

文章编号:2095-6002(2013)02-0026-05

引用格式:刘猛,杜明,孔莹莹,等.牛乳乳铁蛋白的纯化及热处理对其分子特性的影响.食品科学技术学报,2013,31(2):26-30.

LIU Meng, DU Ming, KONG Ying-ying, et al. Purification and Effect of Heat Treatment on Molecular Characteristics of Lactoferrin. Journal of Food Science and Technology, 2013,31(2):26-30.

牛乳乳铁蛋白的纯化及热处理对其分子特性的影响

刘 猛, 杜 明*, 孔莹莹, 张兰威

(哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘 要:乳铁蛋白是牛乳中一种重要的碱性蛋白,相关基础与应用研究已引起广泛关注.首先以鲜牛乳为原料,通过脱脂、除酪蛋白、SP Sepharose Big Bead 阳离子交换层析及 Superdex 200 凝胶层析组合方法、超滤浓缩等过程,最终获得乳铁蛋白样品,纯度约为 94.71%.进而,研究了热处理对乳铁蛋白的分子特性的影响.通过差示扫描量热法测定得到的乳铁蛋白热变性温度为 73.1℃.通过圆二色谱研究了热处理(63℃ 30 min;72~75℃ 20 s;85℃ 10 min;95℃ 10 min)对乳铁蛋白二级结构的影响,结果表明,随着处理温度的增加,乳铁蛋白的 α -螺旋构象逐步转变为 β -折叠构象,蛋白质分子排列更为有序,分子的结构变得更加紧密,蛋白质分子发生变性趋势明显增加.

关键词:牛乳;乳铁蛋白;纯化;热处理;圆二色性

中图分类号:TS252.1

文献标志码:A

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是铁转运蛋白家族中一种铁结合性糖蛋白,主要存在于哺乳动物的各种外分泌液中,如乳汁、泪液或唾液等. LF 的分子量约为 78 ku^[1-2],LF 的一级结构是单一的多肽链结构,由约 700 个氨基酸组成^[3].不同种类的乳铁蛋白氨基酸序列具有非常高的同源性,其二级结构以 α -螺旋和 β -折叠结构为主(>70%),二者沿蛋白质的氨基酸顺序交替排列,且 α -螺旋大大多于 β -折叠结构^[4],并在二级结构的基础上折叠成两个对称的具有相似结构的球状叶(N-叶和C-叶),中间则由一段螺旋肽链连接,呈“二枚银杏叶型”结构^[5-6].人乳中 LF 含量为 2~4 mg/mL,牛乳中含量为 0.01~0.35 mg/mL^[7-9],其中牛 LF(bovine lactoferrin, bLF)和人 LF(human lactoferrin, hLF)氨基酸序列同源性达 69%,两者在生物活性和理化性质方面均具有较高的相似度.因此,牛乳资源的丰富程度,牛乳乳铁蛋白的相关基础研究备受关注.

热处理是乳制品工业中常见的单元操作,乳铁蛋白受热之后某些生物活性会发生改变甚至消失,这都归因于热处理导致的乳铁蛋白分子空间结构的改变.阐明热处理对于乳铁蛋白结构的影响,对于阐明温度对乳铁蛋白生物活性的影响,进而在产品开发中选择恰当的工艺,或有针对性地进行活性保护等,都具有重要的科学意义和现实意义.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鲜牛乳,哈尔滨香坊区奶站;牛血清白蛋白, Roche 公司;丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺,Tris,十二烷基硫酸钠,过硫酸铵,TEMED,甘氨酸,溴酚蓝,均购买于美国 Bio-Rad 公司; β -巯基乙醇,美国 Sigma 公司;考马斯亮蓝 G-250,考马斯亮蓝 R-250,Amresco 公司;SP Sepharose Big Bead, HiLoad 16/60 Su-

收稿日期:2013-03-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31101316);教育部新世纪优秀人才计划项目(NCET-11-0796);黑龙江省博士后研究人员落户黑龙江科研启动金;中央高校基本科研业务金项目(HIT. BRETⅢ. 201231).

