

УДК 637.045

Поступила в редакцию 15.07.2018
Received 15.07.2018**В.С. Метель, И.К. Куликова, Г.С. Анисимов, И.А. Евдокимов***ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»,
г. Ставрополь, Российская Федерация***ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ФРАКЦИЙ ПЕРМЕАТА
ОБЕЗЖИРЕННОГО МОЛОКА, ПОЛУЧЕННОГО МЕТОДОМ
УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ**

Аннотация. В статье рассмотрены основные пути образования пептидов в сыром обезжиренном молоке и степень перехода пептидов в пермеат при ультрафильтрационной обработке молока, приведен метод хроматографирования белковой и пептидной фракции, представлены результаты хроматографического исследования нативных молочных пептидов, находящихся в пермеате обезжиренного молока, полученного методом ультрафильтрации.

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, договор МОН 03.G25.31.0241.

Ключевые слова: молоко, пермеат, ультрафильтрация, пептиды, хроматография

V.S. Metel, I.K. Kulikova, G.S. Anisimov, I.A. Evdokimov*North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia***INVESTIGATION OF POLYPEPTIDE FRACTIONS OF SKIM MILK
PERMEATE OBTAINED BY ULTRAFILTRATION**

Abstract. The main ways of peptide formation in raw skim milk and the extent of peptides permeation in the ultrafiltration process are considered in the article. The method of chromatography of the protein and peptide fractions is described, the results of chromatographic studies of native milk peptides present in the permeate of skim milk obtained by ultrafiltration are presented.

Acknowledgements: The authors would like to acknowledge financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, contract MON 03.G25.31.0241.

Keywords: milk, permeate, ultrafiltration, peptides, chromatography

Введение. С увеличением покупательского спроса на продукты, богатые белком, начал развиваться и рынок молочных продуктов с фракционированным белковым составом. Особый интерес исследователей вызывают биологически активные пептиды молочных продуктов. Во всем мире проводится большое количество исследований, целью которых является выявление полезных свойств пептидов для здоровья человека. Уже доказаны функции пептидов в области здоровья и физиологии человека, они включают антигипертензивную, антимикробную, антиоксидантную, антитромботическую, опиоидную, антиаппетитную, иммуномодулирующую и минералосвязывающую активность [1, 2].

Биоактивные пептиды, полученные из различных белков молока, были рассмотрены многими исследователями [3, 4]. Биоактивные пептиды неактивны в последовательности исходного белка и могут выделяться тремя способами: (1) путем гидролиза нативными молочными протеиназами, (2) путем гидролиза белков протеолитическими микроорганизмами и (3) посредством действия вносимых протеолитических ферментов, полученных из микроорганизмов или растений [5]. В основном пептидный состав свежего молока представлен продуктами действия плазмينا. Содержание пептидной фракции в молоке в зависимости от активности плазмينا составляет от 0,5 до 1,8 г/л [6]. Наиболее чувствительны к плазмину β - и α_2 -казеины; α_1 -казеин гидролизуеться много медленнее, а κ -казеин устойчив к его действию, α_3 -казеин расщепляется плазмином с образованием фрагментов с молекулярной массой 20,5, 12,5, 10,3 кДа. Действие активного плазмينا на полипептидную цепь β -казеина, содержащую 209 аминокислотных остатков и 5 фосфатных групп, приводит к разрыву пептидных связей цепи Лиз₂₈ - Лиз₂₉, Лиз₁₀₅ - Гис₁₀₆ и Лиз₁₀₇ - Глу₁₀₈ с образованием фрагментов β -казеина. Данные фрагменты — фос-

фопептиды (устаревшие названия - 5-я и 8-я фракции протеозопептонов), γ_1 -, γ_2 - и γ_3 -казеины. Возможно образование пептидов при разрыве пептидных связей между 29- и 105-м, а также 29- и 107-м остатками β -казеина с образованием фрагментов с молекулярной массой 9,9 и 10,2 кДа. Продукты расщепления β -казеина могут обуславливать горький вкус молока, а при выработке белковых продуктов переходят в сыворотку, так как не денатурируют при обработке сычужным ферментом. Вместе с тем продукты распада β - и α s-казеинов могут обладать высокой физиологической активностью [7]. В свежем молоке пептиды содержатся в незначительном количестве.

