

EXPRESS ANALYSIS OF COW MILK CASEINS

V. Yukalo, O. Krupa, L. Storozh

Ternopil Ivan Puluj National Technical University

Key words:

*Casein fractions
Express analysis
Electrophoresis
Identification*

Article history:

Received 12.09.2022
Received in revised form
26.09.2022
Accepted 18.10.2022

Corresponding author:

L. Storozh

E-mail:

lstorozh@gmail.com

ABSTRACT

Proteins of the casein complex are characterized by a high degree of heterogeneity (4 main fractions and more than a dozen minor ones). In recent years, the identifying of individual casein fractions has been very important during the composition analyzing of dairy protein products. This is due to the discovery of a large number of biologically active peptides which can be formed during proteolysis of caseins. Moreover, a certain fractional specificity of bioactive peptides is inherent for caseins. In addition, controlling of the casein fractional composition is important for production of dairy products, casein concentrates, substitutes for breast milk, as well as for establishing of the naturalness of dairy products.

In order to create an electrophoretic express system for the analysis of casein fractions, the analytical electrophoretic system of a homogeneous polyacrylamide gel (PAG) in the presence of urea and β -mercaptoethanol was used as a basis, as well as a previously proposed system which allowed the identification of only α_{S1} - and β -caseins. Homogeneous casein fractions with a high degree of purification were selected (α_{S1} -casein — 92%, β -casein — 95% and κ -casein — 94%) due to establish the location of casein fractions on the electrophoregrams. A differential precipitation, ion exchange chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration on Sephadex G-150 were used for this casein fractions selection.

As a result, an accessible electrophoretic express system was created for casein fractions analysis with using the plate of homogeneous PAG in the presence of urea and β -mercaptoethanol. This system allows reliable identification of α_{S1} - and β -caseins as well as a group of α_{S2} -caseins. The group of κ -caseins, due to the different content of oligosaccharides, does not form separate bands on the electrophoregram. The duration of electrophoresis is 55—65 minutes. With intensive diffuse washing of the gels, the main fractions of caseins can be identified in 45 minutes after staining. The electrophoretic express system is available and can be useful for batch analyses of casein and dairy protein products under industrial conditions.

ЕКСПРЕС-АНАЛІЗ КАЗЕЇНІВ КОРОВ'ЯЧОГО МОЛОКА

В.Г. Юкало, О.М. Крупа, Л.А. Сторож

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

Білки казеїнового комплексу характеризуються високим ступенем гетерогенності (4 основні фракції і більше десятка мінорних). В останні роки при аналізі складу білкових молочних продуктів важливим є питання ідентифікації окремих фракцій казеїну. Це пов'язано з відкриттям великої кількості біологічно активних пептидів, які можуть утворюватися в результаті протеолізу казеїнів. При чому для казеїнів характерна певна фракційна специфічність біоактивних пептидів. Також контроль фракційного складу казеїну є важливим при виробництві молочних продуктів, казеїну, замінників жіночого молока, при встановленні натуральності молочних продуктів.

Для створення електрофоретичної експрес-системи аналізу казеїнових фракцій за основу були взяті аналітична електрофоретична система однорідного поліакриамідного гелю (ПАГ) в присутності сечовини і β -меркаптоетанолу, також раніше запропонована система, яка ідентифікувала лише α_{S1} - і β -казеїни. Також для встановлення розміщення казеїнових фракцій на електрофореграмі було виділено гомогенні казеїнові фракції з високим ступенем очищення (α_{S1} -казеїн — 92%, β -казеїн — 95% і κ -казеїн — 94%). Для цього використовували диференційне осадження, іонообмінну хроматографію на ДЕАЕ-целюлозі і гель-фільтрацію на сефадексі G-150.

