

ние всасывания в кишечнике и развитие в кишечнике разных патологических процессов, например, воспалений или опухолей. Нарушение синтеза миелина, что ведет к ухудшению познавательных способностей. Нарушение всасывания связано с недостаточностью либо отсутствием фактора Касла. Низкое содержание цианкобаламина приводит к риску развития коронарного атеросклероза [4].

К причинам появления врожденного и наследуемого гиповитаминоза относятся генетический дефект транскобаламинов I и II, дефицит внутреннего фактора Касла и нарушение всасывания в кишечнике. При генетическом дефекте уменьшается либо отсутствует содержание транскобаламинов, которые обеспечивают транспорт витамина B12. К категории людей с риском возникновения дефицита кобаламина относятся: пожилые люди, беременные и кормящие женщины, пациенты с пернициозной анемией, с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, вегетарианцы.

Высокий уровень B12 в большинстве случаев связан с качественным либо количественным нарушением транскобаламинов - белков связывания. Причинами повышения уровня кобаламина в крови могут стать избыточное потребление или неправильное применение с медицинской целью, высвобождение витамина из внутреннего депо, нарушение выведения из организма. К этиологическим факторам гипervитаминоза чаще всего относят большие новообразования, злокачественные гематологические новообразования и заболевания печени.

Снижение поступления витаминов в организм в настоящее время происходит из-за употребления высоко-рафинированных продуктов и консервированной пищи. Применяемые в коммерческом сельском хозяйстве методы культивирования овощей и фруктов привели к тому, что содержание витаминов B1, B2 сократилось во многих овощных культурах на 30%. Даже строго сбалансированный рацион питания не всегда может удовлетворить потребности организма в витаминах. Соответственно, периодический прием синтетических витаминов необходим для поддержки организма и для уменьшения вероятности дефицитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Канюков, В.Н. Витамины: учебное пособие / В.Н. Канюков, А.Д. Стрекаловская, Т.А. Санеева. –Оренбург: ОГУ, 2012 – 108 с.
2. Balabanova, L. Microbial and Genetic Resources for Cobalamin (Vitamin B12) Biosynthesis / L. Balabanova, L. Averianova, M. Marchenok // Ecosystems to Industrial Biotechnology. Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22. – P. 1–39.
3. Шестопалов, А. В. Прогнозируемая представленность метаболических путей синтеза витаминов и короткоцепочечных жирных кислот при ожирении у взрослых / А. В. Шестопалов // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2023. – Т. 59, № 5. – С. 389–402.
4. Литвицкий, П.Ф. Нарушения обмена витаминов / П.Ф. Литвицкий // Вопросы современной педиатрии. – 2014. – Т. 13, № 4. – С. 40–47.

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРНО-ВРЕМЕННОГО РЕЖИМА ГИДРОЛИЗА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА НА ИХ АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ

INFLUENCE OF CHANGES IN THE TEMPERATURE-TIME REGIME OF HYDROLYSIS OF MILK WHEY PROTEINS ON THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY

Е. И. Тарун¹, Я. А. Самаркина¹, Т. Н. Головач²

E. I. Tarun¹, Y. A. Samarkina¹, T. N. Halavach²

¹Учреждение 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

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

¹International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

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

Проведено сравнительное изучение антиоксидантной активности (АОА) 7-ми образцов сывороточных белков молока. Нативные и термообработанные белки молока подвергались гидролизу с использованием бактериальной щелочной протеазы Протозима (Protozym) при 50 и 60 °С. в течение разного времени – 2 и 3 часов. Получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации всех образцов, из которых графически определены показатели IC₅₀, которые находились в пределах 20,93–153,25 мкг/мл. Нативные и термообработанные белки молока, а также их гидролизаты восстанавливали

флуоресценцию флуоресцеина до 51-99 % при концентрации образцов 0,1–0,5 мг/мл. Самая высокая АОА получена для нативного сывороточного белка после его гидролиза при 50 °С в течение 2-х часов.

