

牛乳中 α_s -、 β -酪蛋白组分的分离

张 艳, 胡志和*, 赖宜萍

(天津市食品生物技术重点实验室, 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

摘 要: 以新鲜脱脂牛乳为原料, 在碱性条件下添加钙盐进行选择性的沉淀分离 α_s -、 β -酪蛋白组分, 并用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法测定分离效果。从 CaCl_2 溶液终浓度、冷却温度和反复溶解、沉淀次数三个方面对 α_s -、 β -酪蛋白的分离效果进行研究。结果表明: CaCl_2 溶液终浓度 0.065mol/L , 冷却温度 2°C , 经 3 次反复溶解、沉淀, 分离得到的 α_s -酪蛋白组分纯度较高, 可达 83.33% , β -酪蛋白组分纯度为 109.53% 。

关键词: 酪蛋白; α_s -酪蛋白; β -酪蛋白; 分离

Separation of α_s - and β -Caseins from Milk

ZHANG Yan, HU Zhi-he*, LAI Yi-ping

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science,
Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: Selective precipitation of α_s - and β -caseins from skimmed milk was achieved by the addition of calcium salt at alkaline pH. Effects of final concentration of CaCl_2 (adding different volumes of 0.5mol/L CaCl_2 solution to skimmed milk), cooling temperature and repeated dissolution-precipitation procedure times on separation of α_s -casein were analyzed by measuring purity of final products using SDS-PAGE followed by Coomassie brilliant blue staining, along with effects of the former two factors on separation of β -casein. The results showed that α_s -casein with a purity of 83.33% and β -casein with a purity of 109.53% could be obtained when the final concentration of CaCl_2 was 0.065mol/L , the cooling temperature 2°C , and the dissolution-precipitation procedure repeated three times.

Key words: casein; α_s -casein; β -casein; separation

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0031-06

乳蛋白是乳中最有价值的成分, 牛乳中蛋白质含量为 $3.0\%\sim 3.7\%$, 其中主要是酪蛋白和乳清蛋白, 还有少量脂肪球蛋白。酪蛋白是由多种蛋白质组成的混合物, 其含量约占乳蛋白质的 $80\%\sim 82\%$ 。酪蛋白富含磷, 与钙结合能使微粒结构稳定, 在乳中以胶体粒子形式存在。酪蛋白含有多种人体所必需的氨基酸, 适合使用在新型食品、新时代营养补充品和生物医学等方面^[1-3]。 α_s -酪蛋白比 β -酪蛋白具有更多的磷酸丝氨酸基团, 在碱性条件下, 带有更多的净负电荷, 因此 α_s -酪蛋白对 Ca^{2+} 的亲合性比 β -酪蛋白更高。而 β -酪蛋白被认为疏水性最强, 低温条件下易游离。在酸性 pH 值和低温下 β -酪蛋白可溶, 而 α_s -酪蛋白不溶, 利用此性质对 α_s -、 β -酪蛋白进行分离纯化。纯化的酪蛋白组分有着鲜明的特性, 并具有广泛的用途。 β -酪蛋白适于制备婴幼儿配方奶粉, κ -酪蛋白适于制备代谢障碍

(如苯丙酮尿症(PKU))患者的专用食品, 以及制造可食性薄膜和生物降解塑料^[4]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜牛奶 天津海河乳业有限公司。

α_s -酪蛋白标准品(百分含量 $\geq 70\%$, 电泳级)、 β -酪蛋白标准品(质量分数 90% , 电泳级)、Tris-Base、甘氨酸、十二烷基磺酸钠 SDS Sigma 公司; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、甘油、2-巯基乙醇、考马斯亮蓝 R-250、过硫酸铵、溴酚蓝、盐酸、氯化钙、氢氧化钠、甲醇、冰乙酸均为分析纯; 四甲基乙二胺(TEMED) Fluka 公司。

1.2 仪器与设备

收稿日期: 2008-10-20

基金项目: 天津市重点科技支撑计划项目(07ZCKFNC00200)

作者简介: 张艳(1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事专用功能性食品研究。E-mail: zhangyandaphne@163.com

