

OBTAINING BIOACTIVE CASEIN PHOSPHOPEPTIDES USING DIFFERENT SOLVENTS

V. Yukalo, L. Storozh

Teropil Ivan Puluj National Technical University

Key words:

*Casein
Proteolysis
Phosphopeptides
Alcohols
Sedimentation*

Article history:

Received 06.09.2017
Received in revised form
18.09.2017
Accepted 21.10.2017

Corresponding author:

V. Yukalo
E-mail:
npnuht@ukr.net

ABSTRACT

The article deals with the determination of effect of type of solvent on absoluteness of phosphopeptides sedimentation from enzymic hydrolyzate of proteins of casein complex of cow's milk. Total casein that was extracted from fresh skim milk by double resedimentation at an isoelectric point was used as a substrate for the phosphopeptides obtaining. Phosphopeptides from the hydrolyzate were extracted by selective sedimentation using calcium salts with presence of various solvents. The yield of bioactive phosphopeptides was investigated using ethanol, propanol, isopropanol, butanol. The features of molecular and weight divisions, precipitated using different alcohols of casein phosphopeptides, were discovered using gel-filtration on Sephadex G-25. It is discovered that the highest yield (11.78%) of phosphopeptides, which molecular weights are similar to natural bioactive phosphopeptides, is reached by using ethanol for sedimentation. Using propanol and isopropanol leads to loss of certain part of large and medium-sized phosphopeptides.

DOI: 10.24263/2225-2924-2017-23-5-1-15

ОТРИМАННЯ БІОАКТИВНИХ КАЗЕЇНОВИХ ФОСФОПЕПТИДІВ З ВИКОРИСТАННЯМ РІЗНИХ РОЗЧИННИКІВ

В.Г. Юкало, Л.А. Сторож

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

Стаття присвячена визначенню впливу виду розчинника на повноту осадження фосфопептидів із ферментативних гідролізатів протеїнів казеїнового комплексу молока корів. Як субстрат для отримання фосфопептидів використовували загальний казеїн, виділений із свіжого знежиреного молока подвійним переосадженням в ізоелектричній точці. Фосфопептиди з гідролізату виділяли селективним осадженням солями кальцію за наявності різних розчинників. Вихід біоактивних фосфопептидів досліджено при використанні етанолу, пропанолу, ізопропанолу, бутанолу. Гель-фільтрацією на сефадексі G-25 встановлено особливості молекулярно-масового розподілу осаджених різними спиртами казофосфопептидів. Виявлено, що при осадженні етанолом досягається найвищий вихід фосфопептидів (11,78%), які за молекулярною

масою подібні до відомих природних біоактивних фосфопептидів. Використання пропанолу та ізопропанолу призводить до втрати частини фосфопептидів великого і середнього розмірів.

Ключові слова: казеїн, протеоліз, фосфопептиди, спирти, осадження.

Постановка проблеми. Вперше біологічно активні пептиди з казеїнів молока було виділено в 1979 р. у Мюнхені групою Віктора Брантла. Шляхом екстрагування в суміші хлороформ-метанолу та використання різних видів рідинної хроматографії і гель-фільтрації йому вдалося виділити із ферментативного гідролізату загального казеїну декілька пептидних препаратів, які були стійкі до дії пронази і проявляли опіоїдну активність. У подальшому ці пептиди було названо казоморфінами [1]. За останні 20 років проведено ряд досліджень ферментативних гідролізітів казеїнів, отриманих *in vitro*, гастроінтестинальних гідролізітів, отриманих *in vivo*, а також синтетичних пептидів, які відповідали первинній структурі казеїнів. У результаті виявлено понад дві сотні біологічно активних пептидів, які можуть утворюватись при розщепленні різних фракцій білків казеїнового комплексу [2]. Такі пептиди впливають на функціонування різних фізіологічних систем організму. Зокрема, були ідентифіковані інгібітори ангіотензин-перетворювального фермента, агоністи та антагоністи опіатних рецепторів, імуномодуляторні пептиди, антитромботичні пептиди, біоактивні фосфопептиди. В наш час активно проводяться дослідження біоактивних пептидів з протеїнів молока, відкриваються нові види їх біологічної активності (антиканцерогенна, антивірусна дія та ін.) [3; 4].

