

О.В. Дымар, Е.Е. Ныркова, Е.Д. Шегидевич

Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

Введение. Молочная сыворотка представляет собой жидкость, которая является нормальным побочным продуктом в процессе промышленной переработки молока на белково-жировые продукты (сыр, творог и казеин). В ней содержится около 50 % сухих веществ молока. Среди основных компонентов молочной сыворотки особое значение имеют белки. Сывороточные белки разнообразны по строению, физико-химическим, биологическим и функциональным свойствам.

Главными из сывороточных белков являются β -лактоглобулин и α -лактальбумин. Первый из них составляет около 50 % сывороточных белков, второй – около 20 %. Остальное количество сывороточных белков приходится на альбумин сыворотки крови, иммуноглобулин, лактоферрин и другие минорные белки [1]. Сывороточные белки богаты незаменимыми дефицитными аминокислотами [2].

Сывороточные белки обладают важными биологическими функциями. Так, иммуноглобулины выполняют защитную функцию, являясь носителями пассивного иммунитета, лактоферрин обладает антибактериальными свойствами. Одной из биологических функций белков является транспортная, например, β -лактоглобулин транспортирует витамин А, лактоферрин – Fe. Некоторым белкам свойственна регуляторная функция [1].

Необходимо отметить, что сывороточные белки обладают рядом ценных функциональных свойств (водосвязывающей способностью, вязкостью, гелеобразованием, пенообразованием). Таким образом, в случае выделения и фракционирования сывороточных белков возможно

их последующее применение в качестве ценных компонентов пищевых продуктов.

Целью работы является определение рациональных путей выделения сывороточных белков и апробация метода гель-фильтрации. Для реализации поставленной цели необходимо выполнение следующих **задач**: анализ основных характеристик сывороточных белков, на основании которых возможно проведение их разделения, анализ существующих методов выделения сывороточных белков, апробация метода гель-фильтрации для выделения сывороточных белков.

Материалы (объекты) и методы исследования. Объектами исследований являлись способы выделения белков молочной сыворотки.

Перед апробацией процесса гель-фильтрации молочного сырья была проведена механическая фильтрация молочной сыворотки с целью удаления казеиновой пыли для более эффективной обработки сырья. Проведение исследований фракций, получаемых в процессе гель-фильтрации, осуществляли спектрофотометрическим методом.

Результаты и обсуждение. С целью рассмотрения и обоснования использования методов выделения белков стоит рассмотреть их основные характеристики, такие как молекулярная масса и изоэлектрическая точка (табл. 1) [1].

Таблица 1. Характеристика белковых соединений сыворотки

Белок	Изоэлектрическая точка, рН	Молекулярная масса, кДа
β-лактоглобулин	5,13	18,2-19,0
α-лактальбумин	4,2-4,5	14,1-14,2
альбумин сыворотки крови	4,7-4,9	66,3
иммуноглобулины, в том числе:		
иммуноглобулин G ₁	5,5-6,8	153-163
иммуноглобулин G ₂	7,5-8,3	146-154
иммуноглобулин А	-	385-417
иммуноглобулин М	-	960-1000
лактоферрин	8,7	80

Известно, что в изоэлектрическом состоянии белки наименее устойчивы. В связи с этим при проведении анализа представленных данных по значению изоэлектрической точки стоит отметить, что при постепенном понижении значения рН будет происходить изменение стабильности различных видов сывороточных белков.

По представленным значениям молекулярных масс сывороточных белков их условно можно разделить на фракции. Так, в первой фракции окажутся белки с относительно низким значением молекулярной массы, такие как β -лактоглобулин, α -лактальбумин, во второй – альбумин сыворотки крови, лактоферрин, в третьей – иммуноглобулины.

Таким образом, молекулярная масса и изоэлектрическая точка являются характеристиками белков, на которых базируются существующие способы выделения и фракционирования белков.

Осаждение белков проводят высаливанием при добавлении солей щелочных и щелочноземельных металлов. Способ основан на образовании нейтральных комплексов между заряженным электролитом и белковой молекулой, что приводит к разрушению гидратной оболочки молекулы и последующему осаждению. Соли щелочных и щелочноземельных металлов вызывают обратимое осаждение белков, т.е. после их удаления белки вновь приобретают способность растворяться, сохраняя при этом свои нативные свойства [3].

