

ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ

УДК 637.12.04 / 07:66.094.941

Л.А. Остроумов, А.И. Линник,
О.В. Кригер, Л.К. Асякина

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТ В ВЫСВОБОЖДАЕМЫХ ФРАГМЕНТАХ ГИДРОЛИЗАТА МОЛОЧНОГО БЕЛКА*

Проведен детальный анализ пептидных профилей гидролизата молочных белков, полученных с использованием различных протеолитических ферментов, и определена аминокислотная последовательность полученных фрагментов, выявлены в составе казеиновых гидролизатов пептиды, обладающие биологической активностью.

Ключевые слова: гидролизат казеина, биологическая активность, ангиотензин-конвертирующий фермент, последовательность, термолизин, гидролиз, фермент, биологически активный пептид, функциональный продукт питания.

L.A. Ostroumov, A.I. Linnik,
O.V. Kriger, L.K. Asyakina

AMINO ACID SEQUENCE DETERMINATION IN THE MILK PROTEIN HYDROLYSATE RELEASING FRAGMENTS

The detailed analysis of the milk protein hydrolysate peptide profiles that are received with the use of different proteolytic enzymes is conducted; the amino acid sequence of the received fragments is determined; the peptides, which have biological activity, are found in the casein hydrolysate composition.

Key words: casein hydrolysate, biological activity, angiotensin converting enzyme, sequence, thermolysin, hydrolysis, enzyme, biologically active peptide, functional food.

Одним из перспективных направлений в области биотехнологии является использование белковых гидролизатов в качестве основного компонента продуктов специального назначения. Это продукты, предназначенные для систематического употребления в составе пищевых рационов, сохраняющие и укрепляющие здоровье за счет наличия в их составе веществ, обладающих способностью оказывать благоприятный эффект на физиологические функции и процессы обмена веществ в организме [1, 2].

Гидролиз пищевых белков и включение полученных гидролизатов в состав продуктов питания улучшают пищевую ценность последних, задерживают их порчу, придают им желательные функциональные характеристики (содержание аллергенов, токсинов и ингибиторов) [3, 4]. Особым при создании продуктов специализированного назначения является вопрос определения последовательности аминокислот в высвобождаемых фрагментах гидролизата молочного белка, который определяет особые свойства полученного продукта.

Целью данной работы является определение последовательности аминокислот в высвобождаемых фрагментах гидролизата молочного белка при оптимальных параметрах биотехнологической обработки.

Для достижения поставленной цели проведен детальный анализ пептидных профилей гидролизата молочных белков, полученных с использованием различных протеолитических ферментов, определена аминокислотная последовательность полученных фрагментов методом MALDI-TOF с помощью хромато-масс-спектрометра REFLEX IV. Анализ спектров молекулярных весов изученных образцов свидетельствует об

* Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» по направлению 1.2.1, гос. контракт №16.740.11.0058.

очень многокомпонентном составе. Подавляющее большинство пептидов имеет молекулярную массу менее 1000 Да. Результаты полученных исследований представлены на рисунках 1–3 и в таблицах 1–3.

