

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ПЕПТИДОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ И ТРИПТОФАНА С ХИТОЗАНАМИ НА ИХ АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

EFFECT OF COMPLEX FORMATION OF WHEY PEPTIDES AND TRYPTOPHAN WITH CHITOSANS ON THEIR ANTIRADICAL PROPERTIES

*Е. И. Тарун¹⁾, В. И. Линник¹⁾, В. А. Свинторжицкая¹⁾,
Т. Н. Головач²⁾, Р. В. Романович²⁾*

E. I. Tarun¹⁾, V. I. Linnik¹⁾, V. A. Svintorjizkaya¹⁾, T. M. Halavach²⁾, R. V. Romanovich²⁾

*¹⁾ Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь
ktarun@tut.by*

²⁾ Белорусский государственный университет, БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

¹⁾ International Sakharov Environmental Institute of BSU, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

²⁾ Belarusian State University, BSU, Minsk, Republic of Belarus

Проведено сравнительное изучение антиоксидантной активности гидролизата сывороточного белка молока и триптофана, а также их комплексов с сукцинированным хитозаном и олигохитозаном. Получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации всех образцов, из которых графически определены показатели IC_{50} , которые находились в пределах 11,89–89,23 мкг/мл. Комплексы гидролизатов с хитозанами восстанавливали флуоресценцию флуоресцеина до 96–97 % при концентрации образцов 0,14–0,35 мг/мл. Комплексы триптофана с хитозанами восстанавливали флуоресценцию флуоресцеина до 89–91 % при концентрации образцов 0,1 мг/мл.

The comparative study of the antioxidant activity of whey protein hydrolyzate and tryptophan, as well as their complexes with succinylated chitosan and oligochitosan, was carried out. The dependences of the fluorescence intensity of fluorescein on the logarithm of the concentration of all samples were obtained, from which the IC_{50} values were graphically determined, which were in the range of 11,89–89,23 $\mu\text{g/ml}$. Complexes of hydrolysates with chitosans restored the fluorescence of fluorescein to 96–97 % at sample concentrations of 0,14–0,35 mg/ml. Complexes of tryptophan with chitosans restored the fluorescence of fluorescein to 89–91 % at a sample concentration of 0,1 mg/ml.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, гидролизат молока, триптофан, хитозан, флуоресцеин.

Keywords: antioxidant activity, whey hydrolyzate, tryptophan, chitosan, fluorescein.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2023-1-334-338>

Ценность молочных продуктов заключается в том, что содержащиеся в них биологически активные пептиды (БАП) обладают гипотензивным, иммуномодулирующим, антиоксидантным, антимикробным, антимутагенным и др. свойствами [1]. БАП образуются в результате воздействия на белки молока пищеварительных ферментов желудочно-кишечного тракта, при технологической обработке очищенными протеазами, а также ферментации молочнокислыми бактериями [2]. При ферментативном гидролизе основных белков-аллергенов молока (β -лактоглобулин, казеин) образуются гипоаллергенные пептиды, что связано с расщеплением участков антигенных детерминант в соответствующих белках [3]. Получение гидролизованных и ферментированных белков молока со специфическим белково-пептидным профилем и характерными биологически активными свойствами достигается использованием различных протеолитических ферментов и пробиотических микроорганизмов [4]. Антиоксидантную активность (АОА) пептидов определяют аминокислотные радикалы триптофана, тирозина, метионина и цистеина. Антиоксидантными свойствами также обладают и полисахариды - хитин, хитозан и их производные.

Целью создания комплексов гидролизата белков молока и триптофана с хитозанами являлось устранение горького вкуса гидролизата. Вместе с тем, актуальным представляется изучение влияния комплексообразования на функциональные свойства пептидов, в частности, на антиоксидантную активность гидролизованных белков молока и триптофана.

