

# 圆二色光谱、红外光谱法解析羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白结构及性质差异

李 萌<sup>1</sup>, 王 娟<sup>1</sup>, 魏子凯<sup>1</sup>, 康佳欣<sup>1</sup>, 张 玲<sup>2</sup>, Tabys Dina<sup>1</sup>, 刘 宁<sup>1\*</sup>, 张 爽<sup>1\*</sup>

1. 乳品科学教育部重点实验室(东北农业大学), 黑龙江 哈尔滨 150030

2. 东北农业大学医院, 黑龙江 哈尔滨 150030

**摘 要** 羊乳  $\beta$ -酪蛋白比牛乳  $\beta$ -酪蛋白更容易被婴幼儿消化吸收, 主要原因是二者结构的不同。目前对牛乳  $\beta$ -酪蛋白结构的研究较多, 但对羊乳  $\beta$ -酪蛋白的结构以及羊乳和牛乳  $\beta$ -酪蛋白结构差异的研究还鲜有报道。蛋白质二级结构的信息可由光谱获得, 其中圆二色光谱是利用蛋白质分子中具有光学活性的生色基团对左、右平面圆偏振光吸收不同, 对蛋白质结构进行表征的方法, 可以测定溶液状态下的蛋白质样品, 使蛋白质构象更接近其生理状态, 而且具有快速简便, 对构象变化灵敏等优点; 红外光谱则是利用蛋白质分子在振动过程中不同化学键或官能团对红外光吸收频率不同, 对蛋白质结构进行表征的方法, 可以测定固体状态下的蛋白质样品, 具有扫描速度快、分辨率高、可测波长范围广、不易受蛋白质样品的分子大小和外界条件影响等优点。圆二色光谱和红外光谱已被广泛应用于蛋白质构象的研究中, 但是结合使用这两种方法分析  $\beta$ -酪蛋白结构的研究还鲜有报道。因此, 该研究采用圆二色光谱和红外光谱比较羊乳和牛乳  $\beta$ -酪蛋白的结构特点, 并利用分光光度法对二者的巯基含量及溶解性进行了分析, 从功能性质方面的不同对两种蛋白结构的差异进行更好的说明。圆二色光谱测得羊乳和牛乳  $\beta$ -酪蛋白二级结构中主要以无规卷曲为主, 但羊乳  $\beta$ -酪蛋白的无规卷曲含量(50.2%±0.16%)显著高于牛乳  $\beta$ -酪蛋白(43.8%±0.14%), 其有序结构中  $\alpha$ -螺旋含量(2.7%±0.21%)、 $\beta$ -折叠含量(15.3%±0.08%)显著低于牛乳  $\beta$ -酪蛋白(4.3%±0.13%, 19.5%±0.12%),  $\beta$ -转角含量分别为 31.8%±0.11%和 32.4%±0.09%, 差异不显著; 红外光谱测得羊乳  $\beta$ -酪蛋白二级结构中  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角含量分别比牛乳  $\beta$ -酪蛋白低 18%~20%, 9%~10%, 0.6%~1%, 无规卷曲含量比牛乳  $\beta$ -酪蛋白高 17%~19%。对两种蛋白功能性质的研究表明, 羊乳  $\beta$ -酪蛋白与牛乳  $\beta$ -酪蛋白表面巯基含量基本一致 19~20  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ , 但羊乳  $\beta$ -酪蛋白总巯基含量[(28.35±0.13)  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ]显著低于牛乳  $\beta$ -酪蛋白[(46.72±0.21)  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ]; 羊乳  $\beta$ -酪蛋白与牛乳  $\beta$ -酪蛋白的等电点较为接近(pH 为 4~5), 且在等电点附近前者的溶解性低于后者, 而远离等电点时前者溶解性则高于后者。研究结果说明与牛乳  $\beta$ -酪蛋白相比, 羊乳  $\beta$ -酪蛋白分子的无序性和柔韧性更高, 胶束内部结构更加的柔软疏松。

**关键词** 羊乳; 牛乳;  $\beta$ -酪蛋白; 圆二色光谱; 红外光谱; 二级结构

**中图分类号:** TS252.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)03-0770-07

## 引 言

近年来, 羊乳以营养价值高、低致敏性、易消化吸收等特点, 深受广大消费者的青睐。羊乳比牛乳中蛋白质、维生素及矿物质等营养成分的含量更高<sup>[1-2]</sup>, 且现代医学研究已经证实摄入羊乳可有效改善牛乳蛋白过敏症状<sup>[3]</sup>。因此, 为了满足不能食用牛乳制品的特殊人群营养需求, 尤其是患有牛乳蛋白过敏症的婴幼儿营养需求, 分析羊乳和牛乳之间的

差异, 对研制更适合婴幼儿的配方食品具有重要的指导意义。

羊乳和牛乳之间的差异, 主要体现在蛋白含量及结构方面<sup>[4]</sup>。 $\beta$ -酪蛋白是羊乳酪蛋白中含量最多的一种蛋白(约占酪蛋白总量的 54.8%), 可在消化过程中被降解成多种具有生物活性的肽段, 这些生物活性肽在免疫、营养、消化代谢等方面发挥着重要的作用<sup>[5-6]</sup>。羊乳和牛乳  $\beta$ -酪蛋白结构及性质的不同, 是造成羊乳和牛乳在结合钙的能力、消化吸收能力等方面存在差异的主要原因。

