

УДК 637.127.576.1

*В.М. Ковбаса, д-р техн. наук
Національний університет
харчових технологій
А.В. Юкало
Тернопільський державний
технічний університет
ім. І. Пулюя*

МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ БІЛКІВ КАЗЕЇНОВОГО КОМПЛЕКСУ

Проведено ідентифікацію білків казеїнового комплексу методами гель-фільтрації, іонообмінної хроматографії та електрофорезу в ПААГ. На основі порівняння отриманих результатів показано переваги та недоліки цих методів при визначенні загального казеїну і окремих казеїнових фракцій.

Ключові слова: казеїн, фракції, гель-фільтрація, іонообмінна хроматографія, електрофорез.

Casein complex proteins identification using such methods as: gel-filtration, ion-exchange chromatography and electrophoresis in PAAG was performed. During identification of total casein and casein fractions all advantages and disadvantages of these methods by comparing them were shown.

Key words: casein, fractions, gel-filtration, ion-exchange chromatography, electrophoresis.

Білки казеїнового комплексу молока є повноцінними харчовими білками, що входять до складу не лише молочних, але і ряду інших продуктів — хлібобулочних, кондитерських, м'ясних. При цьому казеїни використовуються для підвищення біологічної цінності, покращення амінокислотного скору, а також як структуроутворювачі [1]. Відкриття біоактивних пептидів серед продуктів протеолізу казеїнів дозволило розширити і більш об'єктивно оцінити їхнє значення у формуванні біологічної цінності харчових продуктів [5]. У зв'язку з цим в окремих випадках використовують казеїнові фракції, які є джерелом певних біоактивних пептидів (антигіпертензивних, опіоїдних, антитромботичних, імуномодуляторних, фосфопептидів та інших) [5].

Сказане свідчить про велике значення загального казеїну та його фракцій у харчуванні людини. В той же час широке використання білків казеїнового комплексу, можливість їх заміни менш цінними білками зумовлюють необхідність розробки ефективних і доступних методів ідентифікації та визначення загального казеїну і його фракцій у сумішах білків різної складності і концентрації в присутності інших харчових речовин. При цьому повинні враховуватися дані сучасної міжнародної класифікації казеїнів [4].

У зв'язку з цим метою даної роботи є порівняльна характеристика методів ідентифікації загального казеїну та його фракцій у відповідності до їх сучасної класифікації.

Для дослідження фракційного складу використовували свіжевиділені білки казеїнового комплексу, які осаджували із знежиреного молока в ізоелектричній точці (рН 4,6), промивали дистильованою водою і розчиняли при рН 7,5. Процедура повторяли тричі. Після інактивації природних протеолітичних ферментів отриманий загальний казеїн розчиняли у водних буферах для зразків. Концентрацію у зразках або хроматографічних фракціях визначали методом Лоурі або спектрофотометрично при довжині хвилі 280 нм, використовуючи коефіцієнти поглинання для загального казеїну та його фракцій, які були встановлені раніше [6].

Для ідентифікації казеїнових фракцій виділяли основні компоненти казеїну із очищеного загального казеїну. При цьому α_{s1} -CN-8P і β -CN-5P диференційно осаджували в ізоелектричній точці в присутності сечовини. Деталі процедур диференційного осадження описані в роботі [7]. Одержані α_{s1} -CN-8P і β -CN-5P містили значну кількість домішок. Для подальшого очищення ці фракції розчиняли в хроматографічному буфері (0,01 М імідазол, 3,3 М сечовина, рН 7,0) і наносили на колонку з ДЕАЕ-целюлозою та проводили хроматографію в градієнті іонної сили. Гомогенний κ -CN-1P виділяли шляхом повторної гель-фільтрації, як описано раніше [2]. Для швидкого очищення всіх фракцій від низькомолекулярних домішок і компонентів хроматографічних буферів їх розчини наносили на колонку з сефадексом G-25, зрівноважену водою або буфером, необхідним для подальших досліджень, і здійснювали гель-фільтрацію. Для зберігання препарати казеїнів ліофілізували.