Во многих исследованиях получение пептидов связано с использованием протеолитических ферментов [8]. Однако с учетом активного внедрения мембранных методов обработки сырья в молочной отрасли представляет интерес потенциальная возможность выделения активных пептидов молочного сырья путем мембранной обработки.

Технология мембранного разделения представляется логичным выбором для фракционирования молока, поскольку многие компоненты молока могут быть разделены в соответствии с их размерами. В исследованиях, посвященных мембранному разделению молочного сырья основное внимание уделяется ультрафильтрации. С помощью ультрафильтрации осуществляется концентрирование мицелл казеина в качестве предварительной обработки при производстве сыра, производится разделение и фракционирование жировых глобул для получения сливок, а также уменьшается бактериальная обсемененность в обезжиренном молоке и очищаются сывороточные белки [9]. Встречаются способы отделения пептидных фракций из реакционной смеси при проведении гидролиза молочных белков с использованием ультрафильтрации [10, 11].

Исследования, проведенные некоторыми авторами [11], показывают, что профили распределения молекулярных масс пептидов гидролизата казеина, обнаруженных в ультрафильтрационных пермеатах (табл. 1), характеризовались высоким содержанием (>94,8 %) коротких пептидов (<2000 Да). Доля пептидов с молекулярной массой 2000–5000 Да незначительно увеличивалась с изменением pH от 6,0 до 10,0, но всегда оставалась в пределах 0,95–4,90 %, тогда как содержание больших пептидов (>5000 Да) всегда находилось ниже, чем 0,3 %. Использование в качестве материала мембран полисульфона (PS) и полиэфирсульфона (PES) существенного влияния не оказывало и приводило к аналогичным результатам. Таким образом, пептиды, содержащиеся в молоке, вероятнее всего, не проникают сквозь ультрафильтрационную мембрану за счет своей довольно крупной молекулярной массы (10–20 кДа).

Т а б л и ц а 1. Профиль распределения молекулярных масс пептидов гидролизата казеина и его пермеата, полученного методом ультрафильтрации

Table 1. The distribution profile of molecular masses of peptides of casein hydrolyzate and its permeate obtained by the method of ultrafiltration

MWCO	Полисульфон, (%)			Полиэфирсульфон, (%)		
	>5000	2000–5000	<2000	>5000	2000–5000	<2000
Общий гидролизат	0,4	3,3	96,3	0,4	3,3	96,3
5 кДа						
pH6,0	<0,1	0,9	99,0	<0,1	1,7	98,2
pH8,0	0,1	2,4	97,5	<0,1	1,8	98,1
pH10,0	0,1	2,0	97,9	0,1	2,3	97,6
10кДа						
pH6,0	<0,1	1,7	98,3	0,1	2,0	97,9
pH8,0	0,3	4,9	94,8	0,2	3,3	96,5
pH10,0	0,3	4,0	95,7	0,2	3,6	96,2

Цель работы – изучить фракционный состав мелких пептидов в ультрафильтрационном пермеате обезжиренного молока.

Материалы и методы исследований.

Объектами исследования были образцы пермеата обезжиренного молока, полученные путем ультрафильтрации на PES мембране с молекулярной массой отсеки 10000 Да (табл. 2).

Пробоподготовка проводилась путем центрифугирования проб 60 мин при 6000 об/мин и температуре 5 °С. Аликвота прозрачной части фильтровалась через фильтрующую шприцевую насадку с размером пор 0,45 мкм.

Исследование проводилось методом эксклюзионной хроматографии. Для хроматографических измерений использовалась система NGC Quest 10+ (Bio-Rad, США). Система NGC была оснащена

50 мкл инъекционной петлей для ввода образцов. Для контроля процесса фракционирования применяли УФ-детектор с проточной ячейкой 10 мм, а также кондуктометрический детектор. Определение белка выполнялось при длине волны 214 нм [12]. Система была оснащена подготовительными головками насоса для скорости потока от 0,1 до 10,0 мл/мин. Смешивание стандартных буферных растворов и градиентов достигалось с помощью смесительного клапана. Система была помещена в лабораторию с контролируемым климатом с постоянной температурой (20 ± 1) °С во всех экспериментах. Использовалась колонка для эксклюзионной хроматографии ENrich SEC 70 (Bio-Rad, США). В качестве подвижной фазы использовался натрий-фосфатный буфер pH = 7,4. Перед использованием буфер фильтровали с помощью 0,45 мкм фильтра и дегазировали.

