

## ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ НАТИВНИХ КАЗЕЇНОВИХ МІЦЕЛ

Л. А. Сторож, А. В. Юкало

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

*Досліджено казеїнові міцели, виділені в системі «вода–білки молока–пектин». За допомогою електронної мікроскопії розраховано середній частинковий діаметр міцел білкової фази, отриманої при розшируванні даної системи, та міцел знежиреного молока. Середній діаметр виділених міцел становив 23,60 нм, середній діаметр міцел молока — 24,84 нм. Проведені дослідження показали, що казеїнові міцели у знежиреному молоці і білковій фазі мають подібні форму і розміри.*

**Ключові слова:** КАЗЕЇН, МІЦЕЛИ, БІЛКОВА І ПОЛІСАХАРИДНА ФАЗИ, ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ

У відомих на сьогодні методах виділення казеїнів мало приділяється увага збереженню їх структури і нативних властивостей, що може вплинути на специфічність протеолізу даних білків і біологічну активність продуктів їх розщеплення. Казеїнові міцели у лабораторних умовах для моделювання різних біологічних і ферментативних процесів одержували в основному методами ультрацентрифугування, ультрафільтрації або гель-фільтрації. Ультрацентрифугування є досить складним, трудомістким і дорогим способом виділення міцел казеїну. До того ж при цьому частково можна втратити фракцію малих міцел [1]. Гель-фільтрація на таких матрицях як сефароза, пористе скло завжди викликає зміни співвідношення фракцій і втрату деяких білкових субодиниць та низькомолекулярних компонентів казеїнових міцел. При застосуванні ультрафільтрації близько 20 % білків молока може денатурувати, а також утворюються агрегати казеїну з білками сироватки молока. З врахуванням цього, на нашу думку, для виділення нативних міцел казеїну перспективним може бути використання принципу термодинамічної несумісності в системі «вода–білок–полісахарид» [2]. У системі, що включає воду, білки знежиреного молока і пектин, є дві групи білків, одна з яких (казеїни) відповідає умовам несумісності, а друга група (білки сироватки молока) — не відповідає. Білки сироватки молока не здатні до самоасоціації при природних значеннях рН. Тому можна сподіватися, що в системі «вода–білки молока–пектин» за рахунок розширування і утворення двох фаз можна отримати фазу, яка буде включати міцели казеїну. Оскільки такий процес відбувається за нативних умов (рН 6,7) без використання дезагрегуючих факторів, то можна сподіватися, що отримані казеїнові міцели за своїм складом і властивостями будуть подібні до міцел, які є в нативному молоці.

Метою даної роботи було дати порівняльну характеристику міцел казеїну, виділених у системі «вода–білки молока–пектин».

### Матеріали і методи

Для виділення нативних міцел казеїну було використано принцип термодинамічної несумісності в системі «вода–білок–кислий полісахарид» та встановлені раніше оптимальні співвідношення і концентрації компонентів систем [3]. Виділення казеїнових міцел проводили в дві стадії. На першій стадії проводили змішування знежиреного молока з 6,5 % розчином пектину. Компоненти були попередньо охолоджені до 7 °С. Отриману суміш перемішували протягом 10 хв і переливали в ділильну ліжку. Друга стадія процесу передбачала розділення фаз отриманої двофазної системи, яке відбувалось шляхом відстоювання суміші молока і пектину протягом двох годин при 4 °С. Після утворення фаз їх відділяли за допомогою ділильної ліжки, об'єднували аналогічні фази.

Розчини казеїну для мікрофотографування з допомогою електронного мікроскопа готували за методом, описаним Д. Г. Шмідтом [4]. Фіксовані зразки казеїнових міцел попередньо розводили. Ступінь розведення встановлювали експериментально при попередньому розведенні. Далі зразки наносили на гальванічну сітку, покриту нітроцелюлозною підкладкою. Сітки із зразками висушували при кімнатній температурі і після цього зразки відтінювалися у вакуумі паладієм під кутом 30°. Фотографували зразки на електронно-графічні фотопластинки при збільшенні  $\times 31000$ . Розрахунок середнього частинкового діаметру проводили за методами [5].

### Результати й обговорення

У результаті розширування системи «вода–білки молока–пектин» отримано дві фази — полісахаридну (82,6 %) і білкову (17,4 %). Для дослідження можливих змін в розмірах і формі казеїнових міцел у процесі виділення ми використали електронну мікроскопію. Середній частинковий діаметр міцел при цьому знаходили за формулою:

$$D_n = \frac{\sum n_i D_i}{\sum n_i},$$

де  $n_i$  — кількість міцел в одному розмірному класі;  
 $D_i$  — діаметр міцел цього розмірного класу.