作者简介:刘 猛,男,硕士研究生,研究方向为食品科学;

*杜 明,男,教授,博士生导师,主要从事乳品科学方面的研究. 通讯作者.

perdex 200 prep grade, 美国 GE 公司。

AKTK-100 型蛋白纯化仪, 美国 GE 公司; TGL-16LG 型离心机, 湖南星科科学仪器有限公司; RL-PHR1-4 型真空冷冻干燥机, 德国 Marin Christ 公司; 164-5050 型电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; 76S/07421 型凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司; DK-S26 型电热恒温水浴锅, 上海精密实验设备有限公司; STA 449C 型示差扫描量热仪, 德国 NETZSCH 公司; J-815 型圆二色光谱仪, JASCO 日本分光公司。

1.2 方法

1.2.1 乳铁蛋白纯化

1.2.1.1 牛乳样品处理

将新鲜牛乳于 6 000 r/min 离心 15 min 脱脂。将脱脂乳用 1 mol/L 乙酸调 pH 值至 4.6, 静置 30 min 后 6 000 r/min 离心 15 min, 收集离心后的上清液依次经孔径为 0.45 μm 和 0.22 μm 的滤膜过滤, 全部操作在 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行。收集流出液以备后续纯化实验。

1.2.1.2 阳离子交换层析纯化

样品首先经强阳离子交换层析 SP Sepharose Big Bead (1.6 $\times$ 50 cm) 进行纯化。预先用 50 mmol/L pH 值为 7.1 的磷酸盐 (PBS) 溶液平衡 (缓冲溶液 A)。缓冲溶液 B 为含有 1 mol/L NaCl 的缓冲溶液 A。采用两段式分步洗脱, 先采用含有 20% B 的混合溶液洗脱 400 mL, 再用 100% B 洗脱 400 mL, 洗脱流速 2 mL/min, 在 280 nm 跟踪检测蛋白。依据 SDS-PAGE 确定 LF 所在峰。收集目的峰的洗脱液, 经过截流分子量为 10 ku 超滤膜超滤浓缩。

1.2.1.3 体积排阻层析纯化

将 1.2.1.2 中收集的 LF 浓缩液经 0.22 μm 膜过滤并采用 Superdex 200 (1.6 cm $\times$ 60 cm) 进一步纯化。凝胶柱先用缓冲液 20 mmol/L 的 PBS (pH 值为 7.6) 进行平衡至基线稳定后进行洗脱, 流速为 0.25 mL/min, 280 nm 下检测蛋白。采用 SDS-PAGE 法确定 LF 所在组分并考查纯化效果, 将含有 LF 的组分采用 10 ku 超滤膜进行浓缩并真空冷冻干燥。

1.2.2 乳铁蛋白热处理

采用 4 种热处理参数, 分别为 63 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 处理 20 s; 85 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min。对乳铁蛋白进行上述不同强度的热处理, 然后采用圆二色谱 (circular dichroism spectrum, CD) 测定样品的 α -螺旋和 β -折叠的含量 (far-UV-CD spectra, 波长 190 ~ 250 nm)。

1.2.3 蛋白质浓度测定

采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度^[10]。

1.2.4 SDS-PAGE

分离胶采用 12% 凝胶浓度, 浓缩胶采用 5% 凝胶浓度, 在 Bio-Rad 公司的 Mini-Protein II 型电泳槽进行电泳, 浓缩胶时采用 80 V 电压运行 30 min, 分离胶时采用 100 V 电压运行 80 min^[11]。

