

高浓度 IgG 初乳粉的工业制备技术研究

戚明翠, 潘道东*

(南京师范大学金陵女子学院食品科学与营养系, 江苏 南京 210097)

摘 要: 本实验探讨了工业化生产高浓度 IgG 含量初乳粉的工艺条件。通过单因素实验研究了中空纤维超滤膜的超滤条件, 确定最佳操作条件为: 温度 25℃、压力 0.10MPa。为了能大规模生产更高浓度 IgG 含量的初乳粉, 对超滤浓缩乳清进一步盐析, 比较了两种方法, 得出辛酸-硫酸铵法所得的冷冻干燥乳粉其 IgG 含量最高, 达到 85% 左右, 但饱和硫酸铵法更适宜大规模生产。

关键词: 牛初乳; 超滤; 盐析; 免疫球蛋白 IgG

Study on Industrial Processing Technology of Bovine Colostrums Powder with High IgG Concentration

QI Ming-hui, PAN Dao-dong*

(Department of Food Science and Nutrition, Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The separating conditions of bovine colostrums whey by hollow fiber ultra-filtration were confirmed on the basis of single factor tests as the result of ultra-filtrating temperature 25 °C and pressure 0.10 MPa. The purity of IgG extracted by caprylic acid-ammonium sulphate method is higher than that of IgG extracted by saturated ammonium sulphate solution method, reaching 85%. But saturated ammonium sulphate solution method is more feasible for industrial mass production.

Key words: bovine colostrums; ultra-filtration; salt out; immunoglobulin (IgG)

中图分类号: TS252.51

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)07-0118-04

牛初乳(bovine colostrums)是母牛分娩后最初几天所分泌的乳汁。20 世纪 50 年代以来, 人们对牛初乳的研究和认识进一步加深, 发现牛初乳中不仅含有丰富的营养物质, 而且含有大量的免疫因子和生长因子, 如免疫球蛋白、乳铁蛋白、溶菌酶等, 具有免疫调节、改善肠胃道、促进生长发育、改善衰老症状、抑制多种病原微生物等一系列生理活性功能, 因而被誉为“21 世纪的保健食品”^[1]。最近几年, 牛初乳已成为食品及功能性乳制品开发的热点, 牛初乳生产加工企业、牛初乳制品种类和品种越来越多。但是由于起步较晚, 目前我国的牛初乳生产企业大多规模较小, 产品质量不高。另外, 由于用牛初乳直接进行冻干生产, 成本比较高, 而且产品中活性成分免疫球蛋白 IgG 的含量较低。因此, 如何改善国内牛初乳企业的生产现状, 降低生产成本, 提高牛初乳制品中免疫球蛋白 IgG 的含量, 实现大规模工业化生产高品质的牛初乳制品就成为当务之急。

牛初乳粉根据其中免疫球蛋白的含量, 主要可分为普通初乳粉、低浓度 IgG 初乳粉、高浓度 IgG 初乳粉, 其中高浓度 IgG 初乳粉中活性免疫球蛋白的含量可达到 30%~45%^[2], 而本实验则是探索如何在工业化生产的条件下, 进一步获得更高浓度 IgG 含量的初乳粉。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

牛初乳为从正常饲养的、无传染病和乳房炎的健康母牛分娩后 72h 内所挤出的的乳汁。经乳成分分析仪测定各组分含量为: 总蛋白质 6.12%、脂肪 4.14%、乳糖 4.47%、非脂乳固体 11.44%、灰分 0.84%。标准牛 IgG (含量 10mg/ml)、抗血清(效价 1:64)购于上海天呈科技有限公司。

盐酸、氢氧化钠、硫酸铵、正辛酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钾、琼脂糖、戊二

收稿日期: 2007-09-14

基金项目: 江苏省高校高新技术产业发展项目(JHB06-11); 江苏省科技厅“十一五”攻关项目(BE2006325);

“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD04A12)

作者简介: 戚明翠(1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事乳品科学研究。E-mail: monica7517@sina.com

* 通讯作者: 潘道东(1964-), 男, 教授, 博士, 主要从事乳品科学研究。E-mail: daodongpan@163.com

醛、巴比妥、巴比妥钠、考马斯亮蓝 R-250、无水乙醇、冰醋酸均为分析纯试剂。

乳成分分析仪 杭州浙大优创科技有限公司; PHS-3C 型精密 pH 计 上海精密科学仪器有限公司; 高速冷冻离心机 赛特湘仪离心机仪器有限公司; 中空纤维膜超滤装置 上海速膜科技有限公司; 冻干机带离心浓缩设备 上海虹益仪器仪表有限公司; 722 可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 工艺流程