收稿日期: 2019-01-21, 修订日期: 2019-04-10

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划项目(2018YFC1604304)资助

作者简介: 李 萌, 女, 1980年生, 乳品科学教育部重点实验室(东北农业大学)副研究员 e-mail: limengneau@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: ningliuneau@outlook.com; szhang@neau.edu.cn

$\beta$ -酪蛋白构象与功能关系的研究可采用光谱完成<sup>[7]</sup>。其中,圆二色光谱是利用蛋白质分子中具有光学活性的生色基团对左、右平面圆偏振光吸收不同,对蛋白质结构进行表征的方法。Hongna<sup>[8]</sup>等用圆二色光谱研究了盐酸四环素(tetracycline hydrochloride, TCH)对牛乳 $\beta$ -酪蛋白二级结构的影响,发现在 TCH 存在的情况下,牛乳 $\beta$ -酪蛋白的 $\alpha$ -螺旋含量显著降低,无规卷曲含量显著增加,说明圆二色光谱在反映蛋白二级结构变化方面是一种较为灵敏的方法。红外光谱是利用蛋白质分子在振动过程中不同化学键或官能团对红外光吸收频率的不同,获得蛋白质中化学键或官能团分布信息的方法。另外,通过对红外光谱中酰胺 I 带进行去卷积和高斯拟合处理,可获得蛋白质局部的二级结构信息。Baltacioglu<sup>[9]</sup>等利用红外光谱阐述了多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)在热处理过程中二级结构的变化,结果显示 PPO 的 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠含量与温度呈负相关。由此可见,红外光谱可成功分析蛋白质二级结构且不易受环境等因素的影响。

目前对 $\beta$ -酪蛋白的研究多集中于牛乳 $\beta$ -酪蛋白,对羊乳 $\beta$ -酪蛋白结构以及羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白结构差异的研究还鲜有报道。因此,本研究采用圆二色光谱和红外光谱技术测定羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白的结构,利用分光光度法对二者的疏基含量及溶解性进行了初步探究,旨在获得羊乳 $\beta$ -酪蛋白结构及功能性质方面的信息,为今后研制出营养价值更高、更适合婴幼儿的配方食品提供有利的理论依据。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

生鲜山羊乳,采自齐齐哈尔飞鹤牧场;牛乳 $\beta$ -酪蛋白、尿素、Tris 购于美国 sigma 公司;SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;其余试剂均购于天津市天力化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

蛋白质纯化仪 AKTA Exploer(美国 GE 公司);LC-MS/MS Thermo Q-Exactive 质谱仪(美国 Thermo Scientific 公司);J-815 型圆二色光谱仪(日本 Jasco 公司);Nicolet 6700 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司);DU800 紫外可见分光光度计(美国 Beckman 公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 羊乳 $\beta$ -酪蛋白的制备

##### (1)羊乳 $\beta$ -酪蛋白的色谱分离

将羊乳样品离心以除去脂肪,调节 pH 值至 4.6,收集酪蛋白沉淀并冻干。取冻干后的酪蛋白沉淀 600 mg,溶于 30 mL 的平衡缓冲液(20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris, 3 mol·L<sup>-1</sup> urea, 1% $\beta$ -巯基乙醇, pH 7.0),涡旋使其充分溶解后,离心弃去沉淀。将上清液从进样环打入 AKTA Exploer 蛋白质纯化仪中,用 0.3 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液进行梯度洗脱并用自动集样器收集各个洗脱峰。

##### (2)羊乳 $\beta$ -酪蛋白 SDS-PAGE 电泳和纯度鉴定

将各个洗脱峰的蛋白溶液进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色液染色 1 h 后进行脱色,直至条带清晰可见。用凝胶成像仪扫描获得电泳图片并进行分析,根据 Marker 的位置和各个样品的相对分子质量确定含有 $\beta$ -酪蛋白的洗脱峰。

#### (3)羊乳 $\beta$ -酪蛋白的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)鉴定

取 10  $\mu$ L 消化后的蛋白溶液样品进行质谱检测。LC-MS/MS 参数:液相色谱:色谱柱 C18, Eprogen(5  $\mu$ m, 150  $\text{\AA}$ );梯度洗脱 0~60 min, 100%A; 0~60 min, 5%~80%B;流动相 A: 0.1%甲酸的水溶液, B: 0.1%甲酸的乙腈溶液;流速 400 nL·min<sup>-1</sup>;柱温室温;检测波长 214 nm。质谱:正离子模式;扫描范围 50~2 200  $m/z$ ;毛细管电压 1 500 V;干燥气体温度 150  $^{\circ}\text{C}$ 。应用 Proteome Discoverer 1.4 软件整合的 MASCOT 对 UniProtKB Bovidae 蛋白数据库进行搜索、分析和鉴定。

#### 1.3.2 圆二色光谱、红外光谱分析羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白二级结构的差异

##### (1)圆二色光谱测定羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白的二级结构

取羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白样品各 1 mg,分别溶于 2 mL 磷酸盐缓冲液(0.01 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.0),加入石英比色皿置于圆二色光谱仪上进行检测,具体参数为:样品池光径 1 mm,步长 0.1 nm,扫描范围 190~250 nm,扫描速度 120 nm·min<sup>-1</sup>。用 Origin Pro 8.5 软件作图,并用 CD Pro 软件拟合蛋白质中二级结构的组成与含量。

