

ХІМІЯ. ХІМІЧНА, БІОЛОГІЧНА ТА ХАРЧОВА ТЕХНОЛОГІЇ

CHEMISTRY. CHEMICAL, BIOLOGICAL AND FOOD TECHNOLOGYS

УДК 637.127.3.001.5

**В. Юкало, докт. біол. наук; Л. Сторож; В. Сельський, канд. біол. наук;
Н. Кушнірук**

Тернопільський державний технічний університет імені Івана Пулюя

ВИКОРИСТАННЯ ГРАДІЄНТУ CaCl_2 ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ $\alpha_{\text{S}2}$ -CN ФРАКЦІЙ КАЗЕЇНУ

Запропоновано метод виділення $\alpha_{\text{S}2}$ -казеїну з коров'ячого молока з використанням іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі в об'ємі. В порівнянні з традиційними способами фракціонування білків казеїнового комплексу метод має низку переваг. Він простий у виконанні і не потребує великих затрат часу. Вихід електрофоретично чистої фракції $\alpha_{\text{S}2}$ -казеїну складає близько 70 %.

V. Yukalo, L. Storozh, V. Sel'skyu, N. Kushniruk

THE USAGE OF CaCl_2 GRADIENT FOR ISOLATION OF $\alpha_{\text{S}2}$ -CASEINS FRACTIONS

Method of obtains $\alpha_{\text{S}2}$ -caseins from cow milk with the help of batch fraction on DEAE-cellulose have been proposed. The method has some preferences compared with the traditional approaches of the fractionation of casein protein complex. It is simple and quick in use. The recovery of electrophoretically pure was 70 %.

Згідно із сучасними уявленнями, білки казеїнового комплексу коров'ячого молока включають чотири основні фракції, які відрізняються за первинною структурою. Це $\alpha_{\text{S}1}$ -, $\alpha_{\text{S}2}$ -, β - і κ -казеїни. Крім того, α_{S} -казеїни можуть утворювати мінорні комбінації залежно від кількості фосфосеринових залишків [1]. Для виділення біологічно активних пептидів шляхом протеолізу, моделювання процесів протеолізу білків молока необхідно використовувати індивідуальні фракції казеїну [2, 3].

Найменш вивченим залишається $\alpha_{\text{S}2}$ -казеїн, який складає близько 10 % від загальної кількості. Методи, які використовувалися для виділення $\alpha_{\text{S}2}$ -казеїну, передбачали обробку казеїну 96% етанолом, концентрованим розчином ацетату амонію. При цьому виділений препарат містив значну кількість домішок $\alpha_{\text{S}1}$ -казеїну. Використання високих температур ($>80^{\circ}\text{C}$) при одержанні $\alpha_{\text{S}2}$ -казеїнів може привести до змін у структурі казеїну. Сучасні методи швидкої рідинної хроматографії під високим тиском, які застосовують в основному в аналітичних дослідженнях казеїнів, не дозволяють одержати значні кількості $\alpha_{\text{S}2}$ -казеїнів [4]. Класичні методи колонкової хроматографії не можуть забезпечити ефективного відділення $\alpha_{\text{S}2}$ -казеїнів від $\alpha_{\text{S}1}$ -казеїну, які мають подібні з ним властивості і становлять лише близько 10 % у складі загального казеїну [5, 4].

Метою даної роботи є виділення електрофоретично чистих $\alpha_{\text{S}2}$ -казеїнів коров'ячого молока.

Методи дослідження

Загальний казеїн коров'ячого молока виділяли без застосування екстремальних значень рН та іонної сили, як описано раніше [6]. Для інактивації природних протеаз отриманий препарат інкубували в розчині оцтової кислоти при рН 4,0 протягом п'яти годин при 4⁰С. Після інкубації осад загального казеїну тричі промивали надлишком дистильованої води, розчиняли при значеннях рН, що не перевищували 7,5, і висушували ліофільно. Одержаний загальний казеїн зберігали при 4⁰С.

Аналіз фракційного складу і гомогенність препаратів α_{S2} -казеїнів на різних стадіях виділення проводили за допомогою електрофорезу на пластинках поліакриламідного гелю в апараті Стадієра. При цьому використовувалась лужна буферна система гелю (рН 7,9), яка включала 0,025 М тріс, 0,027 М діетилбарбітурат, 0,003 М ЕДТА і 4,5 М сечовину. В комірки наносили по 10 мкл розчину казеїнів. Після електрофорезу пластинки фіксували в 7 %-му розчині оцтової кислоти і забарвлювали в 1 %-му розчині амідочорного 10 Б [7].

Фракціонування казеїнів в об'ємі проводили на ДЕАЕ-целюлозі (ДЕАЕ-52, "Serva").

