

乳清中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白分离制备技术研究

赵玉娟, 段翠翠, 高磊, 牛春华, 李盛钰*

(吉林省农业科学院农产品加工研究所/国家乳品加工技术研发分中心, 长春 130033)

摘要:本研究采用不同分离方法对牛乳乳清中的主要成分 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白进行逐级分离纯化。利用两步硫酸铵沉淀法对乳清蛋白进行初级分离,使蛋白含量提高了4倍;响应面法优化PEG1500/硫酸铵双水相萃取系统的最佳工艺参数,萃取后蛋白组分被进一步纯化,蛋白浓度提高到815.6 mg/g,达到浓缩主要蛋白的目的;萃取蛋白经Sephadex G-75和DEAE离子交换层析后,所获得的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白样品纯度达到85%。

关键词: α -乳白蛋白; β -乳球蛋白; 双水相萃取; 浓缩; 分离纯化

中图分类号: TS252

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2017)02-0053-07

Studies on Separation and Preparation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from Whey

ZHAO Yujuan, DUAN Cuicui, GAO Lei, NIU Chunhua, LI Shengyu*

(*Institute of Agricultural products processing Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences /National R&D Center for Milk Processing, Changchun 130033, China*)

Abstract: In this study, α -lactalbumin and β -lactoglobulin, the main ingredients in whey, were separated and purified step by step by different methods. Two-step ammonium sulfate precipitation method was used to primarily concentrate bovine whey protein, so that the protein content was increased by 4 times. The optimal parameters of PEG1500/(NH₄)₂SO₄ two aqueous phase extraction system were optimized by response surface methodology, the extracted protein fraction was further purified, so the protein concentration was further increased to 815.6 mg/g. Followed by Sephadex G-75 gel chromatography and DEAE-Sepharose Fast Flow ion-exchange column chromatography, the purity of α -lactalbumin and β -lactoglobulin reached 85%.

Key words: α -lactalbumin; β -lactoglobulin; Aqueous two-phase systems; Concentration; Partition

α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白是牛乳乳清蛋白的主要组成部分,而作为干酪副产物的乳清资源非常丰富,分离纯化其中的主要成分不但可提高乳清的利用价值还可减少环境污染。 α -乳白蛋白(α -lactalbumin, α -La)和 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -Lg)因具有良好的生物学特性和营养特性,被应用于食品、药品和保健品中,如 α -乳白蛋白可用作药物缓释剂和抗癌药物^[1]、抗II型糖尿病的葡萄糖吸附剂,以及婴儿配方食品 and 低敏食

品^[2]等;而 β -乳球蛋白具有凝胶、乳化等丰富的功能特性^[3],可用作添加剂、稳泡剂、脂肪替代物等,且该蛋白是优质氨基酸重要来源,已被用于新型乳清饮料等功能产品的开发^[4]。

乳清中蛋白含量低、且两种主要蛋白 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的分子量和理化性质十分接近,很难用常规的分离纯化方法获得高纯度的乳清蛋白产品。目前虽有多种方法用于乳清蛋白的分离,如盐析^[5]、疏水作用/阴离子交换色谱法^[6]、超滤^[7]等。然而这些方法都存在一定的局限性,如色谱法成本高,超滤时残余的脂肪可能造成不可逆的膜污染等。随着分离纯化技术的发展,一些新技术不断应用于乳清蛋白的分离制备,例如双水相萃取系统^[8](Aqueous two phase systems, ATPS)等。将这些分离新技术与传统方法相结合,开发

收稿日期: 2017-01-11

基金项目: 国家科技支撑计划(2013BAD18B07); 现代农业产业技术体系(CARS-37)

作者简介: 赵玉娟(1980-),女,副研究员,主要从事乳品微生物与功能食品研究。

通讯作者: 李盛钰,男,博士,副研究员, E-mail: lisy720@126.com

操作简单、成本低廉、易于规模化生产的成套分离制备技术,应用于乳清蛋白的分离制备,就显得十分必要。

本研究主要以牛乳乳清为研究对象,采用硫酸铵分级沉淀、双水相萃取、凝胶过滤层析等不同分离技术相结合的方法,分离制备乳清中的主要蛋白成分 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白,优化了分离制备工艺,为制备高纯度 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白提供了一套新的解决方案。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

