

牛初乳中主要生物活性物质开发的最新进展*

傅维琦 吴绵斌 李向平 陶银英

(浙江大学化学工程和生物工程系 杭州 310027)

摘 要 综述了近年来牛初乳资源的开发利用状况,重点介绍了几种主要功能性物质如免疫球蛋白(IgG)、乳铁蛋白(Lf)及类胰岛素生长因子(IGF)的分离纯化技术,并对牛初乳的综合利用前景进行展望。

关键词 牛初乳,免疫球蛋白,乳铁蛋白,类胰岛素生长因子,综合利用

牛初乳是指奶牛产犊后 3 d 内所分泌的乳汁。科学研究证实,牛初乳是自然界免疫因子最为富集的生物资源之一,其中包括重要的免疫因子和生长因子,如免疫球蛋白(IgG)、乳铁蛋白(Lf)及胰岛素样生长因子(IGF)等,含量比常乳高 10~100 倍。这些生理活性成分具有免疫调节、延缓衰老、促进生长发育、抑制肿瘤等一系列的生物功能,不仅可以制造功能食品,而且还具有开发天然活性生物药物的巨大潜力^[1~7]。

20 世纪 90 年代,牛初乳的价值得到了国内外学者的重视,我国也出现了强化牛初乳的乳制品,如深圳海王集团、黑龙江完达山食品厂及浙江省金华市李子园乳品厂等一批企业利用牛初乳开发出富含免疫球蛋白的营养强化食品。但是,目前初乳资源的开发才开始,主要是一些健康食品,产品中活性物质的有效浓度不够高,其免疫活性在加工过程中损失较大,而且在资源综合利用方面也较欠缺,初乳本身所具备的潜在价值得不到充分的反映。因此,高效综合利用牛初乳资源,开发出合理的分离技术路线以提取高纯度高活性的天然活性蛋白质,特别是从中开发天然的生物药原料将具有十分重要的现实意义。本文就目前牛初乳中主要生物活性物质的研发状况作出综述,并对综合利用前景进行展望。

1 牛初乳中主要生物活性物质研究的最新进展

1.1 乳铁蛋白(Lf)

乳铁蛋白,晶体呈红色,是一种分子质量约为 80 000 u 的铁结合性糖蛋白。目前已清楚乳铁蛋白中每条肽链的一级结构^[8,9]。牛初乳中 Lf 是由 703 个氨基酸组成,其二级结构呈“二枚银杏叶型”。牛初乳 Lf 含量约 1.5~5.0 mg/mL,为常乳中含量的 20 倍左右。乳铁蛋白具有独特的生理调节代谢功能。近年来国内外研究已经证实,乳铁蛋白能增强铁的传递和利于人体吸收^[10],具有广谱抗菌性、抗病毒作用、免疫作用^[11],可作为天然的抗氧化剂,能消炎,并能作为生长因子促进肠道菌群平衡。

1.1.1 乳铁蛋白的分离

目前分离乳铁蛋白的技术主要有色谱技术和膜分离技术。

(1) 离子交换色谱法。Groves 最早利用 DEAE 纤维素阴离子交换树脂分离出较纯的乳铁蛋白,随后他又开发出磷酸纤维素交换色谱法,并由 Foley 对此法加以改进,得到乳铁蛋白的纯度为 81% 左右。国内王崇道等采用改进离子交换色谱法^[12]。其工艺过程如下:200 mL 新鲜人初乳经离心、酸化制得乳清。将预处理过的磷酸纤维素与乳清以 1:

第一作者:大学生。

* 浙江省科技厅资助项目(No. 2003C31036)和浙江大学第 5 期 SRTP 资助项目

收稿时间 2002-10-10,改回时间 2003-02-28

10 的体积比混合后,用 0.1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0,搅拌 2h,装 Sephadex C₅₀ 柱(φ2.6 cm × 10 cm),以 0.1 mol/L, pH = 7.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)含 0.1 mol/L NaCl 淋洗至流出液分光光度测定值 $A_{280\text{nm}} < 0.08$,再用 0.2 mol/L, pH 7.5 PBS(含 0.25 mol/L NaCl)的缓冲液进行洗脱。收集淋洗峰管,浓缩后上 Sephadex C₁₀₀ 柱(φ1 cm × 120 cm),合并淋洗液分光光度测定值 $A_{280\text{nm}} > 1.0$ 的淋洗峰管。将用 0.01 mol/L, pH 7.4 的 Hepes-NaOH 缓冲液(含 0.05 mol/L NaCl)进行透析平衡,真空冷冻干燥, -20℃ 下保存。上述操作均在 4℃ 下进行。

