

И.С. Разумникова, О.В. Козлова, А.В. Дороганова, Г.А. Аветисян

ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПОДХОД К СОЗДАНИЮ ПРОДУКТОВ СПЕЦИАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ И ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ*

Биологически активные пептиды в настоящее время находят широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности. Особое внимание уделяется получению пептидов из гидролизатов белков, а также фракции определенных тканевых структур. Изучение таких пептидов позволило выделить определенные закономерности в их аминокислотной последовательности. На основании таких закономерностей были получены биологически активные пептиды из белков молока, направленные на снижение артериального давления при гипертонической болезни и хронической сердечной недостаточности.

Биологически активные пептиды, гидролизат, молочный белок, аминокислотная последовательность, гипертоническая болезнь, ферментные препараты, сердечная недостаточность, питание.

По данным Всероссийской организации здравоохранения, Россия занимает первое место в мире по смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Среди общей смертности в России сердечно-сосудистые заболевания составляют 57 %. В год от сердечно-сосудистых заболеваний в России умирают 1 миллион 300 тысяч человек. Доминирующими остаются ишемическая болезнь сердца и артериальная гипертония. Опасность повышенного артериального давления заключается в том, что часто, клинически никак не проявляясь, оно приводит к развитию ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности, мозгового инсульта, к нарушению работы почек и других органов [1].

Безусловно, большую роль в высокой смертности населения играет профилактика и лечение заболеваний сердца. В связи с вышеизложенным особую актуальность приобретает разработка технологии препаратов и продуктов специального назначения для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Особая роль принадлежит созданию лечебных и специализированных продуктов питания на основе растительного и животного сырья.

В питании такие продукты предназначены для систематического употребления в составе пищевых рационов, сохраняющих и укрепляющих здоровье за счет наличия в их составе веществ, обладающих способностью оказывать благоприятный эффект на физиологические функции и процессы обмена веществ в организме. Кроме того, специализированные и лечебные продукты играют важную роль в предотвращении возникновения различных заболеваний и укреплении здоровья. Правильно организованное питание с включением специализированных и лечебных продуктов способствует повышению защитных свойств организма, активизирует течение анаболических процессов, что в конечном итоге ведет к укреплению здоровья [2].

В России рынок продуктов, разработанных для снижения риска возникновения гипертонических болезней, находится в настоящее время в зачаточном состоянии. Тем не менее следует отметить появление на рынке таких продуктов, как специализированные продукты питания и биологически активные добавки, обогащенные пептидами и отдельными аминокислотами, жирными кислотами, кисломолочные продукты, полученные с использованием специально подобранных штаммов молочнокислых бактерий [1]. При этом значительно повысился интерес к структуре и функциям низкомолекулярных пептидов, полученных в результате направленного ферментативного гидролиза полноценных белков молока, выполняющих в организме ряд специфических биологических функций.

За последние десятилетия было обнаружено особенно много биологически активных пептидов, которые либо присутствуют в продуктах непосредственно, либо могут быть выделены из содержащихся в этих продуктах белков в ходе энзиматического (ферментативного) или химического (кислотного) гидролиза. В процессе естественной обработки пищевых белков в пищеварительном тракте (а в случае предварительной ферментации и до этого) такие пептиды высвобождаются из структуры белков и начинают действовать как самостоятельные регуляторные единицы, обладающие активностью, сходной с гормональной. На сегодняшний день выделено уже значительное количество подобных пептидов, обладающих широким спектром биологических функций [1, 3].

Механизм биологического действия пептидов в организме человека можно описать следующим образом. Известно, что уровень артериального давления зависит от многих факторов, среди которых особая роль принадлежит ренин-ангиотензиновой и кинин-калликреиновой системам. Конвертируя де-

* Исследования выполнены в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы. Мероприятие 1.5 «Проведение научных исследований коллективами под руководством приглашенных исследователей».

