

Модификация метода диск-электрофореза для контроля количества фракций казеина в молоке

Гунькова П.И., Гуньков С.В., Горбатова К.К.

qvurk65@ mail.ru

Санкт-Петербургский государственный университет
низкотемпературных и пищевых технологий

В настоящее время известно, что качество и выход белковых молочных продуктов определяются фракционным составом казеина. В работе приведено сравнение существующих методов определения фракций казеина, определены их недостатки и предложена модифицированная методика для контроля количества фракций казеина в молоке.

Ключевые слова: диск-электрофорез, количество γ -казеина, фракции казеина.

Modification of disc-electrophoresis method to control the amount of casein fractions in milk

Gunkova P., Gunkov S., Gorbatova K. qvurk65@mail.ru

Saint-Petersburg State University of Low Temperature and Food Technology

The quality and output of protein dairy products are known to be determined by the fractional composition of casein. The paper represents comparison of currently available methods of determining of casein fractions and shows their downsides. A modified technique to control the amount of casein fractions in milk is proposed.

Keywords: disc-electrophoresis, γ - casein amount, casein fractions

Как известно из литературных источников, качество и выход белковых молочных продуктов определяются фракционным составом казеина. Низкий выход продуктов обусловлен, в большой степени, высоким содержанием в молоке γ -казеина, теряющегося с сывороткой.

В нашей стране и за рубежом существуют несколько методов количественного определения фракций казеина: метод Е.А. Ждановой и И.Н. Влодавца с применением электрофореза на бумаге, метод К. Буткуса и В. Буткене с применением гель-хроматографии, метод К. Буткуса и А.Антавичуса с применением диск-электрофореза, метод японского исследователя Igarashi с применением электрофореза в полиакриламидном геле [1,2,3,4].

Разработанные методы определения фракций казеина имеют существенные недостатки: некоторые из них недостаточно точны, а некоторые очень сложны в исполнении. Поэтому возникла необходимость в разработке метода определения γ - и других фракций казеина в молоке.

Среди имеющихся методов определения фракций казеина, с нашей точки зрения, наибольший интерес представляют электрофоретические методы. В связи с этим мы провели сравнение двух методов аналитического электрофореза (диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС) и электрофореза с мочевиной) для анализа фракций казеина.

Диск-электрофорез в присутствии 0,1 % ДДС проводили в 16 % полиакриламидном геле [5]. Проба содержала 1 – 5 мкг белка в трис – HCl буфере pH 6,8, содержащем 2% ДДС и 5 % β -меркаптоэтанола. Параллельно проводили электрофоретическое разделение белков с известным молекулярным весом.

Электрофорез в полиакриламидном геле с мочевиной проводили согласно методике, предложенной Дейвисом и Орнстейном (Davis D. J. 1964, Ornstein L., 1964).

В ходе эксперимента исследовали: цельное молоко, обезжиренное молоко, сыворотку, полученную после осаждения белков 1N раствором уксусной кислоты и казеин.

Электрофорез исследуемых проб в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии мочевины при кислотном pH не позволил достаточно четко выявить все фракции казеина в исследуемом молоке.

Электрофорез в ПААГ с ДДС позволил четко выявить гетерогенность казеина и обнаружить колебания столь важной для белковых молочных продуктов фракции γ -казеина в исследуемых пробах молока.

Для количественного определения фракций казеина на цифровом изображении геля путем экстраполяции определяли соответствующие им полосы (рис.1). Для этого линейкой измеряли длину пробега R_f маркерных белков и строили калибровочную кривую, представляющую собой зависимость длины пробега маркерных белков от логарифма их молекулярной массы ($R_f = f(\lg M.M)$). Далее, зная молекулярную массу искомым фракций, по калибровочной кривой находили их длину пробега R_f . Узнав длину пробега искомым фракций, находили на геле нужные полосы.

Количественную оценку γ -казеина проводили с помощью компьютерной программы Scion Image, которая осуществляет цифровую обработку изображений полосок. Количество искомым фракций казеина зависит от интенсивности окраски соответствующей полосы на геле и выражается в квадратных пикселях (px^2).