A comparative study of the antioxidant activity (AOA) of 7 samples of whey milk proteins was carried out. Native and heat-treated milk proteins were hydrolyzed using bacterial alkaline protease Protozym at 50 and 60 °C. for different times - 2 and 3 hours. 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 20,93–153,25 µg/ml. Native and heat-treated milk proteins, as well as their hydrolysates, restored fluorescein fluorescence to 51-99% at sample concentrations of 0,1-0,5 mg/ml. The highest AOA was obtained for native whey protein after its hydrolysis at 50 °C for 2 hours.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, гидролизат сывороточных белков молока, флуоресцеин.

Keywords: antioxidant activity, whey protein hydrolyzate, fluorescein.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-1-353-356>

Ценность молочных продуктов заключается в том, что содержащиеся в них биологически активные пептиды (БАП) обладают гипотензивным, иммуномодулирующим, антиоксидантным, антимикробным, антимуtagenным 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]. Использование различных протеолитических ферментов и пробиотических микроорганизмов обеспечивает получение гидролизированных и ферментированных белков молока со специфическим белково-пептидным профилем и характерными биологически активными свойствами [4].

Проведено исследование антиоксидантной активности 7-ми образцов сывороточных белков молока (таблица 1). Первую часть образцов перед гидролизом оставляли в нативном состоянии. Вторую часть образцов подвергали термообработке для частичной денатурации белков сыворотки молока с целью увеличения доступных сайтов гидролиза. Затем все образцы подвергали гидролизу с использованием бактериальной щелочной протеазы Протозима (Protozym). Гидролиз проводили при двух температурах 50 и 60 °С в течение разного времени – 2 и 3 часов. Температурно-временной режим гидролиза изменяли для оптимизации технологического процесса получения гидролизата сывороточных белков молока с более глубокой степенью гидролиза. По данным электрофоретического анализа в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях применение предварительной тепловой обработки белков и повышение температуры до 60 °С позволяет расщепить все сывороточные белки на промежуточные пептиды с молекулярной массой менее 10 кДа.

Таблица 1

Образцы сывороточных белков молока

№	Образец	Белок, мг/мл	Примечания
1	nWP	50	Нативный сывороточный белок
2	tWP	50	Термообработанный сывороточный белок
3	nWH-P5%-50 °C-2h	50	Гидролизат nWP, фермент Protozym 5%, 50 °C-2 ч
4	nWH-P5%-60 °C-2h	50	Гидролизат nWP, фермент Protozym 5%, 60 °C-2 ч
5	tWH-P5%-60 °C-2h	50	Гидролизат tWP, фермент Protozym 5%, 60 °C-2 ч
6	nWH-P5%-60 °C-3h	50	Гидролизат nWP, фермент Protozym 5%, 60 °C-3 ч
7	tWH-P5%-60 °C-3h	50	Гидролизат tWP, фермент Protozym 5%, 60 °C-3 ч

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 взяты 7 образцов сывороточных белков молока.

В ходе исследования ингибирования реакций свободных радикалов, генерируемых в системе Фентона, получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А) от логарифма концентрации всех образцов молока, из которых графически определены основные показатели антиоксидантной активности образцов, представленные в таблице 2: A_{max} - интенсивность флуоресценции, соответствующая максимальному 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 образцов сывороточных белков молока

№	Название образца	$A_{\max}$, %	$C_{\max}$, мг/мл	IC_{50} , мкг/мл
1	nWP	75	0,5	153,25
2	tWP	51	0,1	95,69
3	nWH-P5%-50 °C-2h	99	0,5	20,93
4	nWH-P5%-60 °C-2h	85	0,5	28,06
5	tWH-P5%-60 °C-2h	88	0,25	31,7
6	nWH-P5%-60 °C-3h	83	0,5	29,28
7	tWH-P5%-60 °C-3h	78	0,5	32,82

На рисунке 1 представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) nWH (1) и tWH (2). Сывороточные белки молока начинают проявлять активность при концентрации 0,005 мг/мл. При последующем увеличении концентрации образца наблюдается увеличение подавления действия свободных радикалов. При концентрации nWH (1) 0,5 мг/мл флуоресценция флуоресцеина восстанавливается до 75 %. Образец термообработанного белка молока tWH (2) восстанавливал флуоресценцию флуоресцеина до 51 % при концентрации 0,1 мг/мл. Последующее падение восстановления флуоресценции при повышении концентрации термообработанного белка молока может быть связано с уменьшением прозрачности раствора, которая не позволила корректно определить флуоресценцию флуоресцеина. При этой концентрации 1-ый образец показывал более низкое значение восстановления флуоресценции флуоресцеина – 44 %. Предварительная термообработка белков молока позволяет повысить АОА. Показатель IC_{50} термообработанного белка молока (95,69 мкг/мл) уменьшается в 1,6 раз по сравнению с нативным белком молока (153,25 мкг/мл).