1.2.5 差示扫描量热法

将纯化后的 LF 用 0.01 mol/L PBS (pH 值为 7.6) 配制成 0.1 g/mL 溶液。取 10 μL 样品溶液置于铝制坩埚中, 密封后置于样品舱中, 参考盘为空铝盘, 保护气体为氮气。设置扫描温度范围为 30 ~ 100 $^{\circ}\text{C}$, 然后线性升温, 升温速率为 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ^[12-13]。进行数据记录和处理得到 DSC 曲线, 峰值点对应的温度为变性温度, 曲线形成的峰所包括的面积为蛋白质变性所吸收的热量, 确定 LF 变性温度。

1.2.6 圆二色谱法

圆二色谱 (optical circular dichroism, CD) 的测量使用 Jasco J-815 型圆二色光谱仪, 采用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 值为 7.6) 配制浓度为 0.25 mg/mL 的 LF 样品, 取 0.4 mL 经不同热处理的 LF 溶液于 0.1 cm 光径的斜口石英比色皿中, 将与待测样品溶液相同的体系作为空白, 扫描的波长范围 190 ~ 250 nm, 扫描速率 50 nm/min, 响应时间 0.5 s, 扫描温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 每隔 0.05 nm 收集数据^[14-15]。

1.2.7 统计学及绘图

数据采用 Origin 8.0 软件进行计算绘图, 采用 K2D2 软件 (<http://www.ogic.ca/projects/k2d2>) 计算 α -螺旋和 β -折叠, 使用的算法为最小二乘法^[16]。

2 结果与讨论

2.1 纯化工艺确定

2.1.1 阳离子交换层析纯化

经过强阳离子交换层析 SP Sepharose Big Bead 得到的蛋白洗脱曲线, 见图 1。由图 1 可以看出 2 个蛋白洗脱峰, 分别为用含 20% B 缓冲溶液和 100% B 缓冲溶液的洗脱峰, 分别收集进行 SDS-PAGE 确定目的蛋白峰, 蛋白电泳图见图 2。由图 2 可以看出峰 1 中杂蛋白较多, 峰 2 较为纯净, 只在小分子量区域有些杂蛋白存在。LF 的分子量通常为 78 ku^[1-2], 因此可以判断 LF 在峰 2 中, 分子量为 (78 $\pm$ 2) ku 左右。将峰 2 进行超滤浓缩, 用于 Superdex 200 凝胶层析进一步纯化。

2.1.2 Superdex 200 凝胶层析纯化

图 2 中峰 2 经过 Superdex 200 凝胶层析得到 2 个峰, 见图 3。分别收集进行电泳检测得到如图 4 和

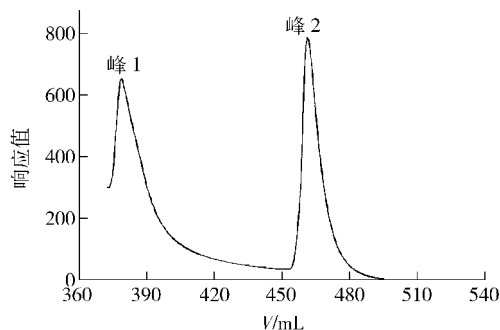


图 1 SP Sepharose Big Bead 阳离子交换层析

Fig.1 Elution of SP Sepharose Big Bead cation exchange column

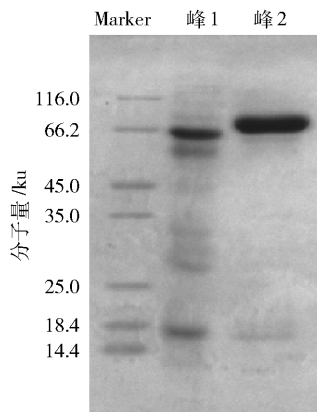


图 2 SP Sepharose Big Bead 分离的峰 1 和峰 2 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE of peak1 and peak2 from SP Sepharose Big Bead

图 5,可以看出乳铁蛋白集中在峰 2-1,且含有少量杂蛋白,利用凝胶成像仪自带的 Quantity One 软件测定 LF 纯度约为 94.71%。峰 2-2 蛋白含量极少,故收集峰 2-1 超滤浓缩并且真空冷冻干燥。