Метод определения АОА по отношению к активированным формам кислорода основан на измерении интенсивности флуоресценции флуоресцентна и ее уменьшении под воздействием свободных радикалов. Генерирование свободных радикалов осуществляли, используя систему Фентона, в которой образуются гидроксильные радикалы при взаимодействии комплекса железа (Fe^{2+}) с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA) и пероксида водорода. При взаимодействии флуоресцеина со свободными радикалами происходит тушение его флуоресценции,

восстановить которую можно при добавлении в систему веществ, проявляющих антиоксидантные свойства [5]. В качестве таких веществ были взяты образец гидролизата сывороточных белков молока (ГСБ), 2 образца хитозанов – олигохитозан (ОХТ) и сукцинированный хитозан (СХТ), триптофан (Трп), а также 4 образца комплексов гидролизата сывороточных белков молока и триптофана с олигохитозаном и сукцинированным хитозаном. В таблице 1 указано содержание сухого вещества и белка/триптофана в образцах.

Таблица 1

Перечень образцов гидролизатов сывороточных белков молока, олигохитозана, сукцинированного хитозана, триптофана и их комплексов

№	Название образца	Краткое название образца	Содержание сухого вещества, мг/мл	Содержание белка/Трп, мг/мл
1	Гидролизат сывороточных белков молока	ГСБ	13	10,4
2	Олигохитозан	ОХТ	5	
3	Сукцинированный хитозан	СХТ	5	
4	Комплекс олигохитозана с гидролизатом сывороточных белков молока	ОХТ - ГСБ	14	10,4
5	Комплекс сукцинированного хитозана с гидролизатом сывороточных белков молока	СХТ - ГСБ	3,5	2
6	Триптофан	Трп	5	4,9
8	Комплекс олигохитозана с триптофаном	ОХТ - Трп	10	4,9
9	Комплекс сукцинированного хитозана с триптофаном	СХТ - Трп	10	4,9

В работе использовали олигохитозан (ОХТ, 100 кДа, степень деацетилирования – 90 %) и сукцинированный хитозан (СХТ, 200 кДа, степень замещения – 75,1 %) производства ЗАО «Биопрогресс» (Россия); гидролизат сывороточных белков (ГСБ) Peptigen IF 3080 WPH с м.д. белка 80 % («Arla Foods Ingredients Group», Дания), Триптофан производства «Sigma-Aldrich» (США).

Получение комплексов гидролизата сывороточных белков молока и триптофана с хитозанами:

С целью получения комплексов готовили водные растворы, содержащие хитозан (ОХТ/СХТ) и Трп/ГСБ в указанной выше концентрации. Растворы ОХТ–Трп/ГСБ и СХТ–Трп/ГСБ инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании (200 об/мин).

Измерения флуоресценции проводили на флуориметре RF-5301 PC («Shimadzu», Япония). Регистрировали интенсивность флуоресценции на длине волны 514 нм. Длина волны возбуждения – 490 нм.

В ходе исследования ингибирования реакций свободных радикалов, генерируемых в системе Фентона, получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А) от логарифма концентрации всех образцов.

В таблице 2 представлены основные показатели антиоксидантной активности: A_{max} – интенсивность флуоресценции, соответствующая максимальной концентрации ингибированию свободных радикалов, C_{max} – концентрация образца, при которой достигается A_{max} и IC_{50} – концентрация образца, при которой достигается 50% ингибирования свободных радикалов.

Таблица 2

Показатели антиоксидантной активности Трп/гидролизата, хитозана (ОХТ и СХТ), комплексов ОХТ/СХТ с Трп/гидролизатом

№	Название образца	A_{max} , %	C_{max} , мг/мл	IC_{50} , мкг/мл сухого вещества	IC_{50} , мкг/мл белка/Трп
1	ГСБ (1,3 %)	96	0,325	25,97±0,06	20,78±0,05
2	ГСБ (0,25 %)-СХТ (0,1 %)	97	0,35	24,37±0,75	13,93±0,43
3	СХТ (0,5 %)	90	0,5	89,23±0,20	
4	ГСБ (1,3 %)- ОХТ (0,1 %)	96	0,14	14,03±0,06	10,42±0,04
5	ОХТ (0,5 %)	95	0,5	35,24±0,24	
6	Трп (0,5 %)	81	0,05	11,89±0,02	11,66±0,02
7	Трп (0,5 %)- ОХТ (0,5 %)	91	0,1	13,92±0,06	6,82±0,03
8	Трп (0,5 %)- СХТ (0,5 %)	89	0,1	15,71±0,03	7,70±0,01

