

УДК 577.112.083/122.2

Юкало В.Г., д.б.н., професор (biotech@tu.edu.te.ua)[©]**Сторож Л.А.**, ст. викладач

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

ГЕЛЬ-ФІЛЬТРАЦІЯ КАЗЕЇНОВИХ ФОСФОПЕПТИДІВ

Білки казеїнового комплексу, як природні харчові білки, в першу чергу відповідають класичним вимогам до харчових білків (збалансований амінокислотний склад, доступність до дії протеаз шлунково-кишкового тракту). Крім цього встановлено, що казеїни є попередниками низки біологічно активних пептидів. Ці пептиди можуть проникати у кров'яне русло і впливати на нервову систему (агоністи та антагоністи опіоїдних рецепторів), травну систему (казофосфопептиди, глікомакропептид κ-казеїну), імунну систему (імунomodulatory та антимікробні пептиди), серцево-судинну систему (антитромботичні та антигіпертензивні пептиди). Казеїнові фосфопептиди є одними з найважливіших біологічно активних пептидів. Вони позитивно впливають на засвоєння іонів кальцію, заліза, цинку, магнію в організмі і є перспективними інгредієнтами для функціональних продуктів харчування.

В даній роботі нами було проведено порівняльні дослідження розподілу за молекулярними масами казеїнових фосфопептидів методами гель-фільтрації. Фосфопептиди отримували протеолізом загального казеїну ензимними препаратами тваринного, рослинного і мікробіологічного походження. Показані суттєві відмінності у складі фосфопептидів, отриманих за дії різних ензимних препаратів.

Ключові слова: фосфопептиди, казеїн, протеоліз, гель-фільтрація.

УДК 577.112.083/122.2

Юкало В.Г., Сторож Л.А.

Тернопольский национальный технический университет имени Ивана Пулюя

ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ КАЗЕИНОВЫХ ФОСФОПЕПТИДОВ

Белки казеинового комплекса, как природные пищевые белки, в первую очередь отвечают классическим требованиям к пищевым белкам (сбалансированный аминокислотный состав, доступность к действию протеаз желудочно-кишечного тракта). Кроме этого установлено, что казеины являются предшественниками ряда биологически активных пептидов. Эти пептиды могут проникать в кровяное русло и влиять на нервную систему (агонисты и антагонисты опиоидных рецепторов), пищеварительную систему (казофосфопептиды, гликомакропептид κ-казеина), иммунную систему (иммуномодулирующие и антимикробные пептиды), сердечно-сосудистую систему (антитромботические и антигипертензивные пептиды). Казеиновые фосфопептиды являются одними из важнейших биологически активных пептидов. Они положительно влияют на усвоение ионов кальция, железа, цинка, магния в организме и являются перспективными ингредиентами для функциональных продуктов питания.

В данной работе нами были проведены сравнительные исследования распределения по молекулярным массами казеиновых фосфопептидов

методами гель-фільтрації. Фосфопептиди получали протеолізом общего казеина энзимными препаратами животного, растительного и микробиологического происхождения. Показаны существенные различия в составе фосфопептидов, полученных при действии различных энзимных препаратов.

Ключевые слова: фосфопептиды, казеин, протеолиз, гель-фильтрация.

UDC 577.112.083/122.2

V.G. Yukalo, L.A. Storozh

Ternopil Ivan Pul'uj national technical university

GEL-FILTRATION OF CASEIN PHOSPHOPEPTIDES

Caseins as the natural food proteins have balanced their amino acid composition and are accessible to digestive enzymes in gastrointestinal tract. Although caseins meet classical requirements to food proteins they are also known as precursors of multiple bioactive peptides. These peptides cross into the bloodstream and affect the nervous system (agonists and antagonists of opiate receptors), digestive system (casophosphopeptides, glycomacropptide from κ -casein), immune system (immunomodulatory and antimicrobial peptides) and cardiovascular system (antithrombotic and antihypertensive peptides). Casophosphopeptides are very important bioactive peptides. They have a positive influence on the absorption of calcium, iron, zinc and magnesium ions in organism and are the perspective ingredients for the functional food.

