

猪血清 IgG 干燥方式及干燥保护剂的应用

罗磊¹, 朱文学¹, 张绍华²

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 洛阳 471003; 2. 南阳市卫生防疫站, 南阳 473000)

摘要: 为寻求符合实际生产需要的猪血清 G 型免疫球蛋白 (IgG) 干燥技术, 该文探讨了猪血清 IgG 喷雾干燥的可行性和热保护剂的实际作用, 对不同干燥方式所得 IgG 产品活性和纯度进行了对比研究。结果表明: 20% (m/V) 的脱脂乳粉、0.5% (m/V) 的甘氨酸和 5% (m/V) 的麦芽糖混合后作为热保护剂能够有效地减少喷雾干燥时 IgG 的活性损失; 海藻糖能够降低 IgG 冷冻干燥时的活性损失。干燥方式和是否添加保护剂决定了产品中 IgG 的含量和活性保留率的高低。

关键词: 喷雾干燥, 应用, 冷冻干燥, 干燥保护剂, 猪血清 IgG, 活性保留率

中图分类号: Q503, S37

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2009)-4-0281-05

罗磊, 朱文学, 张绍华. 猪血清 IgG 干燥方式及干燥保护剂的应用[J]. 农业工程学报, 2009, 25(4): 281-285.

Luo Lei, Zhu Wenxue, Zhang Shaohua. Application of different protectants and drying methods for porcine serum immunoglobulin G[J]. Transactions of the CSAE, 2009, 25(4): 281-285. (in Chinese with English abstract)

0 引言

免疫球蛋白能够有效地预防和治疗婴幼儿及成人由大肠杆菌和轮状病毒引发的腹泻, 还可以预防龋齿和治疗类风湿关节炎。猪血中免疫球蛋白含量很高, 其中以 G 型免疫球蛋白 (Immunoglobulin G, 简称 IgG) 为主, 其含量为血清蛋白的 17%, 免疫球蛋白总量的 80%。根据国家统计局的数据, 2004 年中国有 140 万 t 猪血产量, 而这些猪血并没有得到有效的利用, 因此从猪血中提取免疫球蛋白具有“变废为宝”的作用^[1,2]。

将从猪血清中得到的免疫球蛋白干燥成固体, 有利于产品的运输和保藏。冷冻干燥可以避免 IgG 活性的大量损失, 但设备昂贵、处理量较小、干燥时间长的缺点一直难以解决。喷雾干燥具有处理量大, 可连续生产, 干燥时间短, 生产成本低等优点。但是干燥过程持续时间约为 15~30 s, 料液液滴的温度 70~90℃, 因变性失活引起的 IgG 损失较大^[3-5]。

为了提高免疫球蛋白的热稳定性, 减少分离制备过程中 IgG 的活性损失, 郑海英对微胶囊化提高牛初乳免疫球蛋白稳定性进行了研究^[6]; Chen 等研究了热稳定剂对牛乳 IgG 的保护作用^[7,8]。这些研究在理论上探讨了提高牛乳中 IgG 稳定性的途径, 而猪血 IgG 稳定化方面的研究尚属空白; 同时, 对于稳定剂在实际生产中的应用, 特别是喷雾干燥中应用的可行性和实际效果未进行深入的研究。为了得到高活性的猪血清 IgG 产品, 同时降低生产成本, 本文对猪血清 IgG 变性温度、干燥方式、干燥保护剂的保护作用和各自特点进行了研究, 以便生产者根据各自的产品要求, 选择适合的干燥方式^[9]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猪血采自无锡肉联厂, 4℃, 8000 r/min 离心 10 min, 除去血球和纤维蛋白原, 得到猪血清。猪血清 IgG 和兔抗猪酶抗体由 Sigma 公司购得。脱脂乳粉由雀巢公司生产, 其他试剂为生化试剂或分析纯。

1.2 试验设备

MK3 酶标仪 (上海雷勃仪器厂); TGL16 台式冷冻离心机 (中科院武汉科学仪器厂); DY-501 型电泳仪 (上海万达科技器材服务部); Pyris-1 型差示量热扫描仪 (Perkin-Elmer 公司); 离心式喷雾干燥机 (无锡市林洲喷雾干燥设备厂); LGJ-1 冷冻干燥机 (上海医用分析仪器厂)。

1.3 测定方法

蛋白质组成分析: 对反应后的样品进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并扫描分析电泳结果^[10]。

