

CHARACTERISTICS OF THE MOLECULAR WEIGHTS OF WHEY PROTEIN CONCENTRATE PROTEOLYSIS PRODUCTS OBTAINED BY THE ACTION OF PANCREATINE

V. Yukalo, K. Datsyshyn, G. Semenyshyn

Ternopil Ivan Pul'uj National Technical University

Key words:

*Whey protein concentrate
Proteolysis
Molecular weight
distribution of peptides
Gel filtration*

Article history:

Received 18.09.2019
Received in revised form
02.10.2019
Accepted 16.10.2019

Corresponding author:

V. G. Yukalo

E-mail:

biotech@tu.edu.te.ua

ABSTRACT

Recent decades studies testify that the value of whey proteins is associated with their biological activity, which may be manifested at the level of numerous bioactive peptides. Such peptides can affect the functions of the digestive, cardiovascular, nervous and immune systems of the body. However, when proteolysis is used in the technological processes with milk whey, conditions for the formation of natural bioactive peptides (BAP) are not always provided. The ability to form natural biologically active peptides is closely associated to the degree of proteolysis of their individual proteins-precursor, as well as to the molecular weight distribution of the resulting proteolysis products.

Whey protein concentrate (WPC) was used as the substrate for proteolysis. The fractional composition of WPC proteins was determined by express electrophoresis in the anode system of a homogeneous polyacrylamide gel (PAG). Proteolysis of 15% WPC was performed in physiological conditions (pH 7.9; 37°C) at the ratio of E:S = 1:20. Samples were taken after 120 minutes of proteolysis to characterize the molecular weight distribution. The amount of products after proteolysis that are not precipitated by 5% trichloroacetic acid is more than 70% at that moment. Three types of Sephadexes were selected for gel filtration of WPC proteolysis products: Sephadex G—10 (0—700 Da), Sephadex G—25 (1000—5000 Da) and Sephadex G—50 (1500—30000 Da). Unsplit proteins and polypeptides in the selected samples were precipitated by trichloroacetic acid before the gel filtration. Use of Sephadexes G—10, G—25 and G—50 combination in gel filtration of WPC proteolysis products by pancreatin in physiological conditions allows to isolate five ranges of peptides and polypeptides by molecular weight. Two of them (0—700 Da and 700—1500 Da) comprise almost 40% of all products of proteolysis, which can contain about 80% of all known BAP from milk whey proteins.

ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНИХ МАС ПРОДУКТІВ ПРОТЕОЛІЗУ КОНЦЕНТРАТУ СИРОВАТКОВИХ БІЛКІВ, ОТРИМАНИХ ЗА ДІЇ ПАНКРЕАТИНУ

В. Г. Юкало, К. Є. Дацишин, Г. М. Семенишин

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

Дослідження останніх десятиліть свідчать про те, що цінність білків сироватки молока пов'язана з їх біологічною активністю, що може проявлятися на рівні численних біоактивних пептидів. Такі пептиди впливають на функції травної, серцево-судинної, нервової та імунної систем організму. Проте при використанні протеолізу в технологічних процесах переробки сироватки не завжди забезпечуються умови для утворення природних біоактивних пептидів (БАП). Можливість утворення природних біологічно активних пептидів тісно пов'язана із ступенем протеолізу їх окремих протеїнів-попередників, а також молекулярно-масовим розподілом отриманих продуктів протеолізу.

