

猪血免疫球蛋白的热稳定性及动力学研究

罗永康¹ 董翠霞¹ 何刚强² 刘伟¹

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 浙江金大地生物工程股份有限公司, 杭州 310002)

摘要 为了使猪血免疫球蛋白在各类食品中得到较好的应用,对猪血免疫球蛋白(PIgG)的热稳定性及热变性动力学进行了分析研究。结果表明,PIgG在60℃以下很稳定,60~65℃比较稳定,大于70℃变性明显加快,超高温杀菌(120℃,4 s)条件下,PIgG几乎失活;其热动力学反应为1.2级;在60,65,70,75,80,85和90℃,PIgG热变性的D值分别为 33.333×10^3 , 14.286×10^3 , 3.333×10^3 , 0.476×10^3 , 0.222×10^3 , 0.169×10^3 和 0.076×10^3 s,在此温度范围内的Z值为10.81,表观活化能为 $227.31 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

关键词 猪血;免疫球蛋白;热变性;动力学

中图分类号 TS2

文章编号 1007-4333(2004)05-0067-04

文献标识码 A

Heat stability and thermodynamic analysis of PIgG

Luo Yongkang¹, Dong Cuixia¹, He Gangqiang², Liu Wei¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Zhejiang Jindadi Bio-technology Limited Company, Hangzhou 310002, China)

Abstract In order to effectively utilize the PIgG in the food processing, the stability of PIgG at different temperatures and thermodynamic analysis were studied. The results indicated that the PIgG was more stable when temperature was less than 65℃, but the PIgG had no bioactivity after UHT heating (120℃, 4 s). The reaction degree number of heat denaturation of PIgG was 1.2. At 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90℃ respectively. The speed constants of PIgG denaturation were 0.36×10^{-4} , 1.45×10^{-4} , 7.25×10^{-4} , 28.99×10^{-4} , 94.22×10^{-4} , 123.21×10^{-4} , 289.91×10^{-4} and D values 33.333×10^3 , 14.286×10^3 , 3.333×10^3 , 0.476×10^3 , 0.222×10^3 , 0.169×10^3 , 0.076×10^3 s respectively. Within this temperature range (60 - 90℃), the Z value was 10.81, and apparent active energy was $227.31 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Key words porcine blood; immunoglobulin G; heat denaturation; thermodynamics

免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)具有改善和调节人体免疫能力,预防和治疗某些疾病的作用^[1]。富含免疫球蛋白的各类功能性食品不断得到消费者的认可和接受^[2]。目前,免疫球蛋白的主要来源是牛初乳、动物血液及卵黄。

猪血中含有1.5%~2%的免疫球蛋白。目前对来源于牛初乳的IgG的热稳定性及其热变性动力学已有较多的研究^[3~8],但猪血免疫球蛋白(Porcine immunoglobulin G, PIgG)的热稳定性及其热变性动力学的研究很少。为了使猪血免疫球蛋白

在各类食品中得到较好的应用,本文中对猪血免疫球蛋白的热稳定性及热变性动力学进行了分析研究,以期对猪血免疫球蛋白的应用提供理论依据。

1 试验材料

猪血免疫球蛋白冻干粉,采用低温乙醇沉淀法制取,PIgG质量分数为69.08%;兔抗猪IgG血清,购于军事医学科学院微生物流行病学研究所,效价1:8~16。

收稿日期:2004-06-24

基金项目:浙江省科技厅项目(021105282,2003C12002)

作者简介:罗永康,副教授,博士,主要从事畜产品加工研究。

2 试验方法

2.1 PIgG热稳定性的测定

用 0.01 mol L^{-1} , pH7.2 的 PBS 缓冲液将免疫球蛋白冻干粉配制成质量浓度为 5 g L^{-1} 的溶液, 取 4 mL 于试管中, 在 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 和 90 的水浴中加热, 每隔一定时间取样置于离心管中, 在冰水浴中迅速冷却, 测定 PIgG 含量。

2.2 热动力学分析^[6,9,10]

