

УДК 577.112.083/122.2

**Юкало В.Г.**, д.б.н., професор, **Сторож Л.А.**, ст. викладач,  
**Штокало М.О.**, студентка ©*Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя,  
м. Тернопіль, Україна***ВИЗНАЧЕННЯ УМОВ ОТРИМАННЯ ПРИРОДНИХ БІОАКТИВНИХ  
КАЗЕЇНОВИХ ФОСФОПЕПТИДІВ**

*Основні протеїни молока – казеїни є попередниками багатьох біологічно активних пептидів, які включають більшу частину їх первинної структури. Ці пептиди проникають в кров'яне русло і впливають на різні системи організму. Було виділено антитромботичні та антигіпертензивні пептиди, імунomodulatory та антимікробні пептиди, агоністи та антагоністи опіоїдних рецепторів, фосфопептиди. Одними з найбільш цінних пептидів є фосфопептиди, які забезпечують засвоєння іонів металів (іонів феруму, кальцію, цинку, магнію). В даній роботі було проведено дослідження виходу фосфопептидів при дії на казеїн різних концентрацій панкреатину при 37°C і рН 7,9. Показано відмінності у розподілі за молекулярними масами фосфопептидів, отриманих при дії різних концентрацій панкреатину. Встановлено оптимальні концентрації панкреатину для виділення природних біоактивних казеїнових фосфопептидів.*

**Ключові слова:** казеїн, фосфопептиди, панкреатин, протеоліз.

УДК 577.112.083/122.2

**Юкало В.Г.**, д.б.н., професор, **Сторож Л.А.**, ст. преподаватель,  
**Штокало М.О.**, студентка*Тернопольский национальный технический университет имени Ивана Пулюя,  
г. Тернополь, Украина***ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ПРИРОДНЫХ  
БИОАКТИВНЫХ КАЗЕИНОВЫХ ФОСФОПЕПТИДОВ**

*Основные протеины молока - казеины являются предшественниками многих биологически активных пептидов, которые включают большую часть их первичной структуры. Эти пептиды проникают в кровяное русло и влияют на различные системы организма. Было выделено антитромботические и антигипертензивные пептиды, иммуномодулирующее и антимикробные пептиды, агонисты и антагонисты опиоидных рецепторов, фосфопептиды. Одними из наиболее ценных пептидов являются фосфопептиды, которые обеспечивают усвоение ионов металлов (ионы железа, цинка, кальция, магния). В данной работе было проведено исследование выхода фосфопептидов при воздействии на казеин различных концентраций панкреатина при 37°C и рН 7,9. Показано различия в распределении по молекулярным массам фосфопептидов, полученных при действии различных концентраций*

панкреатина. Установлены оптимальные концентрации панкреатина для выделения природных биоактивных казеиновых фосфопептидов.

**Ключевые слова:** казеин, фосфопептиды, панкреатин, протеолиз.

UDC 577.112.083/122.2

**Yukalo V.G., Storozh L.A., Shtokalo M.O**

*Ternopil Ivan Pul'uj National Technical University, Ternopil, Ukraine*

## **DETECTING OF THE CONDITIONS FOR NATURAL BIOACTIVE CASOPHOSHOPEPTIDES OBTAINING**

*The main milk proteins - caseins are precursors of multiple bioactive peptides that include great part of casein amino acid residues. These peptides pass through the bloodstream and affect the different systems of organism. It was obtained antithrombotic and antihypertensive peptides, immunomodulatory and antimicrobial peptides, agonists and antagonists of opiate receptors, phosphopeptides. Phosphopeptides are very important bioactive casein peptides. They have a positive impact on the absorption of iron, calcium, zinc and magnesium ions in organism.*

*In current study the process of obtaining natural phosphopeptides from casein using different concentration of pancreatin (37°C, pH 7,9) was investigated. It has been shown the differences in molecular mass of phosphopeptides preparations which were obtained using different pancreatin concentrations. Optimal concentrations of pancreatin for natural casophosphopeptides obtaining have been detected.*

