

# 离子交换树脂法规模化生产乳源酪蛋白糖巨肽及其对流感病毒的血凝抑制活性

Large-scale production of milk source CGMP by ion exchange resin method and its hemagglutination inhibitory activity against influenza virus

汪清美<sup>1</sup> 刘小雨<sup>2</sup> 陈庆森<sup>2</sup> 赵培<sup>2</sup> 闫亚丽<sup>2</sup>

WANG Qingmei<sup>1</sup> LIU Xiaoyu<sup>2</sup> CHEN Qingsen<sup>2</sup> ZHAO Pei<sup>2</sup> YAN Yali<sup>2</sup>

(1. 信阳农林学院药学院, 河南 信阳 464000; 2. 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

(1. College of Pharmacy, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang, Henan 464000, China;

2. College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

**摘要:**目的:优化规模化生产乳源酪蛋白糖巨肽(CGMP)的工艺条件,并探讨其对流感病毒的血凝抑制能力。方法:以阴离子交换树脂为分离介质,唾液酸含量为产品的活性检测指标,分别从上样体积、上样流量、洗脱液浓度、洗脱液体积和树脂使用周期 5 个工艺条件,在前期小试和中试的基础上,考察从乳清粉中规模化生产 CGMP;同时利用血球凝集抑制试验验证产品 CGMP 对流感病毒的抑制活性。结果:优化的 CGMP 产品技术路线为上样体积 3BV、上样流量 0.8 L/min、洗脱体积 1BV、洗脱液浓度 0.6 mol/L、树脂适宜使用周期 4 次。该工艺条件下处理乳清粉溶液体积为 108 L(2 160 g)、树脂 36 L,得到 CGMP 产品 21.183 g,得率为 0.981 g/100 g,产品纯度为 89.032%,回收率为 51.972%,唾液酸含量为 21.503 g/100 g,蛋白 CGMP 产品对流感病毒 A(H1N1)和流感病毒 B 的最低抑制质量浓度分别为 1.000 0、1.250 0 mg/mL。结论:利用优化的技术路线生产获得 CGMP 产品的纯度和唾液酸含量均优于市售商品 CGMP,且对流感病毒有明显的抑制作用。

**关键词:**酪蛋白糖巨肽;规模化生产;阴离子交换树脂;工艺优化;唾液酸;流感病毒;血球凝集抑制

**Abstract: Objective:** This study aimed to optimize the process conditions for the large-scale production of milk-derived casein glycomacropeptide (CGMP) and explore its hemagglutination inhibition (HI) ability against influenza virus. **Methods:** Using

anion exchange resin as the separation medium and sialic acid content the activity detection index of the product, based on the preliminary small and medium-sized tests, the large-scale production of CGMP from whey powder was investigated from five process conditions: sample volume, loading flow, eluent concentration, eluent volume, and resin service cycle. Meanwhile, a hemagglutination inhibition test was used to verify the inhibitory activity of the product CGMP against the influenza virus. **Results:** The optimized technical route of CGMP product is as follows: loading volume 3BV, loading flow 0.8 L/min, elution volume 1BV, eluent concentration 0.6 mol/L, and suitable use cycle of resin 4 times. Under these conditions, the volume of whey powder solution was 108 L (2 160 g) and the resin was 36 L, and 21.183 g of CGMP product was obtained, with a yield of 0.981 g/100 g, the product purity of 89.032%, the recovery rate of 51.972% and the sialic acid content of 21.503 g/100 g. The minimum inhibitory concentration of CGMP products on influenza virus A (H1N1) and influenza virus B is 1.000 0 and 1.250 0 mg/mL, respectively. **Conclusion:** The purity and sialic acid content of CGMP produced by the optimized technical route were better than those of commercial CGMP, and had an obvious inhibitory effect on the influenza virus. **Keywords:** casein glycomacropeptide; scale production; anion exchange resin; optimized process; sialic acid; influenza virus; hemagglutination inhibition (HI)

作为一种生物活性肽,酪蛋白糖巨肽(casein glycomacropeptide, CGMP)在市场上的开发度远未达到公众的期望值。目前关于 CGMP 分离纯化工艺的研究已见报道<sup>[1-3]</sup>,但国内外有关具有规模化生产 CGMP 的研究报道甚少,生产规模也十分有限。面对 CGMP 的多种生物活性不断地被发现,人们对 CGMP 的需求日益增多,

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31071522)

作者简介:汪清美,女,信阳农林学院讲师,硕士。

通信作者:陈庆森(1957—),男,天津商业大学教授,硕士。

E-mail: chenqs1689@163.com

收稿日期:2024-01-03 改回日期:2024-05-01

寻找一种适合规模化生产 CGMP 的工艺路线则成为亟待解决的问题。当前主要采用酶交联法、层析法、沉淀法、超滤法和双水相法等制备 CGMP,其中沉淀法<sup>[4]</sup>和酶交联法操作方便,但规模生产存在问题,且纯度较低,产物为生物活性尚不明确的交联物<sup>[5]</sup>;双水相法在工业化生产过程中会对水资源造成一定的浪费,并且所得到的 CGMP 在纯度上也低<sup>[6]</sup>;超滤法在加工过程中稀释乳清也需消耗大量的水和能量<sup>[7]</sup>。

乳源 CGMP 中的唾液酸在流感病毒感染过程中充当竞争者的角色,它同人细胞表面的唾液酸受体竞争与流感病毒结合,从而间接抑制了人细胞同流感病毒的结合。如果 CGMP 失去唾液酸则不能抑制红细胞凝集<sup>[8]</sup>,同时失去预防流感病毒感染的功效<sup>[9-10]</sup>。Wang 等<sup>[11]</sup>使用血清素—磁性颗粒偶联物从牛乳中分离唾液酸糖蛋白,也证实分离的蛋白质具有抑制甲型流感病毒(IAV)模拟物附着于 MDCK 细胞的能力,当唾液酸部分被破坏时,抑制作用消失。乳清中含有作为 CGMP 特征指示物的唾液酸,其中约有 80% 聚集在甜乳清中的 CGMP 上<sup>[12]</sup>,因此获得高含量的唾液酸是 CGMP 生产的关键指标之一。