капептид ангиотензин I в являющийся мощным вазоконстриктором октапептидангиотензин II, ангиотензинконвертирующий фермент (АКФ) повышает давление в кровеносных сосудах. Поэтому подавление активности АКФ имеет антигипертензивный эффект. Антигипертензивные пептиды могут быть выделены из казеинов (казеокинины) и белков сыворотки (лактокинины). К первым, в частности, относятся сс51-казокинин-5 (Фен-Фен-Вал-Ала-Про) и β-казокинин-7 (Ала-Вал-Про-Тир-Гли-Арг), а ко вторым – α- и β-лакторифин (Тир-Гли-Лей-Фен и Ала-Лей-Фен-Мет-Гис-Иле-Арг соответственно) [1, 5].

Включение в пищевой рацион специализированных продуктов, обогащенных молочными (сывороточными) пептидами, которые блокируют превращение неактивного пептида – ангиотензин I в активное соединение – ангиотензин II, является эффективным и безопасным способом снижения артериального давления. Окись азота активирует фермент гуанилатциклазу, в результате чего образуется циклический гуанозинмонофосфат, который и обладает способностью расширять гладкомышечные клетки сосудов [1]. Обогащение пищевых продуктов функциональными сывороточными казоплателинами, оказывающими антитромботическое действие, снижает риск развития осложнений у лиц, страдающих гипертонией и гиперхолестеринемией [6].

Одним из важнейших источников биологически активных пептидов является молоко и молочные продукты. В то же время подобные пептиды могут быть выделены из таких разнообразных пищевых продуктов, как яйцо, рыба, моллюски, злаки (рис, пшеница, гречиха, ячмень и кукуруза), соевые бобы и редис. Содержащиеся в молоке функциональные белки обладают широчайшим спектром биологической активности. Биологически активные пептиды находятся в составе как казеина (αs, β, κ и κ-казеина), так и белков сыворотки (α-лактальбумина, β-лактоглобулина, лактоферрина и иммуноглобулинов) [4].

Технология выделения пептидов из природных продуктов имеет решающее значение. В зависимости от физико-химических параметров гидролиза полученные пептиды могут иметь как разную структуру, так, соответственно, и разные биологические свойства. При получении

гидролизатов в пищевой промышленности наиболее широко используют ферментативный способ.

Гидролизу могут подвергаться как казеин, так и белки сыворотки коровьего молока. Сывороточные белки по своей биологической ценности превосходят казеины прежде всего за счет более высокого содержания незаменимых аминокислот цистеина и триптофана, поэтому сывороточные гидролизаты принято считать более физиологичными, чем казеиновые. Однако казеины можно гидролизовать до более мелких пептидов, что делает их более эффективными в диетотерапии тяжелых случаев пищевой аллергии [7, 8]. Гидролизаты казеина используют в основном как ингредиенты детского и специализированного питания. Известны различные виды гидролизатов казеина и способы их получения.

Для получения максимально эффективных результатов в отношении типа гидролизата казеина и методов его получения наибольшее значение имеют четыре следующих фактора: величина ДН (степень гидролиза), которая ведет к образованию более коротких пептидов в продукте, а следовательно, к низкой аллергентности; низкое содержание свободных аминокислот, определяющих низкую осмолетическую характеристику, что считается предпочтительным, если продукт вводят в пищевые продукты; снижение горечи; высокий выход.

Препараты гидролизатов белков, полученные путем ферментативного гидролиза, компенсируют белковое голодание и обеспечивают азотистое равновесие организма у больных после операций желудочно-кишечного тракта, при тяжелых ожогах и т.д. Разработка технологий гидролизатов молочных белков приобретает особую актуальность в связи с недостатком белковых препаратов и их гидролизатов повышенной биологической ценности, а также продуктов энтерального питания и специализированных заменителей женского молока, получаемых на их основе [8].

Выделяемые из α-, β- и κ-казеина и лактоферрина пептиды (такие как β-казокинины, казоморфины (казеоморфины), экзорфин α-казеина, казеинофосфопептиды и лактоферрицин) демонстрируют антигипертензивные свойства, антимикробную, антитромботическую активность (табл. 1) [9].

