

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ УРОВНЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В СИСТЕМЕ С АКТИВИРОВАННЫМИ ФОРМАМИ КИСЛОРОДА

Е.И. Тарун, М.В. Зайцева, О.И. Кравцова*, В.П. Курченко*, Т.Н. Головач*

Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Республика Беларусь

**Белорусский Государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

e-mail: halavachtn@gmail.com, ktarun@tut.by

Введение

Молоко является уникальным продуктом, обеспечивающим организм разнообразием питательных веществ и биологически активных компонентов [1]. Ферментативный гидролиз белков молока направлен на снижение их аллергенного потенциала, повышение питательной и биологической ценности. Расщепление белковых субстратов осуществляют с использованием широкого спектра протеаз – ферментов класса гидролаз, катализирующих гидролитический разрыв пептидных связей [2]. При изучении механизмов проявления антиоксидантной активности (АОА) установлена зависимость ее уровня от конформации и аминокислотной последовательности белков и пептидов [3]. Актуальность исследований связана с необходимостью усовершенствования технологий изготовления гидролизатов с заданными физико-химическими и биологически активными свойствами: белковым и пептидным составом, радикал-восстанавливающей активностью.

Метод определения АОА по отношению к активированным формам кислорода (АФК) является одним из наиболее применяемых в настоящее время [4–5]. Он основан на измерении интенсивности флуоресценции окисляемого соединения и ее уменьшении под воздействием АФК. В настоящей работе для детектирования свободных радикалов использовали флуоресцеин, обладающий высоким коэффициентом экстинкции и близким к единице квантовым выходом флуоресценции. Генерирование свободных радикалов осуществляли в системе Фентона, в которой образуются гидроксильные радикалы при взаимодействии комплекса железа (Fe^{2+}) с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) и пероксида водорода [6–7].

Целью работы являлось сравнительное исследование АОА ферментативных гидролизатов сыВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА, используемых для изготовления продуктов функционального питания и характеризующихся различной степенью расщепления белковых субстратов и пептидным составом. Кроме того, проведен анализ двух опытных образцов частичных гидролизатов сыВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ (НИИ прикладных проблем биологии БГУ). В качестве контроля использовали концентрат сыВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ (КСБ), являющийся субстратом для получения гидролизатов сыВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ.

Методы исследования

Реагенты. Использовали соль Мора $(NH_4)_2SO_4 \times FeSO_4 \times 6H_2O$ (Fe^{2+}), пероксид водорода (H_2O_2) фирмы «Реахим» (Россия), флуоресцеин, ЭДТА производства «Sigma» (США).

Изучена АОА экспериментальных образцов гидролизатов сыВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ, полученных с применением сериновой протеазы (алкалазы, образец № 1), а также комплекса сериновых протеаз (алкалазы и трипсина, образец № 2). В качестве контроля использовали концентрат сыВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ, изготовленный методом ультрафильтрации (КСБ, ТУ ВУ 100377914.550–2008, исходный субстрат для получения гидролизатов). В качестве образцов сравнения применяли гидролизаты Peptigen IF 3080 WPH (Arla Foods, Дания), Optiper–80 DH 32 (Carbery Food Ingredients, Ирландия), Prodiet GF 006 (Ingredia, Франция), Vital Armor H 801 LB (Armor Protéines, Франция), Hilmar 6350 (Hilmar, США). Массовая доля белка в исследуемых образцах составляла 75–80%.

В качестве эталона сравнения при оценке уровня антиоксидантной активности использовали тролокс с исходной концентрацией 100 мг/мл.

Приготовление раствора гидролизата сывороточных белков. Взвешивали 0,2 г сухого порошка гидролизата и вносили в сосуд на 5 мл, добавляли 2 мл дистиллированной воды. Для получения однородной суспензии помещали стакан с гидролизатом на водяную баню при температуре 50°C и перемешивали. Получали раствор гидролизата с концентрацией 100 мг/мл. Из полученного раствора готовили ряд разведений гидролизата, соответствующий концентрациям 0,1–0,2–1–2–10,0–20,0–40,0 мг/мл. Содержание сухого вещества в тест-системе уменьшалось в 10 раз и составляло 0,01–0,02–0,1–0,2–1,0–2,0–4,0–100,0 мг/мл.

