

高压 CO₂ 和乙醇协同沉淀法从牛乳中分离蛋白质的研究*

何卫中 姚善泾 关怡新 朱自强

(浙江大学化学工程与生物工程学系 杭州 310027)

摘 要 以 CO₂ 为沉淀剂,乙醇为 CO₂ 助溶剂,考察了高压 CO₂ 和乙醇对牛乳中蛋白质的协同沉淀作用。结果表明,牛乳中蛋白质的沉淀存在着临界温度和临界压力,分别为 32℃ 和 2.76 MPa,当体系高于这个临界温度和临界压力时对沉淀过程有利;CO₂ 和乙醇对牛乳中蛋白质的沉淀具有双重作用,在水体系中加入乙醇既有助于增加 CO₂ 的溶解度,也可以使沉淀的临界温度和临界压力降低。

关键词 高压 CO₂ 牛乳 蛋白质 抗溶剂沉淀

应用高压或超临界 CO₂ 作为沉淀剂,替代对环境有害的无机酸(如盐酸和硫酸等)、有机溶剂或有机混合溶剂,从有机相或水相中分离生物产品和其他高附加值产品,是一项非常有前途和实用价值的技术,越来越引起人们的重视^[1]。该技术(SAS, supercritical anti-solvent precipitation)在食品工业中的应用,最近已有很多报道。本实验室利用超临界 CO₂ 作为沉淀剂,得到了柠檬酸的微细颗粒^[2]。实验中详细考察了纤维素酶在 CO₂ 加压下的酶活变化特性^[3]。Winters 等^[4]以气体 CO₂ 作为抗溶剂,从 DMSO 的蛋白质混合溶液中分级分离碱性磷酸酶、胰岛素、溶菌酶、核糖核酸酶、胰蛋白酶等。Hofland 等^[5]将 CO₂ 看作挥发性电解质,并将它用作沉淀剂,分离来自大豆的蛋白质混合物。Tomasula 等^[6,7]曾分别用高压 CO₂ 连续和间歇流程,将酪蛋白从牛乳中沉淀出来。该过程没有产生任何含酸或碱的废水,可以被认为是绿色分离技术。

牛乳是营养丰富、成分配比合理、生理功能较全面的理想食品,蛋白质是牛乳的主要成分,牛乳中蛋白质含量约为 32 g/L,其中酪蛋白大约占 80%。酪蛋白是几种蛋白质通

过胶质磷酸钙(CCP, colloidal calcium phosphate)和疏水键结合在一起的蛋白质复合体,加入酸(如盐酸)将会使 CCP 从酪蛋白中溶解出来,从而导致酪蛋白稳定结构的破坏而沉淀析出,其沉淀的原因与蛋白质的疏水性相互作用有关,并且具有温度依赖性。用 CO₂ 替代盐酸作沉淀剂具有吸引力,但由于 CO₂ 不易溶于水,如果将 CO₂ 直接加入到一般的蛋白质水溶液中,即使达到较高的压力,沉淀仍比较困难。而如果加入适量的有机溶剂,如乙醇、丙酮等,可以在较低的压力下使蛋白质沉淀。因此,CO₂ 助溶剂的加入和作用十分重要。

本实验中以牛乳中蛋白质为研究对象,考察其在不同 CO₂ 压力和乙醇下相对蛋白质含量变化,探讨高压 CO₂ 和乙醇对蛋白质的协同沉淀作用。

1 实验材料与设备

1.1 实验材料

牛乳采用杭州美丽健乳品有限公司的美丽健纯牛乳。乙醇为杭州长征化工厂的分析纯无水乙醇。牛血清白蛋白(BSA)购自华美生物工程公司。CO₂ 由浙江大学气体供应站

第一作者:博士,讲师(姚善泾为通讯作者)。

* 国家自然科学基金资助项目(No.29736180,20076042)

