food Chemistry, 2009, 114(1): 180-189
- [2] S Fuchs, M Kutscher, T Hertel, et al. Transglutaminase: new insights into gelatin nanoparticle cross-linking [J]. Journal of Microencapsulation, 2010; 27(8): 747-754
- [3] M H Norziah, A Al-Hassan, A B Khairulnizam, et al. Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23: 1610-1616
- [4] R A De Carvalho, C R F Grosso. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde [J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18(5): 717-726
- [5] Pimchanok Kaewudom, Soottawat Benjakul, Kongkam Kijroongrojana. Properties of surimi gel as influenced by fish gelatin and microbial transglutaminase [J]. Food Bioscience, 2013, 1: 35-41
- [6] Xiang Dong Sun, Susan D. Arntfiel. Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate catalyzed by microbial transglutaminase cross-linking [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(2011): 25-31
- [7] Mingyan Yan, Bafang Li, Xue Zhao, et al. Physicochemical properties of gelatin gels from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(2011): 907-914
- [8] A Bigi, S Panzavolta, K Rubini. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films [J]. Biomaterials, 2004, 25(25): 5675-5680
- [9] Yan Jiang, Chuan-He Tang, Qi-Biao Wen, et al. Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2007, 8(2): 218-225
- [10] Katarzyna Sztuka, Ilona Kołodziejaska. The influence of hydrophobic substances on water vapor permeability of fish gelatin films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 23(3): 1062-1064
- [11] Pui Khoo Hong, Davide Gottardi, Maurice Ndagijimana. Glycation and transglutaminase mediated glycosylation of fish gelatin peptides with glucosamine enhance bioactivity [J]. Food Chemistry, 2014, 142(1): 285-293
- [12] M Mcdermott, T Chen, C Williams, et al. Mechanical properties of biomimetic tissue adhesive based on the microbial transglutaminase-catalyzed crosslinking of gelatin [J]. Biomacromolecules, 2004, 5(4): 1270-1279
- [13] Hanna Staroszczyk, Julia Pielichowska, Katarzyna Sztuka, et al. Molecular and structural characteristics of cod gelatin films modified with EDC and Tgase [J]. Food Chemistry, 2012, 130(2): 335-343
- [14] Prospero Di Pierro, Belkis Chico, Reynaldo Villalonga, et al. Transglutaminase-catalyzed preparation of chitosan-ovalbumin films [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(3): 437-441