

УДК 637.07

Метель Владимир Сергеевич, Куликова Ирина Кирилловна,  
 Анисимов Георгий Сергеевич

## АНАЛИЗ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ

*В статье рассмотрены методы фракционирования различных видов молочных белков: хроматография (ионообменная, аффинная и гидрофобная хроматография), мембранные методы и комбинированные методы. В последнее время были внедрены новые перспективные методы, такие как водное двухфазное разделение (ATPS) и магнитная ловушка. В этой статье рассматривается использование этих методов вместе с оценкой их эффективности в отношении выхода и чистоты основных белков. Также рассмотрены перспективные методы разделения казеинов в связи с растущим интересом к очищенным фракциям казеина и их пептидов.*

**Ключевые слова:** молоко, казеин, сывороточные белки, хроматография, мембранные методы.

Vladimir Metel', Irina Kulikova, Georgij Anisimov

### ANALYSIS OF MODERN METHODS OF MILK PROTEIN FRACTIONATION

*The methods of milk protein fractionation are analysed: chromatography (ion exchange, affinity and hydrophobic chromatography), membrane methods and combined methods. The new prospective methods have been described, such as aqueous two-phase separation (ATPS) and magnetic fishing. The combination of the methods together have been estimated from a perspective of their effectiveness: yield and purity of the major proteins. The prospective methods of casein separation are also considered in considering with the growing interest in the high purified fractions of casein and its peptides.*

**Key words:** milk, casein, whey proteins, chromatography, membrane methods.

**Введение / Introduction.** Молоко – это жидкость, вырабатываемая молочными железами самок всех млекопитающих, в первую очередь для удовлетворения потребностей в питании новорожденных. Секретируемое молоко чрезвычайно разнообразно по составу и содержит набор уникальных белков:  $\alpha$ - $\beta$ - и  $\kappa$ -казеины,  $\beta$ -лактоглобулин,  $\alpha$ -лактальбумин [1].

Казеины молока – это фосфопротеиды, которые осаждаются из сырого молока путем подкисления до pH 4,6 при 20 °C [2]. Идентифицировано четыре генных типа казеина:  $\alpha$ <sub>1</sub>-казеин ( $\alpha$ <sub>1</sub>-CN) [3, 4],  $\alpha$ <sub>2</sub>-казеин ( $\alpha$ <sub>2</sub>-CN) [5],  $\beta$ -казеин ( $\beta$ -CN) [6] и  $\kappa$ -казеин ( $\kappa$ -CN) [7]. Стандартные концентрации  $\alpha$ <sub>1</sub>-CN,  $\alpha$ <sub>2</sub>-CN,  $\beta$ -CN и  $\kappa$ -CN в коровьем молоке составляют 12–15, 3–4, 9–11 и 2–4 г\*л-1 соответственно, а казеины составляют приблизительно 75–80 % от общего количества молочного белка.

Около 20 % общего белка молока крупного рогатого скота остаются растворимыми при pH 4,6 и обычно называются сывороточными белками, или неказеиновым азотом; сыворотка содержит некоторые фосфопептиды, полученные из казеинов (то есть протеозо-пептоны). Фракция этих белков характеризуются:

- растворимостью при pH 4,6;
- растворимостью в насыщенном растворе поваренной соли NaCl;
- растворимостью после коагуляции казеинов, вызванной реннином;
- отделяемостью от мицелл казеина путем гелеобразования или микрофльтрации;
- не осаждаются ультрацентрифугированием с добавлением или без добавления Ca<sup>2+</sup>.

Еще с 1950-х годов были разработаны многочисленные методы очистки и фракционирования молочных белков [8]. Некоторые из ранних методов оказались непрактичными и применяются только в лабораторных целях: высаливание, осаждение, основанное на селективной растворимости в присутствии растворителей и кислотно-тепловом разделении, которое использует различия термической стабильности в кислых условиях.

Технически процесс должен был быть простым, быстрым, не денатурирующим белки, и гарантировать высокий выход и качество продукта. Ни одна из приведенных выше процедур не способствовала широкому развитию фракционирования белков молока.