Як субстрат для проведення протеолізу було використано концентрат сироваткових білків (КСБ). Фракційний склад білків КСБ було визначено з допомогою експрес-електрофорезу в анодній системі однорідного поліакриламідного гелю (ПАГ). Протеоліз 15% КСБ проводили у фізіологічних умовах (рН 7,9; 37°C) при співвідношенні $E:S = 1:20$. Для характеристики молекулярно-масового розподілу відбирали зразки через 120 хвилин протеолізу. На цей момент кількість продуктів протеолізу, що не осаджуються 5-відсотковою трихлороцтовою кислотою становить більше 70%. Для проведення гель-фільтрації продуктів протеолізу КСБ були вибрані три типи сефадексів: сефадекс G-10 (0—700 Да), сефадекс G-25 (1000—5000 Да) і сефадекс G-50 (1500—30000 Да). Перед гель-фільтрацією у відібраних взірцях осаджували нерозщеплені білки і поліпептиди трихлороцтовою кислотою. Застосування комбінації сефадексів G-10, G-25 і G-50 при гель-фільтрації продуктів протеолізу КСБ панкреатином у фізіологічних умовах дає змогу виділити п'ять діапазонів пептидів і поліпептидів за молекулярними масами. До двох з них (0—700 Да і 700—1500 Да) входять майже 40% всіх продуктів протеолізу, які можуть містити близько 80% усіх відомих БАП з протеїнів сироватки молока.

Ключові слова: концентрат сироваткових білків, протеоліз, молекулярно-масовий розподіл пептидів, гель-фільтрація.

Постановка проблеми. За сучасними уявленнями цінність білків сироватки молока значною мірою пов'язана з їх біологічною активністю, яка може проявлятися на рівні інтактних молекул, а також численних біоактивних пептидів. Такі пептиди утворюються під дією ферментів шлунково-кишкового тракту в процесі нормального травлення. Проте при використанні протеолізу в технологічних процесах переробки сироватки не завжди забез-

печуються умови для утворення природних біоактивних пептидів (БАП). Це передусім стосується параметрів протеолізу (рН, температура), а також специфічності протеолітичної дії ферментних препаратів. Як правило, відсутній адекватний контроль, який би підтверджував можливість утворення біоактивних пептидів. При проведенні протеолізу протеїнів сироватки за використання препаратів травних протеаз у фізіологічних умовах важливим критерієм може бути молекулярно-масовий розподіл отриманих пептидів.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. В останнє десятиліття охарактеризовано більше сотні різних біоактивних пептидів з білків сироватки молока [1; 2] і доведено їхній позитивний вплив на різні фізіологічні системи організму. Серед таких пептидів найбільш поширеними є лактокініни. Вони здатні гальмувати дію ангіотензин-перетворювального ензиму, що призводить до зниження артеріального тиску [3]. Важливе місце серед біоактивних пептидів займають антимікробні пептиди. Вони утворюються переважно з лактоферину, α -лактальбуміну і в меншій мірі з β -лактглобуліну [4]. Ці пептиди пригнічують розвиток багатьох хвороботворних бактерій, а також вірусів. З α -лактальбуміну виділено ряд імуномодуляторних пептидів, які здатні активувати проліферацію лімфоцитів і синтез антитіл, підвищувати активність природних клітин кілерів. Вони також можуть підвищувати імунітет клітин слизової шлунково-кишкового тракту і знижувати вияви алергічних реакцій [5]. Також серед БАП з сироваткових білків знайдені опіюїдні пептиди, пептиди, з холестеролевмічною дією, регулятори перистальтики, пептиди, які впливають на апетит [6].

Майже всі відомі БАП були отримані за дії травних протеаз. Переважно це був комплексний ферментний препарат панкреатин. Деякі БАП були отримані за дії ферментів, які входять до складу панкреатину — трипсину і хімотрипсину [2].

Значення молекулярних мас відомих БАП з білків сироватки молока знаходиться в межах від 100 до 2000 Да. Тож, якщо при використанні панкреатину у фізіологічних умовах для протеолізу білків сироватки молока утворюються пептиди із такою молекулярною масою, велика ймовірність, що серед них будуть природні БАП.