**Key words:** casein, phosphopeptides, pancreatin, proteolysis.

**Вступ.** Казеїнові природні біоактивні фосфопептиди утворюються в процесі нормального травлення в шлунково-кишковому тракті переважно за дії протеолітичних ензимів підшлункового соку [1]. Основною функцією казеїнових фосфопептидів є участь у процесах транспортування і засвоєння іонів двохвалентних металів, зокрема, кальцію, цинку і феруму. Тому в даний час казеїнові фосфопептиди викликають значний інтерес як перспективні інгредієнти функціональних харчових продуктів [2]. Аналіз первинної структури казеїнових фосфопротеїнів ( $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN) – попередників біологічно активних пептидів показує можливість утворення великої різноманітності фосфопептидів в залежності від специфічності протеолітичних ензимів і умов проведення протеолізу [3]. Зокрема, в нашій лабораторії раніше було показано, що казеїнові фосфопептиди, отримані в результаті використання різних протеолітичних препаратів тваринного, рослинного і мікробіологічного походження, суттєво відрізняються за молекулярно-масовим розподілом. Це може відобразитися на їхній біологічній активності [4]. Реалізуючи підхід до виділення природних біологічно активних казеїнових фосфопептидів, ми виходимо із припущення, що фізіологічно найбільш ефективними є фосфопептиди, які утворюються в умовах, наближених до умов розщеплення казеїнів у шлунково-кишковому тракті. При цьому необхідно враховувати, що крім температури, рН середовища і складу протеаз на ступінь протеолізу і, відповідно, величину фосфопептидів може

впливати концентрація субстрату і ензим-субстратне співвідношення. Для встановлення оптимальних умов утворення природних фосфопептидів нами було проведено протеоліз при різних співвідношення казеїнових субстратів і панкреатину.

**Мета.** Встановити оптимальні концентрації загального казеїну і панкреатину для отримання природних біоактивних казеїнових фосфопептидів.

**Матеріали і методи.** В якості субстрату використовували загальний казеїн, який виділяли із свіжого знежиреного молока подвійним переосадженням в ізоелектричній точці. Інактивацію природних протеаз молока здійснювали шляхом інкубації в оцтовій кислоті при значенні рН 4,0 протягом п'яти годин.

Для протеолізу казеїнових субстратів використовували панкреатин виробництва ПрАТ «Технолог» (Україна).

Протеїновий склад казеїнових субстратів досліджували електрофорезом на вертикальних пластинках поліакриламідного гелю (ПААГ). Для цього використовували лужну систему (рН 7,9), яка містила 25 мМ тріс, 27 мМ діетилбарбітурат, 3 мМ ЕДТА і 4,5 М сечовину [5]. Електрофореграми фіксували і проявляли загальноприйнятими методами. Електрофоретичні буфери і гелі готували, використовуючи реактиви фірми «Reanal» (Угорщина). Результати електрофорезу представляли у вигляді денситограм, які отримували при використанні програми зчитування графічних зображень, розробленої у системі Matlab [6].

Концентрацію протеїнів у препаратах субстрату і гідролізатах визначали методом Лоурі або спектрофотометрично за поглинанням при довжині хвилі 280 нм на спектрофотометрі СФ-46. При цьому використовували загальноприйнятий коефіцієнт поглинання ( $D_{1\text{см}}^{1\%}$ ) для загального казеїну – 8,2.

Кінематичну в'язкість казеїнових субстратів визначали в термостатованому капілярному віскозиметрі типу ВПЖ-2. Діаметр капіляра віскозиметра становив 1,77 мм. Кінематичну в'язкість  $\nu$  виражали у мм<sup>2</sup>/с.