У результаті була запропонована доступна електрофоретична експрес-система для аналізу казеїну в пластинках однорідного ПАГ в присутності сечовини і β -меркаптоетанолу. Ця система дає змогу надійно ідентифікувати α_{S1} - і β -казеїни, групу α_{S2} -казеїнів. Група κ -казеїнів за рахунок різного вмісту олігосахаридів не утворює на електрофореграмі окремих смуг. Тривалість електрофорезу становить 55—65 хв. При інтенсивному дифузному відмиванні гелів основні фракції казеїнів уже можна ідентифікувати через 45 хв після проведення забарвлення. Електрофоретична експрес-система доступна і може бути корисною для серійних аналізів казеїну і молочних білкових продуктів в умовах виробництва.

Ключові слова: казеїнові фракції, експрес-аналіз, електрофорез, ідентифікація.

Постановка проблеми. Протеїни казеїнового комплексу молока становлять близько 80% від усіх протеїнів молока. Вони є основним джерелом амінокислот, в тому числі незамінних. Також натеper досконало вивчено протеоміку казеїну коров'ячого молока, встановлено первинну структуру всіх його фракцій, розміщення фосфосеринових і олігосахаридних груп (Fox, Uniacke-Lowe, McSweeney, & O'Mahony, 2015). Ці дані мали переважно теоретичне значення до відкриття у складі первинної структури казеїнів численних біоактивних пептидів (БАП), які можуть звільнятися за дії протеолітичних ферментів під час травлення казеїнів у шлунково-кишковому тракті або в процесі виробництва молочних продуктів

(Юкало, 2021). Ці пептиди позитивно впливають на різні фізіологічні системи організму і знаходять щоразу ширше застосування як функціональні інгредієнти при виробництві молочних продуктів. Казеїнові фракції характеризуються певною специфічністю як джерело БАП. Тому важливим завданням є отримання казеїнових фракцій, а також розроблення доступного методу їх ідентифікації на різних етапах виділення й очищення. Існуючі методи є або дуже довготривалими для аналізу великої кількості зрізів, або не забезпечують ідентифікацію всіх казеїнових фракцій. Тому розроблення ефективного і доступного експрес-методу для ідентифікації казеїнових фракцій є актуальним. Такий метод може бути корисним при з'ясуванні натуральності молочних продуктів.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. За останні десятиліття відкрито сотні біоактивних пептидів з усіх фракцій казеїнового комплексу. Такі пептиди позитивно впливають на серцево-судинну, нервову, травну та імунну системи організму. Встановлено певну специфіку біологічної дії пептидів з окремих казеїнових фракцій (табл. 1).

Таблиця 1. Розподіл біоактивних пептидів серед казеїнових фракцій за характером біологічної дії (Юкало, 2021)

Вид біологічної дії	Казеїнові фракції			
	α_{S1} -CN B-8P	α_{S2} -CN A-11P	β -CN A ² -5P	κ -CN A-1P
Агоністи опіатних рецепторів	3	—	8	—
Антагоністи опіатних рецепторів	1	—	1	6
Інгібітор АПЕ	28	17	54	6
Імуномодуляторна дія	6	1	9	4
Мінералзв'язувальна дія	11	13	12	1
Антитромботична дія	—	—	1	6
Антидіабетична дія	1	2	9	—
Антимікробна дія	4	10	4	4
Антиканцерогенна дія	2	—	2	—
Антиоксидантна дія	5	—	—	—
Регуляція виділення травних соків	—	—	—	2
Антиконвульсант	1	—	—	—

Значна частина цих пептидів уже використовується в складі функціональних харчових продуктів (Phelan, Aherne, FitzGerald, & O'Brien, 2009). Окремі групи казеїнових БАП отримують у результаті протеолізу загального казеїну молока (антигіпертензивні пептиди, фосфопептиди) (Nongonierma, O'Keefe, & FitzGerald, 2016). Проте подальший прогрес у питанні казеїнових БАП пов'язаний з виділенням та ідентифікацією індивідуальних очищених фракцій.

