

BİOLOGİYA

УДК 577.1:577.156

ВЛИЯНИЕ ПЕПСИНА НА АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ, ВЫСВОБОЖДАЮЩИХСЯ ИЗ КАЗЕИНОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПРОТЕАЗ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

**Р.С.МУСТАФАЕВА, А.Ф.АХМЕДОВА,
С.Г.ГЮЛЬАХМЕДОВ, А.А.КУЛИЕВ**
Бакинский Государственный Университет
biochem@mail.az

*Целью данной работы было изучение влияния протеолитической активности различных штаммов МКБ на образование антиоксидантных пептидов из казеинов молока, а также исследование устойчивости этих пептидов к гидролизу пепсином в условиях *in vitro* стимулированного пищеварения. Антиоксидантную активность гидролизатов после каждого этапа гидролиза определяли спектрометрически путем измерения нейтрализации АБТС+ радикала. В качестве эквивалента использовали аналог токоферола – Тролокс и антиоксидантную активность рассчитывали в виде Тролокс Эквивалентного Антиоксидантного Потенциала. Антиоксидантную активность пептидов определяли в гидролизатах, полученных после 4 и 24 ч гидролиза бактериальными клетками, а также в гидролизатах, полученных после протеолиза последних пепсином. В ходе экспериментов было показано, что в результате гидролиза казеинов протеазами штаммов МКБ образовывались пептиды, обладающие способностью нейтрализовать свободные радикалы. Эти пептиды проявили различную устойчивость к пепсину, которая зависела от штамма, которым проводился прегидролиз субстрата, а также от времени инкубации с субстратом.*

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, протеолитическая активность, казеин, антиоксидантные пептиды

Пищевые продукты являются важнейшим источником биологически активных белков и пептидов, обладающих широчайшим спектром уникальных биологических свойств – антибактериальных и противовирусных, антиоксидантных, гипотензивных, иммуностимулирующих и т.д. [6, 8]. В процессе естественной обработки пищевых белков в пище-

варительном тракте (а в случае предварительной ферментации различными микроорганизмами и до этого) такие пептиды высвобождаются из структуры белков и начинают действовать как самостоятельные регуляторные единицы, обладающие активностью.

Молоко является особо важным источником биологически активных пептидов. Последние находятся в составе как казеина (α s, β , κ и у-казеина), так и белков сыворотки (α -лактальбумина, β -лактоглобулина, лактоферрина и иммуноглобулинов) и могут быть высвобождены в ходе гидролиза собственными ферментами пищеварения или ферментами микроорганизмов [3, 6]. Биологически активные пептиды были обнаружены в молоке, ферментированном разнообразными молочнокислыми бактериями [9]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидролизаты молочных белков могут быть использованы как натуральные антиоксиданты для повышения антиоксидантных свойств функциональных пищевых продуктов. При этом, активность выделенных пептидов прямо зависит от типа использованных для ферментации бактериальных культур, от длительности процесса ферментации, достигнутой степени протеолиза и многих других факторов. Адекватный протеолиз способствует высвобождению активных пептидов, но когда он превышает определенный лимит, активность последних снижается.

Несмотря на то, что биологический эффект различных пептидов, высвобождающихся в процессе ферментации, был достаточно широко изучен, очень мало известно о способности этих пептидов, противостоять процессу пищеварения и сохранять свою биологическую активность. Пищеварительные ферменты могут повлиять на период полураспада этих пептидов, расщепляя активные последовательности, или, наоборот, освободить биологически активные фрагменты, которые могут иметь новые биологические свойства [6, 12].

Целью данной работы было изучение влияния протеолитической активности различных штаммов МКБ на образование антиоксидантных пептидов из казеинов молока, а также исследование устойчивости этих пептидов к гидролизу пепсином в условия *in vitro* стимулированного пищеварения.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В исследовании использовались штаммы молочнокислых бактерий (МКБ) (таблица 1) из лабораторной коллекции кафедры Биохимии и биотехнологии Бакинского Государственного Университета. Данные штаммы были ранее выделены из традиционных сыров нашей республики. Они являются продуцентами протеолитических ферментов и их протеолитическая активность была детально охарактеризована в предыдущих работах [1, 2].

