А.В. Юкало
Тернопольский национальный технический университет им. Ивана Пулюя

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ КАЗЕИНОВЫХ ФРАКЦИЙ

В работе представлены результаты идентификации протеиновых фракций в растворах казеина современными методами электрофореза в полеакриамидном геле и колоночной жидкостной хроматографии. Установлены недостатки и преимущества каждого метода при определении протеинов казеинового комплекса. Даются рекомендации по использовании этих методов.

Ключевые слова: идентификация казеиновых фракций, электрофорез в ПААГ, жидкостная хроматография

A.V. Yukalo
Ternopil Ivan Pul'uy National Technical University, Ukraine

CASEIN FRACTIONS IDENTIFICATION BY THE CHROMATOGRAPHIC AND ELECTROPHORETIC METHODS

Casein soluble protein fractions were identified using modern methods of PAAG electrophoresis and column liquid chromatography. Some advantages and disadvantages of these methods were shown. The recommendations for the appliyng of these methods were proposed.

Keywords: casein fractions identification, PAAG electrophoresis, liquid chromatogaphy

Рекомендує до друку
О.Б. Столяр

Надійшла 22.07.2013

УДК 577.155.1

В.Г. ЮКАЛО, Р.А. ТКАЧУК
Тернопільський національний технічний університет ім. Івана Пулюя
вул. Руська, 56, Тернопіль, 46001

УТВОРЕННЯ ІНГІБІТОРІВ АНГІОТЕНЗИН ПЕРЕТВОРЮВАЛЬНОГО ЕНЗИМУ В ПРОЦЕСІ ПРОТЕОЛІЗУ A_{S1}-КАЗЕЇНУ ПРОТЕАЗАМИ ЛАКТОКОКІВ L. LACTIS SSP. CREMORIS

Модельний протеоліз α_{S1}- казеїну було здійснено за участі протеолітичних ензимів лактококів і молокозгортального препарату «Фромаза». Низькомолекулярні пептиди виділяли методом гель-фільтрації на сефадексі G-25. Показано, що протеолітичні ензими протеїназо-позитивних штамів лактококів L. lactis ssp. cremoris у поєднанні з молокозгортальним препаратом здатні розщеплювати α_{S1}-казеїн з утворенням казокінінів.

Ключові слова: протеоліз, α_{S1}-казеїн, казокініни, лактококи, L. lactis ssp. cremoris, молокозгортальний препарат

Ще в кінці сімдесятих років минулого століття було встановленно, що окремі ферменти первинної структури протеїнів казеїнового комплексу молока, які звільняються у вигляді пептидів в процесі нормального травлення, можуть проявляти біологічну дію в організмі ссавців в період молочного живлення. Такий висновок було зроблено в результаті досліджень властивостей глікомакропептиду, який утворюється на початкових стадіях дії травних протеаз на казеїнові міцели. Виявилось, що глікомакропептид є інгібітором шлункової секреції і моторики. Пізніше було відкрито багато біоактивних пептидів казеїнового походження [1]. Зокрема, важливим джерелом таких пептидів є α_{S1}-CN, який становить більше 30% у складі

протеїнів казеїнового комплексу. Серед продуктів його протеолізу є опіоїдні пептиди, імуномоляторні пептиди, фосфоропептиди, а також пептиди, які проявляють антигіпертензивну дію – казокініни. Нами раніше було показано, що казокініни можуть утворюватись з α_{S1}-казеїну за дії протеолітичних систем лактококів Lactococcus lactis ssp. lactis [2]. Для цього ми використали модельну протеолітичну систему, яка дозволяє інтенсифікувати процеси протеолізу без впливу на його специфічність. Велике значення у виробництві молочних продуктів також мають лактококи підвиду Lactococcus lactis ssp cremoris. Вони використовуються у складі різних заквасок – зокрема заквасок для виробництва твердих сирів, де має місце довготривалий протеоліз.

У зв'язку з цим метою даної роботи є вивчення можливості утворення казокінінів в процесі протеолізу α_{S1}-казеїну ензимами протеолітичних систем лактококів Lactococcus lactis ssp cremoris.