В качестве стандартов для хроматографии и последующего построения графика распределения молекулярных масс пептидов использовалась лиофилированная смесь GelFiltrationStandard (Bio-Rad, США), рис. 1, состоящая из тиреоглобулина (CV = 0,36), бычьего γ-глобулина (CV = 0,38), овальбумина цыпленка (CV = 0,43), лошадиного миоглобина (CV = 0,51) и витамина B12 (CV = 0,74), MW 1,350-670,000.

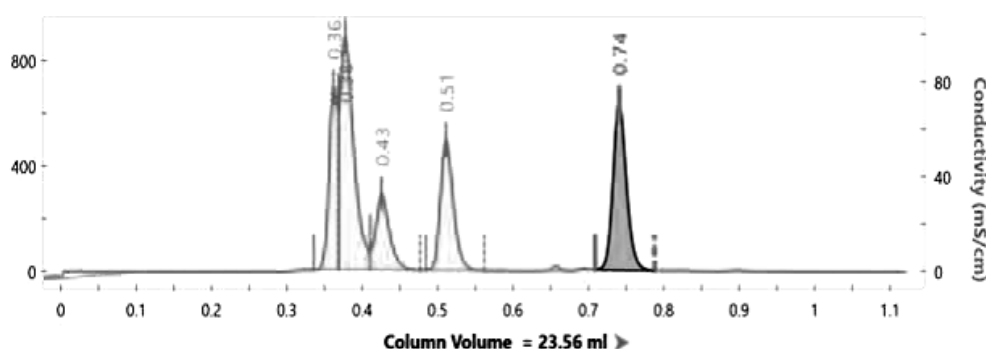


Рис. 1. Разделение стандартов с помощью гель-хроматографии
 Fig. 1. Separation of Standards by Gel Chromatography

В связи с тем, что колонка подходит для разделения биомолекул в диапазоне молекулярных масс 500–70 000 Да, наблюдается слияние пиков тиреоглобулина и бычьего γ-глобулина. В дальнейших расчетах тиреоглобулин не учитывается. Построение графиков и математическая обработка результатов исследований осуществлялись при помощи компьютерной программы Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, США).

Таблица 2. Состав и физико-химические свойства пермеата обезжиренного молока
 Table 2. Composition and physico-chemical properties of skimmed milk permeate

Параметр	Среднее (%)	Диапазон (%)
Сухие вещества	5,30	5,03–5,53
Зола	0,43	0,38–0,45
Лактоза	4,59	4,50–4,70
Белок	0,31	0,23–0,43
pH	6,55	6,50–6,60

Результаты хроматографии образцов представлены на рисунке 2.

Расчет распределения молекулярных масс был произведен с использованием графического метода [13]. Этот метод применяют для наглядного изображения формы связи между изучаемыми показателями. Для этого в прямоугольной системе координат строят график, по оси ординат откладывают индивидуальные значения результативного признака Y, а по оси абсцисс – индивидуальные значения факторного признака X. Совокупность точек результативного и факторного признаков называется полем корреляции (рис. 3).

Пик, выходящий на 0,38 объема колонки, не используется в расчетах молекулярных масс, т.к. это вещество выходит за рамки чувствительности колонки, что может являться каким-либо загрязнением или посторонней примесью.

На основании поля корреляции можно выдвинуть гипотезу о том, что связь между всеми возможными значениями X и Y носит степенной характер.