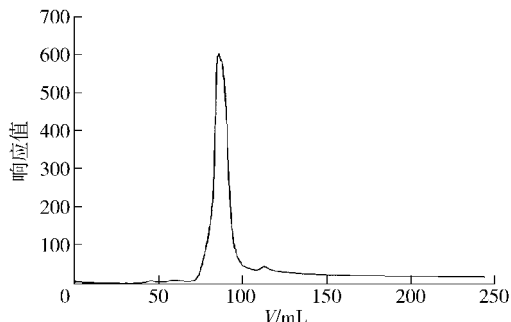


图 3 Superdex 200 凝胶层析图

Fig.3 Elution of Superdex 200 gel exclusion chromatography

2.2 乳铁蛋白变性温度确定

热处理会使蛋白肽链展开和分子间聚集,使得蛋白结构发生改变,这就将伴随着放热(吸热)过

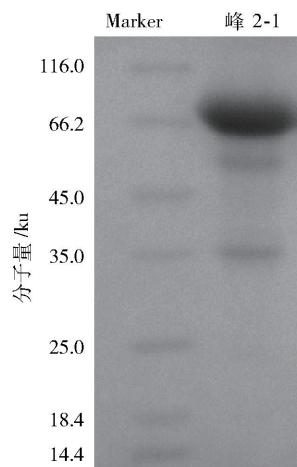


图 4 Superdex 200 分离的峰 2-1 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE of peak 2-1 from Superdex 200

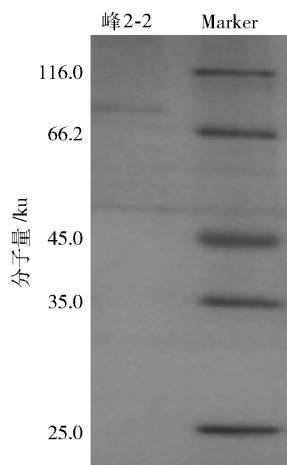


图 5 Superdex 200 分离的峰 2-2 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE of peak 2-2 from Superdex 200

程,并可以通过差式扫描量热方法(differential scan calorimeter,DSC)进行测量。图 6 是乳铁蛋白的 DSC 图谱。随着加热温度的升高,在 73.1℃,LF 出现了一个热焓峰(变性峰),即变性温度为 73.1℃。

本研究中,根据 LF 的 DSC 图谱及实际生产中的热处理参数,设置加热参数 62~65℃加热处理 30 min、72℃加热处理 10 s、85℃加热处理 10 min、95℃加热处理 10 min。

2.3 热处理对乳铁蛋白二级结构影响

蛋白质二级结构中 α -螺旋和 β -折叠结构的含量可以通过 CD 光谱来估计。圆二色谱紫外区段(190~240 nm),主要生色团是肽链,这一波长范围的 CD 谱包含了生物大分子主链构象的信息。常在 CD 谱中 200~230 nm 具有双负峰是 α -螺旋结构的反映。 α -螺旋构象的 CD 谱在 222,208 nm 处呈负峰,在 190 nm 附近有一正峰。 β -折叠构象的 CD 谱,

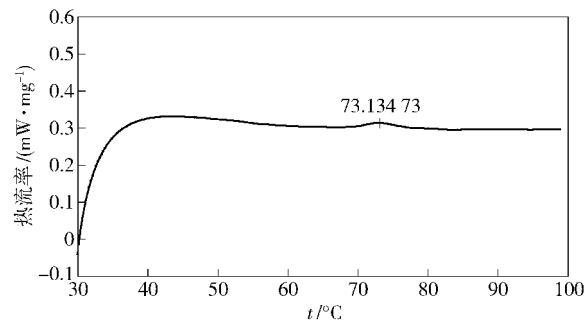


图6 乳铁蛋白的DSC图谱

Fig. 6 DSC properties of lactoferrin

在210 nm处有一负峰,在195~198 nm处有一强的正峰.