In current study the distribution of casein phosphopeptides molecular mass by gel-filtration methods has been comparative investigated. Phosphopeptides were obtaining by proteolysis of total casein, using enzyme preparations of animal, plant and microbiological origins. It has been detected that there is an important difference between phosphopeptides compositions according to the using one of various enzyme preparations.

Key words: phosphopeptides, casein, proteolysis, gel-filtration.

Вступ. Більшу частину серед протеїнів молока становлять фосфопротеїни (близько 70 %). До них належать фракції α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN і κ -CN. Фосфосеринові залишки беруть участь у формуванні пористої міцелярної структури цих протеїнів, а також відіграють важливу роль у зв'язуванні ними іонів кальцію [1]. В останні роки було показано, що в результаті розщеплення у шлунково-кишковому тракті ссавців з фосфопротеїнів молока утворюються біологічно активні фосфопептиди, які здатні доставляти іони кальцію та інших металів у розчиненому вигляді до активних і пасивних транспортних систем у кишечнику [2]. У зв'язку з цим фосфопептиди казеїнового походження є перспективними інгредієнтами для створення функціональних продуктів. У наш час активно проводяться дослідження методів одержання фосфопептидів і вивчення їх властивостей. При цьому використовують різні протеолітичні препарати тваринного, мікробіологічного і рослинного походження. Основним критерієм ефективності методу виділення є вихід фосфопептидів по відношенню до кількості фосфопротеїнів, взятих для протеолізу [3].

В залежності від специфічності ензимів протеолітичних препаратів можливе утворення фосфопептидів з різними молекулярними масами і, відповідно, відмінностями у первинній структурі. Це може відобразитися на

ефективності їх біологічної дії у порівнянні з природними фосфопептидами, які утворюються у шлунково-кишковому тракті. Для перевірки цього припущення і виявлення можливих відмінностей нами було проведено гель-фільтрацію казеїнових фосфопептидів, отриманих у результаті протеолізу загального казеїну панкреатином, трипсином, хімотрипсином, папаїном і нейтральною протеазою.

Мета. Порівняти хроматографічні профілі казеїнових фосфопептидів, отриманих за дії протеолітичних препаратів тваринного, рослинного і мікробіологічного походження.

Матеріали і методи. Загальний казеїн виділяли із свіжого знежиреного молока подвійним переосадженням в ізоелектричній точці. Після другого переосадження здійснювали інактивацію природних протеаз молока в оцтовій кислоті (рН 4,0) протягом 5 годин [4].

Протеоліз загального казеїну проводили з використанням препаратів трипсину і хімотрипсину фірми «Biozym» (Німеччина), панкреатину виробництва ПрАТ «Технолог» (Україна), нейтральної протеази і папаїну фірми «Barrett industrial limited» (Великобританія). Протеолітичну активність ферментних препаратів визначали на розчинах казеїнату натрію, як було описано раніше [5].

Концентрацію протеїнів у препаратах субстрату і гідролізатах визначали методом Лоурі або спектрофотометрично за поглинанням при довжині хвилі 280 нм на спектрофотометрі СФ-46. При цьому використовували загальноприйнятий коефіцієнт поглинання ($D_{1\text{cm}}^{1\%}$) для загального казеїну – 8,2.

Склад загального казеїну на різних стадіях виділення досліджували електрофорезом на вертикальних пластинках поліакриламідного гелю (ПААГ) в апараті типу Стадіера. При цьому застосовували лужну систему (рН 7,9), що містила 25 мМ тріс, 27 мМ діетилбарбітурат, 3 мМ ЕДТА і 4,5 М сечовину [6]. Електрофореграми фіксували і проявляли загальноприйнятими методами. Електрофоретичні буфери і гелі готували, використовуючи реактиви фірми «Reanal» (Угорщина). Для ідентифікації казеїнів на електрофореграмах застосовували гомогенні фракції α_{S1} - і β -казеїнів, виділені у нашій лабораторії [4].

