

Yu.I. Senyk, B.Z. Lavrin, I.Yu. Nayko, O.B. Ostapyuk, D.V. Hayduk, V.Ya Byyak, V.O. Khomenchuk, V.Z. Kurant

Ternopil V. Hnatiuk National Pedagogical University, Ukraine

Bukovina University, Chernivtsi, Ukraine

THE PHOSPHOLIPID MITOCHONDRIA COMPOSITION OF FISH LIVER IN ACTION IONS Zn^{2+} AND Cd^{2+}

The influence Zn^{2+} (0.5 mg/dm^3 and 2 mg/dm^3) and Cd^{2+} (0.005 mg/dm^3 and 0.02 mg/dm^3) on the lipid composition of the mitochondria of cells hepatopancreas of carp (*Cyprinus carpio* L.) and pike (*Esox lucius* L.). Found that the effect of elevated concentrations of metals causes structural and functional changes in mitochondrial phospholipid composition of the studied fish.

The effect of 0.5 mg/dm^3 Zn^{2+} ions in both species and effect of low concentrations of Cd^{2+} ions in the synthesis of PC of pike activated, such changes in the content of phospholipid show a decrease micro viscosity of the membrane, which is probably due to the increasing role of phospholipids in the regulation of membrane permeability for ions of metals. Accumulation of PI due to the need to increase the regulation of mitochondrial metabolism, which is undergoing a modulating effect of zinc ions.

The action of the two studied concentrations of cadmium and the effect of 2 mg/dm^3 of zinc ions caused a growing number of PEA, LPH and SM and reduction of PC and PI. Decreasing the amount of PC and PI with parallel accumulation LPC indicates the activation of lysosomal phospholipase A_2 and phospholipase C, the destruction of the lipid layer membranes of mitochondria, adaptive response to these changes can be regarded as the accumulation of SM and PEA, which increases the density of the lipid bilayer and thus reduce its permeability.

Although the role of adaptive PEA, its significant savings while hydrolysis PC promotes its possible appearance on the outer layer of the membranes of mitochondria, resulting in an increase in its permeability, which may be one reason for the accumulation of ions Cd^{2+} and Zn^{2+} on their exposure to high concentrations.

Keywords: pike, carp, zinc, cadmium, liver, mitochondria, membranes, phospholipids

Рекомендує до друку

В.В. Грубінко

Надійшла 23.08.2013

УДК 577.155.1

А.В. ЮКАЛО

Тернопільський національний технічний університет ім. Івана Пулюя

вул. Руська, 56, Тернопіль, 46001

ВИДІЛЕННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕЇНОВОГО СКЛАДУ НАТИВНИХ КАЗЕЇНОВИХ МІЦЕЛ

Нативні казеїнові міцели було виділено в результаті повторного розшарування системи «вода – протеїни молока – полісахарид». В результаті хроматографічних і електрофоретичних досліджень показано, що виділені міцели є подібними до міцел із знежиреного молока за значенням молекулярних мас і фракційним складом протеїнів.

Ключові слова: казеїн, нативні міцели, хроматографія, електрофорез

Питання будови нативних казеїнових міцел до сьогоднішнього дня залишається відкритим. Не встановлені деталі їх структури. Як і тридцять років тому існує декілька точок зору на принципи будови казеїнових міцел [5]. Відсутнє чітке пояснення багатofракційності казеїнів [3]. Їх відомі функції не потребують такого різноманіття протеїнів казеїнового комплексу.

Окрім того, в останні роки було встановлено, що казеїни є попередниками багатьох біологічно активних пептидів, які утворюються в процесі нормального травлення у шлунково-кишковому тракті ссавців [2]. Це явище теж може мати своє відображення у будові казеїнових надмолекулярних структур.

