УДК 616.12-008.331.1-085:577.175.821.85]-092.4

В. Г. Юкало, Б. Л. Луговий

Утворення антигіпертензивних пептидів при протеолізі β–казеїну

В эксперименте установлено образование антигипертензивных олигопептидов, действующих как ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ). Пептиды получены при моделировании протеолиза β-казеина с использованием биомассы протеолитически активных лактококков Lactococcus lactis ssp. lactis, а также при комбинированном протеолизе β-казеина биомассой лактококков с пепсином или фромазой. Максимальный ингибиторный эффект на АПФ показал пептидное вещество, полученное при протеолизе β-казеина биомассой лактококков с пепсином. Таким образом, физиологически активные пептиды с антигипертензивным эффектом могут образовываться непосредственно в молочных продуктах под воздействием протеолитических ферментов молочнокислых бактерий и молокосвёртывающих препаратов.

Вступ

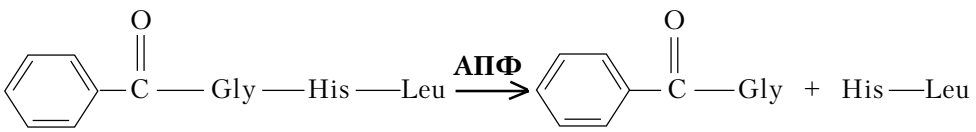
Регуляція активності ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) за допомогою його інгібіторів — ефективний засіб при боротьбі з артеріальною гіпертензією. АПФ відіграє важливу роль у підвищенні тиску крові у резистивних судинах, оскільки є важливим компонентом ренін-ангіотензивної системи. При дії АПФ на декапептид ангіотензин-І відбувається відщеплення гістидиллейцину з С-термінального кінця і утворення пресорного октапептиду ангіотензину-ІІ, який має сильний вазоконстрикторний ефект [21]. Крім цього, у кінін-калікреїновій системі АПФ інактивує брадикінін, якому властива вазодилататорна дія [10]. Такі інгібітори АПФ, як каптоприл [14] нині успішно використовуються для лікування артеріальної гіпертензії [2]. Серед природних пептидів уперше виявив інгібіторний ефект на АПФ пентапептидний компонент отрути змій *Bothrops jararaca* [11]. Застосування протеолітичних ферментів дозволило виділити та ідентифікувати деякі АПФ-інгібіторні пептиди з харчових білків [7, 22, 24]. Результати використання пепсину, трипсину та інших травних ферментів свідчать, що білки казеїнового комплексу молока і, зокрема, β-казеїн, є попередниками фізіологічно активних пептидів, які можуть утворюватись *in vivo* в процесі травлення протеазами шлунково-кишкового тракту. Ці пептиди мають різні властивості, а саме: антигіпертензивний ефект, за що їх було названо «казокініни» [17], опіоїдну активність — «казоморфіни» [8], імуномодуляторні [18], антиканцерогенні [13] тощо. Припущення про можливість утворення фізіологічно активних пептидів при протеолізі білків казеїнового комплексу під дією ферментних систем молочнокислих бактерій і молокозгортальних препаратів, тобто у кисломолочних продуктах ще до потраплення їх у шлунково-кишковий тракт було висунуто нами раніше [5].

© В. Г. Юкало, Б. Л. Луговий

Метою цієї роботи було визначення антигіпертензивної активності в пептидних фракціях, отриманих при модельному протеолізі β-казеїну, у якому відтворено умови молочнокислого процесу, використано протеолітичноактивний штам лактококів l_{12} *Lactococcus lactis ssp.lactis* та протеолітичні препарати — пепсин і фромаза, які використовуються у виробництві сирів.