* 通讯作者: 胡志和(1962-), 男, 教授, 主要从事专用功能食品研究与开发。E-mail: hzhihe@tjcu.edu.cn

高速冷冻离心机 科大创新股份有限公司中佳分公司; 低温恒温槽 宁波新芝生物科技股份有限公司; pH计 天津市盛邦科学仪器技术公司; 恒温浴槽 成都仪器厂; 冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂; DYY-2C型电泳仪、DYCZ-24DN型电泳槽 北京市六一仪器厂; XRS型凝胶成像仪。

1.3 方法

1.3.1 α_s -、 β -酪蛋白分离工艺流程

牛奶→脱脂→加热→调节pH11.0→加入CaCl₂溶液→调节pH7.0→产物①

产物①→离心→ $\left\{ \begin{array}{l} \text{上清液} \rightarrow \text{调节pH3.8} \rightarrow \text{离心} \rightarrow \kappa\text{-酪蛋白沉淀} \\ \text{沉淀} \rightarrow 20^\circ\text{C水溶解} \rightarrow \text{调节pH7.0} \rightarrow \text{冷却} \rightarrow \\ \rightarrow \text{调节pH4.5} \rightarrow \text{产物} \textcircled{2} \end{array} \right.$

产物②→离心→ $\left\{ \begin{array}{l} \alpha_s\text{-酪蛋白沉淀} \rightarrow \text{反复溶解、冷却、沉淀} \rightarrow \\ \rightarrow \text{高纯度} \alpha_s\text{-酪蛋白} \rightarrow \text{干燥} \rightarrow \alpha_s\text{-酪蛋白组分} \\ \text{上清液} \rightarrow \text{加热} \rightarrow \text{调节pH4.6} \rightarrow \text{离心} \rightarrow \beta\text{-酪} \\ \text{蛋白沉淀} \rightarrow \text{干燥} \rightarrow \beta\text{-酪蛋白组分} \end{array} \right.$

1.3.2 α_s -、 β -酪蛋白分离工艺处理方法

1.3.2.1 CaCl₂浓度对 α_s -、 β -酪蛋白分离效果的影响

分别将0.5mol/L CaCl₂溶液133、150ml加入1000ml pH11.0、温度30℃的脱脂牛奶中, CaCl₂溶液终浓度分别为0.059、0.065mol/L。按1.3.1节工艺流程进行操作, 获得纯度较高的 β -酪蛋白组分。2℃条件下, 反复溶解于20℃水中、沉淀2次获得纯度较高的 α_s -酪蛋白沉淀。将沉淀分别冷冻干燥后称重, 分别计算其酪蛋白得率, 并用SDS-PAGE法测定其纯度。

1.3.2.2 冷却温度对 α_s -、 β -酪蛋白分离效果的影响

在CaCl₂溶液浓度0.065mol/L条件下, 按1.3.1节工艺流程进行操作, 将产物①离心所得沉淀溶解于20℃水中, 调节pH值至7.0, 分别在2、4℃条件下进行冷却, 调节pH值至4.5沉淀, 获得富含 α_s -酪蛋白的沉淀, 即产物②。加热产物②离心所得上清液至35℃, 调节pH值至4.6, 离心得到富含 β -酪蛋白的沉淀。将产物②离心得到的 α_s -酪蛋白沉淀重新悬浮于pH7.0的水中, 剧烈搅拌使其分散后, 分别冷却到2、4℃, 搅拌下加入1.0mol/L的HCl, 调pH值至4.5, 继续搅拌15min后离心。反复溶解、沉淀2次以获得纯度较高的 α_s -酪蛋白沉淀。将沉淀分别冷冻干燥后称重, 分别计算其酪蛋白得率, 并用SDS-PAGE法分别测定其纯度。

1.3.2.3 反复溶解、沉淀次数对 α_s -酪蛋白纯度的影响

按1.3.1节工艺流程进行操作, 反复溶解、沉淀次数分别为1、2、3次以获得纯度较高的 α_s -酪蛋白沉淀。将沉淀分别冷冻干燥后称量, 计算酪蛋白得率, 并用SDS-PAGE法分别测定其纯度。

1.3.3 酪蛋白得率计算

$$\text{酪蛋白得率}(\%) = \frac{\text{分离单位体积原料奶得到酪蛋白含量}}{\text{电泳测得单位体积原料奶酪蛋白含量}} \times 100$$

