

凝胶色谱法测定乳清中主要蛋白的相对分子量及其分布

赵玉娟, 段翠翠, 高磊, 栾畅, 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:本研究采用凝胶色谱分析技术,以牛乳乳清为研究对象,建立一种简便、快速的测定 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白含量的方法。通过一系列的试验,确定最佳凝胶色谱试验条件:采用PBS缓冲液作为流动相,柱温为35℃,检测器为示差折光检测器,流速1 mL/min,进样量为20 μ L。在该工艺条件下,牛乳乳清中的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白被有效地分离纯化,蛋白的回收率在90%以上。本方法具有良好的重复性和稳定性,为短时间内对乳制品中的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白进行分离和定量检测提供一种新的方法,满足了科研和生产的需求。

关键词:凝胶色谱; α -乳白蛋白; β -乳球蛋白;含量测定

中图分类号:TS201.2*1

文献标识码:A

文章编号:1003-8701(2017)04-0044-05

Determination of Molecular Weight and Distribution of Major Proteins in Whey by Gel Chromatography

ZHAO Yujuan, DUAN Cuicui, Gao Lei, LUAN Chang, 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, a simple and rapid method to measure α -lactalbumin and β -lactoglobulin contents was established by gel chromatography. Through a series of experiments, the optimum gel chromatography conditions were determined, where PBS was used as mobile phase, the column temperature was 35 °C, the detector was a refractive index detector, flow rate was 1 mL/min, and the injection volume was 20 μ L. Under this condition, the α -lactalbumin and β -lactoglobulin in the cow's milk whey were effectively separated and purified, the recovery rate was higher than 90%. In addition, both of them were with good reproducibility and stability. It provides a new method to quickly separate and quantitatively detect α -lactalbumin and β -lactoglobulin from dairy products, therefore meet requirements of the scientific research and production.

Key words: Gel chromatography; α -lactalbumin; β -lactoglobulin; Assaying.

α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白是牛奶乳清蛋白中两种重要的蛋白质,分别占其总量的10%~20%和40%~50%^[1]。 α -乳白蛋白具有调节半乳糖转移酶,催化葡萄糖合成乳糖,并含有色氨酸和半胱氨酸,对胃口、情绪、痛觉、睡眠及生物钟等神经性反应具有重要的调节作用^[2-5]。 β -乳球蛋白具有良好的凝胶性能,可参与脂溶性维生素

的转运及脂肪酸的结合^[6-8];具有抑制酪氨酸酶活性的能力,可降低黑色素水平^[9];显著提高肝脏中谷胱甘肽酶的活性及细胞抗氧化能力^[10];促进细胞因子(IL-6、IL-1、IL-10)的产生,增强机体免疫力^[11]等功效。由于 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白具有很高的营养价值和生物学特性,被广泛地应用于食品、医药、保健品等诸多领域。

目前 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白常用的检测方法有液相色谱法^[12]、凝胶电泳法^[1, 13-14]及免疫法等^[15]。液相色谱法是分析乳清蛋白成分的有效方法之一,该方法稳定性高、回收率高,但前期处理操作较为繁琐,且成本很高;凝胶电泳法成本低、重现性好,但对操作方法和试验条件要求非常严格;免疫法灵敏度高、特异性高,但抗体成本较

收稿日期:2017-02-28

基金项目:国家科技支撑计划(2013BAD18B07);现代农业产业体系专项资金资助(CARS-37);长春市产学研协同创新示范项目建设专项(16CX20)

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

高。有关凝胶色谱法检测 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的方法尚未见相关报道,因此本文应用凝胶色谱法测定 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的分子量及其分布,为牛乳乳清中主要蛋白的制备研究提供一种简便、快速、准确的测定方法,可满足生产和科研的需求。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

α -乳白蛋白标准品(纯度 $\geq 85\%$, 14 178 Da)和 β -乳球蛋白标准品(纯度为85%, 18 400 Da),购自美国Sigma有限公司;牛血清白蛋白标准品(纯度 $\geq 99\%$, 68 000 Da),购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

LC98 II RI凝胶色谱仪,购自北京温分分析仪器技术开发有限公司;P98 II等梯度高压输液泵,购自北京温分分析仪器技术开发有限公司;RI201H示差折光检测器,购自日本昭和电工;7725I进样阀,购自美国Rheodyne公司;T98色谱柱温箱,购自北京温分分析仪器技术开发有限公司;Shodex凝胶色谱柱,购自日本昭和电工。

