

*О.В. Дымар, Е.Д. Шегидевич*

*Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

## **ИЗОЛЯЦИЯ $\beta$ -ЛАКТОГЛОБУЛИНА МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ**

*(Поступила в редакцию 05.05.2015 г.)*

*Проведен анализ существующих методов выделения  $\beta$ -лактоглобулина молочной сыворотки и установлено, что в настоящее время используются следующие: хроматография, мембранная фильтрация, осаждение и тепловая денатурация. В лабораторных условиях определена возможность изоляции  $\beta$ -лактоглобулина с применением осаждения и тепловой денатурации. По результатам серии экспериментов выявлено, что указанные методы позволяют изолировать  $\beta$ -лактоглобулин молочной сыворотки, однако следует рассматривать их в контексте возможного комбинирования с прочими.*

**Введение.** Сывороточные белки представляют собой группу различных глобулярных белков, отличающихся друг от друга по структуре и свойствам. Главные представители сывороточных белков  $\beta$ -лактоглобулин и  $\alpha$ -лактальбумин.  $\beta$ -Лактоглобулин составляет около 50% сывороточных белков,  $\alpha$ -лактальбумин – около 20%. Остальное количество сывороточных белков приходится на альбумин сыворотки крови, иммуноглобулины, лактоферрин и другие минорные белки [1].

Получение отдельных фракций белков молока в последнее время вызывает интерес при создании новых видов продуктов. Например, перспективным направлением развития следующего поколения продуктов детского питания является их обогащение  $\alpha$ -лактальбумином, что обусловлено присутствием указанного белка в женском молоке. В связи с этим возникает необходимость рассмотрения возможности выделения и направлений использования  $\beta$ -лактоглобулина, как одного из основных компонентов молочной сыворотки.

К ценным функциональными свойствам белков молочной сыворотки относят водосвязывающую способность, вязкость, гелеобразование, пенообразование. Следует отметить, что перечисленные свойства сыворотки обусловлены в первую очередь присутствием  $\beta$ -лактоглобулина. Таким образом,  $\beta$ -лактоглобулин может

быть использован при создании новых видов продуктов за счет своих функциональных свойств [2].

**Целью** работы является определение способов выделения фракции  $\beta$ -лактоглобулина из молочной сыворотки. Для реализации поставленной цели необходимо выполнение следующих **задач**: анализ существующих методов выделения  $\beta$ -лактоглобулина, апробация методов осаждения и тепловой денатурации для изоляции  $\beta$ -лактоглобулина из молочной сыворотки и последующий электрофоретический анализ полученных образцов.

**Материалы (объекты) и методы исследования.** Объектами исследований являлись способы выделения  $\beta$ -лактоглобулина из молочной сыворотки.

Определение наличия  $\beta$ -лактоглобулина в получаемых образцах осуществляли с использованием методики идентификации фракционного состава белков молока методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-электрофореза). Электрофорез – метод разделения веществ, основанный на явлении миграции заряженных микрочастиц в геле под действием внешнего электрического поля.

ДСН-электрофорез позволяет фракционировать белки в зависимости от значений только одного параметра – их молекулярной массы. Белки связывают додецилсульфат натрия (ДСН) за счет гидрофобных взаимодействий в теоретическом соотношении 1,4 г ДСН на 1 г белка. Каждая молекула ДСН несет отрицательный заряд, и огромный избыток их превосходит собственный суммарный заряд белка. Соотношение размер/заряд в присутствии ДСН становится практически одинаковым для любого белка, и деление происходит по молекулярной массе, так как поры геля работают как молекулярные сита [3].

Электрофорез проводили в 12% акриламидном геле. Параметры процесса устанавливали следующие: при вхождении образцов в разделяющий гель – напряжение 100 В, после захождения в гель – 250 В. Продолжительность разделения составила 4 ч.

**Результаты и их обсуждение.** В настоящее время существует большое разнообразие методов, позволяющих проводить выделение фракции  $\beta$ -лактоглобулина из сыворотки. К таким методам относятся: хроматография, мембранная фильтрация, осаждение и тепловая денатурация [2, 4].

Примером использования хроматографии для выделения  $\beta$ -лактоглобулина является метод гель-фильтрации. Процесс гель-

фильтрации осуществляется за счет вымывания частиц разделяемого раствора через слой набухшего геля растворителем. Большие молекулы, не проникая в поры геля, свободно проходят с потоком растворителя. Более мелкие молекулы распределяются в жидкой среде снаружи и внутри гелевых частиц. Молекулы, находящиеся внутри геля, элюируются медленнее. Следовательно, компоненты раствора выходят из колонки соответственно убыванию их молекулярной массы [5]. Сывороточные белки могут быть фракционированы на  $\beta$ -лактоглобулин и  $\alpha$ -лактальбумин.