На рисунке 1 представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А) от логарифма концентрации (С) гидролизата сывороточных белков молока (ГСБ) (1), комплекса гидролизата сывороточных

белков молока с сукцинированным хитозаном (ГСБ–СХТ) (2), и сукцинированным хитозаном (СХТ) (3). Минимальная антиоксидантная активность получена для образца СХТ. Сукцинированный хитозан восстанавливал флуоресценцию флуоресцеина до 90 % при концентрации 0,5 мг/мл, тогда как образцы ГСБ и ГСБ–СХТ восстанавливали флуоресценцию до 96-97 % при концентрации в 1,5/1,4 раза ниже (0,325/0,35 мг/мл). Показатель IC_{50} (89,23 мкг/мл) СХТ в 3,4/3,7 раза превышает аналогичные показатели ГСБ (25,97 мкг/мл) и ГСБ–СХТ (24,37 мкг/мл). Включение сукцинированного хитозана в комплекс к гидролизату повышает АОА последнего. Показатель IC_{50} по белку для ГСБ–СХТ (13,93 мкг/мл) уменьшается в 1,5 раза по сравнению с IC_{50} по белку для ГСБ (20,78 мкг/мл).

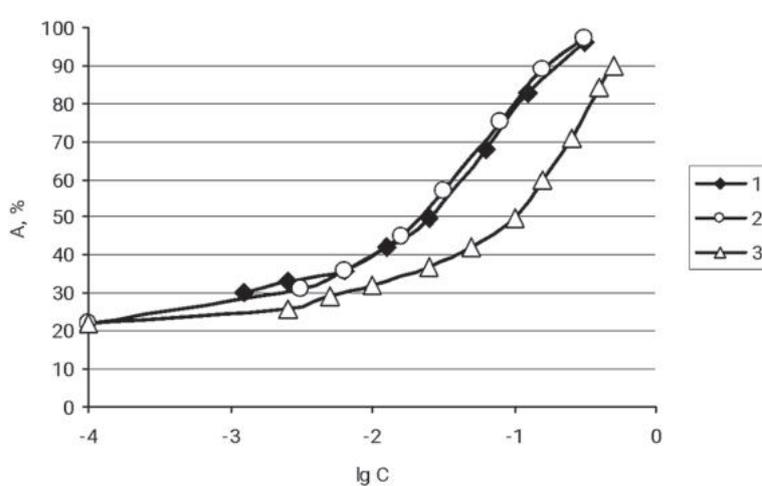


Рисунок 1 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) гидролизата сывороточных белков молока (ГСБ) (1), комплекса гидролизата сывороточных белков молока с сукцинированным хитозаном (ГСБ–СХТ) (2), и сукцинированного хитозана (СХТ) (3)

На рисунке 2 представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) гидролизата сывороточных белков молока (ГСБ) (1), комплекса гидролизата сывороточных белков молока с олигохитозаном (ГСБ–ОХТ) (2), и олигохитозана (ОХТ) (3). Максимальная антиоксидантная активность получена для образца ГСБ–ОХТ. Комплекс восстанавливал флуоресценцию флуоресцеина до 96 % при концентрации 0,14 мг/мл. Гидролизат также восстанавливал флуоресценцию флуоресцеина до 96 % при более высокой концентрации 0,325 мг/мл. Олигохитозан восстанавливал флуоресценцию флуоресцеина до 95 % при еще более высокой концентрации 0,5 мг/мл. Показатель IC_{50} (35,24 мкг/мл) ОХТ в 1,4/2,5 раза превышает аналогичные показатели ГСБ (25,97 мкг/мл) и ГСБ–ОХТ (14,03 мкг/мл). Включение олигохитозана в комплекс к гидролизату повышает АОА последнего. Показатель IC_{50} по белку для ГСБ–ОХТ (10,42 мкг/мл) уменьшается в 2 раза по сравнению с IC_{50} по белку для ГСБ (20,78 мкг/мл).