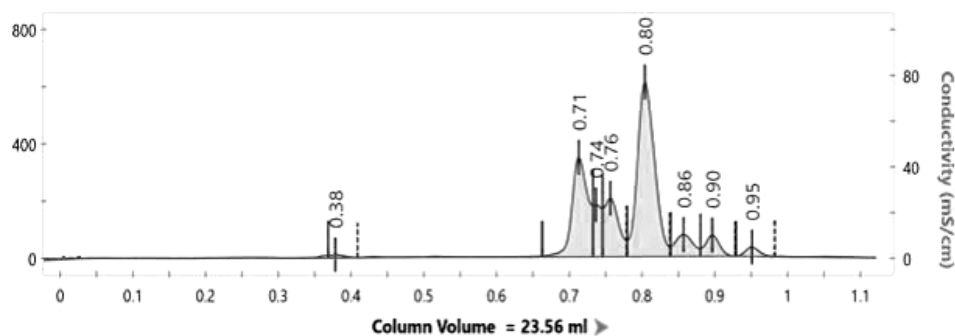


Рис. 2. Разделение пептидных фракций пермеата обезжиренного молока с помощью гель-хроматографии

Fig. 2. Separation of skimmed milk permeate peptide fractions using gel chromatography

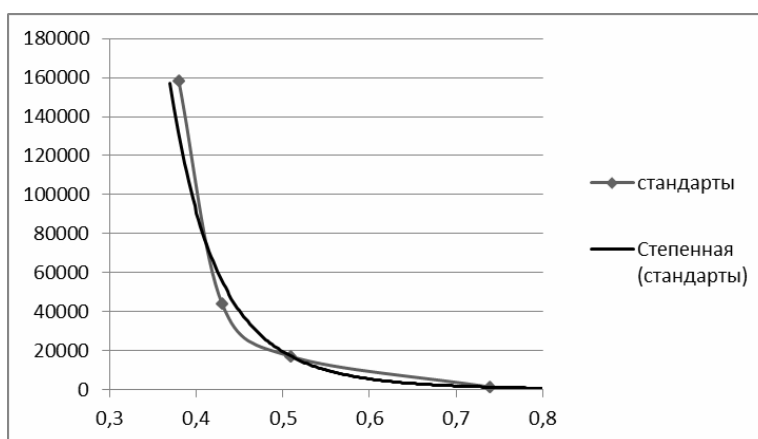


Рис. 3. График распределения молекулярных масс
Fig. 3. Molecular Weight Distribution Graph

Уравнение регрессии:

$$y = 160,55 * x^{-6,926}.$$

Величина достоверности аппроксимации:

$$RI = 0,9925.$$

Таким образом, в 99,25 % случаев X влияет на изменение Y, т.е. уравнение может быть использовано для расчета молекулярных масс пептидов, содержащихся в исследуемом образце (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Молекулярный вес пептидных фракций пермеата обезжиренного молока
Table 3. Molecular weight of peptide fractions of skimmed milk permeate

Время выхода пика, CV	Средний молекулярный вес расчетный (Да)	Количество соответствующих биоактивных пептидов [14]
0,71	1720 ± 60	4
0,74	1290 ± 50	3
0,76	1070 ± 40	4
0,8	750 ± 40	11
0,86	460 ± 20	15
0,9	330 ± 20	10
0,95	230 ± 10	5

Заключение. Исследования показали, что в пермеате обезжиренного молока преобладают пептиды с молекулярной массой от 230 до 1700 Да. Согласно базе данных биоактивных пептидов молока [14], обнаруженные пептиды могут соответствовать 52 вариантам, наиболее вероятными из которых являются АПФ-ингибирующая, ДПП-4-ингибирующая, антиоксидантная, антимикробная активности.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что в пермеате обезжиренного молока содержатся пептиды, которые потенциально обладают биологически активными свойствами.