研究拟在前期小试和中试的基础上,采用阴离子交换树脂为介质,唾液酸含量作为 CGMP 分离纯化的活性指标,乳清粉为原料,从上样体积、上样流量、洗脱液浓度、洗脱液体积以及树脂使用周期 5 个工艺指标考察规模化生产 CGMP 的效果(唾液酸含量、纯度、得率等),以获得适合工业规模生产且保持较高水平的产品纯度和唾液酸含量的 CGMP 工艺条件;同时,验证 CGMP 对流感病毒的抑制作用,以期利用乳源活性物质预防流感病毒提供理论支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

流感病毒 A/天津河西/SWL181/2014(H1)、流感病毒 B/天津河西/1281/2014;天津市疾病预防控制中心;

MDCK 细胞株;狗肾细胞,北京协和医院;

商品 CGMP;新西兰 Tatura Dairy Co-operative 公司;

CGMP 标准品、 $\alpha$ -乳白蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、牛血清白蛋白;美国 Sigma 公司;

乙腈;色谱纯,天津华生源科技有限公司;

脱盐乳清粉;芬兰维利奥有限公司;

强碱性苯乙烯系阴离子交换树脂;天津南开和成科技有限公司;

唾液酸测定试剂盒;南京建成生物工程研究所。

### 1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计;UV-752 型,上海欣茂仪器有限公司;

阴离子交换树脂;201 $\times$ 4 型,天津南开和成科技有限

公司;

有机玻璃交换柱;20 cm $\times$ 170 cm 型,保定天佑水处理设备有限公司;

高效液相色谱仪;2010c 系列,日本岛津公司;

高速冷冻离心机;5810R 型,德国 Eppendorf 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 乳清粉溶液配制及预处理 称取一定量(根据每批次用量而定)的乳清粉,溶解于 0.02 mol/L 的乙酸钠溶液中,配制质量浓度为 100 mg/mL 的乳清粉溶液;用冰乙酸调至 pH 5.1,静置过夜沉淀杂蛋白,虹吸法吸取上清液,下层混浊液 1 700 r/min 离心 25 min 取上清液,与之前收集到的上清液混合。

1.3.2 树脂转型处理 参照文献<sup>[13]</sup>。

1.3.3 洗脱液收集时间的确定 将经过除杂预处理后的乳清粉溶液调成质量浓度为 0.02 g/mL、pH 为 3.9,上交换柱子并控制流量 0.8 L/min,待样品全部进入交换柱中后加入 1 倍树脂体积(1BV)的乙酸钠缓冲液对树脂进行洗涤,清洗完成后通入不同浓度的 NaCl 溶液对吸附到树脂上的 CGMP 进行洗脱,在有效时间段内收集洗脱液进行检测。在洗脱液通过树脂约 1/3 处时开始收集流出液,以 2 L 为一桶共收集 24 桶即 48 L,分别测定各桶收集液的蛋白质质量浓度、唾液酸质量浓度以及 CGMP 纯度,从而确定收集洗脱液的时间范围。

1.3.4 动态阴离子交换法规模化制备 CGMP 工艺条件优化 在确定适宜的洗脱液收集时间段后,以 CGMP 产品的得率、纯度、蛋白质含量和唾液酸含量等为指标,进行单因素试验。固定上样流量 0.8 L/min,洗脱液浓度 0.6 mol/L,洗脱液体积 1BV,上样体积 3BV,上柱、收集、洗脱、测定,考察上样体积(2BV,3BV,4BV)、上样流量(0.5,0.8,1.0 L/min)、洗脱液浓度(0.4,0.6,0.8 mol/L)、洗脱液体积(1.0BV,1.5BV,2.0BV)对制备 CGMP 效果的影响。

取 5 次不同批次分离制备 CGMP 的离子交换树脂离心后烘干,测定交换容量(按 GB/T 5760—1986 执行)和含水量(按 GB/T 5759—2000 执行)。

1.3.5 CGMP 收集液的超滤、冷冻及干燥 先用自来水正反冲洗截留相对分子质量为 6 000 的超滤膜 15 min,再用蒸馏水冲洗 20 min,采用空气泵排除残留水 3 min。CGMP 收集液在 0.06 MPa 的条件下脱盐超滤至原液体体积的 1/8,脱盐超滤后的 CGMP 用蒸馏水洗涤几次,置 -20  $^{\circ}$ C 冰箱完全冻结,之后进行真空冷冻干燥(冷阱温度 -40  $^{\circ}$ C,真空度 30 Pa)。

1.3.6 CGMP 制备过程中各指标的检测方法

(1) CGMP 含量:采用高效液相色谱仪测定,检测条件见文献<sup>[13]</sup>。其中线性关系试验:配制质量浓度为

1.5 mg/mL 的 CGMP 纯品溶液后,依次吸取 5,10,15,20  $\mu\text{L}$  进样分析,根据测定的峰面积作 CGMP 的线性关系曲线。

(2) 唾液酸含量:按唾液酸测定试剂盒检测。

(3) CGMP 纯度:采用  $\text{OD}_{280\text{ nm}}/\text{OD}_{210\text{ nm}}$  的值粗略估算待测样品中 CGMP 的纯度,该值越小则表示 CGMP 越纯,精确 CGMP 纯度计算方法参照文献[14]。

(4) 蛋白质含量:参照文献[15]。

1.3.7 制备 CGMP 最佳工艺条件验证 根据 1.3.4 试验结果建立一条可生产高纯度、高唾液酸含量的 CGMP 产品的工艺路线,处理乳清粉溶液体积 108 L、树脂 36 L,检测此工艺条件下制备的 CGMP 产品的得率、纯度、回收率、唾液酸含量。

1.3.8 制备 CGMP 产品对流感病毒的血球凝集抑制 (hemagglutination inhibition, HI) 试验 该部分检验和研究工作与天津市疾病预防控制中心合作实施完成。

(1) 流感病毒活力测定:病毒活力的检测采用血凝试验来表示其效价。将流感病毒 A 接种于 MDCK 细胞上,于孵化箱内孵化 72 h 后收获,收集细胞液,测定血凝。具体方法:分别在 10 个孔加入 0.05 mL 生理盐水(0.9%),然后将 0.05 mL 细胞液加入第 1 孔(病毒稀释度为 1:2),反复抽动然后吸出 0.05 mL 加入第 2 孔(病毒稀释度为 1:4),以此类推,直到将第 9 孔稀释完成后从中吸出 0.05 mL 细胞液弃去,其中将第 10 孔的红血球作为对照,即不加细胞液。表 1 为各孔(1~10)的病毒稀释度。