На рисунке 2 представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) nWH (1), nWH-P5%-50 °C-2h (2) и nWH-P5%-60 °C-2h (3). Гидролиз белков молока значительно увеличивает их АОА. Показатели $A_{\max}$ 3-го (85 %) и 2-го (99 %) образцов увеличиваются на 10 и 24 % по сравнению с негидролизированным белком молока. Показатели IC_{50} уменьшаются для 3-го (28,06 мкг/мл) и 2-го (20,93 мкг/мл) образцов в 5,5 и 7,5 раз соответственно. Гидролиз нативного белка молока при 50 °C в течение 2-х часов позволяет получить более оптимальные показатели АОА. Показатель $A_{\max}$ 2-го образца на 14 % выше 3-го, а показатель IC_{50} в 1,34 раза ниже. Увеличение времени гидролиза до 3-х часов приводит к незначительному уменьшению АОА. Показатель $A_{\max}$ nWH-P5%-60 °C-3h (83 %) уменьшился на 2 % по сравнению с nWH-P5%-60 °C-2h, а показатель IC_{50} (29,28 мкг/мл) увеличился в 1,04 раза.

На рисунке 3 представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) tWH (1), tWH-P5%-60 °C-2h (2) и tWH-P5%-60 °C-3h (3). Гидролиз белков молока после термообработки также значительно увеличивает их АОА. Показатели $A_{\max}$ 3-го (78 %) и 2-го (88 %) образцов увеличиваются на 27 и 37 % по сравнению с исходным образцом (1). Показатели IC_{50} уменьшаются для 3-го (32,82 мкг/мл) и 2-го (31,7 мкг/мл) образцов в 2,9 и 3 раза соответственно. Увеличение времени гидролиза до 3-х часов приводит к незначительному уменьшению АОА. Показатель $A_{\max}$ 3-го образца уменьшился на 10 % по сравнению со 2-м образцом, а его показатель IC_{50} увеличился в 1,04 раза. Аналогичное изменение показателя IC_{50} наблюдается и при увеличении времени гидролиза до 3-х часов для нативных белков молока.

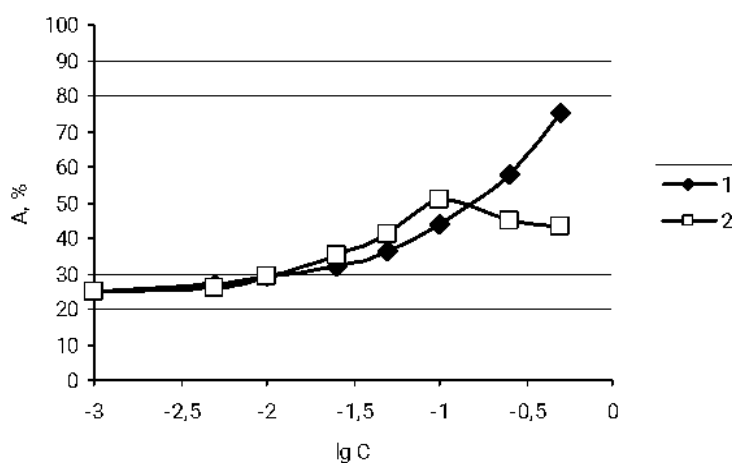


Рисунок 1 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) nWH (1) и tWH (2)