Сучасні методи протеоміки молока і, зокрема, білків казеїнового комплексу (двовимірний електрофорез, високоефективна рідинна хроматографія, мас-спектрометрія) є занадто дорогими і складними для аналізу численних зрізів в умовах виробництва. У зв'язку з цим більш привабливими є значно дешевші і доступніші методи електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПАГ) (Sharma та ін., 2017). Серед них для аналізу казеїнів використовувались різні варіанти електрофорезу: нативний диск-електрофорез, електрофорез в присутності додецилсульфату натрію або сечовини, електрофорез у градієнтному гелі. Найкращі резуль-

тати було отримано в аналітичній анодній системі ПАГ в присутності сечовини (Юкало, 2007). Проте ця методика вимагає великих затрат часу. Експрес-варіант цієї методики дав змогу надійно ідентифікувати лише основні α_{S1} - і β -казеїнові фракції (Iukalo, 2015).

Мета дослідження: розробка експрес-електрофоретичної системи для ідентифікації казеїнових фракцій коров'ячого молока.

Матеріали і методи. Для досліджень використовували загальний казеїн, який виділяли подвійним ізоелектричним осадженням із знежиреного молока, отриманого з ПрАТ «Тернопільський молокозавод».

Концентрацію загального казеїну і його очищених фракцій визначали спектрофотометрично в ультрафіолетовій області спектру при довжині хвилі 280 нм. Для обчислення концентрацій казеїнів у взірцях використовували такі коефіцієнти поглинання ($D_{1\%}^{1\text{cm}}$): 8,2 — для загального казеїну; 10,0 — для суміші α_{S0} - і α_{S1} -казеїнів; 4,6 — для β -казеїну; 9,6 — для суміші κ -казеїнів (Fattell та ін., 2004).

Аналітичний електрофорез у пластинках поліакриламідного гелю для встановлення складу препарату загального казеїну, а також контроль гомогенності казеїнових фракцій проводили за методом, описаним раніше (Юкало, 2007). Фіксування і фарбування пластинок ПАГ після проведення електрофорезу проводили загальноприйнятими методами. Для побудови денситограм з отриманих електрофореграм використовували функцію зчитування графічних зображень *imread*, як було описано в праці (Юкало, 2007).

Гель-фільтрацію на сефадексі G-100 fine фірми «Pharmacia» (Швеція) проводили на колонках з набору для рідинної хроматографії «Reanal» (Угорщина). Концентрацію білків у хроматографічних фракціях визначали спектрофотометрично.

Для іонообмінної хроматографії казеїнових фракцій використовували ДЕАЕ-целюлозу ДЕ-52 фірми «Serva». При цьому створювали градієнт концентрацій NaCl від 0,0 до 0,27 М.

Для приготування ПАГ і буферних розчинів для електрофорезу, гель-фільтрації та іонообмінної хроматографії були використані реактиви фірми «Reanal» (Угорщина) та «Sigma» (США), а також реактиви вітчизняного виробництва марки «хч» і «осч».

Результати і обговорення. При створенні експрес-електрофоретичної методики для ідентифікації білкових фракцій важливим питанням є точне визначення їх розміщення на електрофореграмі. Для цього потрібні високоочищені індивідуальні фракції казеїну. Проведений у нашій лабораторії аналіз індивідуальних фракцій молочних білків, які пропонують різні фірми біохімічних реактивів, а також літературні дані свідчать, що вони не є електрофоретично гомогенні (Мажка та ін., 2013). Тому на першому етапі наша робота була направлена на виділення таких фракцій.

Високоочищені фракції β - і α_{S1} -казеїнів отримували комбінацією диференційного осадження в присутності сечовини та іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі. Хід диференційного осадження і виділення β - і α_{S1} -казеїнів показані на схемі (рис. 1).

