

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВ НАЦИОНАЛЬНОГО МЯГКОГО СЫРА
ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

ҰЛТТЫҚ ЖҰМСАҚ ІРІМШІКТИҢ АҚУЫЗЫН ЭЛЕКТРОФОРЕТИКАЛЫҚ ӘДІСПЕН
ТАЛДАУ

INVESTIGATION OF PROTEINS OF KAZAKH NATIONAL SOFT CHEESE BY
ELECTROPHORESIS METHOD

М.К. АЛИМАРДАНОВА¹, Т.К. КУЛАЖАНОВ¹, Н. ЖЕКСЕНБАЙ¹, В. СКАЛКА², М. ПЛОЦКОВА²
М.Қ. АЛИМАРДАНОВА¹, Т.Қ. ҚҰЛАЖАНОВ¹, Н. ЖЕКСЕНБАЙ¹, В. СКАЛКА², М. ПЛОЦКОВА²
M.K. ALIMARDANOVA¹, T.K. KULAZHANOV¹, N. ZHEXENBAY¹, V. SKALKA², M. PLOCKOVA²

(¹Алматынський технологический университет, г. Алматы

²Химико-технологический институт, г. Прага)

(¹Алматы технологиялық университеті, Алматы қ.

²Химия технологиялық институты, Прага қ.)

(¹Almaty Technological University, Almaty

²Institute of Chemical Technology, Prague)

E-mail: nurshash1@mail.ru

В статье рассмотрены результаты исследования белков электрофоретическим методом ПЛАГ. Образцы национального мягкого сыра из смеси коровьего и козьего молока были исследованы на полиакриламидном геле шестикратной повторности, с содержанием 10%, 12,5%, 15%, 17% и 20% полиакриламидного геля. Установлен наиболее подходящий полиакриламидный гель для лучшего разделения белков национального мягкого сыра, с помощью которого можно определить – из какого молока сделан сыр или другие молочные продукты.

Бұл мақалада электрофоретикалық әдістің нәтижелері талданған. Ешкі және сиыр сүтінің қоспасымен жасалған ұлттық жұмсақ ірімшік сынамалары 10%, 12,5%, 15%, 17% және 20% полиакриламидтік геледе алты рет қайталанумен орындалған. Ірімшіктің ақуыздарын бөлуге ең қолайлы полиакриламид гелі анықталған. Ақуыздардың құрамына қандай малдың сүтінен жасалған өнім екенін анықтай аламыз.

The article describes the results of a study of protein electrophoretic method. Samples of national soft cheese from a mixture of cow's and goat's milk were investigated in 10%, 12.5%, 15%, 17% and 20% polyacrylamide gel. Established suitable polyacrylamide gel for a marketing better separation of proteins national soft cheese. By means of which could be determined from what milk is the cheese made or other dairy products.

Ключевые слова: электрофоретический метод, национальный мягкий сыр, козье молоко.

Негізгі сөздер: электрофоретикалық әдіс, ұлттық жұмсақ ірімшік, ешкі сүті.

Key words: electrophoretic method, the national soft cheese, goat's milk.

Введение

Электрофоретический метод исследования белка является быстроразвивающимся методом. Результаты электрофореза можно обрабатывать из полученных цифровых изображений геля с помощью сканера или прибора с тепловизором. Количественную оценку белков можно осуществить с помощью

компьютерной программы Total Lab 100, которая осуществляет цифровую обработку изображений полосок [1].

Электрофорез в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия (ДДС-Na, C₁₂H₂₅OSO₃Na) позволяет фракционировать белки в зависимости от значений только одного параметра — их

молекулярной массы. Для этого белки в исходном растворе препарата обрабатывают не менее чем трехкратным избытком ДДС-Na. За счет гидрофобных взаимодействий детергент примерно одинаково связывается с подавляющим большинством белков в соотношении 1,4 мг ДДС-Na на 1 мг белка [2]. Одновременно с обработкой ДДС-Na необходимо обеспечить полную денатурацию белка и разрыв всех S—S-связей. С этой целью белковый препарат обрабатывают высокой концентрацией β-меркаптоэтанола при повышенной температуре [3].

Пробоподготовка включает экстракцию и солиubilизацию белкового образца, который свободен от примесей и имеет общую концентрацию белка, пригодного для электрофореза. Качество подготовки проб может сильно повлиять на качество данных результата. Солиubilизация белка - процесс,

разрушающий взаимодействия в агрегации белков, такие как: дисульфидные связи, водородные связи, ван-дер-Ваальса, ионные и гидрофобные связи [4].

