УДК 637.127.576

КІЛЬКІСНИЙ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ БІЛКІВ КАЗЕЇНОВОГО КОПЛЕКСУ

В. Г. Юкало, Б. І. Яворський, Л. А. Сторож, І. Є. Соловодзінська

Тернопільський державний технічний університет ім. І. Пулюя
*Львівський державний аграрний університет

Запропоновано методику для кількісного аналізу електрофореграм, яка дозволяє визначити вміст α_{S1}-CN, α_{S2} -CN, β-CN, к-CN і γ-CN фракцій після електрофоретичного розділення загального казеїну в лужній системі поліакриламідного гелю.

Ключові слова: КАЗЕЇН, ЕЛЕКТРОФОРЕЗ, КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ

Білки казеїнового комплексу коров'ячого молока місять чотири окремих фракції (α_{S1}-, α_{S2}-, β- і к-казеїни), які відрізняються первинною структурою і становлять відповідно приблизно 37, 10, 35 і 15 % від загальної кількості казеїну [1]. Група α_{S1}-казеїнів (до 40 % від кількості загального казеїну) включає один основний і один мінорний компонент. В α_{S2}-казеїні методом електрофорезу у лужній системі поліакриламідного гелю в присутності сечовини виявлено 5 компонентів, відносна електрофоретична рухливість яких знаходиться між α_{S1}- і β-казеїнами. Розрахунок кількості β-казеїнів в складі казеїнового комплексу ускладнюється внаслідок дії природного протеолітичного ферменту молока — плазміну. Цей фермент специфічно розщеплює β-казеїн з утворенням γ_1-, γ_2 і γ_3-казеїнів. К-казеїн суттєво відрізняється за будовою і властивостями від інших фракцій казеїну. На відміну від інших казеїнів, він є глікопротеїдом. к-казеїн володіє найменшою електрофоретичною рухливістю. Раніше нами була запропонована електрофоретична система для розділення та ідентифікації казеїнів [2]. При застосуванні лужної системи однорідного поліакриламідного гелю можна швидко і якісно розділити білки казеїнового комплексу відповідно до міжнародної класифікації [1]. У зв'язку з цим важливим є питання кількісної оцінки електрофореграм, одержаних цим методом. Метою роботи є розробка методу кількісного аналізу електрофореграм білків казеїнового комплексу молока.

Матеріали і методи

Загальний казеїн виділяли із знежиреного коров'ячого молока шляхом переосадження в ізоелектричній точці (pH 4,6) за умови інактивування природних протеолітичних ферментів молока [3]. Нативний казеїн отримували при розшаруванні системи «вода — білки молока — пектин». Розділення фаз відбувалось шляхом відстоювання суміші знежиреного молока і 6,5 % розчину пектину протягом двох годин при 4 ^{0}C [4]. Усі препарати білків ліофільно висушували і зберігали при температурі 4 ^{0}C.

Для аналізу білкової фази було використано лужну електрофоретичну систему (pH 7,9), яка включала 4,5 М сечовину [2]. Електрофоретичний буфер і гель готували, використовуючи реактиви фірми «Reanal» (Угорщина). Для ідентифікації казеїнів на електрофореграмах, як свідки було використано гомогенні фракції α_{S1}- і β-казеїнів, виділені в нашій лабораторії як описано в роботі [3].

Концентрацію білків у зразках для електрофорезу визначали спектрофотометрично за ступенем поглинання світла при довжині хвилі 280 нм на спектрофотометрі СФ-46, використовуючи встановлені раніше коефіцієнти поглинання ($Д_{1см}^{1\%}$) казеїнів [5].

Для кількісної обробки одержаних електрофореграм було створено програму в системі Matlab.

Результати й обговорення

Для виділення нативних міцел казеїну було використано принцип термодинамічної несумісності в системі «вода — білок — полісахарид» та встановлені раніше оптимальні концентрації компонентів систем [4]. Виділення казеїнових міцел проводили в дві стадії. На першій стадії проводили змішування знежиреного молока з розчином пектину. При цьому до 450 г знежиреного молока додавали 50 мл 6,5 % розчину пектину. Компоненти були попередньо охолоджені до 7 ^{0}С. Отриману суміш перемішували протягом 10 хвилин і переливали в ділильну лійку. Друга стадія процесу полягає в розділені фаз отриманої двохфазної системи. Розділення фаз відбувалось шляхом відстоювання суміші молока і пектину протягом двох годин при 4 ^{0}С. Після утворення фаз їх розділяли за допомогою ділильної лійки. Для електрофоретичного аналізу відібрані з білкової фази зразки ліофільно висушували і розчиняли в буфері. В якості контролю використовували загальний казеїн, який виділяли з цього знежиреного молока. Результати електрофорезу чотирьох різних зразків білкової фази показані на рис. 1. На електрофореграмі видно характерне розділення білків казеїнового комплексу коров'ячого молока, що відповідає міжнародній класифікації казеїнів. Аналіз зразків білкових фаз показує присутність у них всіх фракцій казеїну.