收稿时间:2003-06-30

提供,纯度为 98%,其他试剂均采用分析纯级。

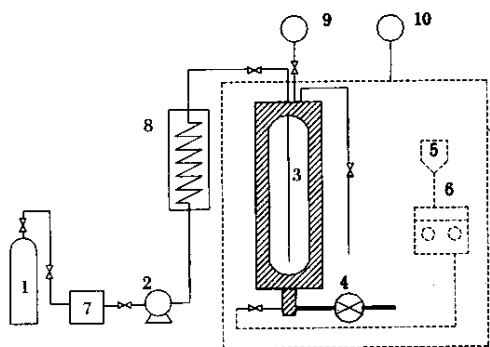
1.2 实验设备

抗溶剂沉淀釜,本实验室自制,离心沉淀机,上海医用分析仪器厂,722 光栅分光光度计,上海第三分析仪器厂。

2 实验方法

2.1 工艺流程

实验流程如图 1 所示。实验采用间歇操作,首先通入 CO_2 将沉淀釜吹干并赶出其中的残余空气。然后将一定量已知乙醇浓度的乙醇-牛乳溶液由蠕动泵加入温度恒定的沉淀釜,加入量一般为 35 g。在设定温度的空气浴中平衡一段时间后,慢慢通入 CO_2 到沉淀釜中,至一定压力后保压,保压过程中观察釜内溶液的变化。在加压和保压过程中温度保持恒定。保压 0.5 h 后,从出料口出料,经离心沉淀机在 2500 r/min 下离心 10 min 后,适当稀释,测定上清液的蛋白质含量。



1. CO_2 钢瓶; 2. 柱塞泵; 3. 可视沉淀釜; 4. 球阀;
5. 高位槽; 6. 蠕动泵; 7. 低温恒温槽;
8. 气体预热器; 9. 精密压力表; 10. 温控仪

图 1 实验流程示意图

2.2 检测方法

蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法^[8],吸光度测定采用分光光度计。

3 结果与讨论

3.1 实验条件选择

根据 Tomasula 等^[6]用 CO_2 从牛乳中沉

淀酪蛋白的实验结果可知,牛乳中酪蛋白的起始沉淀温度为 32℃,起始沉淀压力为 2.76 MPa,停留时间(> 5 min)对沉淀无显著影响。牛乳中酪蛋白沉淀较佳操作条件为: CO_2 压力 2.75 ~ 5.52 MPa,温度 38 ~ 49℃。本实验将采用 CO_2 -乙醇-牛乳体系,无搅拌的间歇操作模式,主要考察加入乙醇后对蛋白质沉淀的影响,因此,采用以下操作条件:乙醇的体积分数分别为:0%、10%、20%、30%、40%;温度 30、35、40℃; CO_2 压力 0 ~ 7.35 MPa;间歇操作 30 min。

3.2 温度对蛋白质沉淀的影响

在图 2 ~ 图 6 中分别出示了 30、35、40℃ 时,乙醇体积分数为 0% ~ 40%、各操作压力下的蛋白质含量变化曲线。蛋白质含量用相对含量表示,以进料液中蛋白质含量为基准。由图 2 ~ 图 6 可以看出,各操作温度、乙醇体积分数下,蛋白质含量随着温度的升高而降低。由图 2 可见,30℃ 不含乙醇时,蛋白质含量随 CO_2 压力升高下降趋势最不明显,2.94 MPa 时相对蛋白质含量仍有 0.82,在整个操作压力范围内,相对蛋白质含量仍大于 0.74,这与牛乳中的酪蛋白含量约占蛋白质含量的 80%^[9]以及 Tomasula 等^[6]用 CO_2 从牛乳中沉淀酪蛋白的实验结果相似,酪蛋白基本没有沉淀,可以确认 Tomasula 等提出的 32℃ 是牛乳中蛋白质沉淀的临界温度,而当加入乙醇后,30℃、2.94 MPa 时,10% ~ 40%

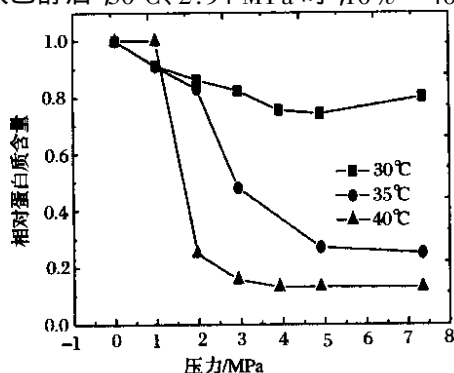


图 2 高压 CO_2 下牛乳中蛋白质相对含量变化曲线

乙醇-牛乳溶液的相对蛋白质含量分别降为 0.68、0.71、0.56、0.49,即随着乙醇的加入,牛乳中蛋白质沉淀的临界温度降低。尤其在温度为 35、40℃,压力 > 2.94 MPa 时,相对蛋白质含量均 < 0.29,在较高温度下乙醇显示了比较明显的助沉淀作用。