(2) 亲和色谱法。肝素琼脂糖亲和色谱可从脱脂乳中进一步分离乳铁蛋白,电泳分析表明其纯度较高。交换 Cu²⁺ 的 1,4-丁二醇、二环氧甘油醚亚胺、二乙酸琼脂糖应用于分离乳铁蛋白和免疫球蛋白。琼脂糖首先用丁二醇、二环氧甘油醚活化交联,再加入亚胺乙二酸使其与活化琼脂糖结合。此树脂用 Cu²⁺ 交换后呈兰色,装柱时上面 1/2 或 2/3 为载铜树脂,下半部分为直接用来交换 Cu²⁺ 的树脂。脱液用 0.05 mol/L HAc 和 0.5 mol/L NaOH。25 mL 的树脂可以吸附 1 L 干酪乳糖的乳铁蛋白和免疫蛋白。这种方法操作简单、分离效果好、纯度高且没有生物活性物质的损失,是生产医药用高纯乳铁蛋白的有效方法之一,但是成本较高。

(3) 超滤法。超滤法^[13]分离乳铁蛋白最初是由日本学者岛崎敬一提出的。国内学者于长青等^[14]采用的改进超滤工艺是选用醋酸纤维素和聚砜超滤膜。先用截留相对分子质量为 60 000 的膜处理,当透过液达 0.5 L 时,在浓缩液中加入同体积的生理盐水,再处理得 0.25 L 相对分子质量大于 8×10^5 的过滤液,所得浓缩液用截留相对分子质量为 100 000 的膜处理得滤液 0.25 mL 相对分子质量小于 9×10^5 ,经过 2 种膜处理后的蛋白质相对分子质量介于 8×10^5 和 9×10^5 之间。应用超滤技术制备乳铁蛋白的回收率可达 70%,浓缩倍数达 2.7。超滤法操作简便,费

用低廉,易形成工业化规模,其缺点是产品纯度低,膜需要经常清洗。此法是乳铁蛋白最具实现工业化潜力的方法之一。

(4) 等电点沉淀和膜分离集成法。国外学者 Marianne Nyström 等^[15]采用等电点沉淀和膜分离工艺,即先进行预处理,调 pH 值为乳铁蛋白的等电点,然后采用经优化选择的膜组件进行分离。该工艺与离子交换色谱法相比具有处理量大等优点,又改变了以往超滤法得到产品纯度低的不足,是一种新兴的组合分离工艺。

(5) 膜分离和色谱组合法。目前,分离技术正不断完善,工业化规模上已开始组合使用膜技术和色谱技术,并开发出从酪乳清和脱脂乳中制备纯度达 95% 以上的 Lf。但分离技术的集成运用还处于起步阶段,许多具体问题有待解决,其研究潜力巨大。

1.1.2 乳铁蛋白的检测

目前,通常采用的检测乳铁蛋白的方法主要有高效液相色谱法、放射免疫扩散法、酶联免疫法以及电泳法等。

其中高效液相色谱法较为快速准确,但对样品纯度要求较高,而且检测费用高;放射免疫扩散法^[16]能实现在一定乳铁蛋白浓度范围内的定性检测,适用于婴幼儿配方奶粉的乳铁蛋白(Lf)的检测,同时也是测定标本中各种免疫球蛋白和补体成分的含量的一种敏感度较高的定量试验方法;酶联免疫法^[17,18]能快速准确检测,操作较为简便,可用于微量 Lf 测定,可测 Lf 最低浓度为 3 ng/mL,而且能够同时对几十个甚至几百个试样进行检测;电泳法仪器设备简单,但操作麻烦,且一次仅能检测少数几个样品。

1.2 免疫球蛋白(IgG)

研究证实,牛初乳中存在 IgG、IgA、IgM、IgE 和 IgD 等 5 类免疫球蛋白(Ig)。IgG 是含量最高的 Ig,占 Ig 总量的 55% 以上,其分子质量为 149 680 u。在初乳中 IgG 含量为 50 ~ 90 mg/mL,是常乳中含量的 100 倍以上。