**Обзор и анализ литературных источников / Review and analysis of literary sources.** Молочная сыворотка содержит смесь белков с важными питательными и биологическими свойствами. Для их извлечения используются три основных метода: хроматографический (например, ионообменная и гидрофобная адсорбция), мембранный (баромембранные и электромембранные) и комбинированный. В последнее время были внедрены новые перспективные методы, такие как водное двухфазное разделение (ATPS) и магнитная ловушка [8].

Методы аффинной хроматографии [9] предполагают использование иммобилизованного гексапептида для адсорбции белка. Авторы [10] использовали трансретинальный иммобилизованный на биосиликате кальция для отделения  $\beta$ -лактоглобулина из сладкой сыворотки. Использование аффинной хроматографии с гепарином позволяет извлечь мелкие белки из изолятов сывороточного белка [11]. Результаты показали, что этот метод может быть использован для концентрирования второстепенных катионных белков, таких как лактоферрин и другие факторы роста.

Ионообменная хроматография широко используется для повышения степени чистоты сывороточных белков, получаемых в промышленности.

История использования анионообменной хроматографии начинается с разделения  $\beta$ -лактоглобулина на полиэтилен-иминовой-силикатной колонке с анионной заменой и использованием линейного градиентного элюирования фосфатом калия (0,025–0,50 М) при pH 6,8 [12]. Еще [13] изучали влияние сжатия на масштабирование производственного процесса ионного обмена в упакованном слое для производства экстракта фактора роста из сыворотки с использованием лактопероксидазы и лактоферрина в качестве модельных веществ. Авторы [14] показали, что изоляцию альфа-лактальбумина и бета-лактоглобулина из белков сладкой сыворотки можно проводить с использованием псевдооживленного ионообменного хроматографического процесса. Они объединили оба компонента в качестве одного объекта в модели пористо-диффузионной адсорбции, а также в последующей модели с кинетическим элюированием. Фогт и Фрейтаг [15] исследовали пригодность смешения анионообменных и гидроксипатитовых для обработки молочной сыворотки [16]. Лан и др. использовали твердо-жидкостную циркулирующую систему ионообменной смолы псевдооживленного слоя для непрерывной регенерации белка из подсырной сыворотки.

Меньше работ было сделано на основе катионообменной хроматографии сывороточных белков. Основным направлением использования катионообменной хроматографии является фракционирование IgG, лактоферрина и лактопероксидазы [17, 18, 19]. Комбинирование катионообменной и анионообменной хроматографии позволяет выделять одновременно  $\alpha$ -лактоальбумин,  $\beta$ -лактоглобулин, иммуноглобулины класса G и бычий сывороточный альбумин [20].

Мембранные методы, используемые для разделения сывороточных белков, подразделяются на три основные категории: микрофильтрация, ультрафильтрация и диафильтрация.

Авторы [21] изучили использование двухступенчатой тангенциальной системы фильтрации для очистки  $\alpha$ -лактоальбумина и  $\beta$ -лактоглобулина из изолята сывороточного белка. Разделение достигалось через мембраны 100 и 30 кДа последовательно.  $\alpha$ -лактоальбумин получали с выходом 90 %, но восстановление  $\beta$ -лактоглобулина было более сложным. Исследовали потенциал мембранной ультрафильтрации для фракционирования осветленной сыворотки [22]. В непрерывном режиме диафильтрации использовалась керамическая мембрана с отсечкой 300 кДа. Наивысший выход пермеата для  $\alpha$ -лактоальбумина и  $\beta$ -лактоглобулина был получен при pH 9 и составлял соответственно 56 и 33 %, тогда как иммуноглобулины класса G, бычий сывороточный альбумин и лактоферрин в основном сохранялись при рабочих значениях pH. Авторы [23] исследовали разделение  $\alpha$ -лактоальбумина с использованием различных режимов ультрафильтрации. Они разработали модельные уравнения для

непрерывной, прерывистой концентрации или режима диафильтрации (одиночные или комбинированные). Они показали, что непрерывная концентрация до высокого уровня восстановления или комбинированная непрерывная концентрация-диафильтрация помогли получить фракцию с повышенной степенью чистоты и удовлетворительным выходом  $\alpha$ -лактоальбумина до 90 %.