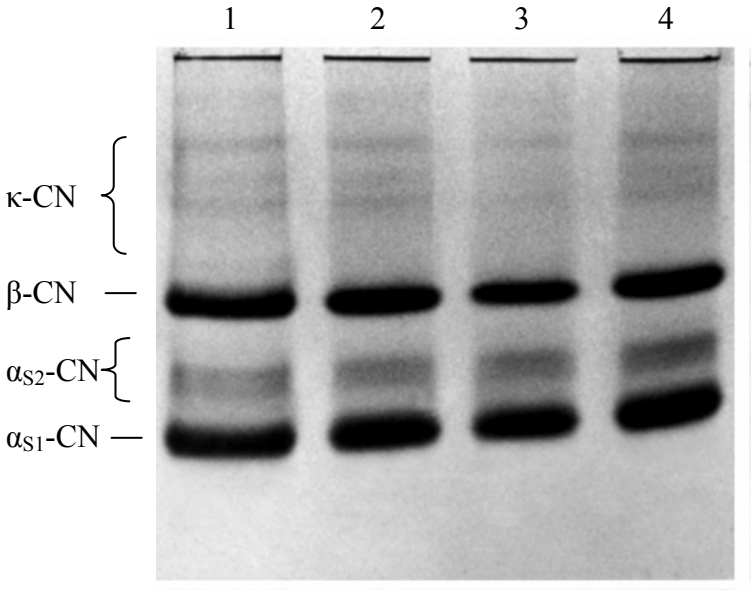

Рис 1. Електрофореграми чотирьох різних білкових фаз після розшарування системи «вода білки — молока — пектин»

Для визначення вмісту фракцій казеїну після електрофоретичного розділення було використано функцію зчитування графічних зображень imread [6]. З цією метою електрофореграму сканували на сканері *hp scanjet 2400*. Одержане зображення опрацьовували в програмі Adobe Photoshop 7.0. При цьому на електронному аналогові електрофореграми було виділено фрагмент шириною 1 піксель і збережено як файл Microsoft Windows Bitmap (BMP) в директорії 'e:/work/1.bmp','bmp' (файли можуть бути збережені також у форматі TIFF, JPEG, PNG).

Програма для визначення вмісту фракцій казеїну після електрофоретичного розділення на ПААГ має вигляд:

m=imread ('e:/work/1.bmp','bmp'); m=double(m); m=255-m; plot(m); s=0; a1=0; b1=10; n=0; for x=a1:b1; n=n+m(x); end; s=0; q=length(m); for x=1:q; s=s+m(x); and; x1=(n*100)/s; title(int2str(x)).

Для визначення вмісту певної фракції казеїну необхідно ввести значення a1 і b1, які на денситограмі (рис. 2) відповідають абсцисам окремих піків.

Денситограма електрофоретичного розподілу білкової фази 1 (рис. 1), одержана за допомогою програми, розробленої у системі Matlab, показана на рис. 2.