1.3.4 SDS-PAGE法测定 α_s -、 β -酪蛋白纯度

1.3.4.1 样品处理

称取一定量待分析的样品于1.5ml的Eppendorf管中, 加入0.3ml含有35%甘油、10%十二烷基磺酸钠(SDS)、1.0mol/L Tris-HCl(pH6.8)的样品处理液, 并添加蒸馏水至总体积为0.6ml, 使溶液中蛋白质浓度为0.2%~0.5%。然后添加20 μ l的2-巯基乙醇(2-ME)和15 μ l的饱和溴酚蓝溶液, 充分混合均匀, 在沸水浴中煮沸3~10min后进行电泳。

1.3.4.2 电泳^[5]

凝胶贮液浓度为30%, 交联度为4%。浓缩胶和分离胶分别用1.5mol/L Tris-HCl(pH6.8)和1.0mol/L Tris-HCl(pH8.8)配制, 并且均含有10% SDS。浓缩胶质量分数为5%, 分离胶质量分数为12%。电泳缓冲液中含有24.8mmol/L Tris, 0.19mol/L甘氨酸, 0.1% SDS。样品在厚度为1mm的垂直电泳板上进行不连续电泳。电泳结束后, 将胶片用考马斯亮兰(CBB)R-250染色液染色(1.21mmol/L CBB R-250, 0.8mol/L冰乙酸, 3.0mol/L甲醇)2h。染色结束后, 用脱色液(0.8mol/L冰乙酸, 3.0mol/L甲醇)对胶片进行洗脱, 直至底色基本脱除为止。

1.3.4.3 光密度扫描

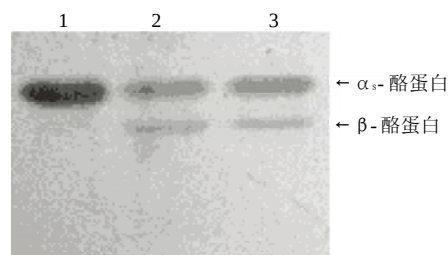
用凝胶成像仪对电泳图片进行扫描, 然后用Quantity One软件对图像进行分析和处理, 根据下式计算出酪蛋白的纯度。

$$\text{酪蛋白纯度}(\%) = \frac{\text{样品谱带峰高值}}{\text{标准样品谱带峰高值}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 CaCl₂浓度对 α_s -、 β -酪蛋白分离效果的影响

2.1.1 CaCl₂浓度对 α_s -酪蛋白分离效果的影响



1. α_s -酪蛋白标准品; 2. CaCl₂ 0.059mol/L的 α_s -酪蛋白样品; 3. CaCl₂ 0.065mol/L的 α_s -酪蛋白样品。

图1 不同CaCl₂浓度制得牛乳中 α_s -酪蛋白组分的SDS-PAGE电泳图谱
Fig.1 SDS-PAGE pattern of α_s -casein standard and sample from milk obtained at different final concentrations of CaCl₂

根据 1.3.2.1 节所述方法, 研究 CaCl_2 浓度对 α_s -、 β -酪蛋白分离效果的影响, 在不同 CaCl_2 浓度下制得的 α_s -酪蛋白组分的 SDS-PAGE 电泳图谱如图 1 所示。

对图 1 中两样品的电泳图谱泳道 2、3 分别与 α_s -酪蛋白标准品泳道 1 用 Quantity One 软件进行处理和分析得扫描图谱图 2、3。

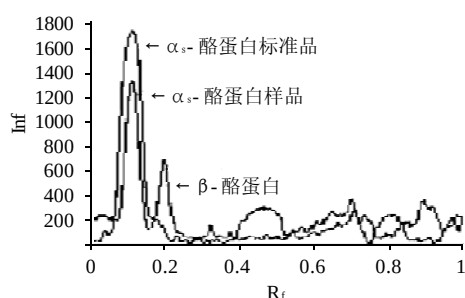


图2 CaCl_2 溶液终浓度为 0.059mol/L 制得的 α_s -酪蛋白样品与标准 α_s -酪蛋白的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.2 Scanning profile of SDS-PAGE pattern of α_s -casein standard and sample obtained at 0.059 mol/L of CaCl_2 on gel imaging system