表 1 流感病毒稀释度

Table 1 The dilutability of influenza virus

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
稀释度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	空白对照

按照从右到左的顺序向各孔中加入 0.05 mL 的 1% 人 O 型血红细胞悬液,振荡后静置 20 min 以观察红细胞的形态。当全部红细胞都出现凝集现象并且呈网状平铺于孔底部,即为 100%凝集,记为(++++) ;当红细胞虽然均匀地在孔底分布,但出现了卷边现象,则为不完全凝集,记为(+++);在红细胞四周形成环形沉积或者中心出现凝集,记为(++),不凝集的红细胞以小团的形态位于板底且边缘呈光滑状态,以(-)表示。

同样方法测定流感病毒 B 的活力。

(2) 流感病毒 A 的血凝抑制试验:分别将商品 CGMP(0.0116 g)、方法 1.3.5 制备的 CGMP 产品 1(0.0120 g)和 CGMP 产品 2(0.0276 g)配制质量浓度为 10.0000 mg/mL 的溶液,其中,CGMP 产品 1 中 CGMP 纯度高于 CGMP 产品 2,CGMP 产品 2 中唾液酸含量高于 CGMP 产品 1,并从  $10^1 \sim 10^{-5}$  mg/mL 范围内倍比稀释成 6 个质量浓度梯度,然后将病毒溶液配制成为 4 倍血凝效价浓度,在 96 孔 U 型板做 3 列,每孔 25  $\mu\text{L}$  不同质量浓度 CGMP 和 25  $\mu\text{L}$  4 倍血凝效价浓度的病毒溶液,混匀后在室温条件下孵育 30 min,同时做回滴试验;再加入 50  $\mu\text{L}$  1% 人 O 型血红细胞溶液,混匀,50~60 min 观察结果,以(+)和(-)表示血凝抑制试验的结果。

(3) 流感病毒 B 的血凝抑制试验:分别将商品 CGMP、CGMP 产品 1 以及 CGMP 产品 2 均配制成质量浓度为 10.0000 mg/mL 的溶液,并依次倍比稀释成 10.0000~0.3125 mg/mL 的 6 个质量浓度,按照 1.3.8 (2) 中的方法检测其对流感病毒 B 的血凝抑制作用。

1.3.9 统计学分析 使用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行分析,结果以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm S$ )表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 高效液相色谱法检测 CGMP 含量

CGMP 纯品的色谱图如图 1 所示,CGMP 的保留时间为 17.341 min。由于 CGMP 相对分子质量(7 000)较小,能够进入分离介质的孔状结构中,所以与其他乳清蛋白相比出峰晚、保留时间长。

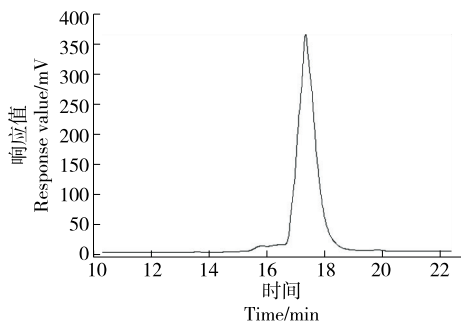


图 1 CGMP 标准品的色谱图

Figure 1 Chromatogram of CGMP standard product (205 nm)

将不同浓度的 CGMP 溶液进样检测峰面积,并以进样量为横坐标、峰面积为纵坐标作 CGMP 线性关系曲线如图 2 所示,得到回归方程  $y = 801\ 217x - 58\ 333$ ,  $R^2 = 0.999\ 9$ ,结果表明 CGMP 进样量在 5~20  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好。

### 2.2 洗脱液收集时间的确定

按照 1.3.3 所述方法以及前期的工作基础<sup>[13]</sup>,通过收集体积,确定洗脱液收集时间范围。由表 2 可知,各时间段收集的洗脱液中的蛋白质质量浓度在前期逐渐升高,

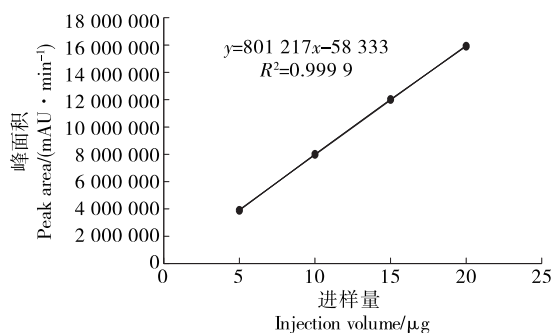


图2 标准品CGMP的线性关系曲线

Figure 2 Linear relationship curve of standard CGMP

且在第6 L时达到最高1.579 mg/mL,而后随着时间的延长逐渐降低;从唾液酸的质量浓度变化分析可知,从第2 L开始到第8 L,唾液酸质量浓度逐渐增加,且收集体积

在第8 L时达到最高值245.2 mg/L,随后逐渐降低,在第48 L时收集到的洗脱液中唾液酸质量浓度比较低,为21 mg/L。从OD<sub>280 nm</sub>/OD<sub>210 nm</sub>的数值上可以看出,其比值均<0.050,说明收集的洗脱液中CGMP的纯度较高,为有效的收集段。综合分析,确定在第6~12 L时间段内收集流出液,获得CGMP产品的水平可达到高唾液酸含量和理想的纯度要求。

### 2.3 规模化制备CGMP工艺条件优化

2.3.1 上样体积对分离制备CGMP效果的影响 由表3可知,随着上样体积的增加,所得CGMP样品的纯度也在不断升高,尽管上样体积为4BV时的纯度最高,但是其纯度与上样体积为3BV时的差别不大,说明研究确定的分离介质和设定的上样体积能够制备高纯度的CGMP产品。由图3可知,蛋白质和唾液酸质量浓度均高于对照

表2 CGMP洗脱液中蛋白质质量浓度、唾液酸质量浓度、OD值以及OD<sub>280 nm</sub>/OD<sub>210 nm</sub>值结果<sup>†</sup>

Table 2 The OD<sub>280 nm</sub>/OD<sub>210 nm</sub> values, protein, sialic acid mass concentration of CGMP eluents were collected at each time period