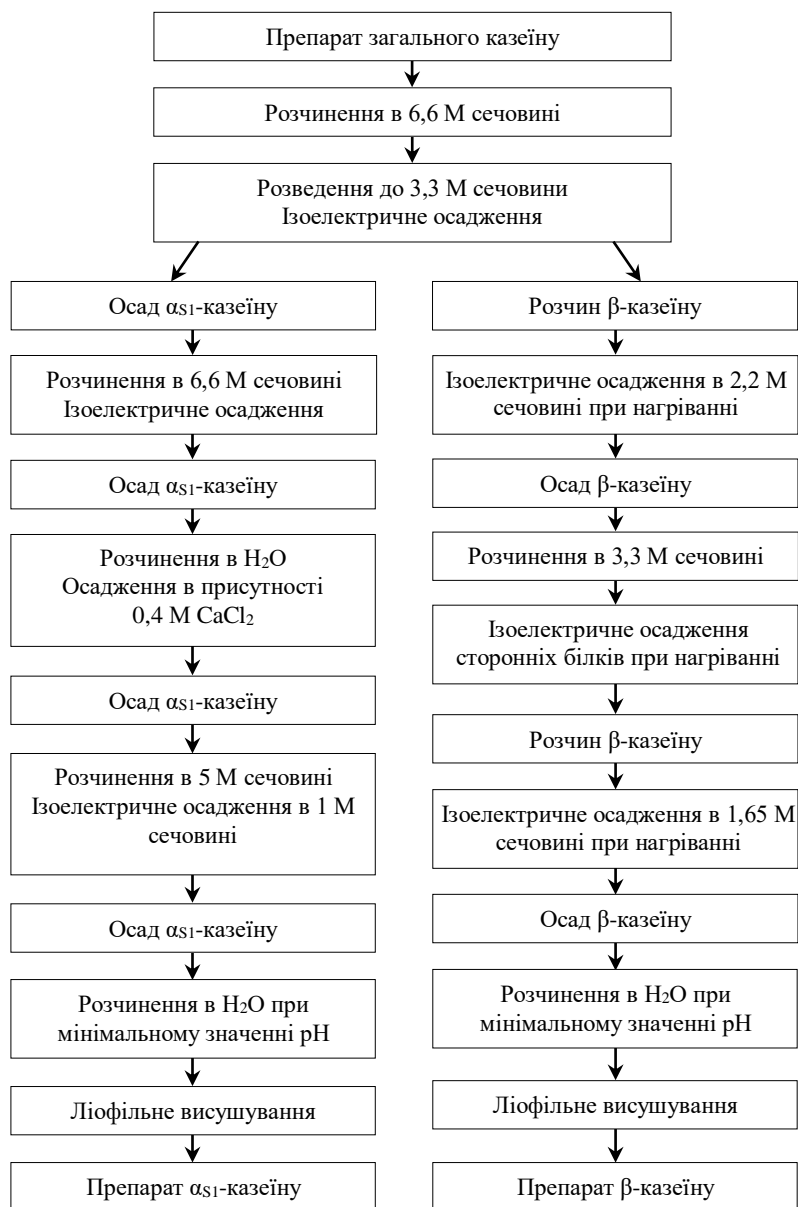


Рис. 1. Схема виділення препаратів β- і α₁-казеїнів

Отримані ліофілізовані препарати α₁- і β-казеїнів характеризували на гомогенність аналітичним електрофорезом. Денситограма електрофореграми α₁-казеїну (рис. 2, графік 1) свідчить про присутність у препараті домішок усіх фракцій α₂-казеїнів. Їх кількість становить близько (14±2)% від загальної кількості білків препарату, також присутні сліди α₀-казеїну, який характеризується високою електрофоретичною рухливістю в цій електрофоретичній системі. На денситограмі електрофореграми β-казеїну помітні фракції κ-казеїну, а також фрак-

цій α_{S2} -казеїнів з меншим вмістом фосфосеринових груп (рис. 2, графік 2). Вміст білкових домішок у препараті становить $(12 \pm 2)\%$.