Электроразделение включает электродиализ и электроацидификацию. Последнее представляет собой недавнюю технологию, которая обеспечивает связанный эффект деминерализации и подкисления с использованием свойств биполярных мембран для диссоциации молекул воды на их границах, а затем катионообменных мембран для деминерализации путем миграции низкомолекулярных ионных веществ. Базинет и др. [24] продемонстрировали возможность ацидификации биполярной мембраной для разделения сывороточного белка. Эта технология позволила выделить 98 %  $\beta$ -лактоглобулин. Оценена возможность выделения лактоферрина из сыворотки электродиализом с помощью ультрафильтрационной мембраны 500 кДа [25]. Наибольшая скорость миграции для лактоферрина была получена при pH 3 с выходом миграции 15 %.

Комбинированные методы основаны на использовании хроматографии, мембранного разделения, химической обработки.

Примером может служить комбинирование электродиализа и ультрафильтрации, что позволяет разделять белки и пептиды в зависимости от их массы и заряда [26, 27, 28]

Эксклюзионную хроматографию обычно используют в качестве конечной стадии очистки после ионообменных и аффинных методов. Предложено использовать эксклюзионную хроматографию в качестве стадии полировки для повышения чистоты  $\alpha$ -лактоальбумина, полученного в результате двухстадийного процесса ионообменной хроматографии [29]. Предварительные исследования показали, что чистота может быть увеличена с 60 % до более 90 %. Рояс и др. [30] использовали эксклюзионную хроматографию для очистки из подсырной сыворотки  $\alpha$ -лактоальбумина и  $\beta$ -лактоглобулина, полученных соответственно в полимерных и солевых фазах водной двухфазной сепарации. Они получили высокую степень очистки белка – 99,7 % – для физиологической фазы и 99,6 % – для полимерной фазы.

Интерес к очищенным фракциям казеина постоянно растет [31, 32].  $\beta$ -казеин обладает хорошими эмульгирующими и стабилизирующими пену свойствами [33] и является хорошим сырьем для получения биофункциональных пептидов [34].  $\alpha$ S-казеин ( $\alpha$ S1- и  $\alpha$ S2-казеин) также может быть использован для формирования структуры [35] и инкапсулирования гидрофобных соединений [36]. К-казеин также является источником физиологически активных соединений [37]. Однако в области выделения отдельных фракций казеина существует важный пробел в отношении их экспериментального восстановления и экономической ценности. Для лабораторных экспериментальных исследований хроматографически очищенные казеины были получены в небольших лабораторных масштабах [38]. Для применения в пищевых продуктах или пищевых препаратах разработан пилотный процесс для производства фракций казеина с высокой степенью чистоты и производительностью [39].

Недавно опубликованный обзор обобщил современные технологии изоляции и очистки казеина [40]. К ним относятся избирательное осаждение, а также мембранная фильтрация при низких температурах. Селективное осаждение использует кальций-чувствительность  $\alpha$ S- и  $\beta$ -казеина, добавляя хлорид кальция при щелочном pH, чтобы отделить эти фракции от сырья [41]. Преимущество использования щелочного pH заключается в том, что  $\alpha$ S- и  $\beta$ -казеин могут осаждаться более легко, что делает возможным их разделение без использования высокоскоростного центрифугирования [42]. В методе мембранной обработки молоко охлаждают ( $\leq 4$  °C) до процесса микрофильтрации, так как хранение при низких температурах вызывает диссоциацию  $\beta$ -казеина из мицеллы казеина в сыворотку и, следовательно, увеличение концентрации  $\beta$ -казеина в сыворотке [43]. Отделенный  $\beta$ -казеин дополнительно очищают с использованием нескольких стадий фильтрации и деминерализации. В другом недавнем патенте молоко предварительно нагревают и подвергают тепловой микрофильтрации, и полученный ретентат охлаждают и подвергают холодной микрофильтрации; этот метод был предложен для получения рецептур и продуктов, содержащих  $\beta$ -казеин [44].