Методика определения антиоксидантной активности гидролизата сывороточных белков. Общий объем пробы, помещаемый в кювету, составлял 2 мл. В кювету вносили 0,02 мл флуоресцеина (2 мкмоль раствор) и 1,98 мл 100 ммоль Na-фосфатного буфера. Прописывали спектр, полученные значения пика флуоресценции принимали за 100%.

Контрольная проба: в кювету вносили 0,02 мл флуоресцеина (2 мкмоль раствор), 0,2 мл Fe^{2+} с ЭДТА (1 ммоль раствор), 1,58 мл 100 ммоль Na-фосфатного буфера и 0,2 мл пероксида водорода (10 ммоль раствор). При взаимодействии Fe^{2+} с H_2O_2 (реакция Фентона) образующиеся радикалы подавляли свечение флуоресцеина. Полученные значения пика флуоресценции принимали за минимальное.

Опытная проба: в кювету вносили 0,02 мл флуоресцеина (2 мкмоль раствор), 0,2 мл Fe^{2+} с ЭДТА (1 ммоль раствор), 0,2 мл гидролизата сывороточных белков (0,1–100,0 мг/мл) и 1,38 мл 100 ммоль Na-фосфатного буфера. Реакцию начинали добавлением 0,2 мл пероксида водорода (10 ммоль раствор). Конечные концентрации реагентов в тест-системе: флуоресцеина – 0,02 мкмоль, Fe^{2+} – 0,1 ммоль, ЭДТА – 0,1 ммоль, H_2O_2 – 1 ммоль, гидролизата сывороточных белков – 0,01–10 мг/мл. Полученные значения пиков флуоресценции выражали в процентах, взяв за 100% флуоресценцию раствора без Fe^{2+} , ЭДТА, гидролизата сывороточных белков и пероксида водорода.

Измерения флуоресценции проводили на флуориметре RF-5301 PC (Shimadzu, Япония). Регистрировали интенсивность флуоресценции на длине волны 514 нм, длина волны возбуждения – 490 нм.

Результаты и обсуждение

Получены экспериментальные данные о зависимости интенсивности флуоресценции (А, %) флуоресцеина (ФЛ) от логарифма концентрации тролокса, взятого в качестве эталона сравнения АОА с образцами гидролизатов (рисунок 1). АОА тролокса изучена в интервале концентраций 0,001–0,2 мг/мл. Тролокс восстанавливал флуоресценцию ФЛ до 70% при его содержании в реакционной смеси 0,1 мг/мл. Повышение концентрации тролокса вызывало снижение активности антиоксиданта, что можно объяснить взаимодействием радикальных продуктов его окисления с флуоресцеином и снижением его флуоресценции.

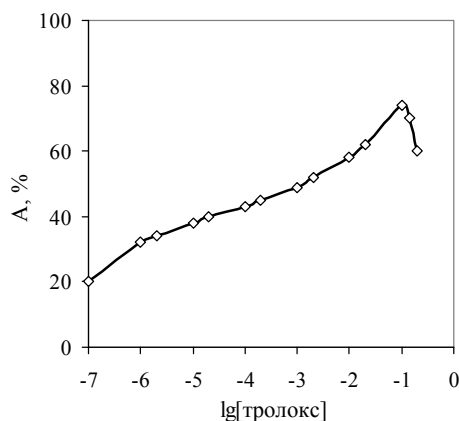
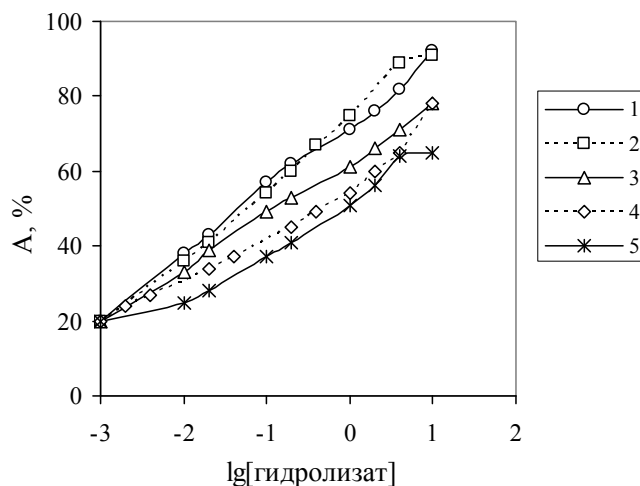


Рисунок 1 – График зависимости интенсивности флуоресценции (А, %) флуоресцеина от логарифма концентрации тролокса

Графически определена величина IC_{50} – концентрация тролокса, при которой достигается 50% ингибирования свободных радикалов; она составила $3,16 \times 10^{-3}$ мг/мл. Величину использовали для расчета ТЕ (Trolox Equivalent) – показателя АОА, отражающего уровень АОА гидролизатов относительно стандарта (тролокса).