Гомогенність препаратів казеїнових фракцій на різних етапах виділення та очищення досліджували за допомогою електрофорезу на вертикальних пластинках поліакриламідного гелю [7]. При цьому застосовували лужну буферну систему (рН 7,0, 0,003 М ЕДТА і 4,5 М сечовину). Комірочки гелю наповнювали 10 мкл розчину казеїну. Після електрофорезу пластинки фіксували 7 % розчином оцтової кислоти і забарвлювали 1 % розчином амідочорного 10 Б. Електрофореграми очищених зразків α_{s1} -CN-8P, β -CN-5P і κ -CN-1P показані на рис. 1.

Серед методів дослідження білкового складу часто використовується гель-фільтрація. Це пояснюється відносною простотою і доступністю цього методу, можливістю багаторазового використання хроматографічної системи для гель-фільтрації. Враховуючи попередні роботи нами була вибрана система, яка дозволяла за рахунок дезагрегуючого агента (6 М сечовина) запобігати утворенню надмолекулярних структур казеїнів [2]. Відомо, що казеїни характеризуються вираженою тенденцією до агрегації в розчинах. В якості буферу використовували 0,001 М тріс-НСІ буфер з рН 7,7. Препарати загального казеїну і його фракцій поступово розчиняли в хроматографічному буфері, доводячи їх концентрацію до 2,5 % (загальний казеїн) і 0,7 % (фракції). Отриманий розчин центрифугували (10 000 g, 15 хв) для видалення нерозчинних частинок і вносили в колонку з сефадексом G-150 попередньо зрівноваженим хроматографічним буфером. Гель-фільтрацію проводили при швидкості елюції 23 мл/год, відбирали по 5 мл елюату і спектрофотометрично визначали вміст білків за поглинанням при 280 нм. Типова хроматограма загального казеїну і його фракцій показана на рис. 2.

Отримані результати свідчать про можливість виділення загального казеїну за характерним хроматографічним профілем в сумішах харчових речовин, які не містять високомолекулярних білків. Відносно чистий κ -CN-1P знаходиться в першій хроматографічній фракції загального казеїну. Вміст цієї фракції дещо перевищує її процент (до 15 %) у складі загального казеїну, що може бути пов'язано з присутністю α_{s2} -CN фракцій. Оскільки κ -CN-1P характеризується найнижчим значенням молекулярної маси — він повинен елюватися з більшим об'ємом буферу, ніж α_{s1} -CN-8P і β -CN-5P. Але у зв'язку з наявністю у його первинній структурі залишків цистеїну, κ -CN-1P утворює у розчинах олігомери, що включають переважно 6 субодиниць. Такі олігомери виходять з вільним об'ємом колонки. Що стосується фракцій α_{s1} -CN-8P і β -CN-5P, то їхні піки у значній мірі співпадають і розділення їх малоефективне.

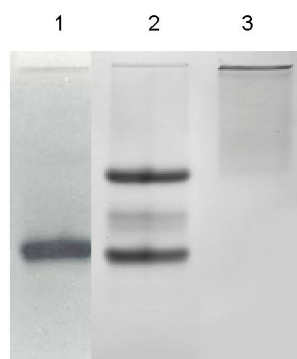


Рис 1. Електрофореграми виділених фракцій: 1 — α_{s1} -CN-8P, 2 — β -CN-5P, 3 — κ -CN-1P

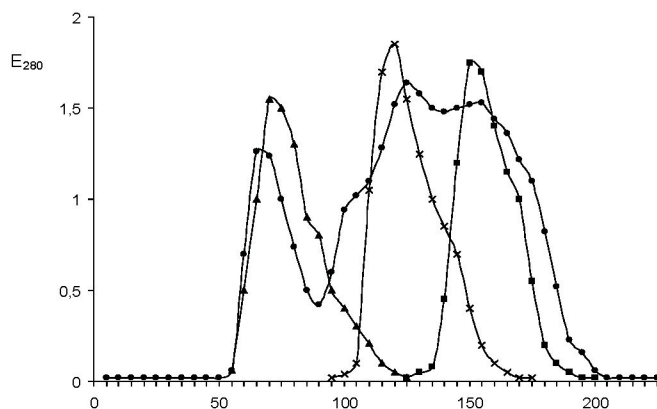


Рис. 2. Хроматограми загального кислого казеїну (•) κ -CN-1P (▲), β -CN-5P (×) і α_{S1} -CN-8P (■), отримані на сефадексі G-150 у присутності сечовини