收集体积/ L	蛋白质 OD值	蛋白质质量浓度/ (mg · mL <sup>-1</sup> )	唾液酸 OD值	唾液酸质量浓度/ (mg · L <sup>-1</sup> )	OD <sub>280 nm</sub> /OD <sub>210 nm</sub>
2	0.027±0.002	0.412±0.015	0.017±0.001	50.973±1.488	0.050±0.002
4	0.056±0.003	0.996±0.005	0.035±0.002	105.120±0.793	0.042±0.002
6	0.085±0.004	1.579±0.002	0.044±0.002	132.113±0.450	0.028±0.001
8	0.083±0.002	1.539±0.022	0.075±0.002	245.217±0.335	0.012±0.001
10	0.074±0.001	1.358±0.004	0.073±0.004	219.217±0.454	0.010±0.002
12	0.071±0.001	1.398±0.001	0.064±0.004	242.817±0.293	0.009±0.001
14	0.053±0.001	0.936±0.002	0.061±0.001	239.720±0.289	0.008±0.001
16	0.029±0.001	0.453±0.004	0.047±0.001	175.417±0.219	0.008±0.002
18	0.021±0.001	0.292±0.001	0.029±0.002	102.913±0.078	0.009±0.001
20	0.018±0.001	0.231±0.004	0.023±0.002	80.513±0.327	0.011±0.004
22	0.018±0.002	0.231±0.005	0.021±0.004	63.113±0.249	0.011±0.003
24	0.017±0.002	0.324±0.002	0.018±0.002	54.123±0.160	0.010±0.004
26	0.015±0.001	0.171±0.002	0.017±0.002	51.503±0.261	0.010±0.007
28	0.016±0.003	0.191±0.004	0.016±0.003	47.997±0.146	0.011±0.002
30	0.014±0.002	0.151±0.002	0.016±0.004	48.043±0.153	0.013±0.002
32	0.013±0.002	0.131±0.001	0.015±0.004	45.017±0.570	0.012±0.002
34	0.015±0.002	0.171±0.002	0.013±0.002	39.013±0.241	0.013±0.004
36	0.013±0.003	0.131±0.001	0.013±0.005	39.007±0.284	0.018±0.001
38	0.011±0.002	0.091±0.001	0.011±0.001	33.013±0.281	0.017±0.002
40	0.011±0.003	0.091±0.003	0.010±0.001	30.013±0.249	0.019±0.001
42	0.013±0.001	0.070±0.002	0.010±0.004	30.017±0.426	0.025±0.002
44	0.008±0.002	0.030±0.002	0.009±0.002	27.006±0.640	0.033±0.003
46	0.007±0.002	0.010±0.002	0.009±0.001	27.017±0.285	0.032±0.002
48	0.007±0.004	0.010±0.003	0.007±0.001	21.006±0.437	0.035±0.001

<sup>†</sup> 在上样体积108 L,上样流量0.8 L/min,洗脱液浓度0.6 mol/L,洗脱液体积1BV的工艺条件下,按照上述方法收集的洗脱液的各项指标的数据。



组,且随着上样体积增加,蛋白质质量浓度与唾液酸质量浓度逐渐提高,但变化不明显。为了获得良好的分离效果,上样体积应保持在适当范围内,过大的上样体积可能导致柱饱和,从而影响分离效果。

经高效液相色谱法检测,得到图 4。上样体积为 2BV,3BV,4BV 时所得 CGMP 产品的峰面积分别为 8 542 272,10 155 836,10 333 535,产品的保留时间分别为 16.912,17.354,17.285 min,分别计算出每 100 g 样品中含有 CGMP 为 0.526,0.636,0.620 g。由表 4 可知,CGMP 的纯度和蛋白含量随上样体积的增大呈先升高后下降的趋势,当上样体积为 3BV 时所得的 CGMP 得率、回收率以及唾液酸含量最高,造成这一现象的原因可能是离子交换树脂同 CGMP 交换结合量逐渐趋于饱和,导致其余含有 CGMP 的乳清粉溶液未得到有效结合就从树脂间流出。综合分析,选用 3BV 作为规模化分离纯化制备 CGMP 的上样体积可达到较高的产量和收益。

2.3.2 上样流量对分离制备 CGMP 效果的影响 由表 5 可知,CGMP 的纯度在上样流量为 0.8 L/min 时最高(97.669%)。上样流量 0.8 L/min 与 1 L/min,CGMP 的纯度相差(0.853%)不明显;由图 5 可知,不同上样流量下测定的蛋白质和唾液酸质量浓度均高于对照组,且上样流量为 0.8 L/min 时,蛋白质和唾液酸质量浓度均达到最大。高效液相色谱法检测上样流量为 0.6,0.8,1.0 L/min 时制备的 CGMP 产品,不同上样流量条件下分离获得的 CGMP 产品的保留时间为 17.289~17.357 min,分别计算每 100 g 样品中含 CGMP 为 0.538,0.626,0.595 g,即上样流量 0.8 L/min 时,每 100 g 样品中所得 CGMP 产

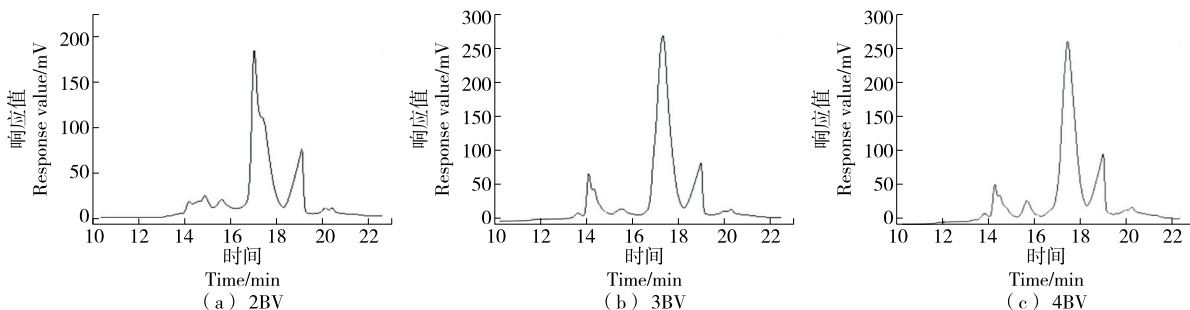


图 4 上样体积为 2BV、3BV、4BV 时得到的 CGMP 色谱图

Figure 4 CGMP chromatogram with sample volume of 2BV, 3BV, 4BV (205 nm)

表 4 上样体积对分离 CGMP 效果影响的综合分析结果

Table 4 Results of comprehensive analysis of isolated CGMP products by the change of loading volume

