

БІОХІМІЯ

УДК 637.127.576.1

А.В. ЮКАЛО

Тернопільський національний технічний університет ім. Івана Пулюя
вул. Руська, 56, Тернопіль, 46001

ХРОМАТОГРАФІЧНІ І ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ КАЗЕЇНОВИХ ФРАКЦІЙ

У роботі наведено результати ідентифікації протеїнових фракцій у розчинах казеїну сучасними методами електрофорезу у поліакриламідному гелі та колонкової рідинної хроматографії. Встановлено недоліки та переваги кожного методу при визначенні протеїнів казеїнового комплексу. Дано рекомендації із застосування цих методів.

Ключові слова: казеїнові фракції, електрофорез у ПААГ, рідинна хроматографія

Казеїни є цінними природними харчовими протеїнами, які повністю відповідають класичним вимогам до харчових протеїнів (збалансований амінокислотний склад, доступність до дії протеаз шлунково-кишкового тракту). Крім цього, в останні роки встановлено, що казеїни є попередниками ряду біологічно активних пептидів, які можуть здійснювати регуляторну дію щодо серцево-судинної системи (казоплателіни, казокініни), нервової системи (казоморфіни, казоксини), травної системи (казофосфопептиди, глікомакропептиди), імунної системи (казоїмунопептиди, казоцидини) [2]. Відкриття казеїнових біоактивних пептидів дозволили розширити і більш об'єктивно оцінити значення казеїнів у формуванні біологічної цінності молочних продуктів, а також ряду інших продуктів, де казеїни використовують для підвищення вмісту протеїну і як структуроутворювач [1]. Новим перспективним напрямом використання казеїну і його фракцій є виділення природних біоактивних пептидів певної дії для створення функціональних продуктів.

Вказані сфери застосування казеїну і його фракцій, а також можлива заміна його менш цінними протеїнами зумовлюють необхідність розробки ефективних і доступних методів ідентифікації загального казеїну та його фракцій у сумішах протеїнів, а також за присутності інших харчових речовин. При цьому необхідно враховувати дані сучасної міжнародної класифікації протеїнів казеїнового комплексу [5].

Метою даної роботи є порівняльна характеристика методів ідентифікації загального казеїну та його фракцій у відповідності до діючої міжнародної класифікації казеїнів.

Матеріал і методи досліджень

Загальний казеїн виділяли із свіжого знежиреного коров'ячого молока шляхом осадження в ізоелектричній точці, промивали і розчиняли при $\text{pH} \leq 7,5$. Процедура переосадження повторювали тричі. Після інактивації природних протеаз молока отриманий препарат загального казеїну розчиняли у відповідних буферах для аналізу або виділення фракцій. Концентрацію протеїнів у препаратах казеїнів або хроматографічних фракціях визначали методом Лоурі або спектрофотометрично ($\lambda=280$) використовуючи наступні коефіцієнти

поглинання, які були встановлені раніше ($D_{\lambda_{max}}^{1\%}$): 10,0-для α_{s1} -CN, 4,6-для β -CN, 9,6-для κ -CN, 10,1-для α_{s2} -CN і 8,2 для загального казеїну.

Гомогенні фракції α_{s1} -CN і β -CN одержували диференційним переосадженням в ізоелектричній точці у присутності сечовини та доочищували іонообмінною хроматографією на колонках з ДЕАЕ – целюлозою (ДЕАЕ-52, «Serva», ФРН), як описано раніше [7]. Гомогенний κ -CN отримували гель-фільтрацією на колонці (2×70см) заповненій сефадексом G-150 («Pharmacia», Швеція) [3].

Фракційний склад загального казеїну та гомогенність його фракцій аналізували на вертикальних пластинках поліакриламідного гелю (ПААГ), як описано раніше [7]. Електрофореграми фіксували і фарбували загальноприйнятими методами. Електрофоретичні буфери і гелі готували використовуючи реактиви фірми «Reanal» (Угорщина).

Результати досліджень та їх обговорення.

Серед методів дослідження протеїнового 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 (6М сечовина) запобігати утворенню надмолекулярних структур казеїнів [6,7]. Відомо, що казеїни характеризуються вираженою тенденцією до агрегації в розчинах. В якості буферу використовували 0,001 М трис-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. 1.

