دراسة كفاءة ثلاثة طرق مختلفة في تنقية كابا كازين حليب الماعز المحلي

جاسم محمد صالح السعدي

أستاذ

قسم علوم وتكنولوجيا الالبان – كلية علوم الاغذية– جامعة القاسم الخضراء

البريد الإلكتروني: jasim_salih@yahoo.com

المستخلص:

درست في هذا البحث كفاءة ثلاث طرق مختلفة وهي كروماتوكرافي الترشيح الهلامي و كروماتوكرافي الالفة الكهربائية وطريقة Zittle و Custer في تنقية كابا كازين حليب الماعز المحلي. أظهرت النتائج تفوق طريقتا الترشيح الهلامي و الألفة الكهربائية في تنقية الكابا كازين من حليب الماعز المحلي إذ تم الحصول على حزمة نقية واحدة في هلام متعدد الاكريل امايد ، بينما كانت طريقة Zittle و Custer أقل كفاءة في تنقية الكابا كازين من حليب الماعز المحلي . قدر تركيز حامض السياليك في الكاباكازين المحضر بالطرق المختلفة في هذه الدراسة وقد كان 4.33 ، 4.20 و 1.12 ملغم. غم$^{-1}$ بروتين للكابا كازين المعزول باستخدام الترشيح الهلامي و الالفة الكهربائية وطريقة Zittle و Custer وعلى التوالي .

الكلمات المفتاحية: حليب الماعز، كابا كازين، تنقية البروتين.

Study the efficiency of three different methods for purification of k-casein from local goat milk

Jasim M.S. Al-Saadi

Professor

Dairy Science and Technology Department, College of Food Sciences , AL-Qasim Green University, Iraq

E-mial address: jasim_salih@yahoo.com

Abstract:

In this paper, we studied the efficiency of three different methods which were gel filtration chromatography, electrostatic affinity chromatography and Zittle and Custer method For the purification of k-casein from the milk of Iraqi local goats. Gel filtration chromatography and electrostatic affinity chromatography were the best methods for the purification of k-casein from goat's milk casein, while Zittle and Custer method was inefficient in k-casein purification. Sialic acid concentration in goats k – casein purified by gel filtration, electrostatic affinity chromatography and Zittle and Custer method were 4.33, 4.20, 1.12 mg.g^{-1} respectively.

Keywords: Goat milk ,K-casein , protein purification.

المقدمة:

يمثل الماعز رابع أكبر مصدر لانتاج الحليب في العالم بعد الابقار والجاموس والاغنام ، ويمثل حليب الماعز اهمية اقتصادية خاصة في المناطق الوعرة التي يصعب بها تربية الابقار (2). يختلف حليب الماعز في خواصه عن حليب الابقار اذ يكون هذا الحليب اقل تسبباً بالحساسية وذو قابلية هضم و سعة بفرية أعلى وخواص علاجية خاصة بالمقارنة مع حليب الابقار(10). يبلغ تركيز الكازين في حليب الماعز 2.11 غم.100 غم$^{-1}$ حليب وهو يمثل 74% من بروتينات الحليب الكلية بينما تمثل بروتينات الشرش 17% (0.6 غم.100 حليب$^{-1}$) .وتبلغ نسبة النيتروجين غير البروتين 11% من النيتروجين الكلي في حليب الماعز(0.4 غم.100 غم حليب$^{-1}$) (8).

تتشابه بروتينات حليب الماعز الرئيسية مع حليب الابقار من حيث نوعها اذ يحتوي حليب الماعز الالفا أس والبيتا والكابا كازين اضافة الى البيتا لاكتو كلوبيولين والالفا لاكتا البومين ولكنها تختلف في تركيزها ومنشأها الجيني (3).

يشكل الكابا كازين 15% من الكازين البقري . ويعتبر من البروتينات المتفردة في الحليب إذ يمتلك هذا البروتين العديد من الصفات التي تميزه عن بقية كازينات الحليب إذ يعمل كمادة حامية ومنظمة لحجم الجسيمات الكازينية ، ويكون المسؤول عن استقرارية هذه الجسيمات وذلك لمقاومته للترسيب بوجود تراكيز عالية نسبياً من الكالسيوم قد تصل الى 0.25 مول (14). استخدمت العديد من طرق لتنقية كابا كازين حليب البقر ، ومن أكثر الطرق التقليدية المستخدمة لذلك هي طريقة Zittle و Custer (15) والتي تعتمد على قابلية هذا البروتين العالية للبقاء بشكل ذائب في محاليل اليوريا ذات الرقم الهيدروجيني المنخفض . كما استخدمت العديد من طرق الكروماتوكرافي في تنقية هذا البروتين مثل التبادل الايوني (7) والترشيح الهلامي (5) وكروماتوكرافي الالفة (12) .

