РАЗДЕЛ XX. ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

Новгородский А.С., Хадыко И.А., Хорошев О.Ю., Терентьев К.Ю.
Первичный анализ пептидных профилей гидролизатов сывороточных белков
коровьего молока

САФУ имени М.В. Ломоносова
(Россия, Архангельск)

doi: 10.18411/lj-12-2018-183

idsp: ljjournal-12-2018-183

Аннотация

В данной работе представлены результаты первичного анализа гидролизатов сывороточных белков молока. Для этой цели были получены пептидные профили методом MALDI масс-спектрометрии. По результатам первичной оценки было установлено влияние интенсивности ферментативного гидролиза на молекулярно-массовое распределение получаемых смесей пептидов и их разнообразие.

Ключевые слова: сывороточные белки молока, протеолизаты, пептидные профили.

Введение

Молочная сыворотка является ценным сырьем, содержащим высокопитательные сывороточные белки. Переработка сыворотки и вовлечение сывороточных белков в производство пищевых продуктов оправдано с точки зрения нутрициологии и экологии молокоперерабатывающих предприятий. Основные сывороточные белки α -лактальбумин и β -лактоглобулин являются распространенной причиной возникновения аллергических реакций. В свете этого перспективным является их переработка, снижающая аллергенность и придающая получаемому продукту новые свойства.

Наиболее эффективным методом глубокой переработки белков является их ферментативный гидролиз протеолитическими ферментами. Протеолиз белков молока является инструментом получения большого разнообразия пептидов, обладающих широким спектром биологических активностей: противогипертензивной [1], опиоидной [2], иммуномодулирующей [3], металлотранспортной [4], антиоксидантной [5] и другими [6]. Среди факторов, влияющих на состав и количество биологически активных пептидов, образующихся в процессе протеолиза, можно выделить различные варианты предварительной обработки [7], вид сырья [9] и тип ферментного препарата [10].

Целью данной работы была первичная оценка полученных пептидных профилей протеолизатов сывороточных белков коровьего молока.

Материалы и методы

Объектом исследования в данной работе стали образцы гидролизатов сывороточных белков коровьего молока (образцы А и Б), полученные смесью протеолитических препаратов. Образцы отличались различной степенью гидролитического воздействия.

Содержание белка в гидролизатах проводили по методу Кьельдаля [11] с использованием эмпирического коэффициента для пересчета азота на белок равного 6,38. Данные использовались для корректного подбора нагрузки по белку на дорожку при гель-электрофорезе.

Для предварительного фракционирования пептидов ферментативных гидролизатов и исследования их молекулярно-массового состава была использована классическая методика денатурирующего гель-электрофореза [12]. Для получения масс-спектров протеолизатов использовали времяпролетный гибридный MALDI масс-спектрометр

Axima Resonance. Навески образцов массой 1 мг помещали в пробирки Эппендорфа, растворяли в 1 мл воды с добавлением 0,1 % TFA. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту. Навеску матрицы в количестве 20 мг помещали в пробирку Эппендорфа и растворяли в 1 мл смеси вода:метанол (9:1). На стальную мишень для MALDI наносили 0,5 мкл матрицы, сверху наносили 0,5 мкл образца и высушивали на воздухе. Масс-спектры записывали в режиме регистрации положительных ионов в рефлектронном режиме. Диапазон записи масс-спектров соответствовал m/z 1000 – 5000. В качестве источника излучения использовали азотный УФ-лазер с длиной волны 337 нм, энергия лазерного излучения составила 70-100 отн. ед. Массовую шкалу прибора калибровали непосредственно перед записью масс-спектров исследуемых образцов с использованием стандартной калибровочной смеси пептидов TOFMix 8.

Расчет теоретических масс пептидов проводился по данным точных атомных масс элементов, представленных в работе Лебедев А.Т. и др. [13]. На основе аминокислотной последовательности сывороточных белков, полученных в базе UniProt (www.uniprot.org) рассчитывали массы всех возможных вариантов пептидов, имеющих в составе от 2 до 20 аминокислотных остатков в составе с рядом допущений.

Результаты и обсуждение

В данной работе использовали классический метод разделения белков на образцах сывороточных гидролизатов. Для первичной оценки использовали 20 %-ный гель и стандартные параметры разделения для белков. Электрофореграмма представлена на рисунке 1.

Рисунок 1 – Электрофореграмма гидролизатов сывороточных белков

На электрофореграмме видно, что в сывороточном гидролизате отсутствуют характерные для сыворотки белки молока (треки с массами 14,2 кДа (α -лактальбумин), 18,3 кДа (β -лактоглобулин), 66 кДа (бычий сывороточный альбумин) и 80 кДа (лактоферрин)). Это свидетельствует об их ферментативном гидролизе до более низкомолекулярных пептидов с массами менее 12-13 кДа.