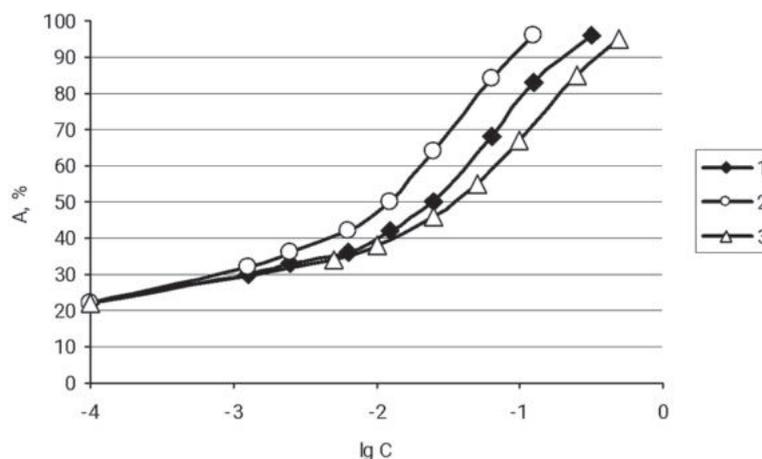


Рисунок 1 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) гидролизата сывороточных белков молока (ГСБ) (1), комплекса гидролизата сывороточных белков молока с олигохитозаном (ГСБ–ОХТ) (2), и олигохитозана (ОХТ) (3)

На рисунке 3. представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) триптофана (Трп) (1), комплекса триптофана с олигохитозаном (Трп–ОХТ) (2), и олигохитозана (ОХТ) (3). Триптофан восстанавливал флуоресценцию флуоресцеина до 81 % при концентрации 0,05 мг/мл.

Комплекс Трп-ОХТ восстанавливал флуоресценцию флуоресцеина до 91 % при концентрации в 2 раза выше – 0,1 мг/мл. Показатель IC_{50} (35,24 мкг/мл) ОХТ в 3/2,5 раза превышает аналогичные показатели Трп (11,89 мкг/мл) и Трп-ОХТ (13,92 мкг/мл). Показатель IC_{50} Трп-ОХТ по сухому веществу превышает Трп в 1,2 раза. Однако, IC_{50} Трп-ОХТ (6,82 мкг/мл) по триптофану в 1,7 раз ниже Трп (11,66 мкг/мл). Таким образом, можно сделать вывод о положительном влиянии включенного олигохитозана на АОА триптофана.

На рисунке 4 представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А) от логарифма концентрации (С) триптофана (Трп) (1), комплекса триптофана с сукцинилированным хитозаном (Трп-СХТ) (2), и сукцинилированного хитозана (СХТ) (3). Комплекс Трп-СХТ восстанавливал флуоресценцию флуоресцеина до 89 % при концентрации 0,1 мг/мл. Показатель IC_{50} (89,23 мкг/мл) СХТ в 7,5/5,7 раза превышает аналогичные показатели Трп (11,89 мкг/мл) и Трп-СХТ (15,71 мкг/мл). Показатель IC_{50} Трп-СХТ по сухому веществу превышает Трп в 1,3 раза. Однако, IC_{50} Трп-СХТ (7,7 мкг/мл) по триптофану в 1,5 раз ниже Трп (11,66 мг/мл). Таким образом, можно сделать вывод о положительном влиянии включенного сукцинилированного хитозана на АОА триптофана.