У зв'язку з цим залишається актуальним питання виділення казеїнових міцел в умовах збереження нативної структури для їх дослідження і з'ясування біологічних функцій. Методи, які зараз використовують для виділення казеїнових міцел, можуть впливати на їх будову і склад. Так, при ультрацентрифугуванні може бути втрачено фракцію малих міцел [4]. Гель-фільтрація з використанням гранульованих гелів або фракціонування на колонках з пористим склом призводить до змін у співвідношенні протеїнових фракцій і втрати частини низькомолекулярних компонентів казеїнових міцел. У процесі ультрафільтрації значна частина протеїнів денатурує. Перспективним є виділення міцел казеїну в умовах термодинамічної несумісності білків і полісахаридів у водних розчинах [6]. Проведені раніше дослідження показали, що при розшаруванні системи «вода-полісахарид-протеїн» можна виділити казеїнові міцели, які за розмірами і формою ідентичні з міцелами молока. Проте, до складу протеїнової міцелярної фази системи входили також протеїни сироватки молока [1].

У зв'язку з цим, метою даної роботи є виділення нативних казеїнових міцел без домішок протеїнів сироватки молока.

Матеріал і методи досліджень

В роботі використовували загальний казеїн, який виділяли із свіжого знежиреного молока шляхом дворазового переосадження в ізоелектричній точці. Після цього проводили дезактивацію природних протеаз молока як описано у роботі [8]. Білки сироватки молока виділяли після осадження казеїну і переводили у потрібний буферний розчин шляхом гель-фільтрації на сефадексі G-25. Очищений β -казеїн отримували як описано раніше [8].

Міцели казеїну в умовах термодинамічної несумісності в системі «вода-протеїн-полісахарид» виділяли використовуючи встановлені раніше оптимальні співвідношення компонентів системи [1].

Концентрацію протеїнів у препаратах казеїнів, а також у хроматографічних фракціях визначали методом Лоурі або спектрофотометрично ($\lambda=280\text{nm}$), використовуючи коефіцієнти поглинання встановлені раніше ($D_{1\text{ml}}^{1\%}$): 4,6 – для β -CN і 8,2 для загального казеїну.

Диск-електрофорез протеїнів молока проводили в апараті фірми «Reanal» (Угорщина) в трубочках поліакриламідного гелю (ПААГ). Протеїни казеїнового комплексу аналізували електрофорезом у анодній системі однорідного ПААГ у вертикальних пластинках на апараті типу Стадієра, виготовленому в нашій лабораторії. Електрофореграми фіксували і забарвлювали загальноприйнятими методами. Всі електрофоретичні буфери і гелі готували з використанням реактивів фірми «Reanal» (Угорщина). Деталі методик електрофорезу описані в роботі [9].

Гель-фільтрацію міцел казеїну проводили на сефарозі 2В в хроматографічній колонці (1×37см). Сефарозу 2В «Pharmacia» (Швеція) готували у відповідності до рекомендацій цієї ж фірми. На колонку наносили по 0,5 мл взірців. У фракцій відбирали по 1 мл елюату.

Результати досліджень та їх обговорення

Після розшарування системи, яка включала протеїни молока і, в якості кислого полісахариду-пектин, було отримано протеїнову фазу (~20% від об'єму всієї системи). Для аналізу розподілу казеїнових міцел, надмолекулярних казеїнових структур, а також протеїнів казеїнового комплексу та сироватки молока було вибрано сефарозу 2В. Відомо, що цей вид сефарози дозволяє фракціонувати протеїни і їх агрегати в діапазоні молекулярних мас від 7×10^4 до 4×10^7 Да. Для створення нативного середовища білкову фазу діалізували проти 0,01М імідазольного буферу (рН 6,7), який включав 0,01М CaCl_2 . Сіль кальцію вводили до складу буферу у зв'язку з його можливою частковою втратою міцелами під час гель-фільтрації. Результати гель-фільтрації протеїнової фази на сефарозі 2В показані на рис. 1.