Найчастіше для характеристики молекулярних мас продуктів протеолізу білків сироватки використовували ексклюзивну хроматографію на сефадексі G-25, а також G-50, G-75 і навіть G-100 [3; 7—8]. Проте жоден з цих гелів не здатен дати повну картину молекулярно-масового розподілу продуктів протеолізу. Так, найбільш популярний сефадекс G-25 дає змогу оцінити вміст двох груп пептидів з молекулярними масами від 0 до 1000 Да і від 1000 до 3000 Да. В першу групу не входять всі БАП, а в другу групу, окрім БАП, потрапить багато великих пептидів без біологічної дії. Подібна ситуація з сефадексами G-75 і, особливо, G-100. У зв'язку з цим перспективним може бути використання для визначення молекулярно-масового розподілу поєднанням декількох сефадексів з низькими значеннями молекулярних мас молекул, які виключаються гранулами гелю.

Мета дослідження: характеризувати гель-фільтрацією молекулярно-масовий розподіл продуктів протеолізу концентрату сироваткових білків за дії панкреатину.

Матеріали і методи. Як субстрат для протеолізу використовували концентрат сироваткових білків (КСБ), вироблений на ТОВ «Бучацький сирзавод» згідно з проектом ТУ У 15.5-00419880-XXX:2011 «Концентрат сироваткових білків (КСБ-УФ). Технічні умови» з масовою часткою білка 72,0. Сироватку молока виділяли центрифугуванням знежиреного свіжого молока після осадження казеїну в ізоелектричній точці. Протеоліз проводили панкреатином виробництва ПрАТ «Технолог» (Україна). Електрофорез білків сироватки і КСБ проводили експрес-методом в однорідному поліакриламідному гелі (ПАГ) [9]. Протеолітичну активність ферментного препарату визначали за методом В. Селеменєва [10].

У процесі дослідження використані реактиви фірми «Reanal», а також вітчизняні реактиви високого ступеня очистки.

Концентрацію білків сироватки і продуктів їх протеолізу визначали спектрофотометрично при довжині хвилі $\lambda = 280$ нм. При цьому використовували коефіцієнт абсорбції ($D_{1\text{cm}}^{1\%}$) — 12,3 [3].

Гель-фільтрацію продуктів протеолізу КСБ проводили на колонках з набору для рідинної хроматографії фірми «Reanal» (Угорщина). При цьому були використані три типи сефадексів G-10, G-25, G-50.

Результати і обговорення. Як субстрат для проведення протеолізу було використано КСБ. Фракційний склад білків КСБ було визначено з допомогою експрес-електрофорезу в анодній системі однорідного ПАГ, яка була спеціально розроблена для аналізу молочної сироватки [9]. Метод дає змогу надійно ідентифікувати всі основні попередники БАП у сироватці молока. Результати аналізу показані на рис. 1. На електрофореграмі КСБ видно типовий фракційний склад протеїнів сироватки молока: β -лактоглобулін (β -LG), α -лактоальбумін (α -LA), альбумін сироватки крові (BSA) та імуноглобуліни (IG).

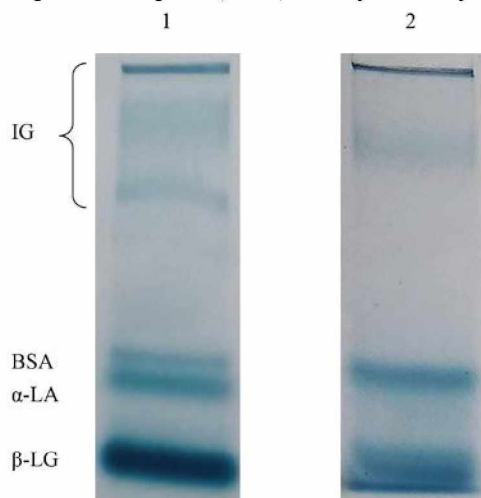
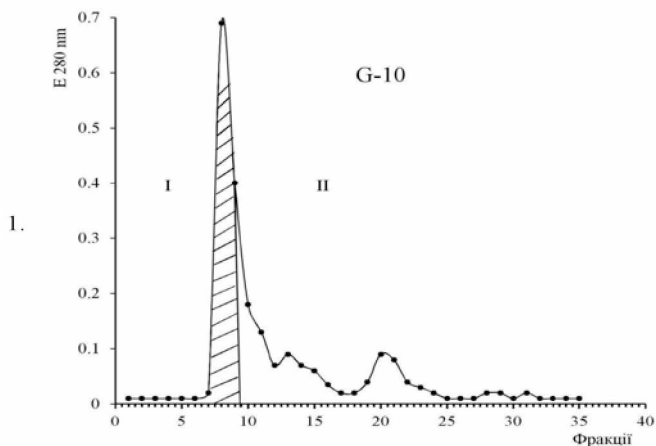


