

# pH 对乳糖-乳铁蛋白复合物结构及理化特性的影响

黄利华<sup>1</sup>, 陈帅<sup>2</sup>, 张业辉<sup>2\*</sup>, 张友胜<sup>2</sup>, 江如蓝<sup>3</sup>, 钟伟锐<sup>4</sup>, 焦文娟<sup>2</sup>, 赵甜甜<sup>2</sup>

(1. 广州城市职业学院食品科学与美食养生学院, 广东广州 510405) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

(3. 加州大学戴维斯分校营养系, 美国加州 95616) (4. 汕尾市五丰海洋生物技术有限公司, 广东汕尾 516626)

**摘要:** 为了探究热处理条件下不同 pH 对乳铁蛋白(LF)-乳糖复合物的结构与理化特性的作用, 对 LF-乳糖复合物的浊度、粒径、微观结构和构象进行测定。结果表明: 在不同 pH (2~10) 条件下, LF-乳糖以不同的结构存在。在 pH 为 2 和 4 的酸性环境中, LF 和乳糖处于共溶状态, 热处理前后溶液浊度没有明显变化, 其粒径维持在 10 nm 左右。在弱酸性和碱性环境中 (6~10), LF 和乳糖形成复合物, 其溶液浊度明显增大, 其粒径也从约 10 nm 增加到约 460 nm。扫描电镜 (SEM) 显示了其结构从零散分布到线性聚集, 再到团状聚集的过程。红外光谱 (FT-IR) 显示了复合物形成后的酰胺带和 890 cm<sup>-1</sup> 处  $\beta$ -糖苷键的特征峰的变化。圆二色谱 (CD) 显示  $\alpha$ -螺旋随 pH 增加从 20.62% 减少到 18.23%,  $\beta$ -折叠则逐渐从 33.35% 增加到 37.17%。SDS-PAGE 图谱表明, 碱性条件下生成了以非二硫键为主要作用力的聚集体。研究结果拓展了乳铁蛋白在食品中的应用。

**关键词:** 乳糖; 乳铁蛋白; 微观结构; 构象

文章编号: 1673-9078(2022)05-64-70

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.0929

## The Effects of pH on Structure and Physicochemical Properties of Lactose-Lactoferrin Complex

HUANG Lihua<sup>1</sup>, CHEN Shuai<sup>2</sup>, ZHANG Yehui<sup>2\*</sup>, ZHANG Yousheng<sup>2</sup>, JIANG Rulan<sup>3</sup>, ZHONG Weirui<sup>4</sup>, JIAO Wenjuan<sup>2</sup>, ZHAO Tiantian<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Health, Guangzhou City Polytechnic, Guangzhou 510405, China) (2. Sericulture & Agri-food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing Processing, Guangzhou 510610, China) (3. Department of Nutrition, University of California, Davis, California 95616, USA) (4. Shanwei Wufeng Marine Biotechnology Co. Ltd., Shanwei 516626, China)

**Abstract:** The turbidity, particle size, microstructure, Fourier transform infrared spectroscopy, circular dichroism chromatography and SDS-PAGE electrophoresis of the LF/lactose complex were measured for determining the structure and characteristics of LF-lactose complex under different pH conditions. The results showed that LF-lactose existed in different forms at different pH. LF and lactose were in a co-solvent state in acidic environment (pH 2 and 4). The turbidity of the solution did not change significantly after heat treatment, and the particle size was maintained at about 10 nm. LF and lactose formed a complex in a weakly acidic and alkaline environment (pH 6~10), its particle size increased from 10 nm to 460 nm. Scanning electron microscopy (SEM) showed the process of the complex structure from scattered distribution to linear

引文格式:

黄利华,陈帅,张业辉,等.pH 对乳糖-乳铁蛋白复合物结构及理化特性的影响[J].现代食品科技,2022,38(5):64-70,+217

HUANG Lihua, CHEN Shuai, ZHANG Yehui, et al. The effects of pH on structure and physicochemical properties of lactose-lactoferrin complex [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 64-70, +217

收稿日期: 2021-08-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31972021); 广东省重点研发计划项目 (2019B020212003; 2021B0202060001); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项 (2021KJ117); 广东省农科院人才项目 (R2018PY-JX002); 岭南重点实验室项目 (NZ2021033); 佛山市科技项目 (基塘农业关键技术研究示范); 广东省农业科学院水产中心建设项目; 广东省对外合作项目 (2018A050506048)

作者简介: 黄利华 (1979-), 女, 副教授, 硕士, 研究方向: 食品科学, E-mail: hlh@gcp.edu.cn

通讯作者: 张业辉 (1979-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品加工, E-mail: zhangyhx@163.com

aggregation, and then to cluster aggregation. Infrared spectroscopy (FT-IR) showed the amide band and changes of characteristic peaks of  $\beta$ -glycosidic bonds at  $890\text{ cm}^{-1}$  after the formation of the complex. Circular dichroism (CD) showed that the  $\alpha$ -helix decreases from 20.62% to 18.23% with the increase of pH, and  $\beta$ -folding gradually increased from 33.35% to 37.17%. The SDS-PAGE showed that aggregates with non-disulfide bonds as the main force were formed under alkaline conditions. The results expand the application of lactoferrin in food.