2.2.1 PIgG热变性反应级数和速率常数的确定

PIgG 的热变性动力学方程用方程(1)确定:

$$-dC/dt = kC^n \quad (1)$$

式中: C 为任意时间 t 时 PIgG 的浓度, dC/dt 为变性速率; k 为变性速率常数; n 为反应级数。

当 $n \neq 1$ 时, 对式(1)积分, 整理得

$$(C_t/C_0)^{1-n} = 1 + (n-1)kC_0^{n-1}t \quad (2)$$

设表观常数为 $k' = kC_0^{n-1}$, 则式(2)变为

$$(C_t/C_0)^{1-n} = 1 + (n-1)k't \quad (2-1)$$

当 $n=1$ 时, 对式(1)积分, 则有

$$\ln(C_t/C_0) = -kt = -k't \quad (2-2)$$

2.2.2 PIgG热变性过程中的 D 值与 Z 值 D 值为在一定温度下 90% PIgG 变性所需要的时间, 通过 $\log C_t \rightarrow t$ 图可以求得。 Z 值为 D 值变化 90% 时的温度变化量, 通过 $\log D \rightarrow t$ 图可以求得。

2.2.3 PIgG热变性过程中表观活化能的确定

PIgG 变性过程中, 温度与变性常数的关系用 Arrhenius 方程表示:

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (3)$$

式中: A 为阿累尼乌斯常数; E_a 为表观活化能; R 为理想气体常数; T 为热力学温度。对式(3)取对数, 整理得

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (4)$$

作 $\ln k \rightarrow 1/T$ 图求出 E_a 。

2.3 免疫球蛋白活性的测定

采用单向免疫扩散 (single immunodiffusion, SD) 法^[11]。取 0.12 g 琼脂加入 10 mL PBS 缓冲液中, 加热溶化, 冷却到 53 并在 53 水浴中保温。加入兔抗猪血清, 混和均匀后倒入内径为 7.5 cm 的培养皿中, 于 4 冷凝 30 min。用直径为 4.9 mm 的打孔器打孔, 每孔上样量 10 μL 。在湿盒中于 37 恒温培养 24 h, 准确量取沉淀环直径。以 PIgG 浓度为横坐标, 扩散面积为纵坐标作标准曲线。样

品测定时用 PBS 缓冲液配成合适的浓度。

3 结果与讨论

3.1 PIgG在不同温度下的变性率

免疫球蛋白冻干粉溶液在 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 水浴中加热不同时间后, PIgG 变性率如图 1 所示。可以看出, 随着加热温度的升高, PIgG 变性速率加快。当温度低于 60 时, PIgG 较稳定, 经 60 min 加热后, PIgG 的变性率约为 20%; 当温度低于 65 时, PIgG 仍具有一定的稳定性, 经 30 min 加热后, 仍保持 60% 的活力; 当温度升高到 70 以上时, 变性速率明显加快。