Для однозначного определения молекулярной массы белка по скорости его миграции при электрофорезе бывает целесообразно распрямить полипептидную цепочку белка и придать ей жесткость. Именно такой прием используется при электрофорезе белков, обработанных додецилсульфатом натрия. Для этого белки в исходном растворе препарата обрабатывают не менее чем трехкратным избытком ДДС-Na. За счет гидрофобных взаимодействий детергент примерно одинаково связывается с подавляющим большинством белков в соотношении 1,4 мг ДДС-Na на 1 мг белка [2].

Основные фракции молочного белка приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Основные фракции белков молока [6, 7, 8, 9]

Белки	Изоэлектрическая точка	Молекулярная масса
α-Казейн	4.1	23,000
κ-Казейн	4.1	19,000
β-Казейн	4.5	24,000
γ-Казейн	5.8-6.0	-
α-Лактальбумин	5.1	14,437
β-Лактоглобулин	5.3	18,000
Лактоферрин	-	87,000

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили 3 вида сыра из смеси козьего и коровьего молока и 3 контрольных вида сыра, все с разным временем созревания:

S 1 – Сыр из смеси козьего и коровьего молока (21 сутки созревания),

S 2 – Сыр из смеси козьего и коровьего молока (14 суток созревания),

S 3 – Сыр из смеси козьего и коровьего молока (7 суток созревания),

S 4 – Сыр из коровьего молока – контроль (21 сутки созревания),

S 5 – Сыр из коровьего молока – контроль (14 суток созревания),

S 6 – Сыр из коровьего молока – контроль (7 суток созревания).

В 20 мг каждого образца добавили 200 μл ДДС-Na (10%), 100 μл EDTA (0,5 Н), натрия гидроксида (0,85 Н), 700 μл дистиллированной воды и встряхивали в течение 1 часа при 70 °С. Затем центрифугировали при 4 °С со скоростью 14000 об/мин в течение 14 минут, после

удалили супернатант. Для осаждения белка добавили 300 μл осаждающего раствора (трихлоруксусная кислота 50 г., дитиотреитол 200 мг., ацетон 50 мл.) и центрифугировали со скоростью 14000 об/мин в течение 14 минут при 7 °С. Промыли фильтрат 2 раза, 1 мл промывочным раствором (дитиотреитол 200 мг, ацетон 100 мл) и центрифугировали на обороте 14000 в течение 14 минут при 7 °С, постоянно выливая промывочный раствор. Окрашивание и приготовление геля проводили по протоколу Laemmli [10]. Электрофоретический анализ в присутствии 0,1% ДДС проводили в 10%, 12,5%, 15%, 17% и 20% полиакриламидном геле в шестикратной повторности. Использовались 2 маркера разных производителей:

- Thermo scientific (MTS) с белками молекулярной массой 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 кДа.

- Bio-Rad (MBR) с белками молекулярной массой 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10, 5, 2 кДа.

Photoshop CS (AdobeSystems) использовались для регулировки яркости, настройки контрастности изображений геля (рис.1).

TotalLab 100 был использован для анализа цифрового изображения 12,5% полиакриламидного геля.