На рисунке 2 представлены графики зависимости интенсивности флуоресценции (А, %) ФЛ от логарифма концентрации гидролизатов сывороточных белков Prodiet GF 006 (1), Optiper-80 DH 32 (2) и Peptigen IF 3080 WPH (3), Vital Armor H 801 LB (4) и Hilmar 8350 (5).

Согласно экспериментальным данным, гидролизаты сывороточных белков начинают подавлять действие свободных радикалов при концентрации 0,01 мг/мл. Для гидролизатов Prodiet GF 006 и Optiper-80 DH 32 показана высокая степень антиоксидантной активности. Указанные образцы восстанавливали флуоресценцию ФЛ до 91–92% при концентрации 10 мг/мл. Для образца Peptigen IF 3080 WPH наблюдалось восстановление уровня флуоресценции до 78%, что также является достаточно высоким показателем АОА. В случае гидролизата Vital Armor H 801 LB установлены аналогичные показатели (78% при внесении 10 мг/мл образца), однако при более низких концентрациях его действие менее выражено, чем Peptigen IF 3080 WPH. Для гидролизата Hilmar 8350 показан минимальный уровень антирадикальной активности. Внесение образца ингибировало действие активных форм кислорода на 65%, что в 1,4 раза менее эффективно, чем при добавлении в реакционную смесь гидролизатов Prodiet GF 006 и Optiper-80 DH 32.

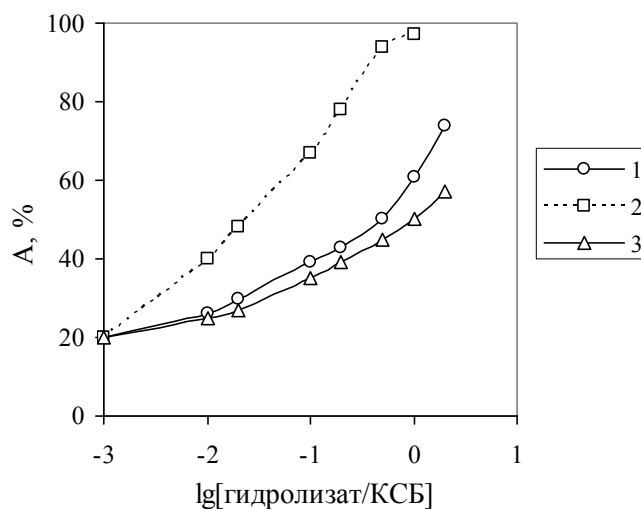


1 – Prodiet GF 006, 2 – Optiper-80 DH 32, 3 – Peptigen IF 3080 WPH, 4 – Vital Armor H 801 LB, 5 – Hilmar 8350

Рисунок 2 – График зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А, %) от логарифма концентрации гидролизатов сывороточных белков

На рисунке 3 показаны графики зависимости интенсивности флуоресценции ФЛ от логарифма концентрации опытных образцов гидролизатов сывороточных белков и концентрата сывороточных белков (КСБ). Опытный образец гидролизата сывороточных белков № 1 начинал подавлять действие свободных радикалов при концентрации 0,01 мг/мл, тогда как опытный образец № 2 – при содержании на порядок ниже – 0,001 мг/мл. Установлено, что опытный образец № 1 обладает достаточно высокой АОА на уровне зарубежного аналога Peptigen IF 3080 WPH. Он восстанавливал флуоресценцию окисляемого соединения до 74% при концентрации гидролизата 2 мг/мл. Наряду с этим, опытный образец № 2 характеризовался большей антирадикальной активностью, чем опытный образец № 1 и зарубежные образцы гидролизатов. Показано возрастание флуоресценции ФЛ до 97% при внесении в реакционную смесь 1 мг/мл образца № 2. Концентрат сывороточных белков, являющийся субстратом для получения гидролизатов сывороточных белков, обладал самой низкой АОА. При внесении в тест-систему 2 мг/мл негидролизованых сывороточных

белков установлено возрастание интенсивности флуоресценции до 60%. Согласно полученным экспериментальным данным, ферментативный гидролиз белков молочной сыворотки обусловил увеличение их ингибирующей активности по отношению к активированным формам кислорода.