Гель-фільтрацію продуктів протеолізу загального казеїну проводили на хроматографічній колонці фірми «Reanal» (Угорщина), яку заповнювали сефадексом G-25 (fine) фірми «Pharmacia» (Швеція). Концентрацію фосфопептидів у всіх фракціях визначали спектрофотометрично.

Результати досліджень. Виділений із знежиреного молока препарат загального казеїну за результатами електрофоретичного дослідження містить всі фракції фосфопротеїнів молока (рис. 1) у відповідності до сучасної класифікації [7].

Для проведення протеолізу нами були вибрані ензимні препарати, які часто використовують для розщеплення молочних білків у харчових цілях. Перед протеолізом ми визначали загальну протеолітичну активність всіх препаратів для розрахунку їх кількості у реакційному середовищі. Враховуючи дані попередніх публікацій [8], а також наших досліджень, розщеплення субстрату проводили при температурі 37°C і значенні рН 7,9 протягом трьох годин. В отриманих гідролізатах оцінювали спектрофотометрично концентрацію низькомолекулярних продуктів протеолізу після осадження протеїнів і поліпептидів трихлороцтовою кислотою (ТХО). У всіх випадках

оптична густина (E_{280}) розведеної в десять разів надосадової рідини після додавання ТХО мала значення в межах 0,440-0,470. Лише у випадку панкреатину – $E_{280}=0,544$.

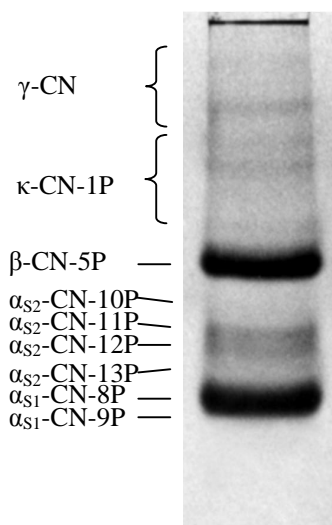


Рис. 1. Електрофореграма загального казеїну, який використовували для протеолізу і виділення фосфопептидів

Другу частину гідролізатів використовували для виділення фосфопептидів. За основу нами було вибрано методику, описану у публікації [9], яка передбачає осадження фосфопептидів етанолом у присутності іонів кальцію.

Для гель-фільтрації у всіх випадках відбирали зразки фосфопептидів, отриманих з 9 мл гідролізату. Така кількість дозволяє аналізувати хроматографічні фракції після гель-фільтрації в умовах найвищої точності УФ-спектрофотометрії без додаткового розведення. Тобто, площа отриманих хроматограм відображає кількісні співвідношення зразків фосфопептидів, отриманих з різних ензимних препаратів, а також співвідношення фосфопептидів різної молекулярної маси.

Результати гель-фільтрації препаратів фосфопептидів на колонці з сефадексом G-25 (fine) показані на рис. 2-5. Для визначення вільного об'єму колонки на рис. 2(1) показано хроматографічний профіль високомолекулярних фосфопротеїнів субстрату. Враховуючи це, а також об'єм елюції з колонки фосфопептидів, можна відзначити, що у всіх випадках молекулярна маса основної частини фосфопептидів знаходиться у діапазоні від 1000 до 10000 Да. Лише у випадку панкреатинових фосфопептидів – значна їх частина (близько 30%) має молекулярну масу до 1000 Да. В цілому профілі хроматограм панкреатинового і в меншій мірі папаїнового гідролізатів зміщені в сторону низькомолекулярних пептидів. Оскільки хроматограми трипсинових і хімотрипсинових фосфопептидів виявилися дуже подібними, ми у даній роботі наводимо лише результати, отримані з трипсином (рис. 3).

