

УДК 637.04

UDC 637.04

**ПОЛУЧЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ МОЛОКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ**

**OBTAINING LOW MOLECULAR WEIGHT PEPTIDES OF MILK AND ANALYSIS OF THEIR IMMUNODEFENCE BOOSTING ACTIVITY**

Данилов Иван Михайлович  
аспирант

Danilov Ivan Mikhailovich  
postgraduate student

Забодалова Людмила Александровна  
д.т.н., профессор  
*Санкт-Петербургский государственный университет низкотемпературных и пищевых технологий, Санкт-Петербург, Россия*

Zabodalova Ludmila Aleksandrovna  
Dr.Sci. Tech, professor  
*St. Petersburg State University of low-temperature and Food Technologies, St. Petersburg, Russia*

Скопичев Валерий Григорьевич  
д.б.н., профессор

Skopichev Valery Grigorievich  
Dr.Sci.Biol, professor

Жичкина Лидия Владимировна  
к.б.н., Ph.D.  
*Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

Zhichkina Lidia Vladimirovna  
Cand.Biol.Sci, Ph.D.  
*St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia*

Исследованы гидролизаты белков молока на наличие низкомолекулярной фракции пептидов, показана биоактивность, рационализированы условия получения, выявлено влияние пептидов на физико-химические показатели кефира

Milk protein hydrolysates are analyzed for the presence of low molecular weight fractions of peptides. Bioactivity is shown; the requirements for obtaining are streamlined; effect of peptides on the physical and chemical characteristics of kefir is revealed

Ключевые слова: ПЕПТИДЫ, ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ МОЛОКА, МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ, КУМЫС, КЕФИР

Keywords: PEPTIDES, HYDROLYSIS OF MILK PROTEINS, ENZYME, LACTIC ACID BACTERIA, KOUMISS, KEFIR

**Введение**

Около пятидесяти лет назад было установлено, что пептиды экзогенного происхождения молекулярной массой 1500-5500 Да, зашифрованные в аминокислотной последовательности некоторых пищевых белков могут оказывать влияние на координацию функций многоклеточных организмов. В результате многолетних исследований показано, что факторы пептидной природы, получаемые в процессе гидролиза белков молока являются одними из наиболее физиологически

активных, воздействуя на пищеварительную, иммунную, сердечно-сосудистую и нервную системы [1].

### **Цель работы**

Рационализация условий получения низкомолекулярных пептидов (НМП) 1500-5000 Да протеолизом белков молока препаратом «Панкреатин»; исследование образцов кисломолочных продуктов на наличие НМП; определение влияния НМП на иммунный статус организма; изучение влияния НМП на физико-химические показатели кисломолочного напитка смешанного брожения.

### **Материалы и методы**

При получении НМП использовались: обезжиренное коровье молоко (массовая доля жира не более 0.05%), ферментный препарат «Панкреатин» производства ЗАО «Фармпроект», хлороформ, культуры молочнокислых бактерий *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, а также естественные симбиотические закваски кумысная и кефирная из коллекции микроорганизмов кафедры технологии молока и пищевой биотехнологии СПбГУНиПТ. Выработка образцов кисломолочных продуктов проводилась при общепринятых продолжительности и температуре сквашивания, в случае продуктов смешанного брожения также присутствовала стадия созревания.

Молекулярно-массовое распределение (ММР) продуктов расщепления белков молока анализировали методом эксклюзионной аналитической гель-проникающей хроматографии на колонках с Sephadex G-75-medium и G-50-medium. Вариант элюирования – изократический, размеры аналитической колонки 0,5×0.015 м, элюент 0.15 М раствор хлорида натрия, скорость пропускания 20 мл\ч перистальтическим насосом LKB Bromma 2132. Линейные области частных калибровочных кривых для Sephadex G-75-medium ( $y = -0,0546x + 5,8857$ , стандартная ошибка 0,0349, коэффициент корреляции 0,9951) и G-50-medium ( $y = -0,0727x + 6,3127$ ,

стандартная ошибка 0,2045, коэффициент корреляции: 0,9624) представлены на рисунках 1 и 2 соответственно. Математическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием пакетов программ MS Office 2010, CurveExpert 1.4.