Для аналізу казеїнів методом іонообмінної хроматографії нами була використана ДЕАЕ-целюлоза, яка застосовувалася для кількісного виділення окремих фракцій казеїну [6]. Після стандартної обробки ДЕАЕ-целюлозу вносили у колонку і зрівноважували буфером (0,01 М тріс-НСl, 3,9 сечовина, рН 7,5). Використання буферу з такими параметрами забезпечує ефективне розділення і не впливає на хроматографічний профіль в порівнянні з буферами, які використовувалися раніше [6, 7]. Незначне утворення агрегатів, в першу чергу α_{S1} -фракціями, очевидно, мало впливає на їхню спорідненість до іонообмінника і, відповідно, на об'єм виходу з колонки.

Результати іонообмінної хроматографії загального казеїну (300 мг) і його фракцій α_{S1} -CN-8P (50 мг) і β -CN-5P (50 мг) показані на рис. 3. Отримано характерне розділення казеїнових фракцій. Пробірки з елюатом, які входять до складу

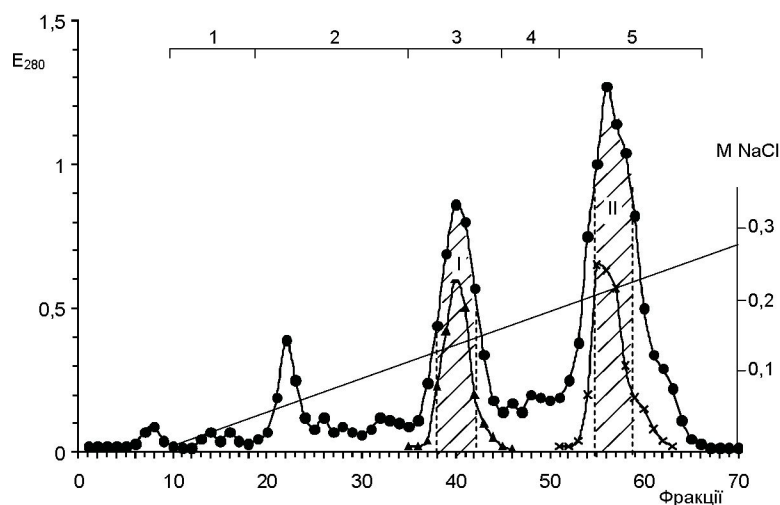


Рис. 3. Хроматограми загального казеїну (•), β -CN-5P (▲) і α_{S1} -CN-8P (×), отримані на ДЕАЕ-целюлозі. Лініями зверху позначені фракції, які відбирали для визначення казеїнових фракцій. Заштриховані ділянки використовували для електрофоретичного аналізу

позначених п'яти фракцій, об'єднували і визначали його об'єм. Частину (по 5 мл) кожної об'єднаної фракції відбирали для діалізу і електрофоретичного аналізу фракційного складу, а другу частину залишали для визначення кількості білків в об'єднаних фракціях. Електрофоретичний аналіз показав, що у двох хроматографічних фракціях (3 і 5) знаходяться гомогенні білки. Це відповідно β -CN-5P у заштрихованій частині фракції 3 і α_{S1} -CN-8P у заштрихованій частині фракції 5 (рис. 4). Інші фракції містять суміші казеїнів. Так, хроматографічна фракція 1 включає β -CN-1P (f 29-209), β -CN-(f 106-209) і β -CN-(f 108-209) фрагменти; фракція 2 складається з одного головного і декількох мінорних фосфоглікопротеїдів κ -CN-1P; фракція 4 містить суміш α_{S2} -CN-13P, α_{S2} -CN-12P, α_{S2} -CN-11P і α_{S2} -CN-10P. Необхідно відзначити, що фракція 5 крім α_{S1} -CN-8P включає невелику кількість α_{S1} -CN-9P. Співвідношення кількості окремих білків в об'єднаних хроматографічних фракціях визначали спектрофотометрично, використовуючи раніше встановлені коефіцієнти поглинання $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ при 280 нм [1, 4].