Было установлено, что продукты гидролиза характеризуются молекулярной массой менее 12-13 кДа. Однако, судя по результату, классический метод

денатурирующего электрофореза не применим к разделению подобных низкомолекулярных пептидных смесей, для этой цели стоит использовать модификации классической методики, адаптированные для идентификации средне- и низкомолекулярных пептидов [14].

Был проведен первичный анализ масс-спектров образцов в диапазоне 1000...5000 m/z. Было установлено, что в диапазоне 3000...5000 нет пиков, имеющих интенсивность существенно превышающую фоновые значения.

Сравнение пептидных спектров двух гидролизатов проводили на основании числовых значений пиков, обнаруженных на спектрах. Для сравнения использовали статистический показатель количества пиков в диапазоне от 1000 до 2800 m/z. Гистограммы сравнения представлены на рисунке 2.

Сравнение гистограмм позволило установить, что гидролизат А содержит значительно меньше пептидов с молекулярной массой более 1600 Да. При этом пептиды с молекулярной массой от 2100 до 2500 Да практически полностью отсутствуют. Снижение количества пептидов практически во всех диапазонах масс в гидролизате А в сравнении с гидролизатом Б объясняется их ферментативным гидролизом при повышении интенсивности процесса. При этом ожидается накопление низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот в диапазоне масс менее 1000 Да. Подобная закономерность согласуется с данными, описанными в статье Cristine Fialho Lopes D и др. [8].

Метод MALDI часто используется в анализе пептидов молочных гидролизатов. При этом подходы, используемые для анализа, различны. В данной работе был применен подход идентификации пептидов, использованный в статьях O'Keeffe M.B. и Zeese M. [15, 16]. Он заключался в идентификации пептидов по их молекулярной массе, установленной на основании масс-спектров, при сравнении с теоретически рассчитанной массой пептидов.

Рисунок 2 – Гистограммы распределения пиков на масс-спектрах гидролизатов

Основными белками молочной сыворотки являются α -лактоальбумин (α -ла) и β -лактоглобулин (β -лг) (в сумме 85 % от всех белков молочной сыворотки), поэтому расчет теоретически образующихся пептидов осуществляли именно для двух этих белков. На основе первичной аминокислотной последовательности белков были рассчитаны все массы возможных образующихся пептидов длиной от 2 до 20 аминокислот (теоретические). Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика пептидных фракций

Количество аминокислот в пептиде	Количество возможных пептидов (теоретическое)		Диапазон масс пептидов, Да	
	α -ла	β -лг	α -ла	β -лг
2	141	177	132,0429...367,1427	146,0586...367,1427
3	140	176	231,1114...481,1856	245,1270...468,1903
4	139	175	318,1434...595,0263	345,1543...600,3164
5	138	174	431,2275...708,1104	448,1635...715,3434
6	137	173	528,2802...817,3864	534,2367...828,4274
7	136	172	651,3123...930,4705	647,3207...973,5530
8	135	171	748,3650...1063,0685	718,3578...1088,5799
9	134	170	876,4599...1176,1525	831,4419...1207,6026
10	133	169	989,5440...1294,1725	917,4535...1336,6452
11	132	168	1104,5709...1409,1995	1030,5376...1451,6722
12	131	167	1232,6658...1525,2799	1143,6217...1565,7151
13	130	166	1345,7499...1652,2850	1243,4467...1667,7468
14	129	165	1467,6599...1766,3279	1344,4944...1781,7898
15	128	164	1581,6752...1879,4120	1457,5785...1894,8738
16	127	163	1708,8389...2000,4396	1560,4963...1993,9422
17	126	162	1776,8036...2114,4965	1663,5596...2107,0263
18	125	161	1939,8670...2228,5394	1760,6124...2220,1467
19	124	160	1996,8884...2335,1023	1873,6964...2334,1896
20	123	159	2124,9833...2463,1972	2002,8416...2463,2322
Итого:	2508	3192	132,0429...2463,1972	146,0586...2463,2322

Далее из всех теоретических вариантов выбирались пептиды, чья масса соответствует пикам спектров, полученных экспериментально. Допуск на расхождение между теоретической и экспериментальной массой пептидного фрагмента был принят равным 0,5 Да. Идентификация основных пептидов сывороточных гидролизатов на основании их молекулярных масс, установленных по масс-спектрам, позволила предположить структуры соответствующих им аминокислотных последовательностей пептидов, образовавшихся при гидролизе основных сывороточных белков молока – α -лактоальбумина и β -лактоглобулина. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Количество теоретически рассчитанных пептидов, соответствующее пикам масс-спектров

Сывороточный белок	Количество пептидов в гидролизате:	
	А	Б
α -лактоальбумин	26	87
β -лактоглобулин	47	104

Для гидролизата А предложена структура 73 пептидов, а для гидролизата Б – 191 пептидов, соответствующих массам пиков масс-спектров. Таким образом, показано, что увеличение интенсивности гидролиза увеличивает количество возможных вариантов образующихся пептидов.