**Заключение / Conclusion.** В этом обзоре рассмотрены различные методы, используемые для получения индивидуальных белков. К ним относятся обычные хроматографические и мембранные методы, а также другие методы, которые недавно стали использоваться для очистки белков, такие как электроразделение, магнитная ловушка, водное двухфазное разделение для сывороточных белков и избирательное осаждение, мембранная фильтрация при низких температурах для казеинов. Колонная хроматография и мембранное разделение остаются наиболее часто используемыми методами фракционирования белков. Однако при использовании одного метода индивидуально всегда существует компромисс между производительностью и чистотой продукта. Более высокие результаты, особенно с точки зрения уровня чистоты, были получены с использованием комбинации более чем одного метода. Поэтому в настоящее время растет интерес к объединению нескольких методов. Техническая и экономическая осуществимость этих связанных систем, вероятно, будет одной из основных будущих задач, стоящих перед отраслью фракционирования молочных белков.

#### ЛИТЕРАТУРА И ИНТЕРНЕТ-РЕСУРСЫ / REFERENCES AND INTERNET RESOURCES

1. McSweeney P. L. H., Fox P. F. (eds.). *Advanced dairy chemistry: volume 1A: proteins: basic aspects*. 4th Edition. Springer Science. New York, 2013
2. Jenness R., Holt C. Casein and lactose concentrations in milk of 31 species are negatively correlated. *Experientia*. 1987. Vol. 43. Issue 9. Pp. 1015–1018
3. Mercier J. C., Grosclaude F., Ribadeau Dumas B. Structure primaire de la caséine  $\alpha$ S1 bovine. Séquence complète. 1971. *Eur. J. Biochem.* Vol. 23. Pp. 41–51.
4. Grosclaude F., Mahé M. F. and Ribadeau Dumas B. Structure primaire de la caseine  $\alpha$ S1 et de la caseine  $\beta$ -bovine. 1973. *Eur. J. Biochem.* Vol. 40. Pp. 323–324.
5. Farrell H. M., Jr., Malin E. L., Brown E. M., Mora-Gutierrez A. Review of the chemistry of  $\alpha$ S2-casein and the generation of a homologous molecular model to explain its properties. 2009. *J. Dairy Sci.* Vol. 92. Pp. 1338–1353.
6. Ribadeau Dumas B., Brignon G., Grosclaude F., Mercier, J. C. Structure primaire de la caséine  $\beta$  bovine. 1972. *Eur. J. Biochem.* Vol. 25. Pp. 505–514.
7. Minkiewicz P., Slangen C. J., Lagerwerf F. M., Haverkamp J., Rollema H. S., Visser S. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of bovine  $\kappa$ -casein macropeptide and characterization of isolated fractions // *Journal of Chromatography A*. Vol. 743. Pp. 123–135.
8. Mayyada M. H. El-Sayed, Howard A. Chase Trends in whey protein fractionation. 2011. *Biotechnol Lett.* Vol. 33. P. 1501–1511.
9. Gurgel P. V., Carbonell R. G., Swaisgood H. E. Fractionation of whey proteins with a hexapeptide ligand affinity resin. *Bioseparation*. 2000. Vol. 9. Pp. 385–392.
10. Vyas H. K., Izco J. M., Jimenez-Flores R. Scale-up of native beta-lactoglobulin affinity separation process. *J Dairy Sci*. 2002. Vol. 85(7). Pp. 1639–1645.
11. Ounis W. B., Gauthier S. F., Turgeon S. L., Roufik S., Pouliot Y. Separation of minor protein components from whey protein isolates by heparin affinity chromatography. *Int Dairy J*. 2008. Vol. 18. Pp. 1043–1050.
12. Flashner M., Ramsden H., Crane L. J. Separation of proteins by high-performance anion-exchange chromatography. *J Anal Biochem*. 1983. Vol. 135(2). Pp. 340–344.
13. Colby C. B., O'Neill B. K., Vaugham F., Middelberg A. P. J. Simulation of compression effects during scaleup of a commercial ion-exchange process. *Biotechnol Prog*. 1996. Pp. 12–662.
14. Carrere H., Bascoul A., Floquet P., Wilhelm A. M., Delmas H. Whey proteins extraction by fluidized ion exchange chromatography: simplified modelling and economical optimization. *Chem Eng J Biochem Eng J*. 1996. Vol. 64(3). Pp. 307–317.
15. Vogt S., Freitag R. Comparison of anion exchange and hydroxyapatite displacement chromatography for the isolation of whey proteins. *J Chromatogr*. 1997. Vol. 760. Pp. 125–137.
16. Qingdao L., Amarjeet B., Jing-Xu (Jesse) Zhu, Argyrios M. Continuous protein recovery from whey using liquid-solid circulating fluidized bed ion-exchange extraction. *Biotechnol bioeng*. 2002. Vol. 78. Pp. 157–163.
17. Hahn R. P., Schulz M., Schau P. C., Jungbauer A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1998. Vol. 795. Pp. 277–287.