**Key words:** lactose; lactoferrin; microstructure; conformation

乳铁蛋白 (Lactoferrin, LF) 是一种与铁结合的转运糖蛋白, 在人的机体中参与铁的转运, 并具有抗氧化、抗菌、调节免疫系统等功能活性, 是哺乳动物免疫系统中的重要成分。食品中的乳铁蛋白是一种从牛初乳中提取的铁结合性糖蛋白<sup>[1]</sup>, 其分子量约为 80 ku, 由约 689 个氨基酸组成 LF 的一级结构。乳铁蛋白的等电点在 8.4~9.0 之间, 高于大多数食品蛋白质<sup>[2,3]</sup>。LF 的三级结构由两个对称的子叶 (N 叶和 C 叶) 组成, 即乳铁蛋白多肽链的 N 末端和 C 末端, 由一个短  $\alpha$ -螺旋连接<sup>[4]</sup>。LF 包含两个热变性温度峰 (61 和 93 °C), 分别对应于 N-和 C-叶上的展开<sup>[5]</sup>。乳铁蛋白具有广泛的生理活性, 例如抗菌活性、抗氧化活性、抗炎活性、免疫调节特性、抗癌等<sup>[6-8]</sup>, 表明它在增强免疫力与抗癌方面可能具有较好的应用价值。此外, LF 是一种生物降解性好、生物相容性高、无毒性的天然化合物, 在婴幼儿食品、化妆品和医药产品中同样具有广泛的应用<sup>[9]</sup>。《国家标准 GB14880-2012》允许在婴儿配方奶粉中添加乳铁蛋白, 其添加量 $\leq 1.0\text{ g/kg}$ 。

蛋白质的热敏性是限制 LF 应用的原因之一, 蛋白质经过加热处理后暴露了疏水性基团, 导致蛋白质聚集, 聚集体之间不断发生相互作用, 最终导致沉淀的形成<sup>[10]</sup>。据文献报道蛋白质与多糖结合形成共价或非共价复合物, 能提高 LF 在加工过程中的热稳定性。已有研究表明, 多糖的加入可以抑制蛋白质的热变形, 提高蛋白质多糖复合物的热稳定<sup>[11-13]</sup>。此外, 在不同的 pH 条件下, 蛋白质多糖复合物还可以形成大小可控的粒子, 这有利于研究蛋白质多糖复合物作为食品或药物的载体<sup>[14]</sup>。因此, 本文主要研究了不同 pH 诱导 LF-乳糖复合物的形成过程、微观结构与理化性质的变化规律, 研究结果为提高乳铁蛋白在食品中的应用提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

乳铁蛋白 (纯度 $\geq 91\%$ ), 湖北威德利化学科技有限公司; 乳糖, 天津市福晨化学试剂厂; 碧云天试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 甲醇, 天津市百世化工有限公司; 冰乙酸, 天津市富宇精细化工有限

公司;  $\beta$ -巯基乙醇, 天津市大茂化学试剂厂; 考马斯亮蓝, 上海源叶生物科技有限公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS), 天津市福晨化学试剂有限公司; 其余试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

UV-1800 型紫外分光光度计, 日本岛津公司; 电泳仪, 美国 Thermo Fisher 公司; ST85B3-1 型真空冷冻干燥机, 美国 Milirock 公司; JascoJ-815 型圆二色谱仪, 日本分光公司; VERTEX33 型傅里叶变换红外光谱仪, 德国 Bruker 公司; SZ-100 纳米颗粒分析仪, 美国 Malvern Instruments 公司; S-3400N 型扫描电子显微镜, 日本 Olympus 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 LF-乳糖糖复合物的制备

LF 和乳糖分别溶解在蒸馏水中, 加入 0.02% ( $m/V$ ) 叠氮化钠, 以防止细菌生长, 室温 (22 °C) 搅拌 2 h, 制备固定浓度为 1% ( $m/V$ ) 的原溶液。把制备好的溶液用保鲜膜封口, 在冰箱 (4 °C) 中保存过夜, 以确保完全水合。

LF 和乳糖溶液 1:1 ( $V/V$ ) 的比例混合, 得到混合溶液中 LF 和乳糖的浓度均为 0.5% ( $m/V$ )。用 1.0 N 盐酸和 0.1 N 的氢氧化钠将混合溶液的 pH 调节至设想值 (2~10), 加入一定比例的氯化钠使溶液的离子强度为 50 mmol/L, 室温搅拌 2 h 后, 将混合溶液装入有螺纹的玻璃瓶中, 于 90 °C 的恒温水浴中加热 30 min。热处理结束后, 将样品立即放入冰水中冷却至室温以防止进一步变性。