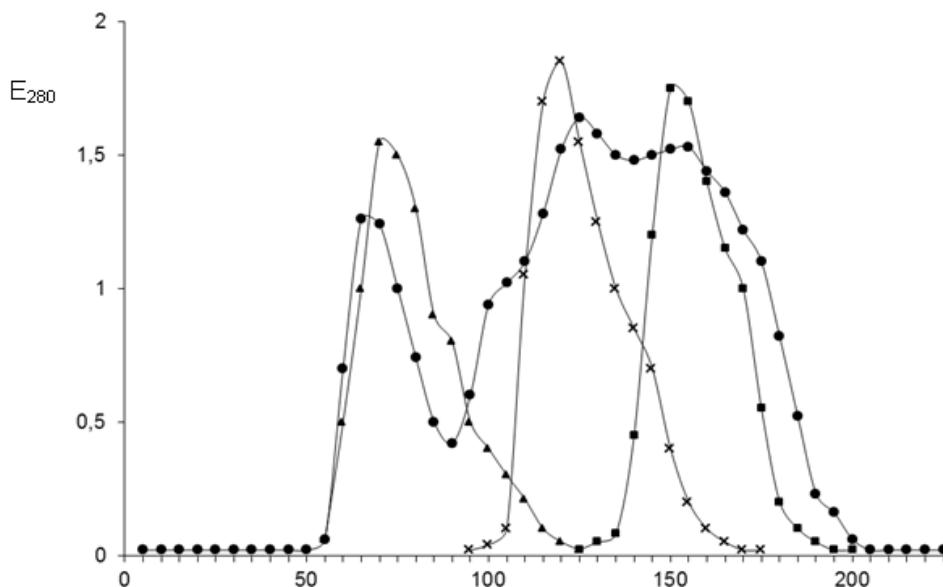


Рис. 1. Хроматограми загального кислотного казеїну (●), κ -CN-1P(▲), β -CN-5P(×) і α_{s1} -CN-8P(■), отримані на сефадексі G-150 у присутності сечовини

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 агрегати, що включають переважно 6 субодиниць. Такі агрегати 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.

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 зрівнювали буфером (0,01 М трис-НСІ, 3,9М 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_S -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. 2. Отримано характерне розділення казеїнових фракцій. Пробірки з елюатом, які входять до складу 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 протеїнів в об'єднаних фракціях. Електрофоретичний аналіз показав, що у двох хроматографічних фракціях (3 і 5) знаходяться гомогенні протеїни. Це відповідно β -CN-5P у заштрихованій частині фракції 3 і α_{S1} -CN-8P у заштрихованій частині фракції 5 (рис. 3). 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 фосфоглікопротеїнів 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 протеїнів в об'єднаних хроматографічних фракціях визначали спектрофотометрично, використовуючи раніше встановлені коефіцієнти поглинання $D_{1\%}^{1\text{cm}}$ при 280 нм.

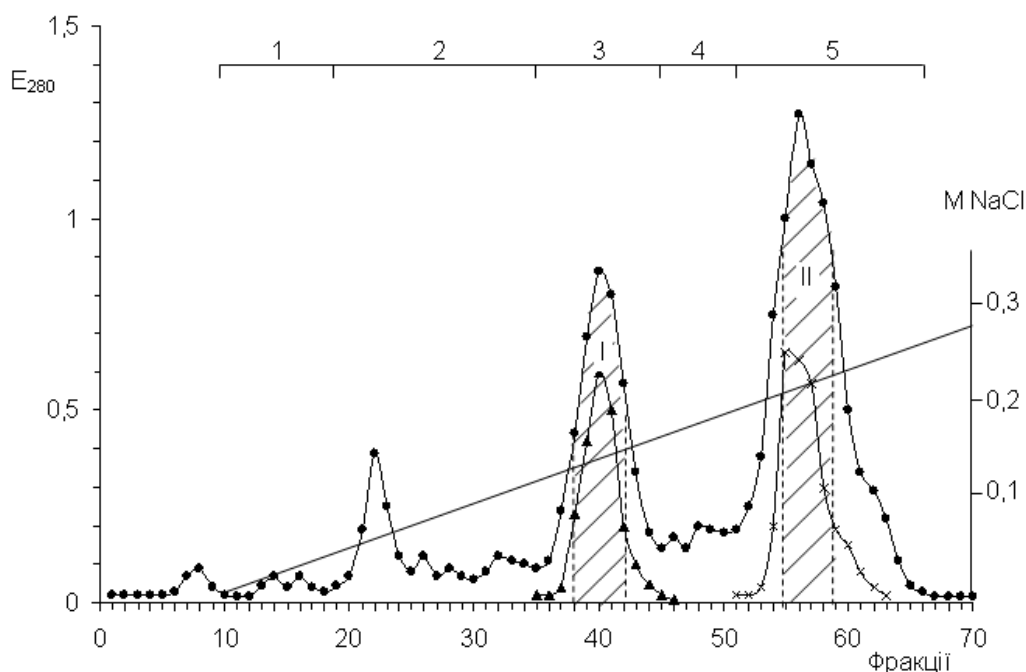


Рис. 2. Хроматограми загального казеїну (•), β -CN-5P(▲) і α_{S1} -CN-8P(×), отримані на ДЕАЕ-целюлозі. Лініями зверху позначені фракції, які відбирали для визначення казеїнових фракцій. Заштриховані ділянки використовували для електрофоретичного аналізу



Рис. 3. Електрофореграма загального казеїну (1), а також хроматографічних фракцій, отриманих на ДЕАЕ-целюлозі (рис. 2): 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 протеїнів варіант електрофорезу дозволяє ідентифікувати всі фракції казеїнів [4]. 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 протеїнів (особливо у багатокомпонентних сумішах); складність виділення окремих електрофоретичних фракцій для подальшого аналізу іншими методами; дороге обладнання і реактиви. Методи гель-фільтрації та іонообмінної хроматографії володіють меншою роздільною здатністю, проте дозволяють точніше провести кількісний аналіз і є більш доступними. При цьому є можливість виділення протеїнових фракцій, які після діалізу і ліофілізації можуть бути використані для детальнішого аналізу іншими методами (імунохімічними, електрофоретичними, амінокислотним аналізом та ін.).