脱盐乳清粉 D90(新西兰进口);Sephadex G-75(法玛西亚公司);DEAE-Sephrose(法玛西亚公司);BCA 蛋白定量试剂盒(北京鼎国生物技术有限公司);蛋白电泳系统(美国 Bio-rad);Alphal-mager HP 凝胶成像系统(美国 Alpha Innotech 公司);Cary 300 UV-VIS 分光光度计(美国 varian 公司);真空冷冻干燥机(美国 Labconco 公司);其他化学试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白含量的测定

采用 BCA 法测定蛋白含量,具体操作参考 BCA 蛋白定量试剂盒的说明书。

1.2.2 硫酸铵分级沉淀乳清蛋白

向 10% 的脱盐乳清溶液中缓慢加入硫酸铵,磁力搅拌下充分溶解,使溶液中硫酸铵的含量依次为 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%,4℃ 静置 30 min 后,6 000 r/min 离心 30 min,收集蛋白沉淀物透析除盐,冻干。将各分级沉淀的乳清蛋白冻干样品经 SDS-PAGE 电泳检测样品的组成,电泳条件:分离胶 15%,浓缩胶 5%,上样量 15 μ L,预电泳电压 100 V,待样品进入分离胶后,电压调至 120 V 恒压电泳,考马斯亮蓝 R250 染色,脱色后凝胶成像系统拍照、分析。

1.2.3 PEG/硫酸铵双水相萃取

采用浊点法绘制 PEG/硫酸铵双水相系统的相图,参照张儒等^[9]方法进行绘图。分别取不同分子量的 PEG(1500、4000、8000)与硫酸铵形成双水相,计算双水相体系的相比(R)和蛋白回收率(Y),确定最优的双水相体系。

相比计算公式如下:

$$R = V_u/V_b$$

其中, V_u 、 V_b 分别是上下相体积(mL)。

乳清蛋白回收率(Y)计算公式如下:

$$Y = \frac{M_l}{M} \times 100\%$$

其中, M_l 为下相蛋白质的总质量,M为体系中蛋白的总质量。

收集形成双水相系统的各相,除盐后冻干,利用 SDS-PAGE 电泳检测形成双水相各相的组成。

1.2.4 响应面优化双水相萃取条件

以单因素试验结果(结果未列出)为基础,应用响应面中心组合设计优化 PEG1500 质量分数、NaCl 质量分数和反应温度 3 个因素对蛋白回收率的影响,并利用 Design-Expert 8.0.6 软件对数据进行统计分析。影响因素水平编码见表 1。

表 1 双水相萃取影响因素水平编码表

编码	因 素		
	PEG1500 质量分数 (%)	NaCl 质量分数 (%)	反应温度 (°C)
-1	16	2	20
0	18	3	30
1	20	4	40

1.2.5 离子交换和凝胶层析

称取萃取蛋白样品 500 mg,加入 5 mL 水使其溶解,上到平衡后的 Sephadex G-75 凝胶柱上,以 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液洗脱,流速为 0.2 mL/min,根据紫外检测图谱收集各部分样品,透析,冻干,利用 SDS-PAGE 电泳进行分析,确定 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的目标洗脱峰。取经凝胶层析初分离的各目标洗脱峰经 DEAE-Sephrose 弱离子柱层析进一步纯化,以含 0~0.5 mol/L NaCl 的磷酸盐连续梯度洗脱液将目的蛋白分别进行洗脱,利用 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的纯度。