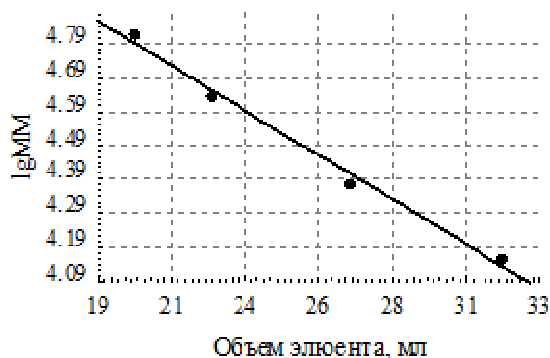


Рисунок 1. Калибровочная кривая G-50-medium

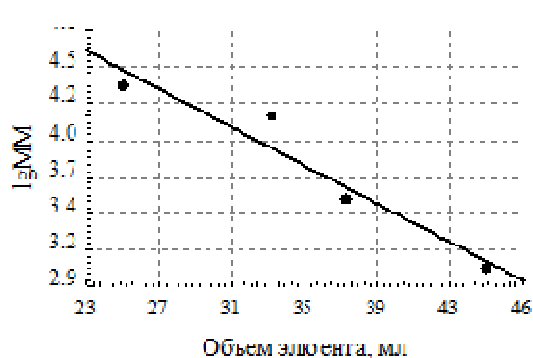


Рисунок 2. Калибровочная кривая Sephadex G-75-medium

В качестве детектора использовали проточный спектрофотометр LKB Bromma 2138 Uvicord S при длине волны 230 нм, которая является наиболее специфической для белков и пептидов, чувствительность 0.5. Данный этап экспериментов проводился на базе лабораторий №9 (синтеза пептидов и полимерных микросфер) и №5 (природных полимеров) ИВС РАН.

Клинические исследования проводились на линейных белых крысах 21 дневного возраста с первоначальным весом  $84 \pm 3$  г. Для каждой кратности эксперимента использовались животные одного помета. Учет величины антимикробных свойств сыворотки крови (БАСК) проводили фотоэлектронфелометрическим способом по методу О.В. Смирновой и Т.А. Кузьминой. Показатель лизоцимной активности сыворотки крови (ЛАСК) определяли фотоэлектроколориметрическим методом по А.Г. Дорофейчуку [2]. Определение фагоцитарной активности (ФА) лейкоцитов *in vitro* проводили по методу Е.А. Коста и М.И. Стенко (1947) [3]. Данный этап экспериментов проводился на базе кафедры физиологии СПбГАВМ.

### **Обсуждение результатов**

Первая часть экспериментов была направлена на рационализацию условий получения НМП расщеплением белков молока посредством ферментного препарата «Панкреатин»: фермент-субстратное соотношение (ФСС), продолжительность и температура ферментации, рН молока.

Установлено, что увеличение массы вносимого фермента от 0.01% до 0.4% от массы ферментируемой смеси позволяет повысить выход НМП до 75-77% (рис. 1), дальнейшее увеличение данного показателя не рационально, т.к. приводит к избыточному накоплению потенциально аллергенных материалов ферментного препарата в гидролизате, а также к удорожанию процесса.

При изучении влияние продолжительности ферментации выявлено, что накопление НМП происходит в течение 22-26 часов, причем, в первые 4-5 часов термостатирования пептидный профиль полученных гидролизатов претерпевает наиболее значительные изменения, что выражается в увеличении содержания искомой фракции приблизительно до 75-76%, в то время как дальнейшее ведение процесса несущественно повышает данный показатель (78-79%).

**Ошибка! Ошибка связи.**

**Ошибка! Ошибка связи.**

Ввиду того, что в состав «Панкреатина» входят протеолитические ферменты трипсин и химотрипсин с различными температурными и рН оптимумами (37 °С, 7.7-8.1 и 50 °С, 7.9-9.1 соответственно) необходима рационализация процесса по данным показателям. Установлено, что при 42-44 °С достигается предельное накопление НМП 72-74%, дальнейшее повышение температуры термостатирования приводит к значительному снижению выхода искомой фракции, с преобладанием практически не подвергшихся гидролизу белков молока - гидролизатов молекулярной массой 16-106 кДа (рис. 3).

На основании анализа биохимической кинетики показано, что рН-статирование обезжиренного молока оказывает значительное влияние. Так, при рН молока 5.0 содержание фракции НМП составляет 23-24% от общего содержания веществ пептидной природы в гидролизате и продолжает увеличиваться до максимальных при данных условиях 75-76% при рН 7.5-7.8. Необходимо отметить, что предпочтителен способ получения НМП без рН-статирования, т.к. при значениях рН 7.1-7.3, что соответствует собственному значению рН, обезжиренного молока выход НМП составляет 72-74%, что незначительно отличается от вышеприведенных показателей. Кроме того, катионы натрия, накапливающиеся в процессе добавления гидроксида натрия вероятно способны негативно сказаться на органолептических показателях и биологической ценности в дальнейшем.