##### (2)红外光谱测定羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白的二级结构

取羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白样品各 1 mg,分别与 10 mg 溴化钾均匀混合压片后,置于红外光谱仪中,在 400~4 000 cm<sup>-1</sup> 频率范围内扫描 32 次。用 Origin Pro 8.5 软件采集谱图并对特征峰进行标注,用 Peakfit Version 4.12 软件在相应谱带范围内进行基线校正,并经 Savitsk-Golay 函数平滑、去卷积处理,对二阶导数曲线进行多次拟合<sup>[10]</sup>,使拟合残差达到理想水平。根据各二级结构单元对应峰的面积,计算蛋白质中各二级结构的含量。

#### 1.3.3 羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白功能性质的测定

##### (1)羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白总巯基和表面巯基含量的测定

使用 Ellman's 法测定两种蛋白的巯基含量<sup>[11]</sup>。表面巯基含量的测定:取适量两种蛋白样品用 pH 8.0 的 Tris-Gly 缓冲溶液(含 4 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA)稀释至 100 mL,取 5 mL 稀释液,加入 0.1 mL 的 Ellman's 试剂。室温避光震荡 30 min 后,于 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液并用紫外分光光度计测定其在 412 nm 处的吸光值,以仅加 Ellman's 试剂为空白对照。总巯基含量的测定与测定表面巯基含量方法一致,所使用的缓冲溶液为含 4 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 8 mmol·L<sup>-1</sup> 尿素, pH 为 8.0 的 Tris-Gly 缓冲溶液。

巯基(SH)含量的计算公式如下

$$\text{SH}/(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{73.53A_{412}D}{c}$$

式中: $A_{412}$ 为样品在 412 nm 处的吸光值; $D$ 为样品稀释倍数; $c$ 为干物质浓度,mg·mL<sup>-1</sup>。

## (2) 羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白溶解性的测定

参照 Singh<sup>[12]</sup> 等的方 法。在室温条件下, 分别取两种蛋白溶液样品( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 用磁力搅拌器搅拌 1 h, 然后调整 pH 值并继续搅拌 30 min,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min。用 BCA 试剂盒测定上清液的蛋白浓度, 此浓度与总蛋白浓度之比即为该蛋白质的溶解度。

### 1.4 数据处理及统计分析

采用 Origin Pro 8.5 对实验数据进行绘图, Spass Statistics 22.0 软件对结果进行 ANOVA 差异显著性分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 显著性水平设置为  $p < 0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 羊乳 $\beta$ -酪蛋白的制备

#### 2.1.1 羊乳 $\beta$ -酪蛋白的色谱分离纯化

对酪蛋白样品进行梯度洗脱的结果如图 1 所示。从图 1 可以看出, 本次纯化过程中出现一个较大的穿过峰和三个蛋白洗脱峰, 将这三个蛋白洗脱峰分别标记为峰 I、峰 II 和峰 III。由于酪蛋白样品含有的未与柱子结合的蛋白和其他杂质的洗脱液会先从柱子流出, 因此层析图中首先出现了一个较大的穿过峰。另外, 图 1 中三个蛋白洗脱峰没有发生重合,

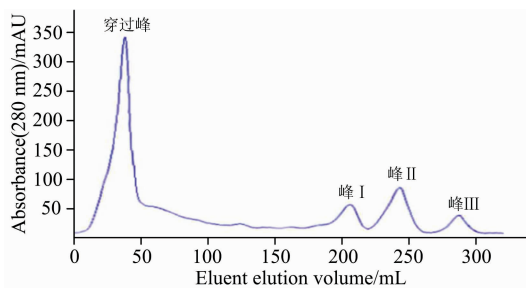


图 1 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析法纯化羊乳  $\beta$ -酪蛋白结果

Fig. 1 Purification of goat milk  $\beta$ -casein by DEAE-Sepharose Fast Flow anion exchange chromatography

说明酪蛋白分离效果较好, 且与峰 I 和峰 III 相比, 峰 II 的峰型较大, 说明其所代表的蛋白质所占比例较高。

#### 2.1.2 羊乳 $\beta$ -酪蛋白 SDS-PAGE 电泳和纯度鉴定

图 2 为各峰洗脱液经 SDS-PAGE 电泳鉴定后的结果。从图 2 可以看出, 峰 I 和峰 II 均为单一的蛋白质, 但峰 II 相对百分含量较大, 其纯度高达 90%。根据 SDS-PAGE 图谱及  $\beta$ -酪蛋白的相对分子质量, 可初步判定峰 II 为  $\beta$ -酪蛋白的目标峰。

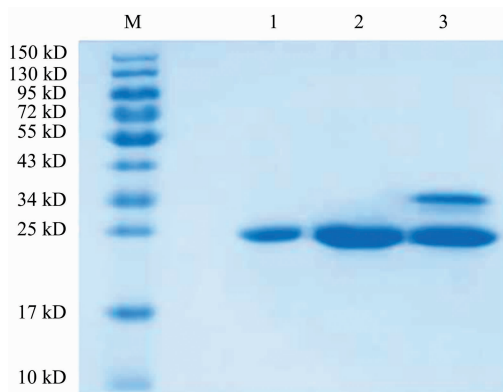


图 2 羊乳  $\beta$ -酪蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

M: Marker; 1: 峰 I; 2: 峰 II; 3: 峰 III

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis of goat milk  $\beta$ -casein

