

УДК 277.3

ВИЗНАЧЕННЯ РІЗНИХ ФОРМ КАЗЕЇНУ У МОЛОЦІ МЕТОДОМ ДИСК-ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

Скалка В.В., Савчук О.М., Остапченко Л.І.

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: olexiy.savchuk@yahoo.com

Надійшла до редакції 10.03.2010

Стаття присвячена дослідженню к-казеїну, який разом з іншими типами казеїнів відіграє значну роль в формуванні фізико-хімічних характеристик молока, виконуючи стабілізуючу функцію при утворенні та існуванні казеїнових міцел молока. Також к-казеїн представляє собою досить цінний біотехнологічний продукт, його кількість в вихідному молоці слугує характеристикою якості даного виду сировини. Нами було показано, що к-казеїн в молоці знаходиться в складі тетрамерного комплексу з молекулярною масою 68 кДа. Розроблено методичні підходи, які дозволяють кількісно і якісно визначати к-казеїн в молоці.

Ключові слова: к-казеїн, електрофоретичні дослідження, тестування молочної продукції.

ВСТУП

Блок-білкові взаємодії – це процеси які визначаються особливостями структури і конформаційного стану протеїну в певний момент за даних умов. Саме ці взаємодії можуть змінювати функцію вихідних компонентів, надаючи новоутвореним комплексам інші характеристики. Яскравим прикладом такого процесу є взаємодія між молекулами казеїну в розчині молока.

За біохімічними властивостями саме к-казеїн є одним з найцінніших і найцікавіших білків. Особливу увагу к-казеїн привертає як об'єкт біотехнологічного використання. Коров'ячий к-казеїн – білок, який складається з 169 амінокислотних залишків, три з яких є фосфорильованими, 6 глікозильовані, що з'єднані з галактозою, N-ацетил-галактозоаміном та N-нейраміновою кислотою. Молекулярна маса поліпептидного ланцюга к-казеїну складає 19 кДа але в залежності від кількості глікозидних залишків може варіювати в досить широкому діапазоні. Завдяки наявності в структурі к-казеїну гідрофобної частини (пара-к-казеїн) та гідрофільної (глікомакропептид казеїну) він відіграє функцію стабілізатора казеїнових міцел і дає можливість казеїновим міцелам знаходитись в фазі розчину і не випадати в осад, крім того завдяки наявності фосфатних залишків к-казеїн також може зв'язувати молекулярний кальцій. Наявність двох (C11, C88) залишків цистеїну, які входять до складу поліпептидного ланцюга, обумовлюють здатність молекули к-казеїну ковалентно взаємодіяти з цистеїн-вмісними білками такими як β -лактоглобулін або полімеризуватись з іншими молекулами к-казеїну утворюючи при цьому ланцюги з молекулярною масою до 300 кДа [1, 3].

Біологічна цінність к-казеїну полягає в тому, що після ферментативної обробки з нього утворюється велика кількість біологічно активних пептидів, серед яких є фактори росту позитивної мікрофлори, антибактеріальні пептиди, пептиди, які інактивують бактеріальні токсини, опіюйдні антагоністи та багато інших [1, 4]. Для харчової промисловості к-казеїн є безцінним, адже саме його кількість в сировині визначає подальшу якість сирної продукції. Для сироваріння використовується пара-к-казеїн, який утворюється після ферментативної обробки хімозином і слугує стабілізатором консистенції сиру. В процесі виробництва сиру утворюється побічний продукт – це інша частина к-казеїну, а саме глікомакропептид, кількість якого в сироватці може сягати до 25% від загальної маси білків. Завдяки дуже низькому вмісту фенілаланіну і високому вмісту інших незамінних амінокислот, саме цей похідний к-казеїну успішно може використовуватись для виготовлення продуктів харчування, які призначені для хворих на фенілкетонурію [4].

Попередні дослідження показали, що ділянки електрофореграмі молока, які відповідають казеїнам, мають відмінні характеристики залежно від умов проведення диск-електрофорезу. Дане явище нами було більш детально досліджено на прикладі комерційних препаратів казеїнів та отриманих нами безпосередньо з коров'ячого молока.

Метою даної роботи було визначення різних форм казеїну за допомогою метода диск-електрофорезу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для наших досліджень було використано два зразки сумішей казеїну: препарат казеїну (Sigma, США) та отриманий методом кислотного осадження

казеїн з коров'ячого молока. Для отримання казеїну з молока використовувався 30% розчин оцтової кислоти. Після осадження казеїнову фракцію розчиняли у відповідному буфері в залежності від задачі дослідження.

Для отримання зразків, які містять білкову фракцію, з метою їх подальшого дослідження за допомогою диск-електрофорезу ми використовували комбінацію методів осадження білків за допомогою оцтової та трихлороцтової кислот [6].