1 – опытный образец гидролизата № 1, 2 – опытный образец гидролизата № 2, 3 – КСБ

Рисунок 3 – График зависимости интенсивности флуоресценции (A, %) флуоресцеина от логарифма концентрации опытных образцов гидролизатов сывороточных белков и КСБ

В таблице 1 представлены основные показатели антиоксидантной активности: A_{\max} – интенсивность флуоресценции, соответствующая максимальному ингибированию свободных радикалов; C_{\max} – концентрация гидролизатов, при которой достигается A_{\max} ; IC_{50} – концентрация антиоксиданта (гидролизатов и КСБ), при которой достигается 50% ингибирования свободных радикалов; TE (Trolox Equivalent) – показатель АОА, отражающий уровень АОА образцов гидролизатов относительно тролокса, или IC_{50} (тролокса) / IC_{50} (гидролизата); TE (гидролизата) / TE (КСБ) – показатель, который отражает, во сколько раз АОА гидролизатов превышает антиоксидантные свойства КСБ.

В соответствии с данными производителей, образцы Prodiет GF 006, Optiper-80 DH 32, Reptigen IF 3080 WPH и опытный образец гидролизата № 2 характеризуются высокой степенью гидролиза – 20–32%. С увеличением количества пептидной фракции и глубины расщепления белковых субстратов достигается возрастание антиоксидантной активности.

Для опытного образца гидролизата № 2, полученного с применением комплекса сериновых протеаз (алкалазы и трипсина), установлено минимальное значение IC_{50} – 0,022 мг/мл, что свидетельствует о его максимальных антирадикальных свойствах. Уровень АОА данного образца оказался в 45,6 раза больше негидролизованых сывороточных белков (КСБ), что в 2 раза превышает показатели зарубежных аналогов Prodiет GF 006, Optiper-80 DH 32, в 6,0 раз – образца Reptigen IF 3080 WPH (таблица 1).

Опытный образец гидролизата № 1, полученный в результате ферментативного гидролиза алкалазой, аналоги Vital Armor H 801 LB и Hilmar 8350 следует отнести к категории образцов со средней степенью гидролиза – 12,5–16%. Так показатель IC_{50} образца № 1 достигал 0,44 мг/мл, что сопоставимо с данными Vital Armor H 801 LB, однако в 8,8 раза выше, чем гидролизата Prodiет GF 006 и в 20 раз – опытного образца № 2. Согласно данным таблицы 1, антиоксидантная активность гидролизата Vital Armor H 801 LB и опытного образца № 1 в 2,3 раза выше, чем нативных белков молочной сыворотки (КСБ).

Наряду с этим, для образца Hilmar 8350 с минимальной степенью гидролиза (12,5%) установлено максимальное значение IC_{50} (0,89 мг/мл), что в 17,8 раза выше данных, полученных для гидролизата Prodiет GF 006, и в 40,4 раза – опытного образца № 2. В целом,

это свидетельствует самой низкой антирадикальной активности Hilmar 8350 в изученном ряду гидролизатов сывороточных белков молока.

Таблица 1 – Характеристика и показатели АОА гидролизатов сывороточных белков молока

Наименование гидролизата	Пептидный профиль *	Соотношение α -аминного и общего азота, AN/TN, %*	A _{max} , %	C _{max} , мг/мл	IC ₅₀ , мг/мл	TE, 10 ⁻³ отн. ед.	TE (г-т) / TE (КСБ)
Опытный образец гидролизата № 2	≤10 кДа 93,2 %	22	97	1	0,022	144,0	45,6
Prodiet GF 006	<5 кДа 97,2 %	20–25	92	10	0,050	63,2	20,0
Optiper–80 DH 32	<10 кДа 99,0 %	28–32	91	10	0,051	62,0	19,6
Peptigen IF 3080 WPH	<10 кДа 99,9 %	22–28	78	10	0,132	23,9	7,6
Vital Armor H 801 LB	<10 кДа 87 %	16	78	10	0,434	7,28	2,3
Опытный образец гидролизата № 1	≤10 кДа 98,0 %	15,5	74	2	0,440	7,18	2,3
Hilmar 8350	<20 кДа 83,0 %	12,5	65	10	0,890	3,55	1,1
КСБ	–	–	60	2	1,0	3,16	1,0