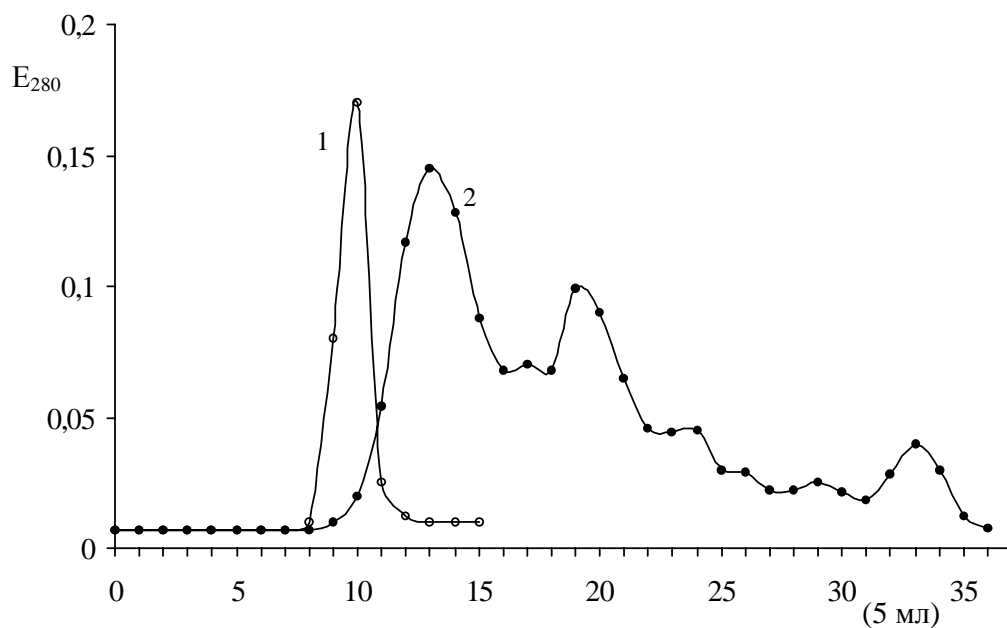


Рис. 2. Хроматограма фосфопротейного субстрату (1) і фосфопептидів, отриманих за дії панкреатину (2)