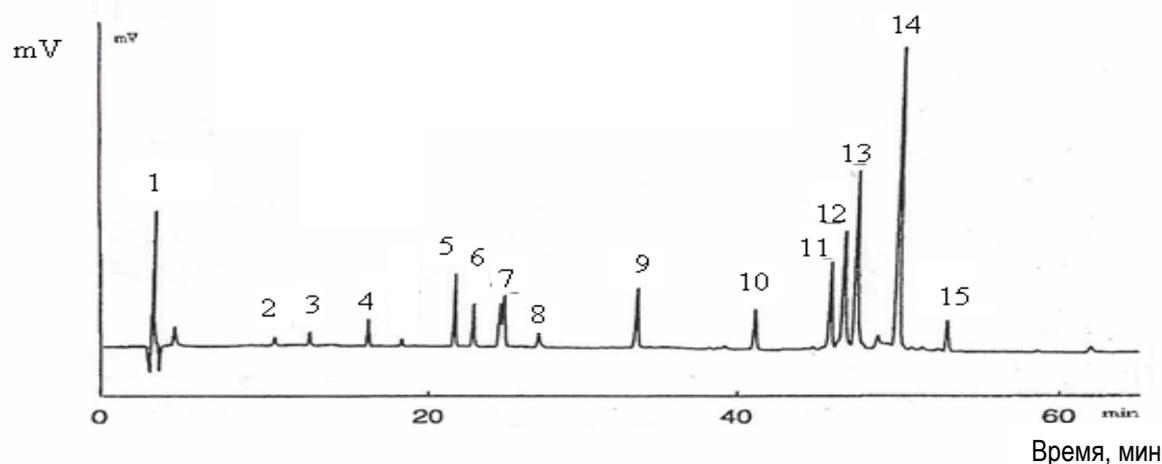


Рис. 1. Масс-спектры продуктов гидролиза молочного белка трипсином

Таблица 1

Характеристика пептидов, образовавшихся в результате гидролиза молочного белка трипсином

Номер	Молекулярная масса, Да	Порядок расположения в полипептидной цепи	Аминокислотная последовательность
1	3803	1–25	RELEELNVPGEIVESLSSEESITR
2	615	26–28	INK
3	98	29	K
4	390	30–32	IEK
5	1463	33–48	FQSEEQQTEDELQDK
6	4451	49–97	IHP- FAQTQSLVYPPFGPIHNSLPQNIPPL TPVVVPPFLQPEVMGVSK
7	180	98–99	VK
8	664	100–105	EAMAPK
9	233	106–107	HK
10	690	108–113	EMPFK
11	2107	184–202	DMPILYQEPVLGPVR
12	589	170–176	VLPVPQK
13	687	177–183	AVPYPQR
14	5172	114–169	YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLP LPLLQSWMHQPHQLPPWVMFP PQSVLSLSQSK
15	585	203–209	GPFPIIV

Примечание. А – аланин; N – аспарагин; D – аспарагиновая кислота; Q – глутамин; E – глутаминовая кислота; G – глицин; H – гистидин; I – изолейцин; L – лейцин; K – лизин; P – пролин; S – серин; T – треонин; W – триптофан; Y – тирозин; V – валин.

На рисунке 2 представлена хроматограмма химотрипсинового гидролизата казеина с расшифровкой пептидных фракций и пиков.

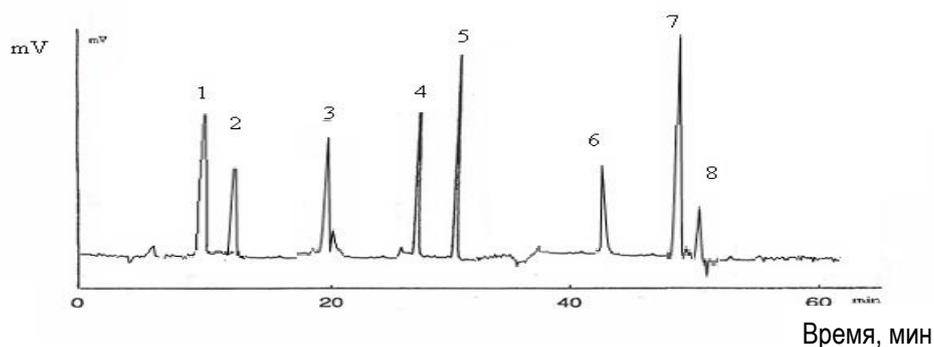


Рис. 2. Масс-спектры продуктов гидролиза молочного белка химотрипсином

Характеристика пептидов, образовавшихся в результате гидролиза молочного белка химотрипсином, представлена в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика пептидов, образовавшихся в результате гидролиза молочного белка химотрипсином