18. El-Sayed M. H., Chase H. A. Purification of the two major proteins from whey concentrate using a cation-exchange selective adsorption process. *J Biotechnol Prog.* 2010. Vol. 26(1). Pp. 192–199.
19. Andersson J., Mattiasson B. Simulated moving bed technology with a simplified approach for protein purification separation of lactoperoxidase and lactoferrin from whey protein concentrate. *Journal of Chromatography A.* 2006. Vol. 1107. Pp. 88–95.
20. Gerberding S. J., Byers C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey // *Journal of Chromatography A.* 1998. Vol. 808. Pp. 141–151.
21. Cheang B., Zydney A. A two stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate // *Journal of Membrane Science.* 2004. Vol. 231. Pp. 156–167.
22. Almecija M. C., Ibanez R., Guadix A., Guadix E. M. Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane // *Journal of Membrane Science.* 2007. Vol. 288. Pp. 28–35.
23. Muller A., Daufin G., Chaufer B. Ultrafiltration modes of operation for the separation of alpha-lactalbumin from acid casein whey // *Journal of Membrane Science.* 1999. Vol. 153. Pp. 9–21.
24. Bazinet L., Ippersiel D., Mahdavi B. Fractionation of whey proteins by bipolar membrane electro-acidification // *Innovat Food Sci Emerg Technol.* 2004. Vol. 5. Pp. 17–25.
25. Ndiaye N., Pouliot Y., Saucier L., Beaulieu L., Bazinet L. Electro-separation of bovine lactoferrin from model and whey solutions. *Sep Purif Technol.* 2010. Vol. 74. Pp. 93–99
26. Doyen A., Roblet C., Beaulieu L., Saucier L., Pouliot Y., Bazinet L. Impact of water splitting phenomenon during electro-dialysis with ultrafiltration membranes on peptide selectivity and migration // *Journal of Membrane Science.* 2013. Vol. 428. Pp. 349–356
27. Firdaus L., Dhulster P., Amiot J., Doyen A., Lutin F., Vézina L. P., Bazinet L. Investigation of the large-scale bio-separation of an antihypertensive peptide from alfalfa white protein hydrolysate by an electromembrane process // *Journal of Membrane Science.* 2010. Vol. 355. P. 175–181
28. Noudou V. Y. K., Suwal S., Amiot J., Mikhaylin S., Beaulieu L., Bazinet L. Simultaneous electro-separation of anionic and cationic peptides: Impact of feed peptide concentration on migration rate, selectivity and relative energy consumption // *Separation and Purification Technology.* 2016. Vol. 157. Pp. 53–59
29. El-Sayed M. H., Chase H. A. Single and two-component cation-exchange adsorption of the two pure major whey proteins // *Journal of Chromatography A.* 2009. Vol. 1216. Pp. 8705–8711.
30. Rojas E. G., Coimbra J. S., Minim L. A., Zuniga A. D., Saraiva S. H., Minim V. P. Size-exclusion chromatography applied to the purification of whey proteins from the polymeric and saline phases of aqueous two-phase systems. *Proc. Biochem.* 2004. Vol. 39. Pp. 1751–1759.
31. Holder A. Cross-flow electro membrane filtration for the fractionation of dairy-based functional peptides. Dissertation, Stuttgart, Germany: University of Hohenheim, Verlag Dr. Hut. 2014.
32. Post A. E., Hinrichs J. Large-scale isolation of food-grade  $\beta$ -casein. *Milchwissenschaft.* 2011. Vol. 66. Pp. 361–364.
33. Dickinson E. Interfacial, emulsifying and foaming properties of milk proteins // Fox P. F., McSweeney P. L. H. (Eds.) *Advanced dairy chemistry. Vol 1. Proteins* (3rd ed., Vol. 1, Pp. 1229–1260). New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
34. Korhonen H. J. Bioactive milk proteins and peptides: From science to functional 250 aP. *Lications* // *Australian Journal of Dairy Technology.* 2009. Vol. 64. Pp. 16–25.
35. Huppertz T. Chemistry of caseins // McSweeney P. L. H. & Fox P. F. (Eds.) *Advanced dairy chemistry. Vol. 1A. Proteins: Basic aspects* (Pp. 135–160). New York, USA: Springer.
36. Kessler, A., Menéndez-Aguirre, O., Hinrichs, J., Stubenrauch, C., & Weiss, J. (2013).  $\alpha$ S-Casein-PE6400 mixtures: A fluorescence study. *Faraday Discussions.* Vol. 166. Pp. 399–416.
37. Tolkach A., Kulozik U. Fractionation of whey proteins and caseinomacropptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. *Journal of Food Engineering.* 2005. Vol. 67. Pp. 13–20.
38. Cayot P., Courthaudon J. L., Lorient D. Purification of  $\alpha$ S-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins by batchwise ion-exchange separation. *Journal of Dairy Research.* 1992. Vol. 59. Pp. 551–556.
39. Shapira A., Assaraf Y. G., Epstein, D., Livney, Y. D.  $\beta$ -Casein nanoparticles as an oral delivery system for chemotherapeutic drugs: Impact of drug structure and properties on co-assembly. *Pharmaceutical Research.* 2010. Vol. 27. Pp. 2175–2186.

