

乳生物化学

RU SHENG WU HUA XUE

汪玉松 邹思湘/主编

吉林大学出版社

乳生物化学

乳生物化学与乳品加工

第二版

中国轻工业出版社

乳 生 物 化 学

主 编 汪玉松 邹思湘

编 者(以姓氏笔划为序)

刘万臣	李子义	李荣文	汪玉松
张永亮	宋华宾	邹思湘	郑玉才
赵建军	崔建华	蔡 辉	欧阳红生

吉 林 大 学 出 版 社

内容提要

本书分上下两篇,共十二章。上篇为乳的化学成分,共七章,介绍乳中蛋白质、脂质、乳糖、酶、维生素、激素和生长因子、无机物质等的种类、含量与营养功能。下篇为乳的生物合成,共五章,介绍乳中重要化学成分的生物合成过程,主要内容有乳腺上皮细胞的结构、乳脂质的生物合成、乳糖的生物合成、乳蛋白质的基因结构和乳蛋白质的生物合成。书末列有中英文专业名词索引。

本书可作为高等农牧、医药、轻工院校的师生和从事人与动物营养、乳与乳制品生产以及生物工程科技人员的专业参考书,对具有一定生物化学基础的读者了解乳生物化学方面的知识也有价值。

乳生物化学

汪玉松 邹思湘 主编

责任编辑、责任校对:杨继奎

封面设计:张沐沉

吉林大学出版社出版

吉林大学出版社发行

(长春市东中华路 29 号) 中国人民解放军农牧大学印刷厂印刷

开本: 787×1092 毫米 1/16

1995 年 12 月第 1 版

印张: 20

1995 年 12 月第 1 次印刷

字数: 510 千字

印数: 1—2000 册

ISBN 7-5601-1875-5/O·207

定价: 25.00 元

前 言

乳是哺乳动物乳腺的分泌产物,是一种十分复杂的生物体液。乳的高度营养价值,对人和动物免疫保护与生长调节中的独特功能,以及各种成分之间的合适比例,使之成为新生哺乳动物几乎是唯一完备的活性源。并且乳作为一种重要的食物资源,千万年来伴随着人类的进化与发展,发挥着重大作用。但是,人们对于乳生物化学认识的时间仅有近半个多世纪。随着现代实验技术和方法的不断进步,乳生物化学的理论和实践近年来发展迅速,所取得的一系列成果的意义和影响已不只局限在其自身的范围里,其宽阔的辐射面引起了包括生理、生化、营养、免疫、细胞、医药、食品、环境以及生物工程众多学科科技工作者的广泛兴趣。但是,目前国内尚缺少一部较系统介绍乳生物化学知识的书。因此我们将多年来从事乳生物化学教学和科研积累的经验 and 资料加以总结,并结合国内外乳生物化学研究的最新进展,编写了本书。

全书分上、下两篇,共十二章。上篇为乳的化学成分,共七章,主要介绍乳中的蛋白质、脂质、乳糖、酶、维生素、激素和生长因子及无机物质的种类、含量与营养功能;下篇为乳的生物合成,共五章,主要介绍乳腺上皮细胞的结构、乳脂质的生物合成、乳糖的生物合成、乳蛋白质基因结构和乳蛋白质生物合成。在编写内容和取材上,我们作了一些尝试,一是力求做到理论与实际的统一。在兼顾其他种别动物(包括实验动物)的同时,本书以牛乳和人乳生化为阐述的重点,这样对于乳业生产,对于促进母乳的生物学潜力的提高和乳资源的开发利用更有实际意义。二是力求反映乳生物化学的最新进展。乳蛋白质的基因结构是当前乳生物化学中研究热点之一,利用乳腺作为生物反应器制造出更多造福于人类的功能蛋白、激素和药物,已被认为是生物工程中一个很有希望的方向,对于这些问题本书均有所阐述。

撰写本书各章的作者分别是:汪玉松、宋华宾第1章,郑玉才第2章,蔡辉第3章,张永亮第4章,李荣文第5章,赵建军第6章,崔建华第7章,李子义第8章,刘万臣第9章,邹思湘第10章,欧阳红生第11章、第12章。

由于科学技术发展日新月异,文献资料很多,很难全部收集到,加之编写人员学识浅薄,经验不足,致使本书虽经多次讨论、修改和审校,疏漏和错误仍然难免,热忱期望专家、读者批评指正。