IgG 最主要功能是与相应抗原特异性结

合,可以在体内介导各种生理和病理效应,使侵入人体的病毒丧失破坏机体健康的能力,具有调理作用和细胞解毒作用,能促进吞噬细胞对细菌等颗粒性抗原的吞噬,并增强 NK 细胞和促发吞噬细胞对组织靶细胞的杀伤破坏作用。同时 IgG 也是唯一能够从母体通过胎盘转移到胎儿体内的 Ig,是胎儿和新生儿抗感染免疫作用的主要来源。最新研究表明,IgG 还具有提示早期诊断肺癌^[19]的可能性。

1.2.1 免疫球蛋白的分离

IgG 的分离^[20-22]技术已步入工艺较为成熟的阶段,目前工业化生产普遍采用离子交换层析和凝胶过滤层析,其分离效果较好,操作简便。

离子交换层析采用 DEAE-52 进行离子交换,将 DE-52 先分别用蒸馏水、0.5 mol/L NaOH 溶液处理,然后用 pH 7.4,0.01 mol/L PB 平衡。平衡后装柱,装柱规格为 16 cm × ϕ 4.5 cm,取 1.5 g IgG 分离物,用 pH 7.4,0.01 mol/L PB 20 mL 溶解后置于透析袋中,在 4℃ 时对 2000 mL pH 7.4,0.01 mol/L PB 透析 24 h,然后上柱,上样后进行分段洗脱。第一段用 pH 7.4,0.01 mol/L PB 洗脱,待第一峰出现后,用 pH 5.4,0.02 mol/L PB 进行第二段洗脱,待第二峰出现后,改用 pH 5.4,0.08 mol/L PB 洗脱,直至第三峰出现,所有操作在 4℃ 进行,洗脱速度为 240 mL/h,280 nm 下自动检测并记录,将洗脱下的 3 个峰分别收集并冻干。

凝胶过滤层析采用 Sephacryl S-100 (Pharmacia Biotech Sweden)进行凝胶过滤层析,柱规格为 80 cm × ϕ 1.5 cm,装柱后,用 pH 7.6,0.005 mol/L PB 在 4℃ 下平衡 12 h,流速为 32 mL/h,将 DE-52 分离得到的 3 个峰分别用 pH 7.6,0.005 mol/L PB 5 mL 溶解并上柱。洗脱液为 pH 7.6,0.005 mol/L PB,洗脱速度为 32 mL/h,操作温度为 4℃,280 nm 处自动检测并记录,将各洗脱峰收集并冻干。

1.2.2 免疫球蛋白的检测

IgG 的含量测定方法已研究出很多^[23-25],有色谱法,氮指数法,凯氏定氮法,低分辨核磁共振法,电泳法等多种测定蛋白质变性的方法,但凯氏定氮法,氮指数法只能确定混合蛋白质总变性率,无法测定某一种蛋白质的变性率,核磁共振法只能利用纯样品进行测定,电泳法可测定每种单一蛋白质变性率,但由于受热或 pH 变化变性,定量结果误差较大,色谱法较费时,操作复杂费用较高,而 80 年代出现的化学发光技术避免了其他技术的缺点,不仅灵敏度高,而且其药品中无放射性和致癌性,有广泛的应用前景。

1.3 胰岛素样生长因子(IGF)

胰岛素样生长因子(IGF)I 和 II 是 2 种肽类化合物,分子质量约为 7 500 u。其中 IGF-I 是牛初乳中最重要的促进生长因子,浓度多在 50 ~ 200 μ g/L 之间,而常乳中 IGF-I 含量不到 10 μ g/L。

IGF 能促进细胞增殖、分化和分泌作用,能对所有胰岛素靶器官起经典的胰岛素效应,能促进脂肪和糖元合成。最新研究发现,短链 IGF-I 能治疗改善 STZ 糖尿病大鼠心肌病变^[26],具有预防或延缓部分小鼠糖尿病发病的效用^[27],提示了 IGF-I 在糖尿病领域的潜在应用价值。

1.3.1 类胰岛素生长因子的分离

研究表明,只有前 3 d 的牛初乳中才含有 IGF,并且 IGF 是相当不稳定的多肽,要求在低于 -20℃ 条件下贮存。目前,关于 IGF 的分离纯化技术的研究很少。主要分离纯化方法是采用离子交换层析和凝胶过滤,牛初乳中 IGF 的分离纯化研究仍然处于起步阶段。

目前国内已有报道的是对大肠杆菌中的重组人类 IGF-I 进行纯化的研究。聂尚海等^[28]采用离子交换层析和凝胶过滤法实现重组人类 IGF-I 的分离纯化,其纯度达到 98%。离子交换层析采用 CM5X(Whatman)柱(ϕ 1.6 cm × 10 cm),用 A 液(8 mol/L 尿素,0.1% β -巯基乙醇,乙酸, pH 4.0)平衡后,将溶