2 方法

2.1 标准品和样品的处理

取适量 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白和牛血清白蛋白的标准品,加流动相制成0.01 mg/mL的溶液,超声脱气60 min,0.45 μ m滤膜过滤,作为标准品溶液。

取制备Cheddar干酪/Mozzarella干酪时新鲜的乳清样品,超声脱气60 min,0.45 μ m滤膜过滤,作为样品溶液备用。

2.2 色谱条件的确定

通过一系列的预实验,确定测定乳清中主要蛋白浓度的凝胶色谱条件:色谱柱为Shodex OHpak SB-805 HQ(8 mm \times 300 mm),流动相为0.01 mol/L pH=7.4 PBS缓冲液(含0.05%叠氮钠,超

声脱气60 min,0.45 μ m滤膜过滤),柱温:35 $^{\circ}$ C,示差折光检测器(检测器温度35 $^{\circ}$ C),流速1 mL/min,进样量20 μ L。

2.3 标准曲线的制备

取 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白和牛血清白蛋白标准品溶液分别进样,记录洗脱峰的保留时间,由Chrom软件绘制标准曲线,以标准品分子量为纵坐标,以相应色谱峰的保留时间为横坐标进行线性回归,得出回归方程。

2.4 重复性试验

分别取 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准品溶液,按上述2.3色谱条件,连续测定4次,根据标准曲线计算其分子量,并计算RSD值。

2.5 稳定性试验

取 α -乳白蛋白的标准品溶液于室温下,按上述2.3色谱条件,分别在0 h、6 h、12 h、18 h和24 h分别进样测定,根据标准曲线计算其分子量,并计算RSD值。

2.6 回收率

分别取 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准品溶液,按上述2.3色谱条件,每个样品进样4次,测定样品的回收率,并计算RSD值。

2.7 样品测定

取4批待测样品分别上样,根据标准曲线计算乳清样品中主要蛋白的分子量及浓度。

3 结果

3.1 标准曲线的绘制

3.1.1 绘制标准曲线

取 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白和牛血清白蛋白标准品溶液分别进样,以0.01 mol/L pH=7.4 PBS缓冲液作为流动相,利用凝胶色谱分析系统对 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白和牛血清白蛋白进行分析所获得的凝胶色谱结果如图1所示。由于购买的 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白标准品的纯度为85%,所以在凝胶色谱图中图1A和图1B均存在一个杂峰。

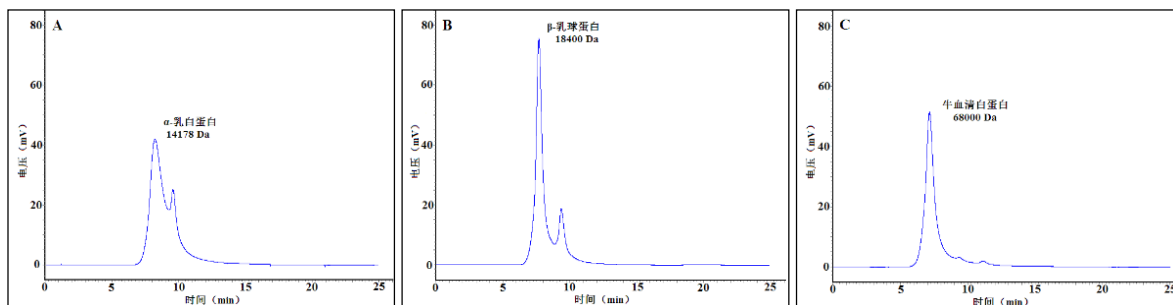


图1 标准品凝胶色谱图

取 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白和牛血清白蛋白标准品溶液分别进样,记录洗脱峰的保留时间,由Chrom软件绘制标准曲线,以标准品分子量为纵坐标,以相应色谱峰的保留时间为横坐标进行

表1 标准品保留时间及其相应的分子量

标准品	分子量(Da)	
	14 178	18 400
保留时间	8.101	7.989
回归方程	$y=457\ 911-54\ 887x$ (线性范围1.50~8.30 min)	

线性回归,得出回归方程,具体结果见表1。该方法获得的标准校正曲线线性良好,相关系数达0.9990。

3.1.2 α -乳白蛋白标准曲线的绘制

取浓度为1 mg/mL、2 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL的 α -乳白蛋白标准品溶液分别进样,记录洗脱峰的保留时间,以标准品浓度为纵坐标,以 α -乳白蛋白色谱峰的峰面积为横坐标进行线性回归,得出回归方程,相关系数达0.9999,具体结果见表2。