经不同加热强度处理乳铁蛋白样品的CD图谱如图7. 从图7a曲线可以看出,天然状态LF的CD谱在200~230 nm给出双负峰,峰值分别出现在208 nm和222 nm. 图7a反映了天然的LF中 α -螺旋结构比例较高. 随着LF处理温度的升高,双负峰的峰值发生了稍许的红移,222 nm处的第二负峰的峰形变得比较平缓,峰值明显减小, α -螺旋有解旋趋势. 这明了 α -螺旋构象比例下降, β -折叠构象比例增加. 由图7b曲线和图7c曲线可以看出,当温度未到达变形温度时,在一段温度范围内, α -螺旋构象与 β -折叠构象比例随着温度变化没有发生明显改变. 但当处理温度达到95℃时,双负峰几乎消失,在210 nm处有一个负峰,这是 β -折叠构象的反映.

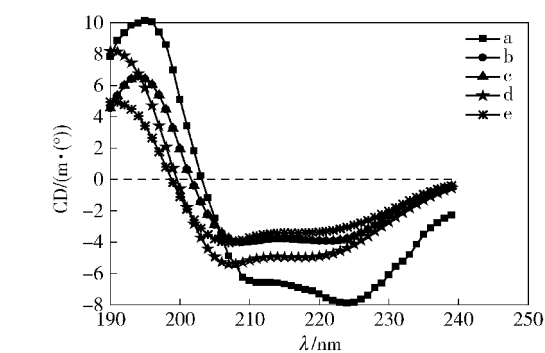


图7 乳铁蛋白的圆二色谱

Fig. 7 CD properties of lactoferrin

从表1可以看出,随着处理温度的增加, α -螺旋结构的比例逐步减小, β -折叠的比例逐步增加. β -折叠结构比 α -螺旋结构更为有序,蛋白质分子排列紧密度增加^[17]. 这说明随着处理温度的增加, α -螺旋构象逐步转变为 β -折叠构象,LF蛋白质分子结构的有序性增加,分子排布更加紧密,LF蛋白质分子发生变性趋势明显增加.

表1 乳铁蛋白样品二级结构组分
Tab. 1 Components of secondary structure
of lactoferrin

处理方式	百分含量/%	
	α -螺旋	β -折叠
未处理(a)	56.26	5.69
65℃处理30 min(b)	40.9	8.76
72℃处理10 s(c)	40.9	8.76
85℃处理10 min(d)	39.37	11.52
95℃处理10 min(e)	27.46	17.04

3 结 论

本研究得到了一种以新鲜牛乳为原料的乳铁蛋白纯化方法. 牛乳经过脱脂、除酪蛋白后得到乳清蛋白. 然后通过SP Sepharose Big Bead 离子交换层析和 Superdex 200 凝胶过滤层析,超滤浓缩,真空冷冻干燥等方法制备得到LF,纯度为94.71%. SP Sepharose Big Bead 离子交换层析用含0.2 mol/L NaCl和1 mol/L NaCl的PBS缓冲液进行梯度洗脱,流速为2 mL/min. Superdex 200 凝胶层析流速为0.25 mL/min,上样量为2 mL,上样浓度为13.6 mg/mL. 通过强阳离子交换层析和凝胶层析结合的方法得到电泳纯LF,LF纯度约为94.71%.

通过DSC测得牛乳中乳铁蛋白变性温度为73.1℃. 随着热处理温度的增加,乳铁蛋白的二级结构发生变化, α -螺旋结构的比例逐步减小, β -折叠的比例逐步增加, α -螺旋构象逐步转变为 β -折叠构象.LF蛋白质分子发生变性趋势明显增加. 该研究结果为乳铁蛋白相关产品开发奠定了一定的理论基础.

参考文献:

[1] Baker E N, Baker H M. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005, 62(22):2531-2539.