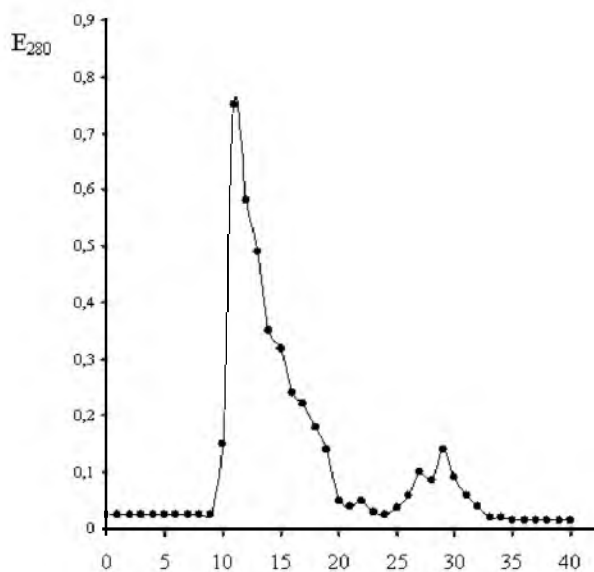


Рис. 1. Хроматограма протеїнової фази після розшарування системи «вода-протеїни молока-полісахарид», отримана на колонці з сефарозою 2В

Видно типовий розподіл міцелярного нативного казеїну. Великі міцели елюються з об'ємом, який дорівнює вільному об'єму колонки. Далі з колонки виходять малі міцели і субміцели. Загалом отриманий хроматографічний профіль ідентичний до профілю міцел знежиреного молока. Також на хроматограмі видно протеїнові фракції, які виходять з повним об'ємом колонки. Для їх ідентифікації ми об'єднували відповідні хроматографічні фракції (27-31), діалізували проти електрофоретичного буферу і наносили на трубочки з ПААГ в апараті для диск-електрофорезу. Результати електрофоретичного аналізу показані на рис. 2.

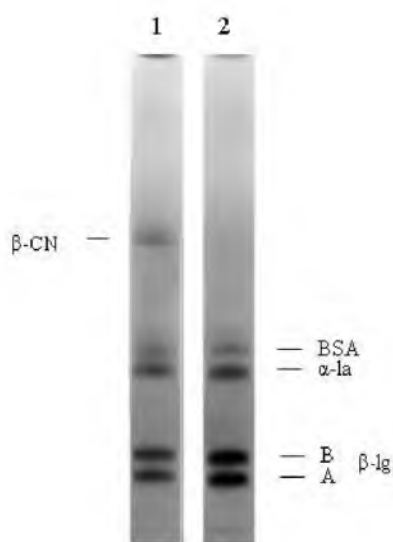


Рис. 2. Диск-електрофорез низькомолекулярної фракції (фракції 27-31) після хроматографії протеїнової фази на сефарозі 2В (1) і контрольних протеїнів сироватки молока (2)

З електрофореграм видно, що до низькомолекулярної фракції протеїнової фази системи «вода-протеїни молока-полісахарид» входять всі основні протеїни сироватки молока – β -лактоглобулін (β -lg), α -лактоальбумін (α -la), альбумін сироватки (BSA), а також сліди імуноглобулінів (Ig) і протеозопептонної фракції. Окрім того чітко видно присутність протеїнової фракції, яка може за електрофоретичною рухливістю бути β -казеїном. Для підтвердження отриманих результатів було проведено гел-фільтрацію на сефарозі 2В окремо протеїнів сироватки молока і β -казеїну (рис. 3). Об'єм елюції протеїнів сироватки і β -казеїну в основному співпадає з об'ємом елюції низькомолекулярних фракцій протеїнової фази.

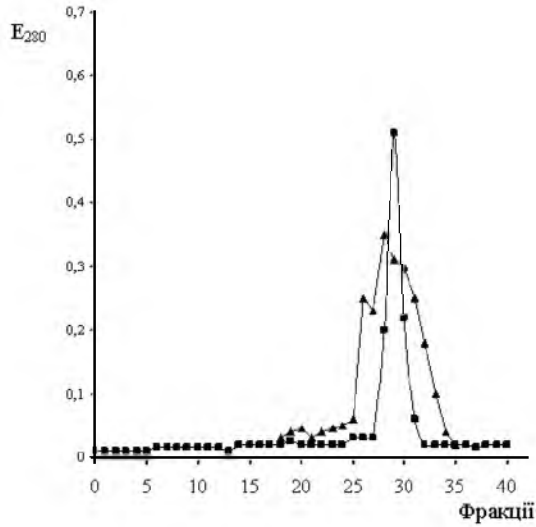


Рис. 3. Хроматограма протеїнів сироватки молока (▲) і β -казеїну (■) на сефарозі 2В

З метою очищення від протеїнів сироватки молока нами було проведено повторне виділення протеїнової фази у системі «вода – протеїни молока – полісахарид». Результати хроматографічного аналізу отриманих казеїнових міцел на сефарозі 2В показані на рис. 4.