编者

1995年7月

目 录

上篇 乳的化学成分	1
第1章 乳中的蛋白质	1
1-1 乳中蛋白质的种类和含量	1
1-2 乳中主要蛋白质的分离纯化和鉴定	4
1-2-1 酪蛋白的分离纯化	5
1-2-2 乳清蛋白质的分离纯化	7
1-2-3 凝胶电泳鉴定	8
1-3 乳蛋白质的遗传变异体	11
1-3-1 乳蛋白质遗传变异体的种类	11
1-3-2 乳蛋白质遗传变异体的理化性质	12
1-3-3 乳蛋白质遗传变异体对生产性能的影响	13
1-4 酪蛋白	17
1-4-1 酪蛋白的组成	17
1-4-2 酪蛋白的结构	17
1-4-3 酪蛋白微团	24
1-5 乳清蛋白质	27
1-5-1 乳清蛋白质的一级结构	28
1-5-2 乳清蛋白质的空间结构	36
1-6 各种动物乳蛋白质的比较	36
1-6-1 乳蛋白质的同源性	36
1-6-2 不同动物同源乳蛋白质组成和序列差异	37
1-7 乳脂肪球膜蛋白质	41
1-8 非蛋白含氮化合物	42
1-9 影响乳蛋白质含量的因素	43
1-9-1 泌乳期对乳蛋白质含量的影响	43
1-9-2 食物对乳蛋白质含量的影响	44
1-9-3 季节对乳蛋白质含量的影响	44
1-9-4 乳房炎对乳蛋白质含量的影响	44
1-10 乳蛋白质的营养功能	45
1-10-1 乳蛋白质营养价值的涵义	45
1-10-2 乳蛋白质营养价值的评价	46
1-10-3 人膳食中的乳蛋白质	48
第2章 乳中的脂质	51
2-1 乳脂的种类 含量和分布	51
2-1-1 乳脂的种类	51
2-1-2 人和动物乳脂的含量	52
2-1-3 乳脂的分布特点	53
2-2 乳脂肪酸的组成	53

2-2-1 乳脂肪酸的种类	53
2-2-2 乳脂中脂肪酸的组成特点	55
2-2-3 必需脂肪酸	57
2-3 乳三酰甘油分子的组成	57
2-3-1 脂肪酸在乳三酰甘油分子中分布的非随机性	57
2-3-2 乳三酰甘油分子的种类	58
2-4 乳类脂的组成	59
2-4-1 磷脂和糖脂	59
2-4-2 固醇类	62
2-5 乳脂肪球	63
2-5-1 乳脂肪球的形态	63
2-5-2 乳脂肪球膜的脂质组成	64
2-5-3 乳脂肪球膜的作用	65
2-6 乳脂的理化性质	65
2-6-1 乳脂的物理性质	65
2-6-2 乳脂的化学性质	66
2-7 影响乳脂组成和含量的因素	66
2-7-1 泌乳期对乳脂的影响	67
2-7-2 季节对乳脂的影响	67
2-7-3 食物对乳脂的影响	68
2-7-4 挤乳对乳脂的影响	69
2-8 乳脂质的功能	70
2-8-1 乳三酰甘油和脂肪酸的营养功能	70
2-8-2 乳类脂的营养功能	72
第3章 乳糖	74
3-1 乳中糖的种类和乳糖含量	74
3-1-1 乳中糖的种类	74
3-1-2 乳糖的含量	76
3-2 乳糖的结构	77
3-3 结晶态乳糖	77
3-3-1 α -乳糖及其水合物	77
3-3-2 不稳定型无水 α -乳糖	77
3-3-3 稳定型无水 α -乳糖	78
3-3-4 β -乳糖	78
3-3-5 α, β -混合型结晶态乳糖	78
3-3-6 非结晶态乳糖	78
3-4 乳糖的理化性质	78
3-4-1 乳糖的物理性质	78
3-4-2 乳糖的化学性质	82
3-5 乳糖衍生物	83
3-5-1 含乳糖基的寡糖	83
3-5-2 乳糖的其他人工衍生物	86
3-6 乳糖的营养功能	90