Таблица 1

Примеры биологически активных пептидов, полученных из гидролизатов казеина

Система организма	Физиологическая функция	Источник получения пептидов	Фрагмент	Последовательность аминокислот в пептидах
Сердечно-сосудистая система	Антигипертензивная	αs1-казеин	144–151	Asp-Ala-Tyr-Pro-Ser-Gly-Ala-Trp
		αs1-казеин	129–134	Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro
		αs1-казеин	181–186	Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp
	Антиоксидантная	κ-казеин	117–127	Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met
	Антитромботическая	κ-казеин	106–116	Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys
	Гипохолестеринемическая	β-казеин	99–101	Val-Pro-Pro
κ-казеин		129–131	Ile-Pro-Pro	

* Исследования выполнены в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы. Мероприятие 1.5 «Проведение научных исследований коллективами под руководством приглашенных исследователей».

Настоящее исследование направлено на разработку технологии выделения биологически активных пептидов из белков молока в связи с созданием продуктов специального назначения для профилактики гипертонической болезни и хронической сердечной недостаточности.

При проведении исследований в качестве биологической системы была выбрана одна из белков молока β -казеин, который является доступным и ценным в биологическом отношении источником белка, а также наиболее адаптирован к физиологическим особенностям организма по сравнению с другими белками. Известно, что казеины в отличие от некоторых глобулярных белков хорошо расщепляются протеиназами в нативном состоянии, поскольку имеют малоупорядоченную конформацию, подобную дезорганизованной структуре денатурированных глобулярных белков. Это объясняется очень низким содержанием α -спиралей и низкой структурной организацией основных компонентов казеина, что обусловлено высоким содержанием пролина в этих белках – от 8,5 до 16 %, а это, в свою очередь, деформирует его в беспорядочный клубок [10].

Для целенаправленного проведения ферментативного гидролиза белка была подобрана энзиматическая система, состоящая из ферментного препарата химотрипсина, которая обеспечивает разделение полипептидной цепи на более короткие пептиды, и проведена очистка полученного пептида с необходимой аминокислотной последовательностью.

β -казеин в соответствующем буфере (рН от 7 до 10) был подвергнут гидролизу химотрипсином при температуре 37 °С с использованием соотношения фермент-субстрата 1:100, 1:50 и 1:25. Пробы отбирались через 0,5; 1; 2; 4; 8; 24 и 48 ч после начала реакции, затем подкисляли для остановки реакции. С увеличением продолжительности гидролиза происходило накопление общего и аминного азота (об этом можно судить по степени гидролиза), характеризующих степень расщепления белка. При этом величина рН реакционной смеси практически не изменялась на протяжении всего процесса и находилась в пределах оптимальной работы комплекса ферментов, что позволяло не проводить рН-стагирование путем добавления щелочи. В результате в гидролизате не накапливаются катионы натрия или калия, что облегчает его использование в составе

специализированных продуктов, требования к минеральному составу которых являются весьма жесткими.

Образующиеся в результате протеолиза пептиды анализировались с использованием жидкостной хроматографии высокого давления на обращенной фазе (ЖХВД) на базе Новосибирского института органической химии СО РАН. Такая методика разделения позволяет пропускать поток жидкости через колонку, заполненную пористыми частицами, имеющими четко определенный диаметр пор. Пептиды были разделены на колонке Nucleosil C18 (4.6 mm x 25 cm, SFCC, France) с линейным градиентом растворителя А (0,11 % трифторуксусной кислоты) к 100 % растворителя В (60 % ацетонитрил, 40 % H₂O, 0,09 % трифторуксусной кислоты) за 62,5 мин.

Пример хроматограммы гидролизата β -казеина представлен на рис. 1.

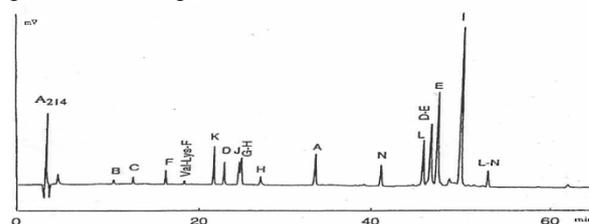


Рис. 1. Обращеннофазная ЖХВД трипсинового гидролизата β -казеина (расположение образующихся пептидов в аминокислотной последовательности β -казеина показано латинскими буквами)