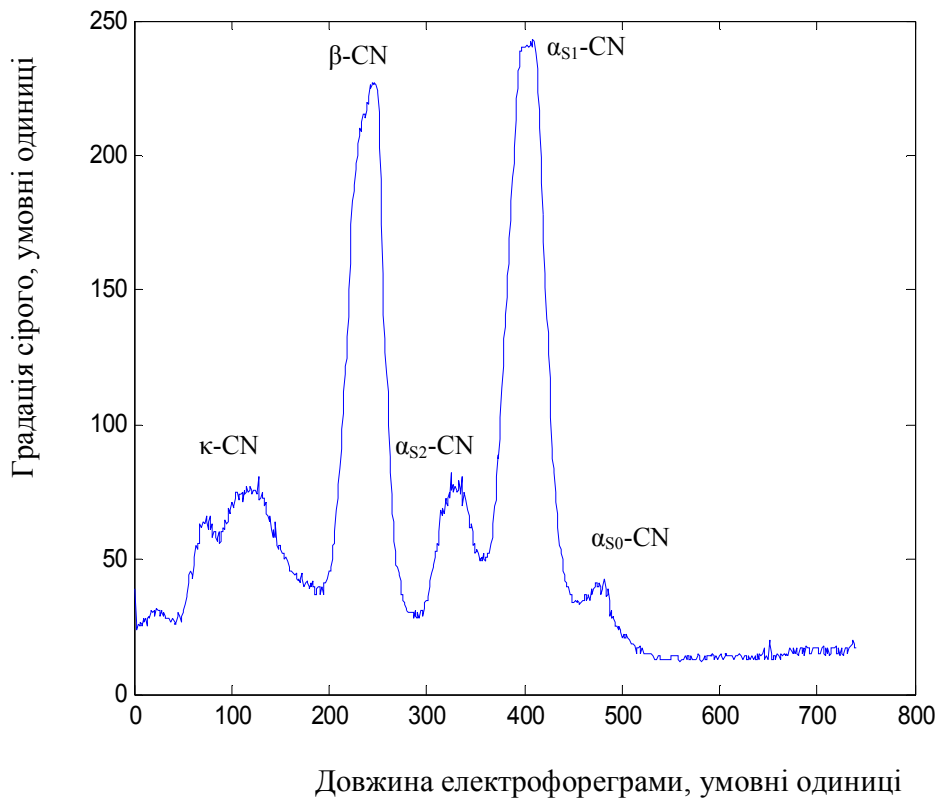
Виділення фосфопептидів із гідролізату проводили відповідно до методики [7].

Гель-фільтрацію отриманих препаратів фосфопептидів здійснювали з використанням хроматографічної колонки фірми «Reanal» (Угорщина), заповненої сефадексом G-25 (fine) фірми «Pharmacia» (Швеція). Концентрацію фосфопептидів у всіх фракціях визначали спектрофотометрично.

Всі експерименти повторювали 3-5 разів. На графіках наведені середні значення величин. Статистичний аналіз проводили користуючись критерієм Стьюдента (t). Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми MS Excel 2003.

**Результати досліджень.** Загальний казеїн, який використовували у якості субстрату, виділяли із свіжого знежиреного молока шляхом подвійного осадження в ізоелектричній точці. При цьому кожен раз казеїни відмивали від залишків протеїнів сироватки дистильованою водою. Після другого осадження загальний казеїн диспергували в оцтовій кислоті при рН 4,7 для інактивації

природних протеаз молока. Отриманий препарат висушували ліофільно і використовували для проведення протеолізу. Склад загального казеїну аналізували методом електрофорезу в ПААГ. Результати представлені на рис. 1. На денситограмі можна ідентифікувати характерний розподіл протеїнових фракцій казеїну у відповідності до сучасної міжнародної класифікації [8].