Список использованных источников

1. Fardet, A. In vitro and in vivo antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: a narrative review of evidence / A. Fardet, E. Rock // *Nutrition Research Reviews*. – 2017. – Т. 31. – Vol. 01. – P. 1–19.
2. Morschheuser, L. Immunological analysis of food proteins using high-performance thin-layer chromatography-immunostaining / L. Morschheuser, K. Mink, R. Horst, C. Kallinich // *J. Chromatogr. A*. – 2017. – Т. 1526. – P. 157–166.
3. Clare, D. Biodefense Properties of Milk: The Role of Antimicrobial Proteins and Peptides / D. Clare, G. Catignani, H. Swaisgood // *Curr. Pharm. Des.* – 2003. – Т. 9. – № 16. P. 1239–1255.
4. Li G.H. Angiotensin I–converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects / G.H. Li, G.W. Le, Y.H. Shi, S. Shrestha // *Nutr. Res.* – 2004. – Т. 24. – № 7. – P. 469–486.
5. Korhonen, H. Bioactive Peptides from Food Proteins / H. Korhonen, A. Pihlanto // *Handbook of Food Products Manufacturing*. Hoboken, NJ, USA: JohnWiley&Sons, Inc. – 2004 – P. 1–37.
6. Гунькова, П.И. Влияние плазмينا на свойства молока / П.И. Гунькова, К.К. Горбатова // *Молочная промышленность*. – 2009. – № 8. – С. 52–53.
7. Topel, A. Chemie und Physik der Milch / A. Topel // *Naturstoff – Rohstoff – Lebensmittel*. – Behr, 2004. – P. 362–364.
8. Цыганков, В.Г. Изучение пептидного состава ферментативного гидролизата концентрата сывороточных белков коровьего молока с целью разработки пищевых продуктов для туристическо-оздоровительной деятельности / В.Г. Цыганков, Т.Н. Головач, В.П. Курченко, А.М. Бондарук // *Труды БГТУ. Минск : БГТУ, 2015. – Т. 174. – № 1. – С. 272–275.*
9. Brans, G. Membrane fractionation of milk: State of the art and challenges / G. Brans, C. Schroll, R. Van Der Sman, R. M. Boom // *Journal of Membrane Science*. – 2004. – Т. 243. – № 1–2. – P. 263–272.
10. Pouliot, Y. Fractionation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration hollow fiber membranes / Y. Pouliot, S.F. Gauthier, C. Bard // *J. Memb. Sci.* – 1993. – Т. 80. – № 1. – P. 257–264.
11. Gourley, L. Separation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration membranes with pH and EDTA treatments applied / L. Gourley, S.F. Gauthier, Y. Pouliot // *Lait. EDP Sciences* – 1995. – Т. 75. – № 3. – P. 259–269.
12. Vijayalakshmi, M.A. High Performance Size Exclusion Liquid Chromatography of Small Molecular Weight Peptides from Protein Hydrolysates Using Methanol as a Mobile Phase Additive / M.A. Vijayalakshmi, L. Lemieux, J. Amiot // *J. Liq. Chromatogr. Taylor&FrancisGroup* – 1986. – Т. 9. – № 16. – P. 3559–3576.
13. Фёрстер, Э. Методы корреляционного и регрессионного анализа / Э. Фёрстер, Б. Рёнци // *М.: Финансы и статистика, 1983. – 304 с.*
14. Nielsen, S.D. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization / S.D. Nielsen, R.L. Beverly, Y. Qu, D.C. Dallas // *Food Chem. Elsevier*. – 2017. – Т. 232. – P. 673–682.

References

1. Fardet, A. In vitro and in vivo antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: a narrative review of evidence / A. Fardet, E. Rock // *Nutrition Research Reviews*. – 2017. – Т. 31. – Vol. 01. – P. 1–19.
2. Morschheuser, L. Immunological analysis of food proteins using high-performance thin-layer chromatography-immunostaining / L. Morschheuser, K. Mink, R. Horst, C. Kallinich // *J. Chromatogr. A*. – 2017. – Т. 1526. – P. 157–166.
3. Clare, D. Biodefense Properties of Milk: The Role of Antimicrobial Proteins and Peptides / D. Clare, G. Catignani, H. Swaisgood // *Curr. Pharm. Des.* – 2003. – Т. 9. – № 16. P. 1239–1255.
4. Li G.H. Angiotensin I–converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects / G.H. Li, G.W. Le, Y.H. Shi, S. Shrestha // *Nutr. Res.*, 2004. – Т. 24. – № 7. – P. 469–486.

