

乳过氧化物酶的分离纯化和酶学性质研究

卢蓉蓉^{1,2}, 许时婴^{1,2}, 王 璋^{1,2}

(1.江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036;

2.江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 采用超滤—离子交换色谱分步洗脱法, 对牛初乳中的乳过氧化物酶进行了分离和纯化。经 SDS-PAGE 测定, 分离出的乳过氧化物酶显示为单一区带, 相对分子质量为 75035D。该酶酶活回收率为 76.17%, 其最适 pH 为 5.0~5.5, 最适温度为 55℃。在 70℃、75℃ 时 LP 酶活的热失活曲线呈现一般植物过氧化物酶失活的双相特征。

关键词: 乳过氧化物酶; 分离; 纯化; 酶活

Isolation and Purification of Lactoperoxidase and Its Enzymatic Properties

LU Rong-rong^{1,2}, XU Shi-ying^{1,2}, WANG Zhang^{1,2}

(1.School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China;

2.Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A stepwise procedure for isolation and purification of lactoperoxidase by ultrafiltration and ion exchange chromatography was investigated. It was shown as a single band in SDS-PAGE. The molecular weight of lactoperoxidase was 75035D. The recovery of lactoperoxidase activity was 76.17%. The optimum pH for lactoperoxidase was 5.0~5.5, and the optimum temperature for lactoperoxidase was 55℃. At 70℃ and 75℃, two independent first-order inactivation reactions were found just as the peroxidases from plants.

Key words: lactoperoxidase; isolation; purification; enzyme activity

中图分类号: TS201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0100-05

乳过氧化物酶(Lactoperoxidase, EC 1.11.1.7, 以下简称 LP)是存在于乳汁中的一种血红素蛋白, 是一种来自动物的过氧化物酶^[1~5], 在初乳中含量尤其丰富。LP 和 H₂O₂ 以及硫氰酸根(SCN⁻)可以形成“乳过氧化物酶体系(LPS)”。这个酶系统具有抑菌活性, 可以在没有冷藏的条件下, 抑制革兰氏阳性菌和阴性菌的生长, 延长鲜乳的保质期, 具有“冷杀菌”的作用^[6~10]。乳中的 LPS 不仅具有抗菌作用, 还可预防 H₂O₂ 等过氧化物的积累, 从而避免了过氧化物引起的细胞损伤, 起到保护乳腺的作用。关于植物性过氧化物酶的报道很多, 但关于动物性过氧化物酶的研究报道却非常少。研究 LP 的酶学性质, 对“冷杀菌”系统的应用具有现实性的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛初乳 无锡市牧场; SP Sepharose Fast Flow(SP Sepharose FF)离子交换剂 Pharmacia 公司; 丙烯酰胺(Acr) Merck 公司; N,N-甲叉双丙烯酰胺(Bis) Merck 公司; 四甲基乙二胺(TEMED) Purris 公司; 标准相对分子质量蛋白(LMW) Pharmacia 公司; 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) Sigma 公司; 其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器

层析柱 $\Phi 4.6 \times 20\text{cm}$ 上海锦华层析设备厂; 色谱层析系统 上海市沪西仪器厂; 垂直板电泳仪 中科院上海生化所; UV-1100 紫外可见分光光度计 北京瑞利分析仪器公司; 微滤器($\Phi = 0.2\text{mm}$) pore 公司; Pellicon 板式超滤系统 美国 Millipore 公司。

1.3 方法

1.3.1 LP 的分离纯化

牛初乳经冷冻离心机脱脂, 35℃下加入适当稀释的

收稿日期: 2005-02-28

作者简介: 卢蓉蓉(1970-), 女, 副教授, 博士, 主要从事乳品科学与技术的研究。

皱胃酶液, 分离去除酪蛋白; 微滤后用截留相对分子质量(MWCO)为 100000 的超滤膜进行首次超滤, 透过液再用 MWCO 为 50000 的超滤膜进行第二次超滤, 然后用 MWCO 为 10000 的超滤膜进行浓缩^[11]。