Приготовление гидролизатов. Протеолиз казеинов штаммами МКБ проводили согласно Figa и соавт. [5]. Свежую культуру исследуемо-

го штамма наносили на поверхность молоко-цитрат агаризованной среды (обезжиренное молоко 4.4%, Na-цитрат 0.8%, дрожжевой экстракт 0.1%, глюкоза 0.5%, агар 1.5% (по массе на объем) в чашках Петри для индукции протеаз. Через 48 часов клетки собирали с поверхности молоко-цитрат агаризованной среды, промывали (8000 об/мин) физиологическим раствором (0.8% NaCl) в присутствии 5мМ ионов Ca^{2+} и разбавляли в фосфатном буфере (100 мМ, рН 7.0) до ОП₆₀₀ нм, равной 20, что приблизительно равно 2×10^{10} КФЕ/мл. Клеточную суспензию смешивали в равных пропорциях с субстратом (Na-казеинат-12 мг/мл), растворенным в том же буфере, и инкубировали в течение 4 и 24 ч при температуре 37°C. В качестве контроля использовали субстрат, инкубированный при тех же условиях в отсутствии клеток. После инкубации клетки удаляли (центрифугирование, 12000 об/мин) и супернатант использовали для следующего этапа - гидролиза пепсином.

Таблица 1

Штаммы МКБ использованные в исследовании

Штамм	Условия культивирования	Тип продуцируемых протеаз	Гидролизруемый субстрат
<i>Lb. helveticus</i> A75	MRS, 30°C	Р III, серин-пр	α_S - и β -казеины
<i>Lb. paracasei</i> A582	MRS, 30°C	Р I, серин-пр	β -казеин
<i>E. faecalis</i> AN1	MRS, 37°C	Р III, металло- и цистеин-пр	α_S - и β -казеины, БЛГ
<i>E. faecalis</i> A121	MRS, 37°C		α_S - и β -казеины

Гидролиз пепсином. Пепсин гидролиз проводили по методике, описанной Моисеосоу и соавт. [10]. Гидролизаты, полученные при гидролизе бактериальными клетками, а также нативные субстраты, не подверженные гидролизу клетками штамма (контроль), подвергали дальнейшему гидролизу пепсином. Гидролиз пепсином проводили в течение 1 часа при рН 2.0 и температуре 37 °С. Концентрация пепсина (Sigma, 4720 ЕД/мг протеина) рассчитывалась из соотношения фермент/субстрат 1/400, соответственно. Для останавления реакции рН образцов доводили до 8.0 с последующей инкубацией при 80 °С в течение 5 мин.

Измерение антиоксидантной активности гидролизатов. Антиоксидантную активность (АОА) субстрата (контроль) и гидролизатов, полученных как при гидролизе бактериальными штаммами, так и при гидролизе пепсином, определяли спектрометрически, методом Тролокс эквивалентного антиоксидантного потенциала (ТЭАП) [13]. Метод основывается на получении катион радикала АБТС (2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин 6-сульфонат) с последующим его взаимодействием с антиоксидантом. Раствор, содержащий АБТС⁺ радикал (Sigma-Aldrich), приготавливали следующим образом: 7мМ-ый водный раствор АБТС (Sigma-Aldrich) окисляли в присутствии 2.45 мМ калия персульфата (молярное соотношение 1:0.5) в течение 12-16 ч в темноте. Перед началом эксперимента раствор АБТС⁺ радикала разбавляли с помощью 5 мМ фосфатного

буфера (рН 7.4) до получения ОП 0.70 ± 0.2 при $\lambda=734$ нм. В полученный раствор (1 мл) добавляли 10 мкл образца и инкубировали в течение 2 мин при 25° С. АОА образцов определяли путем измерения снижения ОП при 734 нм с использованием спектрофотометра (Модель UV-200-RS, Израиль). В качестве стандарта АОА применяли гидрофильный аналог витамина Е – Тролокс (Sigma-Aldrich). Для построения калибровочной кривой использовали диапазон концентрации Тролокса 0 – 25 мкмоль/мл. АОА выражали в микромоль Тролокс эквивалента (ТЭ) на миллилитр и рассчитывали по калибровочной кривой стандарта. Эксперимент проводился в трех повторениях с последующим расчетом средних значений.