#### 1.3.2 浊度测定

浊度的测量采用 Li 等<sup>[15]</sup>的方法。使用 UV-1800 型紫外分光光度计在 600 nm 处测定不同 pH 条件下 LF-乳糖溶液的浊度。以去离子水为空白对照, 对浊度值进行校正。摇匀后测定, 每个样品一式三份。

#### 1.3.3 粒径测定

使用美国 Malvern Instruments 公司的 SZ-100 纳米颗粒分析仪测定样品的粒径大小及分布。数据报告为平均直径或体积直径。

#### 1.3.4 扫描电子显微镜 (SEM)

将冻干的 LF-乳糖复合物粉末用双面胶带固定在圆形铝桩上,用离子溅射仪镀金后,在 15 kV 加速电压下用扫描电子显微镜(日本 Olympus 公司的 S-3400N)进行检查和拍照。

### 1.3.5 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)

将冷冻干燥后的 LF-乳糖复合物与溴化钾(KBr)按 1:100 的比例进行混合压片后,在 400~4000  $\text{cm}^{-1}$  范围内进行光谱扫描,分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ ,扫描 32 次。

### 1.3.6 圆二色谱测定

分别移取 300  $\mu\text{L}$  不同 pH 条件下的 LF-乳糖复合物溶液于光程为 1 mm 的比色皿中,在波长为 190~260 nm,持续通入氮气的条件下,进行样品的圆二图谱扫描,重复两遍实验。

### 1.3.7 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

参考 Laemmli<sup>[16]</sup>的方法,根据电泳试剂盒说明书,选用 4%浓缩胶和 10%分离胶进行配胶。取 0.5 mL 样品溶液与等体积上样缓冲溶液进行混合,煮沸 5 min,于冰水混合物中冷却并恢复至室温后上样,每孔上样量 10  $\mu\text{L}$ 。采用恒压模式,浓缩胶时电压为 25 V,分离胶电压为 80 V,凝胶用染色液(含 0.02%考马斯亮蓝,45%甲醇和 10%冰乙酸)染色 2~4 h,随后用脱色液(含 45%甲醇和 10%冰乙酸)脱色至条带清晰可见并进行拍照。

还原 SDS-PAGE 中上样缓冲液中加入 10%  $\beta$ -巯基乙醇,其他同上。

## 1.4 数据分析

测定和分析结果采用 Origin 8.0、CDNN 和 Prodata 软件处理数据,SPSS V20.0 软件进行单因素差异性及相关性分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同 pH 条件下 LF-乳糖复合物的浊度变化

如图 1a 所示,所有溶液在热处理前都是透明的。相比之下,加热后 B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 组仍然澄清,B<sub>3</sub>/B<sub>4</sub>/B<sub>5</sub> 出现浑浊。此外,在 B<sub>3</sub>/B<sub>4</sub>/B<sub>5</sub> 玻璃瓶可以观察到大的聚集体,而且聚集体随着 pH 的增大也逐渐增多,这显然是热处理后 LF 分子的变性和聚集所致<sup>[17,18]</sup>。

热处理前后不同 pH 值条件下样品的浊度变化如图 1b 所示。加热前,pH 值对 LF-乳糖复合物的浊度基本没有影响,复合物溶液在的吸光值大约在 0.05 左右,溶液呈澄清透明状态。加热后,随着混合溶液中 pH 值的增加,LF-乳糖复合物的浊度逐渐变大。特别

是在 pH 值 6 时,复合物溶液的浊度开始急剧增加(吸光值约 pH 为 2 时的 30 倍),直到 pH 值为 10,吸光值增加到 2.4 左右。从图中可以看出,高 pH 值条件下,热处理后 LF-乳糖复合物的变性和聚集更易发生,这可能与 LF 分子在碱性环境中对热不稳定的原因有关<sup>[19]</sup>。

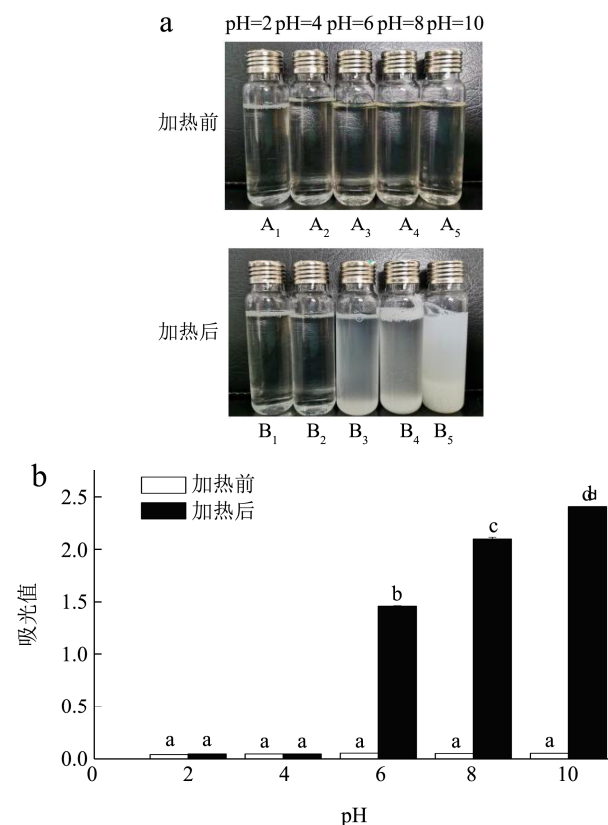


图 1 热处理前后不同 pH 条件下 LF-乳糖复合物外观变化(a)及浊度变化(b)