Фосфопептиди відносяться до найбільш цінних і перспективних функціональних інгредієнтів казеїнового походження. Основними властивостями казеїнових фосфопептидів є взаємодія з іонами металів (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} та ін.), утворення з ними розчинних комплексів і сприяння їх адсорбції в кишечнику. Казеїнові фосфопептиди зазвичай отримують шляхом протеолізу загального казеїну ферментними препаратами тваринного (трипсин, хімо-трипсин, панкреатин, пепсин), а також рослинного або мікробіологічного походження. Очевидно, що лише природний спектр казеїнових фосфопептидів забезпечує транспорт іонів металів у травному тракті. При промисловому виділенні фосфопептидів цей спектр може змінюватися залежно від специфічності застосованих протеаз, а також способу осадження. Тому для отримання природних фосфопептидів нами були використані умови протеолізу казеїну, які характерні для травного тракту (рН, температура, склад протеаз). Іншими важливими факторами, що впливають на склад фосфопептидів, можуть бути умови їх осадження з гідролізітів різними розчинниками. Тому важливим залишається вибір розчинника, який може забезпечити повне виділення всього спектра природних казофосфопептидів.

Мета дослідження: порівняти вихід і молекулярно-масовий розподіл казеїнових фосфопептидів при використанні різних розчинників для їх осадження.

Матеріали і методи. Як субстрат для отримання фосфопептидів використовували загальний казеїн, який виділяли із свіжого знежиреного молока

подвійним переосадженням в ізоелектричній точці. Ферментативний гідроліз казеїнового субстрату проводили за дії панкреатину виробництва ПрАТ «Технолог» (Україна). Фосфопептиди із гідролізату виділяли селективним осадженням солями кальцію за наявності різних розчинників (етанолу, пропанолу, ізопропанолу, бутанолу), як описано раніше [5]. Гель-фільтрацію отриманих препаратів фосфопептидів здійснювали з використанням хроматографічної колонки фірми «Reanal» (Угорщина), заповненої сефадексом G-25 (fine) фірми «Pharmacia» (Швеція). Концентрацію фосфопептидів у всіх фракціях визначали спектрофотометрично. Математично-статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програми Microsoft Office Excel.

Викладення основних результатів дослідження. Раніше нами було обґрунтовано вибір оптимальних умов отримання нативних біоактивних фосфопептидів з протеїнів казеїнового комплексу коров'ячого молока [6]. Згідно з одержаними результатами протеоліз 9% казеїнового субстрату проводили за дії панкреатину в термостаті при температурі 37° С. Значення рН підтримували на рівні 7,9, що є оптимальним для використаного ферменту. Співвідношення «фермент:субстрат» задавали рівним 1:100. Ступінь протеолізу оцінювали через кожні 30 хв протягом 3 годин. При цьому із реакційної суміші відбирали по 5 мл гідролізату і додавали по 3 мл 10-процентної трихлороцтової кислоти. Осад нерозщеплених протеїнів відфільтровували, а розчинні продукти протеолізу розводили 5-процентною оцтовою кислотою і виміряли оптичну густину розчинів на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 280 нм. На основі середніх значень п'яти вимірювань було побудовано криву інтенсивності протеолізу (рис. 1).

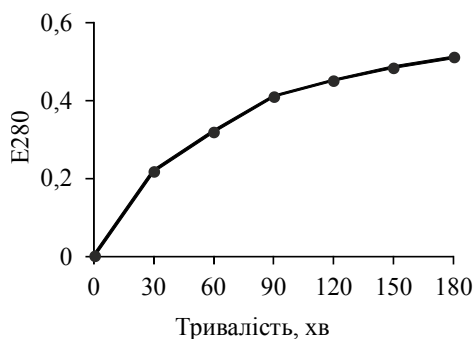


Рис. 1. Протеоліз загального казеїну панкреатином при співвідношенні «фермент:субстрат» — 1:100

Із рис. 1 видно, що швидкість протеолізу більша на початку процесу включно до 90-ї хвилини, після чого зростання інтенсивності протеолізу сповільнюється. Проведені раніше електрофоретичні дослідження показали, що на 90-й хвилині протеолізу окремі фракції високомолекулярних пептидів у гідролізаті відсутні, а загальний молекулярно-масовий розподіл пептидів нагадує такий розподіл при нормальному травленні, яке призводить до утворення природних біоактивних пептидів [3]. У зв'язку з цим із гідролізату,

отриманого на 90-й хвилині протеолізу, виділяли фосфопептиди за схемою, поданою на рис. 2.