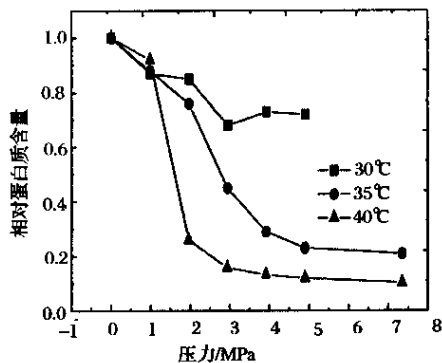


图 3 高压 CO₂ 下 10% 乙醇-牛乳溶液中蛋白质相对含量变化曲线

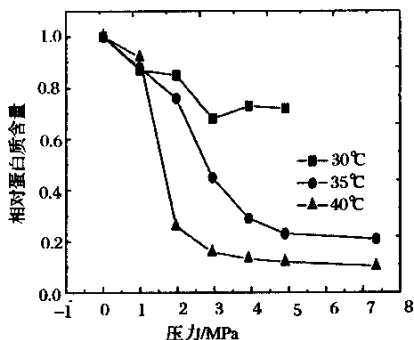


图 4 高压 CO₂ 下 20% 乙醇-牛乳溶液中蛋白质相对含量变化曲线

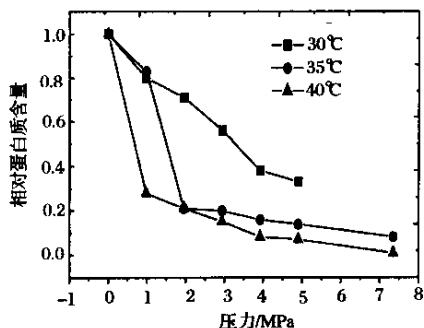


图 5 高压 CO₂ 下 30% 乙醇-牛乳溶液中蛋白质相对含量变化曲线

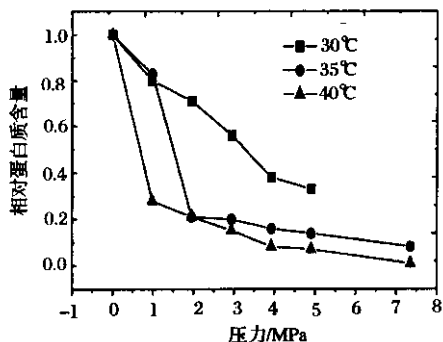


图 6 高压 CO₂ 下 40% 乙醇-牛乳溶液中蛋白质相对含量变化曲线

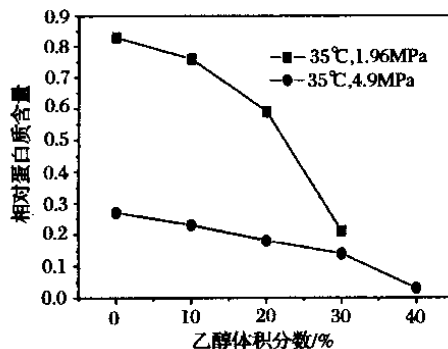


图 7 35℃、1.96 MPa 和 4.9 MPa 下相对蛋白含量随乙醇体积分数的变化曲线

由此可见,牛乳中蛋白质含量随着温度的升高而降低,而且牛乳中蛋白质的沉淀存在着临界温度,高于其临界温度(32℃)对沉淀过程有利。因此,温度在较低的 30℃ 时,随着压力和乙醇添加量的升高,蛋白质含量下降不显著;温度较高的 35、40℃ 时,蛋白质含量下降则十分明显。

3.3 CO₂ 压力对蛋白质沉淀的影响

由图 2 ~ 图 6 可知,除不含乙醇的牛乳液在 30℃ 时沉淀不明显外,乙醇体积分数为 0% ~ 40% 的牛乳溶液随压力的升高蛋白质含量均明显下降,其下降程度随乙醇体积分数和温度的不同而不同。温度和乙醇体积分数越高,蛋白质含量随压力升高的下降速率越快。可以认为在不同的乙醇体积分数和温度下具有不同的临界沉淀压力,当达到临界沉淀压力时,相对蛋白含量迅速下降。特别是当 40℃、乙醇体积分数为 40% 时,压力升