采用 pH7.7, 10mmol/L 的磷酸缓冲液为起始缓冲液, 以 SP Sepharose FF 为离子交换剂, 流速 70ml/h, 色谱柱尺寸 ϕ 4.6 \times 20cm。采用 0.3、0.5、1.0mol/L NaCl 分步洗脱, 分别收集洗脱组分。

1.3.2 LP 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)^[12]

样品浓度 0.5mg/ml; 分离胶缓冲液 2mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.8); 浓缩胶缓冲液 1mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH6.8); 单体 30%(W/V) Acr + 0.8%(W/V) Bis; 电极缓冲液 25mmol/L Tris, 0.192mol/L 甘氨酸, 含 0.1%(W/V)SDS, pH8.3; 聚合起始剂 新鲜配制的 10% 过硫酸铵溶液; 聚合促进剂 10%(V/V) TEMED; 固定液 20%(W/V) 三氯乙酸; 染色液 0.1%(W/V) 考马斯亮兰 R-250, 45%(V/V) 甲醇, 10%(V/V) 冰醋酸; 脱色液 10%(V/V) 甲醇, 10%(V/V) 冰醋酸。

垂直板电泳分离胶和浓缩胶的组成见表 1。

表 1 分离胶和浓缩胶的组成

Table 1 Constitutes of separating gel and concentrating gel

	分离胶(T=12%)	浓缩胶(T=5%)
单体(ml)	4.0	0.67
分离胶缓冲液(ml)	1.9	—
浓缩胶缓冲液(ml)	—	0.5
10%(W/V) SDS(ml)	0.1	0.04
10%(W/V)过硫酸铵溶液(ml)	0.1	0.05
10%(V/V)TEMED(ml)	0.2	0.05
双蒸水(ml)	3.2	2.7

电泳条件: 恒流 10mA

相对迁移率(R_f)的计算:

$$R_f = \frac{\text{蛋白质样品距加样端的距离}}{\text{溴酚蓝带距加样端的距离}}$$

1.3.3 LP 酶活测定方法^[13]

取 4ml 1.73mmol/L 的 ABTS 试剂(0.1mol/L, pH5.5 的柠檬酸钠缓冲液)、140 μ l 5.35mmol 的 H_2O_2 、10 μ l 适当稀释的待测酶液, 在 405nm 处测定吸光度的变化($\Delta A / \Delta t$, min⁻¹), 乘以 11.5, 即为 LP 的活力(U/ml)。

1.3.4 LP 的最适 pH 的测定

在 0.1mol/L, pH 为 3.0~10.0 的缓冲液中分别测定 LP 的酶活。pH3.0~8.0 为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, pH9.0~10.0 为甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。

1.3.5 LP 的 pH 稳定性

在一系列的试管中加入 0.1mol/L, pH 值分别为 3.0~

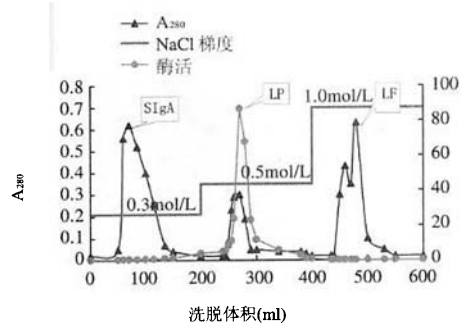
10.0 的缓冲溶液, 置于 30℃ 下恒温, 在各试管中加入相同体积的预先恒温 30℃ 的酶液, 在不同的时间间隔分别从各个试管取出一定量酶液, 在 pH5.5, 30℃ 下测定酶的残余活力。

1.3.6 LP 的热稳定性

将酶液置于毛细管(内径 2mm, 壁厚 1mm)中, 分别在 20~80℃ 下温度下保温, 在不同的时间间隔, 依次取出一定量的酶液, 置于冰浴中保存, 在 pH5.5, 30℃ 下测定残存酶活。