牛初乳收集→过滤→离心脱脂→杀菌(60℃, 30min)→酸沉淀法除去酪蛋白→超滤浓缩(100kD)→进一步盐析提纯→所得沉淀重新溶解、超滤→冷冻干燥→初乳粉

1.2.2 初乳乳清制备

牛初乳经 4000r/min 离心 20min 脱脂后, 置于 38℃ 水浴中, 缓慢滴加 0.5mol/L 盐酸溶液调其 pH 值至 4.4, 静置 30min 后, 在 20℃ 下经 5000r/min × 15min 离心, 除去酪蛋白, 过滤得初乳乳清, 用氢氧化钠溶液调 pH 至 6.8, 于 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 初乳乳清中 IgG 的超滤浓缩^[4-5]

将初乳乳清用分子截留量为 100kD 的中空纤维超滤膜装置进行超滤分离, 有效膜面积为 0.4m²。改变操作参数, 选取不同超滤温度: 15、25、35、45、55、65℃; 不同的超滤压力: 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.12、0.14、0.16MPa, 后测定不同操作条件对膜通量 J(L/m²·h) 和活性 IgG 含量的影响。

1.2.4 IgG 的盐析法提纯

1.2.4.1 饱和硫酸铵法

取 50ml 超滤浓缩乳清, 加入硫酸铵使其饱和度达 50%, 4℃ 静置 3h, 5000r/min 离心 20min, 收集沉淀并溶于原乳清两倍体积 PBS (pH7.4、0.01mol/L)。再用 33% 饱和硫酸铵重复盐析两次, 沉淀溶于适量蒸馏水, 在 PBS 中透析除盐至用 BaCl₂ 检测无白色沉淀。

1.2.4.2 辛酸-硫酸铵法^[5]

取 50ml 超滤浓缩乳清, 用 2 倍体积 pH4.8 0.06mol/L 醋酸缓冲液稀释, 用盐酸调 pH 值至 4.5, 逐滴加入 1500 μl 辛酸, 4℃ 静置 2h, 10000r/min 离心 20min, 去沉淀留上清。上清液用氢氧化钠调 pH 至 6.8, 再用上述饱和硫酸铵法盐析。最终沉淀用 PBS 透析除盐至用 BaCl₂ 检测无白色沉淀。

1.2.5 活性 IgG 含量的测定^[6]

采用改良式火箭免疫电泳法测定。用 pH8.6 0.025mol/L 巴比妥-巴比妥钠缓冲液配制 1% 的琼脂糖溶液, 煮沸溶解后保温于 56℃ 水浴锅中。取适量抗血清,

用 pH7.55 巴比妥-巴比妥钠缓冲液稀释后, 迅速与保温于 56℃ 的琼脂糖溶液混匀, 倒平板(平板厚度为 2mm 左右), 水平静置。待冷却凝固后, 打孔上样, 每孔 10 μl 样品液。样品与戊二醛 1:1 混合后用 pH8.6 0.05mol/L 巴比妥-巴比妥钠缓冲液稀释, 静置 10min。10℃ 恒温条件下, 以 pH8.6 0.025mol/L 巴比妥-巴比妥钠缓冲液为电极缓冲液, 前 30min 以恒压 70V 泳动, 再调整为恒压 140V 泳动 6h 左右。电泳结束后, 压片染色, 用 0.25% 考马斯亮蓝 R-250 染色 20min, 后用洗脱液脱色 2 至 3 次, 每次脱色时间为 15~20min。可见清晰火箭峰, 量取火箭峰高度, 根据标准曲线计算样品中活性 IgG 的含量。

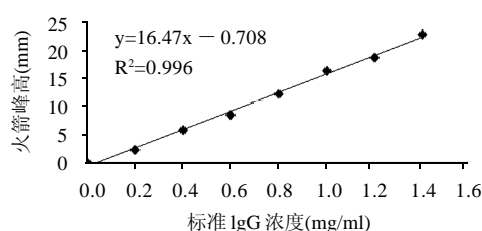


图1 火箭电泳测定 IgG 的标准曲线

Fig.1 IgG standard curve gained by Rocket Immune-electrophoresis

1.2.6 总蛋白含量的测定

采用南京建成生物工程研究所提供的总蛋白定量测定试剂盒(Bradford 法)测定。

1.2.7 初乳粉的检测^[7-8]