Висновки

На підставі порівняльного аналізу методів рекомендуємо ідентифікувати, за відсутності інших протеїнів в харчових сумішах, методами гель-фільтрації та іонообмінної хроматографії загальний казеїн, який найчастіше використовується в харчових продуктах і утворює характерні хроматографічні профілі. З окремих казеїнових фракцій методом гель-фільтрації доцільно ідентифікувати κ -CN-1P в присутності низькомолекулярних харчових протеїнів. Іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-целюлозі дозволяє ефективно ідентифікувати і виділити дві основні фракції казеїнів – α_{S1} -CN-8P і β -CN-5P.

1. Горбатова К.К. Химия и физика белков молока / К.К. Горбатова — М.: Колос, 1993. — 192 с.
2. Юкало А.В. Протеїни казеїнового комплексу молока корів (*Bos taurus*) як попередники біологічно активних пептидів / А.В. Юкало, Л.А. Сторож, В.Г. Юкало // Біотехнологія — 2012. — Т. 5, № 4. — С. 21—33.
3. Юкало В.Г. Гель-фільтрація білків казеїнового комплексу молока / В.Г. Юкало // Медична хімія. — 2001. — №2. — С. 35—38.
4. 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.
5. 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.
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.

А.В. Юкало

Тернопольский национальный технический университет им. Ивана Пулюя

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ КАЗЕИНОВЫХ ФРАКЦИЙ

В работе представлены результаты идентификации протеиновых фракций в растворах казеина современными методами электрофореза в полеакриамидном геле и колоночной жидкостной хроматографии. Установлены недостатки и преимущества каждого метода при определении протеинов казеинового комплекса. Даются рекомендации по использованию этих методов.

Ключевые слова: идентификация казеиновых фракций, электрофорез в ПААГ, жидкостная хроматография

A. V. Yukalo

Ternopil Ivan Pul'uy National Technical University, Ukraine

CASEIN FRACTIONS IDENTIFICATION BY THE CHROMATOGRAPHIC AND ELECTROPHORETIC METHODS

Casein soluble protein fractions were identified using modern methods of PAAG electrophoresis and column liquid chromatography. Some advantages and disadvantages of these methods were shown. The recommendations for the applying of these methods were proposed.

Keywords: casein fractions identification, PAAG electrophoresis, liquid chromatography

Рекомендує до друку

Надійшла 22.07.2013

О.Б. Столяр

УДК 577.155.1

В.Г. ЮКАЛО, Р.А. ТКАЧУК

Тернопільський національний технічний університет ім. Івана Пулюя
вул. Руська, 56, Тернопіль, 46001

УТВОРЕННЯ ІНГІБІТОРІВ АНГІОТЕНЗИН ПЕРЕТВОРЮВАЛЬНОГО ЕНЗИМУ В ПРОЦЕСІ ПРОТЕОЛІЗУ α_{S1} -КАЗЕЇНУ ПРОТЕАЗАМИ ЛАКТОКОКІВ *L. LACTIS SSP. CREMORIS*

Моделльний протеоліз α_{S1} -казеїну було здійснено за участі протеолітичних ензимів лактококів і молокозгортального препарату «Фромаза». Низькомолекулярні пептиди виділяли методом гель-фільтрації на сефадексі G-25. Показано, що протеолітичні ензими протеїназо-позитивних штамів лактококів *L. lactis ssp. cremoris* у поєднанні з молокозгортальним препаратом здатні розщеплювати α_{S1} -казеїн з утворенням казокінінів.

Ключові слова: протеоліз, α_{S1} -казеїн, казокініни, лактококи, *L. lactis ssp. cremoris*, молокозгортальний препарат

Ще в кінці сімдесятих років минулого століття було встановлено, що окремі ферменти первинної структури протеїнів казеїнового комплексу молока, які звільняються у вигляді пептидів в процесі нормального травлення, можуть проявляти біологічну дію в організмі ссавців в період молочного живлення. Такий висновок було зроблено в результаті досліджень властивостей глікомакропептиду, який утворюється на початкових стадіях дії травних протеаз на казеїнові міцели. Виявилось, що глікомакропептид є інгібітором шлункової секреції і моторики. Пізніше було відкрито багато біоактивних пептидів казеїнового походження [1]. Зокрема, важливим джерелом таких пептидів є α_{S1} -CN, який становить більше 30% у складі