Визначення середнього частинкового діаметру міцел проводили при дослідженні великої кількості міцел. На мікрофотографіях (рис. 1.1 і рис. 1.3) показані характерні картини розподілу казеїнових міцел у знежиреному молоці та білковій фазі після розшарування системи «вода–білки молока–пектин». Для знежиреного молока отримана типова картина розподілу міцел у широкому діапазоні їх діаметру (від 20 до 300 нм). Більшість авторів вважає, що малі однорідні частинки казеїнів з діаметром близьким до 20 нм є субміцелами, тобто структурними одиницями всіх казеїнових міцел більших розмірів [1]. Менші частинки — це продукти агрегації або частинки, які утворюються при розпаді міцел. Як видно на мікрофотографіях, казеїнові міцели у знежиреному молоці і білковій фазі мало відрізняються за формою та розмірами. Певні відмінності встановлено лише при порівнянні середнього частинкового діаметру міцел. Результати, одержані при визначенні середнього частинкового діаметру міцел шляхом перегляду на електронному мікроскопі великої кількості міцел (табл. 1). Проведені дослідження показали, що у свіжоотриманій білковій фазі середній частинковий діаметр міцел виявився дещо меншим, ніж міцел знежиреного молока. Це можна пояснити перерозподілом іонів кальцію в системі. Встановлено, що кислий полісахарид пектин зв'язує частину іонів кальцію, які переходять у полісахаридну фазу, що може зумовити часткову дезагрегацію казеїнових міцел [2, 6]. Малоймовірно, що зменшення розмірів міцел обумовлене виходом  $\beta$ -казеїну в розчин і переходом його в полісахаридну фазу, оскільки виходить він в малих кількостях, а крім того, він також звільняється із міцел у молоці при низьких температурах [1].

Оскільки в лабораторній практиці не весь виділений міцелярний казеїн одразу використовується в дослідженнях, тому частину його зазвичай переводять в стабільну форму. Найкраще при цьому зберігається ліофільно висушений міцелярний казеїн, у зв'язку з чим ми провели електронну мікроскопію міцел знежиреного молока і білкової фази після ліофільного їх висушування (рис. 1.2 і рис. 1.4).

За результатами досліджень виявлено збільшення розмірів казеїнових частинок знежиреного молока і, особливо, білкової фази. Подібні результати були отримані іншими авторами в аналогічних системах [7]. При цьому показано, що розчинення у відповідному буфері, який відтворює умови, наявні в нативному молоці, призводить до відновлення розмірів і форми казеїнових міцел [2].

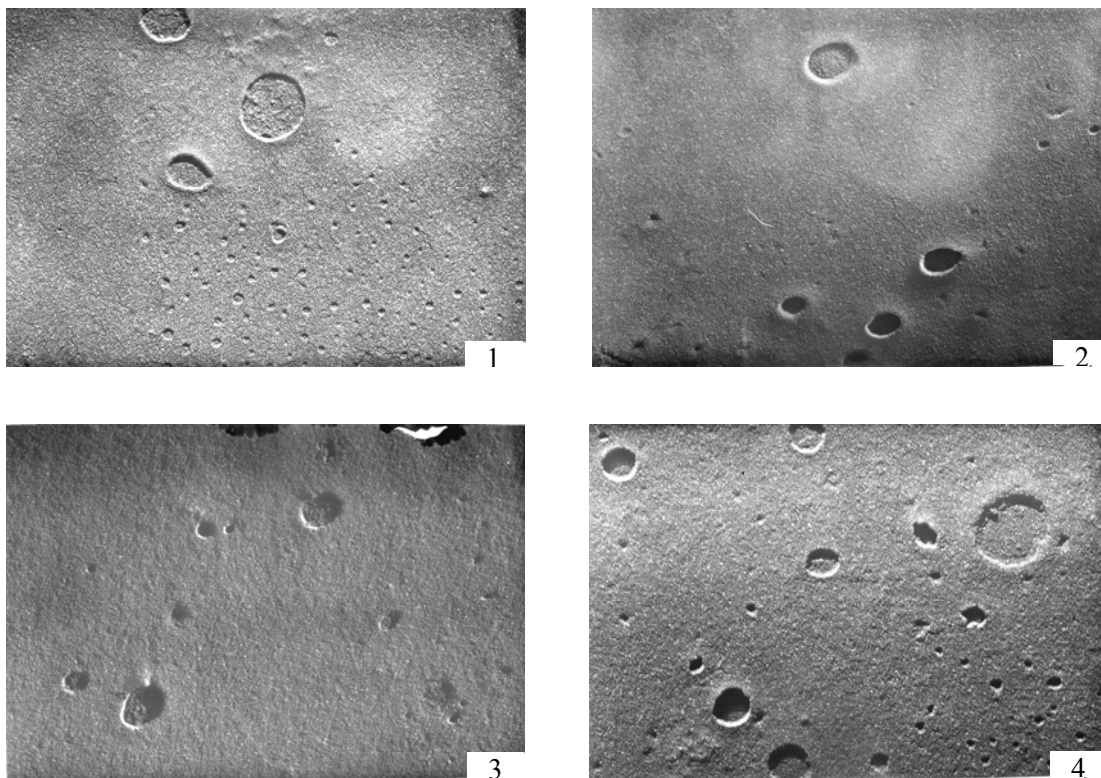


Рис. 1. Електронні мікрофотографії казеїнових міцел знежиреного молока (1), казеїнових міцел знежиреного молока після ліофілізації (2), казеїнових міцел білкової фази після розшарування системи «вода–білки молока–пектин» (3), казеїнових міцел білкової фази після ліофілізації (4) (31000×1,5)