اشار Al-Saadi (1) الى اختلاف كابا كازين حليب الماعز المحلي عن نظيره البقري في العديد من الصفات الكيميائية وخاصة في نقطة التعادل الكهربائي وتركيز الكاربوهيدرات وتركيز حامض السياليك إذ بلغت قيم هذه العوامل في كابا كازين حليب الماعز المحلي 4.7 ، 5.82 (ملغم. غم$^{-1}$) و4.26 (ملغم.غم$^{-1}$) مقارنة بقيمتها في حليب البقر والتي بلغت 5.8 ، 20.06 (ملغم.غم$^{-1}$) و16.71 (ملغم. غم$^{-1}$) وعلى التوالي. بسبب وجود هذه الاختلافات بين التركيب الكيمياوي لكابا كازين حليب البقر والماعز فقد هدف هذا البحث الى تحديد كفاءة بعض الطرق المستخدمة لتنقية كابا كازين حليب البقر وهي طريقة التنقية باليوريا وطريقة الالفة الكهربائية وطريقة الترشيح الهلامي في تنقية كابا كازين حليب الماعز المحلي.

المواد وطرائق العمل:

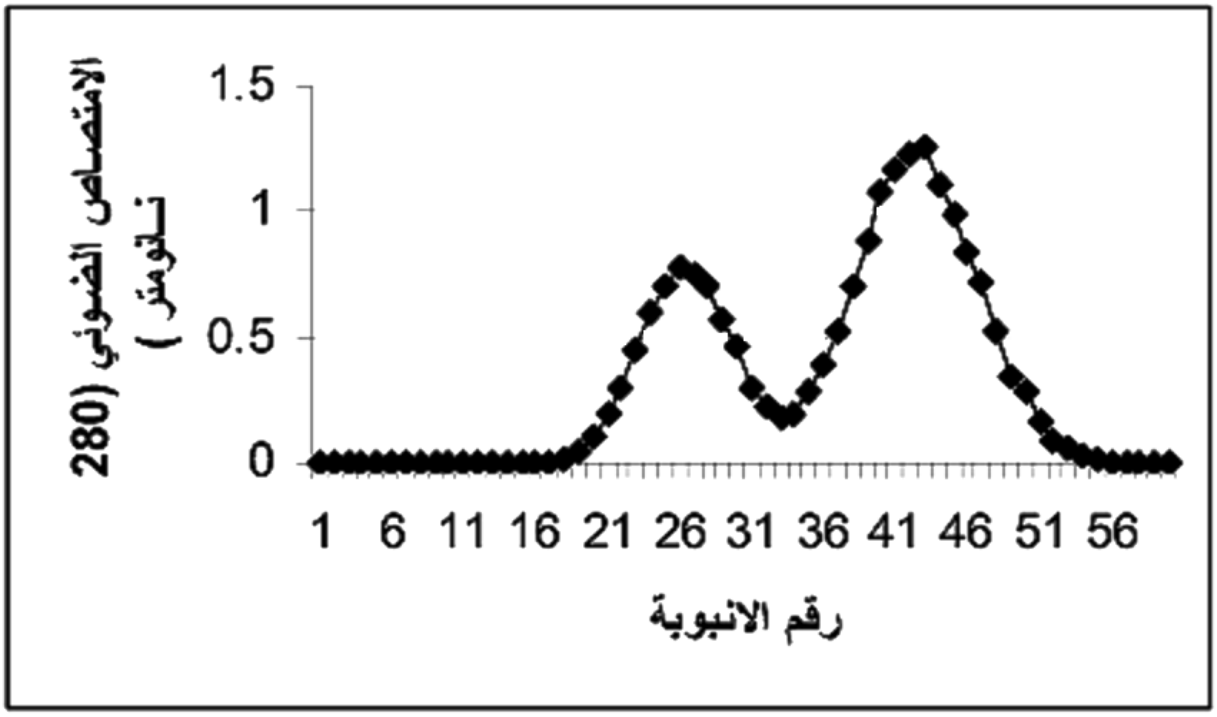
تم الحصول على نماذج حليب الماعز المحلي من أحدى الحقول في ضواحي مدينة السليمانية . فرز الحليب باستخدام عملية النبذ المركزي على 2400 × g لمدة 15 دقيقة على حرارة 4°م . وحضر الكازين الحامضي بخفض الرقم الهيدروجيني لحليب الماعز الى 4.3 (15). نقي كابا كازين حليب الماعز من الكازين الحامضي باستخدام ثلاث طرق مختلفة ، الطريقة الاولى هي طريقة Zittle و Custer (16) إذ اذيب 350غم من الكازين الحامضي في لتر من محلول اليوريا (6.6 M) وخفض الرقم الهيدروجيني للمحلول الى 1.4 وذلك باضافة 200 مل من حامض الكبريتيك (7 عياري) وبعدها تم تخفيف المحلول الى لترين ، إذ تترسب كل الكازينات الاخرى ويبقى الكابا كازين بشكل ذائب في المحلول والذي يتم ترسيبه باضافة 132 غم من كبريتات الامونيوم لكل لتر من المحلول . اما الطريقة الثانية فهي كروماتوكرافي الالفة الكهربائية (Electrostatic affinity chromatography) (12) وباستخدام عمود من مادة الامبرلايت CG – 50 بابعاد 2.5 × 30 سم والموازن باستخدام محلول الاثلين ثنائي الامين رباعي حامض الخليك (EDTA) M0.005 ذو الرقم الهيدروجيني 8.5 ، والحاوي على M3 يوريا .