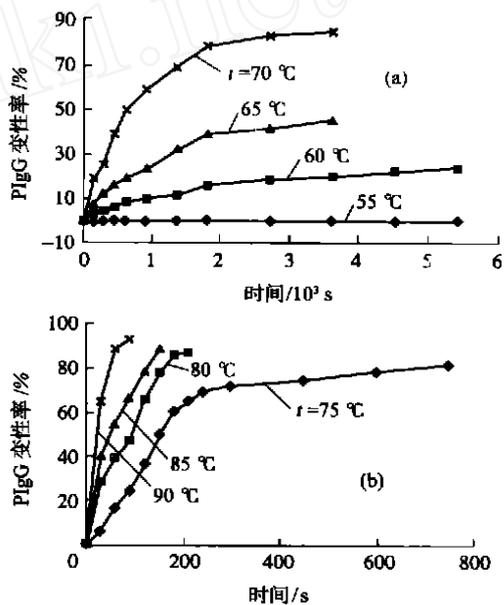


图 1 不同温度下 PIgG 稳定性的变化

Fig. 1 Effect of heating temperature on PIgG stability

3.2 PIgG的热动力学分析

3.2.1 PIgG热变性反应级数和变性速率常数的确定 取 $n = 0, 1.0, 1.1 \sim 1.9, 2.0$, 由式(2)作 $(C_t/C_0)^{1-n} \rightarrow t$ 图; $n = 1$ 时, 由式(2-1)作 $\ln(C_t/C_0) \rightarrow t$ 图, 求得不同温度下直线的相关系数 R^2 。综合不同温度下的 n 值, 只有 $n = 1.2$ 时, R^2 均大于 0.95, 所有线性回归方程的截距均接近 1 (图 2)。由此确定 PIgG 热变性动力学反应为 1.2 级, 进一步求出其不同温度下的热变性速率常数 (表 1)。

3.2.2 PIgG热变性过程中的 D 值与 Z 值的确定

由不同温度下 $\log C_t \rightarrow t$ 的关系 (图 3) 求得不同温度下的 D 值 (表 2), 并由 $\log D \rightarrow t$ 的关系 (图 4), 求出 Z 值 (表 2)。

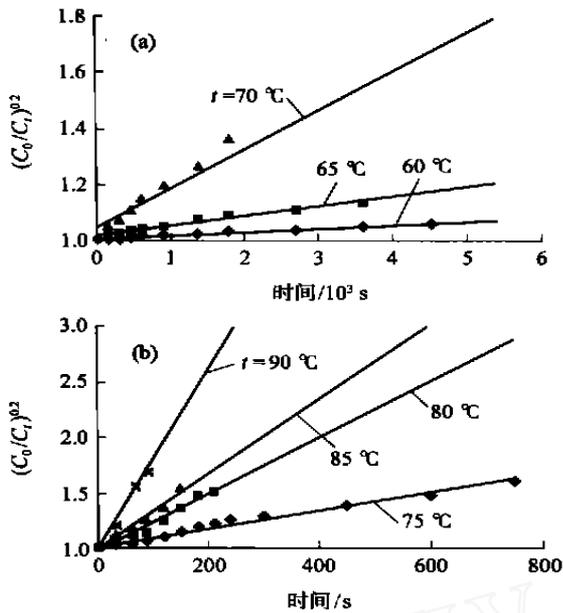


图 2 $(C_t/C_0)^{-0.2} \rightarrow t$ 关系图 ($n=1.2$)