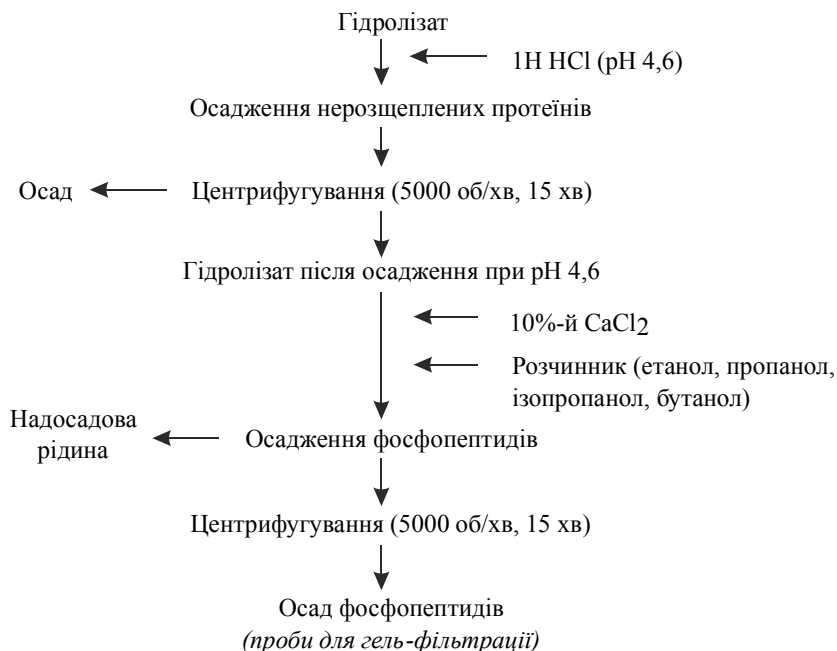


Рис. 2. Схема осадження фосфопептидів з використанням різних розчинників

До гідролізатів, що містили розчинні у трихлороцтовій кислоті продукти, протеолізу додавали 10-процентний CaCl_2 і один із спиртів: етанол, пропанол, ізопропанол, бутанол. Утворений осад фосфопептидів відділяли центрифугуванням, промивали відповідним спиртом, висушували до постійної маси і зважували. У табл. 1 представлені кількості фосфопептидів (мг) з 9 мл гідролізатів, отримані при осаженні різними спиртами. Як видно з табличних даних, найвищого виходу фосфопептидів було досягнуто при використанні етанолу (11,78%), найменший вихід був у випадку осаження бутанолом.

Таблиця 1. Вихід фосфопептидів при осаженні із гідролізатів різними спиртами

№ п/п	Назва спирту	Кількість фосфопептидів, мг ($M \pm m, n = 5$)	Вихід, %
1	Етанол	95,4±1,3	11,78
2	Пропанол	51,2±1,0	6,32
3	Ізопропанол	68,7±1,2	8,36
4	Бутанол	31,8±0,8	3,93

Висушені препарати фосфопептидів використовували для встановлення молекулярно-масового розподілу. Для цього була проведена гель-фільтрація на сефадексі G-25. Наважку фосфопептидів, осаджених різними спиртами з однакової кількості гідролізатів, розчиняли у хроматографічному буфері, що містив 6 М сечовину (pH 7,9). Нерозчинні фрагменти відфільтровували, а фільтрат наносили на колонку. Розділення проводили на колонці (2·70 см) з

набору для рідинної хроматографії фірми «Reanal» (Угорщина). Результати гель-фільтрацій показані на рис. 3 і 4.

Отримані хроматограми мають подібні профілі для таких пар: пропанол і бутанол; етанол і ізопропанол. У випадку пропанолу і бутанолу можна відзначити суттєве зменшення частки фосфопептидів із середньою (1000—3000 Да) і особливо з високою (3000—5000 Да) молекулярними масами в межах виключення сефадексу G-25. Найбільш повно всі види казеїнових фосфопептидів представлені при використанні етанолу. Цей розподіл узгоджується з молекулярними масами відомих природних казофосфопептидів [7].