Матеріал і методи досліджень

В роботі досліджували штами протеїназо-позитивних лактококів Lactococcus lactis ssp cremoris, які підтримуються на кафедрі харчової біотехнології і хімії Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя. В якості молокозгортального препарату використовували фромазу (Fromase 2200TL, «Gist Brocades», Франція). Препарат загального казеїну виділяли із свіжого знежиреного молока, шляхом переосадження в ізоелектричній точці в умовах інактивації природних протеаз. Гомогенний α_{S1}-казеїн виділяли диференційним осадженням у присутності сечовини. Отриманий препарат очищували методом іонообмінної хроматографії на колонках з ДЕАЕ-целюлозою (ДЕАЕ-52, «Serva», ФРН). Деталі виділення і очищення α_{S1}-казеїну описані у статті [5]. Фракційний склад загального казеїну та гомогенність препаратів очищеного α_{S1}-казеїну, а також склад хроматографічних фракцій, аналізували методом електрофорезу на вертикальних пластинках поліакриламідного гелю. При цьому використовували лужну буферну систему гелю (pH=7,9), що містить 25 мМ трис, 27 мМ діетилбарбітурат , 3 мМ ЕДТФ і 4,5 М сечовину [3]. Електрофореграми фіксували і фарбували загальноприйнятими методами. Електрофореграфічні буфери і гелі готували, використовуючи реактиви фірми «Reanal» (Угорщина).

Фракціонування продуктів протеолізу α_{s1}-казеїну проводили на хроматографічній колонці фірми «Reanal», яку заповнювали сефадексом G-25 fine («Phasmacia», Швеція).

Концентрацію протеїнів визначали спектрофореографічно при довжині хвилі 280 нм. При цьому використовували встановлені раніше коєфіцієнти поглинання: 10,0 для α_{S1}-казеїну і 8,2 для загального казеїну.

Інгібіторну дію на ангіотензин-перетворювальний ензим (КФЗ.4.15.1) визначили за методом [4]. При цьому використовували ензим (АПЕ) з легень кроля («Sigma», США) та синтетичний субстрат гіпурил-L- гістидил-L-лейцин («Sigma», США). Концентрацію продуктів протеолізу визначали за методом Залашка М.В. [2].

Результати досліджень та їх обговорення

Отримання продуктів протеолізу α_{S1}-казеїну проводили у модельній протеолітичній системі, яка відображає умови протеолізу казеїнових фракцій у процесі виробництва ферментованих молочних продуктів. Протеоліз проводили у двох варіантах. В першому випадку протеоліз відбувався лише з використанням біомаси лактококів. В другому випадку протеоліз проводили з біомасою лактококів в комбінації з фромазою, яка використовується як молокозгортальний препарат. Послідовність всіх процедур отримання продуктів протеолізу α_{S1}-казеїну показані на схемі (рис. 1).

В першій серії дослідів 1 % α_{S1}-казеїн інкубували при 30^{o}C з різними штамами лактококів Lactococcus lactis ssp cremoris – C_4, C_5, C_9 і C_{10}. При цьому була досягнута значно вища концентрація продуктів протеолізу α_{S1}-казеїну, ніж при звичайному рості лактококів у знежиреному молоці або в розчині α_{S1}-казеїну. Після закінчення інкубації всі поживні середовища центрифугували і супернатанти, які містили продукти розпаду α_{S1}-казеїну, висушували ліофільно і тестували на інгібіторну дію по відношенню до ангіотензин-перетворювального ензиму. Із використаних штамів лише один (C_9) показав інгібіторну дію

(~9 %). Інгібування активності іншими штамами, не перевищувало 5 %, що можна пояснити низькою концентрацією інгібітор них пептидів, або неспецифічною дією продуктів протеолізу.

В подальших дослідженнях у протеолітичну систему через 5 годин після початку інкубації вводили фромазу в концентрації, яка в 10 разів перевищувала концентрацію, що використовується для згортання молока у процесі виробництва твердих сичужних сирів. Для контролю α_{S1}-казеїн інкубували з фромазою без внесення у середовище лактококів.