根据中国乳制品工业行业规范 RHB 602-2005—牛初乳粉, 对冷冻干燥的成品进行理化指标和卫生指标进行检测。

2 结果与分析

2.1 超滤工艺参数的确定

2.1.1 超滤温度对膜通量和活性 IgG 含量的影响

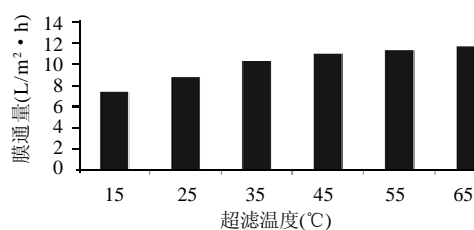


图2 超滤温度对膜通量的影响

Fig.2 Effects of ultra-filtration temperature on permeate flux

由图2可见, 随着超滤温度的升高, 膜通量也随之增加。当温度小于 35℃ 时, 膜通量随温度的上升而迅速增加; 超过 35℃ 以后, 膜通量的增加幅度则趋于

平缓。说明提高超滤温度虽然在一定程度上能改善超滤膜的渗透性,但是当温度升高到一定程度后,蛋白质的热变性加剧反而会影响膜通量。

表1 超滤温度对浓缩乳清中 IgG 及总蛋白含量的影响

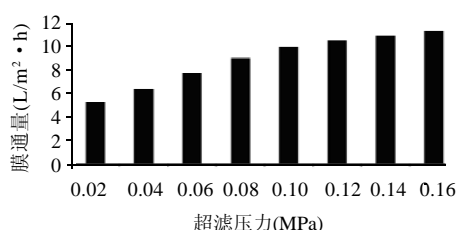
Table 1 Effects of ultra-filtration temperature on IgG and total protein content

超滤温度(°C)	15	25	35	45	55	65
活性 IgG 含量(mg/ml)	24.06	24.24	22.60	14.95	12.58	5.11
总蛋白含量(mg/ml)	54.52	51.75	52.83	48.92	44.67	37.04
IgG 占总蛋白百分比(%)	44.13	46.84	42.78	30.56	28.17	13.81

由表1可知,超滤温度小于35℃时,活性IgG和总蛋白受到的影响并不明显;当温度超过35℃后,随着温度的升高活性IgG的含量下降很快,但乳清总蛋白的下降幅度不大,由此可见温度对IgG活性的影响还是很大的。

综合考虑超滤温度对膜通量和活性IgG及总蛋白含量的影响,25~35℃都是比较适宜的操作条件。但考虑到工业大规模生产的环境,室温25℃是最适宜的,因此选择25℃为最佳温度。

2.1.2 超滤压力对膜通量和活性 IgG 含量的影响



操作条件:中空纤维膜分子量100kD,超滤温度25℃(室温),初乳乳清2000ml。

图3 超滤压力对膜通量的影响

Fig.3 Effects of ultra-filtration pressure on permeate flux

由图3可见,随着超滤压力的提高,膜通量也随之增加。当压力小于0.10MPa时,膜通量随着压力的增大而明显增加;压力超过0.10MPa后,膜通量虽然也有所上升,但增加量相对缓慢。压力提高到一定值以后,超滤膜的膜表面会形成浓差极化,影响膜通量的增加。

由表2可知,超滤压力小于0.10MPa时,操作压力对活性IgG有显著影响,其含量随着压力的增大而明显增加,而对总蛋白的影响不大;压力在0.10~0.14MPa之间,活性IgG和总蛋白的含量有所下降,但下降幅度较小;直到压力达到0.16MPa,活性IgG和总蛋白的含量才有明显下降。由此可见超滤压力对IgG活性的影响相对于超滤温度更明显。

表2 超滤压力对浓缩乳清中 IgG 及总蛋白含量的影响

Table 2 Effects of ultra-filtration pressure on IgG and total protein content

超滤压力(MPa)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16
活性IgG含量(mg/ml)	12.02	17.09	25.17	31.40	36.93	34.40	30.47	23.78
总蛋白含量(mg/ml)	51.86	54.33	55.73	56.29	57.40	55.25	51.02	42.22
IgG 占总蛋白百分比(%)	23.17	31.46	45.16	55.78	64.34	62.25	59.73	56.33

综合考虑超滤压力对膜通量和活性IgG及总蛋白含量的影响,0.08~0.12MPa为比较适宜的操作条件。但考虑到工业大规模生产的可行性,操作压力0.10MPa是比较适宜的。

2.2 两种盐析方法对活性 IgG 含量的影响

超滤工艺参数确定后,将2000ml初乳乳清用分子截留量为100kD的中空纤维膜超滤器进行分离浓缩(操作温度25℃、操作压力0.10MPa、超滤速度3.8L/h)得浓缩乳清约400ml,浓缩倍数5倍。为了提高活性IgG的浓度,浓缩乳清经过不同方法盐析后,将盐析沉淀重新溶解、稀释超滤以除盐和浓缩,再用冷冻干燥工艺得到絮状粉末。