IgG 活性测定: 将待测样品稀释到合适浓度, 直接酶联免疫吸附法测定样品中活性 IgG 含量^[11]。

水分测定: 105℃干燥法^[12]。

蛋白含量采用电泳法测定。

回收率、纯度和活性保留率计算: 根据电泳扫描分析和直接酶联免疫吸附法测定结果, 按照以下公式计算回收率 (Recovery rate)、纯度 (Purity) 和活性保留率 (Activity Preservation Rate):

$$\text{回收率} = \frac{\text{样品中IgG含量}}{\text{猪血清中IgG总量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{纯度} = \frac{\text{样品中IgG含量}}{\text{猪血清中蛋白质总量}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{活性保留率} = \frac{\text{反应后IgG的活性}}{\text{反应前IgG的活性}} \times 100\% \quad (3)$$

1.4 复合热保护剂

复合热保护剂按照表 1 配制。

收稿日期: 2007-11-03 修订日期: 2009-03-05

基金项目: 河南科技大学青年科学研究基金资助项目 (2007QN026)

作者简介: 罗磊 (1976-), 男, 河南南阳人, 博士, 副教授, 主要从事生物保健食品、药食同源食品的应用与开发, 天然活性物质的研究。洛阳 河南科技大学, 471003. Email: luolei_cn@yahoo.com.cn

表 1 复合热保护剂配制表

Table 1 Preparation of complex thermal protectants

名称	组成
复合 1	20%的脱脂乳粉+5%的麦芽糖
复合 2	20%的脱脂乳粉+10%的山梨糖醇
复合 3	20%的脱脂乳粉+0.5%的甘氨酸
复合 4	10%的山梨糖醇+5%的麦芽糖
复合 5	20%的脱脂乳粉+5%的麦芽糖+0.5%的甘氨酸

2 结果与分析

2.1 温度对猪血清 IgG 活性的影响

Lee 等用差示量热扫描技术分析牛血清 IgG 样品, 结果证实其最高耐热温度为 70℃, 最高变性温度为 78.98℃^[13]。为了准确掌握猪血清 IgG 的变性条件, 进行了差示量热扫描(DSC), 检测条件为: 升温速度 10℃/min, 测定范围 20~95℃, 上样量为 20 μg。DSC 扫描结果显示(见图 1), IgG 热变性的温度范围为 70.265~72.162℃, 峰值 71℃, 吸热量为 338.4 J/g。而喷雾干燥时料液液滴的温度为 70~90℃, 持续时间为 15~30 s, 因此猪血清 IgG 不适合直接进行喷雾干燥, 必须研究相关的保护措施。

为避免热变性引起的活性损失, 通过改变蛋白质内在氨基酸结构和外界化学微环境来提高稳定性的办法被称为蛋白质的稳定化, 常见有 4 种: 固定化、化学修饰、蛋白质工程和添加保护剂。对于猪血清 IgG 分离制备, 添加甘油、糖以及聚乙二醇等多羟基化合物作为热保护剂, 与 IgG 等活性蛋白形成大量氢键, 以“溶剂层”的形式增加蛋白质的表面张力和溶液黏度, 降低水解作用, 从而提高稳定性, 减少 IgG 活性损失^[14,15]。

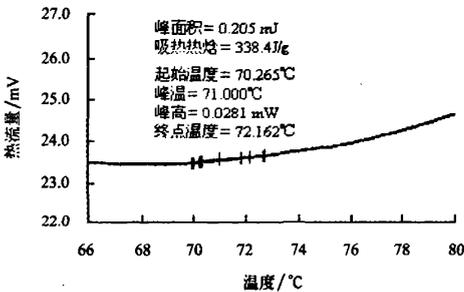


图 1 猪血清 IgG 差示量热扫描图

Fig.1 Differential Scanning Calorimetric(DSC) diagram of Immunoglobulin G (IgG)

2.2 热保护剂对猪血清 IgG 活性的影响

1) 糖和糖醇对 IgG 活性的保护作用

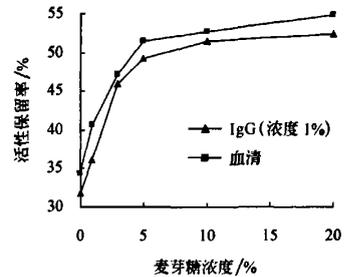
寡糖和糖醇含有大量羟基, 能够改变溶液中蛋白质的水合结构, 促进蛋白质分子间的疏水相互作用, 从而提高了受热时蛋白质的稳定性。不同的寡糖和糖醇对蛋白质的保护作用是有差异的, 这可能是由于羟基基团的数量和位置不同造成的, 寡糖中麦芽糖对蛋白质的热保护作用最强, 而糖醇中山梨糖醇效果最好。