Fig. 2 $(C_t/C_0)^{-0.2} \rightarrow t$

表 1 不同温度下 PIgG 的变性速率常数

Table 1 Speed constants of PIgG denaturation at different temperature

温度/ °C	60	65	70	75	80	85	90
$k/10^{-4}$	0.36	1.45	7.25	28.99	94.22	123.21	289.91

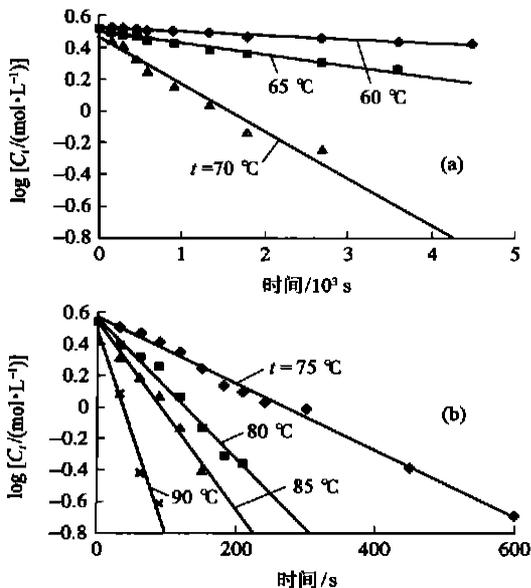


图 3 不同温度下的 $\log C_t \rightarrow t$ 关系图

Fig. 3 The relationship of $\log C_t \rightarrow t$ at different temperature

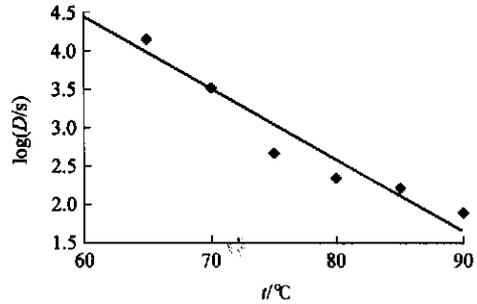


图 4 $\log D \rightarrow t$ 图

Fig. 4 $\log D \rightarrow t$

表 2 不同温度下 PIgG 的 D 值和 Z 值

Table 2 D and Z value of PIgG at different temperature

参数	温度 $t/$						
	60	65	70	75	80	85	90
$D/10^3$ s	33.333	14.286	3.333	0.476	0.222	0.169	0.076
Z/	10.81						

3.2.3 PIgG 热变性过程中表观活化能的确定 由式(4),作 $\ln k \rightarrow 1/T$ 关系图(图 5),求得表观活化能 $E_a = 227.45 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

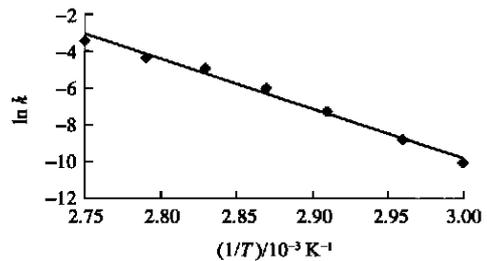


图 5 $\ln k \rightarrow 1/T$ 图

Fig. 5 $\ln k \rightarrow 1/T$

3.2.4 常用杀菌条件下 PIgG 的变性率 根据热变性动力学参数,可计算得到几种常用杀菌条件下 PIgG 的变性率。

在巴氏杀菌时,63 加热 30 min,PIgG 变性率为 21.06%;72 加热 30 s,75 加热 15 s,85 加热 5 s 其变性率分别为 3.40%,3.36%和 9.67%。超高温杀菌(120,4s)条件下,PIgG 完全失活。这些结果表明,PIgG 可以耐受低温巴氏杀菌(LTLT)和高温短时间巴氏杀菌(HTST),但不宜采用超高温(UHT)杀菌。

4 结论

1)加热温度低于 60 对 PIgG 活性影响很小;加热温度为 60~65,PIgG 仍具有较高的稳定性;

当温度继续升高时,PIgG变性加速。

2) PIgG热动力学方程的反应级数属于 1.2 级。在 60,65,70,75,80,85 和 90 ,PIgG的变性速率常数从 0.36×10^{-4} 增大到 289.91×10^{-4} , D 值从 33.333×10^3 s 降低到 0.076×10^3 s;在此温度范围内,其 Z 值为 10.81 ,表观活化能为 $227.45 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

3) 63 加热 30 min,72 加热 30 s,75 加热 15 s,85 加热 5 s,PIgG 变性率分别为 21.06%,3.40%,3.36%和 9.67%;在超高温杀菌条件下,PIgG完全失活。

参 考 文 献

- [1] 郑建仙. 功能性食品(第三卷)[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999. 215~217
- [2] Facon M. Potential for immunological supplementation of foods[J]. Food Agriculture Immunology, 1993, 5: 85~91
- [3] 郭本恒. 牛初乳理化性质和生物活性物质的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,1995
- [4] Fukumoto L R. Stability of membrane sterilized bovine immunoglobulins aseptically added to UHT milk[J]. J Food Sci, 1994, 59: 757~759
- [5] Lirchan E, Kummer A, Losso J N, et al. Stability of bovine immunoglobulin to thermal treatment and processing[J]. Food Research International, 1995, 28: 9~16
- [6] 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
- [7] Peterson W, Campbell B. Use of immunoglobulins from immunized cows in passive immunization in human[J]. J Food Sci, 1995, 75:494
- [8] 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,2000
- [9] Anems S G, Mckenne A B. Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1996, 44: 422~428
- [10] 曾宪诚,张元勤. 化学反应热动力学理论与方法[M]. 北京:化学工业出版社,2003. 1~16
- [11] 杨廷彬,王钦富. 免疫学及免疫学检验[M]. 北京:人民卫生出版社,1998. 11~24