M: Marker; 1: peak I; 2: peak II; 3: peak III

#### 2.1.3 羊乳 $\beta$ -酪蛋白的 LC-MS/MS 鉴定

对峰 II 蛋白组分进行 LC-MS/MS 鉴定, 结果显示在 UniProtKB Bovidae 数据库中编号为 Q95L76 的蛋白得分最高, 为 15 678 分, 且该蛋白检测出可信度较高 (Score > 11) 的肽段共 11 条, 这 11 条肽段的信息匹配表如表 1 所示。图 3 标红部分为该蛋白肽段及碎片离子质量数实测值与理论值相符的肽段序列, 序列覆盖率为 53%。因此, 根据 SDS-PAGE 电泳及质谱鉴定结果, 可以确认本研究纯化所得的峰 II 蛋白组分为羊乳  $\beta$ -酪蛋白。

表 1 LC-MS/MS 测定羊乳  $\beta$ -酪蛋白的肽段信息匹配表

Table 1 Peptides matching table of goat milk  $\beta$ -casein by LC-MS/MS

Start—End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Miss	Sequence
48—63	661.292 1	1 980.854 5	1 980.854 8	0	K. FQSEEQQTDELQDK. I
113—120	466.267 5	930.520 4	930.520 8	1	K. VKETMVPK. H
121—128	507.263 6	1 012.512 5	1 012.516 4	1	K. HKEMPPFK. Y
123—128	374.688 8	747.362 9	747.362 5	0	K. EMPFPK. Y
123—147	971.478 5	2 911.413 7	2 911.420 1	1	K. EMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVEK. L
129—147	1 092.042 9	2 182.071 1	2 182.068 1	0	K. YPVEPFTESQSLTLTDVEK. L
148—184	693.370 9	4 154.181 8	4 154.221 3	0	K. LHLPLPLVQSWMHQPPQLSPTVMFPPQSVLSLSPK. V
185—191	390.750 8	779.487 1	779.490 5	0	K. VLPVPQK. V
185—196	680.426 9	1 358.839 2	1 358.839 8	1	K. VLPVPQKVVPPQR. D
192—215	922.514 4	2 764.521 4	2 764.509 8	1	K. VVPQRDMPIQAFLLYQEPVLPVPR. G
197—215	1 093.590 2	2 185.165 9	2 185.160 5	0	R. DMPIQAFLLYQEPVLPVPR. G

### 2.2 圆二色光谱、红外光谱分析羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白二级结构的差异

#### 2.2.1 圆二色光谱测定羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白的二级结构

图 4 为羊乳和牛乳  $\beta$ -酪蛋白的圆二色光谱谱图。根据图

4 和相关参考文献对蛋白质圆二色光谱的峰谱指认信息<sup>[13]</sup>, 羊乳和牛乳  $\beta$ -酪蛋白在 190 nm 左右均出现一个较为明显的正峰谱带, 此处特征峰为  $\alpha$ -螺旋在 192 nm 与  $\beta$ -折叠在 185~200 nm 处特征峰的重合峰, 说明这两种蛋白结构中均含有  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠。另外, 在 200~210 nm 之间出现一个明显的负峰谱带, 此处特征峰为  $\alpha$ -螺旋在 208 nm 与无规卷曲在 200 nm 处特征峰的重合峰, 而当波长超过 206 nm 后, 两种蛋白样品的峰谱谱带均开始向正峰发展, 这是  $\beta$ -转角在 206 nm 特征峰的谱带所造成的结果, 说明这两种蛋白结构中还存在大量的  $\beta$ -转角和无规卷曲。使用 CD pro 软件分析两种蛋白各二级结构的相对百分含量, 结果如表 2 所示。

1 MKVLILACLVLALAIAREQEE LNVVGETVES LSSSEESITH INKKIEK FQS  
51 EEQQQTEDEL QDKIHFAQA QSLVYPFTGP IPNSLPQNIL PLTQTPVVVP  
101 PFLQPEIMGV PKVKETMVPK HKEMPFKYP VEPFTESQSL TLTDVEKLHL  
151 PLPLVQSWMH QPPQLSPTV MFPPQSVLSL SQPKVLPVPQ KVVQPRDMP  
201 QAFLLYQEPV LGPVRGPFPI LVV

图 3 羊乳  $\beta$ -酪蛋白的质谱序列覆盖情况

注: 标红部分为检测到的片段

Fig. 3 Mass spectrum sequence coverage of goat milk  $\beta$ -casein

Note: the red part is the detected fragment

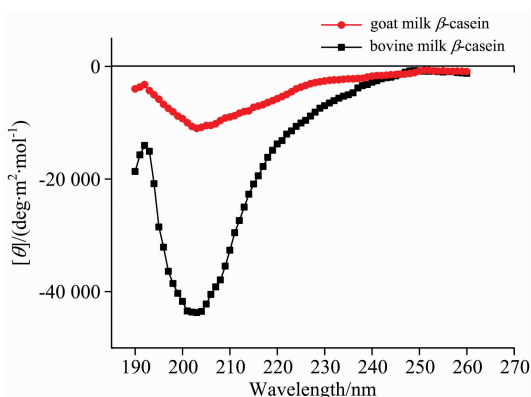


图 4 羊乳  $\beta$ -酪蛋白和牛乳  $\beta$ -酪蛋白圆二色光谱图

Fig. 4 Circular dichroism spectra of goat milk  $\beta$ -casein and bovine milk  $\beta$ -casein