40. Atamer Z., Post A. E., Schubert T., Holder A., Boom R. M., Hinrichs J. Bovine  $\beta$ -casein: Isolation, properties and functionality. A review. *International Dairy Journal*. 2017. Vol. 66. Pp. 115–125.
41. Post A. E., Ebert M., Hinrichs J.  $\beta$ -Casein as a bioactive precursor – processing for purification. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2009. Vol. 64. Pp. 84–88.
42. Law A. J. R., Leaver J. Methods of extracting casein fractions from milk and caseinates and production of novel products. WO Patent 2003003847. 2007.
43. O'Mahony J. A., Smith K. E., Lucey J. A. Purification of  $\beta$ -casein from milk. US Patent 20070104847 A1. 2007.
44. Christensen J., Holst H. H. Method of producing beta-casein compositions. EU patent EP2947996 B1. 2016.

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Метель Владимир Сергеевич**, аспирант кафедры прикладной биотехнологии Института живых систем, ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь. E-mail: metel@mokostav.com

**Куликова Ирина Кирилловна**, кандидат технических наук, доцент кафедры прикладной биотехнологии Института живых систем, ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь. E-mail: kik-st@yandex.ru

**Анисимов Георгий Сергеевич**, кандидат технических наук, директор Центра биотехнологического инжиниринга СКФУ, ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь. E-mail: metel@mokostav.com

#### INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Metel' Vladimir**, postgraduate student, Department «Applied Biotechnology», Institute of Living Systems, NCFU. E-mail: metel@mokostav.com

**Kulikova Irina**, candidate of technical Sciences, associate Professor, Department «Applied Biotechnology», Institute of Living Systems, NCFU. E-mail: kik-st@yandex.ru

**Anisimov Georgij**, candidate of technical Sciences, Director of the Center for Biotechnological Engineering NCFU. E-mail: metel@mokostav.com