Применение мембранной фильтрации позволяет выделить компоненты с определенными молекулярными массами из многокомпонентной системы, сконцентрировать их до определенного уровня без изменения нативных свойств [6]. Выделение  $\beta$ -лактоглобулина мембранной фильтрацией возможно при комбинировании с другими способами.

Методы осаждения и тепловой денатурации просты в исполнении. В лабораторных условиях был проведен ряд экспериментов по определению возможности выделения  $\beta$ -лактоглобулина указанными методами.

В основу первого и второго эксперимента положен метод осаждения. Данный метод является классическим. Он основан на разделении белков в соответствии с их различной растворимостью. Осаждение может проводиться под действием кислот, ферментов, солей [3]. При планировании эксперимента для выделения  $\beta$ -лактоглобулина был выбран способ селективного осаждения остальных сывороточных белков. В качестве осадителей белков использовали трихлоруксусную кислоту и натрий хлористый в сочетании с соляной кислотой [7].

В качестве исходного сырья использовали сыворотку молочную подсырную. Для проведения экспериментов были использованы следующие реактивы: 6%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), натрий хлористый NaCl, 2М раствор соляной кислоты HCl.

Последовательность действий по выделению  $\beta$ -лактоглобулина с применением трихлоруксусной кислоты представлена на рисунке 1.

Подготовку исходного сырья для осаждения с применением ТХУ не осуществляли.

Для проведения первого эксперимента сыворотку подсырную смешивали с равным объемом 6%-ного раствора ТХУ, проводили осаждение в течении 30 минут при комнатной температуре, наблюдая постепенное расслоение жидкости. На лабораторной центрифуге

отделяли полученный осадок (режимы работы центрифуги представлены на рисунке 1). Надосадочная жидкость (супернатант) содержит  $\beta$ -лактоглобулин, что подтверждается результатами электрофореза.

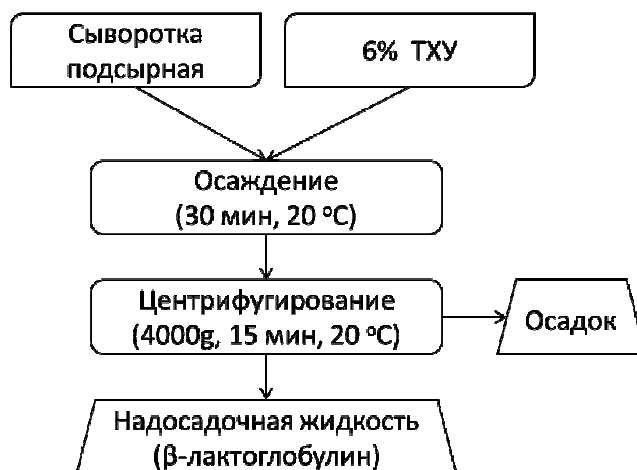


Рисунок 1 – Последовательность операций по выделению  $\beta$ -лактоглобулина с применением трихлоруксусной кислоты

Последовательность действий по выделению  $\beta$ -лактоглобулина с применением натрия хлористого в сочетании с соляной кислотой представлена на рисунке 2.

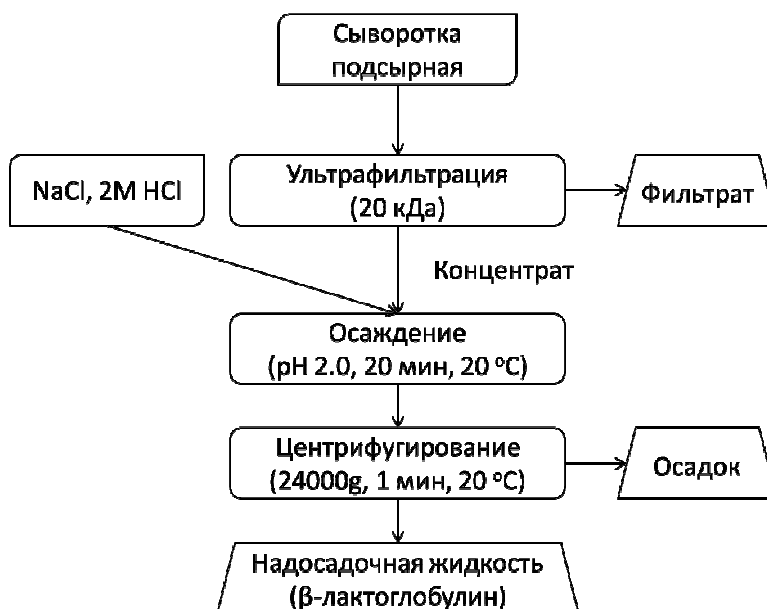


Рисунок 2 – Последовательность операций по выделению  $\beta$ -лактоглобулина с применением натрия хлористого и соляной кислоты

Для увеличения эффективности процесса осаждения натрием хлористым в сочетании с соляной кислотой проводили сгущение

сыворотки с применением метода мембранной обработки (ультрафильтрации), постепенно отводя фильтрат из процесса. Ультрафильтрацию осуществляли на лабораторно-экспериментальной установке для проведения фракционирования белков молочного сырья с мембранным элементом селективностью 20 кДа. Использование мембраны с селективностью 20 кДа позволяет провести частичное удаление из молочного сырья минеральных веществ и лактозы, а также повысить содержание белка. При этом выделение отдельных фракций белков в фильтрат не происходит, что подтверждается результатами исследований, проведенными при первоначальном испытании установки.