表 2 圆二色光谱测定羊乳  $\beta$ -酪蛋白和牛乳  $\beta$ -酪蛋白中各二级结构的百分含量

Table 2 Percentage of secondary structure in goat milk  $\beta$ -casein and bovine milk  $\beta$ -casein by Circular dichroism

	羊乳 $\beta$ -酪蛋白/%	牛乳 $\beta$ -酪蛋白/%
$\alpha$ -螺旋	2.7 ± 0.21 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.13 <sup>b</sup>
$\beta$ -折叠	15.3 ± 0.08 <sup>a</sup>	19.5 ± 0.12 <sup>b</sup>
$\beta$ -转角	31.8 ± 0.11 <sup>a</sup>	32.4 ± 0.09 <sup>a</sup>
无规卷曲	50.2 ± 0.16 <sup>a</sup>	43.8 ± 0.14 <sup>b</sup>

注: 同列肩标字母不同表示差异显著 ( $p < 0.05$ )

Note: Difference letters above same column indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

根据表 2 可以看出, 羊乳  $\beta$ -酪蛋白内部  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠含量显著低于牛乳  $\beta$ -酪蛋白 ( $p < 0.05$ ), 无规卷曲含量则显著高于牛乳  $\beta$ -酪蛋白 ( $p < 0.05$ )。据报道, 蛋白质分子中  $\alpha$ -

螺旋和  $\beta$ -折叠能够形成紧密的无空腔结构, 而与  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠结构相比, 无规卷曲结构的构象稳定性和紧密程度则相对较差<sup>[14]</sup>, 因此, 羊乳  $\beta$ -酪蛋白中较低含量的  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠以及较高含量的无规卷曲结构使其分子的无序性更高, 结构更加疏松开放。

### 2.2.2 红外光谱测定羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白的二级结构

图 5 为羊乳和牛乳  $\beta$ -酪蛋白的红外光谱谱图。酰胺 I 带的振动频率取决于 C=O 和 N-H 之间的氢键性质, 此波段的吸收峰主要表示蛋白分子之间及分子内部形成的二级结构。因此, 在红外光谱中主要利用酰胺 I 带来分析蛋白的特定二级结构信息。根据相关参考文献对蛋白红外光谱的指认信息<sup>[15]</sup>, 酰胺 I 带的波长范围为 1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$ 。从图 5 可知, 羊乳和牛乳  $\beta$ -酪蛋白酰胺 I 带的特征吸收峰分别在波长为 1 621.31 和 1 632.61  $\text{cm}^{-1}$  处。根据酰胺 I 带特征峰的指认信息:  $\alpha$ -螺旋位于 1 642~1 660  $\text{cm}^{-1}$  波段,  $\beta$ -折叠位于 1 615~1 638 和 1 672~1 694  $\text{cm}^{-1}$  两个波段,  $\beta$ -转角位于 1 653~1 691  $\text{cm}^{-1}$  波段, 无规卷曲位于 1 639~1 654  $\text{cm}^{-1}$  波段, 采用 Peakfit Version 4.12 软件分别对图 5 中 1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$  处两种蛋白样品的峰谱图进行去卷积、二阶求导和高斯拟合处理, 得到的拟合图谱如图 6 所示(拟合图谱与原图谱残差  $R^2 \geq 0.99$ )。表 3 为经计算后得到的两种蛋白各二级结构的相对百分含量, 从表 3 可以看出羊乳  $\beta$ -酪蛋白内部  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠含量显著低于牛乳  $\beta$ -酪蛋白 ( $p < 0.05$ ), 无

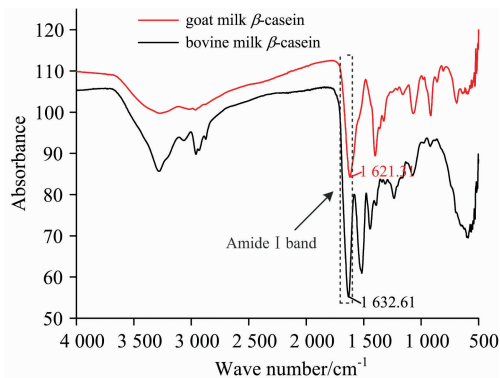


图 5 羊乳  $\beta$ -酪蛋白和牛乳  $\beta$ -酪蛋白红外光谱图

Fig. 5 Fourier transformation infrared spectroscopy spectra of goat milk  $\beta$ -casein and bovine milk  $\beta$ -casein

表 3 红外光谱测定羊乳  $\beta$ -酪蛋白和牛乳  $\beta$ -酪蛋白中各二级结构的百分含量

Table 3 Percentage of secondary structure in goat milk  $\beta$ -casein and bovine milk  $\beta$ -casein by Fourier transformation infrared spectroscopy

	羊乳 $\beta$ -酪蛋白/%	牛乳 $\beta$ -酪蛋白/%
$\alpha$ -螺旋	12.1 ± 0.14 <sup>a</sup>	31.2 ± 0.22 <sup>b</sup>
$\beta$ -折叠	18.9 ± 0.18 <sup>a</sup>	28.3 ± 0.13 <sup>b</sup>
$\beta$ -转角	7.8 ± 0.09 <sup>a</sup>	8.6 ± 0.11 <sup>a</sup>
无规卷曲	52.7 ± 0.16 <sup>a</sup>	34.6 ± 0.15 <sup>b</sup>