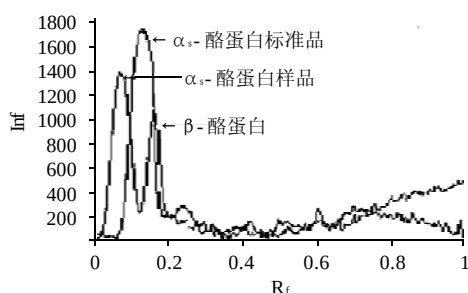
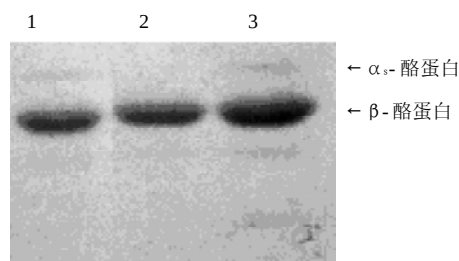


图3 CaCl_2 溶液终浓度为 0.065mol/L 的样品与标准 α_s -酪蛋白的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.3 Scanning profile of SDS-PAGE pattern of α_s -casein standard and sample obtained at 0.065 mol/L of CaCl_2 on gel imaging system

2.1.2 CaCl_2 浓度对 β -酪蛋白分离效果的影响



1. CaCl_2 0.059mol/L 的 β -酪蛋白样品; 2. β -酪蛋白标准品; 3. CaCl_2 0.065mol/L 的 β -酪蛋白样品。

图4 不同 CaCl_2 浓度制得牛乳中 β -酪蛋白组分的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.4 SDS-PAGE pattern of β -casein standard and sample from milk obtained at different final concentrations of CaCl_2

根据 1.3.2.1 节所述方法, 对 CaCl_2 浓度对 α_s -、 β -酪蛋白分离效果的影响进行研究, 在不同 CaCl_2 浓度下制得的 β -酪蛋白组分的 SDS-PAGE 电泳图谱如图 4 所示。

对图 4 中两样品的电泳图谱泳道 1、3 分别与 β -酪蛋白标准品泳道 2 用 Quantity One 软件进行处理和分析得扫描图谱图 5、6。

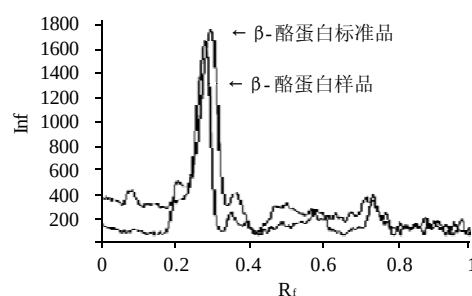


图5 CaCl_2 溶液终浓度为 0.059mol/L 制得的样品与标准 β -酪蛋白的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.5 Scanning profile of SDS-PAGE pattern of β -casein standard and sample obtained at 0.059 mol/L of CaCl_2 on gel imaging system

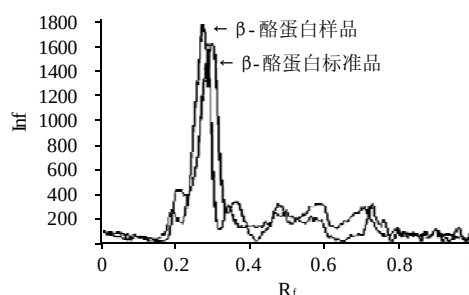


图6 CaCl_2 溶液终浓度为 0.065mol/L 制得的样品与标准 β -酪蛋白的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.6 Scanning profile of SDS-PAGE pattern of β -casein standard and sample obtained at 0.065 mol/L of CaCl_2 on gel imaging system

由图 2、3、5、6, 根据各条带峰高大小, 与标准样品条带对比, 分别计算出酪蛋白的纯度, 结果见表 1。

表1 不同 CaCl_2 终浓度条件下制得的 α_s -、 β -酪蛋白的纯度

Table 1 Purity of α_s - and β -caseins obtained at different final concentrations of CaCl_2 (the cooling temperature 2 $^{\circ}\text{C}$, and the dissolution-precipitation procedure repeated twice)

CaCl_2 溶液终浓度(mol/L)	纯度(%)	
	α_s -酪蛋白	β -酪蛋白
0.059	78.30	97.10
0.065	80.11	109.53

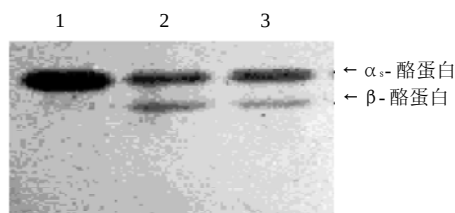
从表 1 可以看出, 在 2 $^{\circ}\text{C}$, 反复溶解、沉淀 2 次后, CaCl_2 溶液终浓度对 α_s -、 β -酪蛋白分离效果是有影响