Концентрацію фракцій казеїну визначали спектрофотометрично за поглинанням при 280 нм на спектрофотометрі СФ-46. При цьому використовували встановлені раніше коефіцієнти поглинання ($D_{1\text{cm}}^{1\%}$): 10,0 для α_{S1} -казеїну; 4,6 для β -казеїну; 9,6 для κ -казеїну; 10,1 для α_{S2} -казеїну і 8,2 для загального казеїну.

Результати і обговорення

Фракціонування загального казеїну в об'ємі на ДЕАЕ-целюлозі проводили при використанні 0,02 М ацетатного буферу (рН 6,45), що включав 3,3 М сечовину, 0,03 М ЕДТА і 0,01 М 2-меркаптоетанол. Такий буфер протидіє вираженій властивості казеїнів утворювати агрегати у розчинах при природних значеннях рН, а також утворенню дисульфідних зв'язків між молекулами α_{S2} - і κ -казеїнів, які містять залишки цистеїну. Включення ЕДТА до складу буферу необхідне для зв'язування іонів кальцію, що входять до складу міцел, і можуть впливати на процес зв'язування кальцію іонообмінником.

ДЕАЕ-целюлозу (10 г) після стандартної обробки зрівноважували з описаним буфером і змішували з препаратом ліофілізованого загального казеїну (2000 мг), розчиненого в цьому ж буфері. Після обережного перемішування протягом 25 хвилин при 10⁰С суміш фільтрували. Таку процедуру із залишками іонообмінника на фільтрі повторювали двічі з новими порціями буферу. Три фільтрати, одержані з буфером одного складу, об'єднували у фільтрат І. У подальшому залишок іонообмінника аналогічно інкубували з буфером, що включав ступінчасто зростаючі концентрації CaCl_2 (0,01 М, 0,02 М, 0,035 М і 0,05 М) і не містив ЕДТА.

Описане в літературі фракціонування загального казеїну в об'ємі на ДЕАЕ-целюлозі проводилось із використанням ступінчастої зміни концентрації NaCl в межах від 0 до 0,3 М, при рН 7,4 (0,01 М імідазол, 3,3 М сечовина, 0,002 М дитіотреїтол) [8]. З п'яти отриманих при цьому об'єднаних фракцій лише дві містили відносно чисті казеїни (κ -CN і β -CN). Решту включали два або три різні білки казеїнового комплексу. Можливо, це зумовлено великою різницею в концентраціях NaCl (до 0,085 М), який додавали в буфер на різних стадіях фракціонування. Крім того, у вказаній роботі відсутнє пояснення нерівномірності зміни інтервалу між концентрацією солей на різних стадіях (від 0,035 до 0,085 М).

Нами був використаний ступінчатий градієнт CaCl_2 для витіснення казеїнів з іонообмінника під час фракціонування. Іони кальцію є набагато ефективнішими, ніж іони натрію при іонообмінній хроматографії фосфопроїдів на аніонообмінниках [8]. Це дозволило знизити майже на порядок його концентрацію. До того ж, що іони кальцію є природними складниками казеїнових міцел [9].

Слід також відзначити, що екстракцію іонообмінника у відповідному буфері достатньо проводити 25 хвилин, а не 60, як відмічено в літературі [10]. За нашими спостереженнями після 25 хвилин концентрація білків в надосадовій рідині практично не змінювалася.

Провівши триразову екстракцію залишку іонообмінника ацетатним буфером без ЕДТА при відповідних концентраціях CaCl_2 , одержали об'єднані фільтрати II, III, IV і V. У фільтратах I-V спектрофотометрично визначили вміст білків, діалізували і ліофільно висушували. Фракційний склад казеїнів кожного фільтрату аналізували шляхом електрофорезу в ПААГ у лужній системі. Електрофореграми наведені на рис. 1.

Аналіз білкового складу фільтратів, одержаних при фракціонуванні загального казеїну коров'ячого молока в об'ємі на ДЕАЕ-целюлозі, показує, що фільтрат I включає із головних фракцій κ -казеїн і β -казеїн, а також продукти розпаду β -казеїну – γ -казеїни. Фільтрати II і III складаються з α_{S2} -казеїнів. Фільтрат IV містить суміш α_{S1} - і α_{S2} -казеїнів, фільтрат V включає тільки α_{S1} -казеїн. Причому α_{S2} - і α_{S1} -казеїни у фільтратах II, III і V є електрофоретично чистими.

Кількісна обробка результатів типового фракціонування 2000 мг загального казеїну на ДЕАЕ-целюлозі в об'ємі показана в таблиці 1. Для оцінки виходу гомогенних фракцій ми скористались середніми значеннями процентного вмісту різних казеїнів у складі загального казеїну. Для α_{S1} -, α_{S2} -, β - і κ -казеїнів вони становлять відповідно 38, 10, 39 і 13 % [11]. Враховуючи це, у представленому досліді вихід електрофоретично чистих фракцій α_{S1} - і α_{S2} -казеїнів становив близько 57 і 70 % від їхнього вмісту у складі загального казеїну.