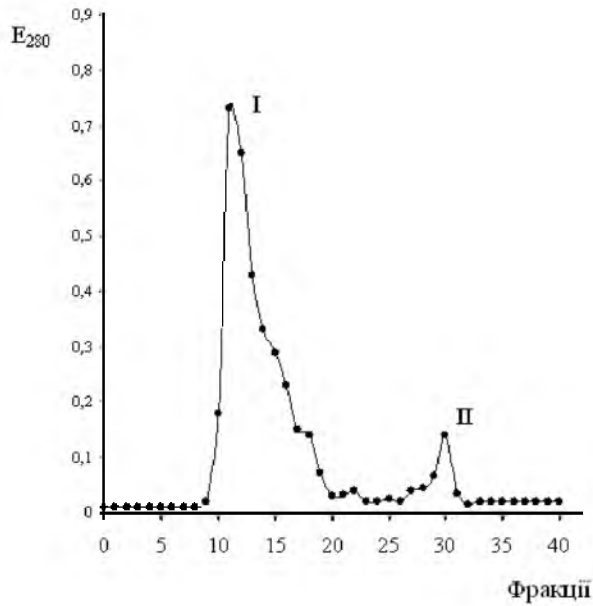


Рис. 4. Хроматограма протеїнової фази після повторного розшарування на системі «вода-протеїни молока-полісахарид» на сефарозі 2В

На хроматограмі видно характерний розподіл міцел і надмолекулярних структур казеїнів, а також, значно менший пік низькомолекулярної фракції. Для ідентифікації протеїнів обох хроматографічних піків їх діалізували проти буферу для взірців анодної електрофоретичної системи в однорідному ПААГ, яка використовується для аналізу фракційного складу казеїнів, і розділяли на вертикальних пластинках. Результати електрофорезу показані на рис. 5.

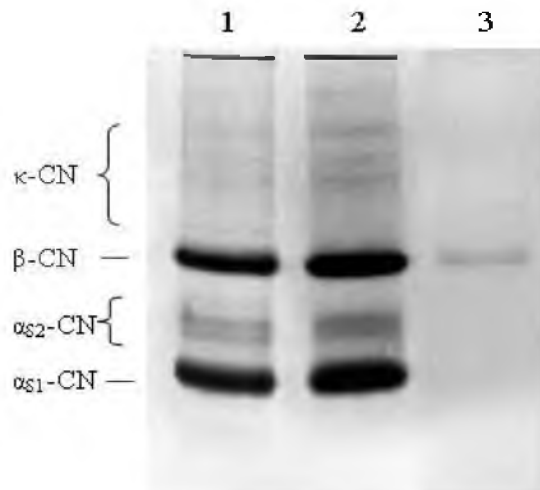


Рис. 5. Електрофореграма контрольного казеїну (1), I хроматографічної фракції (2) і II хроматографічної фракції (3) протеїнової фази системи «вода-протеїни молока-полісахарид» після повторного розшарування

Видно, що перший хроматографічний пік включає лише протеїни казеїнового комплексу у характерних для нього співвідношеннях, а низькомолекулярна фракція (II пік) представлена β-казеїном. Слід відзначити, що β-казеїн може частково виходити зі складу казеїнових міцел у розчинах [7]. Інші протеїни на електрофореграмі не виявлені.

Висновки

Шляхом повторного розшарування системи «вода – протеїни молока – полісахарид» було отримано міцелярну казеїнову фазу. Хроматографічний аналіз на сефарозі 2В підтвердив характерний розподіл міцел, надмолекулярних структур і протеїнів казеїну у виділеній фазі. Електрофоретичний аналіз показав ідентичність протеїнового складу виділеної міцелярної фази і контрольного загального казеїну.