注: 同列肩标字母不同表示差异显著 ( $p < 0.05$ )

Note: Difference letters above same column indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

规卷曲含量则显著高于牛乳  $\beta$ -酪蛋白 ( $p < 0.05$ ), 该结果与圆二色光谱测得的两种蛋白二级结构趋势相同。

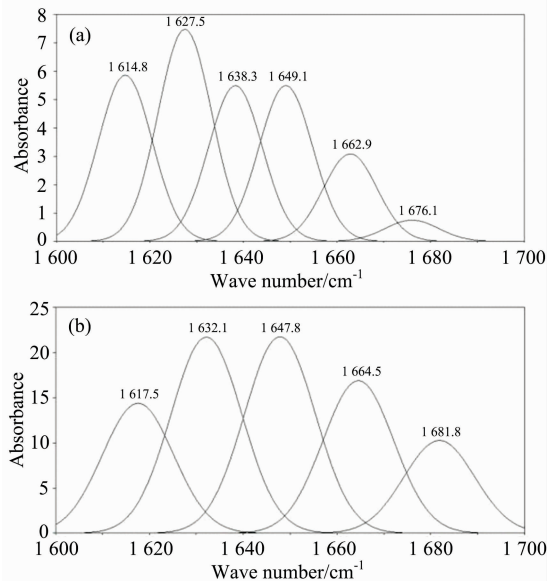


图 6 羊乳  $\beta$ -酪蛋白和牛乳  $\beta$ -酪蛋白酰胺 I 带高斯曲线拟合图

(a): 羊乳  $\beta$ -酪蛋白酰胺 I 带高斯曲线拟合图;

(b): 牛乳  $\beta$ -酪蛋白酰胺 I 带高斯曲线拟合图

Fig. 6 Gaussian curve fitting map of amide I bands of goat milk  $\beta$ -casein and bovine milk  $\beta$ -casein

(a): Gaussian curve fitting map of goat milk  $\beta$ -casein amide I band;

(b): Gaussian curve fitting map of bovine milk  $\beta$ -casein amide I band

### 2.3 羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白功能性质的测定

#### 2.3.1 羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白总巯基和表面巯基含量的测定

表 4 为羊乳和牛乳  $\beta$ -酪蛋白总巯基和表面巯基含量。从表 4 可以看出, 两种蛋白表面巯基含量相似, 但羊乳  $\beta$ -酪蛋白总巯基含量显著低于牛乳  $\beta$ -酪蛋白 ( $p < 0.05$ ), 这说明羊乳  $\beta$ -酪蛋白的巯基主要以暴露巯基的形式分布于蛋白质分子的表面, 其内部巯基含量更低。巯基是蛋白质中重要的功能基团之一, 具有较高的生物活性, 其可与二硫键在巯基/二硫键氧化还原酶的催化下进行相互转化, 羊乳  $\beta$ -酪蛋白胶束内部更低的巯基含量使其内部二硫键含量更少。

表 4 羊乳  $\beta$ -酪蛋白和牛乳  $\beta$ -酪蛋白总巯基和表面巯基含量

Table 4 Total and surface sulfhydryl content of goat milk  $\beta$ -casein and bovine milk  $\beta$ -casein

	总巯基/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ )	表面巯基/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ )
羊乳 $\beta$ -酪蛋白	28.35 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	19.67 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
牛乳 $\beta$ -酪蛋白	46.72 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	19.21 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>

注: 同列肩标字母不同表示差异显著 ( $p < 0.05$ )

Note: Difference letters in the same column indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

#### 2.3.2 羊乳和牛乳 $\beta$ -酪蛋白溶解性的测定

溶解性可以反映出蛋白质内部结构发生变性和聚集的程度, 是蛋白质最重要的物理、化学和功能性质之一。羊乳和牛乳  $\beta$ -酪蛋白在不同 pH 值条件下的溶解性曲线如图 7 所示。从图 7 可以看出, 两种蛋白的溶解性具有明显的 pH 依赖性, 且二者等电点 (pH 为 4~5) 接近, 溶解性曲线均呈现出在接近等电点时溶解性降低, 远离等电点时溶解性升高的趋势。

当两种蛋白溶液的 pH 值在等电点附近时, 蛋白分子表面所带的正电荷与负电荷恰好相等, 导致蛋白分子与分子间的相互作用力增强, 此时羊乳  $\beta$ -酪蛋白比牛乳  $\beta$ -酪蛋白的溶解性低, 说明羊乳  $\beta$ -酪蛋白分子表面包含更多的疏水基团; 当两种蛋白溶液的 pH 值远离等电点时 (pH 2~4 和 pH 6~10), 蛋白分子则处于酸性或碱性的环境中, 此时蛋白质分子带有静电荷, 由于静电排斥和离子水化作用, 蛋白质分子之间不易聚集, 因此溶解性较高, 同时, 溶液中离子强度的增大使蛋白表面的电荷发生堆积, 促进蛋白结构的展开, 且结合表 4 可知, 羊乳  $\beta$ -酪蛋白包裹在胶束内部的巯基含量低于牛乳  $\beta$ -酪蛋白, 因此这很好的解释了羊乳  $\beta$ -酪蛋白在偏离等电点时溶解性更高的原因。