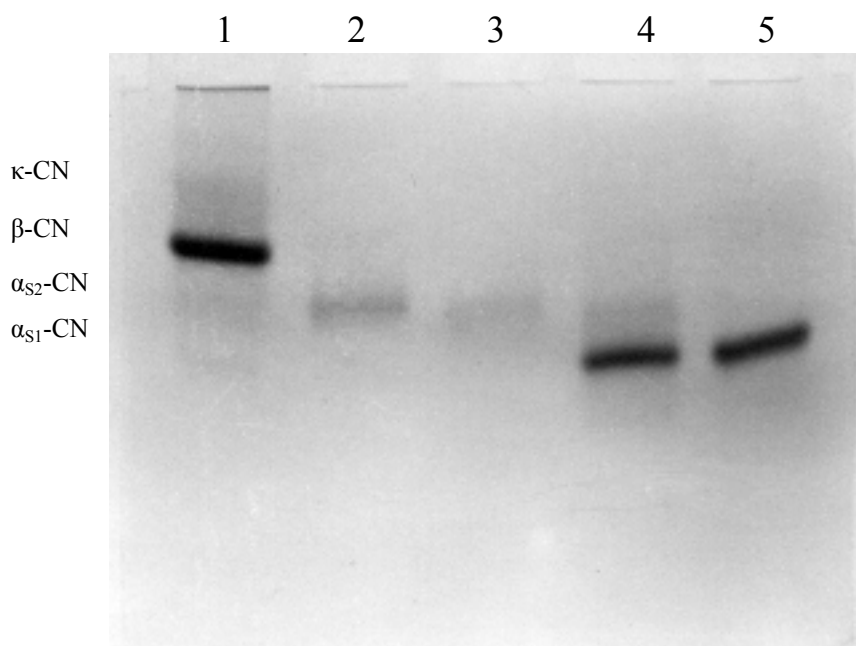


Рисунок 1 – Електрофореграми білків фільтратів 1(I), 2(II), 3 (III), 4 (IV), 5 (V), отриманих під час фракціонування загального казеїну на ДЕАЕ-целюлозі

Таблиця 1 – Процент виходу білкових фракцій при розділенні загального казеїну (2000 мг) на ДЕАЕ –целюлозі в об'ємі

Номер фракції	Концентрація CaCl ₂ в буфері, М	Фракція казеїну (за результатами електрофорезу)	Вихід	
			мг ¹	% ²
1	0	γ-CN β-CN κ-CN	735	
2	0,01	α _{S2} -CN	72	5,1
3	0,02	α _{S2} -CN	26	1,9
4	0,035	α _{S1} -CN α _{S2} -CN	267	
5	0,05	α _{S1} -CN	304	21,7
Всього отримано ліофілизованого казеїну			1404	70,2

Примітки:

1. Маса ліофілизованогої фракції після діалізу.
2. Визначали для гомогенних фракцій.

Висновки. Запропоновано метод фракціонування білків казеїнового комплексу коров'ячого молока на ДЕАЕ-целюлозі з використанням градієнту CaCl₂, який дозволяє виділити гомогенний α_{S2}-казеїн. Вихід електрофоретично чистої фракції α_{S2}-казеїну при використанні даного методу фракціонування становить 70 %.

Література

1. Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision // J. Dairy Sci. – 1984. – Vol. 67, № 8 – P. 1599-1631.
2. Юкало В.Г., Луговий Б.Л. Утворення антигіпертензивних пептидів при модельному протеолізі β-казеїну // Фізіол. журн. – 2000. – Т. 46, № 3. – С. 78-83.
3. Fiat A.M., Migliore-Samour D., Jolles P. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities // J. Dairy Sci. – 1993. – Vol. 76. – P. 301-310.
4. Davies D.T., Law J.R. Quantitative fractionation of casein mixture by protein liquid chromatography // J. Dairy. Res. – 1987. – 54, № 3. – P. 369-376.
5. Christensen T.M.E., Munksgaard. Quantitative fractionation of casein by precipitation or ion exchange chromatography // Milchwissenschaft. – 1989. – 44, №8. – P. 480-484.
6. Юкало В.Г., Луговий Б.Л. Характеристика методів препаративного виділення β-казеїну // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. – 1998. – №3-4. – С.27-29.
7. Юкало В.Г. Електрофорез білків молока // Медична хімія. – 2000. – Т. 2, № 4. – С. 79-82.
8. Wei T.M., Whitney R.M. Batch fractionation of bovine caseins with diethylaminoethyl cellulose // J. Dairy Sci. – 1985. – Vol. 68, № 7. – P. 1630-1636.
9. Fox P.F., Mc Sweeny P.L.H. Dairy chemistry and biochemistry. – London: Tomson Science, 1998. – 478 p.
10. Остерман Л.А. Хроматография белков и неклейновых кислот. – М.: Наука, 1985. – 536 с.
11. 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.

Одержано 14.08.2007 р.