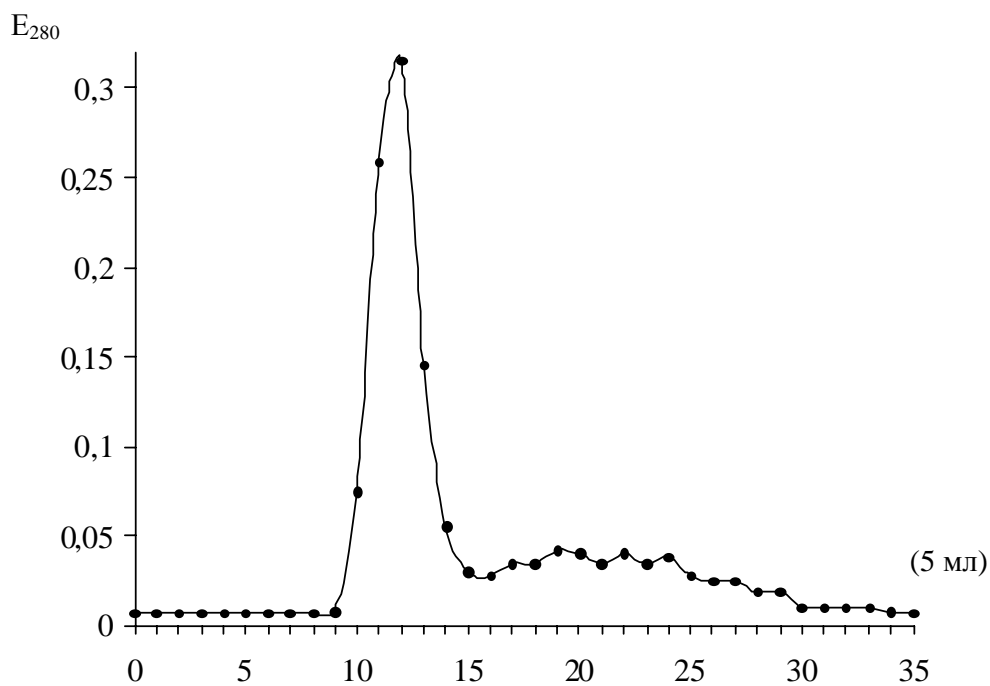


Рис. 3. Хроматограма фосфопептидів, отриманих за дії трипсину

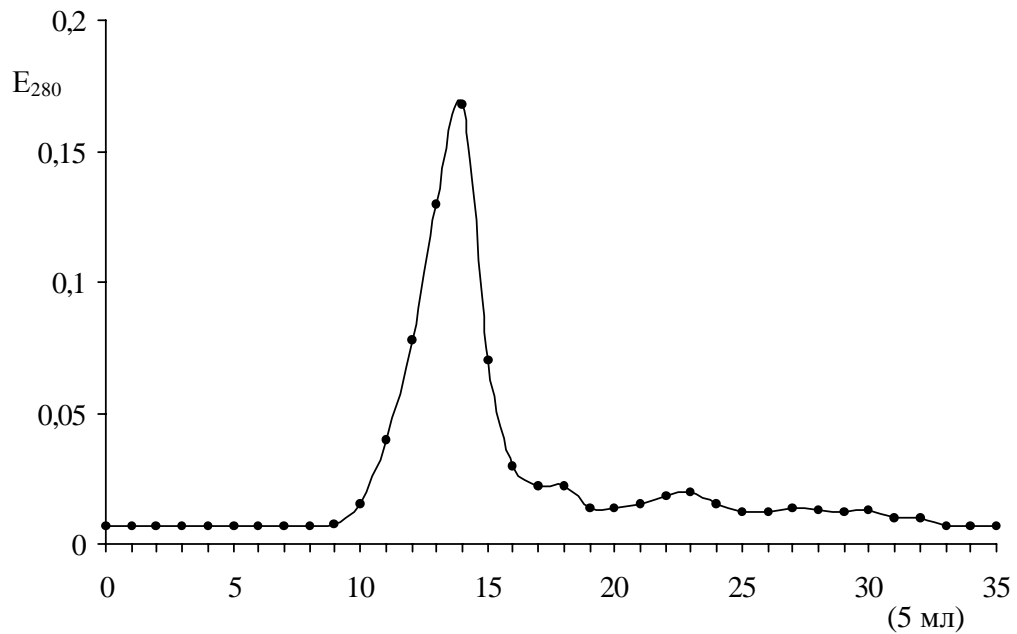


Рис. 4. Хроматограма фосфопептидів, отриманих за дії нейтральної протеази

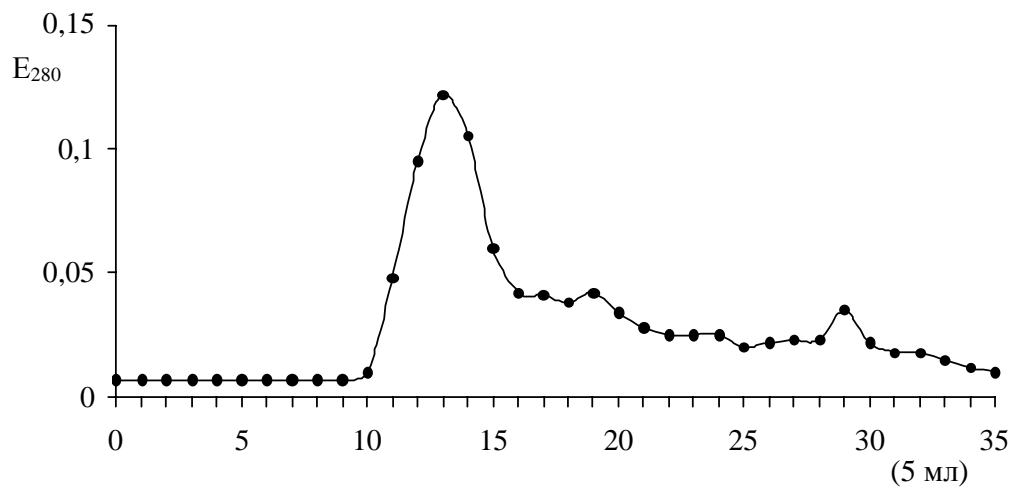


Рис. 5. Хроматограма фосфопептидів, отриманих за дії папаїну

Очевидно, що фосфопептиди, отримані за дії різних протеолітичних препаратів, мають різну молекулярну масу і первинну структуру. Це можна було очікувати, враховуючи специфічність ензимів, які входять до складу препаратів. Проте знайдені нами суттєві відмінності у молекулярно-масовому розподілі фосфопептидів можуть позначитися на їхній біологічній дії. Відомо,

що первинна структура біоактивних пептидів відіграє важливу роль у забезпеченні їх біологічної функції [10]. У всякому разі більшою є ймовірність утворення біологічно активних пептидів у випадку відтворення природних умов протеолізу. У нашому випадку такими можна вважати фосфопептиди, отримані з використанням панкреатину.

Висновок. Показано, що казеїнові фосфопептиди, отримані в результаті використання протеолітичних препаратів тваринного, рослинного і мікробіологічного походження, суттєво відрізняються за молекулярно-масовим розподілом, що може мати значення для проявлення ними біологічної активності. Пропонується для отримання фосфопептидів, як функціональних інгредієнтів, використовувати протеоліз, який максимально відображає природні процеси розщеплення фосфопротеїнів у шлунково-кишковому тракті.

Література