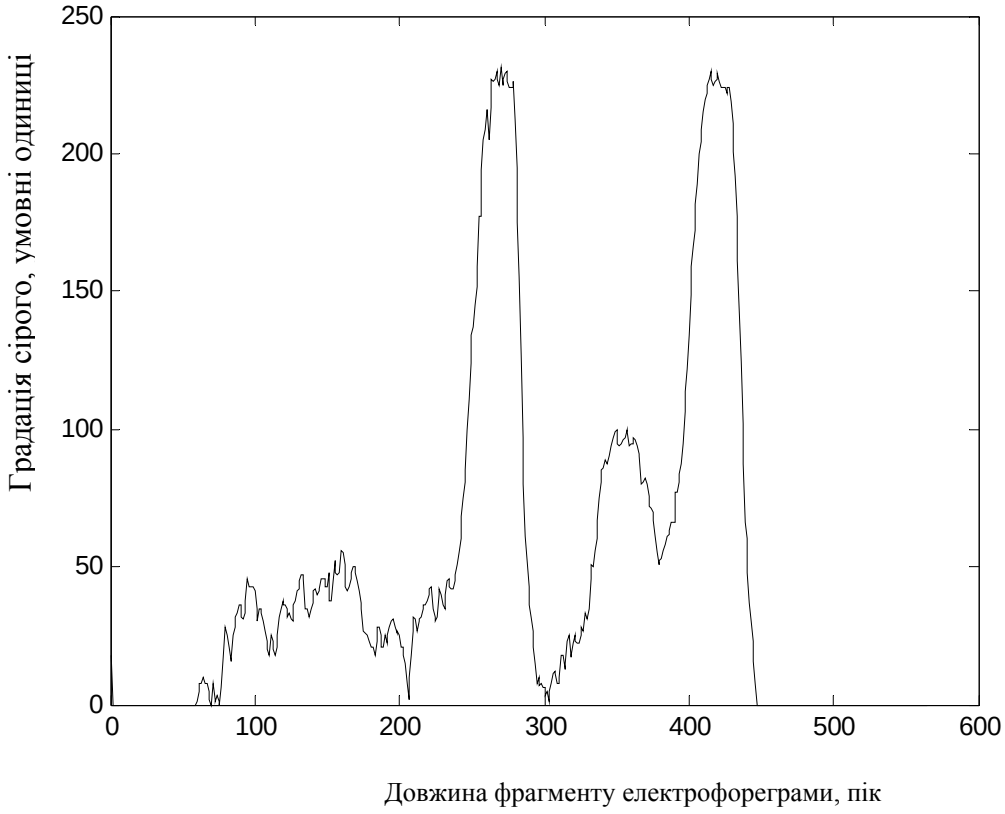

Рис.2. Денситограма електрофоретичного розділення білкової фази після розшарування системи «вода — білки молока — пектин» (рис. 1(1))

Результати розрахунків, одержані при виконанні наведеної вище програми, подані у таблиці 1.

Таблиця 1

Процентний вміст фракцій казеїну у білковій фазі за результатами кількісного електрофоретичного аналізу

Фракція	Зразки				Середнє значення
	1	2	3	4	
α_{S1}-CN	34	35	34	36	34,75
α_{S2}-CN	16	15	16	14	15,25

β-CN	31	32	33	33	32,25
κ-CN	15	14	15	14	14,50
γ-CN	4	4	3	3	3,50

Вміст фракцій казеїнів, визначений за допомогою запропонованого методу кількісного аналізу електрофореграм, узгоджується із середніми значеннями процентного вмісту різних казеїнів у складі загального казеїну.

Висновки

Запропонований кількісний метод електрофоретичного аналізу дозволяє швидко і достовірно опрацьовувати електрофореграми без застосування спеціального дорогого обладнання.

V. G. Yukalo, B. I. Yavorskyy, L. A. Storozh, I. Y. Solovodzins'ka *

QUANTITATIVE ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF CASEIN COMPLEX PROTEINS

S u m m a r y

Method for the quantitative analysis of the electrophoretic patterns was proposed. The method permit to determine α_{S1}-CN, α_{S2} -CN, β-CN, κ-CN and γ-CN fractions after alkaline polyacrylamide gel system electrophoresis of total casein.

Ternopil State Technology University named after I. Pulyu
Lviv State Agrarian University

1. *Farrell H. M., Jimenez-Flores R., Bleck G. T.* Nomenclature of the proteins of cows' milk — sixth revision // J. Dairy Sci. — 2004. — Vol. 87, № 6. — P. 1641–1674.

2. *Юкало В. Г.* Електрофорез білків молока // Медична хімія. — 2000. — Т.2, №4. — с. 79–82.

3. *Yukalo V. G.* Obtaining of casein protein complex fractions from cow milk // Nutracos. — 2005. — № 5. — P. 17–19.

4. *Tolstogusov V. B.* Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels // Food hydrocolloids. — 1995. — 9. № 4. — P. 317–332.

5. *Ribadeau-Dumas B., Grappin R.* Milk protein analysis // Lait. — 1989. — Vol. 69, № 5. — P. 357–416.

6. *Дьяконов В.* Matlab. Обработка сигналов и изображений. Специальный справочник. — Спб.: Питер., 2002. — 608с.