3-6-1 为生理活动提供能量	90
3-6-2 促进肠道内钙磷等的吸收	90
3-6-3 参与机体组成和细胞活动	90
3-6-4 乳糖消化吸收和不耐乳糖症	90
3-6-5 半乳糖代谢及其毒性	91
第4章 乳中的酶	93
4-1 乳中酶的种类和含量	93
4-2 乳中的氧化还原酶类	94
4-2-1 乳酸脱氢酶	94
4-2-2 黄嘌呤氧化酶	95
4-2-3 过氧化氢酶	96
4-2-4 乳过氧化物酶	96
4-2-5 超氧化物歧化酶	97
4-2-6 巯基氧化酶	97
4-2-7 谷胱甘肽过氧化物酶	98
4-3 乳中的转移酶类	99
4-3-1 γ -谷氨酰转肽酶	99
4-3-2 糖基转移酶	99
4-4 乳中的水解酶类	100
4-4-1 蛋白酶	100
4-4-2 脂酶和酯酶	103
第5章 乳中的维生素	111
5-1 乳中维生素的种类和含量	111
5-1-1 乳中维生素的种类	111
5-1-2 乳中维生素的含量	112
5-2 脂溶性维生素	113
5-2-1 维生素A	113
5-2-2 维生素D	117
5-2-3 维生素E	119
5-2-4 维生素K	121
5-3 水溶性维生素	123
5-3-1 维生素B ₁	123
5-3-2 维生素B ₂	124
5-3-3 维生素PP	126
5-3-4 维生素B ₆	127
5-3-5 泛酸	129
5-3-6 叶酸	130
5-3-7 维生素B ₁₂	131
5-3-8 生物素	132
5-3-9 维生素C	133
第6章 乳中的激素和生长因子	136
6-1 乳中激素和生长因子的种类 含量和生理功能	136
6-1-1 乳中激素和生长因子的种类	136

6-1-2 乳中激素和生长因子的含量	137
6-1-3 乳中激素和生长因子的生理功能	138
6-2 乳中的激素	139
6-2-1 类固醇激素	139
6-2-2 肽类激素和蛋白质激素	140
6-3 乳中的生长因子	144
6-3-1 胰岛素样生长因子	144
6-3-2 上皮生长因子	145
6-3-3 转化生长因子	146
6-3-4 其他生长因子	147
6-4 前列腺素	149
第7章 乳中的无机物质	151
7-1 乳中无机物质的种类和含量	151
7-2 乳中的主要无机物质及营养功能	153
7-2-1 钠 钾 氯	153
7-2-2 钙	154
7-2-3 磷	155
7-2-4 镁	155
7-2-5 硫	156
7-3 乳中的微量元素及营养功能	157
7-3-1 铁	157
7-3-2 铜	158
7-3-3 锌	159
7-3-4 锰	160
7-3-5 硒	160
7-3-6 碘	161
7-3-7 氟	162
7-3-8 钴	162
7-3-9 铬	163
7-3-10 钼	163
7-3-11 乳中其他微量元素	163
7-4 影响乳中无机物质浓度的因素	164
7-4-1 泌乳期的影响	164
7-4-2 季节的影响	165
7-4-3 食物的影响	165
7-4-4 乳房炎的影响	165
7-4-5 乳中无机盐浓度之间的关系	166
7-5 乳牛对矿物质的需要	167
7-5-1 宏量元素的需要	167
7-5-2 微量元素的需要	168
7-6 无机离子的分泌	168
7-6-1 高尔基体途径	168
7-6-2 亚细胞途径	170

下篇 乳的生物合成	171
第 8 章 乳的生物合成场所	171
8-1 乳腺的发生和组织结构	172
8-1-1 乳腺的发生	172
8-1-2 乳腺的组织结构及乳腺的生长发育	173
8-2 乳腺上皮细胞的超微结构及功能	176
8-2-1 胞液	176
8-2-2 线粒体	176
8-2-3 内质网	178
8-2-4 高尔基复合体	181
8-2-5 细胞核	183
第 9 章 乳脂质的生物合成	189
9-1 血脂与乳脂的合成	189
9-1-1 血脂的组成	189
9-1-2 乳腺中血脂的可利用性	190
9-1-3 脂蛋白脂肪酶和三酰甘油的水解	193
9-2 乳三酰甘油的生物合成	195
9-2-1 乳甘油-3-磷酸的合成	195
9-2-2 乳脂肪酸的合成	196
9-2-3 乳腺中脂肪酸的进一步代谢	204
9-2-4 乳三酰甘油的生物合成	206
9-3 磷脂和胆固醇的生物合成	209
9-3-1 磷脂的生物合成	209
9-3-2 胆固醇的生物合成	212
9-4 激素对乳脂肪合成的调节	213
9-5 乳脂的分泌	213
第 10 章 乳糖的生物合成	215
10-1 哺乳动物的糖代谢	215
10-1-1 哺乳动物体内糖代谢的主要途径	215
10-1-2 血糖	218
10-1-3 泌乳期动物乳腺糖代谢的特点	219
10-2 乳糖的生物合成	220
10-2-1 葡萄糖前体	220
10-2-2 乳糖生物合成的途径	220
10-2-3 乳糖合成酶	221
10-2-4 含乳糖寡糖的生成	223
10-3 葡萄糖在乳糖生物合成中的可利用性	224
10-3-1 乳腺的血流量	224
10-3-2 葡萄糖浓度	224
10-4 乳糖合成的调节	227
10-4-1 α -乳清蛋白的调节	227
10-4-2 底物的调节	227
10-5 乳糖的分泌	229