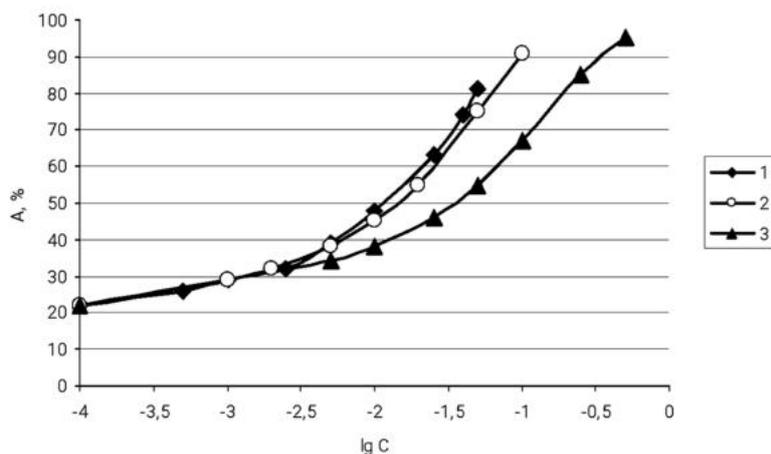


Рисунок 3 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А) от логарифма концентрации (С) триптофана (Трп) (1), комплекса триптофана с олигохитозаном (Трп-ОХТ) (2), и олигохитозана (ОХТ) (3)

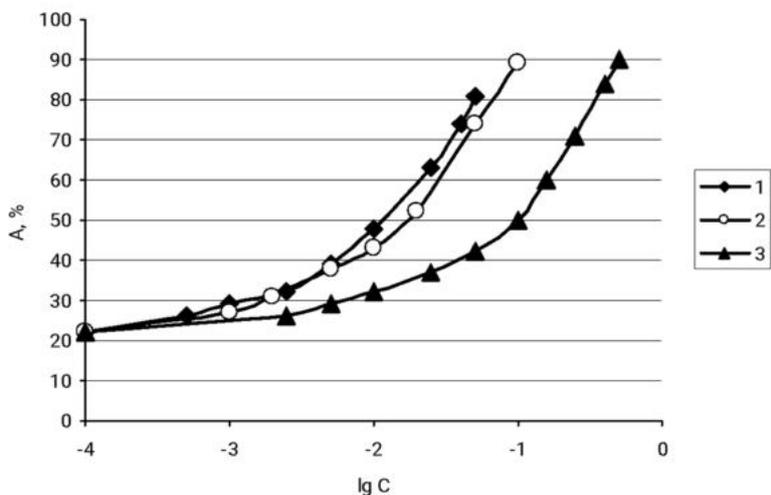


Рисунок 4 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А) от логарифма концентрации (С) триптофана (Трп) (1), комплекса триптофана с сукцинилированным хитозаном (Трп-СХТ) (2), и сукцинилированного хитозана (СХТ) (3)

Антиоксидантный эффект (IC_{50}) триптофана в 2,2/1,8 раза превышает показатель смеси пептидов (ГСБ) по сухому веществу/белку (триптофану) в связи с протон-донорными свойствами аминокислотного радикала. Комплексы Трп-ОХТ и Трп-СХТ также показывают более высокую АОА по сравнению с комплексами ГСБ-ОХТ и ГСБ-СХТ. Показатель IC_{50} Трп-ОХТ ниже ГСБ-ОХТ в 1,5 раз по белку (триптофану), а показатель IC_{50} Трп-СХТ ниже ГСБ-СХТ в 1,8 раз по белку (триптофану).

Следует отметить более высокий антиоксидантный эффект биокмпозитов гидролизата и триптофана с олигохитозаном, тогда как взаимодействие ГСБ и Трп с сукцинилированной формой полисахарида менее эффективно. Антиоксидантная активность (IC_{50}) олигохитозана в 2,5 раза выше сукцинилированного хитозана. Антиоксидантная активность (IC_{50}) комплекса ГСБ-ОХТ выше ГСБ-СХТ в 1,7/1,3 раза по сухому веществу/белку. Антиоксидантная активность (IC_{50}) комплекса Трп -ОХТ выше Трп -СХТ в 1,1 раза по сухому веществу и триптофану.

Сукцинизированный хитозан показывает антиоксидантную активность в 3,4/7,5 раз ниже ГСБ/Трп и в 3,7/5,7 раз ниже комплексов ГСБ-СХТ/Трп-СХТ. Однако, присоединение сукцинизированного хитозана оказывает положительный эффект на АОА комплексов ГСБ-СХТ и Трп-СХТ. Антиоксидантный эффект (IC_{50}) из расчета по белку/триптофану повышается в 1,4–1,5 раз.