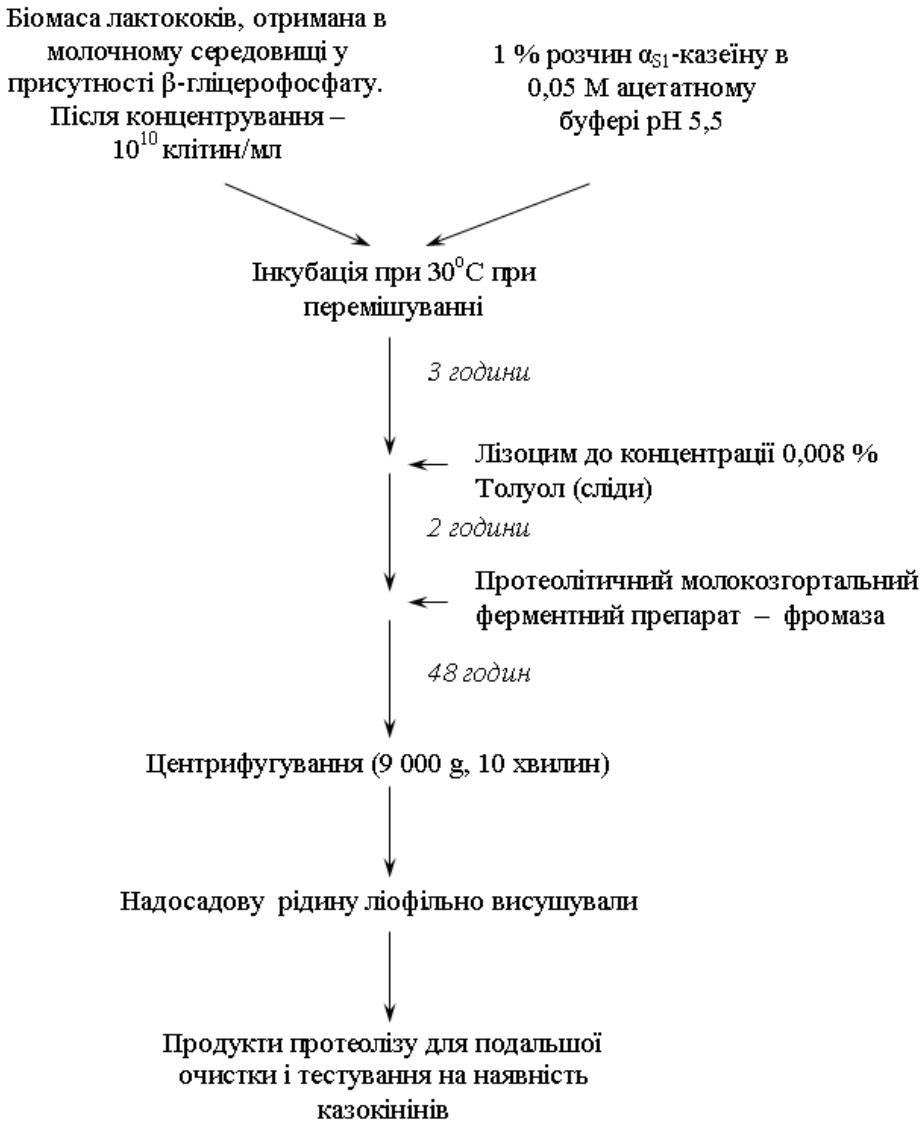

Рис. 1. Схема протеліози модельного α_{S1}-казеїну ферментами лактококів та молокозгортального препарату

Значення концентрацій розчинних у трихлороцтовій кислоті (ТХО) продуктів протеолізу через 48 годин інкубації наведені в табл. 1. Після інкубації α_{S1}-казеїну зі штамами лактококів у присутності фромази, зразки центрифугували, а супернатанти ліофілізували і фракціонували на сефадексі G-25. Типова хроматограма показана на рис. 2. Видалені хроматографічні фракції аналізували методом електрофорезу в ПААГ (рис. 3). Перша хроматографічна фракція містить нерозщеплений α_{S1}-казеїн, а також багато різних високомолекулярних продуктів протеолізу, які не утворюють чітких смуг на електрофореграмі.