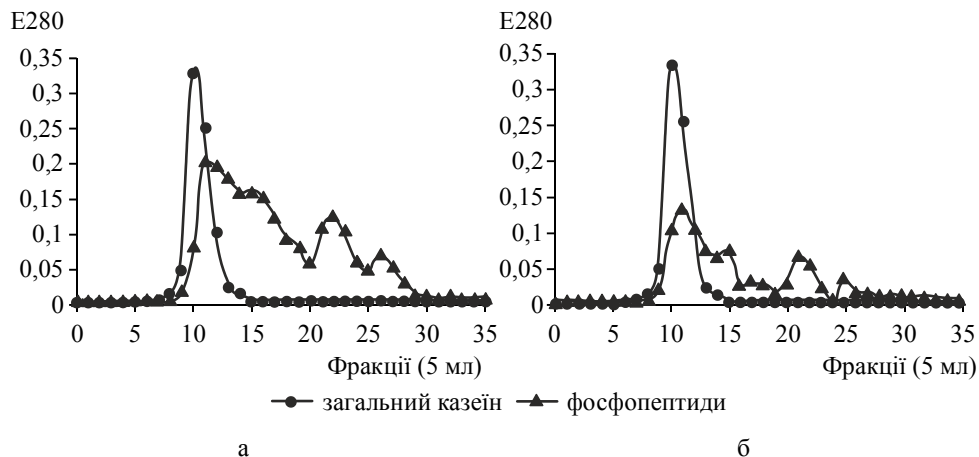


Рис. 3. Хроматограми фосфопептидів, отриманих при осадженні: а) етанолом; б) ізопропанолом

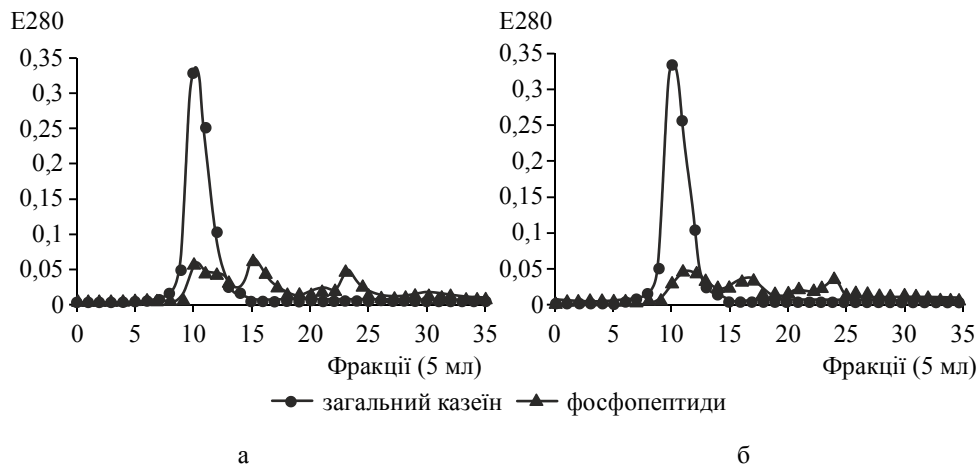


Рис. 4. Хроматограми фосфопептидів, отриманих при осадженні: а) пропанолом; б) бутанолом

Висновки

Отримані результати свідчать, що з досліджуваних розчинників (етанол, ізопропанол, пропанол і бутанол) найбільший вихід біоактивних фосфопептидів

забезпечує використання етанолу (11,78%). У випадку пропанолу, ізопропанолу і бутанолу вихід фосфопептидів суттєво менший. Причому застосування пропанолу і бутанолу призводить до втрати частини фосфопептидів з молекулярною масою від 1000 до 5000 Да.

Література

1. *Meisel H.* Biochemical Properties of Peptides Encrypted in Bovine Milk Proteins / H. Meisel // *Current Medicinal Chemistry.* — 2005. — V. 12. — P. 1623—1629.
2. *McSweeney P.L.H.* Advanced Dairy Chemistry. Volume 1B: Proteins: Applied Aspects. Fourth Edition / P.L.H. McSweeney, J.A. O'Mahony. — New York : Springer, 2016. — 498 p.
3. *Dairy Chemistry and Biochemistry (Second Edition)* / P.F. Fox, T. Uniacke-Lowe, P.L.H. McSweeney, J.A. O'Mahony. — New York: Springer, 2015. — 585 p.
4. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system — a review / M. Sz wajkowska, A. Wolanciuk, J. Barłowska et al. // *Animal Science papers and Reports.* — 2011. — Vol. 29, # 4. — P. 269—280.
5. *Юкало В.Г.* Выделение фосфопептидов из общего казеина и его фракций / В. Юкало, Л. Сторож // *Maisto chemija ir technologija.* — 2013. — T. 47, № 2. — P. 32—40.
6. *Юкало В.Г.* Визначення умов отримання природних біоактивних казеїнових фосфопептидів / В.Г. Юкало, Л.А. Сторож, М.О. Штокало // *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького.* — 2014. — Т. 16, № 3(60), Ч. 4. — С. 192—200.
7. Bioactive Casein Phosphopeptides in Dairy Products as Nutraceuticals for Functional Foods. In : *Milk Proteins*, Hurley W.L. (ed.) / G. Pinto, S. Caira, M. Cuollo et al. — Croatia : In Tech, 2012. — P. 3—44.