

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ И ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДАМИ

Головач Т.Н., Тарун Е.И., Кравцова О.И., Курченко В.П.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Введение. Биологически активные пептиды белков молока представляют особый интерес в нутрициологии, так как они обладают иммуномодулирующим, антиоксидантным, антимуtagenным, гипотензивным, противомикробным, противовирусным и др. действием [1]. Антиоксидантная активность (АОА) белков и пептидов обусловлена доступными растворителю аминокислотами (восстанавливающими свойствами аминокислотных радикалов). В составе идентифицированных пептидов с антирадикальными свойствами выявлены триптофан, тирозин, метионин и гистидин. Получение гидролизатов, содержащих специфические пептиды, обеспечивается проведением ферментативной реакции в оптимизированных условиях, особенностями субстратной и сайт-специфичности протеаз, физико-химическими свойствами расщепляемых белковых субстратов [2]. Актуальность исследований связана с получением ферментативных гидролизатов белков молока (казеина и сывороточных белков) с заданным пептидным профилем и биологическими активностями для продуктов функционального питания.

Цель работы – сравнительное исследование антиоксидантной активности пептидов сывороточных белков молока спектрофотометрическим и флуориметрическим методами.

Материалы и методы исследований. В исследовании использовали концентрат сывороточных белков молока, изготовленный методом ультрафильтрации (КСБ, ТУ ВУ 100377914.550–2008, исходный субстрат для получения гидролизатов) и опытный образец частичного ферментативного гидролизата сывороточных белков, полученный в НИЛ прикладных проблем биологии БГУ. В качестве образцов сравнения применяли частичные ферментативные гидролизаты сывороточных белков «PRODIET GF 006» (Ingredia, Франция), «Vital Armor H 801 LB» (Armor Protéines, Франция) и «Hilmar 8350» (Hilmar, США).

Для оценки АОА образцов гидролизатов применены спектрофотометрический и флуориметрический методы. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) – метод, основанный на измерении уменьшения ин-

тенсивности флуоресценции флуоресцеина (ФЛ), что наблюдается при его связывании с кислородными радикалами. Антиоксиданты (АО) в реакционной среде, взаимодействуя с радикалами, замедляют свободнорадикальное окисление ФЛ. Степень уменьшения флуоресценции – это мера степени деградации ФЛ под воздействием кислородных радикалов. Подход, использованный в работе, основан на определении АОА образцов по их способности связывать свободные радикалы, образованные в системе Фентона. В данной системе генерируются гидроксильные радикалы при взаимодействии комплекса Fe(II) и этилендиамина тетрауксусной кислоты с H₂O₂. Интерпретация получаемых данных осложняется одновременным присутствием нескольких активных форм кислорода (АФК) с различной реакционной способностью. Также не исключается прямое воздействие АО на компоненты системы генерирования АФК.

Вместе с тем, при измерении АВТС-радикал-восстанавливающей активности предполагается применение предварительно полученного катион-радикала на основе диаммониевой соли 2,2'-азино-бис[3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты]. АВТС⁺⁺ – метастабильный радикал, который может существовать в растворе продолжительное время; при внесении в среду различных антирадикальных агентов наблюдается быстрое восстановление радикала. Реакцию контролировали спектрофотометрически при λ_{734} : АВТС⁺⁺-радикал (синее окрашивание раствора) при восстановлении преобразуется в свою бесцветную нейтральную форму. В данной системе присутствует один тип радикала и исключено влияние антиоксиданта на процесс его образования, поэтому осуществляется механизм прямого взаимодействия АО с радикалом.

Результаты и их обсуждение. Получены данные об АОА исходного субстрата для изготовления гидролизатов (КСБ), опытного образца гидролизата и зарубежных аналогов (таблица). Диапазон анализируемых концентраций белка составил 2–120 и 2–10 000 мкг/мл для спектрофотометрического и флуориметрического методов, соответственно. Определены величины IC₅₀, или концентрации АО (мкг/мл), при которых в анализируемых системах связывается 50 % свободных радикалов.