**Рис. 1. Денситограма електрофоретичного розділення загального казеїну, який використовували для протеолізу і виділення фосфопептидів**

Аналіз літературних джерел показує, що різними авторами для виділення казеїнових фосфопептидів використовувались розчини загального казеїну концентрацією від 5 до 13%. Проте при цьому використовували різні значення температури в діапазоні від 20 до 55°C в залежності від оптимуму дії ензимного препарату. Нами для протеолізу були обрані фізіологічні значення температури, а саме 37°C. При такій температурі лімітуючим фактором у процесах протеолізу концентрованих розчинів казеїну може бути їх висока в'язкість [9]. Тому для встановлення максимально допустимої концентрації казеїнового субстрату ми враховували залежність кінематичної в'язкості від концентрації казеїну при 37°C. В'язкість визначали з використанням

віскозиметра ВПЖ-2, температуру в якому підтримували за допомогою водяного термостату.

Кінематичну в'язкість розраховували за середніми значеннями трьох вимірювань витікання розчину казеїну:

$$\nu = \frac{g}{9,807} \cdot \tau \cdot K,$$

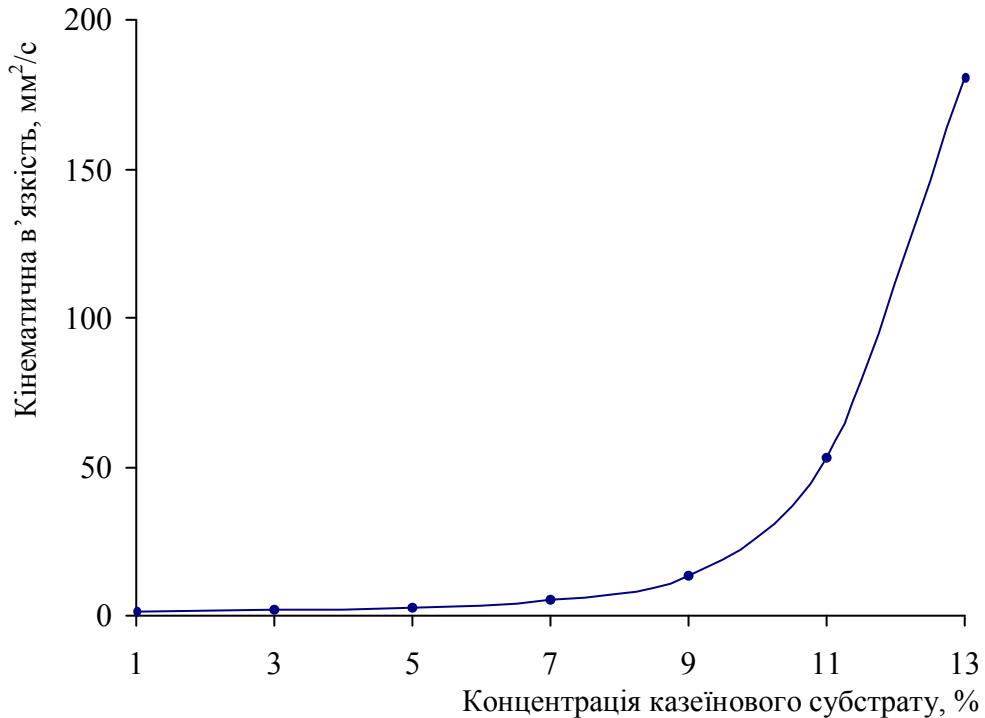
де  $K$  – стала віскозиметра,  $0,9303 \text{ мм}^2/\text{с}^2$ ;

$\nu$  – кінематична в'язкість розчину,  $\text{мм}^2/\text{с}$ ;

$\tau$  – час витікання розчину в секундах;

$g$  – прискорення вільного падіння у місці вимірювання,  $\text{м}/\text{с}^2$ .