1. Юкало В. Г. Виділення міцел казеїнового комплексу коров'ячого молока / В. Г. Юкало // Біологія тварин — 2004 — Т. 6, № 1-2. — С. 397—400.
2. Юкало А. В., Сторож Л. А., Юкало В. Г. Протеїни казеїнового комплексу молока корів (*Bos taurus*) як попередники біологічно активних пептидів / А. В. Юкало, Л. А. Сторож, В. Г. Юкало // Біотехнологія — 2012. — Т. 5, № 4. — С. 21—33.
3. Farrell H. M. Nomenclature of the proteins of cow's milk – sixth revision / H. M. Farrell, R. Jimenez-Flores, G. T. Bleck // *J. Dairy Sci.* — 2004. — Vol. 87, № 6. — P. 1641—1674.
4. Fox P. F. Dairy chemistry and biochemistry / P. F. Fox, P. L. H McSweeney. — London: Tomson Science, 1998. — 478 p.
5. Holt C. Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, behavior in foods / C. Holt, J. A. Carver, H. Ercoyod, D. C. Thorn. // *J. Dairy Sci.* — 2013. — V. 96, № 10. — P. 6127—6146.
6. Tolstoguzov V. B. Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels / V. B. Tolstoguzov // *Food Hydrocolloids.* — 1995. — V. 9, № 4. — P. 9—57.
7. Walstra P. On the stability of casein micelles / P. Walstra // *J. Dairy Sci.* — 1996. — V. 73, № 8. — P. 1965—1979.
8. Yukalo V. G. Obtaining of casein protein complex fractions from cow milk / V. G. Yukalo // *Nutracos.* — 2005. — № 5. — P. 17—19.
9. Yukalo A. V., Yukalo V. G., Shynkaryk M. M. Electrophoretic separation of the milk protein // BFE 2009. Proc. of Internal. Conf. on Bio and Food Electrotechnologies. — Compiègne (France). — 2009. — P. 227—231.

А. В. Юкало

Тернопольский национальный технический университет им. Ивана Пулюя

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕИНОВОГО СОСТАВА НАТИВНЫХ КАЗЕИНОВЫХ МИЦЕЛЛ

Казеины, как природные пищевые протеины, отвечают классическим требованиям к пищевым протеинам (сбалансированный аминокислотный состав, доступность к действию энзимов

желудочно-кишечного тракта). Кроме того, в последние годы установлено, что казеины являются предшественниками ряда биологически активных пептидов, что дало основание считать эти протеины пищевыми прогормонами. Среди продуктов протеолиза казеина обнаружены пептиды, влияющие на сердечнососудистую, нервную и иммунную системы. В связи с этим актуальным есть выделение казеиновых предшественников биологически активных пептидов в нативном виде. Нативные казеиновые мицеллы выделяли в результате повторного расслоения системы «вода – протеины молока – полисахарид». В результате хроматографических и электрофоретических исследований показано, что выделенные мицеллы похожи на мицеллы из обезжиренного молока по значениям молекулярных масс и фракционному составу протеинов.

Ключевые слова: казеин, нативные мицеллы, хроматография, электрофорез

A.V. Yukalo

Ternopil Ivan Pul'uy national technical university, Ukraine

OBTAINING AND PROTEIN FRACTIONS CHARACTERIZATION OF NATURAL CASEIN MICELLES

Casein, as the natural food proteins, meet classical requirements to food proteins (balance of their aminoacid composition and accessibility to digestive enzymes in gastro-intestinal tract). They are also known as precursors of multiple bioactive peptides that enable to consider them as food prohormones. Among the products of casein proteolytic degradation, the peptides with various physiological activities were detected. They include peptides affecting cardiovascular, nervous, digestive and immune systems. That is why the obtaining of casein precursor in natural state is actual. Obtaining of native casein micelles under repeated layering in system «water – milk-proteins – polysaccharide» was performed. Electrophoretic and chromatographic investigations had shown that isolated micelles are similar to natural ones from skim milk and have close values of molecular weight and protein fraction composition.

Key words: casein, natural micelles, chromatography, electrophoresis

Рекомендує до друку

О.Б. Столяр

Надійшла 30.09.2013