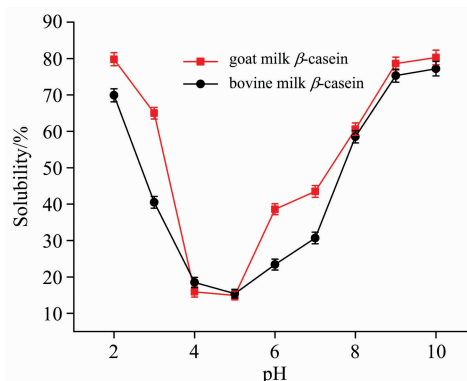


图 7 羊乳  $\beta$ -酪蛋白和牛乳  $\beta$ -酪蛋白的溶解性-pH 曲线

Fig. 7 Solubility-pH curve of goat milk  $\beta$ -casein and bovine milk  $\beta$ -casein

## 3 结论

圆二色光谱和红外光谱检测结果表明: 与牛乳  $\beta$ -酪蛋白相比, 羊乳  $\beta$ -酪蛋白二级结构中  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和  $\beta$ -转角的内容更少, 无规卷曲含量更高, 羊乳  $\beta$ -酪蛋白分子结构更倾向于无序性, 蛋白分子的柔韧性更好。

羊乳  $\beta$ -酪蛋白与牛乳  $\beta$ -酪蛋白表面巯基含量相似, 但前者总巯基含量显著低于后者, 羊乳  $\beta$ -酪蛋白内部巯基含量更低。

羊乳  $\beta$ -酪蛋白和牛乳  $\beta$ -酪蛋白在接近等电点 (pH 为 4~5) 时, 溶解性降低, 远离等电点溶解性升高。在 pH 2~4 和 pH 6~10 时, 羊乳  $\beta$ -酪蛋白溶解性高于牛乳  $\beta$ -酪蛋白, 而在等电点时前者溶解性低于后者, 羊乳  $\beta$ -酪蛋白分子与分子间相互作用力更强, 分子表面包含了更多的疏水基团。

## References

- [1] Verrucka S, Dantasb A, Prudencio S E. *Journal of Functional Foods*, 2019, 52: 243.
- [2] ZHANG Xi-tong, GUAN Bo-yuan, KONG Fan-hua, et al(张熙桐, 关博元, 孔繁华, 等). *Food Science(食品科学)*, 2017, 38(24): 107.
- [3] Albenzio M, Campanozzi A, D'Apolito M, et al. *Small Ruminant Research*, 2012, 105(1-3): 202.
- [4] Claeys W, Verraes C, Cardoen S, et al. *Food Control*, 2014, 42(3): 188.
- [5] Atamer Z, Post A E, Schubert T, et al. *International Dairy Journal*, 2017, 66: 115.
- [6] Ahmed S A, El-Bassiony T, Elmalt M L, et al. *Food Research International*, 2015, 74: 80.
- [7] Wang R, Xu P, Chen Z, et al. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 101: 207.
- [8] Bi H, Tang L, Gao X, et al. *Journal of Luminescence*, 2016, 178: 72.
- [9] Baltacıoğlu H, Bayındır A, Severcan M, et al. *Food Chemistry*, 2015, 187: 263.
- [10] WANG Xiao-lin, ZHU Li-jie, CHEN Yan-jie, et al(王晓琳, 朱力杰, 陈妍婕, 等). *Food and Fermentation Industries(食品与发酵工业)*, 2016, 42(5): 86.
- [11] LI Gong-zhong, ZHAO Ying, WANG Jun-tong, et al(李弓中, 赵英, 王俊彤, 等). *Food Science(食品科学)*, 2019, 40(9): 70.
- [12] Singh A, Sharma S, Singh B. *Journal of Cereal Science*, 2017, 76: 131.
- [13] ZHOU Juan, JIN Gui-yun, SUN Ting-quan, et al(周娟, 金桂云, 孙婷荃, 等). *Chinese Journal of Analysis Laboratory(分析实验室)*, 2014, 33(1): 35.
- [14] QI Bao-kun, ZHAO Cheng-bin, JIANG Lian-zhou, et al(齐宝坤, 赵城彬, 江连洲, 等). *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology(中国食品学报)*, 2018, 18(9): 53.
- [15] Han Y, Wang J, Li Y, et al. *Food Chemistry*, 2015, 188: 201.

## Analyzing Structure and Properties of Goat Milk $\beta$ -Casein and Bovine Milk $\beta$ -Casein by Circular Dichroism and Fourier Transformation Infrared Spectroscopy

LI Meng<sup>1</sup>, WANG Juan<sup>1</sup>, WEI Zi-kai<sup>1</sup>, KANG Jia-xin<sup>1</sup>, ZHANG Ling<sup>2</sup>, Tabys Dina<sup>1</sup>, LIU Ning<sup>1\*</sup>, ZHANG Shuang<sup>1\*</sup>

1. Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education (Northeast Agricultural University), Harbin 150030, China