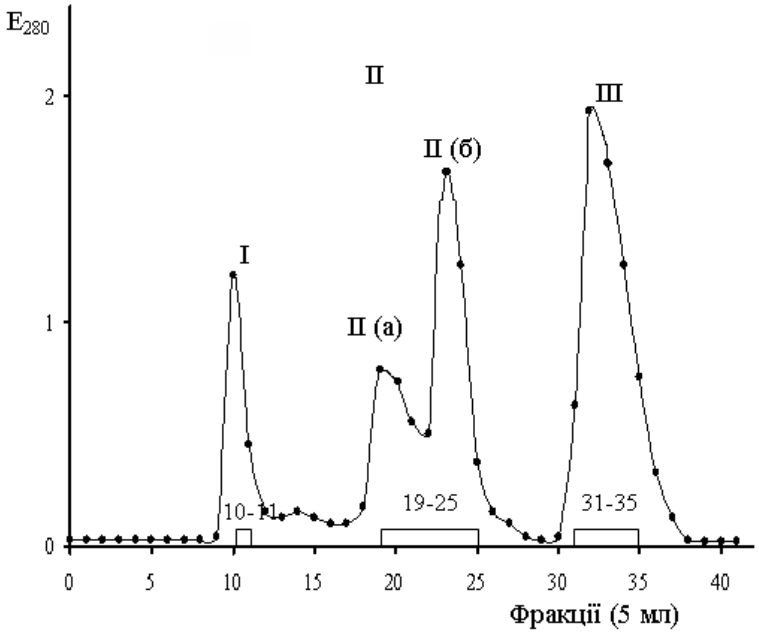

Рис. 2. Хроматограма водорозчинних продуктів протеолізу α_{S1}-казеїну після інкубації зі штамом C_5 Lactococcus lactis subsp. cremoris та фромазою

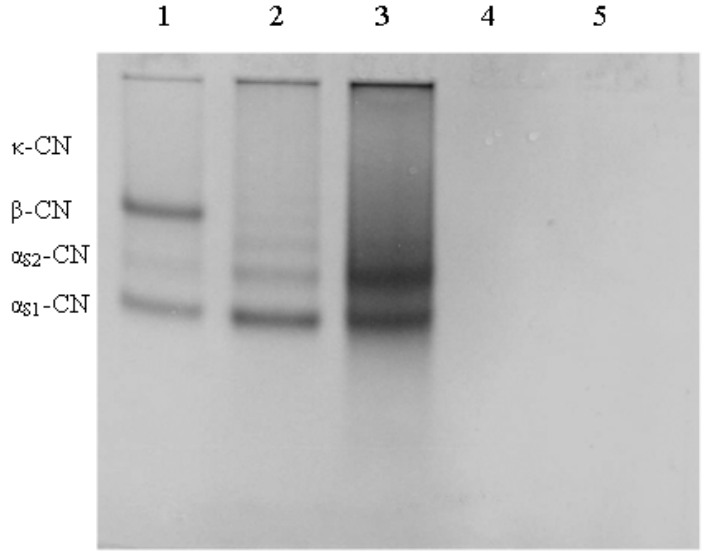

Рис. 3. Електрофореграма загального казеїну (1), α_{S1}-казеїну після п'яти годин інкубації з лактококами (2) та хроматографічних фракцій I (3), II (4) і III (5), одержаних після розділення продуктів протеолізу α_{S1}-казеїну на сефадексі G-25 fine (рис. 2)

Низькомолекулярні пептиди фракцій II та III не фіксуються в ПААГ. Результати тестування на здатність гальмувати активність АПФ свідчать, що у продуктах протеолізу α_{S1}-казеїну, які виходять з першою та другою хроматографічними фракціями, казокініни відсутні при використанні всіх штамів лактококів в комбінації з фромазою. Пептиди третьої хроматографічної фракції показали інгібіторний ефект (табл. 1).