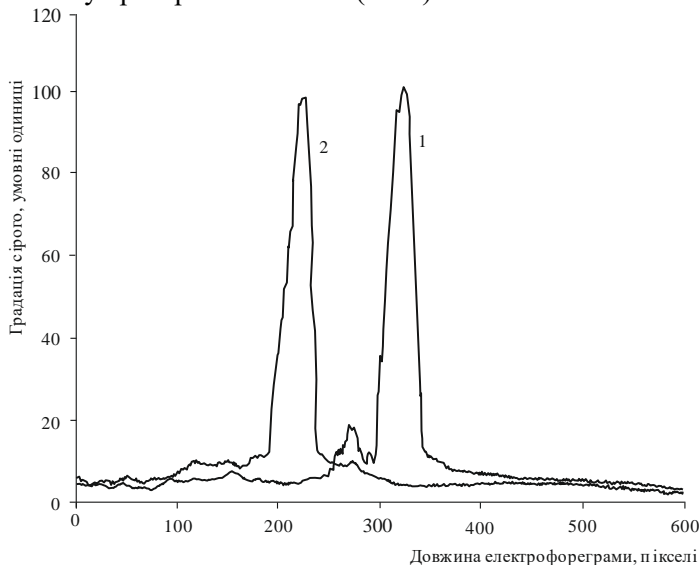


Рис. 2. Денситограма препаратів α_{S1} -казеїну (1) і β -казеїну (2), виділених диференційним осадженням в присутності різних концентрацій сечовини

Подальше очищення препаратів α_{S1} - і β -казеїнів проводили з допомогою іонообмінної хроматографії (ІОХ) на колонках з ДЕАЕ-целюлозою. За літературними даними ІОХ на аніонообмінниках в присутності сечовини є ефективним методом розділення і, відповідно, очищення казеїнових фракцій (Fox, Uniacke-Lowe, McSweeney, & O'Mahony, 2015). Для обох препаратів використовували однакові умови ІОХ, а саме хроматографічний буфер (рН 7,0), що включав 0,01 М гістидин і 3,3 М сечовину, а також градієнт концентрацій NaCl (0,0—0,27 М).

Об'єднані фракції кожного препарату об'єднували, діалізували, висушували ліофільно й аналізували на гомогенність аналітичним електрофорезом у присутності сечовини. Денситограми препаратів β - і α_{S1} -казеїнів після очищення іонообмінною хроматографією показані на рис. 3.

Розрахунок на основі денситограм показує, що препарат α_{S1} -казеїну містить $(7 \pm 1)\%$, а β -казеїн $(4 \pm 1)\%$ інших білків. Також для ідентифікації казеїнових фракцій було виділено очищений препарат κ -казеїну. Для цього було використано з деякими модифікаціями метод повторної гель-фільтрації на сефадексі G-150, запропонований раніше (Юкало, 2007).

Електрофоретичний аналіз отриманого препарату κ -казеїну показав високий ступінь його гомогенності. Вміст інших фракцій казеїнового комплексу (переважно це α_{S1} -казеїни і фрагменти β -казеїну) становить $(5 \pm 1)\%$.

Отримані препарати α_{S1} -, β - і κ -казеїнів мають достатньо високий ступінь гомогенності і вони були використані для ідентифікації казеїнових фракцій при розробці експрес-електрофоретичної системи.

За основу для розробки електрофоретичної експрес-системи була взята раніше описана аналітична система електрофорезу в ПАГ у присутності сечовини

іβ-меркаптоетанолу, а також експрес-система без β-меркаптоетанолу (Юкало, 2007; Iukalo, 2015). Аналітична система дає змогу ідентифікувати всі відомі фракції білків казеїнового комплексу, включаючи також фрагменти β-казеїну, які ще називають γ-казеїнами.