З різних систем електрофоретичного поділу білків за молекулярною масою нами було обрано диск-електрофорез в модифікації методики Laemmli [2]. Електрофорез проводили на апараті Hoefler Mighty Small (Amersham Biosciences, США) за сили струму 19 мА для концентруючого та 35 мА для розділяючого гелів. Як маркери використовували: PageRules Prestained Protein Ladder (Fermentas), до якого входять такі білки: 170 кДа, 130 кДа, 100 кДа, 72 кДа, 55 кДа, 40 кДа, 33 кДа, 24 кДа, 17 кДа, 11 кДа. Гелі фарбували 0,125% розчином кумасі G-250 у 25% ізопропанолі та 10% оцтової кислоти.

Для відновлення дисульфідних зв'язків застосовували 2% розчин дітіотритулу [5].

Обробка отриманих методом диск-електрофорезу електрофореграм проводили використовуючи програму ImageMaster TotalLab v.2.01 (Amersham Biosciences).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами було проаналізовано препарати казеїну, які були отримані осадженням безпосередньо з молока та комерційний препарат виробництва Sigma (США). Для досліджень ми використовували метод диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі в системі Laemmli в двох варіантах: в стандартних умовах і при наявності дітіотритулу. Обробка фракції казеїнів розчином дітіотритула проводилась для того, щоб зруйнувати утворенні дисульфідні зв'язки між молекулами казеїнів. Обробка дітіотритулом дозволила отримати окремі молекули казеїнів, а не їх комплекси один з одним та з іншими білками.

Основними компонентами серед білків молока є казеїни які представлені 4 різновидами: α_{s1} -казеїн, якого більше всього в молоці (12-15 г/л), α_{s2} -казеїн (3-4 г/л), β -казеїн (9-11 г/л) і κ -казеїн, який в найменшій мірі представлений в молоці (2-4 г/л). Експериментально було підібрано оптимальні умови для проведення диск-електрофорезу з різними концентраціями білку в пробі. Для проведення електрофорезу використали зразки об'ємом 10, 15, 20 мкл. Після проведеного нами електрофорезу зразків казеїну на електрофореграмі ми виділили чітко 3 білкові зони, в пробах без додавання до зразка дітіотритулу і 4 - в зразках у присутності дітіотритулу (рис. 1).

Не залежно від попередньої обробки по відновленню зразків препаратів казеїну у всіх досліджуваних пробах на електрофореграмах спостерігались смуги які відповідали молекулярним

масам 27 і 25 кДа. Відповідні молекулярні маси є характерними для α -казеїну та β -казеїну, концентрація яких у вище вказаних смугах не змінювалась залежно від умов підготовки зразків, що підтверджує відсутність взаємодій між цими білками та іншими компонентами зразків за рахунок утворення дисульфідних зв'язків [1].

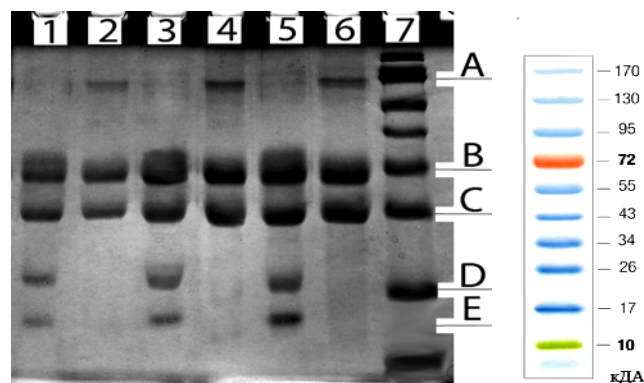


Рис. 1. Електрофореграма казеїну за різних умов:

1,3,5 – зразки казеїну попередньо оброблені дітіотритулом; 2,4,6 - зразки казеїну, які не проходили додаткової обробки, 7 - білкові маркери молекулярних мас: 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 10 кДа;

A - зона яка відповідає тетрамерному комплексу з молекулярною масою 68 кДа,

B – зона яка відповідає α -казеїну 27 кДа,

C- зона яка відповідає β -казеїну 25 кДа,

D – зона яка відповідає κ -казеїну 19 кДа,

E – зона яка відповідає γ -казеїну 11 кДа.

Аналіз зразків, які не проходили попередню обробку дітіотритулом показав, на електрофореграмі присутність смуги з молекулярною масою 68 кДа. Електрофорез таких самих зразків, але оброблених дітіотритулом, показав наявність нових двох смуг 19 кДа і 11 кДа. Враховуючи вищевказані результати, було зроблено висновок, що смуга молекулярною масою 68 кДа – це комплекс утворений за допомогою дисульфідних зв'язків. До такого роду взаємодій α -казеїну та β -казеїн не здатні оскільки до складу їхнього поліпептидного ланцюгу залишки цистеїну не входять [3]. Отримані результати дають підставу передбачити, що смуга на електрофореграмі з молекулярною масою 68 кДа, є тетрамерним комплексом, який утворюється в результаті взаємодії двох білків - κ -казеїну (19 кДа) та можливо γ -казеїну (11 кДа). З літератури відомо, що ці два білка мають у своєму складі залишки цистеїну, тому вони можуть утворювати комплекси завдяки появі дисульфідних зв'язків [3].