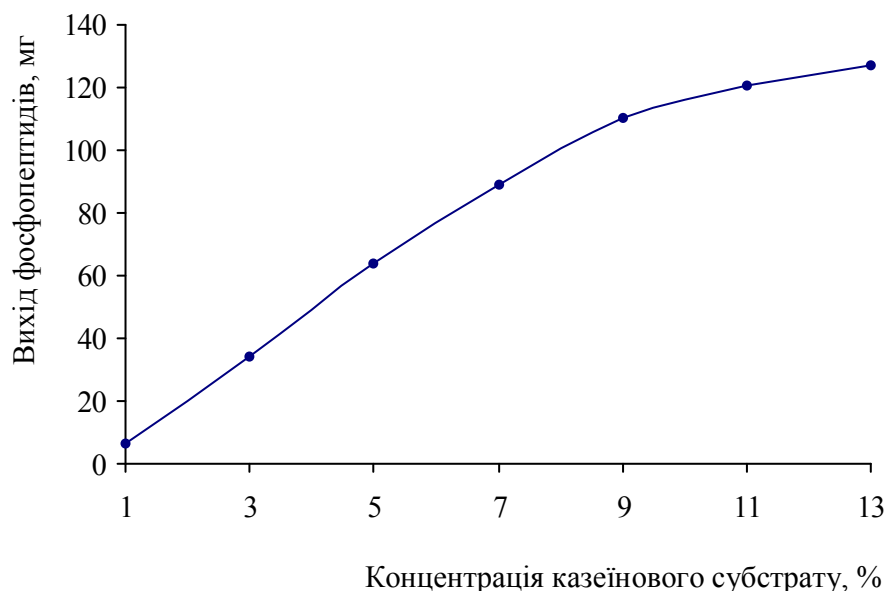
Результати показані на рис. 2.



**Рис. 2. Залежність кінематичної в'язкості від концентрації казеїнових субстратів при температурі 37°C**

З графіку видно, що при концентраціях казеїну більше 9% починається різке зростання значень кінематичної в'язкості, що може впливати на вихід фосфопептидів. Для перевірки цього ми провели дослідження виходу фосфопептидів за однакового співвідношення «ензим-субстрат» в залежності від концентрації казеїнових розчинів.

Протеоліз проводили в термостаті при температурі 37°C, значення рН підтримували на рівні 7,9. Співвідношення «ензим-субстрат» було вибране 1:20. Після двох годин протеолізу відбирали проби для виділення фосфопептидів. При цьому рН гідролізату доводили до 4,6 і осаджували нерозщеплені казеїни центрифугуванням. Потім до 9 мл супернатанту додавали 1 мл 10% CaCl<sub>2</sub> і 10 мл етанолу для осадження фосфопептидів. Осад фосфопептидів після центрифугування промивали етанолом, висушували до постійної ваги і зважували. Результати виходу фосфопептидів (в мг з 9 мл гідролізату) показані на рис. 3.