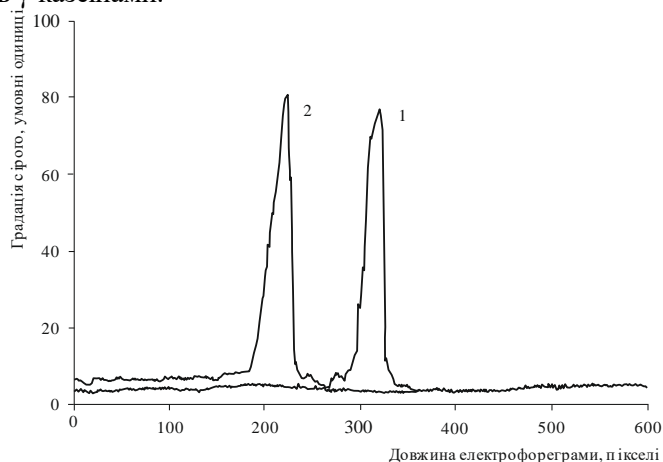


Рис. 3. Денситограми препаратів α_{S1}-казеїну (1) і β-казеїну (2) після очищення на ДЕАЕ-целюлозі

Основним недоліком цієї системи є висока тривалість аналізу, відносно великі розміри пластинок ПАГ і тому значний розхід реактивів. В умовах виробництва важливо провести швидку ідентифікацію білкових фракцій. Експрес-система дає змогу швидко (до 4 год) отримати результати аналізу фракційного складу казеїну. Проте надійно ідентифікувати можна лише основні α_{S1}- β-казеїнові фракції. Причому в цій системі α_{S1}-казеїн має подібну електрофоретичну рухливість до одного з генетичних варіантів β-лактоглобуліну сироватки молока. Дві інші важливі гетерогенні групи казеїнів α_{S2}- і κ-казеїни не розділяються в системі та представлені на електрофореграмах суцільними смугами. Очевидно, це пов'язано з відсутністю у складі гелю β-меркаптоетанолу. Відомо, що α_{S2}- і κ-казеїни містять залишки цистеїну у своїй первинній структурі та здатні утворювати міжмолекулярні дисульфідні зв'язки. Це призводить до утворення агрегатів й ускладнює їх ідентифікацію на електрофореграмах.

Зважаючи на викладене вище, пропонується експрес-система, в якій ПАГ має концентрацію 3,3% для пришвидшення електрофорезу, містить β-меркаптоетанол і має дещо зменшене значення рН — 8,1. Зменшення рН може запобігти дефосфорилуванню фосфосеринових залишків казеїнів. Тривалість самого електрофорезу в такій системі збільшено до 55—65 хв. Для досягнення ефекту концентрування буфер для взірців залишаємо низької концентрації, як в аналітичній системі.

Для ідентифікації окремих фракцій під час експрес-електрофорезу паралельно із загальним казеїном аналізували індивідуальні очищені фракції α_{S1}- β- і κ-казеїнів. Результати показані на денситограмі (рис. 4).

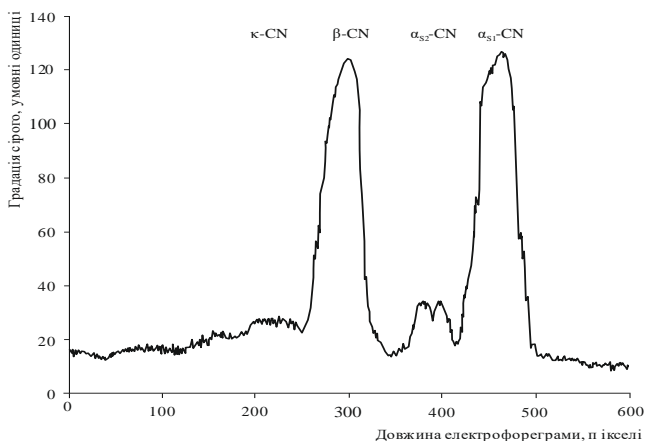


Рис. 4. Денситограма загального казеїну, отримана в експрес-електрофоретичній системі в присутності β -меркаптоетанолу