的,在所测浓度下, CaCl_2 溶液终浓度越大, α_s -、 β -酪蛋白组分纯度越高,分离效果越好。

2.2 冷却温度对 α_s -、 β -酪蛋白分离效果的影响

2.2.1 冷却温度对 α_s -酪蛋白分离效果的影响

根据 1.3.2.2 节所述方法,对冷却温度对 α_s -、 β -酪蛋白分离效果的影响进行研究,不同温度下制得 α_s -酪蛋白组分的 SDS-PAGE 电泳图谱如图 7 所示。



1. α_s -酪蛋白标准品; 2. 2℃的 α_s -酪蛋白样品; 3. 4℃的 α_s -酪蛋白样品。

图 7 不同温度制得牛乳中 α_s -酪蛋白组分的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.7 SDS-PAGE pattern of α_s -casein standard and sample obtained from milk at different cooling temperatures

对图 7 中两样品电泳图谱泳道 2、3 分别与 α_s -酪蛋白标准品泳道 1 用 Quantity One 软件进行处理和分析得扫描图谱图 8、9。

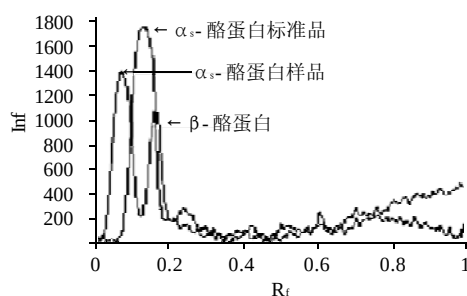


图 8 温度为 2℃ 的样品与标准 α_s -酪蛋白的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.8 Scanning profile of SDS-PAGE pattern of α_s -casein standard and sample obtained when the cooling temperature was 2 °C on gel imaging system

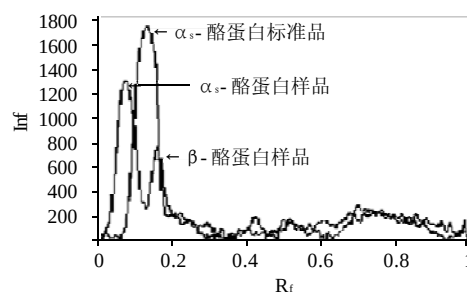
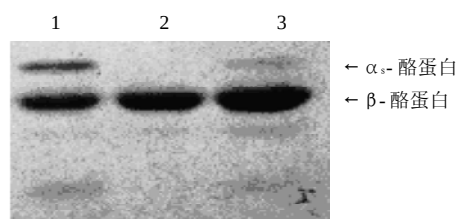


图 9 温度为 4℃ 的样品与标准 α_s -酪蛋白的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.9 Scanning profile of SDS-PAGE pattern of α_s -casein standard and sample obtained when the cooling temperature was 4 °C on gel imaging system

2.2.2 冷却温度对 β -酪蛋白分离效果的影响



1. 4℃, β -酪蛋白样品; 2. β -酪蛋白标准品; 3. 2℃, β -酪蛋白样品。

图 10 牛乳中 β -酪蛋白组分的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.10 SDS-PAGE pattern of β -casein standard and sample obtained from milk at different cooling temperatures

根据 1.3.2.2 节所述方法,冷却温度对 α_s -、 β -酪蛋白分离效果的影响进,不同温度下制得的 β -酪蛋白组分的 SDS-PAGE 电泳图谱如图 10 所示。

对图 10 中两样品电泳图谱泳道 1、3 分别与 β -酪蛋白标准品泳道 2 用 Quantity One 软件进行处理和分析得扫描图谱图 11、12。

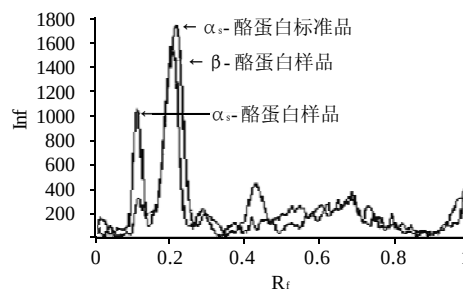


图 11 温度为 4℃ 的样品与标准 β -酪蛋白的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.11 Scanning profile of SDS-PAGE pattern of β -casein standard and sample obtained when the cooling temperature was 4 °C on gel imaging system