Методика

Для протеолізу використовували гомогенний електрофоретичночистий препарат β-казеїну, отриманий за допомогою розробленого нами попередньо методу диференційного фракціювання казеїну за допомогою сечовини та доочистки отриманого препарату використанням іонообмінної хроматографії на колонках з ДЕАЕ-целюлозою [4]. Для роботи використовували протеолітичноактивний штам лактококів l_{12} *Lactococcus lactis subsp. lactis*, якому властиві високі фізіологічні показники. [1]. Як протеолітичні препарати ми використовували вітчизняний свинячий пепсин (700 Од/г) та фромазу (Fromase 2200 TL, фірма «Gist Brocades», Франція). Протеоліз 1%-го розчину β-казеїну в ацетатному буфері з pH 5,5 здійснювали додаванням 7% біомаси лактококів при їх концентрації 10^{10} клітин/мл протягом 54 год при 30 °С. Через 3 год від початку інкубації у середовище вносили лізоцим (яєчний курячий, ЕС 3.2.1.17., фірма «Sigma», США), концентрація якого становила 0,008%. Після цього через 2 год реакційну суміш асептично розділяли на три зразки, рівні за об'ємом. До одного з них додавали 0,02% пепсину, до другого вносили 0,02% фромази, у третьому зразку продовжувався бактеріальний протеоліз β-казеїну. Як антисептик використовували 0,05 мл толуолу, який вносили до кожного зразка. Для осадження клітинних фракцій лактококів зразки центрифугували при 10000g протягом 10 хв, супернатант заморожували і ліофільно висушували. Для отримання низькомолекулярних пептидних фракцій продуктів протеолізу β-казеїну ліофілізований препарат розчиняли у 0,01 моль/л фосфатному буфері і піддавали гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-25 Fine, фірми «Pharmacia», Швеція). Отримані низькомолекулярні пептидні фракції (молекулярна маса близько 5 тис. Да) заморожували і ліофілізували. Антигіпертензивний ефект пептидних фракцій визначали за їх впливом на активність АПФ за методом Cushman і Cheung [9] у модифікації Nakamura і співавт. [19]. Для реакції використовували АПФ (ЕС 3.4.15.1., з легень кроля (фірми «Sigma», США) та синтетичний субстрат гіпурил-L-гістидил-L-лейцин (Hip-His-Leu, фірми «Sigma», США). При цьому реакція має наступний вигляд:



Гіпурил-L-гістодил-L-лейцин Гіпурова кислота

Hip-His-Leu розчиняли в 0,1 моль/л натрій-боратному буфері з pH 8,3 при наявності 0,3 моль/л NaCl. Далі 200 мкл 5 ммоль/л розчину Hip-His-Leu змішували з 80 мкл 0,6% розчину пептидної речовини, ефект якої потрібно

встановити. Реакція починалася з моменту внесення 20 мкл розчину АПФ (0,1 Од /мл H_2O) до реакційної суміші, яка далі інкубувалась при 37°С протягом 30 хв, а зупинялася додаванням 250 мкл 1 моль/л HCl. Гіпурову кислоту, яка утворювалася під дією АПФ, екстрагували за допомогою 1,7 мл етилацетату і розчиняли в 1 мл дистильованої води після відділення етилацетату випаровуванням при 120°С протягом 20 хв. Екстинкцію гіпурату вимірювали за допомогою спектрофотометра СФ-46 при довжині хвилі 228 нм. Ступінь інгібіторної дії пептидів (I) був обчислений за формулою:

$$I = (B - A)/(B - C) \times 100,$$

де А — оптична густина при наявності АПФ і АПФ-інгібіторів, В — оптична густина без АПФ-інгібіторів, С — оптична густина без АПФ.

Результати та їх обговорення

Низькомолекулярні пептидні фракції, отримані в процесі модельного протеолізу β-казеїну показали антигіпертензивну активність *in vitro*, інгібуючи АПФ. Результати наведені у таблиці. Найвищий інгібіторний ефект був досягнутий при використанні олігопептидної речовини, одержаної при комбінованій дії протеазних систем біомаси штаму l_{12} *Lactococcus lactis ssp. lactis* та пепсину, який входить до складу багатьох молокозгортальних препаратів. При цьому pH середовища, у якому відбувався протеоліз відповідало діапазону активності пепсину, було 5,5 (втрата активності свинячого пепсину спостерігається при pH 6,6 [3]). Інший молокозгортальний препарат — фромаза, при синергічній дії з біомасою лактококів на β-казеїн, дозволив отримати низькомолекулярну речовину пептидів, дія яких має інгібіторний ефект на активність АПФ. Фромаза є мікробним препаратом, продуцентом якого є *Rhizmucor miehei* і нині використовується у молочній промисловості багатьох країн, а також України, зокрема фромаза типу TL, яка застосовувалася нами для модельного протеолізу, призначена для всіх видів сирів [3]. Засто-

Інгібіторний ефект низькомолекулярних пептидних препаратів, отриманих при протеолізі β-казеїну на активність ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) (M+m)