Для выделения  $\beta$ -лактоглобулина с применением натрия хлористого в сочетании с соляной кислотой сыворотку сгущенную (концентрат) смешивали с NaCl (из расчетной концентрации 7%), доводили pH до значения 2,0 используя 2М раствор соляной кислоты, проводили осаждение в течении 20 минут при комнатной температуре. На лабораторной центрифуге отделяли полученный осадок. Надосадочная жидкость содержит  $\beta$ -лактоглобулин, что подтверждается результатами электрофореза.

В основу третьего эксперимента положен метод выделения, основанный на тепловой денатурации белков. Тепловая денатурация эффективна для выделения отдельных фракций белка молока. Данный прием может быть использован, если белок относительно устойчив в условиях нагревания, в то время как сопутствующие белки денатурируют. На способность белков денатурировать оказывает влияние значение pH раствора, продолжительность обработки и температура [3]. Основываясь на свойствах отдельных белков молочного сырья и изменяя указанные выше параметры был построен эксперимент по определению возможности выделения  $\beta$ -лактоглобулина с применением тепловой денатурации.

В качестве исходного сырья использовали сыворотку молочную подсырную. Для проведения эксперимента были использованы следующие реактивы: 2М раствор соляной кислоты HCl, 10%-ный раствор гидроксида натрия NaOH.

Последовательность действий по выделению  $\beta$ -лактоглобулина с применением тепловой денатурации представлена на рисунке 3.

Для  $\beta$ -лактоглобулина с применением тепловой денатурации сыворотку подсырную предварительно сгущали по аналогии со вторым экспериментом. Далее доводили значение pH сыворотки сгущенной до 3,8, используя 2М раствор соляной кислоты, проводили температурную

обработку при 55 °С в течение 30 минут. Такие физико-химические условия включают обратимую полимеризацию белков, которые осаждаются вместе с иммуноглобулинами и альбумином сыворотки крови. На лабораторной центрифуге отделяли полученный осадок.

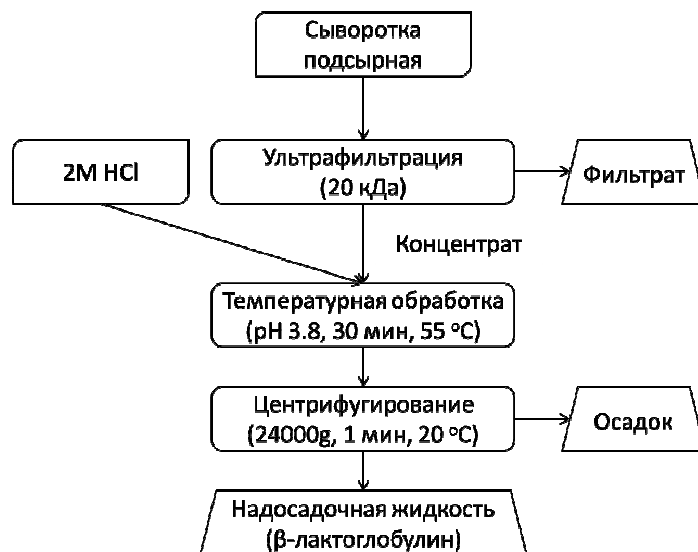


Рисунок 3 – Последовательность операций по выделению β-лактоглобулина с применением тепловой денатурации

Результаты анализа методом ДСН-электрофореза образцов, полученных при проведении экспериментов, представлены на рисунке 4.