2. Northeast Agricultural University Hospital, Harbin 150030, China

**Abstract** Goat milk  $\beta$ -casein is more easily digested and absorbed by infants than bovine milk  $\beta$ -casein, and the principal reason for this difference is the diversity of their structure. Recently, many investigations have reported the structure of bovine milk  $\beta$ -casein, however, the structure of goat milk  $\beta$ -casein and the difference between the structure of goat milk  $\beta$ -casein and bovine milk  $\beta$ -casein still needs to be studied in detail. The information of protein secondary structure can be obtained by spectroscopy technique, Circular dichroism is a method to characterize the structure of protein in solution state by using different optical active chromophores to absorb circularly polarized light in the left and right planes, which can make the protein conformation closer to its physiological state, and has the advantages of being rapid, simple and sensitive to conformational changes; Fourier transformation infrared spectroscopy is a method to characterize the structure of protein in solid state by using different chemical bonds or functional groups in the process of the vibration, which has the advantages of fast scanning speed, high resolution, wide measuring wavelength range, and is not easily affected by the molecular size and external conditions of protein samples. Circular dichroism and Fourier transformation infrared spectroscopy have been widely used in the study of protein conformation, but these two spectroscopy techniques to analyze the structure of  $\beta$ -casein has been rarely reported. Thus, this study used Circular dichroism and Fourier transformation infrared spectroscopy to compare the structural characteristics of the goat milk  $\beta$ -casein and bovine milk  $\beta$ -casein, and the sulfhydryl content and solubility of the two proteins were analyzed by spectrophotometry. Circular dichroism showed that random coil was the main secondary structure of goat milk  $\beta$ -casein and bovine milk  $\beta$ -casein, but the content of random coil of goat milk  $\beta$ -casein ( $50.2\% \pm 0.16\%$ ) was significantly higher than bovine milk  $\beta$ -casein ( $43.8\% \pm 0.14\%$ ), the content of  $\alpha$ -helix ( $2.7\% \pm 0.21\%$ ) and  $\beta$ -fold ( $15.3\% \pm 0.08\%$ ) in the ordered structure were significantly lower than bovine milk  $\beta$ -casein ( $4.3\% \pm 0.13\%$ ,  $19.5\% \pm 0.12\%$ ), the content of  $\beta$ -turn was  $31.8\% \pm 0.11\%$ ,  $32.4\% \pm 0.09\%$ , respectively and the difference was not significant; Fourier transformation infrared spectroscopy showed that the content of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -fold,  $\beta$ -turn in the secondary structure of goat milk  $\beta$ -casein were lower than bovine milk  $\beta$ -casein by  $18\% \sim 20\%$ ,  $9\% \sim 10\%$ ,  $0.6\% \sim 1\%$ , respectively and the content of random coil was higher than bovine milk  $\beta$ -casein by  $17\% \sim 19\%$ . The func-

tional properties of the two proteins showed that the surface sulfhydryl content of goat milk  $\beta$ -casein and bovine milk  $\beta$ -casein were basically consistent with  $19\sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ , but the total sulfhydryl content of goat milk  $\beta$ -casein ( $28.35 \pm 0.13 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) was significantly lower than bovine milk  $\beta$ -casein ( $46.72 \pm 0.21 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ); the isoelectric point of goat milk  $\beta$ -casein was similar to bovine milk  $\beta$ -casein (pH 4~5), and the solubility of goat milk  $\beta$ -casein was lower than bovine milk  $\beta$ -casein near the isoelectric point, but higher than bovine milk  $\beta$ -casein far from the isoelectric point. The results showed that compared with the bovine milk  $\beta$ -casein, the disorder and flexibility of the goat milk  $\beta$ -casein were higher, and the internal structure of micelle was softer and looser.

**Keywords** Goat milk; Bovine milk;  $\beta$ -casein; Circular dichroism; Fourier transformation infrared spectroscopy; Secondary structure

\* Corresponding authors

(Received Jan. 21, 2019; accepted Apr. 10, 2019)

(上接 764 页)

### 4.3 会议住宿

会议酒店:

#### 1. 世外桃源酒店

地址: 四川省成都市武侯区科华北路 69 号

酒店房间价格: 标间 620 元/间天; 大床房 560 元/间天

#### 2. 科华苑宾馆

地址: 四川省成都市武侯区科华北路 141 号

酒店房间价格: 标间 360 元/间天; 大床房 470 元/间天

由于会议期间住宿相对紧张, 涉及到房间预定、会议安排等因素, 务请各位专家、同学在截止日期前注册, 只有在收到注册费后, 才会进行会议相关安排, 务请体谅与协助。

### 五、会议组织机构

大会组委会人员组成请见如下链接: [http://www.sinospectroscopy.org.cn/meeting/extend.php?mid=24&body\\_id=12](http://www.sinospectroscopy.org.cn/meeting/extend.php?mid=24&body_id=12)

学术委员会人员组成见如下链接: [http://www.sinospectroscopy.org.cn/meeting/extend.php?mid=24&body\\_id=13](http://www.sinospectroscopy.org.cn/meeting/extend.php?mid=24&body_id=13)

有关会议的邀请报告、住房信息、交通路线、稿件编号等信息敬请登录会议主页查询。

### 六、组委会和会务组联系方式

组委会:

吴兰: 13688385033 Email: wulan@scu.edu.cn

会务组:

注册&住宿: 张亮 15902844473 Email: zhang.liang@scu.edu.cn

报告&论文: 李成辉 18980877825 Email: atcpubs@scu.edu.cn

厂商联络: 王香凤 13520034335 Email: xiangfeng@bnu.edu.cn

### 七、支持媒体

会议官网: 光谱网(<http://www.sinospectroscopy.org.cn>)

会议各类信息发布以光谱网信息为准。

主办单位:

中国光学学会

中国化学会

中国光学学会光谱专业委员会

承办单位:

四川大学分析测试中心

中国光学学会光谱专业委员会

四川大学分析测试中心

2019 年 11 月 18 日