上样体积	CGMP 纯度 (占蛋白质)/%	唾液酸含量/ (10 <sup>-2</sup> g·g <sup>-1</sup> 蛋白)	蛋白质含量/ %	CGMP 回收率/ %	得率/ (10 <sup>-2</sup> g·g <sup>-1</sup> 乳清粉)
2BV	74.210±0.488	12.891±0.195	70.874±0.422	42.962±0.962	0.717±0.050
3BV	80.724±0.839	15.359±0.481	78.785±0.955	46.795±0.517	0.781±0.020
4BV	79.706±0.259	13.830±0.540	77.780±0.773	39.685±0.672	0.663±0.011

表 3 上样体积对分离 CGMP 产品纯度的影响

Table 3 The influence of loading volume on the purity of separated CGMP products

上样体积	OD <sub>280 nm</sub> 值	OD <sub>210 nm</sub> 值	CGMP 纯度/%
2BV	0.012±0.002	0.358±0.003	96.652±0.005
3BV	0.015±0.003	0.589±0.004	97.457±0.004
4BV	0.017±0.003	0.723±0.002	97.649±0.005

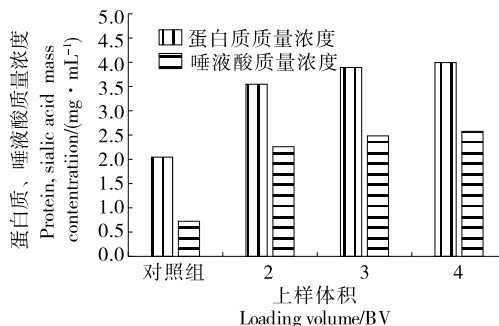


图 3 上样体积对 CGMP 产品中蛋白质和唾液酸质量浓度的影响

Figure 3 Effects of loading volume on protein and sialic acid mass concentration of CGMP products

Figure 3 Effects of loading volume on protein and sialic acid mass concentration of CGMP products

的量最高。

由表 6 可知,动态离子交换法规模化制备 CGMP 产品时,上样流量 0.8 L/min 时分离获得 CGMP 产品的纯度、蛋白质和唾液酸含量最高。从产量和收益的角度分

表 5 上样流量对 CGMP 纯度的影响

Table 5 The influence of loading flow on the purity of separated CGMP products

上样流量/ (L · min <sup>-1</sup> )	OD <sub>280 nm</sub> 值	OD <sub>210 nm</sub> 值	CGMP 纯度/%
0.5	0.011 ± 0.005	0.231 ± 0.053	95.247 ± 0.020
0.8	0.015 ± 0.002	0.590 ± 0.090	97.669 ± 0.002
1.0	0.013 ± 0.003	0.408 ± 0.011	96.816 ± 0.007

析,选用 0.8 L/min 作为规模化分离制备 CGMP 的最适上样流量。

2.3.3 洗脱液浓度对 CGMP 产品分离效果的影响 由表 7 可知,洗脱液浓度为 0.6 mol/L 时,所得 CGMP 产品的纯度达到最高(97.390%),洗脱液浓度为 0.8 mol/L 时其纯度最低。结合表 8 推测,较高浓度的氯化钠洗脱液

表 6 上样流量对分离 CGMP 效果影响的综合分析结果

Table 6 The comprehensive analysis results of the effect of loading flow on CGMP separation

上样流量/ (L · min <sup>-1</sup> )	CGMP 纯度 (占蛋白质)/%	唾液酸含量/ (10 <sup>-2</sup> g · g <sup>-1</sup> 蛋白)	蛋白质含量/ %	CGMP 回收率/ %	得率/ (10 <sup>-2</sup> g · g <sup>-1</sup> 乳清粉)
0.5	75.139 ± 0.985	12.198 ± 0.177	71.611 ± 0.377	40.233 ± 0.719	0.672 ± 0.026
0.8	80.460 ± 1.055	15.317 ± 0.344	77.806 ± 0.149	46.972 ± 0.744	0.783 ± 0.067
1.0	78.776 ± 0.266	14.339 ± 0.306	75.528 ± 0.292	43.052 ± 0.096	0.719 ± 0.014

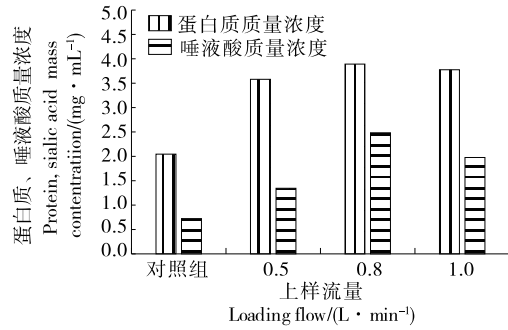
表 7 洗脱液浓度对 CGMP 产品纯度的影响

Table 7 The influence of eluent concentration on the purity of CGMP products

洗脱液浓度/ (mol · L <sup>-1</sup> )	OD <sub>280 nm</sub> 值	OD <sub>210 nm</sub> 值	CGMP 纯度/%
0.4	0.021 ± 0.019	0.391 ± 0.020	94.591 ± 0.007
0.6	0.015 ± 0.015	0.591 ± 0.044	97.390 ± 0.002
0.8	0.035 ± 0.002	0.422 ± 0.021	91.638 ± 0.005

将会吸附在离子交换树脂上的其他杂蛋白洗脱下来。由图 6 可知,洗脱液浓度为 0.6 mol/L 时,唾液酸和蛋白质质量浓度最高。由表 8 可知,洗脱液浓度为 0.6 mol/L 时 CGMP 中的唾液酸含量最高(15.649 g/100 g),说明唾液酸含量与所吸附的蛋白含量存在相关性,即洗脱液的浓度对唾液酸与蛋白结合的稳定性以及高品质的 CGMP 产品的获得至关重要。