Fig.1 Appearance (a) and turbidity (b) of the LF-lactose complex at different pH before and after heat treatment

### 2.2 不同 pH 条件对 LF-乳糖复合物粒径的影响

在不同 pH 条件下热处理后 LF-乳糖复合物的平均粒径如图 2a 所示,从图中可以明显的得出,环境中 pH 对 LF-乳糖复合物颗粒的形成具有促进作用。随着混合溶液中 pH 的增加,LF-乳糖复合物颗粒呈显著增大的趋势,在 pH=10 时,LF-乳糖复合物颗粒粒径达到最大值 465 nm。在强酸性环境中(pH=2 和 pH=4),LF 和乳糖分子呈共溶状态,颗粒平均直径基本维持在 10 nm 左右。在弱酸和碱性环境中(pH=6、pH=8 和 pH=10),LF-乳糖复合物的粒径形成,并逐渐变大(224 增加到 467 nm),这可能与 LF 在弱酸和碱性环境中不稳定相关<sup>[20,21]</sup>。当复合物中静电相互作用较弱且净电荷相对较高时,可溶复合物就会形成。相反,当静电相互作用较强且净电荷较低时,就会形成共聚物<sup>[22]</sup>。热处理导致 LF-乳糖复合物聚集体的形成,弱酸和碱

性环境降低了 LF 本身的正电荷,从而引起了 LF-乳糖复合物聚集体间的静电斥力降低,聚集体之间不断相互作用,最终导致沉淀的生成。从图 1a 中瓶底部的沉淀也可以说明,pH 值越大 LF-乳糖溶液中沉淀越多。

为了更好地说明不同 pH 值对 LF-乳糖复合物颗粒形成的影响,我们测定了样品的尺寸分布,如图 2b 所示。在 pH=2 和 pH=4,溶液的粒径基本一致,分布很窄;随后随着 pH 值的增加粒径分布的峰值明显向大尺寸方向移动,同时也发现更宽的尺寸分布,这也表明 LF-乳糖复合物的形成。

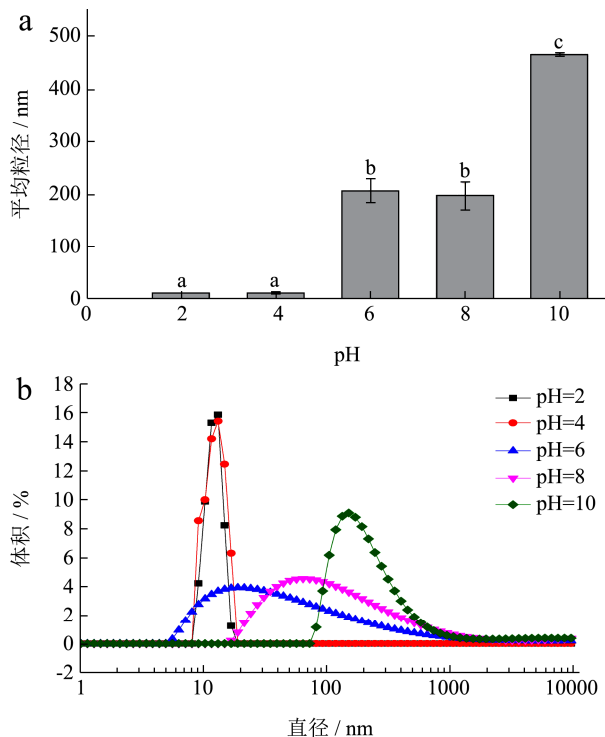


图 2 热处理后不同 pH 条件下 LF-乳糖复合物的粒径大小 (a) 和粒径分布 (b)

Fig.2 Particle size (a) and particle size distribution (b) of LF-Lactose complex at different pH values after heat treatment