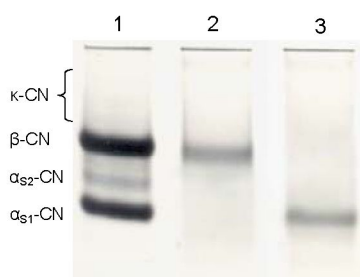


Рис. 4. Електрофореграма загального казеїну (1), а також хроматографічних фракцій, отриманих на ДЕАЕ-целюлозі (рис. 3): 2 — перша заштрихована фракція; 3 — друга заштрихована фракція.

Електрофорез у поліакриламідному гелі часто використовується для аналізу харчових сумішей, що містять загальний казеїн або його фракції. Рекомендований комітетом по номенклатурі, класифікації і методології молочних білків варіант електрофорезу дозволяє ідентифікувати всі фракції казеїнів [3]. Це дві фракції α_{S1} -CN, чотири фракції α_{S2} -CN, β -CN-5P, декілька фракцій κ -CN-1P і три великі фрагменти β -CN. Проте цей метод має певні недоліки. До них можна віднести: складність кількісної обробки даних; значні проблеми ідентифікації казеїнів у присутності інших харчових білків (особливо у багатокомпонентних сумішах); складність виділення окремих електрофоретичних фракцій для подальшого аналізу іншими методами; дороге обладнання і реактиви. Методи гелі-фільтрації та іонообмінної хроматографії володіють меншою роздільною здатністю, проте дозволяють точніше провести кількісний аналіз і є більш доступними. При цьому є можливість виділення білкових фракцій, які після діалізу і ліофілізації можуть бути використані для детальнішого аналізу іншими методами (імунохімічними, електрофоретичними, амінокислотним аналізом та ін.).

Висновки. За відсутності інших білків в харчових сумішах методами гелі-фільтрації та іонообмінної хроматографії можна ідентифікувати загальний казеїн, який найчастіше використовується в харчових продуктах і утворює характерні хроматографічні профілі. З окремих казеїнових фракцій методом гелі-фільтрації можна ідентифікувати κ -CN-1P в присутності низькомолекулярних харчових білків. Іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-целюлозі дозволяє ефективно ідентифікувати і виділити дві основні фракції казеїнів — α_{S1} -CN-8P і β -CN-5P.

ЛІТЕРАТУРА

1. Горбатова К.К. Химия и физика белков молока / К.К. Горбатова — М.: Колос, 1993. — 192 с.
2. Юкало В.Г. Двохстадійне фракціонування казеїну гелі-фільтрацією / В.Г. Юкало, Л.А. Сторож, Н.М. Барська // Молочна промисловість. — 2007. — №7. — С. 49–52.
3. Eigel W.N. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision / W.N. Eigel, J.E. Butler, C.A. Ernstrom // J. Dairy Sci. — 1984. — Vol. 67, № 8 — P. 1599–1631.

Розділ 1. Актуальні проблеми ... досліджень харчових продуктів

4. Farrell H.M. Nomenclature of the proteins of cows' milk — sixth revision / H.M. Farrell, R. Jimenez-Flores, G.T. Bleck // J. Dairy Sci. — 2004. — Vol. 87, № 6. — P. 1641–1674.
5. Meisel H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins / H. Meisel // Bio Factors. — 2004. — Vol. 21. — P. 55–61.
6. Ribadeau-Dumas B. Milk protein analysis / B. Ribadeau-Dumas, R. Grappin // Lait. — 1989. — Vol. 69, № 5. — P. 357–416.
7. Yukalo V.G. Obtaining of casein protein complex fractions from cow milk / V.G. Yukalo // Nutracos. — 2005. — № 5. — P. 17–19.

Надійшла до редакції 4.04.2011 р.