由于猪血清中含有血清蛋白, 可能对 IgG 活性保留

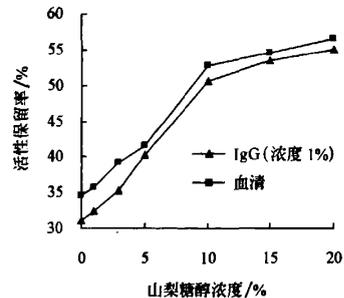
有帮助, 因此试验中选择猪血清和 1%浓度的 IgG 溶液进行研究。

在猪血清和浓度为 1% (m/V) 的 IgG (溶剂为 pH7 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液) 样品中, 分别加入 1%、3%、5%、10%和 20% (m/V) 的麦芽糖和山梨糖醇, 75℃保温 10 min, 直接用酶联免疫吸附法测定 IgG 活性保留率。

由试验结果可知(见图 2), 随着麦芽糖和山梨糖醇添加量的增加, 猪血清和免疫球蛋白样品中 IgG 的活性保留率迅速增加, 当麦芽糖浓度达到 5% (m/V)、山梨糖醇添加量超过 10% (m/V) 以后, 添加更多的保护剂只能使 IgG 的活性保留率略微上升, 这可能是由于麦芽糖和山梨糖醇添加量达到一定浓度后, IgG 能够与羟基结合的部位基本上都已占用, 因此进一步添加保护剂也不能与 IgG 发生疏水作用, 所以麦芽糖和山梨糖醇的适合添加量分别为 5% (m/V) 和 10% (m/V)。由于其他血清蛋白对 IgG 活性的保护作用, 血清中 IgG 的活性保留率始终比纯 IgG 样品略高一些。



a. 麦芽糖



b. 山梨糖醇

图 2 麦芽糖及山梨糖醇对 IgG 活性的影响

Fig.2 Effects of maltose and sorbitol concentrations on IgG activity

2) 氨基酸对 IgG 活性的保护作用

氨基酸在一定程度上能够减轻蛋白质受热时的结构变化, 这种保护作用被认为是氨基酸的羧基引起的, 对于不同的氨基酸, 羧基基团的数量和位置决定了热保护作用的强弱。根据文献报道, 甘氨酸对于蛋白质的热保护作用最强^[7]。

在猪血清和浓度为 1% (m/V) 的 IgG (溶剂为 pH7 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液) 样品中, 分别加入 0.1%、0.3%、0.5%、1%、2% (m/V) 的甘氨酸, 75℃保温 10 min,

直接酶联免疫吸附法测定 IgG 活性。从图 3 可以看到, 甘氨酸对于 IgG 热保护作用的变化规律与麦芽糖和山梨糖醇相似, 当 IgG 结合部位均被占用后, 继续添加保护剂并不能起到保护作用, 因此甘氨酸的最适添加量为 0.5% (m/V)。

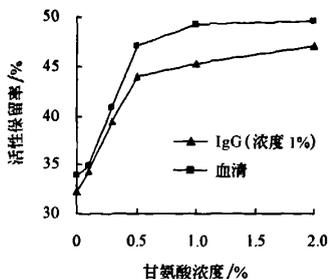


图 3 甘氨酸对 IgG 活性的影响

Fig.3 Effect of glycine concentration on IgG activity

3) 乳蛋白对 IgG 活性的保护作用

受热时, 猪血清 IgG 活性损失的速度要小于纯 IgG 样品, 可见其他血清蛋白可以起到保护作用, 避免 IgG 活性损失, 而添加外源蛋白质也能够发挥同样效果。

在猪血清和浓度为 1% (m/V) 的 IgG (溶剂为 pH7 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液) 样品中, 分别加入 1%、3%、5%、10%、20% (m/V) 的脱脂乳粉, 75℃保温 10 min, 测定 IgG 活性保留率。从图 4 中可以看到, 蛋白质对于 IgG 活性的保护作用要比前几种热保护剂弱, 随着溶液中乳蛋白含量的增加, IgG 的活性保留率逐渐增加, 高浓度时的增加速度要比低浓度时慢一些, 但并不像寡糖、糖醇和氨基酸那样有明显的分界点。这是由于添加的乳蛋白增加了样品中的蛋白总量, 受热时这些蛋白质发生变性, 减少了 IgG 的活性损失, 实际上起到保护 IgG 的作用。