Таблиця 1

Інгібіторна дія низькомолекулярних продуктів протеолізу α_{S1}-казеїну (хроматографічна фракція III) на активність АПФ (M±m, n=5)

Варіанти досліду	Концентрація продуктів протеолізу, мкг/мл	Інгібіторний ефект стосовно АПФ, %
α_{S1}-казеїн + фромаза	503±27	5,2±0,1
α_{S1}-казеїн + штам c_9	95±7	12,5±0,2
α_{S1}-казеїн + штам c_9 + фромаза	241±15	20,1±0,6
α_{S1}-казеїн + штам c_4 + фромаза	293±17	17,0±0,5
α_{S1}-казеїн + штам c_5 + фромаза	251±16	27,4±0,7
α_{S1}-казеїн + штам c_{10} + фромаза	325±15	29,3±0,7

Отримані дані підтверджують можливість утворення казокінінів у процесі протеолізу у ферментованих молочних продуктах за сумісної дії ензимів протеолітичних систем лактококів і ензимів молокозгортального препарату фромази.

Висновки

В умовах модельної системи за сумісної дії протеаз лактококів Lactococcus lactis subsp. cremoris та молокозгортального препарату фромаза на α_{S1}-казеїн утворюються казокініни. За результатами гель-фільтрації казокініни входять до низькомолекулярної фракції продуктів протеолізу (до 1500 Да). Підбір штамів лактококів здатних утворювати казокініни може бути використаний для створення ферментативних молочних продуктів з антигіпертензивними властивостями.

1. *Юкало А.В.* Протеїни казеїнового комплексу молока корів (Bos taurus) як попередники біологічно активних пептидів / А.В Юкало, Л.А. Сторож, В.Г Юкало //Біотехнологія — 2012. — Т. 5, № 4. — С. 21—33.
2. *Юкало В.Г.* Вплив продуктів протеолізу α_{S1}-казеїну на активність ангіотензин-перетворюючого ферменту / В.Г. Юкало // Укр. біохім. журнал. — 2001. — № 5. — С. 28—32.
3. *Юкало В.Г.* Електрофорез білків молока / В.Г. Юкало // Медична хімія. — 2000. — Т. 2, № 4. — С. 79—82.
4. *Cushman D.W.* Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung/ D.W. Cushman // Biochem. Pharmacol. — 1971. — V. 20. — P. 1647—1648.
5. *Yukalo V.G.* Obtaining of casein protein complex fractions from cow milk / V.G. Yukalo // Nutracos. — 2005. —№ 5. — P. 17—19.

В.Г. Юкало, Р.А. Ткачук

Тернопольский национальный технический университет им. Ивана Пулюя

ОБРАЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ЭНЗИМА В ПРОЦЕССЕ ПРОТЕОЛИЗА A_{S1}-КАЗЕИНА ПРОТЕАЗАМИ ЛАКТОКОККОВ L. LACTIS SSP. CREMORIS

Модельный протеолиз α_{S1}-казеина проводили с участием протеолитических энзимов лактококков и молокосвертывающего препарата «Фромаза». Низкомолекулярные пептиды выделяли методом гель-фильтрации на сефадексе G-25. Показано, что протеолитические энзимы протеиназо-положительных штаммов лактококков L. lactis ssp. cremoris совместно с молокосвертывающими препаратами способны расщеплять α_{S1}-казеин с образованием казокининов.

Ключевые слова: протеолиз, α_{S1} - казеин, казокинины, лактококки, L. lactis ssp. cremoris, молокосвертывающий препарат

V.G. Yukalo, R.A. Tkachuk
Ternopil Ivan Pul'uy National Technical University

ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORS FORMATION DURING THE A_{S1}-CASEIN PROTEOLYSIS BY THE PROTEASES OF LACTOCOCCUS LACTIS SSP. CREMORIS

Model proteolysis of α_{S1}-casein was performed by the proteolytic enzymes of Lactococci and milk-clotting preparation "Fromaze". The low molecular weight peptides have been isolated with the help gel-filtration on Sephadex G-25. It was shown, that enzymes of proteinase-positive strains of lactococci with "Fromaze" are capable to cleavege α_{S1} - casein with cazokinin creation.

Keywords: proteolysis, α_{S1}-casein, casokinins, lactococci L. lactis ssp. cremoris, milk-clott

Рекомендує до друку
О.Б. Столяр

Надійшла 22.07.2013