10-5-1 高尔基体膜的通透性	229
10-5-2 乳糖与乳蛋白分泌的关系	230
第 11 章 乳蛋白质基因	233
11-1 DNA 的组成与结构	233
11-1-1 核酸的组成	233
11-1-2 DNA 一级结构	233
11-1-3 DNA 二级结构	234
11-1-4 DNA 三级结构	234
11-2 乳蛋白质基因的结构特点	235
11-3 酪蛋白基因的结构	235
11-3-1 α_{S1} -酪蛋白基因	236
11-3-2 α_{S2} -酪蛋白基因	244
11-3-3 β -酪蛋白基因	251
11-3-4 钙敏感酪蛋白的进化	259
11-3-5 κ -酪蛋白	259
11-4 乳清蛋白质的基因结构	260
11-4-1 α -乳清蛋白	260
11-4-2 β -乳球蛋白	265
11-4-3 乳转铁蛋白	267
11-4-4 乳清酸蛋白	268
11-5 乳蛋白质基因工程	270
11-5-1 基因工程的一般原理	270
11-5-2 乳蛋白质基因的克隆与表达	273
11-5-3 转基因动物的乳腺表达	274
第 12 章 乳蛋白质的生物合成	278
12-1 RNA 在乳蛋白质生物合成中的作用	278
12-1-1 乳蛋白质 mRNA 的合成	278
12-1-2 乳蛋白质 mRNA 的作用	281
12-1-3 tRNA 的作用	287
12-1-4 rRNA 及核糖体	288
12-2 乳蛋白质生物合成过程	288
12-2-1 氨基酸的活化与转运	288
12-2-2 合成起始	289
12-2-3 肽链延长	291
12-2-4 合成终止	291
12-2-5 蛋白质生物合成的抑制剂	291
12-2-6 乳蛋白质的转运	291
12-2-7 乳蛋白质翻译后加工	293
12-3 乳蛋白质生物合成的调节	298
12-3-1 乳蛋白质基因表达调控序列	298
12-3-2 激素的调节	300
名词索引	302

上篇 乳的化学成分

在人和哺乳类动物乳中含有水分、蛋白质和非蛋白含氮化合物、脂质、糖类、无机物质、维生素、酶类、激素和生长因子、有机酸以及气体等化学成分。乳中存在酪蛋白、 α -乳清蛋白、乳糖及脂肪球等重要的生化特征。

不同种类的动物，乳中各成分的含量有很大差异。同一地区不同品种的动物或不同地区同一品种的动物，乳中各成分含量亦有所不同。动物乳中成分的变动还受泌乳期、季节、食物成分、营养水平、健康状况以及挤乳过程等的影响。在某些疾病过程中，乳中部分成分也发生变化。

本篇将讨论乳中主要成分的种类、含量、性质、营养功能和免疫功能以及各种因素(如泌乳期等)对乳成分的影响，并着重对牛乳与人乳进行比较。

第 1 章 乳中的蛋白质

1-1 乳中蛋白质的种类和含量

乳中蛋白质的种类较多，含量丰富，分布广泛，是乳的主要成分。哺乳动物乳中蛋白质主要由酪蛋白(Casein)和乳清蛋白质(Whey protein)组成。此外还有乳脂肪球膜(Milk fat globule membrane, MFGM)蛋白质。乳中酪蛋白有 α_s -酪蛋白(α_s -Casein, α_s -CN)、 β -酪蛋白(β -Casein, β -CN)、 κ -酪蛋白(κ -Casein, κ -CN)和 γ -酪蛋白(γ -Casein, γ -CN)四种类型。 γ -酪蛋白实际上是乳中蛋白酶分解 β -酪蛋白的产物，故乳中酪蛋白主要类型应是前三种。乳清蛋白质包括 β -乳球蛋白(β -Lactoglobulin, β -LG)、 α -乳清蛋白(α -Lactalbumin, α -LA)、血清清蛋白(Serum albumin, SA)、免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)、乳铁蛋白(Lactoferrin, Lf)、转铁蛋白(Transferrin, Tf)、 β_2 -微球蛋白(β_2 -Microglobulin, β_2 -M)、乳清酸蛋白(Whey acidic protein, WAP)和溶菌酶(Lysozyme)等。