#### **Ошибка! Ошибка связи.Ошибка! Ошибка связи.**

Анализ литературы по проблеме микробиального гидролиза белков молока с целью получения биоактивных пептидов показал, что в данной области достаточно активно занимаются за рубежом [2-4]. Публикации отечественных исследователей по выделению и изучению биоактивных пептидов из белков молока, гидролизованного культурами молочнокислых бактерий, практически отсутствуют.

На наш взгляд проблему получения и использования биоактивных пептидов молока можно решить за счет традиционных кисломолочных продуктов. В этой связи актуально провести мониторинг молочных продуктов по вопросу содержания НМП, обладающих биологической активностью.

В следующей серии экспериментов были исследовано 4 образца, представляющие собой обезжиренное пастеризованное при  $87 \pm 2$  °С в течение 20 мин, сквашенное: *Str. thermophilus* (образец 1) , *Lbc.*

acidophilus(образец 2), а также кефирной (образец 3) и кумысной (образец 4) закваской.

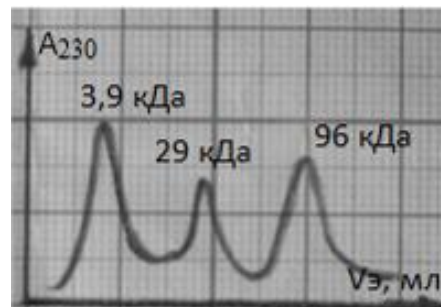
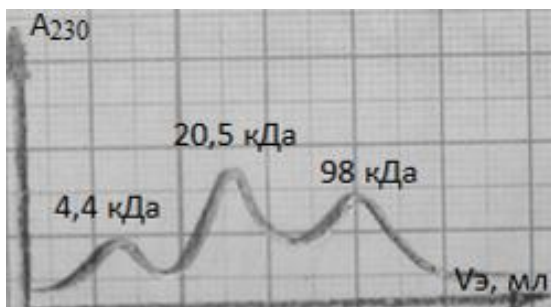


Рисунок 5. Хроматограмма образца 1 Рисунок 6. Хроматограмма образца 2

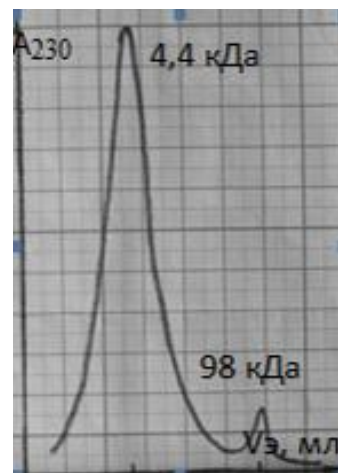
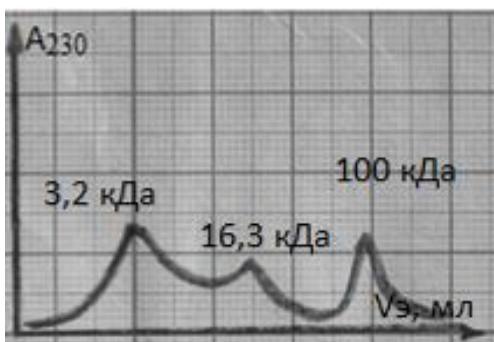


Рисунок 7. Хроматограмма образца 3

Рисунок 8. Хроматограмма образца 4

Из представленных рисунков, наибольшее количественное содержание фракции НМП наблюдается в образце 4, также следует отметить отсутствие областей перекрытия пиков с близлежащей высокомолекулярной фракцией, другими словами, не происходит накопление веществ пептидной природы с промежуточными молекулярными массами, способными осложнить процесс последующей очистки НМП. Высота и ширина пиков свидетельствуют о высокой эффективности и достаточной селективности подобранной колонки в данном случае.

В образцах 1, 2, 3 относительно небольшое образование НМП на фоне более широкого спектра гидролизатов по молекулярной массе, четко

прослеживается накопление пептидов молекулярной массой 3,2-4,4 кДа, 16,3-29 кДа и 96-100 кДа.