2 结果与讨论

2.1 LP 的分离纯化



起始缓冲液: pH7.7, 10mmol/L 磷酸缓冲液; 柱材料: SP Sepharose FF; 色谱柱尺寸: ϕ 4.6 \times 20cm; 上样体积: 200ml; 流速: 70ml/h; 组分收集: 5ml/管; 洗脱方式: 0.3、0.5、1.0mol/L NaCl 分步洗脱。

图 1 离子交换色谱法从 LF 粗制品中分离纯化 LP 的洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of purification of LP from crude LF by ion-exchange chromatography with stepwise ionic strength gradients

采用分步洗脱方式, 洗脱相中出现了 3 个组分(见图 1)。洗脱组分的颜色, 分别是无色、黄色和红色。一些文献报道, LP 是一种天然的黄色蛋白质, 是一种分泌型的酶^[15,16], 在 412nm 处有特征吸收。对洗脱出的黄色蛋白质进行波长扫描, 发现在 280nm 和 412nm 处确有特征吸收(见图 2)。因此, 可以基本确定这种黄色组分就是 LP。

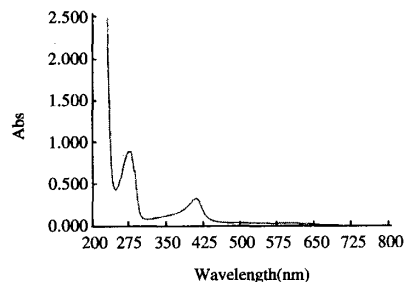


图 2 LP 的紫外-可见光吸收光谱图

Fig.2 UV-visible absorbance spectrum of LP

根据试验结果,并结合文献报道^[16,17],3个洗脱组分按其出峰次序分别是分泌型免疫球蛋白(Secretory IgA, SIgA)、LP和乳铁蛋白(Lactoferrin, LF)。收集LP分部,测定LP酶活。从图2中可以看出,LP酶活集中在LP的洗脱组分中,在SIgA组分峰中有少量的LP酶活,LF组分峰中几乎没有LP活性。

标准蛋白、LP样品的SDS-PAGE图谱以及蛋白质相对分子质量与相对迁移率之间的关系见图3和图4。从图3可以看出,分离出的LP为单一区带,经计算其相对分子质量为75035D。实验结果与文献报道LP的相对分子质量为70~80kD^[4,5]一致。

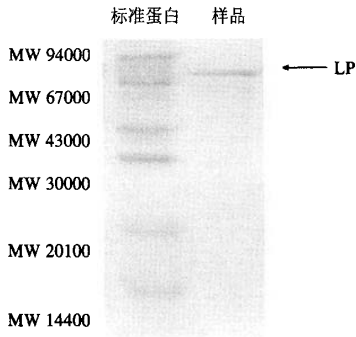


图3 LP的SDS-PAGE图
Fig.3 SDS-PAGE profile of LP

所使用的标准相对分子质量蛋白: Phosphorylase b (94000), Albumin(67000), Ovalbumin (43000), Carbonic Anhydrase (30000)。

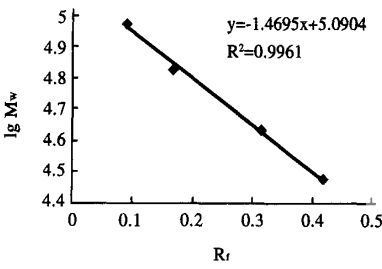


图4 SDS-PAGE中相对分子质量与相对迁移率(R_f)的关系
Fig.4 Relation between molecular weight and R_f of SDS-PAGE

表2表明,在分离纯化过程中LP酶活的最终回收率达到76.17%,纯化倍数达到191倍。

2.2 LP的最适pH及pH稳定性

从图5可知,LP的最适pH为5.0~5.5。当pH低于4.0或pH高于8.0,LP的活力都很低。这与植物性过氧化物酶的最适pH值(4.5~6.0)^[18]差别不大。