Сьогодні є відомим, що κ -казеїн утворює комплекси оскільки він єдиний серед казеїнів який містить залишки цистеїну. За однією з моделей структури казеїнових міцел κ -казеїн формує тримери в складі міцели, при цьому гідрофобно взаємодіючи своєю гідрофобною ділянкою (пара- κ -казеїн) з гідрофобними ділянками інших казеїнів. Гідрофільна ділянка κ -казеїн в такому комплексі ймовірно відіграє

роль стабілізатора і не дає коагулювати міцелам казеїну [1]. Але нами було показано, що крім 3 залишків κ-казеїну в комплекс входить ще один інший білок, який не відповідає параметрам κ-казеїну, але можливо він і відіграє роль стабілізатора структури самого тетраметра. Для пояснення цієї можливості необхідні більш детальні дослідження виявленого тетрамерного комплексу та 11 кДа білку.

Крім суто біохімічного інтересу підібрані нами умови проведення диск-електрофорезу підходять для вхідного аналізу молочної сировини на присутність різних типів казеїнів, яка використовується у виробництві сиру чи отриманні біологічних активних продуктів, прекурсором яких є κ-казеїн.

ВИСНОВКИ

Наші дослідження показали, що κ-казеїн в молоці знаходиться в складі тетраметра, молекулярною масою 68 кДа. Досліджений тетраметр складається з 3 молекул κ-казеїну і однієї протеїну молекулярною масою 11 кДа, який можливо є γ-казеїном. Дані результати дають можливість по іншому оцінити взаємодію між κ-казеїном та іншими білками в складі міцел молока. Комплекс методів, який був

використаний для отримання описаних нами результатів може бути використаний в промислових цілях для вхідного контролю молочної сировини, яка призначена для подальшого виробництва сирів.

Література

1. *Lawrence K. Creamer, Jeffrey E. Plowman Michael, Liddell J., Mark H. Smith, Jeremy P. Hill.* Micelle Stability: κ-Casein Structure and Function//Journal of Dairy Science. - 1998. - V. 81 p. 3004-3012.
2. *Laemmli K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4// Nature. - 1970. - V.227,N1 - p. 680-685.
3. *O'Donnella R., Holland J. W., Deeth H. C. Alewood P.* Milk proteomics// International Dairy Journal. - December 2004. - V14, Issue 12 – p. 1013-1023
4. *Sofia V. Silva, Xavier Malcata F.* Caseins as source of bioactive peptides//International Dairy Journal. - January 2005. - V.15, Issue 1 - p. 1-15.
5. *Галь Э., Медьешин Г., Верецкеи Л.* Электрофорез в разделении биологических молекул. – М.: Мир, 1982. – 448 с.
6. *Остерман Л.А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование – М.: Наука, 1981. – 286 с.

ТЕСТИРОВАНИЕ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА ПРИСУТСТВИЕ κ-КАЗЕИНА

Скалка В.В., Савчук А.Н., Остапченко Л.І.

Статья посвящена исследованию κ-казеина, который вместе с другими типами казеина играет значительную роль в формировании физико-химических характеристик молока, выполняя стабилизирующую функцию при образовании и существовании казеиновых мицелл молока. Также κ-казеин представляет собой достаточно ценный биотехнологический продукт и его количество в исходном молоке служит характеристикой качества данного вида сырья. Анализ его характеристик в молоке представляет собой весьма важный вопрос как с теоретической, так и с практической точек зрения. Нами было показано, что κ-казеин в молоке находится в составе тетрамерного комплекса с молекулярной массой 68 кДа. Разработаны методические подходы, которые позволяют количественно и качественно определять κ-казеин в молоке.

Ключевые слова: κ-казеин, электрофоретическое исследование, тестирование молочной продукции.

TESTING OF MILK PRODUCTS FOR THE PRESENCE OF κ-CASEIN

Skalka V.V., Savchuk O.M., Ostapchenko L.I.

Article is devoted to researching of κ-casein, which, together with other types of caseins plays a significant role in forming the physicochemical characteristics of milk perform a stabilizing function in the formation and existence of casein micelles of milk. Also, κ-casein is a very valuable biotechnological product and its quantity in milk serves as a quality characteristic of this type of material. Analysis of its characteristics in milk is a very important issue both from theoretical and practical perspectives. We have shown that κ-casein in milk is in tetramer complex with a molecular mass of 68 kDa. Methodical approaches that qualitatively and quantitatively determine the κ-casein in milk were developed.

Key words: κ-casein, electrophoretic research, testing of dairy products.