Результаты и их обсуждение

Антиоксиданты могут проявлять свою активность, предотвращая образование или нейтрализуя радикалы перекиси водорода и других пероксидов. Молочные протеины являются одним из важных источников природных антиоксидантов – антиоксидантных пептидов, которые высвобождаются в процессе протеолитического расщепления казеинов и белков сыворотки молока [14]. Зависимость активности этих пептидов от их структуры, аминокислотного состава, активно изучается в последние годы. Данные, полученные во многих исследованиях, показали, что антиоксидантная активность гидролизатов молочных белков, зависит от аминокислотной последовательности пептидов, и следовательно от специфичности протеаз, участвующих в процессе гидролиза [7, 11].

В данном исследовании антиоксидантная активность (АОА) казеинов и их гидролизатов различными штаммами МКБ (таблица 1), до и после гидролиза пепсином была рассчитана методом определения ТЭАП. На рис. 1. представлена калибровочная кривая Тролокса в диапазоне концентрации 0 – 25 мкмоль/мл. На основе этой кривой рассчитывали ТЭАП гидролизатов (рис. 2).

После гидролиза протеазами штаммов МКБ АОА казеинов увеличивалась, причем наблюдалась положительная зависимость АОА от длительности протеолиза. Так, у гидролизатов, полученных после 4 ч инкубации с бактериальными клетками, АОА по сравнению с контролем (интактные казеины) увеличивалась незначительно (рис. 2 А). Значение ТЭАП для интактных казеинов было 1.8 мкмоль/мл, а для гидролизатов штаммов А75, А581, АN1 и А121 эти значения увеличились до 6.2, 4.4, 8.1 и 7.8 мкмоль/мл, соответственно. Как видно, наибольшая активность на этом этапе наблюдалась для гидролизата штамма АN1. Дальнейший протеолиз этих гидролизатов пепсином привел к увеличению АОА.

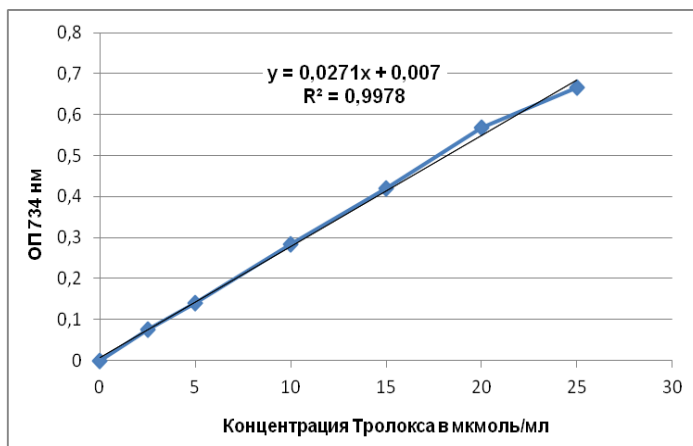


Рис. 1. Калибровочная кривая Тролокса. Зависимость ОП от концентрации Тролокса.

Как видно на рис. 2 С, после пепсин-гидролиза ТЭАП гидролизатов увеличился в несколько раз: контроль - до 8.6 мкмоль/мл; гидролизаты штаммов А75, А581, АН1 и А121 до 20.4, 15.9, 22.9 и 22.4 мкмоль/мл, соответственно. Полученные данные вполне логичны, так как после 4 ч гидролиза бактериальными протеазами расщепление субстрата было неполным, следовательно, не все активные последовательности были высвобождены из протеинов. При последующем гидролизе пепсином в результате завершения протеолиза субстрата АОА увеличивалась вследствие высвобождения большого количества пептидов, обладающих антиоксидантной активностью.