### 2.3 不同 pH 条件下 LF-乳糖复合物的微观结构

采用扫描电镜表征不同形态的 LF-乳糖复合物微观结构。图 3 显示, LF、乳糖均呈球状或椭圆状, LF 分子相对较大。图 3b 和 3c 中, LF 和乳糖分子呈无规则状态,这是由于在强酸环境中 LF 和乳糖分子均被质子化,静电斥力阻碍了 LF 与乳糖的结合,它们处于共溶状态<sup>[23]</sup>。在宏观图 1a 中,也可以明显的看到 LF-乳糖呈透明状态。图 3d 和 3e 中,可以明显看到 LF 和乳糖结合在一起, NaCl 附着在其表面形成盐桥促进 LF-乳糖复合物的形成。并且随着 pH 值的变大, LF-乳糖复合物之间进一步发生相互作用,形成更大的聚集体。但是在粒径结果中,在 pH=6 和 pH=8 时,

LF-乳糖复合物的粒径变化不大,说明测聚集集体之间主要靠盐键连接,聚集体在水溶液中部分溶解。在图 3f 中 (pH=10), 观察到长条状聚合物,由于 LF 分子在碱性条件中不稳定,加热处理后, LF 分子完全变性,导致蛋白分子间聚集,生成沉淀。图 2a 和图 1a 中复合溶液的粒径的突然增大以及玻璃瓶底部有大量沉淀的生成也可以说明了这点。除此之外,有关报道指出, LF 在 90 °C 10 min 条件下就完全变性,丧失其原有的空间结构<sup>[4]</sup>,但在 LF-乳糖复合物中发现 LF 的原有的球形结构 (pH=6 和 pH=8), 因此可以推测,乳糖的加入一定程度上抑制了 LF 的热变性。

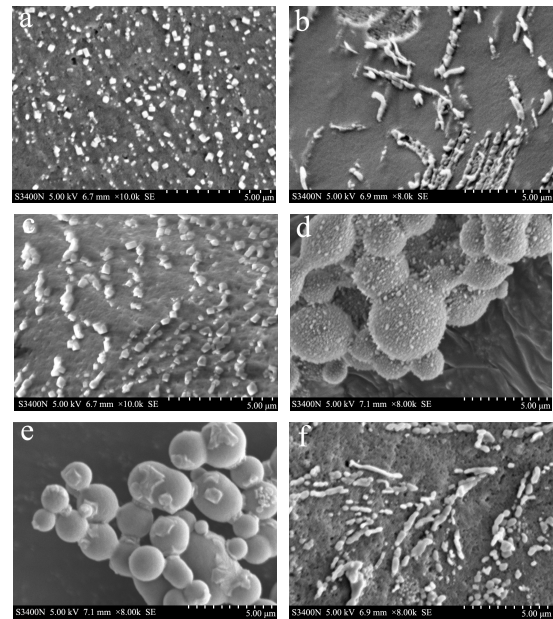


图 3 热处理后不同 pH 条件下 LF-乳糖复合物扫描电镜图  
Fig.3 SEM of LF-lactose complex at different pH after heat treatment

注: a: LF; b: pH=2; c: pH=4; d: pH=6; e: pH=8; f: pH=10。

### 2.4 不同 pH 条件下 LF-乳糖复合物的红外光谱分析

乳铁蛋白、乳糖及不同 pH 条件下 LF-乳糖复合物的红外光谱图如图 4 所示。LF 和乳糖在酰胺 A 带 (3000~3700  $\text{cm}^{-1}$ ) 内有个很宽的峰,这是由于-OH 的伸缩振动引起的。LF 在酰胺一带 (1600~1700  $\text{cm}^{-1}$ ) 和酰胺二带 (1500~1600  $\text{cm}^{-1}$ ) 均有峰值,这是 LF 分子中的肽键产生的,其中酰胺一带 (1652.77) 主要由 C=O 伸缩振动产生的,酰胺二带 (1542.51) 是由 N-H 的弯曲振动和 C-N 伸缩振动产生的<sup>[24]</sup>。乳糖在酰胺一带有峰值 (1654.97), 这是乳糖中 C=O 伸缩振动引起的,在 890  $\text{cm}^{-1}$  吸收峰是乳糖中  $\beta$ -糖苷键的特征峰<sup>[25]</sup>。

在所有复合物样品中都存在酰胺带（酰胺一带和酰胺二带）和 890  $\text{cm}^{-1}$  处  $\beta$ -糖苷键的特征峰，这说明 LF 与乳糖发生了相互作用形成了 LF-乳糖复合物。

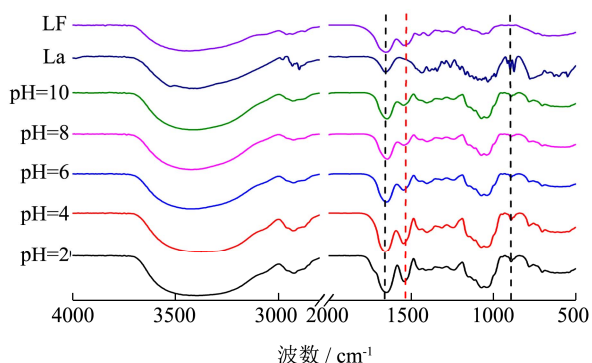


图4 热处理后不同 pH 条件下 LF-乳糖复合物的 FT-IR 光谱(乳糖, La)