2 试验结果

2.1 硫酸铵分级沉淀法初步提取 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白

乳清经分级沉淀后所获得的粗蛋白重量结果如图 1 所示,经 80% 硫酸铵盐析所获得的粗提乳清蛋白最多,约占粗提蛋白总数的 50%。将各级冻干样品溶解(1 mg/mL)后,SDS-PAGE 电泳检测(图 2)发现当硫酸铵饱和度高于 60% 时析出的蛋白质为 α -La、 β -Lg 及 BSA,所以本研究采用两步硫酸铵沉淀法提纯乳清蛋白,即首先调整硫酸铵饱和度为 60%,去除样品中的杂蛋白后调整硫酸铵饱和度至 80%。

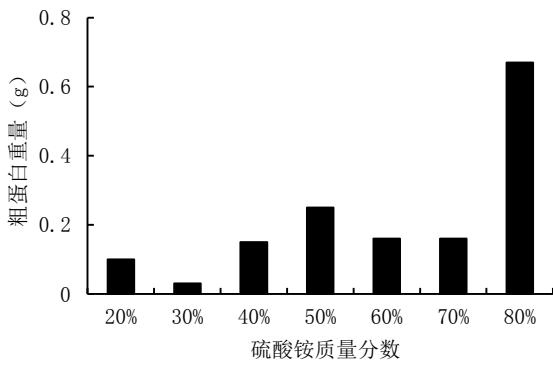


图1 硫酸铵分级沉淀获得粗蛋白重量

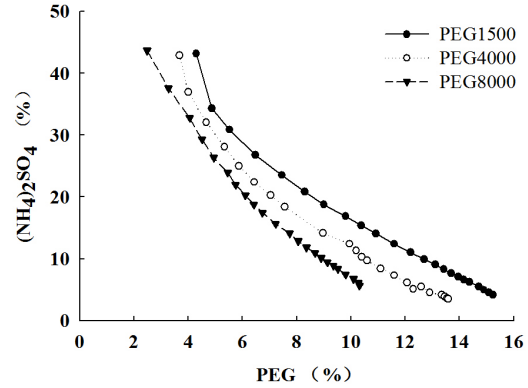


图3 常温下 PEG 与硫酸铵相图

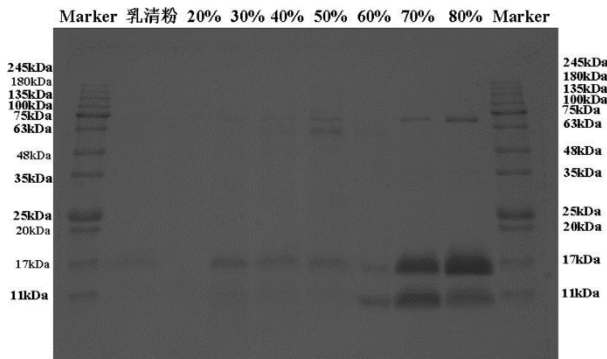


图2 SDS-PAGE 电泳检测分级沉淀的组分

水相的时间变长,且相比增加,而样品中的蛋白回收率却呈现下降趋势,PEG1500/硫酸铵双水相体系中乳清蛋白的回收率最高,达到77.1%。

将形成双水相的各相经 SDS-PAGE 电泳检测结果如图4所示,乳清蛋白经过 PEG/硫酸铵双水相系统萃取后, α -La 和 β -Lg 集中在下相,且 PEG 相对分子质量越大,蛋白浓度越低。BSA 可能由于萃取后浓度降低,在双水相上相和下相中均没有检出。因此本研究采用 PEG1500/硫酸铵双水相系统对乳清蛋白进行分离。

2.2 PEG/硫酸铵双水相萃取

2.2.1 双水相体系相图的绘制

由图3可以看出,不同分子量的 PEG 与硫酸铵在较大质量分数范围内都可以形成双水相,分相能力随着 PEG 分子量的增大而减弱,PEG 相对分子质量越大,所形成的双节线越趋向原点,成相临界点浓度越低。