Рис. 1. Електрофореграма протеїнів сироватки молока (1) і концентрату сироваткових білків (2)

Протеоліз 15% КСБ проводили у фізіологічних умовах (рН 7,9; 37°C) при співвідношенні Е:С = 1:20. Таке співвідношення використовується при виробництві гідролізатів білків молочної сироватки для дитячих і гіпоалергенних продуктів [8]. Для характеристики молекулярно-масового розподілу відбирали зразки через 120 хв протеолізу. На цей момент кількість продуктів протеолізу, що не осаджуються 5 відсотковою трихлороцтовою кислотою, становить більше 70%.

Для проведення гель-фільтрації продуктів протеолізу КСБ були вибрані три типи сефадексів з низькими значеннями молекулярних мас діапазону фракціонування пептидів. Це були: сефадекс G-10 (0—700 Да), сефадекс G-25 (1000—5000 Да) і сефадекс G-50 (1500—30000 Да). Комбінація таких сефадексів при гель-фільтрації дає змогу оцінити вміст низькомолекулярних пептидів гідролізату, серед яких знаходяться відомі БАП. Перед гель-фільтрацією у відібраних взірцях осаджували нерозщеплені білки і поліпептиди трихлороцтовою кислотою. Для запобігання втратам елюцію низькомолекулярних пептидів проводили в 5-відсотковій оцтовій кислоті. Результати гель-фільтрації показані на хроматограмах (рис. 2). З урахуванням молекулярних мас виключення кожна хроматограма розділена на сектори. Хроматографічні фракції кожного сектору об'єднували і визначали загальний вміст продуктів протеолізу. Результати були отримані на основі трьох гель-фільтрацій з кожним типом сефадексу. За молекулярними масами було виділено п'ять діапазонів. Результати розрахунків вмісту пептидів кожного діапазону і їх відсоток від загального вмісту продуктів протеолізу показані в табл. 1. Відомо, що близько половини БАП з білків сироватки молока мають молекулярні маси до 700 Да [2; 3]. Приблизно ще 30% БАП знаходяться в діапазоні від 700 до 1500 Да. Незначна частина БАП знаходиться у низькомолекулярній частині третього діапазону (від 1500 Да до 5000 Да). Сюди переважно відносяться біоактивні поліпептиди з лактоферину з бактерицидною та імуномодуляторною дією [4]. В сукупності серед продуктів протеолізу КСБ пептиди і поліпептиди, серед яких можуть бути БАП, становить більше 40%.