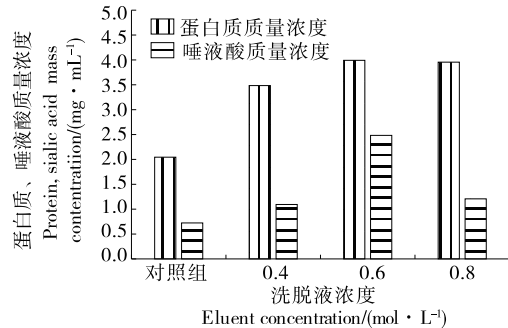
洗脱液浓度为 0.4, 0.6, 0.8 mol/L 条件下制备的 CGMP 产品经高效液相色谱法检测,制备的 CGMP 产品的保留时间为 16.915~17.361 min,分别计算不同洗脱液浓度下每 100 g 样品中 CGMP 产品的含量为 0.536, 0.636, 0.583 g。由表 8 可知,洗脱液浓度在适宜范围内,才能获得高纯度和高唾液酸含量的 CGMP 产品。综上所述,选用 0.6 mol/L 的洗脱液浓度有利于 CGMP 的



对照组为上样流量 0.8 L/min 的条件下商品 CGMP 中蛋白质和唾液酸质量浓度

图 5 上样流量对 CGMP 产品中蛋白质和唾液酸质量浓度的影响

Figure 5 Effects of loading flow on protein and sialic acid mass concentration of CGMP products



对照组为洗脱液浓度 0.6 mol/L 的条件下商品 CGMP 中蛋白质和唾液酸质量浓度

图 6 洗脱液浓度对 CGMP 产品中蛋白质和唾液酸质量浓度的影响

Figure 6 Effects of eluent concentration on protein and sialic acid mass concentration in CGMP products

吸附和收集,从而获得高唾液酸含量的 CGMP 产品和收益。

2.3.4 洗脱液体积对分离 CGMP 效果的影响 由图 7 和表 9 可知,随着洗脱液体积的变化,所得 CGMP 产品的各项指标均存在不同程度的变化。当洗脱液体积为 1.0BV 时,其纯度最高(97.508%),而洗脱液体积为 1.5BV 和 2.0BV 时,其纯度均约降低 2%。当洗脱液体积为 1.0BV

表 8 洗脱液浓度对分离 CGMP 效果影响的综合分析结果

Table 8 The comprehensive analysis results of eluent concentration on separation of CGMP products were obtained

洗脱液浓度/ (mol · L <sup>-1</sup> )	CGMP 纯度 (占蛋白质)/%	唾液酸含量/ (10 <sup>-2</sup> g · g <sup>-1</sup> 蛋白)	蛋白质含量/ %	CGMP 回收率/ %	得率/ (10 <sup>-2</sup> g · g <sup>-1</sup> 乳清粉)
0.4	76.899 ± 1.490	12.571 ± 2.075	69.744 ± 1.765	38.415 ± 1.455	0.642 ± 0.038
0.6	80.449 ± 2.130	15.649 ± 1.830	79.141 ± 1.801	46.754 ± 2.411	0.781 ± 0.055
0.8	74.922 ± 2.192	11.708 ± 1.694	77.776 ± 1.079	45.414 ± 1.447	0.758 ± 0.033

时唾液酸质量浓度最高,达到高唾液酸含量生产 CGMP 的目的。高效液相色谱法检测洗脱液体积为 1.0BV, 1.5BV, 2.0BV 条件下制备的 CGMP 产品, 分别计算每 100 g 样品中 CGMP 产品含量为 0.640, 0.626, 0.614 g。由表 10 可知, 随着洗脱液体积增大, 分离产品中 CGMP 的纯度、蛋白质和唾液酸含量越来越低。综合分析, 选用 1BV 作为规模化分离纯化制备 CGMP 的最佳洗脱液体积。

表 9 洗脱液体积对 CGMP 产品纯度的影响

Table 9 The influence of eluent volume on the purity of CGMP products

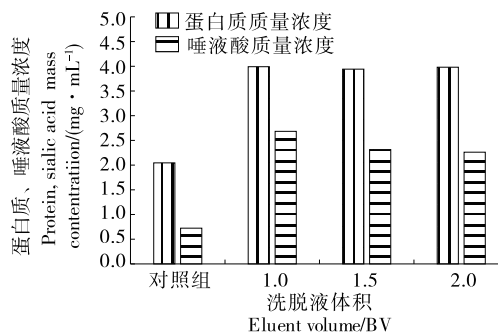
洗脱液体积	OD <sub>280 nm</sub> 值	OD <sub>210 nm</sub> 值	CGMP 纯度/ %
1.0BV	0.015 ± 0.003	0.592 ± 0.021	97.508 ± 0.003
1.5BV	0.016 ± 0.004	0.376 ± 0.002	95.779 ± 0.009
2.0BV	0.017 ± 0.004	0.367 ± 0.002	95.371 ± 0.013

表 10 洗脱液体积对分离 CGMP 效果影响的综合分析结果

Table 10 Results of comprehensive analysis of different eluent volume for the resulting CGMP products

洗脱液体积	CGMP 纯度 (占蛋白质)/%	唾液酸含量/ (10 <sup>-2</sup> g · g <sup>-1</sup> 蛋白)	蛋白质含量/ %	CGMP 回收率/ %	得率/ (10 <sup>-2</sup> g · g <sup>-1</sup> 乳清粉)
1.0BV	80.359 ± 0.333	15.748 ± 0.460	79.643 ± 0.951	47.771 ± 0.034	0.781 ± 0.088
1.5BV	79.425 ± 0.407	13.708 ± 0.690	78.816 ± 0.939	45.880 ± 1.387	0.766 ± 0.024
2.0BV	78.889 ± 0.478	12.735 ± 0.409	77.827 ± 0.235	45.025 ± 0.224	0.752 ± 0.061

2.3.5 树脂使用周期测定 由表 11 可知, 不同批次的树脂样品的含水量均在合格范围(54%~62%)内, 且交换容量随着批次的递增而逐渐下降, 到第 5 批次时, 树脂样品的交换容量出现了明显下降, 最后达到全交换容量的 57.5%。在实际操作中一般离子交换树脂的再生交换容量为全交换容量的 70%~90%, 显然第 5 批已经不合格。造成这一现象的原因可能是样品中的杂蛋白未被完全洗脱下来, 使树脂受到了污染, 影响了树脂的交换容量, 导致其工作能力下降, 此时需要对树脂进行再生处理。在生产中, 原料乳清粉中含有较多的高分子肽或蛋白, 这些成分因尺寸较大而不能进入树脂的微孔中, 因此在实际生产中的交换容量会低于试验时测定的交换容量值, 这就需要在实际的生产设计时, 依据生产经验和相关试验数据对试验值进行修正。