2.2.2 双水相萃取能力的确定

由表2可以看出,利用 PEG/硫酸铵双水相萃取乳清蛋白时,随着 PEG 分子量的增大,形成双

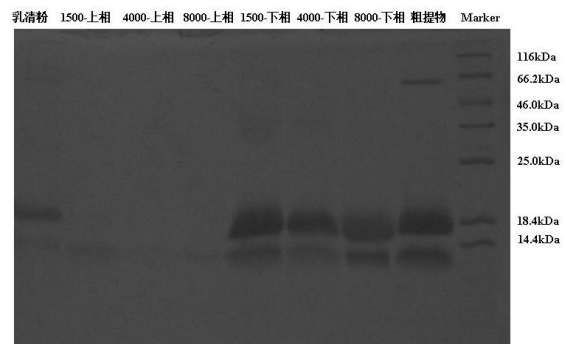


图4 SDS-PAGE 检测各双水相萃取蛋白的组分

表2 PEG/硫酸铵双水相呈相结果

PEG 相对分子质量	PEG 质量分数 (%)	硫酸铵质量分数 (%)	相比 (R)	蛋白回收率 (%)
PEG1500	16.6	10.38	0.429	77.1
PEG4000	4.52	12.91	1.181	73.4
PEG8000	7.45	9.81	1.378	69.3

2.3 蛋白含量测定

不同样品中蛋白含量结果如表3所示。通过对乳清粉的处理,样品中的蛋白组分被逐步纯化,且蛋白的浓度逐步提高。样品经硫酸铵盐析后蛋白浓度为733.6 mg/g,是乳清粉的5.32倍;经 PEG1500/硫酸铵双水相萃取进一步纯化了蛋白组分,蛋白浓度达到815.6 mg/g,是乳清粉的5.92倍,

达到了对乳清粉中主要蛋白(α -La 和 β -Lg)进行浓缩的目的。

2.4 响应面优化萃取条件

2.4.1 Box-Behnken 中心设计优化萃取条件

应用响应面中心组合设计分析优化 PEG1500 质量分数、NaCl 质量分数和反应温度3个因素对蛋白回收率的影响,结果如表4所示。

表3 各样品蛋白含量

蛋白样品	蛋白含量(mg/g)	浓缩倍数
乳清粉	137.8±10.5	-
80% 硫酸铵盐析粗提物	733.6±57.8	5.32±0.05
PEG1500/硫酸铵双水相粗提物	815.6±64.3	5.92±0.07

试验数据经 Design-Expert 8.0.6 软件中 ANOVA 程序的分析,得到了 PEG1500 质量分数、NaCl 质量分数和反应温度对双水相萃取蛋白回收率的

回归方程:

$$Y=85.08-0.51\times A-0.075\times B-0.84\times C+0.025\times AB-0.1\times AC-0.025\times BC-1.79\times A^2-0.42\times B^2-3.69\times C^2$$

从表 5 中可以看出,回归方程模型极显著($P < 0.01$),模型的失拟项不显著($P > 0.05$),方差数据表明响应面模型合理,可以用来表示各个因素与响应值之间的关系。3 个因素中对蛋白萃取结果的影响顺序为:反应温度>PEG1500 质量分数>NaCl 质量分数。

表4 Box-Behnken 试验条件及结果

试验号	PEG1500 质量分数	NaCl 质量分数	反应温度	蛋白回收率
	A	B	C	Y (%)
1	-1	-1	0	80.3
2	1	-1	0	81.6
3	-1	1	0	82.9
4	1	1	0	81.9
5	-1	0	-1	78.6
6	1	0	-1	81.3
7	-1	0	1	78.2
8	1	0	1	76.4
9	0	-1	-1	80.2
10	0	1	-1	80.1
11	0	-1	1	79.3
12	0	1	1	78.9
13	0	0	0	83.7
14	0	0	0	84.2
15	0	0	0	84.9
16	0	0	0	84.2
17	0	0	0	83.2

表5 Box-Behnken 试验方差分析

方差来源	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	9	10.2	16.3	0.0007	极显著
A PEG1500 质量分数	1	0.18	0.39	0.6084	
B NaCl 质量分数	1	0.72	1.15	0.3191	
C 反应温度	1	6.85	10.93	0.0130	显著
AB	1	1.32	2.11	0.1894	
AC	1	5.06	8.09	0.0249	显著
BC	1	0.023	0.036	0.8550	
A ²	1	11.92	19.04	0.0033	极显著
B ²	1	1.96	3.13	0.1200	
C ²	1	58.66	93.70	<0.0001	极显著
残差	7	0.63			
失拟项	3	0.92	2.29	0.2201	不显著
纯误差	4	0.40			
总变异	16				