由表3可知,两种盐析方法都能得到活性IgG含量较高的产物。同等体积的浓缩乳清盐析后,辛酸-硫酸铵法所得成品的数量和质量都略高于饱和硫酸铵法,那是因为在酸性条件下辛酸能沉淀出非Ig类的蛋白质,再结合饱和硫酸铵盐析,其效果相较于单纯用饱和硫酸铵盐析效果更好一些、IgG的纯度也更高一些。但考虑到辛酸-硫酸铵法相对耗时、耗力、成本较高,因此使用饱和硫酸铵法进行盐析更适合大规模工业化生产。

表3 浓缩乳清盐析后冷冻干燥产物的活性 IgG 及总蛋白含量

Table 3 Content of IgG and total protein in freeze-drying products of concentrated whey by salting-out

盐析方法	浓缩乳清 取样(ml)	冷冻干燥 乳粉(mg)	总蛋白含量 (mg/ml)	活性 IgG 含量 (mg/ml)	IgG/总蛋白 (%)	IgG 纯 度(%)
饱和硫酸铵法	100.00	856.33	68.41	59.73	87.31	77.96
辛酸-硫酸铵法	100.00	896.67	73.85	67.42	91.29	85.14

2.3 生产工艺的确定及最终成品的质量检测

上述实验确定了最佳超滤工艺参数:温度25℃,压力0.10MPa。此条件下膜通量9.5L/m²·h,浓缩倍数5倍。超滤浓缩乳清进一步采用饱和硫酸铵法盐析,沉淀经再次溶解、超滤后冷冻干燥,得到高浓度IgG含量的初乳粉,根据中国乳制品工业行业规范RHB 602-2005对其理化性质和卫生状况检测。

由表4的检测结果可知,本实验室生产的成品符合国家标准,因此本实验所采用的生产工艺可以适用于大规模工业生产。

表4 高浓度 IgG 初乳粉的各项指标
Table 4 Criteria of bovine colostrums power with high IgG concentration

检测项目	本实验成品	国家标准	达标状况
蛋白质(%)	89.29	≥ 40.0	+
免疫球蛋白(IgG)(%)	77.96	≥ 10.0	+
脂肪(%)	2.3	≤ 5.0	+
水分(%)	3.7	≤ 5.0	+
复原乳酸度(° T)	36	≤ 50	+
黄曲霉毒素 M1(μg/kg)	未检出	≤ 5.0	+
酵母和霉菌(CFU/g)	12	≤ 50	+
菌落总数(CFU/g)	18000	≤ 30000	+
大肠菌群(MPN/100g)	未检出	≤ 90	+
致病菌(指肠道致病菌和致病性球菌)	未检出	不得检出	+

注：+ 表示达标。

3 结 论

综上所述, 在高浓度 IgG 含量初乳粉的工业化生产工艺中, 超滤和盐析是两个最关键的环节。超滤环节中, 温度和压力对膜通量和活性 IgG 及总蛋白含量有不小的影响, 最适宜工业生产的操作参数为: 温度 25℃、

压力 0.10MPa。盐析环节中, 综合考虑工业生产成本和产品得率, 饱和硫酸铵法是最适宜的盐析方法。根据本实验的生产工艺, 可得到活性 IgG 纯度为 78% 的初乳粉, 并且各项理化指标和卫生指标都符合国家标准, 因此本实验的生产工艺适合高浓度 IgG 含量初乳粉的大规模工业化生产。

参考文献:

- [1] 曹劲松. 初乳功能性食品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
- [2] 张和平, 郭军. 免疫乳——科学与技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- [3] 张丹凤, 陆东林, 荆文清, 等. 奶牛初乳及其生产工艺研究[J]. 新疆农业科学, 2002, 39(1): 12-14.
- [4] FUKUMOTO L R, LI-CHAN E, KWAN L. Isolation of immunoglobulin from cheese whey using ultra-filtration and immobilized metal affinity chromatography [J]. Food Research International, 1994, 27(4): 335-348.
- [5] 岳喜庆, 冯巧萍, 张和平, 等. 牛血清免疫球蛋白的盐析法提取与纯化[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(3): 16-21.
- [6] 阿克塞尔森 N H. 定量免疫电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [7] 中国乳制品工业行业规范 RHB602—2005 牛初乳粉[J]. 新疆畜牧业, 2006(2): 27-30.
- [8] 朱俊平. 乳及乳制品质量检验[M]. 北京: 中国计量出版社, 2006.