**Середній частинковий діаметр казеїнових міцел знежиреного молока та білкової фази**

| Досліджуваний об'єкт                    | Кількість досліджених частинок | Середній частинковий діаметр $\bar{D}_n$ (нм) |
|-----------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------|
| Знежирене молоко                        | 1016                           | 24,84                                         |
| Білкова фаза                            | 997                            | 23,60                                         |
| Знежирене молоко після ліофільної сушки | 996                            | 26,56                                         |
| Білкова фаза після ліофільної сушки     | 1003                           | 27,75                                         |

**Висновки**

За низкою показників (розмір, форма, білковий склад, розчинність) виділені казеїнові міцели в системі «вода–білки молока–пектин», близькі до нативних у знежиреному молоці, які можуть бути використані при дослідженні та моделюванні протеолітичних процесів розщеплення казеїну.

**Перспективи подальших досліджень.** Подальші експериментальні дослідження будуть направлені на отримання із міцелярного казеїну окремих його гомогенних фракцій в умовах збереження їх природних властивостей для використання в якості попередників біологічно активних пептидів.

*L. Storozh, A. Yukalo*

**ELECTRON MICROSCOPY OF NATURAL CASEIN MICELLES****S u m m a r y**

Casein micelles were isolated in the system: «water–milk proteins–pectin», and investigated. The protein phase was obtained by disintegrated layering of this system and the mean particle diameter of protein phase micelles were assayed by electronic microscopy and compared to micelles of skim milk. The mean diameter of isolated micelles was 23.60 nm compared to 24.84 nm of milk micelles. We concluded that casein micelles of protein phase have similar shape and size to micelles of skim milk.

*Л. А. Сторож, А. В. Юкало*

**ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ НАТИВНЫХ КАЗЕИНОВЫХ МИЦЕЛЛ****А н н о т а ц и я**

Исследовано казеиновые мицеллы, выделенные в системе «вода–белки молока–пектин». С помощью электронной микроскопии рассчитан частичковый диаметр мицелл белковой фазы, полученной при расслоении данной системы, и мицелл обезжиренного молока. Средний диаметр выделенных мицелл составлял 23,60 нм, средний диаметр мицелл молока — 24,84 нм. Проведенные исследования показали, что казеиновые мицеллы в обезжиренном молоке и белковой фазе имеют подобные форму и размеры.

1. *Fox P. F.* Dairy chemistry and biochemistry / P. F. Fox, P. L. H. Mc Sweeny. — London : Tomson Science, 1998. — 478 p.
2. *Tolstoguzov V.* Compositions and phase diagrams for aqueous systems based on proteins and polysaccharides / V. Tolstoguzov // Intern. Review of Cytology. — 2000. — Vol. 192. — P. 3–31.
3. *Юкало В. Г.* Розподіл білків у системі «вода–знежирене молоко–пектин» / В. Г. Юкало // Наук. пр. УДУХТ. — 2001. — № 10. — С. 96–97.
4. *Schmidt D. G.* Colloidal aspects of casein / D. G. Schmidt // Neth. Milk Dairy J. — 1980. — Vol. 34, № 1. — P. 42–64.
5. *Mc Gann T. C. A.* Composition and size distribution of bovine casein micelles / T. C. A. Mc Gann, W. J. Donnelly, R. D. Kearney // Biochim. Biophys. Acta. — 1980. — Vol. 630, № 2. — P. 261–270.
6. *Yukalo V. G.* Obtaining of casein protein complex fractions from cow milk / V. G. Yukalo // Nutracos. — 2005. — № 5. — P. 17–19.
7. *Bourriot S.* Phase separation rheology and structure of micellar casein-galactomannan mixtures / S. Bourriot, C. Garnier, J. L. Doublier // Int. Dairy J. — 1999. — Vol. 9. — P. 353–357.
8. *Ribadeau-Dumas B.* Milk protein analysis / B. Ribadeau-Dumas, R. Grappin // Lait. — 1989. — Vol. 69, № 5. — P. 357–416.

**Рецензент:** завідувач лабораторії екологічної фізіології та якості продукції, доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент НААН Федорук Р. С.