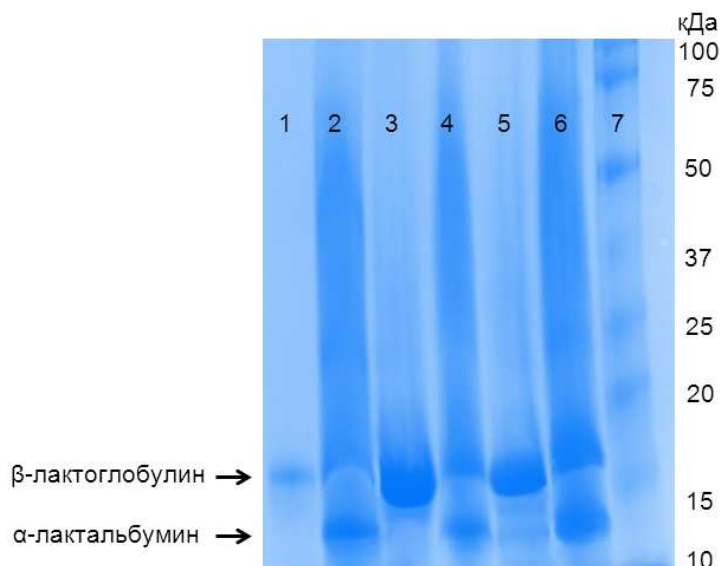


Рисунок 4 – Результаты электрофореза образцов, полученных при проведении экспериментов

(1 – надосадочная жидкость (I эксперимент), 2 – осадок (I эксперимент), 3 – надосадочная жидкость (II эксперимент), 4 – осадок (II эксперимент), 5 – надосадочная жидкость (III эксперимент), 6 – осадок (III эксперимент), 7 – маркер молекулярных масс)

Согласно приведенной электрофореграмме (рис. 4): надосадочные жидкости (супернатанты), полученные в трех экспериментах содержат  $\beta$ -лактоглобулин (молекулярная масса ~ 18 кДа).

**Заключение.** При анализе литературных источников было установлено, что для изоляции  $\beta$ -лактоглобулина используют различные методы: хроматография, мембранная фильтрация, осаждение и тепловая денатурация.

При использовании хроматографии (гель-фильтрации) и мембранной фильтрации необходимо учитывать близость значения молекулярной массы  $\beta$ -лактоглобулина к молекулярной массе  $\alpha$ -лактальбумина. Для гель-фильтрации элюирование указанных белков из колонки будет проходить последовательно, при этом возможно затруднение при отборе фракции  $\beta$ -лактоглобулина. Использование мембранной фильтрации без предварительного осаждения либо расщепления (под действием ферментов)  $\alpha$ -лактальбумина также затруднительно. Например, при фильтрации сыворотки с использованием мембраны селективностью 50 кДа в фильтрат переходят оба белка ( $\beta$ -лактоглобулин и  $\alpha$ -лактальбумин).

При апробации возможности выделения  $\beta$ -лактоглобулина с применением методов осаждения и тепловой денатурации было установлено, что применение указанных способов позволяет изолировать  $\beta$ -лактоглобулин молочной сыворотки. Однако на электрофореграмме полученных образцов можно видеть небольшое содержание  $\beta$ -лактоглобулина в получаемых осадках, что может свидетельствовать о необходимости выбора иного способа для отделения надосадочной жидкости (супернатанта) вместо центрифугирования, наиболее подходящим для этого является мембранная фильтрация.

Следует отметить, что в настоящее время не существует никакого абсолютного способа, позволяющего провести выделение  $\beta$ -лактоглобулина. В связи с этим стоит рассматривать применяемые методы в контексте их возможного комбинирования.

## Литература

1. Горбатова, К.К. Химия физика белков молока / К.К. Горбатова. – М.: Колос, 1993. – 192 с.

2. Whey processing, functionality and health benefits / Institute of Food Technologists; editors: Charles Onwulata, Peter Huth. – Ames, 2008. – 400 p.

3. Сова, В.В. Выделение и очистка белков. Методическое пособие по курсу «Химия и биохимия белков и ферментов» / В.В. Сова, М.И. Кусайкин. – Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. – 42 с.

4. Advanced Dairy Chemistry. Volume 1A: Proteins: Basic Aspects / editors: Paul L.H. McSweeney, Patrick F. Fox. – New York, 2013. – 548 p.

5. Остерман, Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман –М.: Наука, 1985. – 536 с.

6. Fuquay, J.W. Encyclopedia of dairy sciences / J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney. – Elsevier Ltd., 2011. – 4068 с.

7. Konrad, G. A large-scale isolation of native  $\beta$ -lactoglobulin: characterization of physicochemical properties and comparison with other methods / G. Konrad, B. Lieske // International Dairy Journal. – 2000. – Vol. 10. – P. 713-721.

*O. Dymar, K. Shehidzevich*

## **THE ISOLATION OF WHEY $\beta$ -LACTOGLOBULIN**

### **Summary**

The analysis of existing methods for the isolation of whey  $\beta$ -lactoglobulin is conducted and it is established that the following methods such as chromatography, membrane filtration, precipitation and thermal denaturation are used actually. The possibility of the isolation of  $\beta$ -lactoglobulin with precipitation and thermal denaturation methods is determined in laboratory conditions. Based on the results of the experiments it is established that indicated methods can be used to isolate whey  $\beta$ -lactoglobulin, though it is necessary to consider them in the context of possible combination with others.