对照组为洗脱液体积 1BV 条件下商品 CGMP 中蛋白质和唾液酸质量浓度

图 7 洗脱液体积对 CGMP 产品中蛋白质和唾液酸质量浓度的影响

Figure 7 Effects of eluent volume on protein and sialic acid mass concentration in CGMP products

综上所述, 在规模化制备 CGMP 产品的工艺中, 分离介质进行 4 次生产后, 需对树脂进行再生处理, 从而保证

表 11 树脂使用批次对其含水量和交换容量的影响<sup>†</sup>

Table 11 Effects of resin use batch on its exchange capacity

树脂使用批次	含水量/ %	交换容量/ (mmol · g <sup>-1</sup> )	再生交换容量/ 全交换容量/ %
1	58.200 ± 0.097	3.702 ± 0.065	92.500 ± 0.016
2	58.030 ± 0.097	3.597 ± 0.097	89.900 ± 0.012
3	57.590 ± 0.570	3.404 ± 0.049	85.000 ± 0.097
4	58.120 ± 0.310	3.063 ± 0.015	76.600 ± 0.038
5	57.840 ± 0.770	2.299 ± 0.210	57.500 ± 0.053

<sup>†</sup> 全交换容量 ≥ 4 mmol/g 为优等品; 再生交换容量/全交换容量以全交换容量为 4 mmol/g 计算。

树脂良好的工作状态。

#### 2.4 制备 CGMP 最佳工艺条件验证

选用 3BV 的上样体积、0.8 L/min 的上样流量、1BV 的洗脱液体积和 0.6 mol/L 的洗脱液浓度,在第 6~12 L 的时间段内收集 CGMP 流出液。用 2 160 g 乳清粉处理溶液体积为 108 L、树脂 36 L,检测此工艺条件下 CGMP

产量、纯度、唾液酸含量、得率和回收率,结果见表 12。在此工艺条件下,制备的 CGMP 纯度、唾液酸含量明显高于优化前(80.724%,15.748 g/100 g),且比市售商品 CGMP 的纯度高 11.219%,比市售商品 CGMP 中的唾液酸含量高 7.929 g/100 g。说明优化的工艺条件适合工业化生产 CGMP。

表 12 最佳工艺条件制备的 CGMP 产品的产量、得率、产品纯度、回收率及唾液酸含量

Table 12 The production, yield, purity, recovery rate, and sialic acid content of CGMP products prepared under optimal process conditions

样品	CGMP 产量/ g	CGMP 纯度 (占蛋白质)/%	唾液酸含量/ ( $10^{-2}$ g · g <sup>-1</sup> 蛋白)	CGMP 回收率/ %	得率/ ( $10^{-2}$ g · g 乳清粉 <sup>-1</sup> )
试验制备的 CGMP	21.183 ± 0.876	89.032 ± 0.965	21.503 ± 0.604	51.972 ± 0.995	0.981 ± 0.011
商品 CGMP	13.609 ± 0.665	77.813 ± 0.404	13.574 ± 0.555	—	—

#### 2.5 CGMP 对流感病毒的血凝抑制试验

2.5.1 流感病毒活力 经测定,呈现出 100% 的血凝现象在第 7 孔,故判定获得的 MDCK 流感病毒的血凝价为 1:128(即凝集效价为 1:2<sup>7</sup>)。用同样方法测定流感病毒 B 的血凝价为 1:256(即凝集效价为 1:2<sup>8</sup>)。

2.5.2 CGMP 产品对流感病毒 A(H1N1)的血凝抑制作用 由表 13 可知,商品 CGMP、CGMP 产品 1 和 CGMP 产品 2 均在质量浓度 10.000 0 mg/mL 下发生血凝抑制,即对流感病毒 A(H1N1)引起的血凝现象产生有效的抑制作用,而在 CGMP 质量浓度 1.000 0 mg/mL 时,只有 CGMP 产品 2 在该质量浓度下产生有效的血凝抑制作用,而其余 CGMP 产品在该质量浓度下均未产生可见的血凝抑制作用。综上所述,商品 CGMP 和 CGMP 产品 1 对血凝抑制的最小质量浓度为 10.000 0 mg/mL,而唾液酸含量较高的 CGMP 产品 2 对血凝抑制的最小质量浓度为 1.000 0 mg/mL。因为流感病毒可通过糖蛋白与相应受体结合后,再与红细胞吸附结合发生红细胞凝集现象,相应的抗体会抑制这种凝集,试验证实 CGMP 产品 2 能有效抑制流感病毒同红细胞的结合以及产生凝集现

象,表明 CGMP 产品 2 在质量浓度 1.000 0 mg/mL 下对甲型 H1N1 流感病毒有明显的抑制作用。

2.5.3 CGMP 对流感病毒 B 的血凝抑制作用 由表 14 可知,CGMP 质量浓度为 10.000 0 mg/mL 时,各产品对流感病毒 B 均能引起血凝现象,并产生有效的抑制作用,而在质量浓度为 5.000 0 mg/mL 和 2.500 0 mg/mL 时,只有 CGMP 产品 2 能产生有效的血凝现象,其余各 CGMP 产品均未产生明显可见的血凝现象。商品 CGMP 和 CGMP 产品 1 对血凝抑制的最小质量浓度为 10.000 0 mg/mL,而 CGMP 产品 2 对血凝抑制的最小质量浓度为 1.250 0 mg/mL,明显优于商品 CGMP 的活力水平。

综上所述,各 CGMP 产品对两种流感病毒均具有一定的抑制作用,但只有 CGMP 产品 2 对两种病毒有明显的抑制作用,且最低抑制质量浓度分别为 1.000 0, 1.250 0 mg/mL,说明制备产品 CGMP 的唾液酸含量高,其血凝抑制活性也高,血凝抑制试验也反映出利用研究优化的 CGMP 规模化生产工艺制备的产品为一种高品质的糖巨肽,与 Salam 等<sup>[4,10-11]</sup>报道的乳源 CGMP 的抑制流感病毒活性功能一致。

表 13 流感病毒 A(H1N1)血凝抑制试验结果<sup>†</sup>

Table 13 The result of HI test on A flu virus

CGMP 质量浓度/ (mg · mL <sup>-1</sup> )	商品 CGMP	CGMP 产品 1	CGMP 产品 2
10 <sup>1</sup>	+	+	+
10 <sup>0</sup>	—	—	+
10 <sup>-1</sup>	—	—	—
10 <sup>-2</sup>	—	—	—
10 <sup>-3</sup>	—	—	—
10 <sup>-4</sup>	—	—	—