اما الطريقة الاخيرة المستخدمة لتنقية الكابا كازين في هذا البحث فهي كروماتوكرافي الترشيح الهلامي باستخدام عمود من مادة السفاروز B4 (Sapharose 4B) (بابعاد 1.5 × 60 سم والموازن باستخدام داريء الفوسفات M 0.005 ذو الرقم الهيدروجيني 7.6 والحاوي على M 6.6 يوريا و M 0.004 EDTA (13 .) فحصت نقاوة الكابا كازين المحضر باستخدام الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود ال SDS وغياب الميركابتو ايثانول (9) ، اما بالنسبة لحامض السياليك فقد تم تقديره باستخدام طريقة Aminoff . (4)

النتائج والمناقشة:

تنقية كابا كازين حليب الماعز المحلي باستخدام الترشيح الهلامي

استخدمت تنقية الترشيح الهلامي لتنقية كابا كازين حليب الماعز بالاعتماد على وزنه الجزيئي العالي مقارنة ببقية الكازينات نتيجة لتداخل وحداته من خلال الاواصر ثنائية الكبريت (11) .يلاحظ من شكل (1) انه عند فصل كازين الماعز الحامضي باستخدام مادة السفاروز B 4 وباستخدام محلول دارئ الفوسفات M 0.005 والحاوي على M 3.3 يوريا و M0.004 EDTA تم الحصول على قمتين ، قمة اولى صغيرة تقع بين الانابيب 18-33 وتمثل الكابا كازين ذو الوزن الجزيئي المرتفع ، وقمة ثانية كبيرة تقع بين الانابيب 34-55 وتمثل الالفا أس كازين والبيتاكازين .



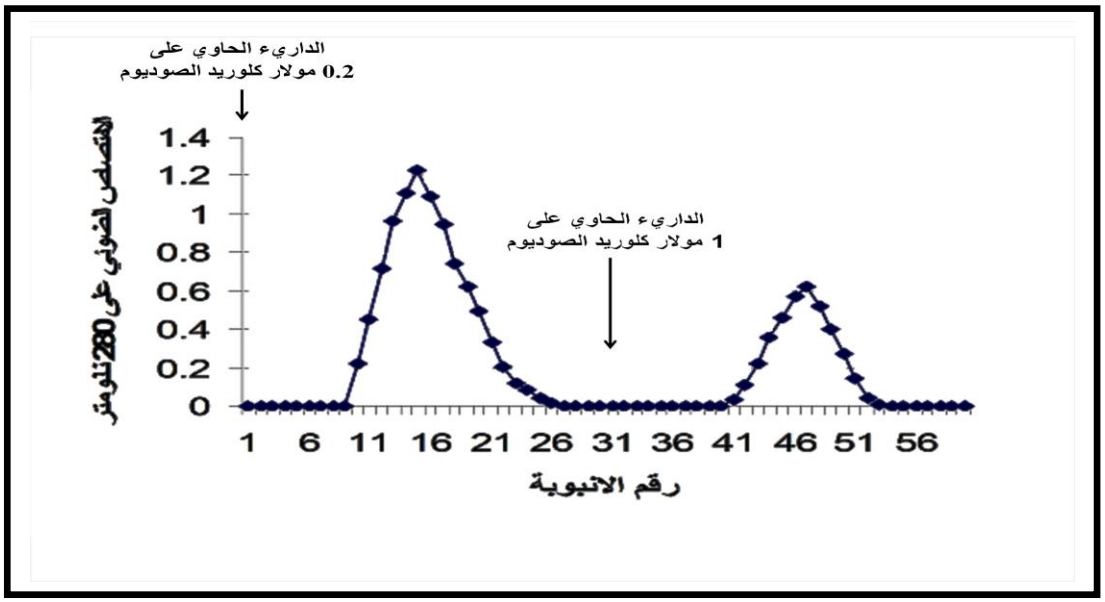
شكل 1: يبين فصل كابا كازين حليب الماعز المحلي من الكازين الحامضي باستخدام عمود مادة السفاروز 4B بابعاد 1.5 × 60 سم والموازن باستخدام دارئ الفوسفات M0.005 ذو الرقم الهيدروجيني 7.6 والحاوي على 6.6 M يوريا و0.004 M EDTA وبسرعة جريان 20 مل. ساعة$^{-1}$ وبمعدل 5 مل. انبوبة$^{-1}$.