5. Korhonen, H. Bioactive Peptides from Food Proteins / H. Korhonen, A. Pihlanto // Handbook of Food Products Manufacturing. Hoboken, NJ, USA: JohnWiley&Sons, Inc., 2004 – P. 1–37.
6. Gunkova, P.I., Gorbatoва K.K. Vliyaniye plazmina na svoystva moloka [Influence of plasmin on milk properties]. Molochnaya promyshlennost' [The dairy industry], 2009, no. 8, pp. 52–53.
7. Topel, A. Chemie und Physik der Milch / A. Topel // Naturstoff – Rohstoff – Lebensmittel. – Behr, 2004. – P. 362–364.
8. Tsygankov, V.G., Kurchenko V.P., Bondaruk A.M. Izuchenie peptidnogo sostava fermentativnogo gidrolizata koncentrata syvorotochnykh belkov korov'ego moloka s cel'yu razrabotki pishchevykh produktov dlya turisticheskoy-ozdorovitel'noy deyatel'nosti [The study of the peptide composition of the enzymatic hydrolyzate of whey protein concentrate of cow's milk with the aim of developing food products for tourist and recreational activities]. Trudy BGTU [Works BSTU]. Minsk: BSTU, 2015, T. 174. no. 1, pp. 272–275.
9. Brans, G. Membrane fractionation of milk: State of the art and challenges / G. Brans, C. Schroll, R. Van Der Sman, R. M. Boom, // Journal of Membrane Science. – 2004. – T. 243. – № 1–2. – P. 263–272.
10. Pouliot, Y. Fractionation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration hollow fiber membranes / Y. Pouliot, S.F. Gauthier, C. Bard // J. Memb. Sci. – 1993. – T. 80. – № 1. – P. 257–264.
11. Gourley, L. Separation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration membranes with pH and EDTA treatments applied / L. Gourley, S.F. Gauthier, Y. Pouliot // Lait. EDP Sciences. – 1995. – T. 75. – № 3. – P. 259–269.
12. Vijayalakshmi, M.A. High Performance Size Exclusion Liquid Chromatography of Small Molecular Weight Peptides from Protein Hydrolysates Using Methanol as a Mobile Phase Additive / M.A. Vijayalakshmi, L. Lemieux, J. Amiot // J. Liq. Chromatogr. Taylor&FrancisGroup. – 1986. – T. 9. – № 16. – P. 3559–3576.
13. Forster, E., Ryants B. Metody korrelyatsionnogo i regressionnogo analiza [Methods of the correlation and regression analysis]. Moscow, Finance and Statistics, 1983. – 304 p.
14. Nielsen, S.D. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization / S.D. Nielsen, R.L. Beverly, Y. Qu, D.C. Dallas // Food Chem. Elsevier. – 2017. – T. 232. – P. 673–682.

Информация об авторах

Метель Владимир Сергеевич – инженер Центра биотехнологического инжиниринга СКФУ, Института живых систем, ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь. E-mail: metel@mokostav.com

Куликова Ирина Кирилловна – кандидат технических наук, доцент кафедры прикладной биотехнологии Института живых систем, ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь. E-mail: kik-st@yandex.ru

Анисимов Георгий Сергеевич – кандидат технических наук, директор Центра биотехнологического инжиниринга СКФУ, ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь. E-mail: ags82@mail.ru

Евдокимов Иван Алексеевич – доктор технических наук, профессор, заведующий базовой кафедрой «Технология молока и молочных продуктов», ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет» при АО «Молочный комбинат Ставропольский», г. Ставрополь. E-mail: ievdokimov@ncfu.ru

Information about authors

Metel Vladimir S. – Engineer of the Center for Biotechnological Engineering of NCFU, Institute of Living Systems, North-Caucasus Federal University, Stavropol. E-mail: metel@mokostav.com.

Kulikova Irina K. – PhD (Technical Sciences), Associate Professor, Department of Applied Biotechnology, Institute of Living Systems, North-Caucasian Federal University, Stavropol. E-mail: kik-st@yandex.ru

Anisimov Georgii S. – PhD (Technical Sciences), Director of the Center for Biotechnological Engineering at North Caucasian Federal University, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «North Caucasus Federal University», Stavropol. E-mail: ags82@mail.ru

Evdokimov Ivan A. – PhD (Technical Sciences), Professor, Head of the Basic Department of Technology of Milk and Dairy Products, FSAEI of HE «North Caucasus Federal University» at the Stavropol Dairy Plant JSC, Stavropol. E-mail: ievdokimov@ncfu.ru