注: $P < 0.01$ 为极显著, $P < 0.05$ 为显著

2.4.2 验证性试验

响应面试验优化得出的最优工艺参数为: PEG1500 质量分数为 18.11%, NaCl 质量分数为 3.2%, 反应温度为 28.66°C, 在此优化条件下, 双水相萃取蛋白的回收率为 84.13%。验证性试验进行 3 次, 在优化条件下对乳清蛋白的回收率为 85.12%, 预测值与实际值接近, 说明二项式优化的区域与设计的目标相符。本研究结果与成希飞^[10]的研究结果一致, 他利用响应面法对乙醇/碳酸钠萃取体系进行优化, 模型预测乳清蛋白回收率为 88.23%, 验证试验表明蛋白回收率达到

87.89%。

2.5 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的进一步分离纯化

2.5.1 Sephadex G-75 凝胶层析

双水相萃取的粗蛋白经 Sephadex G-75 分离后出现 3 个不同的洗脱峰, 结果如图 5 所示, SDS-PAGE 电泳检测发现 3 个峰的蛋白组成不同。a 峰为混合蛋白, 包含 α -La 和 β -Lg, 且 α -La 占优势; b 峰主要是 β -Lg; 可能由于分子量太小, c 峰未检测出蛋白。

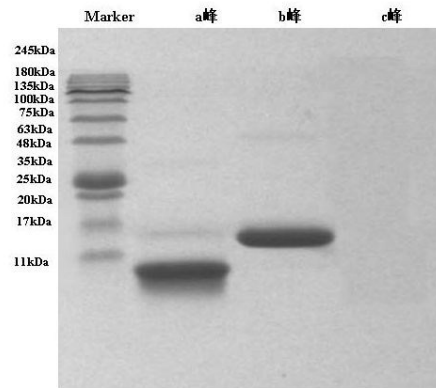
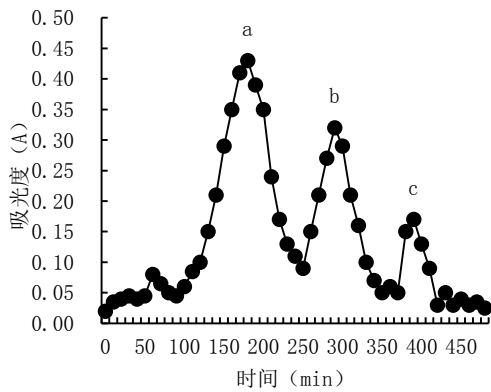


图 5 SephadexG-75 分离层析曲线及 SDS-PAGE 检测结果

2.5.2 DEAE 阴离子交换层析

将经 Sephadex G-75 凝胶层析收集的 a 峰和 b 峰样品利用 DEAE-Sephrose Fast Flow 离子交换层析进一步分离纯化, 具体结果如图 6 所示。利

用含 0 ~ 0.5 mol/L NaCl 的磷酸盐连续梯度洗脱液进行洗脱, α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白各获得 2 个峰。