Номер	Молекулярная масса, Да	Порядок расположения в полипептидной цепи	Аминокислотная последовательность
1	3803	1–25	RELEELNVPGEIVESLSSE ESITR
2	1802	26–32	INKKIEKF
3	2329	33–51	QSEEQQTEDELQDKIHPF
4	3754	52–86	AQTQSLVYFPFGPIPNLPLQ NIPPLTQTPVVVPPF
5	3668	87–118	LQPEVMGVSKVKEAMAPKHK EMPFKYPVEPF
6	2734	119–142	TESQSLTLTDVENLHLPLPL LQSW
7	5286	143–189	MHQPHQLPPTVMFPPQSVL SLSQSKVLPVPQKAVPYPQR DMPIQAF
8	1717	190–209	QEPVLGPVRGPFPIIV

Примечание см. табл. 1.

На рисунке 3 представлена хроматограмма термолизинового гидролизата казеина с расшифровкой пептидных фракций и пиков.

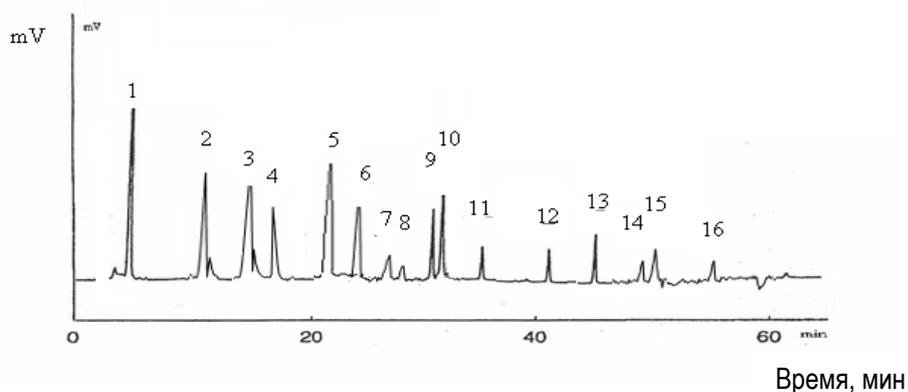


Рис. 3. Масс-спектры продуктов гидролиза молочного белка термолизином

Характеристика пептидов, образовавшихся в результате гидролиза молочного белка термолизина, представлена в таблице 3.

Анализ данных, представленных на рисунках 1–3 и в таблицах 1–3, свидетельствует о том, что все исследованные фракции гидролизата содержат в своем составе какие-либо пептиды разной молекулярной массы.

Таблица 3

**Характеристика пептидов, образовавшихся в результате гидролиза
молочного белка термолизином**

Номер	Молекулярная масса, Да	Порядок расположения в полипептидной цепи	Аминокислотная последовательность
1	1197	55–64	LSKDIGSEST
2	763	100–104	KEDVPS
3	915	205–210	ENSEKTT
4	972	81–88	SSSEEIVP
5	914	22–28	KHQGLPQ
6	773	185–190	GTQYTD
7	705	118–122	KYKVP
8	683	177–183	AVPYPQR
9	616	195–199	SDIPN
10	642	125–129	EIVPN
11	385	173–176	AYP
12	585	145–148	QQKE
13	443	161–163	YPE
14	439	92–94	EQK
15	416	17–19	PKH
16	368	48–50	GKE

Примечание см. табл. 1.

Идентификацию полученных последовательностей пептидов проводили посредством поиска в базах данных NCBI (www.ncbi.nlm.gov) и SwissProt (www.expasy.ch). Результаты сравнительных исследований представлены в таблице 4.

В результате идентифицирования в исследуемых гидролизатах пептидов было выявлено, что в каждом из исследуемых образцов при ферментации трипсином или химотрипсином, или термолизином образуется хотя бы один пептид, обладающий биологической активностью.

Исследования показали, что в казеиновых гидролизатах присутствуют более 10 олигопептидов.

Основным результатом данной части исследования явилось нахождение в составе казеиновых гидролизатах пептидов, обладающих биологической активностью.