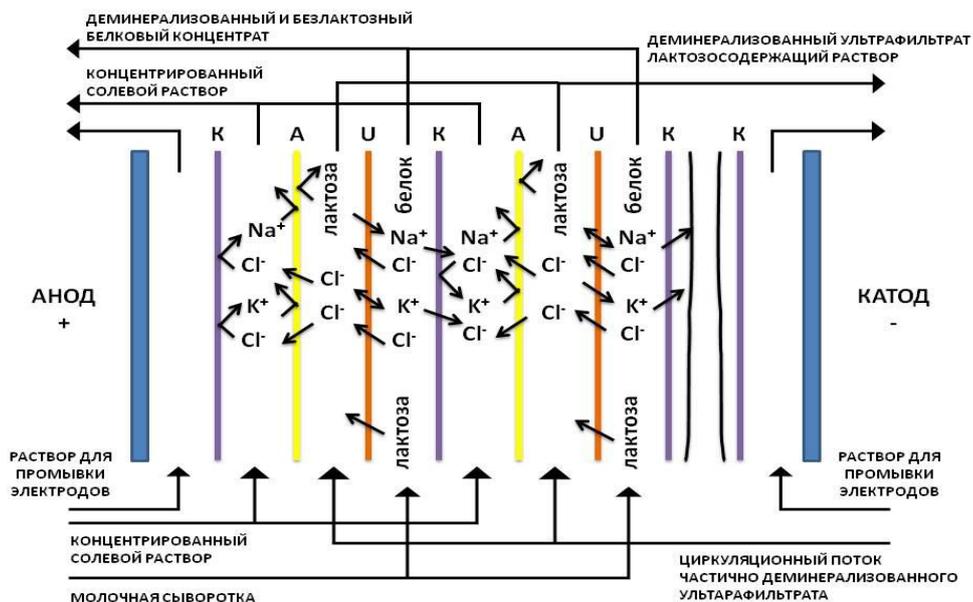
Например, разделить сывороточные белки на фракции можно путем осаждения их растворами $MgSO_4$ и $(NH_4)_2SO_4$ при различном рН. При рН 6,0 из сыворотки, свободной от казеина, после добавления $(NH_4)_2SO_4$ до полунасыщения выделяются иммуноглобулины, при рН 4,8 – большая часть β -лактоглобулина. При последующем снижении величины рН осаждается α -лактальбумин с остатками β -лактоглобулина [4].

В настоящее время для выделения в нативном состоянии используются различные комбинированные способы, основанные на

мембранных методах, и хроматографические методы: адсорбционная хроматография, гель-фильтрация.

Примером применения комбинированных способов выступает метод, основанный на применении мембран трех видов (рис. 1). Катионообменные мембраны пропускают калий, натрий, кальций и др., анионообменные – анионы – хлориды, фосфаты, лактаты. Ультрафильтрационные мембраны задерживают белки, не проницаемые для лактозы и других низкомолекулярных веществ [5].

Подающаяся на установку молочная сыворотка поступает вначале в пространство между катионообменной мембраной и мембраной для ультрафильтрации. Ионизированные минеральные вещества с помощью электродиализа направляются с одной стороны через катионообменную, а с другой через ультрафильтрационную мембрану. Последняя проницаемая для потоков анионов и лактозы. Дальнейшую деминерализацию лактозосодержащего элюата обеспечивает анионообменная мембрана. Белковый элюат освобождается от содержащихся в нем солей и одновременно от лактозы [5].



А – анионообменная мембрана, К – катионообменная мембрана,
 У – мембрана для ультрафильтрации

Рисунок 1 – Комбинирование электродиализа и ультрафильтрации при 3-поточной схеме

При правильном сочетании ультрафильтрации с электродиализом получают после центрифугирования фракцию, которая более чем на 90 % состоит из β -лактоглобулина и нерастворима в бессолевом растворе при данном значении рН. В растворе остается α -лактальбумин. Осадок β -лактоглобулина состоит из нативного белка [5].

Адсорбционная хроматография основана на применении твердых пористых сорбентов, которые представляют собой неподвижную фазу. Равновесное распределение вещества между подвижной и неподвижной фазами определяется процессами его сорбции и десорбции на поверхности сорбента. В качестве сорбентов используются активированный уголь, синтетические смолы и природные сорбенты [6].

Рассмотрим пример применения адсорбционной хроматографии. Это процесс «Вистек», разработанный английской фирмой «Koch-Light/Lab/ Limited». Для осуществления процесса используется специальная ионообменная целлюлоза, известная под названием «среда Вистек». Процесс осуществляется в динамике и включает следующие операции:

- поступление молочной сыворотки в реактор и перемешивание со средой при низких рН;
- отделение депротеинизированной сыворотки (элюата) через фильтрующую сетку;
- промывка сорбента с белком водой;
- заполнение реактора раствором с высоким рН и перемешивание;
- отделение белкового раствора сорбентом с последующим его извлечением.