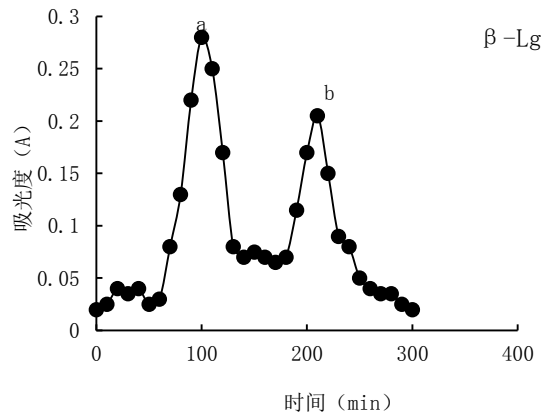
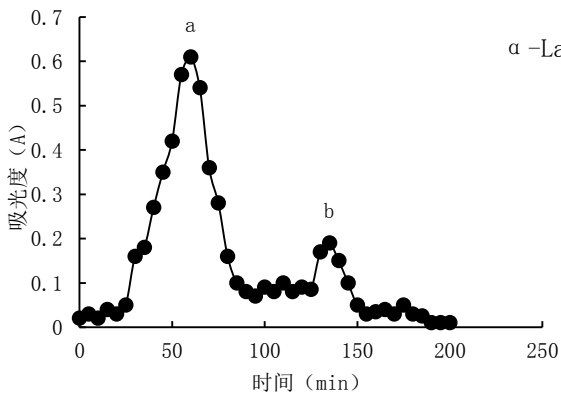


图 6 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的 DEAE 层析洗脱曲线

SDS-PAGE 电泳检测分离蛋白的纯度结果如图 7 所示。 α -乳白蛋白洗脱 a 峰蛋白的分子量为 14 kDa, 与 α -La 相一致, β -乳球蛋白洗脱得到二

个峰的蛋白分子量均为 18 kDa, 与 β -Lg 相一致, 且电泳结果显示 α -La 和 β -Lg 样品均为单一条带, 样品纯度达到 85% 以上。

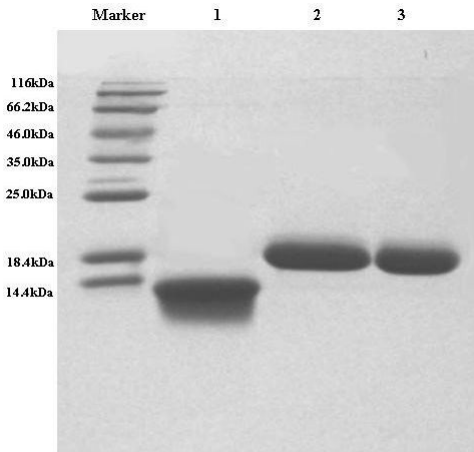


图7 SDS-PAGE 检测 DEAE 层析结果
泳道 1: α -乳白蛋白的洗脱曲线中的 a 峰;
泳道 2、3: β -乳球蛋白洗脱曲线中的 a、b 峰

3 结论与讨论

本研究主要以牛乳乳清蛋白为研究对象,采用先进的技术手段对其中的主要成分 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白进行逐级浓缩、分离,以期建立高效、稳定、适合工业化生产的工艺流程。硫酸铵逐级盐析结果表明,当硫酸铵饱和度低于 60% 析出的蛋白质主要是酪蛋白等杂蛋白质,而硫酸铵饱和度高于 60% 时析出的蛋白质为 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白及 BSA,因此本研究确定采用两步硫酸铵沉淀法对乳清蛋白进行初级分离,使得乳清蛋白的含量提高了 4 倍。在双水相萃取系统分离蛋白时,人们考察较多的是聚合物/聚合物、聚合物/盐等双水相体系^[11],但是聚合物/盐的分离效果更佳,更适合于工业化生产,如 Anandharamakrishnan^[12]和 Capezio^[13]等利用 PEG/磷酸盐对牛乳乳清中的蛋白进行分离,发现蛋白浓度和 pH 是影响萃取效果的关键因素。Kalaivani 等^[14]在进行分离 β -Lg 时首先将乳清蛋白进行酸处理后,再进行双水相萃取蛋白, β -Lg 的回收率和纯度分别为 96% 和 76%。谭志坚^[15]在利用双水相分离纯化芦荟活性成分时发现,向反应体系中添加 0.6 g 氯化钠,使得分配系数和萃取效率达到了最大值,说明无机盐能通过改变两相间的电荷差来调节目标物质在两相间的分配。本研究综合考虑各种因素对 α -La 和 β -Lg 萃取效果的影响,在单因素试验中分别研究了 PEG1500、硫酸铵、无机盐的质量百分数,体系 pH 和反应温度等因素对萃取效果的影响,发现 PEG1500 和 NaCl 的质量分数、反应温度是关键因素,随后利用响应面中心组合设计分析