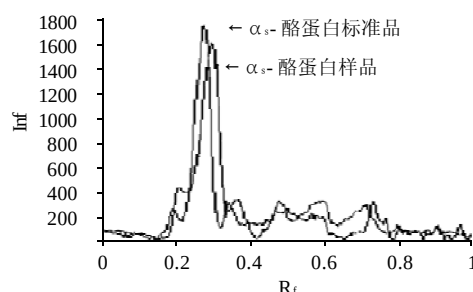


图 12 温度为 2℃ 的样品与标准 β -酪蛋白的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.12 Scanning profile of SDS-PAGE pattern of β -casein standard and sample obtained when the cooling temperature was 2 °C on gel imaging system

由图 8、9、11、12, 根据各条带峰高大小, 与标准样品条带对比, 分别计算出酪蛋白的纯度, 结果见表 2。

表 2 不同温度下制得的 α_s -、 β -酪蛋白的纯度

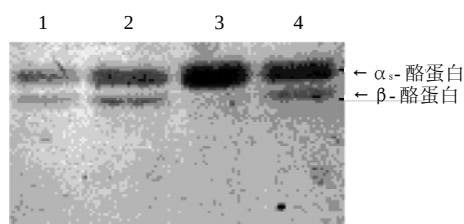
Table 2 Purity of α_s - and β -casein obtained at different cooling temperatures (the final concentration of CaCl_2 0.065 mol/L, and the dissolution-precipitation procedure repeated twice)

冷却温度(°C)	纯度(%)	
	α_s -酪蛋白	β -酪蛋白
2	80.11	109.53
4	74.75	86.51

从表 2 可以看出, 在 CaCl_2 溶液终浓度 0.065mol/L, 反复溶解、沉淀 2 次条件下, 冷却温度对 α_s -、 β -酪蛋白分离效果是有影响的, 在所考察温度条件下, 温度越低, α_s -、 β -酪蛋白组分纯度越高, 分离效果越好。

2.3 反复溶解、沉淀次数对 α_s -酪蛋白纯度的影响

根据 1.3.2.3 节所述方法, 对反复溶解、沉淀次数对 α_s -酪蛋白纯度的影响进行研究, 不同的反复溶解、沉淀次数, α_s -酪蛋白组分的 SDS-PAGE 电泳图谱如图 13 所示。



1.反复 1 次的 α_s -酪蛋白样品; 2. 反复 2 次的 α_s -酪蛋白样品; 3. α_s -酪蛋白标准品; 4. 反复 3 次的 α_s -酪蛋白样品。

图 13 不同溶解、沉淀次数制得牛乳中 α_s -酪蛋白组分的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.13 SDS-PAGE pattern of α_s -casein standard and sample obtained from milk when the dissolution-precipitation procedure was performed different times

对图 13 中三个样品的电泳图谱泳道 1、2 和 4 分别与 α_s -酪蛋白标准品泳道 3 用 Quantity One 软件进行处理和分析得扫描图谱图 14~16。

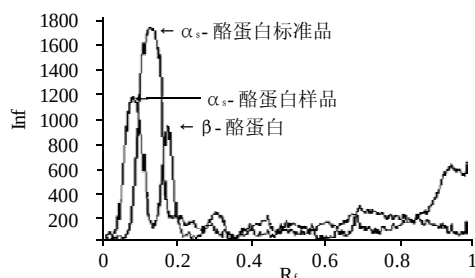


图 14 反复溶解、沉淀 1 次时样品与标准 α_s -酪蛋白的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.14 Scanning profile of SDS-PAGE pattern of α_s -casein standard and sample obtained when the dissolution-precipitation procedure performed only once