Полученный раствор нативных белков молочной сыворотки концентрируется методом ультрафильтрации и высушивается распылительным способом. Полученный продукт отличается высокой степенью чистоты (97 % белка) и состоит в основном из β -лактоглобулина и α -лактальбумина [4].

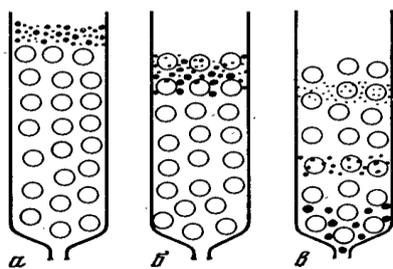
Гель-фильтрацию применяют для фракционирования сложных биологических систем на молекулярном уровне с целью получения отдельных компонентов в нативном состоянии. Установка гель-фильтрации представлена на рисунке 2. Данная установка состоит из следующих основных элементов:

- хроматографическая колонна;
- приёмный бак;
- циркуляционный насос.



Рисунок 2 - Установка гель-фильтрации

Процесс гелевой 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 (рис. 3) [5, 6].



а – момент внесения смеси в колонку, б – начало фракционирования,
 в – начало выхода из колонки фракций наиболее крупных молекул
 Рисунок 3 – Принцип гель-фильтрации (кружки – гранулы пористой матрицы, черные точки разных размеров – компоненты семи веществ)

Стоит отметить, что метод гель-фильтрации используется для разделения компонентов сыворотки на низкомолекулярную и высокомолекулярную фракции.

Была проведена апробация применения метода гель-фильтрации для выделения сывороточных белков.

Для проведения испытаний использовался гель на основе декстрана (сефадекс). Высота столбика геля в колонке составила 30 см. В качестве буферного раствора использовали раствор хлорида натрия с концентрацией 0,1 Н, объем буферного раствора составил 100 мл. Рабочее давление сжатого воздуха $p_1=0,6\pm 0,05$ бар.

При помощи перистальтического насоса в колонку вводили исследуемый образец. Элюация проводилась описанным выше буферным раствором. В ходе проведения гель-фильтрации собирали фракции сыворотки по 3 мл, которые затем анализировались спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм.

Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры процесса гель-фильтрации

№ п.п.	Образцы	Длина волны, нм	Оптическая плотность, Б			Массовая доля белка, %	Массовая доля азота, %
			опыт №1	опыт №2	Среднее значение		
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Исходное сырье	280	5,6	5,8	11,4	0,791	0,124

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5	6	7	8
2	Фракция №1	280	9,4	9,6	9,5	0,045	0,007
3	Фракция №2		6,4	6,1	6,3	0,389	0,061
4	Фракция №3		6,9	7,1	7,0	0,325	0,051
5	Фракция №4		6,5	6,2	6,4	0,638	0,1
6	Фракция №5		7,1	7,4	7,3	0,721	0,113
7	Фракция №6		13,8	13,3	13,6	0,657	0,103
8	Фракция №7		12,1	11,6	11,9	0,485	0,076
9	Фракция №8		21,7	22,1	21,9	0,293	0,046
10	Фракция №9		9,5	9,8	9,7	0,281	0,044
11	Фракция №10		12,9	13,1	13,0	0,172	0,027
12	Фракция №11		30,1	29,7	29,9	0,083	0,013

Исходя из полученных данных, были построены графики профилей элюирования отдельных белковых фракций, представленные на рисунках 4, 5.