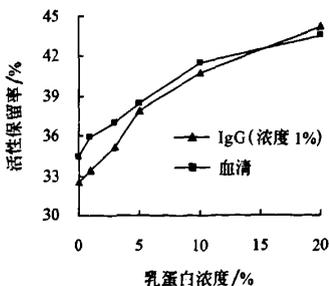


图 4 乳蛋白对 IgG 活性的影响

Fig.4 Effect of lactoprotein concentration on IgG activity

4) 热保护剂的复合试验

合适的浓度下, 麦芽糖和山梨糖醇的保护作用最强, 脱脂乳粉和甘氨酸较弱。由于热保护机理不同, 因此首先将乳蛋白作为基础保护剂, 分别与麦芽糖、山梨糖醇、甘氨酸复合进行研究 (见表 1 中复合 1、2、3), 结果显示 (图 5), 乳蛋白和麦芽糖、山梨糖醇、甘氨酸复合时, 其热保护效果要比单独添加时好。

而麦芽糖和山梨糖醇复合后 (复合 4, 见表 1) 对 IgG

的保护作用并没有明显增加, 这可能是由于热保护机理相同造成的。当麦芽糖添加量均为 5% 时, 脱脂乳粉的保护效果要比山梨糖醇更好一些, 为了避免添加量过大造成成本升高, 以及干燥后产品吸湿性太强, 选择麦芽糖与乳蛋白和甘氨酸进行复合试验。

将 20% 的脱脂乳粉、0.5% 的甘氨酸和 5% 的麦芽糖混合后作为复合保护剂 5 进行试验, 研究结果显示复合 5 的热保护作用最强, 相对于没有添加保护剂的 IgG 样品, 同在 75℃受热 10 min 的条件下, 添加复合 5 后 IgG 的活性保留率高出近一倍, 这是由于麦芽糖的羟基、甘氨酸的羧基改变了 IgG 的水合结构, 降低了水解作用, 提高了 IgG 的热稳定性; 同时乳蛋白的添加增加了样品中的蛋白总量, 以自身的变性减少了 IgG 的变性失活。因此, 热保护剂可以有效地提高免疫球蛋白的热稳定性, 减少生产过程中 IgG 的活性损失, 有利于得到具有较高生物活性的免疫球蛋白产品。

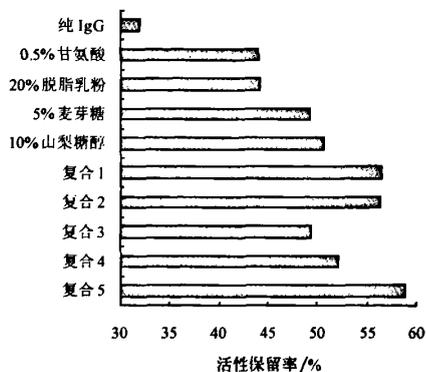


图 5 复合热保护剂对 IgG 活性的影响

Fig.5 Effect of complex thermal protectants on IgG activity

2.3 猪血清 IgG 干燥方式的研究

超滤浓缩后得到蛋白质含量 2.08% (m/V) 的液体样品, 其中 IgG 含量为 1.42% (m/V), 分别以冷冻干燥和喷雾干燥 2 种方法进行干燥研究, 并通过添加保护剂的办法降低干燥过程中 IgG 的活性损失。

1) 猪血清 IgG 的喷雾干燥研究

超滤浓缩得到的猪血清 IgG 喷雾干燥时活性损失较大, 由于麦芽糖和甘氨酸能够改变 IgG 的水合结构, 而添加的乳蛋白增加了样品中蛋白总量, 这些措施提高了 IgG 的热稳定性。为了研究热保护剂在喷雾干燥时的作用, 根据前面研究的结果, 以复合 5 为热保护剂对得到的猪血清 IgG (样品中蛋白质含量为 2.08%, IgG 含量为 1.42%) 进行喷雾干燥试验, 工艺参数为: 均质压力 5 MPa, 进风温度 170℃, 出风温度 80℃。试验结果 (表 2) 证实热保护剂在喷雾干燥时能够减轻 IgG 的活性损失。