表2 α -乳白蛋白色谱峰的峰面积及其相应的蛋白浓度

浓度	1 mg/mL	2 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
峰面积	412 395.438	568 433.375	1 102 257.813	1 973 105.731
回归方程	$y=173\ 729x+231\ 085$ (线性范围0.10~20.00 mg/mL)			

3.1.3 β -乳球蛋白标准曲线的绘制

取浓度为1 mg/mL、2 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL的 β -乳球蛋白标准品溶液分别进样,记录洗脱峰的保留时间,以标准品浓度为纵坐标,以

β -乳球蛋白色谱峰的峰面积为横坐标进行线性回归,得出回归方程。该方法的标准校正曲线线性良好,相关系数达0.9994,具体结果见表3。

表3 β -乳球蛋白色谱峰的峰面积及其相应的蛋白浓度

浓度	1 mg/mL	2 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
峰面积	245 515.625	497 895.727	1 221 284.688	2 404 052.297
回归方程	$y=239\ 365x+150\ 44$ (线性范围0.10~20.00 mg/mL)			

3.2 重复性试验

分别取 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准品溶液,按上述2.3色谱条件,连续测定4次,根据标准曲线计算分子量,结果如表4所示。 α -乳白蛋白

的分子量在12 612~13 984 Da之间, β -乳球蛋白的分子量在17 948~21 766 Da之间,二种蛋白测定时的RSD分别为1.26%、4.48%,表明该系统测定样品分子量的重复性良好。

表4 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白色谱峰保留时间及其相应的分子量

种类	编号	保留时间(min)	分子量(Da)	RSD(%)
α -乳白蛋白	B001	8.093	13 710.509	1.26
	B002	8.113	12 612.769	
	B003	8.088	13 984.944	
	B004	8.111	13 722.543	
β -乳球蛋白	C001	7.989	19 418.757	4.48
	C002	8.034	17 948.842	
	C003	8.006	18 485.678	
	C004	7.928	21 766.864	

3.3 稳定性试验

取 α -乳白蛋白标准溶液于室温下保存,按上述2.3色谱条件,在0 h、6 h、12 h、18 h和24 h分别进样,并根据标准曲线计算分子量分布在12 742~13 854 Da之间,且RSD在0.18%~3.56%。表明供试样品溶液在24 h内保持稳定。

3.4 回收率

分别取 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准品溶液,按上述2.3色谱条件,每个样品进样4次,样品的蛋白浓度和回收率测定结果如表5所示。各乳清蛋白的回收率均在90%以上,且RSD在2.17%~4.53%之间,说明该方法的精密度很高。

表5 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准品的回收率

种类	编号	上样量(μg)	蛋白浓度(mg/mL)	回收率(%)	RSD(%)
α -乳白蛋白	D001	200	9.56	94.61	2.17
	D002	200	9.62	95.14	2.86
	D003	200	9.47	93.47	2.55
	D004	200	9.23	91.52	3.02
β -乳球蛋白	E001	200	9.54	93.76	4.53
	E002	200	9.29	91.07	3.27
	E003	200	9.67	95.46	3.54
	E004	200	9.45	92.80	4.16

3.5 样品测定

分别取2批新鲜的Cheddar干酪和Mozzarella干酪的乳清样品分别上样,按照确定的最佳凝胶层析的色谱条件对乳清样品进行分析,根据绘制的标准曲线及样品色谱峰的峰面积计算样品中各主要蛋白的含量,具体结果见表6。由结果可以看出,本研究所确定的凝胶色谱法可以有效地测定不同乳清样品中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量, α -乳白蛋白的浓度在1.21~1.45 mg/mL之间, β -乳球蛋白的浓度在3.25~3.65 mg/mL之间。

本方法耗用时间短,操作简便,无需昂贵的试剂,且准确度高,方法稳定,为短时间内对乳制品中的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白进行分离和定量检测提供一种新的方法,满足了生产和科研的需求。

4批乳清样品间 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量存在一定的差异,可能与牛乳原料、凝乳时间、压榨等条件有关。因此建立一种简便、准确测定乳清主要蛋白含量的检测方法将为今后生产及对产品的质量控制提供保障。

表6 样品色谱峰保留时间及其相应的分子量

编号	α -乳白蛋白			β -乳球蛋白		
	保留时间(min)	峰面积	浓度(mg/mL)	保留时间(min)	峰面积	浓度(mg/mL)
Y001	8.103	441 123.361	1.209	7.989	792 740.885	3.249
Y002	8.092	468 051.356	1.364	7.962	845 161.821	3.468
Y003	8.111	486 987.817	1.473	8.021	889 923.075	3.655
Y004	8.157	478 822.554	1.426	8.037	791 783.425	3.245