图6表明,在pH3.0~8.0的范围内,LP均十分稳

表2 LP的分离纯化结果

Table 2 Results of separation and purification of LP

	脱脂初乳	超滤浓缩液	离子交换LP收集液
体积(ml)	5600	1000	140
酶活(U/ml)	0.67	3.35	20.41
总酶活(U)	3752	3350	2857
LP的回收率(%)	100	89.29	76.15
蛋白质浓度(mg/ml)	120	29	19
比活力(U/mg)	0.0056	0.12	1.07
纯化倍数*	1	21.43	191.07

* 纯化倍数为纯化酶的比活力与粗酶比活力的比值。

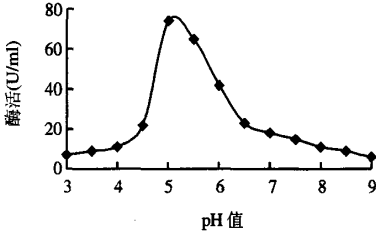


图5 LP的最适pH
Fig.5 Optimum pH of LP

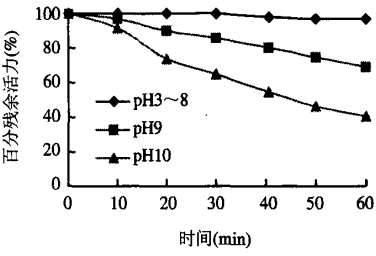


图6 LP的pH稳定性
Fig.6 pH stability of LP

定。在pH9.0的条件下保温30min、60min,酶活仅损失15%、32%,稳定性仍然较好。但在pH为10的强碱性环境下,稳定性较差。

2.3 LP的最适温度及热稳定性

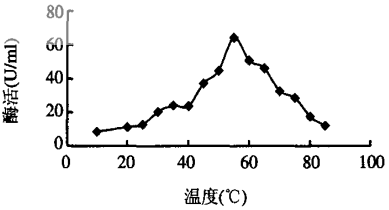


图7 LP的最适温度
Fig.7 Optimum temperature of LP

图7表明,55℃为LP的最适温度。在45~70℃之间酶活都较高。这与文献报道不太一致。1973年,Shahani报道LP的最适温度为25~30℃^[2],Kussendrager和Girgis报道LP的最适温度为70℃^[9,10]。

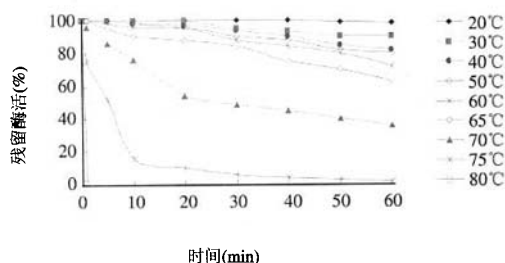


图8 LP的热稳定性

Fig.8 Thermal stability of LP

由图8可以看出,在20~30℃加热60min,对酶活几乎没有影响,酶活残留90%以上。在40~50℃加热60min,酶活残留80%以上。在65℃加热60min,酶活仍保留63%。而70℃以上加热对酶活的影响较大。70℃下加热处理60min,酶活残留36%。而经75℃处理10min后,酶活残留不足20%,60min后LP几乎完全钝化。80℃加热1min,酶活就完全丧失了。

与植物性过氧化物酶相比,LP的热稳定性较差。但与乳中的其它酶类(如过氧化氢酶、解脂酶、磷酸酶、黄嘌呤氧化酶)相比,LP的热稳定性较好,因此检测LP的活性是判断乳制品的热处理是否充分的依据之一。

2.4 LP的酶失活动力学

按照一级反应动力学,酶失活的速度与残留酶活成正比^[19],可表示为:

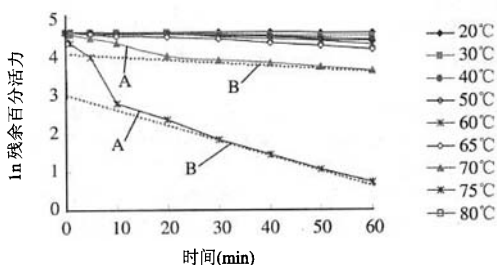
$$\frac{du}{dt} = -ku \quad (1)$$

式中 $\frac{du}{dt}$ 表示酶失活速度, k 表示酶失活常数(min^{-1}), u 为残余百分酶活。

对式(1)移项积分,可得

$$\ln u - \ln u_0 = -kt \quad (2)$$

式中 u_0 为初始百分酶活。

图9 $\ln u \sim t$ 关系图Fig.9 $\ln u$ vs. t

以 $\ln u$ 对时间 t 作图,可得到一系列直线。直线的斜率即反映不同加热温度下的 k 值。 k 值越大,表示酶的耐热性越差。图9表明,LP的酶失活动力学遵循一

级动力学。对图中的直线进行线性回归,可得到不同温度下的回归方程:

$$20^\circ\text{C}: \ln u = -0.0003 t + 4.6086$$

$$30^\circ\text{C}: \ln u = -0.0021 t + 4.6199 \quad R^2=0.9193$$

$$40^\circ\text{C}: \ln u = -0.0034 t + 4.6240 \quad R^2=0.9594$$

$$50^\circ\text{C}: \ln u = -0.0040 t + 4.6230 \quad R^2=0.9769$$

$$60^\circ\text{C}: \ln u = -0.0052 t + 4.6229 \quad R^2=0.9610$$

$$65^\circ\text{C}: \ln u = -0.0072 t + 4.6030 \quad R^2=0.9763$$

$$70^\circ\text{C}: \ln u = -0.0307 t + 4.6132 \quad R^2=0.9961 \quad A$$

$$\ln u = -0.0101 t + 4.1975 \quad R^2=0.9972 \quad B$$

$$75^\circ\text{C}: \ln u = -0.1833 t + 4.6926 \quad R^2=0.9734 \quad A$$

$$\ln u = -0.0421 t + 3.1554 \quad R^2=0.9953 \quad B$$

$$80^\circ\text{C}: \ln u = -0.9210 t + 4.6050 \quad R^2=1$$

值得注意的是,在70、75℃时LP酶活的热失活曲线呈现一般植物过氧化物酶失活的双相特征^[19,20],且其中每一相均遵循一级动力学。因此着重分析这两条曲线。从图中可以看出,这两条热失活曲线的斜率不同,均可看作由一条陡峭的直线部分(A)和一条平缓的直线部分(B)组成。热失活曲线的形状说明在热失活过程中有两个独立的一级热失活反应。A部分为酶的热不稳定部分的失活曲线,B部分为耐热部分的失活曲线。

外延图9中代表酶的耐热部分(B部分)的直线至零时间,可以估算LP酶的耐热部分活力在总酶活中所占的比例。按此法计算,在70℃和75℃加热时LP耐热部分活力分别占酶的总活力的66.5%、23.5%。由此可见,热处理条件会显著影响耐热部分所占的比例,其中温度是最重要的因素,温度越高,耐热部分所占的比例越低,在更高的温度范围(如80℃),已很难区分酶的热不稳定部分和耐热部分。

3 结论

3.1 采用超滤和色谱分离技术可以从牛初乳中的SIgA、LP与LF进行完全分离,纯化倍数达191倍,可分离获得单一区带的LP。

3.2 在此过程中,LP酶活损失不大,酶活回收率为76.17%。

3.3 LP最适pH为5.0~5.5,在pH3~8范围内稳定。LP的最适温度为55℃,比一般的植物性过氧化物酶的热稳定差。在70、75℃时LP酶活的热失活曲线呈现一般植物过氧化物酶失活的双相特征。温度越高,耐热部分所占的比例越低。

参考文献:

- [1] Martin M, Donald E H. Lactoperoxidase[J]. J of Bio Chem, 1963, 238 (8): 2846-2847.
- [2] Shahani K M, Harper W J, Jensen R G, et al. Enzymes in bovine milk:

谷氨酰胺转胺酶作用的酸奶超微结构电镜观察

马 微¹, 杨会琴², 王海波¹, 张兰威^{3,*}

(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 Wei¹, YANG Hui-qin², WANG Hai-bo¹, ZHANG Lan-wei^{3,*}

(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.