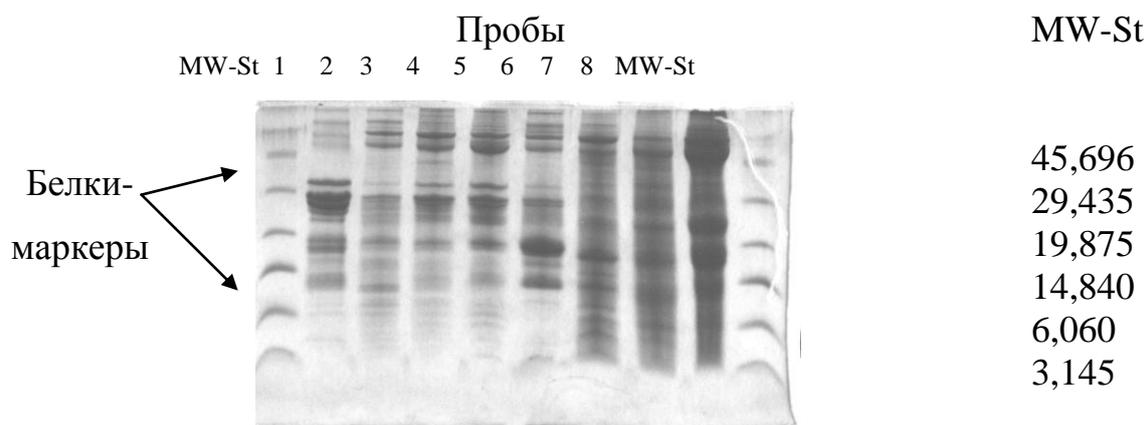


Рис. 1. Цифровое изображение окрашенного геля с нанесенными образцами белка

Анализ электрофореграмм сыворотки молока показывает практически полное отсутствие основных фракций казеина в ней (зона белков с молекулярным весом 22 – 24 кДа) и значительное количество белка в области γ -казеинов (белки с молекулярным весом 11,5 – 20,5 кДа).

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлено, что метод диск-электрофореза в ПААГ с ДДС превосходит метод электрофореза в ПААГ с мочевиной как метод анализа фракционного состава молока.

Поэтому для количественного определения фракций казеина предлагаем использовать метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле со следующими изменениями:

- при подготовке образцов молока не осаждают казеин и сывороточные белки, а использовать нативные белки обезжиренного молока без его обработки;
- проводить электрофорез в присутствии 0,1 % ДДС в 16 % полиакриламидном геле, состав исследуемой пробы: 1 – 5 мкг белка в трис – HCl буфере pH 6,8, содержащем 2% ДДС и 5 % β -меркаптоэтанола;
- окрашивать гель красителем Кумасси бриллиантовый голубой вместо раствора бромтимолового синего;
- количественную оценку фракций белков проводить не с использованием сканирующего денсиметра, а с помощью компьютерной программы Scion Image — по интенсивности окраски полосок на геле.

Список литературы

1. Буткус К., Буткене В. Фракционирование молочных белков путем фильтрования через гель декстрана // Тр. Литовского филиала ВНИИМСа, 1971.-Т. VI.-С. 121-132;
2. Дьяченко П.Ф., Алексеева Н.Ю. Исследование состава

казеинаткальцийфосфатного комплекса молока // Молочная промышл. - 1968. - № 8. - С. 11-14;

3. *Крусь Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В.* Методы исследования молока и молочных продуктов / Под общ. Редакцией А.М. Шалыгиной. - М.: Колос, 2000.-368с;

4. *Igarashi Y.* A method for determination of γ -casein and its use for investigating proteolysis in bovine milk // J. Dairy Res. - 1989. - V. 56. - P. 619 – 629;

5. *Schagger G., Von Jagow G.* Tricine – sodium dodecylsulphate – polyacrilamide gel electrophoresis for the serration of proteis in the range from 1—100 kDa.// Anal. Biochem., 1987, 166, p. 368—379.