УДК 543.545.4: 547 96

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ТЕПЛОВОЙ ОБРАБОТКИ НА ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ КОРОВЬЕГО МОЛОКА

[1]Щербакова Ю.В., [2]Акулов А.Н., [1]Ахмадуллина Ф.Ю., [2]Каримова Ф.Г.

[1]ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», Казань, e-mail: balakirevajulia3@mail.ru;

[2]ФГБУН «Казанский институт биохимии и биофизики» Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, e-mail: akulov_anton@mail.ru

Проведены исследования по влиянию ряда промышленных режимов пастеризации (65 °C, 30 мин; 76 °C, 5 мин; 90 °C, 20 сек и 95 °C, 5 мин) на полипептидный состав коровьего молока. Для этого в работе применяли метод двумерного электрофореза (2DE) с последующей идентификацией ряда полипептидов (ПП). Оценка количества полипептидов нативного и пастеризованного при различных режимах молока, по данным 2DE, показала, что при всех режимах пастеризации степень деструкции нативных ПП достигает 15–27%. Для идентификации методом MALDI-TOF MS мы выбрали 3 ПП: два – сильно изменяющихся по содержанию и один, появляющийся при пастеризации молока. Из идентифицированных белков коровьего молока Chain A of Diferric Bovine Lactoferrin исчезает при всех исследованных режимах пастеризации, за исключением 76 °C, 5 мин. Нами было выявлено, что белок Chain A, Structure-Based Design Of Novel Pin1 Inhibitors (I), способный проявлять антиоксидантные свойства, появляется в молоке после его пастеризации, за исключением жесткого режима 65 °C, 30 мин., что может быть вызвано разрушением жировых глобул молока и выходом в плазму дополнительных ПП. Полученные результаты свидетельствуют о возможном повышении антиоксидантной активности молока при его пастеризации.

Ключевые слова: полипептиды молока, двумерный электрофорез, пастеризация

ELECTROPHORETIC RESEARCH OF INFLUENCE HEART TREATMENT TO COW MILK'S POLYPEPTIDES

[1]Scherbakova Y.V., [2]Akulov A.N., [1]Akhmadullina F.Y., [2]Karimova F.G.

[1]Kazan technological university, Kazan, e-mail: balakirevajulia3@mail.ru;

[2]Kazan institute biochemistry and biophysics of Kazan since centre Russian academy of since, Kazan, e-mail: akulov_anton@mail.ru

In the article there are dates about influence of some untrimmed pasteurization standards on cow milk's polypeptides. Main methods of studying were two-dimensional electrophoresis (2DE) and identification of some polypeptides. Degree of destruction intact milk's polypeptides was 15–27% during heat treatment according to the data of 2DE. For identification by MALDI-TOF MS we used 3 polypeptides of cow's milk: two – highly variable in content, one was appeared during pasteurization. Chain A of Diferric Bovine Lactoferrin disappeared during pasteurization expecting conditions of 76 °C, 5 min. Chain A, Structure-Based Design Of Novel Pin1 Inhibitors (I) appeared in the milk after pasteurization, expecting conditions of 65 °C, 30 min. It is able to show antioxidant properties and appear in the milk during pasteurization from fat globules. It defined that during pasteurization led to increasing of cow milk antioxidant activity.

Keywords: polypeptides of milk, two-dimensional electrophoresis, pasteurization

Основная причина патологических процессов в организме человека, вызывающих преждевременное старение и развитие многих болезней, избыточное накопление в организме активных форм кислорода (АФК). Защита клеток, тканей и других биоструктур от токсического действия АФК и органических свободных радикалов осуществляется антиоксидантами, под которыми понимают соединения различной химической природы, способные тормозить или устранять свободнорадикальное окисление органических веществ метаболитами молекулярного кислорода [11].

К настоящему времени проведенные исследования подтвердили высокую антиоксидантную активность молока [10], которая в большей степени обусловлена его белками, являющимися основными антиоксидантами специфического действия.

Однако молоко относится к скоропортящимся продуктам питания, что обусловливает его обязательную тепловую обработку на молочных заводах. Термолабильный характер полипептидов и их денатурация при термообработке должны способствовать изменению содержания свободных S-H связей в молоке и, как следствие, приводить к изменению интегральной антиоксидантной активности молока [8].