Примечание: * – показатели представлены согласно данным производителей

Заключение

С увеличением степени гидролиза сывороточных белков молока и количества низкомолекулярной пептидной фракции установлено возрастание антиоксидантной активности изученных образцов. Результаты исследований коррелируют с данными по определению уровня АОА гидролизатов с использованием другого методического подхода – АВТС-радикал-восстанавливающей активности [8].

Ферментативный гидролиз сывороточных белков сериновыми протеазами (алкалазой, комплексом трипсина и алкалазы) обеспечил получение образцов частичных гидролизатов с различной степенью расщепления субстратов и антирадикальным потенциалом. Образец гидролизата, полученный при расщеплении белков алкалазой, по физико-химическим показателям и уровню антиоксидантной активности соответствует образцу Vital Armor H 801 LB, а в случае совместного применения алкалазы и трипсина превосходит зарубежные аналоги (Prodiet GF 006, Optiper-80 DH 32 и Peptigen IF 3080 WPH), которые в настоящее время используют в качестве белкового компонента продуктов детского и специализированного питания.

Список литературы

1. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk / A. Zulueta [et al.] // Int. Dairy J. – 2009. – Vol. 19, № 6–7. – P. 380–185.
2. Halavach, T.M. Enzymatic hydrolysis of milk proteins as a basis of specialized food products biotechnology / T.M. Halavach, V.P. Kurchenko, A.I. Albulov // Ural Scientific Bulletin. – 2014. – № 25 (104). – P. 69–79.
3. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin / B. Hernández-Ledesma [et al.] // Int. Dairy J. – 2007. – Vol. 17, № 1 – P. 42–49.

4. Cao, G.H. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants / G.H. Cao, H.M. Alessio, R.G. Cutler // *Free Radic. Biol. Med.* – 1993. – Vol. 3, № 14. – P. 303–311.
5. Ehlenfeldt, M.K. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry / M.K. Ehlenfeldt, R.I. Prior // *J. Agric. Food Chem.* – 2001. – Vol. 49. – P. 2222–2227.
6. Сычев, А.Я. Гомогенный катализ соединениями железа / А.Я. Сычев, В.Г. Исак // Кишинев: Штиинца, 1988. – 216 с.
7. Wei, Y. A novel H₂O₂-triggered anti-Fenton fluorescent pro-chelator excitable with visible light / Y. Wei // *Chem. Commun.* – 2009. – Vol. 11. – P. 1413–1415.
8. Антигенные свойства и антирадикальная активность ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки / Т.Н. Головач [и др.] // Труды БГУ. – 2014. – Т. 9, ч. 1. – С. 172–179.

EFFECT OF WHEY PROTEIN PEPTIDES ON RECOVERY OF FLUORESCENCE LEVEL IN SYSTEM WITH ACTIVATED FORM OF OXYGEN

E.I. Tarun, M.V. Zaitseva, O.I. Kravtsova*, V.P. Kurchenko*, T.M. Halavach*

International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Belarus

**Belarusian State University, Minsk, Belarus*

e-mail: halavachtn@gmail.com, ktarun@tut.by

The antioxidant activity of obtained samples of enzymatic hydrolysates prepared using serine proteases (alcalase, complex alcalase and trypsin) and their foreign analogues was described. The antiradical potential of native whey proteins and peptides was identified using fluorimetric method. The fluorescence recovery of oxidized compound (fluorescein) after introduction of antioxidants (trolox, whey proteins and their hydrolysates) in test system was evaluated. The correlation between increase in degree of protein hydrolysis and raise in their antioxidant properties was established. Obtained sample that was prepared using trypsin and alcalase had maximum level of radical-inhibitory activity (increase of 45.6 times compared to native whey proteins). Experimental data for the study of biological activities of partial hydrolysates with predetermined protein and peptide profile are the basis for obtaining a component with a high biological value for functional food products.