4 结 论

乳清是干酪生产的副产物,按照生产1 t干酪需排放9 t乳清计算,我国每天有上万吨的乳清等待利用和处理^[6]。而目前我国乳品加工企业对乳清的处理方式主要是将其作为废水排放^[7],不但浪费资源,还会造成严重的环境污染^[8]。近年来,随着环保意识的增强和激烈的经济竞争使人们逐渐意识到乳清中的主要蛋白(α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白)是具有丰富营养价值的乳品加工副产物,可以将其作为其他高品质产品加工所需的原材料。利用乳清生产高纯度的 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白,以及开发乳清干酪、乳清饮料等高附加值产品是未来的发展趋势。因此建立一种简单、快速测定乳清中主要蛋白含量的方法就显得尤为重要。

本研究确定了一种利用凝胶色谱分离检测乳

制品中的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的方法,可在短时间内测定样品中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量,且方法稳定,成本低,操作简便,无需昂贵的试剂,准确性高,对今后生产及对产品的质量控制提供保障,同时为鉴别乳清及其他乳制品的品质提供一种简便的方法。

参考文献:

- [1] 韩奕奕,黄菲菲,王建军,等.凝胶电泳法(SDS-PAGE)测定乳与乳制品中 β -乳球蛋白的含量[J].乳业科学与技术,2009,2(2):74-77.
- [2] Pellegrini A, Detting C, Thomas U, et al. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine beta-lactoglobulin[J]. Biochimica Biophysica Acta, 2001, 1526(2): 131-140.
- [3] Fast J, Mossberg A K, Nilsson H, et al. Compact oleic acid in HAMLET[J]. FEBS Letters, 2005, 579(27): 6095-6100.
- [4] Nurminen M L, Sipola M, Kaarto H, et al. Alpha-lactorphan low-

- ers blood pressure measured by Radiotelemetry in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats [J]. *Life Sciences*, 2000, 66(16): 1535-1543.
- [5] Kelleher S L, Chatterton D, Nielelsen K, et al. Glycomacropptide and alpha-lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2003, 77(5): 1261-1268.
- [6] Jouenne E, Crouzet J. Effect of pH on retention of aroma compounds by beta-lactoglobulin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(4): 1273-1277.
- [7] 高学飞, 王志耕. β -乳球蛋白应用研究进展[J]. *乳品工业*, 2005, 5(12): 41-44.
- [8] Kushibiki S, Hodate K. Effect of beta-lactoglobulin on plasma retinol and triglyceride concentrations, and fatty acid composition in calves[J]. *Journal of Dairy Research*, 2001, 68(4): 79-86.
- [9] Nakajima M, Shinoda I. Beta-lactoglobulin suppresses melanogenesis in cultured human melanocytes[J]. *Pigment Cell Research*, 1997, 10(6): 10-30.
- [10] 陈文亮, 毛仁淡. 牛乳加热前与加热后乳球蛋白之差异[J]. *科学新天地*, 2005, 3(1): 64-67.
- [11] Yamauchi R, Usui H, Yunden J, et al. Characterization of beta-lactoglobulin, as a neurotensin agonist[J]. *Bioscience Biotechnol Biochemistry*, 2003, 67(4): 940-943.
- [12] 李 慧, 陈 敏, 李 赫. 反相高效液相色谱法测定乳清蛋白中的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白[J]. *色谱*, 2007, 25(1): 36-39.
- [13] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(26): 1327-1333.
- [14] 张 杉, 陈 敏, 李 慧. SDS-PAGE电泳测定乳清蛋白方法的研究[J]. *食品科技*, 2008, 33(1): 35-38.
- [15] 袁水林, 熊 鼎, 陈红兵, 等. 间接竞争ELISA法检测牛乳中 β -乳球蛋白含量的准确性评价[J]. *食品科学*, 2014, 35(18): 100-104.
- [16] 蒲玲玲, 郭长江. 乳清蛋白的组成及其主要保健功能[J]. *中国食品与营养*, 2011, 17(6): 68-70.
- [17] 陈 婷, 余群力. 超滤膜分离技术回收乳清蛋白工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2010(4): 226-228.
- [18] Suarez E, Lobo A, Alvarez S, et al. Demineralization of whey and milk ultrafiltration permeate by means of nanofiltration[J]. *Desalination*, 2009, 24(5): 272-280.

(责任编辑:王 昱)