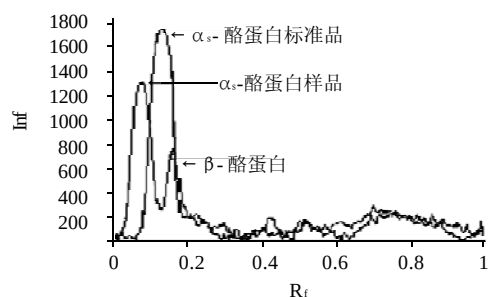


图 15 反复溶解、沉淀 2 次时样品与标准 α_s -酪蛋白的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.15 Scanning profile of SDS-PAGE pattern of α_s -casein standard and sample obtained when the dissolution-precipitation procedure performed twice

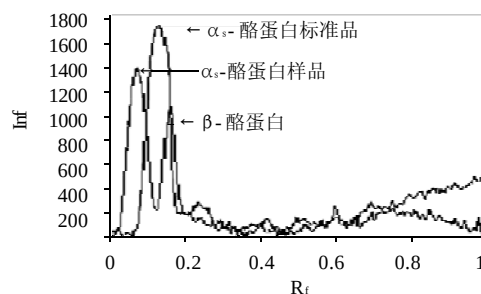


图 16 反复溶解、沉淀 3 次时样品与标准 α_s -酪蛋白的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.16 Scanning profile of SDS-PAGE pattern of α_s -casein standard and sample obtained when the dissolution-precipitation procedure performed three times

由图 14~16, 根据各条带峰高大小, 与标准样品条带对比, 分别计算出酪蛋白的纯度, 结果如表 3。

表 3 不同的反复溶解、沉淀次数下 α_s -酪蛋白的纯度

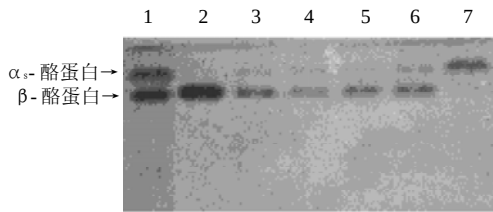
Table 3 Purity of α_s -casein when the dissolution-precipitation procedure was performed different times (the final concentration of CaCl_2 0.065 mol/L, and the cooling temperature 2 °C)

反复溶解、沉淀次数(次)	1	2	3
纯度(%)	75.79	79.54	83.33

从表 3 可以看出, 在温度为 2 °C, CaCl_2 溶液终浓度 0.065mol/L 条件下, 反复溶解、沉淀次数越多, α_s -酪蛋白的纯度越高, 但是纯度提高幅度不显著。

2.4 α_s -、 β -酪蛋白得率研究

为了研究牛乳酪蛋白的得率, 对牛乳及其分离后 α_s -、 β -酪蛋白组分样品及标准品进行了 SDS-PAGE 电泳, 电泳图谱如图 17 所示。



1.牛乳样品; 2. β -酪蛋白标准品; 3、5 分别为冷却温度 2、4℃, CaCl_2 0.065mol/L, 反复溶解沉淀 2 次条件下的 α_s -酪蛋白样品; 4、6 分别为冷却温度 2、4℃, CaCl_2 0.059mol/L, 反复溶解沉淀 2 次条件下的 α_s -酪蛋白样品; 7. α_s -酪蛋白标准品。

图 17 牛乳及其 α_s -、 β -酪蛋白组分的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.17 SDS-PAGE pattern of α_s -casein and β -casein standards, milk and α_s -casein obtained under different conditions

对图 17 中 SDS-PAGE 电泳图谱泳道 1、2 和 7 用 Quantity One 软件进行处理和分析得扫描图谱图 18、19。

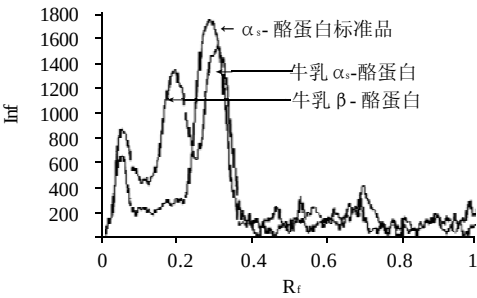


图 18 牛乳样品与标准 α_s -酪蛋白的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.18 Scanning profile of SDS-PAGE pattern of α_s -casein and β -casein in milk and α_s -casein standard