Fig.4 FT-IR spectra of LF-lactose complex at different pH after heat treatment (Lactose, La)

表 1 不同 pH 下 LF-乳糖复合物对应的光谱带分析

Table 1 Spectral band analysis of LF-lactose complex at different pH values

pH	酰胺 A 带 (3000~3700 $\text{cm}^{-1}$ )	酰胺一带 (1600~1700 $\text{cm}^{-1}$ )	酰胺二带 (1500~1600 $\text{cm}^{-1}$ )
2	3396.36	1647.73	1540.63
6	3410.33	1648.85	1545.17
10	3421.32	1645.23	1544.81

如表 1 所示，总的来说，当混合溶液的 pH 值为酸性时，LF-乳糖复合物的酰胺 I 带和酰胺 II 带略有蓝移现象，酰胺 A 带由 3410.33  $\text{cm}^{-1}$  蓝移至 3396.36  $\text{cm}^{-1}$ 。当混合溶液的 pH 值为碱性时，LF-乳糖复合物的酰胺 I 带和酰胺二带略有蓝移现象，而酰胺 A 带由 3410.33  $\text{cm}^{-1}$  红移至 3421.32  $\text{cm}^{-1}$ ，这表明混合溶液的酸碱性影响了 LF-乳糖复合物的-OH。可能是由于混合溶液中环境的酸碱性改变了-OH 伸缩振动的大小，从而导致酰胺 A 带的蓝移或红移现象。

### 2.5 不同 pH 条件对 LF-乳糖复合物二级结构的影响

LF-乳糖复合物不同 pH 值条件下二级结构的变化如图 5 所示。有报道称 LF 的远紫外图谱含有两个特征吸收峰，在 195 nm 左右的正峰带和 210 nm 左右的负峰带<sup>[26]</sup>，这是蛋白质二级结构的典型峰。从图中可以明显看出，随着溶液中 pH 值逐渐增大，195 nm 左右的正峰带强度变化较小，210 nm 左右负峰带的强度逐渐减弱，这说明随着溶液中 pH 值逐渐增大，更多的二级结构遭到破坏，这与 LF 在碱性条件下不稳定

是一致<sup>[19]</sup>。氢键是维持蛋白质二级结构最主要的作用力。这种变化可能是因为酸性环境中增强了氢键作用力，从而保护了 LF 的二级结构不受破坏；而碱性环境中，降低了氢键作用力，破坏了 LF 的二级结构。此外，在酸性条件下 (pH=2 和 pH=4) 210 nm 左右负峰带有蓝移现象，这与红外分析结果一致。

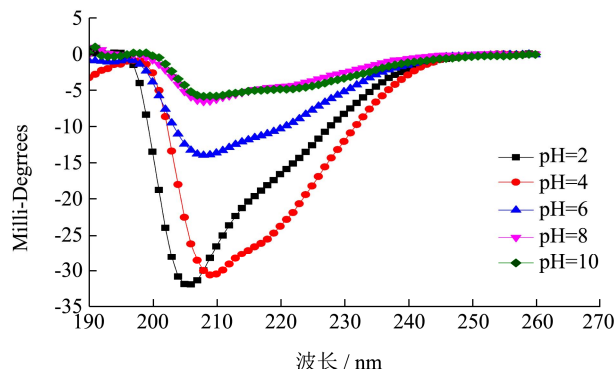


图5 热处理后不同 pH 条件下 LF-乳糖复合物的 CD 色谱

Fig.5 CD chromatography of LF-lactose complex at different pH after heat treatment

表 2 热处理后不同 pH 条件下 LF-乳糖复合物的二级结构变化

Table 2 Secondary structure changes of LF-lactose complex at different pH after heat treatment

pH	$\alpha$ -螺旋/%	$\beta$ -折叠/%	$\beta$ -转角/%	无规则卷曲/%
2	20.62	33.35	20.62	26.38
4	20.96	33.93	20.28	26.35
6	19.94	34.57	20.59	27.22
8	19.40	35.12	20.30	27.07
10	18.23	37.17	20.52	28.41

通过 Prodata 和 CDNN 软件处理圆二图谱计算二级结构的变化，如表 2 所示。可以得出， $\alpha$ -螺旋含量逐渐降低，同时无规则卷曲和  $\beta$ -折叠含量逐渐增大， $\beta$ -转角基本保持不变。由于 LF-乳糖复合物中 LF 分子在碱性环境中不稳定，热处理加大了蛋白分子变性的程度，导致  $\alpha$ -螺旋展开，蛋白质中其他结构向无规则卷曲和  $\beta$ -折叠转变，引起其含量增加<sup>[27]</sup>。黎庆等<sup>[28]</sup>和刘猛等<sup>[4]</sup>在研究 LF 的热变性时，也发现其二级结构中  $\alpha$ -螺旋含量降低， $\beta$ -折叠含量升高，与本研究结果相似。