1. Park Y.W. Bioactive components in milk and dairy products. – USA: Wiley – Black Well, 2009. – 426 p.
2. Bouhallab S., Bougle D. Bioactive of milk: caseinophosphopeptides and mineral bioavailability // *Reprod. Nutr. Dev.* – 2004. – V.44. – P. 493-498.
3. Юкало А.В., Сторож Л.А., Юкало В.Г. Протеїни казеїнового комплексу молока корів (*Bos taurus*) як попередники біологічно активних пептидів // *Біотехнологія*. – 2012. – Т. 5, № 4. – С. 21-33.
4. Yukalo V.G. Obtaining of casein protein complex fractions from cow milk // *Nutracos*. – 2005. – №5. – P. 17-19.
5. Польшалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. – М.: Де Ли принт, 2003. – 375 с.
6. Юкало В.Г. Электрофоретичний аналіз білків казеїнового комплексу // *Наукові праці НУХТ*. – 2008. – №24. – С. 65-67.
7. Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T. Nomenclature of the proteins of cows' milk – sixth revision // *J. Dairy Sci.* – 2004. – Vol. 87, № 6. – P. 1641-1674.
8. Декуша Г.В. Розробка технології сухих сумішей з гідролізованим білком для дитячого харчування : дис. канд. техн. наук : 05.18.16 : захищ. 10.06.09 / Г.В. Декуша. – Одеса, 2009. – 157 с.
9. Adamson N.J, Reynolds E.C. Characterization of multiply phosphorylated peptides selectively precipitated from a pancreatic casein digest // *J Dairy Sci.* – 1995. – Vol. 78, № 12. – P. 2653-2659.
10. Fitz Gerald R.J. Potential uses of caseinophosphopeptides // *Int. Dairy J.* – 1998. – Vol. 8. – P. 451-457.

Рецензент – д.т.н., професор Білонога Ю.Л.