Компоненти зразка та модель протеолізу	Екстинкція гіпурової кислоти при довжині хвилі 228 нм, товщині шару 1 см	Інгібіторний ефект (*I*), %
Протеолітичні системи *L. lactis ssp. lactis* (A_1)	0,655±0,003	51,85
Зразок А1 без АПФ	0,525±0,002	
Протеолітичні системи *L. lactis ssp. lactis,* пепсин (A_2)	0,560±0,003	82,46
Зразок А2 без АПФ (C_2)	0,510±0,001	
Протеолітичні системи *L. lactis ssp. lactis*, фромаза (A_3)	0,580±0,004	67,19
Зразок А3 без АПФ (C_3)	0,475±0,001	
Реакція АПФ і Hip-His-Leu без β-казеїнових пептидів (В)	0,795±0,001	

Для обчислення (*I*) використовували середні значення зразків А, С, В.

сування протеолітичних речовин сумісно з біомасою лактококів стимулювало високу продукцію антигіпертензивних пептидів, проте використання для протеолізу β-казеїну лише біомаси штаму l_{12} *Lactococcus lactis ssp. lactis* дозволило отримати низькомолекулярну пептидну речовину, яка вже при концентрації 0,6% пригнічувала роботу АПФ більше, ніж наполовину (див. таблицю). Такий ефект свідчить про те, що утворення антигіпертензивних пептидів може відбуватися ще в процесі виготовлення та дозрівання кисломолочних продуктів, до складу яких входять закваски молочнокислих бактерій з високою протеолітичною активністю. Відомо, що багато фізіологічноактивних олігопептидів стійкі до дії пептидаз травної системи і потрапляючи з продуктом у шлунково-кишковий тракт можуть всмоктуватись у кров в активній формі [12]. Meisel, вивчаючи відомі нині казокініни встановив, що всі ці пептиди мають пролінові, лізинові чи аргінінові С-термінальні залишки, два останні, зокрема, мають позитивні заряди гуанідино- чи ε-аміногруп, які на думку автора, структурно схожі до брадикініну і можуть потенціювати інгібіторний ефект на активний центр АПФ [17]. Значення пролінових залишків у казокінінах може бути пов'язане з їх стійкістю до деградації травними ферментами [6]. Yamamoto провів скринінг антигіпертензивних пептидів, отриманих з харчових білків чи синтезованих за структурною аналогією і, стосовно β-казеїнових пептидів, наводить наступні амінокислотні послідовності, яким властива різною мірою АПФ-інгібіторна активність: AVPYPQR, KVLPVP, KVLPVPQ, VPP, IPP [23]. Результати перевірки низькомолекулярних пептидних фракцій, отриманих при модельному протеолізі β-казеїну лактококами та протеолітичними препаратами дозволяють припустити можливість існування у цих препаратах згаданих амінокислотних залишків. Для більш детального вивчення антигіпертензивного ефекту олігопептидних фракцій буде проводитися дослідження їх дії на тваринах, у яких змодельована реноваскулярна артеріальна гіпертензія.

Висновки

1. Протеоліз β-казеїну протеолітичноактивним штамом l_{12} *Lactococcus lactis ssp. lactis* дозволяє отримати низькомолекулярні пептидні речовини, яким властивий антигіпертензивний ефект, як інгібіторам ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ).

2. Найвищий інгібіторний ефект на АПФ спостерігається у пептидній фракції, отриманій при комбінованій дії протеолітичних систем лактококів і пепсину при протеолізі β-казеїну, високе пригнічення активності АПФ відбувається при використанні пептидних речовин, отриманих при модельному протеолізі β-казеїну лактококами і фромазою.

V. G. Yukalo, B. L. Luhovyy

THE GENERATION OF ANTIHYPERTENSIVE PEPTIDES FROM β-CASEIN AFTER MODELING PROTEOLYSIS

Antihypertensive peptides were obtained after the proteolysis of β-casein by starter cells *Lactococcus lactis ssp. lactis* and lactococci with pepsin or fromase. The peptides have shown the effect as inhibitors of angiotensin-converting enzyme.

The strongest action the peptide obtained after the proteolysis of β-casein by synergic action of lactococci with pepsin has shown. It demonstrates a capability of formation of such peptides directly in milk products during their making and maturation under the action of proteolytic system of lactic acid bacteria and milk clothing proteases.