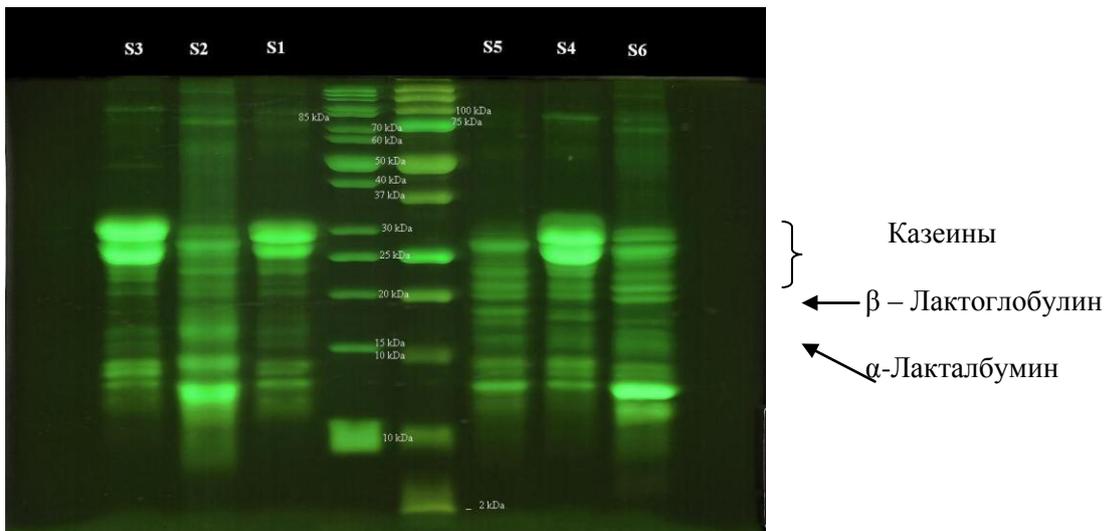


Рисунок 1 - Цифровое изображение окрашенного геля (12,5%) с нанесенными образцами белка и маркеры MTS и MBR.

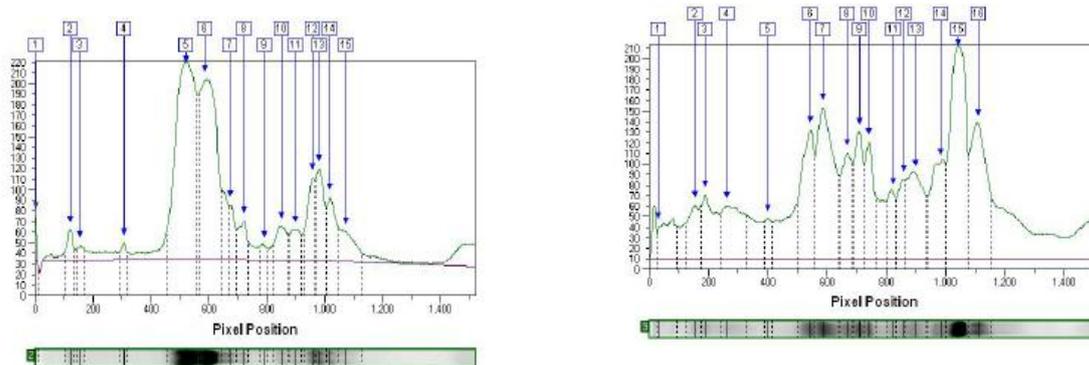


Рисунок 2 - Анализ электрофореграммы сыров из смеси козьего и коровьего молока и контроль из коровьего молока с созреванием 7 суток

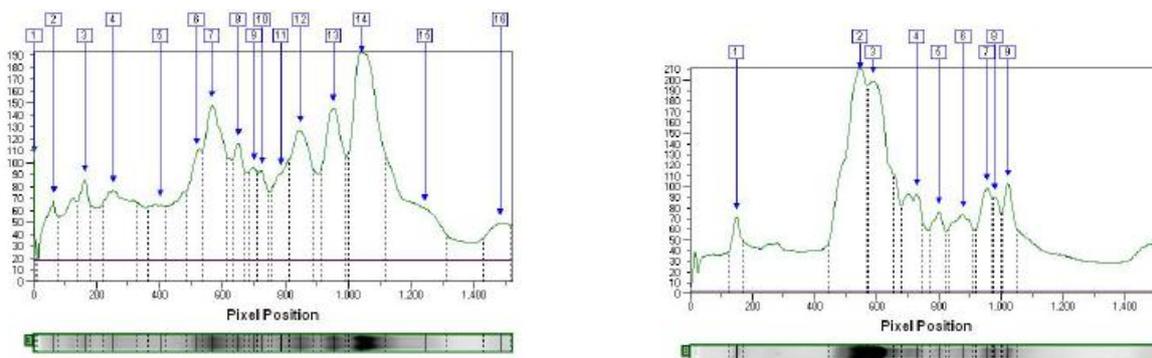


Рисунок 3 - Анализ электрофореграммы сыров из смеси козьего и коровьего молока и контроль из коровьего молока контроль с созреванием 14 суток