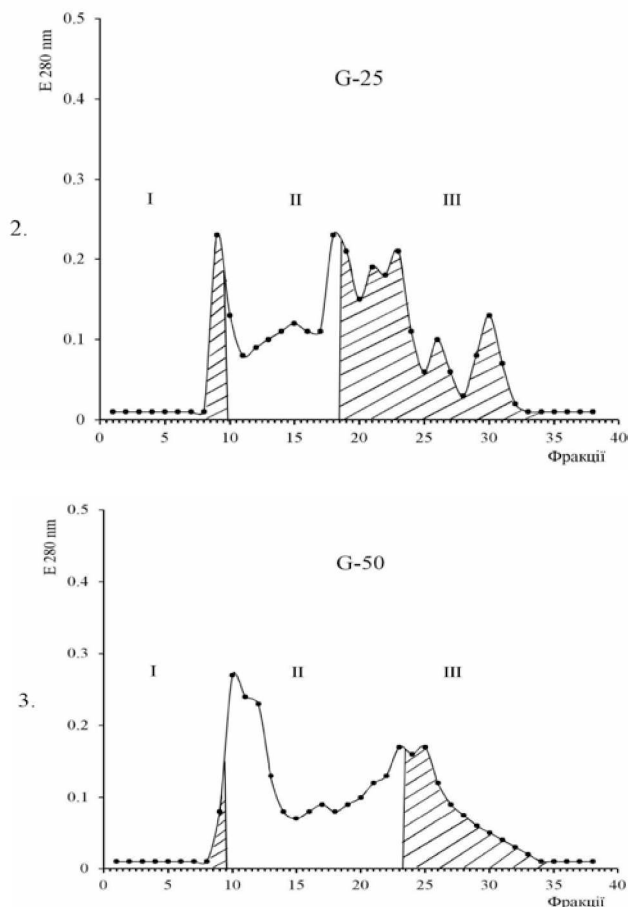


Рис. 2. Хроматограми панкреатинного гідролізату КСБ, отримані гель-фільтрацією на сефадексі G-10 (1), G-25 (2) і G-50 (3)

Оскільки протеоліз проводили у фізіологічних умовах з використанням ферментного препарату з підшлункової залози, то можна стверджувати, що всі природні БАП входять до складу гідролізату.

Таблиця 1. Молекулярно-масовий розподіл продуктів протеолізу КСБ панкреатином

Діапазон молекулярних мас (Да)	>30000	30000>M>5000	5000>M>1500	1500>M>700	>700
Кількість продуктів протеолізу (мг)	4±1	21±3	65±5	18±3	36±4
Відсоток від загальної кількості продуктів протеолізу (%)	3%	14%	45%	13%	25%

Висновок

Застосування комбінації сефадексів G-10, G-25 і G-50 при гелі-фільтрації продуктів протеолізу КСБ панкреатином у фізіологічних умовах дає змогу виділити п'ять діапазонів пептидів і поліпептидів за молекулярними масами. До двох з них (0—700 Да і 700—1500 Да) входять майже 40% усіх продуктів протеолізу, які можуть містити близько 80% всіх відомих БАП з протеїнів сироватки молока.

Література

1. Brandelli A., Daroit D. J., Correa A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*. 2015. V. 73. P. 149—161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.016>.
2. Iukalo A. V., Datsyshyn K. Ye., Yukalo V. G. Bioaktyvni peptydy proteiniv syrovatky moloka koriv (Bos Taurus). *Biotechnologia Acta*. 2013. V. 6(5). 49—61. doi: 10.15407/biotech6.05.049.
3. Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. Dairy Chemistry and Biochemistry (Second Editon). New York: Springer, 2015. 585 p. doi: 10.1007/978-3-319-14892-2.
4. Madureira A. R., Pereira C.I., Gomes A. M. P. Bovine whey proteins — Overview on the main biological properties. *Food Research International*. 2007. V. 40(10). P. 1197—1211.
5. Gauthier S. F., Pouliot Y., Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*. 2006. V. 16(11). P. 1315—1323.
6. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 2006. V. 16(9). P. 945—960.
7. Данилов И. М., Забодалова Л. А., Скопичев В. Г., Жичкина Л. В. Получение низкомолекулярных пептидов молока и исследование их иммуностимулирующей активности. *Научный журнал КубГАУ*. 2011. Т. 70(06). С. 1—9.
8. Декуша Г.В. Розробка технології сухих сумішей з гідролізованим білком для дитячого харчування: дис. ... канд. техн. наук : 05.18.16. Одеса, 2009. 157 с.
9. Yukalo V., Datsyshyn K., Storozh L. Electrophoretic system for express analysis of whey protein fractions. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2019. V. 2(11 (98)). P. 37—44. doi: 10.15587/1729-4061.2019.160186.
10. Польшалина Г. В. Определение активности ферментов. Справочник / Г. В. Польшалина, В. С. Чердниченко, Л. В. Римарева. М.: Де Ли принт, 2003. 375 с.