Немного другая картина наблюдалась у гидролизатов, полученных после 24 ч инкубации с клетками штаммов МКБ. На первом этапе, после гидролиза бактериальными клетками, АОА значительно увеличивалась. Как видно, на рис. 2 Б, показатели ТЭАП казеинов после 24 ч гидролиза протеазами штаммов А75, А581, АН1 и А121 увеличились до 13.4, 10.2, 20.7 и 16.5 мкмоль/мл, соответственно. В наших предыдущих исследованиях [1, 2] было показано, что после 24 ч инкубации с субстратом, штаммы А75, АН1 и А121 полностью расщепляют все фракции казеина, а штамм А581 только β -казеин. Следовательно, степень гидролиза напрямую коррелирует с уровнем АОА. Однако, как видно на рис. 2 Д, после гидролиза пепсином увеличение АОА наблюдалось не для всех гидролизатов. ТЭАП значения для гидролизатов А75, А581 и АН1 увеличивались после гидролиза пепсином, однако для гидролизата штамма А121 наблюдалось значительное снижение ТЭАП. Вероятно, что после гидролиза пепсином происходило расщепление некоторых пептидов в области активных последовательностей, что и привело к снижению АОА. Подобный феномен наблюдался и в исследованиях других авторов, где АОА

пептидов снижалась после гидролиза пищеварительными ферментами [11]. Хотя в естественных условиях пищеварение является гораздо более сложным процессом, существует вероятность, что биоактивные пептиды не всегда могут быть устойчивыми к условиям пищеварения.