<sup>†</sup> “+”表示将出现血凝现象;“—”表示未出现血凝现象。

表 14 流感病毒 B 血凝抑制试验结果<sup>†</sup>

Table 14 The result of HI test on B flu virus

CGMP 质量浓度/ (mg · mL <sup>-1</sup> )	商品 CGMP	CGMP 产品 1	CGMP 产品 2
10.000 0	+	+	+
5.000 0	—	—	+
2.500 0	—	—	+
1.250 0	—	—	+
0.625 0	—	—	—
0.312 5	—	—	—

<sup>†</sup> “+”表示将出现血凝现象;“—”表示未出现血凝现象。



### 3 结论

研究建立了一种从乳清粉中分离纯化酪蛋白糖巨肽的可行性技术方法:上样体积 3 倍树脂体积、上样流量 0.8 L/min、洗脱体积 1 倍树脂体积、洗脱液浓度 0.6 mol/L、树脂适宜使用周期为 4 次,按照该工艺条件,投入乳清粉溶液体积 108 L(2 160 g)、树脂 36 L,得到酪蛋白糖巨肽产品 21.183 g,得率为 0.981 g/100 g,产品纯度 89.032%、回收率 51.972%、唾液酸含量 21.503 g/100 g 蛋白,且该工艺条件下制备的酪蛋白糖巨肽产品的纯度和唾液酸含量均优于市售的商品酪蛋白糖巨肽(77.813%, 13.574 g/100 g)。该技术路线分离酪蛋白糖巨肽具有过程简单、纯化效果好、唾液酸含量高、操作周期短且成本较低等特点,适合于规模化生产酪蛋白糖巨肽的推广。

研究还揭示了分离获得的各酪蛋白糖巨肽产品对两种常见的流感病毒 A(H1N1)和流感病毒 B 均具有一定的抑制作用,其中酪蛋白糖巨肽产品 2 的抑制作用效果较为明显,其最低质量浓度分别为 1.000 0, 1.250 0 mg/mL。后续可进一步探究酪蛋白糖巨肽抑制各种流感病毒的机理,更好地实现乳源性活性肽的功能发挥;提供更优的酪蛋白糖巨肽生产工艺,将该成果尽快转化为生产力。

#### 参考文献

[1] MAJIDINIA L, KALBASI ASHTARI A, MIRSAEEDGHAZI H. Effects of pH, stirring rate, reaction time and sequential ultrafiltration of whey protein solution on recovery and purification of glycomacropetides[J]. *Journal of Dairy Research*, 2022, 89(3): 327-334.

[2] 李琪琪, 李天歌, 焦颖泽, 等. 具有 DPP-IV 抑制活性的酪蛋白糖巨肽分离纯化及其序列鉴定[J]. *中国乳品工业*, 2022, 50(8): 4-8, 34.

LI Q Q, LI T G, JIAO Y Z, et al. Preparation and identification of casein glycopeptide with dipeptidyl peptidase-IV Inhibitory activity [J]. *China Dairy Industry*, 2022, 50(8): 4-8, 34.

[3] 武伦玮, 刘丽君, 段国霞, 等. HPAEC-PAD 测定乳清粉和乳粉中唾液酸的含量[J]. *饮料工业*, 2022, 25(3): 33-38.

WU L W, LIU L J, DUAN G X, et al. Determination of sialic acid content in whey and milk powder by HPAEC-PAD [J]. *Beverage Industry*, 2022, 25(3): 33-38.

[4] SALAM M. Characteristics and potential uses of the casein macropetide[J]. *International Dairy Journal*, 1996, 6(4): 327-341.

[5] MOTOKI M, SEGURO K. Transglutaminase and its use for food processing[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1998, 9(5): 204-210.

[6] LI E W Y, MINE Y. Technical note: Comparison of chromatographic profile of glycomacropetide from cheese whey isolated using different methods[J]. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(1): 174-177.

[7] SILVA C A S, COIMBRA J S R, ROJAS E E G, et al. Partitioning of glycomacropetide in aqueous two-phase systems [J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(11): 1 213-1 216.

[8] DOUGLAS B. Application of numerical analysis to a number of models for chimosin-induced coagulation of casein micelles [J]. *Journal of Dairy Research*, 1996, 63(2): 223-232.

[9] THOM C, KRAUSE I, KULOZIK U. Precipitation behaviour of caseinomacropetides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC [J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(4): 285-293.

[10] YOSHIHIRO K, HIROKO I, HIROSHI S, et al. Inhibition by  $\kappa$ -casein glycomacropetide and lactoferrin of influenza virus hemagglutination [J]. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 1993, 57(7): 1 214-1 215.

[11] WANG X L, MA T R, YU H J, et al. Purification of sialoglycoproteins from bovine milk using serotonin-functionalized magnetic particles and their application against influenza A virus [J]. *Food & Function*, 2020, 11(8): 6 911-6 920.

[12] 张秀媛, 何扩, 袁永俊. 超滤法纯化酪蛋白凝乳酶水解物中的酪蛋白糖巨肽 [J]. *中国乳品工业*, 2009, 37(12): 11-13.

ZHANG X Y, HE K, YUAN Y J. Purifying casein glycomacropetide from chimosin casein hydrolysate by ultrafiltration [J]. *China Dairy Industry*, 2009, 37(12): 11-13.

[13] 刁瑞丽, 闫亚丽, 陈庆森. 阴离子交换树脂分离酪蛋白糖巨肽工艺条件优化 [J]. *食品科学*, 2012, 33(2): 72-77.

DIAO R L, YAN Y L, CHEN Q S. Optimization of separation process conditions for casein glycomacropetide by anion exchange resin adsorption [J]. *Food Science*, 2012, 33(2): 72-77.

[14] 闫亚丽, 陈庆森, 李博智, 等. 酪蛋白巨肽 (Caseinomacropetides) 检测方法的初步研究 [J]. *食品科技*, 2010, 35(7): 284-286.

YAN Y L, CHEN Q S, LI B Z, et al. Preliminary study on the method for determination of caseinomacropetides [J]. *Food Science and Technology*, 2010, 35(7): 284-286.

[15] 陈庆森. 实用生物化学实验技术指导 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2006: 40-41.

CHEN Q S. Technical guidance of practical biochemical experiments [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 2006: 40-41.