各种动物乳中蛋白质含量有明显差异。从表 1-1 看出，总蛋白质含量为 1.2%~14.5%，含量高的有黑熊(14.5%)、海狮(13.6%)、麋鹿(13.5%)和海狸鼠(13.7%)等动物；含量低的有人(1.4%)和黑猩猩(1.2%)、犀牛(1.5%)、驴(1.3%)、骡(2.0%)等动物。一般来说，在动物发育阶段，母乳中总蛋白质的含量较高。兔、大鼠等生长速度较快的动物，母乳中蛋白质含量较高，但生长速度与乳蛋白质含量之间并不都呈正相关。

表 1-1 人和各种动物乳中总蛋白质含量(%)

类 别	含量	类 别	含量
人(Human)	1.4	豚鼠(Guinea pig)	8.1
羚羊(Antelope)		仓鼠(Hamster)	9.0
黑羚羊(Black buck)	6.9	马(Horse)	2.4
非洲旋角大羚羊(Eland)	6.8	大袋鼠(Kangaroo)	7.9
瞪羚(Gazelle)	11.1	豹(Leopard)	11.1
叉角羚羊(Pronghorn)	6.9	狮子(Lion)	12.5
驴(Ass, Donkey)	1.8	美洲驼(Llama)	3.9
熊(Bear)		貂(Mink)	7.0
黑熊(Black bear)	14.5	恒河猴(Macaca mulatta, 猕猴)	2.1
灰棕熊(Grizzly bear)	11.1	麋(Moose, 麋鹿)	13.5
北极熊(Polar bear)	10.9	小鼠(Mouse)	9.0
水牛(Buffalo)		骡(mule)	2.0
中国水牛(Chinese buffalo)	6.0	麝牛(Musk ox)	5.3
埃及水牛(Egyptian buffalo)	4.3	海狸鼠(Nutria, Coypu)	13.7
菲律宾水牛(Philippine buffalo)	5.9	负鼠(Opossum)	9.2
骆驼(Camel)	3.5	豪猪(Porcupine)	12.4
猫(Cat)	10.1	美洲狮(Puma)	12.0
牛(Cattle)		兔(Rabbit)	10.4
艾尔夏牛(Ayrshire)	3.6	大鼠(Rat)	9.7
瑞士褐牛(Brown Swiss)	3.6	驯鹿(Reindeer)	10.0
格恩西牛(Guernsey)	3.8	犀牛(Rhinoceros)	1.5
荷兰乳牛(Holstein)	3.1	海狮(Sea lion, 海驴, 加利福尼亚)	13.6
泽西乳牛(Jersey)	3.9	海豹(Seal)	
短角牛(Shorthorn)	3.3	灰海豹(Gray seal)	11.2
瘤牛(Zebu)	3.9	爱尔兰海豹(Harp seal)	10.4
黑猩猩(Chimpanzee)	1.2	绵羊(Sheep)	6.8
灰鼠(Chinchilla, 栗鼠)	8.0	灰松鼠(Squirrel)	9.2
鹿(Deer)	10.4	猪(Swine)	5.9
犬(Dog)	9.3	鲸(Whale)	12.2
海豚(Dolphin)	10.9	狼(Wolf, 欧洲)	9.2
象(Elephant)	4.2	牦牛(Yak)	5.2
长颈鹿(Giraffe)	5.8	斑马(Zebra)	3.0
山羊(Goat)	3.1		

各种动物乳中酪蛋白和乳清蛋白质含量明显不同(表 1-2)。乳中酪蛋白含量为 0.4%~9.5%，乳清蛋白质含量为 0.5%~5.7%。反刍动物乳中酪蛋白含量很高，人和驴、马等动物则含量低。反刍动物乳中蛋白质的 75% 以上为酪蛋白，而人和马等动物则只占 35% 左右。

表 1-2 人和各种动物乳中酪蛋白和乳清蛋白质含量(%)

类 别	酪蛋白	乳清蛋白质	类 别	酪蛋白	乳清蛋白质
人	0.4	0.5	瘤牛	2.6	0.6
驴	1.0	1.0	海豚	3.9	2.9
土豚	9.5	4.8	黑熊	8.8	5.7
印度象	1.9	3.0	兔	9.3	4.6
牛	2.6	0.6	山羊	2.6	0.6
大鼠	6.4	2.0	水牛	3.2	0.6
灰松鼠	5.0	2.4	驯鹿	8.6	1.5
毛海豹(海狗)	4.6	4.3	豚鼠	6.6	1.5
绵羊	3.9	0.7	骆驼	2.7	0.9
马	1.3	1.2	猪	2.8	2.0
犬	5.1	2.3			