Отримані результати свідчать, що запропонована експрес-система дає змогу надійно ідентифікувати α_{s1} -, α_{s2} - і β -казеїни. κ -казеїни не утворюють чітких смуг. Це пов'язано з тим, що їх гетерогенність визначається не лише за рахунок утворення дисульфідних зв'язків, а в основному кількістю і складом олігосахаридних груп (Sharma та ін., 2021). В аналітичному варіанті електрофорезу ця фракція теж представлена великою кількістю смуг. Отже, запропонована експрес-електрофоретична система поєднує переваги аналітичної системи і при цьому дає змогу швидко ідентифікувати основні фракції казеїнового комплексу молока. Запропонована система електрофорезу може бути корисна при виробництві білкових молочних продуктів, казеїну, казеїнатів. Оскільки в цих продуктах також можуть бути білки сироватки молока, то в подальшому було б важливо встановити їх розміщення на електрофореграмах цієї експрес-системи.

Висновки

1. Запропонована електрофоретична експрес-система в однорідному поліакрил-амідному гелі, яка дає змогу ідентифікувати дві основні фракції казеїнів — α_{s1} - і β -казеїни, а також групу α_{s2} -казеїнів у молочних білкових системах. Тривалість самого аналізу становить 55—65 хв. При інтенсивному дифузному відмиванні гелів вже через 45 хв можна ідентифікувати основні казеїнові фракції.

2. Розміщення основних казеїнових фракцій на електрофореграмах було підтверджено використанням спеціально виділених електрофоретично гомогенних казеїнів: α_{s1} -, β - і κ -казеїнів. Ступінь очищення їх становить більше 92% для α_{s1} -казеїну, 95% для β -казеїну і 94% для κ -казеїну.

Література

Юкало, В. Г. (2021). *Біологічна активність протеїнів і пептидів молока: монографія*. Тернопіль: Вид-во ТНТУ імені Івана Пулюя.

Юкало, В. Г. (2007). *Білки казеїнового комплексу коров'ячого молока та продукти їх протеолізу за дії ферментів молочнокислих бактерій*. (Дис. докт. біол. наук). Інститут біології тварин НААН, Львів.

Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., ..., Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87 (6), 1641—1674. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6.

Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015) *Dairy Chemistry and Biochemistry* (Second Edition). New York: Springer.

Iukalo, A. V. Identification of protein fractions of milk cows casein complex. (2015). *The Ukrainian Biochemical Journal*, 87 (4), 87—91. doi:https://doi.org/10.15407/ubj87.04.087.

Majka, G., Śpiwak, K., Kurpiewska, K., Heczko, P., Stochel, G., Strus, M., & Brindell M. (2013). A high-throughput method for the *quantification of iron saturation in lactoferrin preparations*. *Analytical and Bioanalytical Chemistr*, 405 (150), 5191—5120. doi: 10.1007/s00216-013-6943-9.

Nongonierma, A. B., O'Keeffe, M. B., & FitzGerald, R. J. (2016). Milk Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides. In: McSweeney, P. L. H., O'Mahony J. A. (Eds.) *Advanced Dairy Chemistry — Volume 1B: Proteins: Applied Aspects* (4th edn.). New York: Springer.

Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R. J., & O'Brien N. M. (2009). Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*. 19 (11), 634—654. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.06.001.

Sharma, N., Sharma, R., Rajput, Y. S., Mann, B., Sight, R., & Gandhi, K. (2021). Separation methods for milk proteins on polyacrylamide gel electrophoresis: Critical analysis and options for better resolution. *International Dairy Journal*, 114, 104920. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104920.