Исследование аминокислотной последовательности пептидов осуществлялось масспектрометрическим методом организацией «Постгеномные и нанобиотехнологические инновации» (CYSC «PYNNY»). В конечных гидролизатах были найдены следующие 12 моноблочных пептидов: А (Arg1-Arg25), В (Ile26-Lys28), С (Lys29-Lys32), D (Phe33-Lys48), Е (Ile49-Lys97), F (Glu100-Lys105), H (Glu108-Lys113), I (Tyr114-Lys169), J (Val 170-Lys176), K (Ala177-Arg183), L (Asp184-Arg202), N (Gly203-Val209); четыре диблочных пептида: D-E (Phe33-Lys97), G-H (His106-Lys113), Val-Lys-F (Val98-Lys105), L-N (Asp184-Val209) и один триблочный пептид G-H-I (His106-Lys169). Образование пептидов А и L-N определяется гидролизом связей Arg-X (Arg25-Ile26 и Arg183-Asp184). Образование пептидов D, E, H, C, F, I, J определяется гидролизом связей Lys-X.

* Исследования выполнены в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы. Мероприятие 1.5 «Проведение научных исследований коллективами под руководством приглашенных исследователей».

1 H.Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-
 25 **B** **C** **D**
 Arg-↓-Ile-Asn-Lys-↓-Lys-↓-Ile-Glu-Lys-↓-Phe-Gln-SerP-Glu-Glu-Gln-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-Asp-
 48 **E**
 Lys-↓-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-
 73
 Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-↓-
 98 **F** **G** **H**
 Val-Lys-↓-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys-↓-His-Lys-↓-Glu-Met-Pro-Phe-Pro-Lys-↓-Tyr-Pro-Val-Glu-Pro-Phe-Thr-
 121 **I**
 Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Val-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro-Leu-Leu-Gln-Ser-Trp-Met-His-
 146
 Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Thr-Val-Met-Phe-Pro-Pro-Gln-Ser-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-↓-Val-
 171 **J** **K** **L**
 Leu-Pro-Val-Pro-Gln-Lys-↓-Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg-↓-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln-
 195 **N** 209
 Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-↓-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val.OH

Аминокислотная последовательность полученных фрагментов представлена в табл. 2.

Таблица 2

Характеристика пептидов, образовавшихся в результате гидролиза β-казеина с использованием химотрипсина

Расположение образующихся пептидов	Молекулярная масса, Да	Порядок расположения в полипептидной цепи	Аминокислотная последовательность
A	3803,00	1–25	RELEELNVPEIVESLSSEESITR
B	615,12	26–28	INK
C	390,19	29–32	IEK
D	1463,61	33–48	FQSEEQQTEDELQDK
E	4451,27	49–97	IHPFAQTQSLVYFPFGPIHNSLPQ NIPPLTPVVVPPFLQPEVMGVSK
F	664,42	100–105	EAMAPK
G	233,15	106–107	HK
H	690,33	108–113	EMPFPK
I	5172,72	114–169	YPVEPFTEQSLLTLDVENLHLP LPLLQSWMHQPHQLPPVVMFP PQSVLSLSQSK
J	589,43	170–176	VLPVPQK
K	687,43	177–183	AVPYPQR
L	2107,23	184–202	DMPILYQEPVLGPVR
N	585,32	203–209	GPFPIIV

При прохождении пептидов с различным размером молекул через колонку мелкие пептиды проходят через поры, в то время как пептиды более крупного размера задерживаются на сорбенте. В результате пептиды в растворе распределяются по размеру молекул (по молекулярному весу), так как более крупные пептиды быстрее вымываются из колонки, чем пептиды более мелкого размера. Установленный на выходе из колонки детектор производит постоянные измерения выходящего потока. Хроматографическая система калибрована при использовании пептидов с известным молекулярным весом.

Инактивацию ферментов можно проводить за счет снижения значения pH, предпочтительно около 4,5, в результате чего конечный продукт становится непосредственно приемлемым для применения в качестве добавки, или за счет повышения температуры. При проведении инактивации за счет снижения значения pH было установлено, что обработка углем не обязательна для улучшения органолептических свойств продукта.