В биологическом эксперименте использовалась очищенная методом препаративной гель-хроматографии на колонке с гелем Sephadex G-75 и лиофильно высушенная фракция НМП полученная в результате гидролиза молока «Панкреатином». Препарат вводили перорально в виде 1% раствора из расчета 2,5 мг на животное.

Таблица 2 - ФА нейтрофилов крови подопытных животных

Показатель	Интактная группа животных, %	Опытная группа животных, %
Фагоцитарный индекс	8,9 ± 1,74 (m <sup>*</sup> =0,78; t <sup>**</sup> =11,47)	11,96 ± 0,85 (m=0,38; t=31,44)
Фагоцитарная активность	74 ± 2,25 (m=1,01; t=73,18)	85 ± 4,55 (m=2,03; t=41,81)
Фагоцитарное число	11,3 ± 1,56 (m=0,7; t=16,22)	15,29 ± 0,99 (m=0,45; t=34,36)

\*m-ошибка средней арифметической, \*\*t-критерий достоверности

Из данных таблицы 1 следует, что фагоцитарный индекс увеличился в 1,3 раз, фагоцитарная активность повышается на 14,9%, фагоцитарное число увеличилось в 1,4 раза, что говорит о повышении функциональной активности фагоцитирующей клетки.

Таблица 3 – Показатели ЛАСК и БАСК подопытных животных

Показатель	Ед. изм.	Интактная группа животных	Опытная группа животных
ЛАСК	% лизиса	13±0,82 (m=0,365; t=35,6)	15±0,55 (m=0,245; t=61,24)
БАСК	% лизиса <i>E.coli</i>	66,4±1,78 (m=0,8; t=83,48)	78,8±1,12 (m=0,5; t=157,04)

На заключительном этапе экспериментов было исследовано влияние добавки НМП на титруемую и активную кислотность кефира в процессе сквашивания. Масса вносимой добавки 2,5% от объема заквашиваемой смеси, внесение более 7% НМП приводит к ухудшению органолептических характеристик вследствие появления горьковатого

привкуса. Было подготовлено 3 образца: контрольный; с добавлением 2,5% НМП; с добавлением 2,5% НМП, предварительно обработанного при температуре  $87 \pm 2$  °С в течение 15 мин. Гель-хроматография фракций НМП до и после тепловой обработки не показала значительных различий.

Последний образец был подготовлен для выявления возможного воздействия остаточного количества ферментного препарата на динамику кислотонакопления. Заквашивание и сквашивание образцов проводили при  $25 \pm 1$  °С.

**Ошибка! Ошибка связи.**

**Ошибка! Ошибка связи.**

На рисунках видно, что кислотонакопление в опытных образцах происходит более динамично, начиная с 5-5,5 ч, до этого момента значительных отличий не наблюдается. Следует отметить, что добавление НМП несколько снижает начальное значение рН заквашенного молока на 0,48-0,48 и на протяжении всего процесса данный показатель у опытных образцов ниже по сравнению с контрольным.

Добавка, не прошедшая предварительную тепловую обработку вызывает наибольшее кислотонакопление, а также образование творожистого сгустка, не характерного для кефира.

Интенсификация процесса сквашивания молока в опытных образцах, по-видимому, связана с наличием во фракции НМП продуктов ферментативного гидролиза молекулярной массой менее 1,5 кДа. которые необходимы для биосинтеза собственных белков лактобактерий, способные проходить через клеточную стенку и мембрану против градиента концентрации [4].

#### **Выводы.**

- наибольшее количество НМП образуется в результате гидролиза белков молока ферментным препаратом «Панкреатин»;



- определены рациональные условия ферментативного гидролиза (без использования рН-статирования, температура и продолжительность ферментации  $43 \pm 1$  °С и 4 ч соответственно, ФСС 1÷25);
- в образцах кисломолочных продуктов также происходит накопление НМП, но большая часть представлена пептидами с молекулярной массой более 16 кДа
- препарат НМП обладает иммуностимулирующей активностью, повышая показатели БАСК и ЛАСК на 18,7% и 15,4% соответственно.

#### Литература

1. Rowan, A.M., Haggarty, N.W., and Ram, S. 2005. Milk bioactives: discovery and proof of concept. *Australian Journal of Dairy Technology* 60: 114–120.
2. Хаитов Р.М. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2009. – 636 с.
3. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2010. – 752 с.
4. Гудков А.В. "Сыроделие: Технологические, биологические и физико-химические аспекты". - М.: ДеЛи принт. – 2004. – 804 с.