Таблица 4

Пептиды, идентифицированные в исследуемых гидролизатах

Фрагмент	Используемый фермент	Последовательность аминокислот в пептидах	Название	Функция
1–25	Трипсин, химотрипсин	Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser(P)-Leu-Ser(P)Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg	Фосфо-пептид	Стимулирование усвоения минеральных веществ
177–183	Термолизин	Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg	β -Казокинин	Ингибитор ангиотензинконвертирующего фермента

В трипсиновом и химотрипсиновом гидролизате казеина идентифицирован фосфопептид с последовательностью аминокислот Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser(P)-Leu-Ser(P)Ser(P)-

Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg, который обладает функцией усвоения и стимулирования минеральных веществ в организме человека [5]. К основной функции фосфопептидов относят связывание минеральных элементов и поддержание их в растворенном состоянии для облегчения всасывания кальция и фосфора в кишечнике человека.

Из термолизинового гидролизата казеина выделен пептид β -казокинин (аминокислотная последовательность Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg), который является ингибитором ангиотензин-конвертирующего фермента. Механизм действия основан на ингибировании ангиотензин-конвертирующего фермента (АКФ) – неспецифической дипептидилкарбоксипептидазы, играющей ключевую роль в регуляции давления в системе кровообращения путем модуляции ренин-ангиотензиновой системы (РАС). Поэтому подавление активности АКФ имеет антигипертензивный эффект, что в дальнейшем важно учитывать при разработке технологии функциональных продуктов питания.

Полученные исследования могут быть использованы при разработке технологии получения функциональных продуктов питания на основе биологически активных ферментативных гидролизатов.

Литература

1. Бакулина О.Н., Бзюк О.В. Функциональные ингредиенты для воплощения концепции здорового питания // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. – 2005. – №2. – С. 30–31.
2. Алексеева, Н.Ю., Павлова Ю.В., Шишкин Н.И. Современные достижения в области химии белков молока // Обзорная информ. Сер. Молочная пром-сть. – М.: АгроНИИТЭИММП, 1988. – 32 с.
3. Арбатская Н.И., Анохина Л.Н. Молочно-белковые концентраты – казециты для детского и диетического питания. – М.: ЦНИИТЭИмясомолпром, 1985. – 27 с.
4. Грачева, И.М., Иванова Л.А., Кантере В.М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и биоэнергия. – М.: Колос, 1992. – 382 с.
5. Phosphopeptides interacting with colloidal calcium phosphate isolated by tryptic hydrolysis of bovine casein micelles / V. Gagnaire [et al.] // J. Dairy Res. – 1996. – № 63. – P. 405–422.



УДК 637.35

О.Б. Соснина, П.Е. Влощинский

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФфуЗИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ПЛЕНОК ДЛЯ УПАКОВКИ САЛАТОВ ИЗ КАПУСТЫ

В статье приведены результаты исследований диффузионных характеристик пленок, применяемых для упаковки салатов из капусты в газовой среде.

Установлена проницаемость пленок двух типов по отношению к кислороду, азоту и углекислому газу в зависимости от давления, температуры и толщины самих пленок.

Ключевые слова: салат, пленка упаковочная, газовая среда, диффузия, давление, температура.

O.B. Sosnina, P.E. Vloshchinsky

DIFFUSION CHARACTERISTIC RESEARCH OF THE FILMS FOR CABBAGE SALAD PACKING

The research results of the film diffusion characteristics, which are used for cabbage salad packing in the gas environment, are given in the article. Permeability of the films of two types in relation to oxygen, nitrogen and carbon dioxide depending on pressure, temperature and the film thickness is determined.

Key words: salad, film wrapper, gas environment, diffusion, pressure, temperature.

Среди овощных культур капуста занимает одно из ведущих мест по посевным площадям, урожайности и употреблению в пищу, что обусловлено ее способностью сохраняться в свежем виде в течение длительного промежутка времени, пригодностью для переработки в охлажденном и замороженном виде, квашения и консервирования [2, 5].