表 2 IgG 喷雾干燥结果

Table 2 Results of IgG spray drying

	活性保留率/%	含水率/%
不加保护剂的样品	51.4	4.7
添加复合保护剂 5 的样品	86.1	3.5

2) 猪血清 IgG 的冷冻干燥研究

由于冷冻干燥(简称冻干)过程中发生了相变,蛋白质会有少量变性,可以通过添加干燥保护剂的办法减少这种变性。糖类的羟基可与蛋白质的极性基团形成氢键,使蛋白质不直接暴露在周围环境中,能够稳定蛋白质的高级结构,防止因冻干造成蛋白质活性损失。海藻糖分子较小,易于填充到蛋白质分子的空隙中,阻碍蛋白质分子内部结构发生变化,同时海藻糖的玻璃化温度较高,易形成玻璃态,将蛋白质分子支撑和包裹起来,使之不易变性^[16]。因此,以海藻糖为保护剂对浓缩后的 IgG 样品进行了冻干研究。

表3 海藻糖对 IgG 冻干的保护作用
Table 3 Protection of trehalose to IgG lyophilization

海藻糖添加量 (m/V) %	活性保留率/%
0	91.4
0.5	94.7
1.0	97.2
1.5	97.8
2.0	98.3

从表3可以看出,不添加冻干保护剂时,约有9% IgG 丧失了生物活性,而随着海藻糖添加量的增加,免疫球蛋白活性损失越来越小。海藻糖添加量为1% (m/V) 时, IgG 的活性保留率提高了近6个百分点,进一步增加海藻糖添加量,免疫球蛋白活性保留率只得到少量提高。为了避免干燥后产品中海藻糖含量过高而引起结晶和结块现象,选择1% (m/V) 海藻糖作为猪血清 IgG 冷冻干燥时的保护剂,干燥得到的产品中含水率约为4.5%。

3) 猪血清 IgG 干燥方式的比较

通过对猪血清 IgG 分别进行冷冻干燥和喷雾干燥的研究,发现这2种干燥方式各有自己的优缺点,在实际生产过程中,可以根据产品的具体要求选择合适的干燥方式,以满足生产销售的需要。

表4 不同 IgG 干燥方式的优缺点

Table 4 Relative merits of different IgG drying methods

	冷冻干燥	喷雾干燥
添加保护剂	IgG 含量为44%, 活性保留率85.1%	IgG 含量为4.9%, 活性保留率75.4%
不添加保护剂	IgG 含量65.2%, 活性保留率80.1%	IgG 含量为65.1%, 活性保留率45%
优点	活性损失很小, 产品中 IgG 含量较高	活性损失较小, 干燥时间短, 成本低, 可连续化生产
缺点	干燥时间长, 处理量小, 成本高	热保护剂添加量大, 产品中 IgG 含量低
适用范围	IgG 纯度要求高的药品或保健品	作为免疫活性添加剂, 用于配方乳粉等产品中

注: 冷冻干燥样品为三氯化铁法选择性沉淀后的猪血清蛋白, IgG 含量为样品蛋白总量的71.7%。由于 IgG 含量较高, 因此冷冻干燥时损失较大, 活性保留率低于猪血清蛋白样品(见表3)。喷雾干燥试验中, 添加的保护剂中含有大量乳蛋白, 因此所得喷雾干燥添加保护剂样品中 IgG 含量仅为4.9%。

3 结论

1) DSC 扫描结果显示: IgG 热变性的温度范围为

万方数据

70.265~72.162℃, 峰值71℃, 吸热量为338.4 J/g。

2) 乳蛋白、寡糖、糖醇、氨基酸对 IgG 均有热保护作用。将20%的脱脂乳粉、0.5%的甘氨酸和5%的麦芽糖混合后作为热保护剂可以有效地减少喷雾干燥时 IgG 的变性损失。以海藻糖为保护剂可以减少 IgG 冷冻干燥时的活性损失。