Для уточнения строения предложенных пептидов, соответствующих конкретным пикам, в дальнейшем можно использовать метод получения масс-спектров второго порядка (MS²). По фрагментации молекулярного иона возможно определить, какие аминокислоты входят в его состав, тем самым подтвердив или отклонив

предложенный вариант первичной структуры. Данный подход трудоемок, поэтому может быть рекомендован для проверки пиков, соответствующих пептидам с предполагаемой биологической активностью.

Заключение

В работе показано, что для электрофоретического разделения компонентов гидролизатов сывороточных белков необходимо использовать модифицированные методики, адаптированные для низкомолекулярных пептидных фракций. Показано, что увеличение интенсивности протеолиза снижает среднюю молекулярную массу пептидов в гидролизатах. Анализ пептидов сывороточных гидролизатов на основании их молекулярно-массовых характеристик, установленных по масс-спектрам, позволил предположить структуры пептидов, образовавшихся при гидролизе основных сывороточных белков α -лактоальбумина и β -лактоглобулина. Для частичного гидролизата предложена структура 73 пептидов, а для глубокого – 191 пептида.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России и гранта «Молочная сыворотка как сырье для производства продуктов лечебно-профилактического и функционального питания» № 09-2018-04а (заказчик Министерство образования и науки Архангельской области, рег. номер договора 01-16/535 от 24.04.2018) с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» (САФУ).

1. Seppo L. et al. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects // The American journal of clinical nutrition. – 2003. – Т. 77. – №. 2. – С. 326-330.
 2. Chiba H., Yoshikawa M. Biologically functional peptides from food proteins: new opioid peptides from milk proteins. – 1986.
 3. Gill H. S. et al. Immunoregulatory peptides in bovine milk // British Journal of Nutrition. – 2000. – Т. 84. – №. S1. – С. 111-117.
 4. Kamau S. M. et al. Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins // Food Reviews International. – 2010. – Т. 26. – №. 4. – С. 386-401.
 5. Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins // International Dairy Journal. – 2006. – Т. 16. – №. 11. – С. 1306-1314.
 6. Sánchez A., Vázquez A. Bioactive peptides: A review // Food Quality and Safety. – 2017. – Т. 1. – №. 1. – С. 29-46.
 7. Adjonu R. et al. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: influence of heat pre-treatment and enzyme specificity // Food Chemistry. – 2013. – Т. 136. – №. 3-4. – С. 1435-1443.
 8. Cristine Fialho Lopes D., Meneghello Delvivo F., Pinto Coelho Silvestre M. Hydrolysates of skim milk: Peptide profiles using two proteolytic enzymes // British Food Journal. – 2005. – Т. 107. – №. 1. – С. 42-53.
 9. Mohanty D. P. et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health—A review // Saudi journal of biological sciences. – 2016. – Т. 23. – №. 5. – С. 577-583.
 10. Mullally M. M. et al. Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolyzate characteristics // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1994. – Т. 42. – №. 12. – С. 2973-2981.
 11. Попова Г.И., Чуркина Ю.В. Лабораторный практикум по биохимии. – Архангельск: Изд-во АГТУ, 2005. – 68 с.
 12. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature, 1970. - vol. 227. - № 5259. - P.680-685.
 13. Лебедев А. Т., Артеменко К. А., Самгина Т. Ю. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов // М.: Техносфера. – 2012. – 13
 14. Haider S. R., Reid H. J., Sharp B. L. Tricine-SDS-PAGE // Protein Electrophoresis. – Humana Press, Totowa, NJ, 2012. – С. 81-91.
 15. O’Keeffe M. B., FitzGerald R. J. Identification of short peptide sequences in complex milk protein hydrolysates // Food chemistry. – 2015. – Т. 184. – С. 140-146.
 16. Zeece M., Huppertz T., Kelly A. Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of β -lactoglobulin // Innovative food science & emerging technologies. – 2008. – Т. 9. – №. 1. – С. 62-69.
-