至 0.98 MPa 相对蛋白质含量就降至 0.147 ; 4.9 MPa 时相对蛋白质含量降至 0.006 ,蛋白质几乎完全沉淀。假如把相对蛋白含量为 0.8 时的 CO₂ 压力作为临界沉淀压力点 ,则各操作温度、压力下的临界沉淀压力点或临界沉淀压力所在的区间如表 1 所示。

表 1 不同的乙醇体积分数和温度下牛乳溶液的临界沉淀压力

温 度		30℃			
乙醇体积分数/%	0	10	20	30	40
CO ₂ 压力/MPa	3.92	1.96 ~ 2.94	1.96	0.98	0 ~ 0.98
温 度		35℃			
乙醇体积分数/%	0	10	20	30	40
CO ₂ 压力/MPa	1.96 ~ 2.94	0.98 ~ 1.96	0.98 ~ 1.96	0.98	0 ~ 0.98
温 度		40℃			
乙醇体积分数/%	0	10	20	30	40
CO ₂ 压力/MPa	0.98 ~ 1.96	0.98 ~ 1.96	0 ~ 0.98	0 ~ 0.98	0 ~ 0.98

因此 ,可以认为牛乳中蛋白质的临界沉淀压力点随着温度和乙醇体积分数的升高而下降 ,压力在临界沉淀压力以上 ,沉淀蛋白质效果十分显著。

3.4 乙醇体积分数对蛋白质沉淀的影响

从图 2 ~ 图 6 中还可看出在不同乙醇体积分数下 ,相对蛋白质含量随温度、CO₂ 压力的变化情况。实验结果表明 ,在相同温度、CO₂ 压力下 ,相对蛋白质含量随着乙醇体积分数的升高而降低。图 7 为 35℃、压力分别为 1.96 MPa 和 4.9 MPa 相对蛋白含量随乙醇体积分数的变化曲线。由图 7 可以看出 ,在较低的操作压力 1.96 MPa 下 ,相对蛋白质含量随乙醇体积分数的升高下降十分明显 ,由不含乙醇时的 0.83 降至乙醇体积分数为 30% 时的 0.20 ;在较高的 4.9 MPa 下 ,相对蛋白含量均降至 0.27 以下 ,乙醇体积分数为 40% 时仅为 0.03。显示了乙醇体积分数和 CO₂ 压力对牛乳中蛋白质的双重沉淀作用。

4 结 语

通过对乙醇不同加入量、不同温度、不同 CO₂ 压力下 ,牛乳中相对蛋白含量变化规律的研究 ,可以得出如下结论 (1)牛乳中蛋白质的沉淀存在一个临界温度 ,高于其临界温度 (32℃)对沉淀过程有利 ,牛乳中蛋白质的

沉淀存在温度依赖性。(2)牛乳中蛋白质的沉淀存在临界压力 ,其临界沉淀压力点随着温度和乙醇添加量的升高而下降 ,压力在临界沉淀压力以上 ,沉淀蛋白质效果十分显著。(3)乙醇和 CO₂ 对牛乳中蛋白质具有双重沉淀作用 ,在水体系加入乙醇有助于增加 CO₂ 的溶解度 ,增强超(近)临界 CO₂ 的沉淀作用 ,使临界沉淀温度和临界沉淀压力下降。

参 考 文 献

- 1 何卫中 ,朱自强 ,姚善泾. 化学工程 ,2001 , 29 (4) : 67
- 2 关怡新 ,姚善泾 ,朱自强. 高校化学工程学报 , 1999 , 13 (6) : 523
- 3 何卫中 ,姚善泾 ,关怡新等. 化工学报 ,2002 , 53 (12) : 1353
- 4 Winters M A , Frankel D Z , Debenedetti P G et al. Biotechnol Bioeng , 1999 , 62 : 247
- 5 Hofland G W , de Rijke A , Thiering R et al. Journal of Chromatography B , 2000 , 743 : 357
- 6 Tomasula P M , Craig J C , Boswell R T et al. J Dairy Sci , 1995 , 78 : 505
- 7 Tomasula P M , Craig J C , Boswell R T. J Food Eng , 1997 , 33 : 405
- 8 李建武 ,余瑞元 ,袁明秀等合编. 生物化学实验原理和方法. 北京 : 北京大学出版社 , 1994
- 9 顾瑞霞主编. 乳与乳制品的生理功能特性. 北京 : 中国轻工业出版社 , 2000