Олигохитозан показывает антиоксидантную активность в 1,4/3 раз ниже ГСБ/Трп и в 1,5/2,5 раз ниже комплексов ГСБ-ОХТ/Трп-ОХТ. Однако, присоединение олигохитозана также оказывает положительный эффект на АОА комплексов ГСБ-ОХТ и Трп-ОХТ. Антиоксидантный эффект (IC_{50}) из расчета по белку/триптофану повышается в 1,7–2 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wada, Y. Bioactive peptides derived from human milk proteins – mechanisms of action / Y. Wada, B. Lönnnerdal // J. Nutr. Biochem. 2014. V. 25, № 5. P. 503–514.
2. Mohanty, D. et al. Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food / D. Mohanty // Int. J. Food Prop. 2016. V. 19. P. 837–846.
3. Tsabouri, S. Cow's milk allergenicity / S. Tsabouri, K. Douros, K.N. Priftis // Endocr. Metab. Immune. 2014. V. 14, № 1. P. 16–26.
4. Madureira, A.R. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins / A.R. Madureira [et al.] // J. Dairy Sci. 2010. V. 93, № 2. P. 437–455.
5. Тарун Е.И. Антиоксидантная активность гексагидрохинолонов / Е.И. Тарун, А.В. Данькова, А.Н. Пырко // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. – 2019. – № 2. – С. 77–83.

IN SILICO CALCULATION OF PYRIMIDIN DERIVATIVE (2R,3R)-3,3A-DIHYDROXY-6-IMINO-2,3,3A,9A-TETRAHADRO-6H-FOUR[2,3,4,5]OXAZOLO[3,2-A]PYRIMIDIN-2-YL) METHYL DIHYDROGEN PHOSPHATE

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ПИРИМИДИНА (2R,3R)-3,3А-ДИГИДРОКСИ-6-ИМИНО-2,3,3А,9А-ТЕТРАГАДРО-6Н-4[2,3,4,5]ОКСАЗОЛО[3,2-А]ПИРИМИДИН-2-ИЛ)МЕТИЛ ДИГИДРОФОСФАТА

A. Fakhruddin^{1,2}, S. Shahab^{1,2}, M. Atroshko^{1,2}

А. Фахрулдин^{1,2}, С. Шахаб^{1,2}, М. Атрошко^{1,2}

¹Belarusian State University, BSU, Minsk, Republic of Belarus

²International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

E-mail: kbb@iseu.by, 2867289924@qq.com

¹Белорусский государственный университет, БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

This article presents the results of theoretical calculations of the compound (2R,3R)-3,3a-dihydroxy-6-imino-2,3,3a,9a-tetrahydro-6H-four[2,3,4,5]oxazolo[3,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl dihydrogen phosphate to determine its equilibrium geometry, free energy and the type of molecular orbitals involved in the formation of the absorption spectrum.

В данной статье представлены теоретические расчеты, относящиеся к новому синтезированному соединению: (2R,3R)-3,3а-дигидрокси-6-имино-2,3,3а,9а-тетрагадро-6Н-4[2,3,4,5]оксазоло[3,2-а]пиримидин-2-ил)метил дигидрофосфату. Определены его стандартная геометрия, значение свободной энергии и формы молекулярных орбиталей, участвующие в формировании спектра поглощения молекулы.

Keywords: computational chemistry, HF/STO-3G*, UV/Vis spectrum.

Ключевые слова: компьютерная химия, HF/STO-3G*, УФ спектр.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2023-1-338-341>

For calculations, we used a personal computer with an intel core i7 processor (3.6 GHz CPU) with the Ubuntu 18.04 operating system installed. When calculating the initial geometry of a molecule with (2R,3R)-3,3a-dihydroxy-6-imino-2,3,3a,9a-tetrahydro-6H-four[2,3,4,5]oxazolo[3,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl dihydrogen phosphate compound base, the method of molecular mechanics (MM+) of the Chem Draw 20.0 software package was chosen. calculation parameters depending on the specific problem. The starting geometry of the molecule was additionally optimized in the solvent