Секція: **Хімія. Хімічна, біологічна та харчова технології.**

УДК 577.112.083

Бобко О. – ст. гр. ХКм-51
Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

ВИДІЛЕННЯ к-КАЗЕЇНУ

Науковий керівник: д.б.н., професор Юкало В.Г.

У літературі описано ряд методів виділення к-казеїну із застосуванням методу диференційного осадження його солями, етанолом та використанням різних варіантів іонообмінної хроматографії на колонці та в об'ємі, а також комбінацією цих методів. На наш погляд, основним недоліком вказаних методів є вплив на к-казеїн екстремальних значень рН, іонної сили, а також денатуруючої дії органічних розчинників, що може призвести до змін у хімічному складі і просторовій структурі білка. Особливо чутливими є вуглеводневі компоненти к-казеїну. Крім того, вказані методи є довготривалими, що підвищує ймовірність денатуруючих змін у молекулах к-казеїну.

У зв'язку із сказаним привабливою для виділення к-казеїну залишається гель-фільтрація. Цей метод дозволяє проводити фракціонування білків в різних умовах, наближених до нативних. Відомо, що гель-фільтрація є малоефективною для аналізу і розділення білків казеїнового комплексу коров'ячого молока, що зумовлено подібністю їхньої молекулярної маси. Виключення становить лише к-казеїн, який може утворювати агрегати за рахунок міжмолекулярних дисульфідних зв'язків. Такі агрегати можуть мати молекулярну масу більше 100 000 Да і відповідно можуть бути відділені від інших казеїнів.

Враховуючи літературні дані, а також результати, отримані в нашій лабораторії раніше, для виділення к-казеїну було вибрано сефадекс G-150. Гель-фільтрацію свіжовиділеного загального казеїну проводили на хроматографічній колонці (1,5×70 см) без використання редукуючих реагентів. При проведенні гель-фільтрації відбирали по 2 мл елюенту. Перед нанесенням на колонку взірець загального казеїну розводили в хроматографічному буфері. В результаті розділення на хроматограмі видно перший пік (I), який виходить з об'ємом елюенту, що дорівнює вільному об'єму колонки, а також два виділені піки (II і III), які чітко не розділяються.

Об'єднані фракції піку I, а також об'єднані фракції виділених піків II і III використовували при проведенні електрофоретичного аналізу на пластинках ПААГ, а також для подальшої очистки. Для приготування електрофоретичних зразків відбирали аліквоти з об'єднаних фракцій кожного піку і діалізували проти дистильованої води при 7^0С у присутності консерванту. Після цього білки з кожного діалізного мішечка осаджували доведенням до ізоелектричної точки 0,1 Н хлоридною кислотою. Осаджені ізоелектрично білки центрифугували (3000 g, 15 хв), отриманий осад промивали дистильованою водою і розчиняли в буфері для електрофоретичних зразків. Для вимірювання концентрацій білків в отриманих зразках визначали оптичну густину при 280 нм на спектрофотометрі СФ-46. Для проведення електрофоретичного аналізу в комірку наносили по 9 мкл зразків. Контролем служив загальний казеїн, частину якого піддавали фракціонуванню на сефадексі G-150. Результати електрофорезу свідчать, що до складу першого піку входить в основному к-казеїн і сліди β-казеїну. Мінорні фрагменти β-казеїну з низькою електрофоретичною рухливістю і низькою молекулярною масою були відсутні.