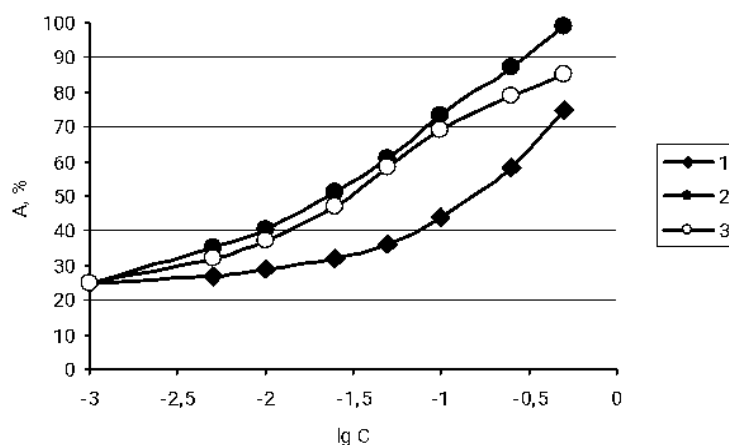


Рисунок 2 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) nWH (1), $nWH-P5\%-50\text{ }^{\circ}C-2h$ (2) и $nWH-P5\%-60\text{ }^{\circ}C-2h$ (3)

Образец $tWH-P5\%-60\text{ }^{\circ}C-2h$, прошедший термообработку перед гидролизом показывает незначительное увеличение показателя $A_{\max}$ на 2 % по сравнению с гидролизатом нативного молока ($nWH-P5\%-60\text{ }^{\circ}C-2h$), а его показатель IC_{50} в 1,13 раз выше. Таким образом, предварительная термообработка перед гидролизом белков молока не оказывает существенного влияния на изменение АОА. Аналогичный вывод можно сделать и при сравнении нативного ($nWH-P5\%-60\text{ }^{\circ}C-3h$) и термообработанного ($tWH-P5\%-60\text{ }^{\circ}C-3h$) белка молока, прошедших гидролиз при $60\text{ }^{\circ}C$ в течение 3-х часов. Увеличении времени гидролиза до 3-х часов приводит к незначительному уменьшению АОА. Показатель $A_{\max}$ образца $tWH-P5\%-60\text{ }^{\circ}C-3h$ (83 %) уменьшился на 2 %, а показатель IC_{50} (29,28 мкг/мл) увеличился в 1,04 раза.

Самая высокая АОА получена для нативного сывороточного белка после его гидролиза при $50\text{ }^{\circ}C$ в течение 2-х часов. Термообработка перед гидролизом приводит к повышению показателей АОА по сравнению с нативным белком молока, однако, при дальнейшем гидролизе при $60\text{ }^{\circ}C$ в течение 2-х и 3-х часов не оказывает существенного влияния на изменение показателей АОА. Изменение температурного режима гидролиза с 50 до $60\text{ }^{\circ}C$ для нативного белка молока приводит к ухудшению показателей АОА. Увеличение времени гидролиза с 2-х до 3-х часов как для нативного, так и для термообработанного белка молока не оказывает существенного влияния на изменение АОА.

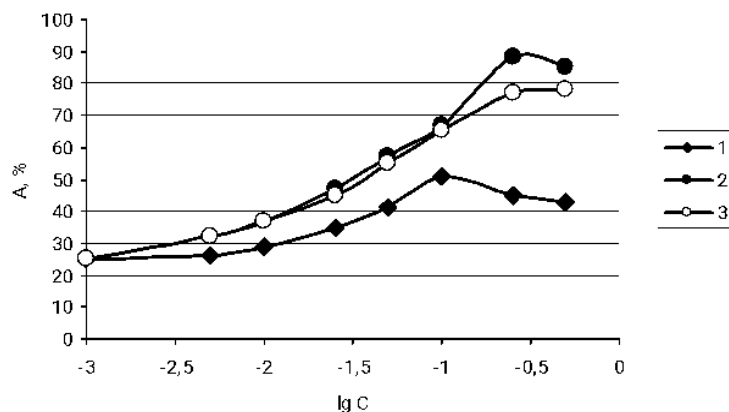


Рисунок 3 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) tWH (1), $tWH-P5\%-60\text{ }^{\circ}C-2h$ (2) и $tWH-P5\%-60\text{ }^{\circ}C-3h$ (3)

ЛИТЕРАТУРА

1. Wada, Y. Bioactive peptides derived from human milk proteins – mechanisms of action / Y. Wada, B. Lönnerdal // 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.