Ivan Pului technical University, Ternopil

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Луговий Б.Л., Юкало В.Г.* Фізіологічні властивості промислових штамів лактококів // Вісник Терноп. держ. техніч. ун-ту. — 1997. — **2**, №2. — С.143-149.
2. *Несукай О.* Кардіопротекторні можливості інгібіторів АПФ // Медицина світу. — 1997. — **2**, №6. — С.303-304.
3. *Репелиус С.* Применение коагулянтов ферментативного происхождения в производстве сыра // Сыроделие. — 1999. — №3. — С.13-15.
4. *Юкало В.Г., Луговий Б.Л.* Характеристика методів препаративного виділення β-казеїну // Эксперим. та клін. фізіологія та біохімія. — 1998. — №3/4. — С.26-29.
5. *Юкало В.Г., Шуляк Т.Л.* Протеолиз казеинов ферментами молочнокислых стрептококков — В кн: Тез. докл. Всесоюз. конф. "Химические превращения пищевых полимеров". — Калининград. — 1991. — С.22.
6. *Adibi S.A., Kim Y.S.* Peptide absorption and hydrolysis. Phisiology of the gastrointestinal tract / Ed. L.R.Johnson. — New York: Raven Press, 1981. — P.1097-1099.
7. *Ariyoshi Y.* Angiotensin I-converting enzyme imhibitors derived from food proteins // Trends Food Sci. Technol. — 1993. — **4,** № 2. — P.139-144.
8. *Brantl V., Neubert K.* Opioid peptides derived from food proteins // Trends Pharmacol. Sci. — 1986. — **7**, № 2. — P.6-7.
9. *Cushman D.W., Cheung H.S.* Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung // Biochemical Pharmacology. — 1971. — **20**, № 12. — P.1637-1648.
10. *Erdos E.G.* Angiotensin I converting enzyme // Circulat. Res. — 1975. — **36**, №2. — P.247-255.
11. *Ferreira S.H., Barlet D.C., Green L.J.* Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* // Biochemistry. — 1970. — **9**, № 13. — P.2583-2593.
12. *Hara H., Funabiki R., Iwata M., Yamazaki K.* Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained condition // J. Nutr. — 1984. — **114**, №10. — P.1122-1129.
13. *Hosono A., Kashina T., Kada T.* Antimutagenic properties of lactic acid cultured milk on chemical and fecal mutagens // J. Dairy Science. — 1986. — **69,** №9. — P.2237-2242.
14. *Koike H., Ito K., Miyamoto M., H. Nishino* Effects of long-term blockade of angiotensin — converting enzyme with captopril (SQ14.225) on hemodynamics and circulating blood volume in SHR // Hypertension. — 1980. — **2**, №3. — P.299-303.
15. *Maruyama S., Mitachi H., Tanaka H., Tomizuka N., Syzuki H.* Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein // Agric. Biol. Chem. — 1987. — **51**, №6. — P.1581-1586.
16. *Maubois J.L., Léonil J.* Peptides du lait a activitй biologique // Lait. — 1989. — **69**, №4. — P.245-269.
17. *Meisel H.* Casokinins as bioactive peptides in the primary structure of casein / Food Proteins — Structure Functionality / Eds: Schwenke K.D., Mothes R. — New York: VCH Weinheim. — 1993. — P.67-75.

18. *Migliore-Samour D., Floc'h F., Jollus P.* Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation //J. Dairy Research.—1989. — **56**, №3. — P.357-362.
19. *Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K, Takano T.* Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I — converting enzyme //J. Dairy Sci. —1995. — **78**, №6. — P.1253-1257.
20. *Ondetti M.A., Rubin B., Cushman D.W.* Design of specific inhibitors of antihypertensive agents // Science. — 1977. — **196**, (April). — P.441-444.
21. *Skeggs L.T., J.E.Kahn, N.P.Shumway.* The preparation and function of the angiotensin-converting enzyme // J. Exp. Med. — 1956. — **103**. — P.295-299.
22. *Ukeda H., Matsuda H., Osajima K. et al.* Peptides from peptic hydrolyzate of heated sardine meat that inhibit angiotensin I converting enzyme //Nippon Nogeikagaku Kaishi. — 1992. — **66**, №1. — P.25-32.
23. *Yamamoto N.* Antihypertensive peptides derived from food proteins //Biopolymers. — 1997. — **43**, №2. — P.129-134.
24. *Yokoyama K., Chiba H., Yoshikawa M.* Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito //Biosci. Biotechnol. Biochem.— 1992. — **56**, № 10. — P.1541-1545.

Тернопол. техн. ун-т ім. Івана Пулюя
М-ва освіти України

Матеріал надійшов до редакції 6.04.2000