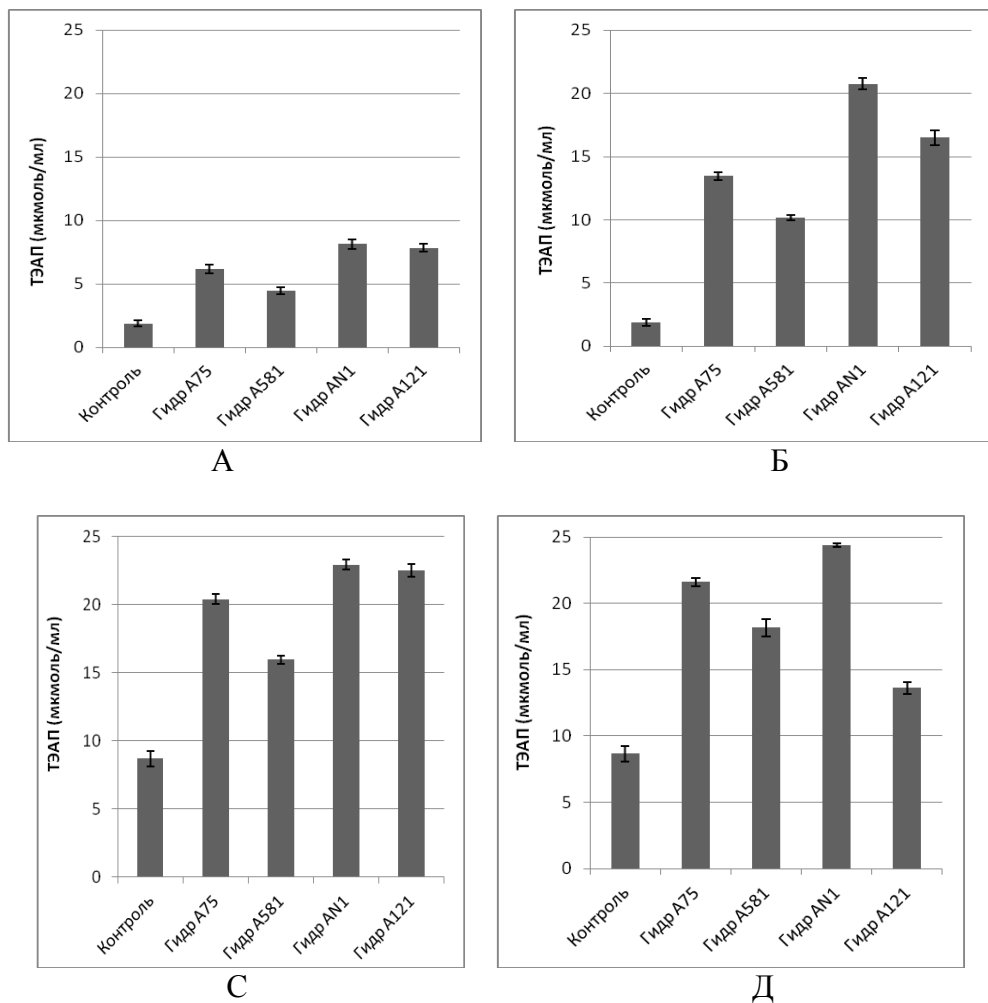


Рис. 2. Тролокс Эквивалентный Антиоксидантный Потенциал (ТЭАП) гидролизатов казеинов, полученных после 4 ч (А) и 24 ч (Б) гидролиза бактериальными клетками и последующим гидролизом пепсином (С и Д, соответственно).

Белки и пептиды проявляют АОА активностью посредством аминокислотных остатков, которые участвуют в нейтрализации свободных радикалов. При этом наиболее высокую активность проявляют остатки Cys, Trp и Met [4]. Результаты ранних исследований свидетельствует о важности С-концевой аминокислоты в определении антиоксидантных свойств пептидов фракции. При полном гидролизе субстрата АОА пепти-

дов зависит не только от их аминокислотного состава, но также от размера и последовательности их аминокислот. Исследования показали, что свободные аминокислоты имеют более низкую АОА, чем гидролизаты. Наиболее высокой АОА обладают пептиды, содержащие гидрофобные и ароматические аминокислоты [7].

Данные, полученные в этом исследовании показывают, что исследуемые протеолитические штаммы МКБ обладают потенциалом для использования в производстве функциональных молочных продуктов, однако необходимо продолжить дальнейшие исследования для определения оптимального процесса ферментации, аминокислотной последовательности высвобождающихся пептидов и их устойчивости в процессе пищеварения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахмедова А.Ф., Абдуллаева Н.А., Гусейнова Н.Ф., Кулиев А.А. // Доклады НАН Азербайджана, 2010, № 6, т.LXVI, с.25-85.
2. Ахмедова А.Ф., Гюльяхмедов С.Г., Мустафаева Р.С., Кулиев А.А. // Вестник Бакинского Университета. Серия Естественных наук, 2010, № 4, с.45-51.
3. Bjurlin M.A., Bloomer S., Nelson C.J. // Biotechnology Letters, 2002, v.24, p.191-195.
4. Elis R.J., McClements D.J., Decker E.A. // J of Agricultural and Food Chemistry, 2005, v.53, p. 10284-10253.
5. Fira D., Kojic M., Banina A. // J Applied Microbiology, 2001, v.90, p.123-130.
6. Hayes M., Stanton C., Fitzgerald G.F., Ross R.P. // Biotechn. J, 2007, v.2, p. 435-449.
7. Hernandez-Ledesma B., Davalos A., Bartolome B., Amigo L. // J Agricultural Food Chemistry, 2005, v.53, p.588-593.
8. Korhonen H. // J of Functional Foods, 2009, v.1 (2), p. 177-187.
9. Kudoh Y., Matsuda S., Igoshi K., Oki T. // J Jpn Soc Food Sci Technol, 2001, v.48, p.44-50.
10. Mouecoucou, J., Villaume C., Sanchez C., Mejean, L. // Biochem.Biophys.Acta, 2004, v.1670, p.105-112.
11. Picariello G., Ferranti P., Fierro O., Mamone G., Caira S., Di Luccia A., Monica S., Addeo F. // Journal of Chromatography B, 2010, v.878, p.295-308.
12. Pihlanto A. // International Dairy Journal, 2006, v.16, p.1306-1314.
13. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. // Free Radical Biology and Medicine, 1999, v.26, p.1231-1237.
14. Suetsuna K., Ukeda H. and Ochi H. // J Nutr Biochem, 2000, v.11, p.128-131.