3) 干燥方式和是否添加保护剂决定了产品中 IgG 的含量和活性保留率的高低, 可以根据产品的具体要求选择合适的生产工艺。

【参 考 文 献】

- [1] Butler T E. Antimicrobial Agents of Milk-Recent Development[C]. International Dairy Federation, 1994: 14-50.
- [2] 李敏康, 钱冬明, 任红媛, 等. 猪血浆中多种功能蛋白的连续提取工艺[J]. 农业工程学报, 2007, 23(6): 242-245. Li Minkang, Qian Dongming, Ren Hongyuan, et al. Extracting several functional protein from pig plasma in sequence[J]. Transactions of the CSAE, 2007, 23(6): 242-245. (In Chinese with English abstract)
- [3] Ustunil Z, Sypien C. Heat stability of bovine milk immunoglobulins and their ability to bind lactococci as determined by an ELISA[J]. J Food Sci, 1997, 62(6): 1218-1222.
- [4] 龙中儿, 钟青萍, 刘活林, 等. 卵黄免疫球蛋白的稳定性研究[J]. 中国生物制品学杂志, 1997, 10(4): 218-220. Long Zhonger, Zhong Qingping, Liu Huolin, et al. Study on stability of yolk immunoglobulin (IgY)[J]. Chinese Journal of Biologicals, 1997, 10(4): 218-220. (In Chinese with English abstract)
- [5] 张和平, 郭军, 李立民, 等. 免疫乳中 IgG 热变性动力学研究[J]. 中国乳品工业, 2001, 29(4): 4-8. Zhang Heping, Guo Jun, Li Limin, et al. The study on the thermodynamics of heat denaturation of IgG in immune milk[J]. China Dairy Industry, 2001, 29(4): 4-8. (In Chinese with English abstract)
- [6] 郑海英. 利用微胶囊化提高牛初乳免疫球蛋白稳定性的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2001. Zheng Haiying. Study on Improving the Stability of Bovine Milk Immunoglobulin by Microencapsulation [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2001. (In Chinese with English abstract)
- [7] Chen C C, Tu Y Y, Chang H M. Thermal stability of bovine milk immunoglobulin G(IgG) and the effect of added thermal protectants on the stability[J]. J Food Sci, 2000, 65(2): 188-193.
- [8] Chen Chaoheng, Chang Hungmin. Effect of thermal protectants on the stability of bovine milk immunoglobulin G[J]. J Agric Food Chem, 1998, (46): 3570-3576.
- [9] Hanes A. Stability of biocatalysts[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 1999, 12(1): 305-316.
- [10] 罗磊, 朱雅东, 丁霄霖. 聚丙烯酰胺凝胶电泳研究猪血清蛋白硫酸铵分级盐析[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 218-222. Luo Lei, Zhu Yadong, Ding Xiaolin. Study of ammonium sulfate fractionation of porcine serum protein by polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Food Science, 2006, 27(2): 218-222. (In Chinese with English abstract)

- [11] 罗磊, 丁霄霖. 直接酶联免疫吸附法检测猪血清 IgG 时某些影响因素的考察与优化[J]. 食品与生物技术, 2006, 25(2): 97-100.
Luo Lei, Ding Xiaolin. Investigation and optimization of factors on measuring IgG in porcine serum by direct enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2006, 25(2): 97-100. (In Chinese with English abstract)
- [12] 张意静. 食品分析技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 23-25.
- [13] Lee Youngzoon, Sim S. Separation of immunoglobulins from blood by polyphosphate precipitation and chromatography[J]. American Chemical Society, 1988, 52(7): 654-659.
- [14] Hirano S, Mihara K, Yamazaki Y, et al. Role of C-terminal region of staphylococcal nuclease for fold ability, stability, and activity[J]. Protein, 2002, 49(2): 255-263.
- [15] Yamagata Y, Meada H, Nakajima T, et al. The molecular surface of proteolytic enzymes has an important role in stability of the enzymatic activity in extraordinary environments[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(18): 4577-4586.
- [16] 秦华明, 宗敏华, 梁世中. 糖在蛋白质药物冷冻干燥过程中保护作用的分子机制[J]. 广东药学院学报, 2001, 17(4): 305-307.
Qin Huaming, Zong Minhua, Liang Shizhong. Molecular carcinogenesis of sugar protective effect in freeze-drying processing of protein drug[J]. Journal of Guangdong College of Pharmacy, 2001, 17(4): 305-307. (In Chinese with English abstract)

Application of different protectants and drying methods for porcine serum immunoglobulin G

Luo Lei¹, Zhu Wenxue¹, Zhang Shaohua²

(1. College of Food and Biology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. Sanitary and Antiepidemic Station of Nanyang, Nanyang 473000, China)

Abstract: In order to search for the optimum drying method of porcine serum immunoglobulin G(IgG), the feasibility of spray drying and practical effects of thermal protectants were investigated in this paper. The effects of drying methods on porcine serum IgG activity and purity were compared. The results showed that the activity loss of porcine serum IgG was reduced effectively by combining with protectants which was made up of 0.5% (m/V) glycine, 5% (m/V) maltase and 20%(m/V) defatted milk powder during spray drying. The activity loss of porcine serum IgG was reduced using mycoses as the protectants. The content and activity preservation rate of IgG depend on the drying methods and drying protectants.

Key words: spray drying, applications, freeze drying, drying protectants, porcine serum IgG, activity preservation rate