从牛乳和人乳中蛋白质的比较看出,牛乳的总蛋白质、酪蛋白和 α_s -酪蛋白含量很高,而人乳 β -酪蛋白和 α -乳清蛋白含量都很高。各酪蛋白占总酪蛋白的百分率不同。如牛乳 α_s -酪蛋白占总酪蛋白的 38.2%, β -酪蛋白占 28.2%, κ -酪蛋白占 10.0%, γ -酪蛋白占 2.4%; 人乳 α -酪蛋白约占总酪蛋白的 10%, β -酪蛋白约占 60%, κ -酪蛋白约占 30%。在牛乳清蛋白质中, β -乳球蛋白含量最丰富(9.7%), 而人乳则 α -乳清蛋白含量最高(26%), 未发现 β -乳球蛋白(表 1-3)。牛乳和人乳中蛋白质的氨基酸组成未见差异, 其含量亦未见明显不同(表 1-4)。

表 1-3 牛乳和人乳中蛋白质种类和含量 g/L(%)

蛋白质	牛 乳		人 乳	
总蛋白质	33.0	(100.0)	10.0	(100.0)
酪蛋白	26.0	(78.8)	3.2	(32.0)
α_s -酪蛋白	12.6	(38.2)	α - 约 10%	
β -酪蛋白	9.3	(28.2)	β - 约 60%	
κ -酪蛋白	3.3	(10.0)	κ - 约 30%	
γ -酪蛋白	0.8	(2.4)		
乳清蛋白质	7.0	(21.2)	6.8	(68.0)
β -乳球蛋白	3.2	(9.7)	0.0	(0.0)
α -乳清蛋白	1.2	(3.6)	2.8	(26.0)
血清清蛋白	0.4	(1.2)	0.6	(6.0)
免疫球蛋白	0.7	(2.1)	1.0	(10.0)
乳铁蛋白	微 量		1.5	(15.0)
溶菌酶	微 量		0.4	(4.0)
其他蛋白质	1.5	(4.6)	0.5	(5.0)

表 1-4 牛乳和人乳中蛋白质的氨基酸组成和含量(总氮量 1g 中的 g 数)

氨基酸	牛 乳	人 乳
丙氨酸 (Alanine, Ala, A)	0.24	0.25
精氨酸 (Arginine, Arg, R)	0.25	0.23
天冬氨酸 (Aspartic acid, Asp, D)	0.53	0.53
胱氨酸 (Cystine, Cys-scy)	0.06	0.12
谷氨酸 (Glutamic acid, Glu, E)	1.44	1.08
甘氨酸 (Glycine, Gly, G)	0.14	0.15
组氨酸 (Histidine, His, H)	0.10	0.15
异亮氨酸 (Isoleucine, Ile, I)	0.35	0.32
亮氨酸 (Leucine, Leu, L)	0.64	0.58
赖氨酸 (Lysine, Lys, K)	0.51	0.43
甲硫氨酸 (Methionine, Met, M)	0.18	0.09
苯丙氨酸 (Phenylalanine, Phe, F)	0.34	0.23
脯氨酸 (Proline, Pro, P)	0.59	0.58
丝氨酸 (Serine, Ser, S)	0.57	0.26
苏氨酸 (Threonine, Thr, T)	0.31	0.28
色氨酸 (Tryptophan, Trp, W)	0.09	0.14
酪氨酸 (Tyrosine, Tyr, Y)	0.28	0.18
缬氨酸 (Valine, Val, V)	0.43	0.42

1-2 乳中主要蛋白质的分离纯化和鉴定

蛋白质的分离纯化可根据蛋白质分子的大小、电荷量、溶解度以及与亲和性结合部位的有无,建立许多分离纯化的方法。常用的有离心分离、等电点 (Isoelectric point) 沉淀、盐析法、透析法、有机溶剂沉淀法、超滤法、层析法和电泳法等。这些分离纯化蛋白质的方法各有利弊。在乳蛋白质分离纯化实际工作中,可根据具体情况,选择适合的方法。一般来说,利用溶解度的不同来分离蛋白质是分离纯化的最初阶段,即粗分离。层析、电泳等方法,多用在最后阶段,或进一步纯化时使用。

盐析 (Salting out) 是分离乳蛋白质的基本方法;层析 (Chromatography) 法常用于纯化乳蛋白质,特别是离子交换层析 (Ion exchange chromatography) 最为常用。近年来发展起来的高效液相层析 (High performance liquid chromatography, HPLC) 技术和快速蛋白液相层析 (Fast protein liquid chromatography, FPLC) 技术,有易于操作、利于分离及效率高等特点,因而是纯化乳蛋白质的一种较好的技术。