解的包涵体上清液直接上样,上样完毕后再用A液平衡到基线,用含60 mmol/L NaCl的A液进行洗脱,收集洗脱峰,进行15%SDS-PAGE鉴定。凝胶过滤采用Sephacryl 100 HR (Pharmacia)凝胶柱($\phi 2.6\text{ cm} \times 80\text{ cm}$),用A液平衡后,将离子交换层析的洗脱峰直接上样,上样体积为20 mL,样品蛋白浓度为7.5 g/L,流速为10 cm/h。

1.3.2 类胰岛素生长因子的检测

目前检测IGF多采用电泳法。而朱秋毓等采用高效液相色谱法^[29]可清晰地分离出多种非IGF组分,分辨率高于电泳法。HPLC可直接从色谱柱后收集洗脱组分,免除了电泳法需将IGF从凝胶中洗脱后才能加以保存的操作,从而减少了IGF在洗脱过程中发生降解或丧失其生物活性的危险。但该法的缺点是灵敏度不高,在信噪比大于2的情况下,最小检测浓度为5 ng/ μL ,与电泳法相近;此外,还需要昂贵的IGF试剂作为比较标准。因此,该法更适合于在需要回收IGF时的情况下使用。

2 结论及前景展望

2.1 结论

目前我国奶牛总数量就达420多万头,每年除喂乳牛外尚可富余20万t初乳。但这些资源并没有得到很好的利用,其中丰富的功能活性物质未得到应有的利用。目前牛初乳的开发利用尚处于起步阶段,亟待解决的问题还很多。

(1)产品品种较为单一,主要是开发免疫球蛋白(IgG)。

(2)资源的综合利用上还有待提高。牛初乳中功能性组分的很多,目前采用的工艺一般都是针对要提取的某一目标蛋白,如免疫球蛋白,而对初乳中富含的其他功能性组分考虑较少,造成了资源浪费。

(3)产品档次还比较低,像国内从牛初乳提取的IgG,由于分离技术的问题,其纯度及活性还比较低,只能用于普通食品中,这大大

降低了产品的价值。

(4)对于牛初乳IGF的分离研究较少,其许多功能性质得不到有效利用。

根据上述问题,有以下意见可供参考。

(1)牛初乳的分离要简化分离步骤,提高产率和纯度,降低分离成本以实现产业化。

(2)建立新的工艺路线,以提高牛初乳的资源利用率,达到综合利用的目的。

(3)设计合理的分离路线,尽可能保持牛初乳中蛋白的活性。

(4)加强IGF等功能性物质的研究,可参照牛初乳中其他蛋白质(如IgG、Lf等)较为成熟的分离纯化方法来研究IGF的分离纯化。

2.2 前景展望

乳铁蛋白(Lf)由于具有抑菌、抗真菌、抗病毒及抗肿瘤等重要的药用价值,可用于开发新药^[30],同时由于其本身就是很好的功能食品基料,市场前景广阔。

人重组胰岛素样生长因子(hIGF)目前国外正在开发成治疗抗胰岛素糖尿病及肌萎缩性糖尿病的新药,并已经得到美国FDA的认证。牛初乳胰岛素样生长因子(IGF)由于其活性比前者高10倍以上,又没有副作用,因此更具有开发成新药的价值。由于糖尿病目前已经成为影响人类健康的主要疾病之一,因此若将其开发成新药,市场前景也十分看好。

免疫球蛋白目前在牛初乳中含量最丰富,该产品已经成为保健乳制品的主要添加成分,市场容量不断扩大。目前市场上该类产品的纯度不高,免疫活性也往往在加工中被破坏,因此提高产品档次,增强竞争力,将使产业化前景十分广阔。

为提高牛初乳资源的利用价值,应向着综合利用的方向发展,要运用现代分离技术,纯化具有不同功能的有效因子,开发高纯度的功能性保健食品的基料,同时开发具有发展价值的医药品。