وهذه النتيجة مشابهة لما وجده Toma و Naka (13) عند فصلهم كازين البقر الحامضي باستخدام الترشيح الهلامي على عمود من مادة السفاروز 4B ، أذ حصلوا على قمتين رئيسيتين الاولى صغيرة تمثل الكابا كازين والثانية كبيرة عبارة عن خليط من الالفا اس كازين والبيتا كازين .وعند اجراء عملية الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الاكريل امايد بوجود مادة الـ SDS للقمة الاولى والتي تمثل الكابا كازين ظهرت لنا على شكل حزمة واحدة مفردة خالية من الشوائب مما يدل على كفاءة هذه الطريقة في تنقية كابا كازين حليب الماعز المحلي (شكل 3) .

تنقية كابا كازين حليب الماعز المحلي باستخدام كروماتوكرافي الالفة الكهربائية

ذكر Ribadean – Dumas وجماعته (11) ان كابا كازين حليب البقر يتميز عن بقية الكازينات بقابليته على التداخل والارتباط مع المواد الحاملة للشحنة السالبة في الرقم الهيدروجيني القريب من التعادل ، ويعود سبب هذا الارتباط الى وجود تركز للشحنات الموجبة على شكل عنقود في السطح الخارجي للكابا كازين البقري .

من الشكل (2) والذي يمثل تنقية كابا كازين حليب الماعز المحلي باستخدام عمود من مادة الامبرلايت CG – 50 يلاحظ انه عند امرار دارئ الموازنة الحاوي على 0.2 M من كلوريد الصوديوم ظهرت لدينا قمة بروتينية في الانابيب (11 – 26) وتمثل هذه القمة الكازينات الملوثة للكابا كازين .