SÜD TURŞUSU BAKTERİYALARININ MÜXTƏLİF ŞTAMLARININ PROTEAZALARININ KAZEİNDƏN AYIRDIĞI PEPTİDLƏRİN ANTIOKSİDANT FƏALLIĞINA PEPSİNİN TƏSİRİ

**R.S.MUSTAFAJEVA, A.F.ƏHMƏDOVA,
S.Q.GÜLƏHMƏDOV, A.Ə.QLİYEV**

XÜLASƏ

Tədqiqatın məqsədi müxtəlif süd turşusu bakteriyaları ştamlarının ifraz etdiyi proteolitik fermentlərin süd kazeinlərindən antioksidant peptidlərin formalaşmasına təsirini öyrənmək, həmçinin bu peptidlərin pepsinə qarşı davamlılığını müəyyən etmək olmuşdur. Hidroliz nəticəsində yaranan peptidlərin antioksidant aktivliyi onların ABTS + radikalını neytral-

laşdırma qabiliyyəti əsasında spektrofotometrik metodla ölçülmüşdür. Antioksidant aktivliyin hesablanması üçün ekvivalent olaraq tokoferolun analoqu olan Troloks istifadə olunmuş və antioksidant aktivlik troloks ekvivalent antioksidant potensial olaraq ifadə olunmuşdur. Antioksidant aktivlik öncə bakterial hidroliz (4 və 24 saat ərzində) nəticəsində yaranmış peptidlər üçün müəyyən edilmiş və sonra bu hidrolizatların pepsinlə hidrolizi nəticəsində yaranmış peptidlərin antioksidant aktivliyi ilə müqayisə edilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, kazeinlərin bakterial proteazalarla hidrolizi nəticəsində antioksidant aktivliyə malik peptidlər yaranır. Bu peptidlərin aktivliyi pepsinlə hidroliz nəticəsində dəyişir və bu dəyişmə bakterial ştamdan, yəni proteazaların spesifikliyindən, həmçinin hidroliz müddətindən asılıdır.

Açar sözlər: süd turşusu bakteriyaları, proteolitik aktivlik, kazein, antioksidant xassəli peptidlər

THE EFFECT OF PEPsin DIGESTION ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PEPTIDES RELEASED FROM CASEINS BY HYDROLYSIS WITH PROTEASES OF DIFFERENT LACTIC ACID BACTERIA STRAINS

**R.S.MUSTAFAYEVA, A.F.AHMADOVA,
S.G.GULAHMADOV, A.A.GULIYEV**

SUMMARY

The aim of this work was to study the effect of proteolytic activity of different LAB strains on release of antioxidant peptides from caseins, and to determine the resistance of these peptides to subsequent pepsin digestion. The antioxidant activity of hydrolysates after each step of proteolysis was determined by measuring ABTS radical scavenging ability. As equivalent of antioxidant activity, hydrophilic analogue of tocoferol – Trolox was used. The antioxidant activity of peptides in hydrolysates obtained after incubation of substrate with bacterial cells during 4 and 24 h, and in pepsin digests of these hydrolysates was determined using a Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) scale. It was revealed, that caseins prehydrolysis by LAB proteases results in release of peptides able to scavenge the free radicals. The resistance of these peptides to pepsin digestions was dependent on the bacterial strain and time applied for prehydrolysis.

Key words: lactic acid bacteria, proteolytic activity, caseine, antioxidant peptides

Поступила в редакцию: 05.12.2012 г.

Подписано к печати: 14.02.2013 г.