参 考 文 献

- 1 Jones E M. J. Appl. Bacteriol. , 1994 ,77(2) :208 ~ 214
- 2 SYAKE. APMIS ,1997 ,105 875 ~ 883
- 3 Nguyen M H. Food Australia ,1999 ,51 210 ~ 211
- 4 Nicholette E B. J. Dairy Research ,1999 ,66 73 ~ 80
- 5 Lin J. J. Dairy Sci. ,1998 ,81 2 151 ~ 2 158
- 6 Lin J. J. Dairy Sci. ,1999 ,82 86 ~ 92
- 7 曹劲松 . 初乳功能性食品 . 北京 :中国轻工业出版社 ,2000.10 ~ 100
- 8 唐传核 ,曹劲松 ,潘彬全等 . 中国乳品工业杂志 , 2000 ,28(3) :14 ~ 17
- 9 张 丹 . 新疆农业科学 ,2002 ,39(1) :12 ~ 14
- 10 姜冬梅 ,李艳华 . 中国乳品工业杂志 ,1999 ,27(1) 24 ~ 25 3
- 11 洪 俊 ,涂群英 . 湖北预防医学杂志 ,2000 ,11(5) 25 ~ 26
- 12 王崇道 ,金 坚 . 同位素 ,1999 ,12(1) 5 ~ 9
- 13 Musale D A ,Kulkarni S S. J. Agric. Food Chem. , 1998 ,46 4717 ~ 4722
- 14 于长青 ,陈 秋 . 黑龙江八一农垦大学学报 , 1999 ,11(3) 56 ~ 61
- 15 Nyström M. Colloids Surfaces A ,1998 ,138 :185 ~ 205
- 16 龚广予 . 中国乳品工业杂志 ,2001 ,29(3) :27 ~ 29
- 17 胡亚平 . 临床检验杂志 ,1993 ,11(4) :212 ~ 213
- 18 张英华 . 中国乳品工业杂志 ,1999 ,27(6) :19 ~ 20 31
- 19 Klotz M. Lung Cancer ,1999 ,24 25 ~ 30
- 20 Kim H. J. Food Sci. ,1998 ,63 429 ~ 434
- 21 张和平 ,李立民 . 中国乳品工业杂志 ,2001 ,29(5) :1 ~ 4
- 22 张和平 . 中国乳品工业杂志 ,1999 ,27(4) 3 ~ 6
- 23 刘冀珑 ,乔惠理 ,邓泽沛 . 中国兽医学报 ,2000 , 20(4) 382 389
- 24 张和平 ,郭 军 ,李立民等 . 中国乳品工业杂志 ,2001 ,29(2) 22 ~ 24
- 25 郭本恒 . 食品科学 ,1996 ,17(7) :10 ~ 13
- 26 叶红英 ,俞茂华 . 中华内分泌代谢杂志 ,2001 ,17(1) 54 ~ 55
- 27 刘 芳 ,俞茂华 . 中华内分泌代谢杂志 ,2001 ,17(1) :15 ~ 16
- 28 聂尚海 ,刘宝英 . 军事医学科学院院刊 ,2001 ,25(2) :129 ~ 132
- 29 朱秋毓 ,俞茂华 . 中国医院药学杂志 ,1999 ,19(7) 396 ~ 398
- 30 Van der Strate B W A. Antiviral Research ,2001 ,52(3) 225 ~ 239

Recent Research on the Main Bio-active Substances of Bovine Colostrum

Fu Weiqi Wu Mianbin Li Xiangping Tao Yinying

(Department of Biochemical Engineering ,Zhejiang University ,Hangzhou 310027)

ABSTRACT In this paper , the recent exploitation state of bovine colostrum is reviewed. The separating technologies of the main bio-active substances , for instance , IgG , lactoferrin(Lf) and IGF , are discussed in detail. And the review also discusses the prospect of comprehensive utilization of bovine colostrum.

Key words bovine colostrum , IgG , IGF , lactoferrin(Lf) , comprehensive utilization

日本发现可使粮食增产的蛋白质

日本名古屋大学生物分子研究中心日前发现 , 有一种蛋白质可以控制水稻的高度 , 把营养集中到稻穗上 , 从而能稳定提高粮食产量。据《朝日新闻》报道 , 日本名古屋大学生物分子研究中心松冈信教授一直在研究水稻等农作物植物茎的生长机理。在实验中松冈教授发现 , 被称为“ GID2 ”的蛋白质具有控制植物茎增高的作用。

不过 , 一旦遇到植物激素赤霉素 , “ GID2 ”蛋白质就会失去效用。松冈教授认为 , 如果用基因技术使“ GID2 ”蛋白质遇到赤霉素不失灵 , 就可以培育出即使肥料充足、杆茎也不过高的水稻和小麦。这一发现已经发表在2003年3月下旬的美国《科学》杂志上。