### 2.6 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

由图 6a 可以看出，LF 在 66~95 ku 区域内有一条密度较高的宽大条带。在 pH 为 2 时，条带的密集度明显降低，这可能由于在强酸性环境中 LF 发生降解。有研究报道表明，LF 在 pH=2 时，部分高级结构展开，

释放大量的铁离子<sup>[29,30]</sup>。在 pH 为 4 时条带密度与 LF 相同, pH 为 6 时, 条带密度略微减低, 这说明 LF-乳糖复合物在 pH=6 时出现变性。在 pH 为 8 时, 只有一条很浅的条带, 同时在浓缩胶顶端也有条带, 这说明 LF-乳糖复合物形成大量聚集体, 且大部分聚集体不能进入分离胶。在 pH 为 10 时, LF-乳糖复合物几乎全部形成了更大的聚集体, 聚集体堆积在浓缩胶顶端, 不能进入分离胶。

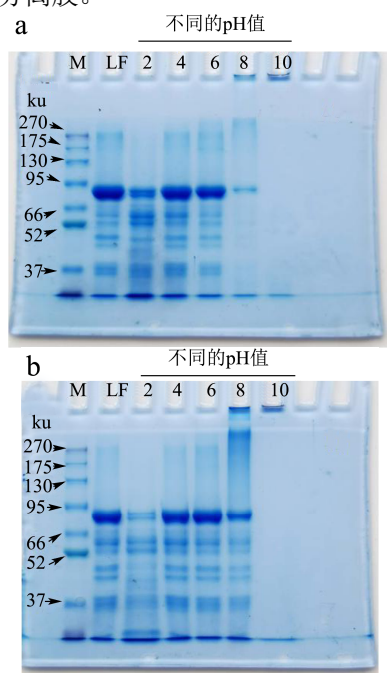


图 6 热处理后不同 pH 条件下 LF-乳糖复合物的 SDS-PAGE 图谱

Fig.6 SDS-PAGE diagram of LF-lactose complex at different pH after heat treatment

注: a: 非还原的; b:  $\beta$ -巯基乙醇还原后的。

弱酸和碱性环境中 LF-乳糖分子均发生交联, 碱性越强交联越紧密, 导致形成聚集体, 且相对分子质量增大, 不能通过浓缩胶。但在还原性电泳图谱中(图 6b), 只有 pH 为 8 时条带明显加深, pH 为 6 时条带略微加深, 而且在 pH 为 8 和 10 时, 在浓缩胶顶端仍发现聚集体, 这说明在碱性环境中形成了不被  $\beta$ -巯基乙醇破坏的聚集体。闫旭东等<sup>[31]</sup>研究表明, 较强烈的热处理打断了 LF 分子内的二硫键从而释放出游离的巯基, 导致了 LF 分子结构的巨大改变。因此可以推测这种聚集体可能以非二硫键的共价键或以静电作用和疏水相互作用为主的非共价键作用形成<sup>[28]</sup>。倪娜等<sup>[32]</sup>在研究 pH 对羊血浆蛋白热诱导凝胶特性时, 也发现在 pH=5.0、85 °C 的持续加热导致了凝胶中非二硫共价键的形成。

### 3 结论

pH 值可以调控 LF-乳糖复合物的粒径大小, 随着

pH 值 (2~10) 逐渐增大, LF-乳糖复合物的粒径也不断增大 (从 10 到 460 nm)。弱酸性环境中, LF-乳糖复合物中仅有少量的蛋白分子变性, LF-乳糖复合物主要以盐键和氢键作用形成。碱性环境中, 蛋白分子大量变性, 形成大量聚集体, 聚集体间主要以静电作用及疏水作用形成。不同的 pH 值条件, 影响了形成 LF-乳糖复合物的主要作用力, 改变了 LF-乳糖复合物结合状态, 导致其在水溶液中不同的存在形式。本研究结果对探索多羟基物质对 LF 分子结构和功能的变化提供一定的理论参考, 也拓宽了乳铁蛋白在食品中的应用。

### 参考文献

- [1] Lisa A Lambert, Perri Holly, Meehan T J. Evolution of duplications in the transferrin family of proteins [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 140(1): 11-25.
- [2] Sebastien Farnaud, Evans Robert. W. Lactoferrin - a multifunctional protein with antimicrobial properties [J]. *Molecular Immunology*, 2003, 40(7): 395-405
- [3] Carlos Bengoechea, Jones Owen-G, Guerrero Antonio, et al. Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: impact of composition, pH and thermal treatment [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(5): 1227-1232
- [4] 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 [J]. *食品科学技术学报*, 2013, 31(2): 26-30  
LIU Meng, DU Ming, KONG Yingying, et al. Purification and effect of heat treatment on molecular characteristics of lactoferrin [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2013, 31(2): 26-30
- [5] Carlos Bengoechea, Peinado Irene, McClements David-Julian. Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: factors affecting particle characteristics [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(5): 1354-1360
- [6] Isui-Abril García-Montoya, Cendón Tania Siqueiros, Arévalo Gallegos Sigifredo, et al. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2012, 1820(3): 226-236
- [7] Francesco Giansanti, Panella Gloria, Leboffe Loris, et al. Lactoferrin from milk: nutraceutical and pharmacological properties [J]. *Pharmaceuticals*, 2016, 9(4): 61
- [8] M Tomita, Wakabayashi H, Shin K, et al. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications [J]. *Biochimie*,