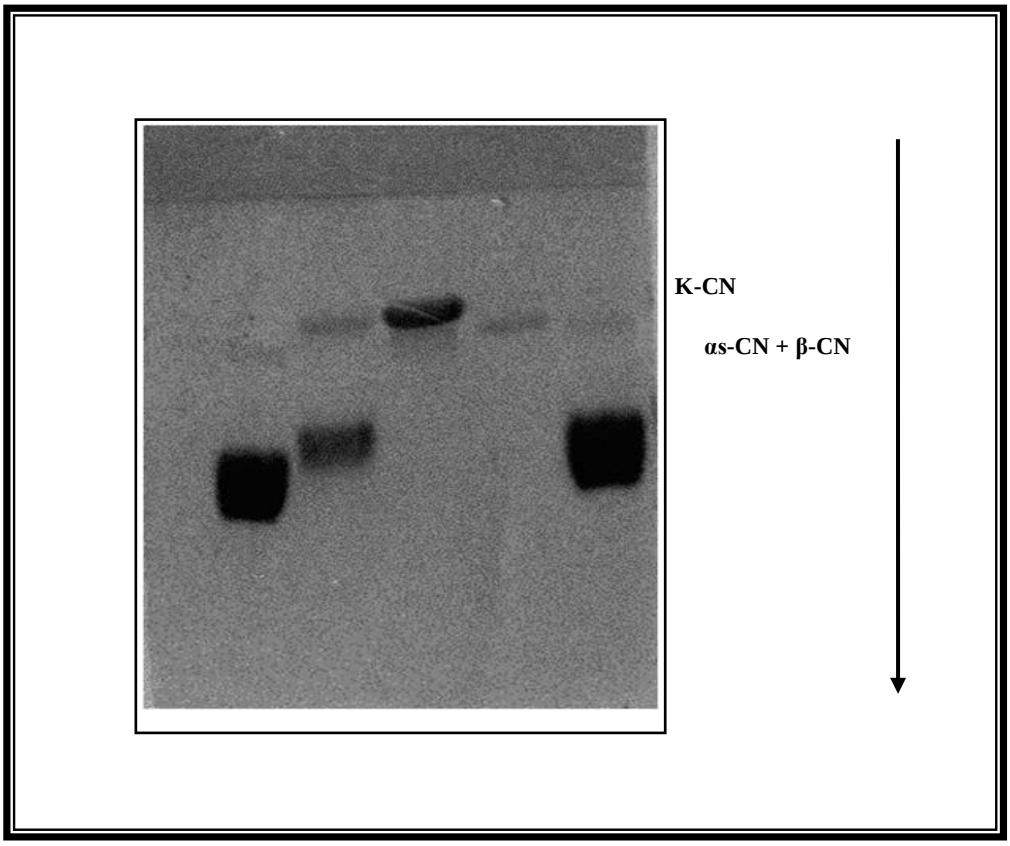
شكل 2: يبين تنقية كابا كازين حليب الماعز المحلي من الكازين الحامضي باستخدام عمود من الامبرلايت 50 – 66 بابعاد 2.5 × 30 سم والموازن باستخدام محلول M0.005 EDTA ، ذو الرقم الهيدروجيني 8.5 ، والحاوي على M3 يوريا وبسرعة جريان 40 مل .ساعة$^{-1}$ وبمعدل 5مل. انبوبة$^{-1}$.

وعند امرار محلول 0.005 M من EDTA ذو الرقم الهيدروجيني 8.5 والحاوي على M3 يوريا و M1 كلوريد الصوديوم على عمود الامبرلايت CG-50 ظهرت لدينا قمة في الانابيب (42-53) والتي عند اجراء عملية الترحيل الكهربائي لها ظهرت على شكل حزمة بروتينية نقية تمثل الكابا كازين (شكل 3). وهذه النتيجة تدل على كفاءة هذه الطريقة في تنقية كابا كازين حليب الماعز المحلي اسوة بكابا كازين حليب البقر.

تنقية كابا كازين حليب الماعز المحلي باستخدام طريقة Zittle وCuster:

تعتمد هذه الطريقة على تميز الكابا كازين عن بقية الكازينات بقابليته العالية للبقاء بشكل ذائب في محاليل اليوريا ذات الرقم الهيدروجيني المنخفض، إذ تكون لدينا نتيجة لهذه الطريقة راسب ابيض والذي عند اجراء عملية الترحيل الكهربائي له في هلام متعدد الأكريل إمايد بوجود مادة الـ SDS (شكل 3) ظهر انه عبارة

عن مزيج من الكازينات الثلاثة مع ملاحظة أن تركيز الكابا كازين قد ازداد بشكل واضح مقارنة بالكازين الحامضي .



شكل 3: يبين مراحل تنقية كاباكازين الماعز بالترحيل الكهربائي على هلام متعدد الاكريل اميد بوجود مادة الSDS ، إذ 1 و5 يمثل كازين حليب الماعز و 2 يمثل كاباكازين حليب الماعز المحضر بالترشيح الهلامي، 3 يمثل كاباكازين حليب الماعز المحضر بالالفة الكهربائية و4 يمثل كاباكازين حليب الماعز المحضربطريقة Zittle وCuster.

ان هذه النتيجة تشير الى ملائمة طريقة الترشيح الهلامي وطريقة الالفة الكهربائية المستخدمة لتنقية كابا كازين حليب البقر في تنقية كابا كازين حليب الماعز المحلي وعدم ملائمة طريقة Zittle وCuster(16) لهذا الغرض.