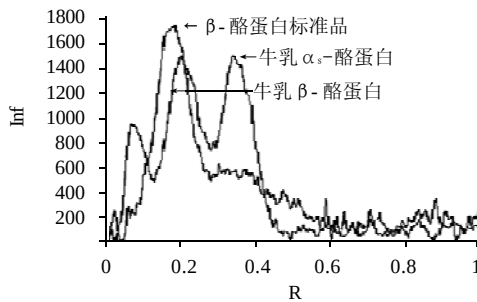


图 19 牛乳样品与标准 β -酪蛋白的 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig.19 Scanning profile of SDS-PAGE pattern of α_s -casein and β -casein in milk and β -casein standard

由图 18、19, 根据牛乳样品 1 条带峰高大小, 与标准样品条带对比, 计算出每毫升牛乳样品中含 22.04mg α_s -酪蛋白, 20.52mg β -酪蛋白。根据 1.3.3 节方法, 对分离得到的 α_s -、 β -酪蛋白组分进行得率计算, 结果如表 4。

将表 4 与表 1、2 进行比较可以得出: α_s -酪蛋白的得率随纯度的升高而下降, 而 β -酪蛋白的得率没有显著变化。

表 4 反复溶解、沉淀次数为 2 次条件下 α_s -、 β -酪蛋白得率

Table 4 Yield of α_s and β -caseins when the final concentration of CaCl_2 was 0.065 mol/L, the cooling temperature 2℃, and the dissolution-precipitation procedure repeated twice.

分离条件	2℃, CaCl_2 0.065mol/L	4℃, CaCl_2 0.065mol/L	2℃, CaCl_2 0.059mol/L
α_s -酪蛋白得率(%)	48.03	58.48	53.31
β -酪蛋白得率(%)	31.04	20.23	25.94

为了研究反复溶解、沉淀次数对 α_s -酪蛋白得率的影响, 根据 1.3.3 节方法, 对分离得到的 α_s -酪蛋白组分进行得率计算, 结果如表 5。

表 5 不同反复溶解、沉淀次数下 α_s -酪蛋白得率

Table 5 Yield and purity of α_s -casein when the dissolution-precipitation procedure was performed different times

反复溶解、沉淀次数(次)	1	2	3
得率(%)	56.73	48.03	40.19
α_s -酪蛋白纯度(%)	75.79	79.54	83.33

从表 5 可以看出: α_s -酪蛋白反复溶解、沉淀次数越多, 纯度越高, 但是得率下降。但反复溶解、沉淀对 α_s -酪蛋白纯度的提高不显著。因处理的样品量较少, 加之处理过程中工艺步骤多, 使得样品在处理过程中会有一定损失, 但从结果仍可得出得率与纯度的相关性, 纯度提高, 相对应的得率降低。

3 结 论

在实验所选的条件范围内, CaCl_2 溶液终浓度越大, 温度越低, 反复溶解、沉淀次数越多, α_s -、 β -酪蛋白组分纯度越高, 分离效果越好。实验所得最优分离条件为: CaCl_2 溶液终浓度 0.065mol/L, 冷却温度 2℃, 反复溶解、沉淀次数 3 次条件下, α_s -、 β -酪蛋白组分分离效果最好, 纯度分别为 83.33% 和 109.53%(相对标准品)。 Ca^{2+} 浓度越高, 与 α_s -酪蛋白的亲水性越高, 越易打破酪蛋白胶束使 α_s -酪蛋白沉淀。而低温条件下, β -酪蛋白往往是游离态的, 温度越低也就越易分离到 β -酪蛋白。这表明只需改变物理条件, 不需引入有毒的化学螯合剂即可提高分离效果, 得到较高纯度的酪蛋白组分, 这使得产品更安全、方法更适用于食品行业。

参考文献:

[1] PLANK J, ANDRES P R, KRAUSE I, et al. Gram scale separation of casein proteins from whole casein on a source 30Q anion-exchange resin column utilizing fast protein liquid chromatography (FPLC)[J]. Protein Expression and Purification, 2008, 60: 176-181.
[2] 郭成宇. 现代乳品工程技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 19.
[3] 张芳, 李红旭. 影响牛乳酪蛋白分离因素的研究[J]. 保鲜与加工, 2006, 6(3): 29-31.
[4] ANDREW L, JEFF L. Methods of extracting casein fractions from milk and caseinates and production of novel products: USA, PCT/GB2002/003098[P]. 2003-01-16.
[5] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2001: 74-82.