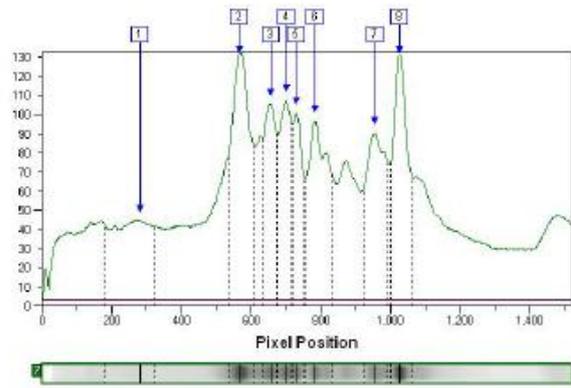
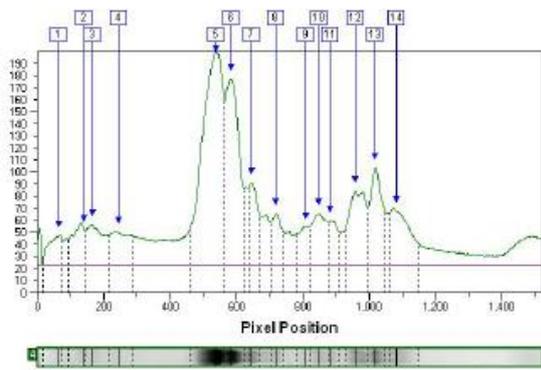


Рисунок 4 - Анализ электрофореграммы сыров из смеси козьего и коровьего молока и контроль из коровьего молока контроль с созреванием 21 суток

Результаты и их обсуждение

Белки были определены согласно их молекулярной массе в сравнении с маркером. Обработка результата с помощью программного обеспечения Totallab Quant дает возможность определить точное положение белка на геле относительно маркеров. Анализ электрофореграммы сыров на 7 сутки созревания (рис. 2) показывает наибольшее количество основных фракций казеина в них (зона белков с молекулярным весом 22 – 24 кДа) и незначительное количество сывороточных белков (белки с молекулярным весом 18 – 14,5 кДа). Электрофореграммы сыров (анализируемый и контроль) на 14 и 21 сутки созревания (рис. 3 и 4) также не отличались. Количество искомым фракций казеина зависит от интенсивности окраски соответствующей полоски на геле и выражается в оптической плотности. С помощью образцов с известной концентрацией фракций белка можно составить градуировочную кривую и определить фракцию белка в сырах количественно.

Выводы

1. Наилучшее разделение фракции белков национального мягкого сыра было на 12,5% полиакриламидном геле.
2. При созревании в течении 21 суток при температуре 4 °С, в национальных мягких сырах, изготовленных из коровьего и его смеси с козьим молоком, значительного изменения в составе фракции белка не происходит.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hui-Chung W., Chien-Chang Y., Wen-Huei Ts., Han-Min Ch. A red line not to cross: Evaluating the limitation and properness of gel image tuning procedures // *Analytical Biochemistry*. - 2010, January. - Vol. 396, issue 1. - PP. 42-50.
2. Rabilloud T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses // *Electrophoresis*. – 1996. – Vol. 17. – PP. 813-829.
3. Reynolds A., Tanford C. Binding of Dodecyl Sulfate to Proteins at High Binding Ratios. Possible Implications for the State of Proteins in Biological Membranes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*.- 1993. - Vol. 66, № 3. – PP. 1002-1003.
4. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. - 288 с.
5. Sodini I., Morin P., Olabi A., Jiménez-Flores R. Compositional and Functional Properties of Buttermilk: A Comparison Between Sweet, Sour, and Whey Buttermilk // *Journal of Dairy Science*. - Vol. 89, issue 2. - 2006, February. – PP. 525-536.
6. Boros V. Influence of the lactation period on variations in the levels of certain components of

bulked goat's milk // *International dairy federation bulletin*. – 1986. - № 202. – PP. 81-100.

7. Nguyen H.A., Skelte G., Anema, P.H., Fanny G., Wong M. Effect of adding low levels of β -mercaptoethanol on the disulphide bonds of κ -casein and β -lactoglobulin solutions // *International Dairy Journal*. – 2012, September. – Vol. 26, issue 1. – PP. 78-82.

8. Assenat L. “Le lait de brebis. Composition et propriétés” in “Laits et Produits Laitiers. Vache. Brebis. Chevre.” I. Ed. F.M. Luquet. *Technique et Documentation – Lavosier APRIA*. Paris. 1985. - PP. 46-53.

9. Mens P. Le. “Propriétés physico-chimiques nutritionnelles et chimiques” In *Laitset Produits Laitiers. Vache. Brebis. Chevre*. I. Ed. F.M. Luquet. *Apria*. Paris. 1985. - PP. 25-31.

10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*– 1970. – Vol. 227. - PP. 680 - 685.