تقدير تركيز حامض السياليك

يتميز الكابا كازين عن بقية الكازينات بأحتواءه على حامض السياليك لهذا فقد تم اعتماد تركيز حامض السياليك في الكابا كازين كدليل لنقاوة هذا البروتين (6).يلاحظ من جدول (1) ان تركيز حامض السياليك في كابا كازين حليب الماعز المحلي المحضر بطريقة الترشيح الهلامي كان هو الاعلى مقارنة ببقية الطرق إذ بلغ 4.33ملغم . غم$^{-1}$ ، بينما كان تركيز حامض السياليك في الكابا كازين المحضر باستخدام كروما توكرافي

الالفة الكهربائية 4.20 ملغم . غم$^{-1}$ مما يدل على ان طريقة الترشيح الهلامي هي الاكفأ لتنقية كابا كازين حليب الماعز المحلي ، وهذه التراكيز مقاربة لما ذكره السعدي (1) من ان تركيز حامض السياليك في كابا كازين حليب الماعز هو 4.26 ملغم. غم$^{-1}$.

جدول 1: يبين تركيز حامض السياليك في كابا كازين حليب الماعز المحلي المحضر باستخدام الترشيح الهلامي ، الالفة الكهربائية وطريقة Zittle وCuster (16) .

طريقة التحضير	تركيز حامض السياليك (ملغم .غم$^{-1}$)
الترشيح الهلامي	4.33
الالفة الكهربائية	4.20
Zittle وCuster	1.12

اما بالنسبة لكابا كازين حليب الماعز بطريقة Zittle وCuster (16) فيلاحظ ان تركيز حامض السياليك كان 1.12 ملغم. غم$^{-1}$ ، وهو تركيز منخفض مقارنة بالطريقتين السابقتين ويعود سبب ذلك الى تلوث الكابا كازين المحضر بهذه الطريقة بالكازينات الاخرى مما يدل على عدم كفاءة هذه الطريقة لتحضير كابا كازين حليب الماعز المحلي.

References:

1. **AL-Saadi, J. and Mohmmed, Salih (2002)** Study of Goat's and Cow's milk proteins and their relationship with allergy.ph.D. thesis, the College of Agriculture of Baghdad University.
2. **AL-Saadi, J.S.; Shaker, K.A. and Ustunol, Z. (2014**) Effect of heat and transglutaminase on solubility of goat milk protein-based films. *International Journal of Dairy Technology*, 67(3), pp.420-426.
3. **Amigo, L. and Fontecha J. (2011**) Goat milk. pp. 484-493. In J.W.Fuquay, P. Fox, P. Sweeney[eds]. Encyclopedia of Dairy Sciences (2nd ed). Academic Press, London, England.
4. **Aminoff,D. (1961)** Methods for the quantitative estamition of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochemical Journal*, 81:384.
5. **Buruiana, L. M. and Mohran, M. A. (1981**) A method of exclusion chromatography to obtain unitar K-casein . *Egyptian Journal of Dairy Science*, 9:129.
6. **Graham, E. R.; McKenzie, H. A. and Murphy, W. H. (1970)** Analysis and structural chemistry of the carbohydrate of glycoproteins. In " Milk Proteins :Chemsitry and Molecular Biology –I". edited by H. A. McKenzie. Academic press. New York and London.

7. Haque, Z. H. and Khalifa, M. Y. (1992) K-casein heterogeneity and mild heating effects on susceptibility to chymosin action. *Journal of Food Science*, 57: 49-54.

8. Jenness, R .(1980) Composition and characteristics of goat milk: Review 1968–1979. *Journal of Dairy Science*, 63 1605-1630.

9. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 680-685.

10. Park , Y. W. (1994) Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research*, 14 151–161.

11. Ribadeau-Dumas, B.; Bringon, G.; Grosclaude, F. and Mercier, J. (1972) Primary structure of bovine casein, complete sequence. *European journal of biochemistry*, 25: 505-514.

12. Snoeren, T. H. M.; VanderSpeck , C. A. and Payens , T. A. J. (1977) Preparation of k-casein and minor αs-caseins by electrostatic affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 490: 255-259.

13. Toma, S. J. and Nakai , S. (1974) Preparation of k-casein by agarose gel chromatography. *Canadian Institute of Food Technology journal*, 7: 285.

14. Whitney, R. M. (1988) Proteins of milk. in " Fundamentals of Dairy Chemistry". edited by Wang, N. P.; R. Jenness ; M. Keeney and E.H. Marth. 3rd ed. Van Nostrand Reihold co. New York. USA.

15. Zittle, C. A. and Custer, J. H (1963) Purification and some of the properties of αs-casein and k-casein. *Journal of Dairy Science*, 46: 1183-1188.

16. Zittle, C. A. and Custer, J. H. (1966) Identification of the k-casein among the components of whole goat milk. *Journal of Dairy Science*, 49:788-791.