Из литературных источников известно, что пептид с аминокислотной последовательностью Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg обладает антигипертензивной активностью [11, 12]. В результате исследований была получена аминокислотная последовательность из β-казеина молока, полностью совпадающая с ранее изученным пептидом. Таким образом, полученный пептид с заданной аминокислотной последовательностью представляет интерес для использования в производстве продуктов специализированного питания.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение биологического действия полученного пептида.

В настоящее время молочные белки рассматриваются как перспективное сырье для пищевой и фармацевтической промышленности. Биологически активные пептиды, полученные из молочных белков, обладают уникальными профилактическими и лечебными свойствами. В связи с этим молоко может рассматриваться как один из самых перспективных функциональных пищевых продуктов для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний, укрепления здоровья и увеличения продолжительности жизни.

Список литературы

1. Трифонов, С.В. Ресурсное обеспечение профилактики и лечения артериальной гипертензии в Российской Федерации / С.В. Трифонов // Экономика здравоохранения. – 2001. – № 11–12.
2. Нилов, Д.Ю. Современное состояние и тенденции развития рынка функциональных продуктов питания и пищевых добавок / Д.Ю. Нилов, Т.Э. Некрасова // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. – 2005. – № 2. – С. 28–29.
3. Тутельян, В.А. От концепции государственной политики в области здорового питания населения России к национальной программе здорового питания / В.А. Тутельян, А.В. Шабров, Е.И. Ткаченко // Клиническое питание. – 2004. – № 2. – С. 2–4.
4. Рогов, И.А. Химия пищи: белки: структура, функции, роль в питании. В 2 кн. Кн. 1 / И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Н.И. Дунченко, Н.А. Жеребцов. – М.: Колос, 2000. – 384 с.
5. Анисимов, С.В. Продукты питания как источник биологически активных белков и пептидов // Косметика и медицина. – 2007. – № 3. – С. 5–11.
6. Тутельян, В.А. Физиологическая роль коротких пептидов в питании / В.А. Тутельян, В.Х. Хавинсон, В.В. Малинин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 135. – № 1.
7. Круглик, В.И. Исследование кинетики ферментативного гидролиза нативных молочных белков // Сыроделие и маслоделие. – 2007. – № 5. – С. 35–36.
8. Крашенинин, П.Ф. Сухие концентраты и гидролизаты молочных белков / П.Ф. Крашенинин, Г.Ю. Сажин, В.И. Круглик // Молочная промышленность. – 1993. – № 3. – С. 4.
9. Bouhallab, S. Biopeptides of milk: Caseinophosphopeptides and mineral bioavailability / S. Bouhallab, D. Bougler // *Reproduction, Nutrition & Development*. – 2004. – V. 44. – P. 493–498.
10. Черников, М.П. Протеолиз и биологическая ценность белков. Казеины как собственно пищевые белки. – М.: Медицина, 1975. – 231 с.
11. Dziuba, M. Milk proteins as precursors of bioactive peptides / M. Dziuba, B. Dziuba, A. Iwaniak // *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* – 2009. – V. 8 (1). – P. 71–90.
12. Korhonen, H. Bioactive peptides: Production and functionality / H. Korhonen, A. Pihlanto // *International Dairy Journal*. – 2006. – V. 16. – P. 945–960.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40

SUMMARY

I.S. Razumnikova, O.V. Kozlova, A.V. Doroganova, G.A. Avetisyan

The perspective approach to development of foods of special purposes for prevention of hypertensive illness and chronic heart insufficiency

Biologically active peptides are widely used in food industry and a pharmaceutical industry. Special attention is given to obtaining of peptides, from hydrolysis of proteins, or from peptide fraction of certain fibre structures. Studying of such peptides has allowed to allocate certain laws in their aminoacid sequences. On the basis of such laws biologically active peptides from milk proteins directed on decrease in arterial pressure at hypertensive illness and chronic heart insufficiency have been received.

Biologically active peptides, hydrolysed, milk proteins, aminoacid sequences, hypertensive illness, fermental preparations, heart insufficiency, nutrition.