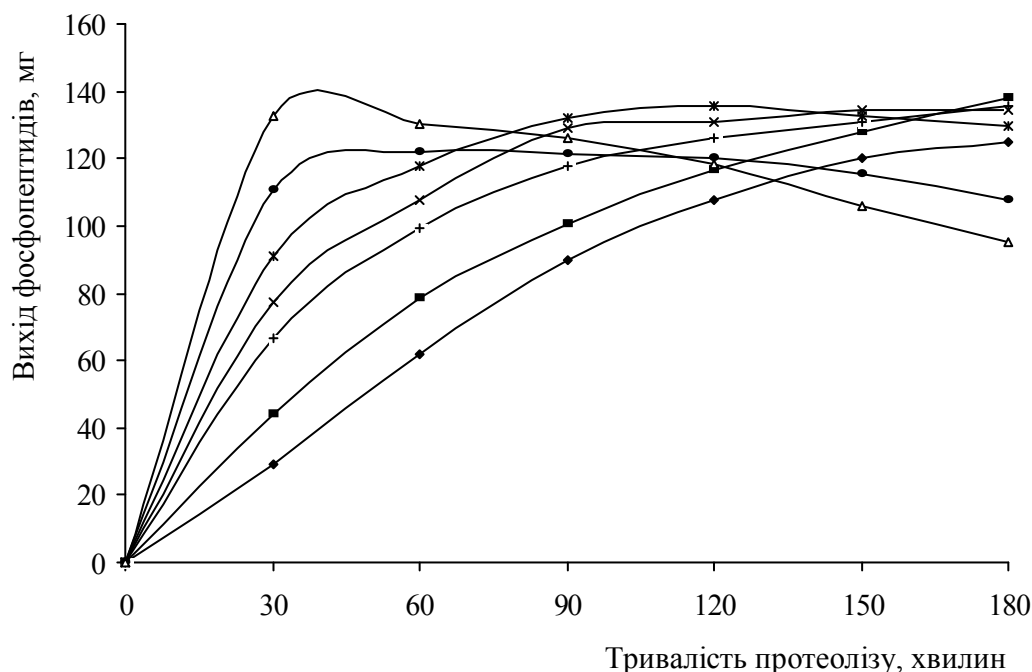


**Рис. 3. Залежність виходу фосфопептидів від концентрації казеїнового субстрату при постійному співвідношенні «ензим-субстрат»**

З графіку видно, що вихід фосфопептидів до досягнення концентрації 9% зростає прямо пропорційно до концентрації субстрату, а вище концентрації 9% зростання значень виходу різко сповільнюється. Робиться висновок про доцільність використання концентрації казеїну 9% для проведення протеолізу при 37°C з метою виділення фосфопептидів.

Для встановлення оптимальних значень співвідношення «ензим:субстрат», а також тривалості протеолізу було проведено серію протеолізів з різним співвідношенням «ензим:субстрат». При цьому на різних етапах протеолізу відбирали проби для встановлення кількості утворених казеїнових фосфопептидів. Протеолізи проводили при фізіологічних значеннях температури і рН (37°C, рН 7,9), а також з використанням казеїнового субстрату концентрацією 9%. Співвідношення «ензим:субстрат» задавали в діапазоні від 1:20 до 1:260, який був встановлений на основі попередніх досліджень, а також

з врахуванням літературних даних [1, 3, 10]. Проби відбирали через кожних 30 хвилин починаючи з 30 хвилини від початку протеолізу і до 180 хвилини включно. Фосфопептиди виділяли і визначали їх вихід, як було описано вище. Результати визначень представлені на рис. 4.



**Рис. 4. Залежність виходу фосфопептидів при протеолізі казеїнового субстрату концентрацією 9% за різних співвідношень «ензим-субстрат»:**  
Δ – 2:20; ● – 1:60; \* – 1:100; × – 1:140; + – 1:180; ■ – 1:220; ◆ – 1:260.

При аналізі кривих виходу фосфопептидів встановлено, що після досягнення максимуму значення виходу починають зменшуватися при співвідношеннях «ензим:субстрат» від 1:20 до 1:100. При співвідношеннях від 1:140 до 1:260 вихід фосфопептидів монотонно зростає, не досягаючи свого максимуму протягом всього періоду визначення. Така залежність відрізняється від ступеню протеолізу, який у всіх випадках співвідношень «ензим:субстрат» монотонно зростає. Очевидно, це пов'язано зі зміною молекулярної маси фосфопептидів у процесі протеолізу. З використанням гель-фільтрації для співвідношень 1:20 і 1:60 при досягненні максимуму було показано високі значення молекулярної маси фосфопептидів в межах від 1000 до 5000 Да. Через короткий проміжок часу спостерігається зменшення молекулярної маси

пептидів, що зумовлює падіння виходу фосфопептидів. При співвідношеннях від 1:140 до 1:260 за даними гель-фільтрації фосфопептиди, які за молекулярною масою (до 2000 Да) близькі до природних, утворюються на останніх стадіях протеолізу.