由于乳中的蛋白质分子有很强的缔合现象 (Association),在分离纯化中常添加尿素,使原来难溶于水的蛋白质,在尿素作用下分离为亚基 (Subunit),卷曲的肽链展开而溶解,或根据乳中各蛋白质在尿素中的不同溶解度,达到分离纯化的目的。为了防止乳蛋白质多肽链中二硫键的生成,缓冲液中还需加入 2-巯基乙醇 (2-Mercaptoethanol) 等,以保护半胱氨酸不被氧化。

在乳蛋白质提纯过程中,要知道每一步的提纯效果,必须测定其蛋白质含量。乳蛋白质含量可根据其物理、化学性质进行测定。

乳蛋白质经过分离提纯以后,需要鉴定其纯度,以决定是否有进一步纯化的必要。但乳蛋白质分子量大,结构复杂,即使使用各种仪器和技术,有时也很难达到需要的纯度。电泳法是一种鉴定乳蛋白质纯度的常用方法,特别是各种聚丙烯酰胺凝胶电泳,既能用于鉴定,又能制备样品,是目前在乳蛋白质分离纯化、鉴定中常用的一种方法。

1-2-1 酪蛋白的分离纯化

1-2-1-1 酪蛋白的粗分离

1. 全酪蛋白的分离

全酪蛋白是指乳中全部的酪蛋白。为了分离酪蛋白各组分及其他成分,往往从乳中先分离出全酪蛋白。其分离通常用等电点沉淀的方法,即用 HCl 调节脱脂乳(Skim milk) pH 到 4.6, 20℃,全酪蛋白沉淀;或调节脱脂乳到 0.07 mol/L CaCl_2 , pH 6.6~6.8, 45 000×g 离心 90 min, 37℃,得到微团(Micelle)沉淀物。全酪蛋白可从酸化的 6.6 mol/L 尿素中进一步分级分离为全 α -酪蛋白(包括 α_s -酪蛋白、 κ -酪蛋白和 λ -酪蛋白混合物)、 β -酪蛋白和全 γ -酪蛋白,即将酸化的 6.6 mol/L 尿素全酪蛋白溶液稀释到 4.63 mol/L,全 α -酪蛋白沉淀;将上清液稀释为 1.7 mol/L 尿素,并调节 pH 为 4.7, β -酪蛋白沉淀;在最后的上清液中添加硫酸铵,则 γ -酪蛋白(γ_1 -酪蛋白、 γ_2 -酪蛋白、 γ_3 -酪蛋白)沉淀。

2. α_s -酪蛋白的分离

向含 6.6 mol/L 尿素的全 α -酪蛋白溶液中添加 12% 三氯乙酸或硫酸,调 pH 至 1.3~1.5, 尿素浓度至 2.2 mol/L, α_s -酪蛋白沉淀。全 α -酪蛋白在 0.4 mol/L CaCl_2 , pH 7.0, 0~4℃, α_s -酪蛋白沉淀。沉淀组成成分包括 α_{s0} -酪蛋白、 α_{s1} -酪蛋白、 α_{s2} -酪蛋白、 α_{s3} -酪蛋白、 α_{s4} -酪蛋白和 α_{s6} -酪蛋白。

3. β -酪蛋白的分离

β -酪蛋白溶于 6.6 mol/L 尿素,但在 pH 4.6,不溶于 1.7 mol/L 尿素。在低钙浓度(0.01~0.03 mol/L)时,温度可影响其溶解度,4℃即可溶解。

4. κ -酪蛋白的分离

κ -酪蛋白是乳中全酪蛋白在 pH 7.0, 37℃, 0.25 mol/L CaCl_2 中可以溶解的组分的主要成分;是全 α -酪蛋白在 pH 7.0, 0~4℃, 0.4 mol/L CaCl_2 中的溶解部分;是乳中唯一能使 α_s -酪蛋白对 0.02 mol/L CaCl_2 保持稳定而不沉淀的蛋白质。

不同浓度的乙醇,可用于分级分离酪蛋白。用 50%(V/V)乙醇,并用乙酸铵调节 pH 为 7.2, κ -酪蛋白沉淀。但在分离中应注意低温条件,并尽量缩短分离时间,以避免蛋白质变性。

5. 全 γ -酪蛋白的分离

全 γ -酪蛋白包括 γ_1 -酪蛋白、 γ_2 -酪蛋白和 γ_3 -酪蛋白,是全酪蛋白在 3.3 mol/L 尿素中的可溶部分,但在 1.7 mol/L 尿素, pH 4.7, 添加硫酸铵可使其沉淀。

1-2-1-2 酪蛋白的分离纯化

尿素-DEAE-纤维素阴离子交换层析,是全酪蛋白分级分离纯化的极好方法之一。样品在 pH 7.0, 0.01 mol/L 咪唑-4.5 mol/L 尿素缓冲液中,用 0~0.6 mol/L NaCl 梯度洗脱(Gradient elution),得到粗 α_{s1} -酪蛋白或 β -酪蛋白。