Установлено возрастание АОА в результате ферментативного гидролиза сывороточных белков. Способность к восстановлению АВТС⁺⁺ при внесении опытного образца по сравнению с КСБ увеличилась в 3,2 раза. Наряду с этим, связывание свободных радикалов, образованных в системе Фентона, возросло в 2,3 раза. Согласно данным таблицы, с увеличением степени гидролиза сывороточных белков с 12,5 до 25 % наблюдается повышение антиоксидантного потенциала гидролизатов. По результатам сравнительного анализа гидролизатов, количество бел-

ковой фракции с $m_r < 10$ кДа в опытном образце на 11–15 % больше, чем в образцах «Vital Armor Н 801 LB» и «Hilmar 8350». Образец «PRODIET GF 006» содержит 97 % фракции с $m_r < 5$ кДа и характеризуется высоким антиоксидантным потенциалом (таблица). Однако в гидролизатах «PRODIET GF 006» и «Hilmar 8350» обнаружен нативный бычий сывороточный альбумин, который обладает аллергенным потенциалом. Преимуществом опытного образца является расщепление всех белков-аллергенов молочной сыворотки, что является определяющим фактором при использовании гидролизатов в гипоаллергенных продуктах.

Таблица – Характеристика гидролизатов сывороточных белков молока

Наименование образца	Пептидный профиль	Степень гидролиза, %	IC ₅₀ (ORAC)	IC ₅₀ (ABTS ⁺⁺)
КСБ	–	–	1000	95,1
Опытный образец	≤10 кДа, 98 %	15,5	439,5	29,9
«Hilmar 8350»	<20 кДа, 83 % *	12,5*	887,6	29,5
«Vital Armor Н 801 LB»	<10 кДа, 87 % *	16*	433,7	26,6
«PRODIET GF 006»	<5 кДа, 97 % *	20–25*	49,6	16,8

Примечание: * – согласно данным производителей.

Применение обоих методов позволяет наиболее полно оценить АОА белков и пептидов как при действии на кислородные радикалы, образующиеся в системе Фентона, так и на предварительно полученный катион-радикал ABTS⁺⁺. ORAC-метод чувствителен в широком диапазоне анализируемых концентраций белка, однако в ABTS⁺⁺-системе присутствует один тип радикала и исключено прямое воздействие антиоксиданта на систему образования радикалов.

Выводы. Согласно данным спектрофотометрического и флуориметрического методов, гидролиз сывороточных белков оказывает существенное влияние на антирадикальную активность полученной пептидной фракции. По результатам сравнительного исследования опытного образца гидролизата и зарубежных аналогов с различной степенью гидролиза показано, что увеличение степени расщепления белков коррелирует с возрастанием их радикал-восстанавливающих свойств.

Литература

1. Raikos, V. Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review / V. Raikos, T. Dassios // Dairy Sci. & Technol. – 2014. – Vol. 94. – P. 91–101.
2. Halavach, T.M. Enzymatic hydrolysis of milk proteins as a basis of specialized food products biotechnology / T.M. Halavach, V.P. Kurchenko, A.I. Albulov // Ural Scientific Bulletin. – 2014. – № 25 (104). – P. 69–79.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА И ГЕНЕРАЦИЯ ИМИ СУПЕРОКСИДНЫХ РАДИКАЛОВ: ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ КОЭНЗИМА Q₁₀-H₂

Дудылина А.Л.¹, Иванова М.В.², Шумаев К.Б.^{2,3}, Рууге Э.К.^{1,2}

¹*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

²*ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Россия*

³*ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Митохондрии являются одним из основных источников активных форм кислорода в клетках организма. Супероксидные анион-радикалы, образовавшиеся в комплексе III митохондриальной дыхательной цепи, и появившийся впоследствии пероксид водорода, вызывают значительный интерес, так как они играют регуляторную и сигнальную роли во многих внутриклеточных процессах. В тоже время, если продукция активных форм кислорода превышает клеточные возможности детоксикации, то последующее окисление фосфолипидов, белков и ДНК приводит к необратимым нарушениям энергетического метаболизма и возможной гибели клеток. Эндогенный коэнзим Q₁₀ (CoQ₁₀) в митохондриях является не только одним из компонентов цепи переноса электронов, но и важнейшим антиоксидантом.

Нами исследована роль экзогенно вводимой восстановленной формы CoQ₁₀ (убихинола-10) в регуляции биоэнергетических процессов и образования супероксидных радикалов в митохондриях сердца крыс линии Wistar. Водорастворимый препарат убихинола-10 (CoQ₁₀-H₂) был разработан и любезно предоставлен ЗАО "НПО "ДОМ ФАРМАЦИИ".