При співвідношеннях «ензим:субстрат» в діапазоні від 1:100 до 1:140 у період протеолізу від 90 до 120 хвилини від його початку досягається високий вихід фосфопептидів, основна частина з яких (більше 70 %) за молекулярною масою відповідає відомим природним казеїновим фосфопептидам [1, 3]. Підсумовуючи отримані результати, можна заключити, що при використанні для протеолізу співвідношень «ензим:субстрат» в діапазоні від 1:100 до 1:140 при 37°C і значенні рН 7,9 через 90 хвилин можна отримати високий вихід казеїнових фосфопептидів, які за своєю молекулярною масою подібні до відомих природних біологічно активних фосфопептидів.

**Висновок.** В результаті проведених досліджень були встановлені оптимальні умови для отримання природних біологічно активних казофосфопептидів за дії панкреатину. Враховуючи залежність в'язкості казеїнових розчинів, а також виходу фосфопептидів від концентрації казеїну пропонується для протеолізу використовувати казеїнові субстрати концентрацією 9%. Щодо співвідношення «ензим-субстрат», то стабільно високий вихід фосфопептидів, які за молекулярною масою відповідають відомим природним фосфопептидам, досягається в діапазоні співвідношень від 1:100 до 1:140. При вищих концентраціях панкреатину після короткого протеолізу досягається максимум виходу фосфопептидів з подальшим швидким їх розщепленням, що супроводжується зменшенням молекулярної маси і виходу. При низьких концентраціях панкреатину в реакційному середовищі максимум виходу фосфопептидів протягом всього часу протеолізу не досягається, причому значна частина утворених фосфопептидів має порівняно високу молекулярну масу, не властиву природним фосфопептидам.

#### Література

1. Fitz Gerald R.J. Potential uses of caseinophosphopeptides / R.J. Fitz Gerald // *Int. Dairy J.* – 1998. – Vol. 8. – P. 451-457.
2. Hartmann R. Food – derived peptides with biological activity: from research to food applications / R. Hartmann, H. Meisel // *Current Opinion in Biotechnology.* – 2007. – V. 18. – P. 163-169.
3. Park Y.W. Bioactive components in milk and dairy products / Park Y.W. – USA: Wiley – Black Well, 2009. – 426 p.
4. Юкало В.Г. Гель-фільтрація казеїнових фосфопептидів / В.Г. Юкало, Л.А. Сторож // *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького.* – 2014. Т. 16, № 2 (59), Частина 4. – С. 225-231.
5. Юкало В.Г. Електрофоретичний аналіз білків казеїнового комплексу / В.Г. Юкало // *Наукові праці НУХТ.* – 2008. – №24. – С. 65-67.
6. Кількісний електрофоретичний аналіз білків казеїнового комплексу / В.Г. Юкало, Б.І. Яворський, Сторож Л.А. [та ін.] // *Біологія тварин.* – 2007. – Т.9, №1-2. – С. 295-298.



7. Yukalo V. Isolation of phosphopeptides from total casein and its fractions / V. Yukalo, L. Storozh // Food Chemistry and Technology.– 2013.– Vol.47, №.2. – P. 32-40.

8. Farrell H.M. Nomenclature of the proteins of cows' milk – sixth revision / H.M. Farrell, R. Jimenez-Flores, G.T. Bleck // J. Dairy Sci. – 2004. – Vol.87, № 6. – P. 1641-1674.

9. Горбатова К.К. Химия и физика белков молока: Учебное пособие / Горбатова К.К. – М.: Колос, 1993. – 192 с.

10. Декуша Г.В. Розробка технології сухих сумішей з гідролізованим білком для дитячого харчування : дис. канд. техн. наук : 05.18.16 : захищ. 10.06.09 / Г.В. Декуша. – Одеса, 2009. – 157 с.

Рецензент – д.т.н., професор Ціж Б.Р.