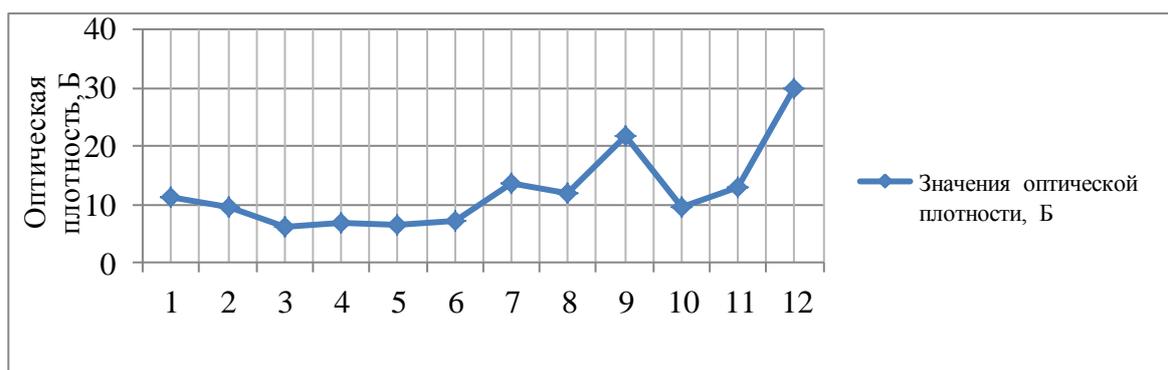


Рисунок 4 – График профиля элюирования отдельных белковых фракций по значениям оптической плотности

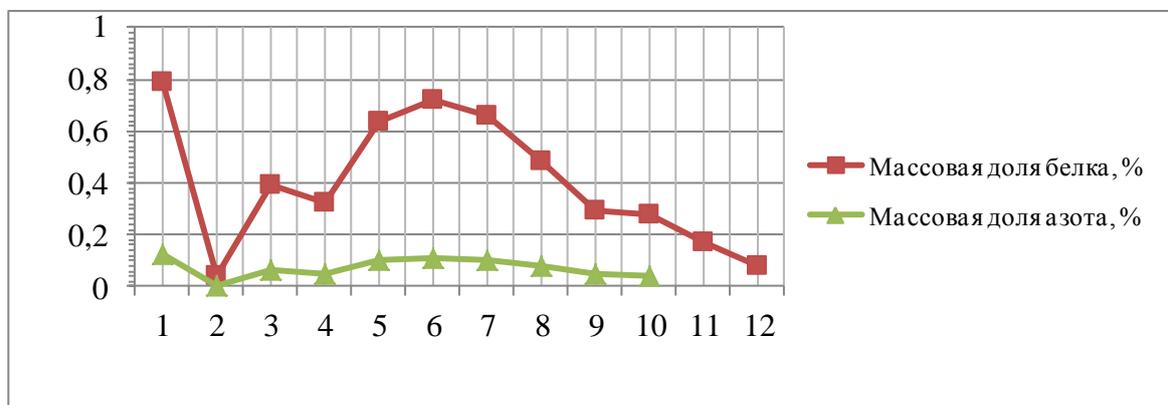


Рисунок 5 – График профиля элюирования отдельных белковых фракций по массовым долям белка и азота

На основе полученных результатов, а именно по изменению оптической плотности и массовым долям белка и азота в зависимости от фракций, установлено, что процесс гель-фильтрации позволяет проводить выделение белков молочной сыворотки.

Вывод. При проведении анализа значений изоэлектрической точки и молекулярной массы сывороточных белков следует отметить, что данные характеристики являются основой для проведения их выделения.

В настоящее время применяются два различных способа выделения сывороточных белков: в денатурированном состоянии и в нативной форме. Примером первого способа является способ высаливания, второго – мембранные и хроматографические методы.

Проведенная апробация гель-фильтрации свидетельствует о возможности применения данного метода для проведения выделения сывороточных белков с изменением исходных параметров сырья.

Литература

1. Горбатова, К.К. Химия и физика молока / К.К. Горбатова. – Санкт-Петербург: ГИОРД, 2004.– 288 с.
2. Храмцов, А.Г. Феномен молочной сыворотки: [монография] / А.Г. Храмцов. – Санкт-Петербург: Профессия, 2011.– 802 с.
3. Северин, Е.С. Биохимия/ Е.С. Северин. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 779 с.
4. Храмцов, А.Г. Технология продуктов из молочной сыворотки / А.Г. Храмцов, П.Г. Нестеренко. – Москва: ДеЛипринт, 2004.– 588 с.
5. Сенкевич, Т. Молочная сыворотка: Переработка и использование в агропромышленном комплексе / Т. Сенкевич. – М.: Агропромиздат, 1989.–269 с.
6. Остерман, Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. – М. : Наука, 1985.– 536 с.

THE METHODS OF WHEY PROTEINS' SEPARATION

Summary

Whey proteins' separation is based on such characteristics as isoelectric point and molecular weight. There are two types of existing methods of whey proteins' separation. It can be separated in the denatured state or in the native form. The first method is a the method of salting, the membrane and chromatographic methods are the second one. The basics techniques of gel filtration and its installation are described. The approbation of the method of gel filtration is considered. The results of the approbation are presented.