优化萃取条件,获得最佳的蛋白萃取条件为: PEG1500 质量分数为 18.11%,硫酸铵质量分数为 10.38%, NaCl 质量分数为 3.2%,反应温度为 28.66°C,蛋白的回收率为 84.13%。验证性试验中乳清蛋白的回收率为 85.12%,说明试验设计和数学模型具有可靠性和重现性。经过双水相萃取后乳清蛋白组分被进一步纯化,萃取后的蛋白主要包括 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白,且蛋白含量提高达到 815.6 mg/g,是乳清粉蛋白含量的 5.92 倍,达到了我们预期的对乳清粉中关键蛋白进行浓缩的目的。SephadexG-75 凝胶层析和 DEAE 离子交换层析对萃取粗蛋白进行二次纯化,所获得的洗脱样品经 SDS-PAGE 电泳检测, α -La 和 β -Lg 样品均为单一条带,样品纯度达到 85% 以上。本研究为 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的分离提取提供了一套高效、稳定的工艺流程。

参考文献:

- [1] Rammer P, Groth-Pedersen L, Kirkegaard T, et al. BAMLET activates a lysosomal cell death program in cancer cells[J]. Molecular Cancer Therapeutic, 2010, 9(1): 24-32.
- [2] Laclair C E, Ney D M, MacLeod E L, et al. Purification and Use of Glycomacropeptide for nutritional management of phenylketonuria[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(4): 199-206.
- [3] 卢晓明,王静波,任发政,等.乳清蛋白在食品工业中的应用[J].食品科学,2010,31(1):262-267.
- [4] Alcántara L A P, Minim L A, Minim V P R, et al. Application of the response surface methodology for optimization of whey protein partitioning in PEG/phosphate aqueous two-phase system[J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2011, 879(21): 1881-1885.
- [5] Lucena M E, Alvarez S, Menendez C, et al. α -Lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates[J]. Separation & Purification Technology, 2007, 52(3): 446-453.
- [6] Santos M J, Teixeira J A, Rodrigues L R. Fractionation of the major whey proteins and isolation of β -Lactoglobulin variants by anion exchange chromatography[J]. Separation & Purification Technology, 2012, 90: 133-139.
- [7] Baldasso C, Barros T C, Tessaro I C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration[J]. Desalination, 2011, 278: 381-386.
- [8] Monteiro P S, Coimbra J S, Minim L A, et al. Partition of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin by cloud point extraction [J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2008, 867(2): 189-193.
- [9] 张儒,张变玲,谢涛,等.聚乙二醇/硫酸铵双水相萃取猪胃蛋白酶工艺研究[J].食品工业科技,2012,33(15): 245-247.
- [10] 成希飞.乳清蛋白组分分离技术研究及水牛乳乳源蛋白酶水解制备抗菌肽条件优化[D].广州:暨南大学,2013.

- [11] Dallora N L P, Klemaz J G D, Filho P D A P. Partition of model proteins in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium carbonate[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 34(1):92-97.
- [12] Anandharamakrishnan C, Raghavendra S N, Barhate R S, et al. Aqueous two-phase extraction for recovery of proteins from cheese whey[J]. *Food & Bioproducts Processing*, 2005, 83(3): 191-197.
- [13] Capezio L, Romanini D, Picó G A, et al. Partition of whey milk proteins in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol-phosphate as a starting point to isolate proteins expressed in transgenic milk[J]. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2005, 819(1): 25-31.
- [14] Kalaivani S, Regupathi I. Synergistic extraction of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin from acid whey using aqueous biphasic system: Process evaluation and optimization[J]. *Separation & Purification Technology*, 2015, 146(3):301-310.
- [15] 谭志坚. 双水相萃取体系在分离纯化芦荟活性成分中的应用研究[D]. 长沙:中南大学,2013.

(责任编辑:范杰英)