[2] Moore S A, Anderson B F, Groom C R, et al. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 angstrom resolution[J]. Journal of Molecular Biology, 1997, 274(2):222-236.

[3] Kawakami A, Hirayama K, Kawakami F, et al. Purification and biochemical characterization of a fibroblast growth factor-binding protein (FGF-BP) from the lactoferrin fraction of bovine milk[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1760(3):421-431.

- [4] 贾洪锋, 贺稚非, 刘丽娜, 等. 乳铁蛋白及其生理功能[J]. 粮食与油脂, 2006(2):44-47.
- [5] Nuijens J H, van Berkel P H, Schanbacher F L. Structure and biological actions of lactoferrin[J]. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 1996, 1(3): 285-295.
- [6] Karthikeyan S, Sharma S, Sharma A K, et al. Structural variability and functional convergence in lactoferrins [J]. Current Science, 1999, 77(3): 241-255.
- [7] Takeuchi T, Hayashida K I, Inagaki H, et al. Opioid mediated suppressive effect of milk-derived lactoferrin on distress induced by maternal separation in rat pups[J]. Brain Research, 2003, 979(1-2):216-224.
- [8] Lin T Y, Kuo C D. Bovine lactoferrin protects RSC96 Schwann cells from tumor necrosis factor- α -induced growth arrest via extracellular-signal-regulated kinase 1/2[J]. Neuroscience, 2008, 151(2):396-402.
- [9] 杨安树, 高金燕, 李欣, 等. 牛乳中乳铁蛋白的分离纯化研究[J]. 食品科技, 2005(3):17-23.
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2):248-254.
- [11] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259):680-685.
- [12] Yamniuk A P, Burling H, Vogel H J. Thermodynamic characterization of the interactions between the immunoregulatory proteins osteopontin and lactoferrin[J]. Molecular Immunology, 2009, 46(11-12):2395-2402.
- [13] Conesa C, Sanchez L, Rota C, et al. Isolation of lactoferrin from milk of different species: calorimetric and antimicrobial studies[J]. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 150(1):131-139.
- [14] Kaur K, Andrew L C, Wishart D S, et al. Dynamic relationships among Type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic R helix as a receptor-binding region[J]. Biochemistry, 2004, 43(28):9009-9020.
- [15] Hauge H H, Mantzilas D, Moll G N, et al. Plantaricin A is an amphiphilic R-helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms [J]. Biochemistry 1998, 37(46):16026-16032.
- [16] 文鹏程, 余丹丹, 汪昕昕, 等. 不同处理条件对乳铁蛋白构象的影响研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(1):162-165.
- [17] 卢蓉蓉, 许时婴, 杨瑞金, 等. 乳铁蛋白抑菌活性及机理研究[J]. 食品科学, 2008, 29(2):238-242.

Purification and Effect of Heat Treatment on Molecular Characteristics of Lactoferrin

LIU Meng, DU Ming*, KONG Ying-ying, ZHANG Lan-wei

(School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: Lactoferrin is a kind of key basic proteins in bovine milk, which has attracted more and more research attentions. In the present study, lactoferrin was isolated from fresh bovine milk by defatting and casein-removing treatments, subsequently purified by SP Sepharose Big Bead ion exchange chromatography, Superdex 200 gel chromatography, and ultrafiltration. The purified form of lactoferrin was obtained with the purity of 94.71%. The denaturation temperature of lactoferrin was determined to be 73.1 °C by differential scanning calorimetry. Circular dichroism studies on the influence of heat treatment (63 °C 30 min, 72 ~ 75 °C 20 s, 85 °C 10 min, 95 °C 10 min) on the secondary structure of lactoferrin showed that, the α -helix conformation of lactoferrin was gradually transformed to β -sheet conformation with the increase of the treatment temperature, indicating that the protein molecules became better ordered and more compact with significantly increased trends of protein denaturation.

Key words: bovine milk; lactoferrin; purification; heat treatment; circular dichroism

(责任编辑:李 宁)