Co-precipitation of Casein from Milk Using Elevated Pressure Carbon Dioxide and Ethanol

He Weizhong Yao Shanjing Guan Yixin Zhu Ziqiang

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

ABSTRACT The precipitation of milk protein using compressed CO₂ as precipitant and ethanol as its cosolvent were investigated. The experimental results indicated that the precipitation occurred at a critical temperature of 32°C and pressure 2.76 MPa. The yield was increased at temperature and pressure exceeding their critical limit. The results also showed that both CO₂ and ethanol could facilitate the precipitation of milk protein, and the critical temperature and pressure would drop when cosolvent ethanol was used to increase the solubility of CO₂ precipitant.

Key words pressured carbon dioxide, milk, proteins, anti-solvent precipitation

新书推荐

《FDA 食品法规》

《FDA 食品法规》(美国联邦法规第 21 卷第 70~74、100~199 部分)中文译本,已于 2003 年 6 月出版。FDA 食品法规是美国食品药品监督管理局的法律性文件,为国际著名的国家级管理法规。它对食品及食品配料、加工工艺、杀菌设备、成品质量、检验方法及进出口贸易各环节都有详细规定,世界上许多国家在实施食品及食品配料国际贸易和国内管理都先后借鉴美国 FDA 法规。这部法规的内容按年度修订发行,以保持内容的新颖性和权威性。为适应我国加入世贸组织,向国内食品及食品配料生产、贸易及管理的企业和政府部门提供参考资料,以促进我国食品早日与国际接轨,对于维持和提高我国食品卫生水平具有重要意义。

该书适用于食品和食品配料生产、科研、贸易、检验、出入境管理,以及教育、卫生、商业等方面技术人员和管理人员查阅及参考使用。

全书约 180 万字,16 开本。定价 220 元,另加包装挂号邮寄费 22 元,合计 242 元/本。

《果蔬保鲜手册》(精装)

为了适应果产品的异地销售,延长果蔬的供应期,国家农产品保鲜工程技术研究中心的技术人员,根据多年来从事果蔬贮运保鲜技术研究、开发的体验,从果蔬贮运保鲜的基本原理到实用技术,从果蔬的商品化处理技术到相关的设备、设施都做了详尽介绍,而且具有很高的可操作性,便于读者参考运用。

该书为 16 开本。定价 72 元,另加 15% 的邮挂费。

《焙烤工业实用手册》(精装)

该书为目前内容新、范围广的实用性大型焙烤工业手册。主要介绍焙烤食品的原辅材料、添加剂、焙烤食品的基本工艺以及焙烤机械与设备、原辅材料 and 产品质量标准与检验、工厂设计及相关技术标准,并介绍了饼干、面包、方便面、月饼、蛋糕、糕点、挤压膨化食品等的加工方法及设备选型。

该书为 16 开本。定价 148 元,另加 15% 邮挂费。

《禽蛋制品生产技术》

该书介绍了禽蛋的贮藏保鲜,皮蛋、咸蛋、糟蛋、干蛋品、湿蛋品、蛋粉、冰蛋品等产品的加工,还介绍了蛋黄酱、蛋类罐头、蛋品饮料、鸡蛋酸奶、液态蛋、风味熟制蛋、蛋类果冻、醉蛋的加工工艺。为了提高蛋品工业的经济效益,还介绍了禽蛋中溶菌酶、卵磷脂、胆固醇、免疫球蛋白、蛋白多肽、蛋黄油、鸡类粘蛋白等高效物质的提取技术。适于蛋品生产者、禽蛋养殖人员、大中专院校食品专业师生使用。

该书大 32 开,定价 30 元,另加 15% 邮挂费。

订购以上各套图书可汇款至

地址 (100027) 北京朝阳区霞云路 32 号《食品与发酵工业》编辑部

电话 (010) 64645559 传真 (010) 64647111