- 2009, 91(1): 52-57
- [9] Fuguo Liu, Zhang Shuhan, Li Junyi, et al. Recent development of lactoferrin-based vehicles for the delivery of bioactive compounds: complexes, emulsions, and nanoparticles [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 79: 67-77
- [10] Kelsey N Ryan, Foegeding E Allen. Formation of soluble whey protein aggregates and their stability in beverages [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43: 265-274
- [11] Huang Guoqing, Sun Yanting, Xiao Junxia, et al. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan [J]. Food Chemistry, 2012, 135(2): 534-539
- [12] Yang Yuan, Wan Zhili, Yang Xiaoquan, et al. Associative interactions between chitosan and soy protein fractions: effects of pH, mixing ratio, heat treatment and ionic strength [J]. Food Research International, 2014, 55: 207-214
- [13] 齐军茹,翁静宜,康燕辉,等.大豆酸溶蛋白/大豆多糖纳米乳液的制备及表征[J].现代食品科技,2015,31(6):136-141
- QI Junru, ONG Jingyi, KANG Yanhui, et al. Preparation and characterization of nano-sized emulsions Produced from acid-soluble soy protein and polysaccharide complexes [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(6): 136-141
- [14] Wei Xu, Jin Weiping, Hu Ying, et al. Tunable self-assembly of nanogels into superstructures with controlled organization [J]. RSC Adv, 2014, 4(67): 35268-35271
- [15] Quanyang Li, Zhao Zhengtao. Formation of lactoferrin/sodium caseinate complexes and their adsorption behaviour at the air/water interface [J]. Food Chemistry, 2017, 232: 697-703
- [16] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685
- [17] Guillaume Brisson, Britten Michel, Pouliot Yves. Heat-induced aggregation of bovine lactoferrin at neutral pH: effect of iron saturation [J]. International Dairy Journal, 2007, 17(6): 617-624
- [18] Ricky S H Lam, Nickerson Michael T. The effect of pH and temperature pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of alpha-lactalbumin [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 163-170
- [19] 张红,罗永康,陈铁涛,等.乳铁蛋白热稳定性及热变性动力学的研究[J].中国乳品工业,2006,4:20-23
- ZHANG Hong, LUO Yongkang, CHEN Tietang, et al. Study on thermal stability and thermodynamics of lactoferrin [J]. China Dairy Industry, 2006, 4: 20-23
- [20] 桑亚新,王向红,孙纪录,等.乳铁蛋白及其生理功能研究进展[J].河北农业大学学报,2003,S1:154-156
- SANG Yaxin, WANG Xianghong, SUN Jilu, et al. Recent development and physiological functions of lactoferrin [J]. Journal of Hebei Agricultural University, 2003, S1: 154-156
- [21] Hiroaki Abe, Saito Hitoshi, Miyakawa Hiroshi, et al. Heat stability of bovine lactoferrin at acidic pH [J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74(1): 65-71
- [22] David-Julian McClements, Decker Eric-Andrew, Park Yeonhwa, et al. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2009, 49(6): 577-606
- [23] Kelvin-K-T Goh, Sarkar Anwesha, Singh Harjinder. Chapter 12-Milk Protein-polysaccharide Interactions [M]. San Diego: Academic Press, 2008: 347-376
- [24] H Yang, Yang S, Kong J, et al. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy [J]. Nat Protoc, 2015, 10(3): 382-396
- [25] 周鹏,谢明勇,傅博强.多糖的结构研究[J].南昌大学学报(理科版),2001,2:197-204
- ZHOU Peng, XIE Mingyong, FU Boqiang. Study on the structure of polysaccharides [J]. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2001, 2: 197-204
- [26] Sharon M Kelly, Jess Thomas J, Price Nicholas C. How to study proteins by circular dichroism [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2005, 1751(2): 119-139
- [27] Sekai Ngarize, Adams Alf, Howell Nazlin-K. Studies on egg albumen and whey protein interactions by FT-Raman spectroscopy and rheology [J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18(1): 49-59
- [28] 黎庆,景浩.卵转铁蛋白和乳铁蛋白的热处理稳定性的比较研究[J].食品工业科技,2016,37(19):101-106
- LI Qing, JING Hao. Comparison of thermal stability of ovotransferrin and lactoferrin [J]. Food Industry Technology, 2016, 37(19): 101-106
- [29] Heather-M Baker, Baker Edward-N. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release [J]. BioMetals, 2004, 17(3): 209-216

(下转第 217 页)