实验中应用2-巯基乙醇,使 κ -酪蛋白分子中的二硫键还原,破坏了其与 β -酪蛋白分子之间的缔合,层析效果很好。例如全酪蛋白采用 DEAE-纤维素离子交换层析,在含有2-巯基乙醇的0.01 mol/L 咪唑-3.3 mol/L 尿素,pH7.0的缓冲液中,用0~0.3 mol/L NaCl 梯度洗脱,可将 γ -酪蛋白、 κ -酪蛋白、 β -酪蛋白、 α_{S2} -酪蛋白和 α_{S1} -酪蛋白依次洗脱下来。

由于 κ -酪蛋白翻译后加工(修饰),结合有不同量电荷的唾液酸残基, κ -酪蛋白的分离是一个特殊问题。但是应用氰酸盐与赖氨酰残基的羧甲酰化作用(Carbamylation),以及应用尿素-硫酸的强酸对唾液酸残基的水解作用,通过浓尿素的直接作用,能对 κ -酪蛋白的残基进行修饰,如此纯化 κ -酪蛋白还是可行的。另外,通过减少硫酸的用量,可以改进分离 κ -酪蛋白的分离效果。采用离子交换层析分离 κ -酪蛋白各组分最好应用 κ -酪蛋白的粗制品,各组分按净电荷顺序洗脱下来,缺乏糖基的分子首先洗脱。

在 DEAE-纤维素阴离子交换层析中,应用含有20% (V/V) 二甲基甲酰胺(Dimethylformamide)的缓冲液,层析结果与尿素的结果类似。

除离子交换层析以外,还有几种分离纯化 κ -酪蛋白、 κ -酪蛋白混合物以及少量 α_S -酪蛋白的方法。例如应用凝胶过滤(Gel filtration),将全酪蛋白在 Sephadex G-150,pH8.6,含有6 mol/L 尿素的 Tris-柠檬酸盐缓冲液中,未还原的 κ -酪蛋白出现在水外体积(Void volume)中,可直接分离得到较纯的 κ -酪蛋白。

已建立了两种分离纯化 κ -酪蛋白的亲和层析(Affinity chromatography)方法。因为当全酪蛋白还原时,只有 κ -酪蛋白和 α_{S2} -酪蛋白含有巯基,这些蛋白质用 Thiol-Sepharose 柱,在 pH7.0 尿素中,通过共价层析(Covalent chromatography),能从其他酪蛋白中分出,得到有效的分离。离子交换层析足以将 κ -酪蛋白和少量 α_S -酪蛋白分开。

在无尿素存在的条件下, γ -酪蛋白能通过 DEAE-纤维素层析分离。结合在柱上的全酪蛋白用5 mmol/L 磷酸钠缓冲液,pH8.3洗脱,除去 γ_2 -酪蛋白、 γ_3 -酪蛋白混合物。再将磷酸盐缓冲液调整到20 mmol/L,pH8.3,则 γ_1 -酪蛋白洗脱。此方法应用于 γ_1 -酪蛋白的纯化。

近年来采用阳离子交换快速蛋白液相层析,应用 Mono S HR5/5层析柱,尿素-乙酸盐缓冲液,pH5.0,0~0.26 mol/L NaCl 梯度洗脱,能将牛乳全酪蛋白分离纯化为 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、 α_{S1} -酪蛋白和 α_{S2} -酪蛋白组分,以及 γ -酪蛋白和某些未知峰(图1-1)。

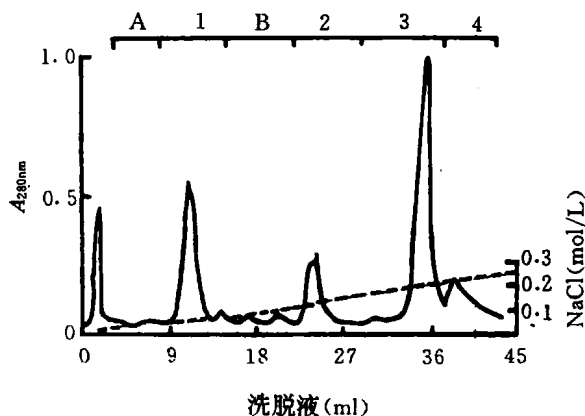


图1-1 牛乳全酪蛋白快速蛋白液相层析图谱

1. β -酪蛋白; 2. κ -酪蛋白; 3. α_{S1} -酪蛋白; 4. α_{S2} -酪蛋白; A. 未知峰; B. 可能是 γ -酪蛋白或未知峰。