В связи с этим целью работы являлось исследование влияния наиболее распространенных промышленных режимов пастеризации молока (65 °C, 30 мин; 76 °C, 5 мин; 90 °C, 20 сек и 95 °C, 5 мин) на изменение его полипептидного состава.

В ранее опубликованных работах [2, 3] на основании одномерного электрофореза нами была показана неоднозначность изменения полипептидного состава молока при

его пастеризации: рост, снижение содержания ПП определенной молекулярной массы, появление или исчезновение некоторых фракций ПП, что свидетельствует об одновременном протекании процессов дезинтеграции и реструктурирования ПП фрагментов при пастеризации.

Более детальное исследование протеома молока позволяет осуществить метод двумерного электрофореза (2DE) с последующей идентификацией ПП, претерпевающих наиболее значительные изменения при его термообработке.

Материалы и методы исследования

Подготовка проб молока. В работе осуществлялся нагрев проб молока до температуры пастеризации с соответствующей выдержкой при условии максимально возможного сокращения времени предварительного нагрева молока. Для этого пробы молочного сырья объемом 10 мл погружали в водяную баню, нагретую до 100 °С, и при интенсивном перемешивании нагревали до достижения необходимой температуры с последующей выдержкой.

Двумерный электрофорез в первом направлении (изоэлектрофокусирование) проводили с помощью самостоятельно изготовленных гелей (4% акриламид, 0,1% бисакриламид, 8 М мочевина, 1% амфолита, 2% ХАПС) в стеклянных трубочках (Bio-Rad) размером 1,0×180,0 мм. В качестве верхнего электродного буфера использовали 50 мм NaOH, нижнего – 20 мм H_3PO_4. Для 2DE белок растворяли в ИЭФ-буфере (8 М мочевина; 2 М тиомочевина; 2% ХАПС; 0,2% амфолита pH 3–10; 30 мм ДТТ и 20 мм Трис). Пробы фокусировали по следующей программе: 1 час при 100 В, 1 час при 200 В, далее каждый час повышали напряжение на 100 В до достижения 700 В (напряжение постоянное; сила тока не должна превышать 0,7 мА). Затем гели выдерживали 15 мин в уравновешивающем буфере (6 М мочевина; 2% ДСН; 30% глицерин; 50 мм Трис-HCl; следы бромфенолового синего и 2% ДТТ) и накладывали на 2D-мини-гель (6–16% ПААГ). 2DE проводили с использованием электродного буфера, содержащего 25 мм Трис-HCl; 192 мм глицина и 0,1% ДСН, при силе тока 5 мА на 1 гель в течение 20 мин, затем при 10 мА в течение 120–150 мин. Для визуализации белков гели окрашивали 0,1% спиртовым раствором Кумасси R-250 в течение 10 мин, затем отмывали 50% этанолом [5]. В ряде случаев белки дополнительно (перед помещением в раствор Кумасси R-250) окрашивали раствором солей серебра [12]. Гели сканировали при помощи Epson Perfection 3170 Photo, и данные переводили в числовые значения оптической плотности при помощи программы Scion Image [9] (Великобритания) и Flicker [6] (США).

Идентификацию белков осуществляли методом MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight mass – spectrometers) [14, 15]. Для идентификации белков по масс-спектрометрическим пептидным картам была использована поисковая программа Mascot [7]. Поиск проводился в базе данных NCBI.nr, поддерживаемой NCBI [1], с ограничением по таксону *Mammalia* (млекопитающие) с указанной точностью и с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха, возможной модификации цистеинов акриламидом и неполного прохождения протеолитического гидролиза.

Результаты исследования и их обсуждение

Спектры полипептидов термообработанного коровьего молока, разделенных методом 2DE приведены на рис. 1.

Полученные результаты показали изменения спектров ПП при пастеризации молока, особенно минорных, что, очевидно, вызвано разложением более высокомолекулярных ПП, высвобождением оболочечных белков жировых шариков, а также образованием гликозилированных форм белков по разным аминокислотным остаткам и другими посттрансляционными модификациями [13].

Режим пастеризации 76 °С, 5 мин (рис. 1, в) вызвал наименьшее изменение спектров ПП в сравнении со всеми другими режимами пастеризации (65 °С, 30 мин; 90 °С, 20 сек.; 95 °С, 5 мин). При этом режиме сохранялось большее число высокомолекулярных ПП. Хорошо разделены ПП со средней мол. массой 50–70 кДа во всем диапазоне pI.

Оценка количества полипептидов нативного и пастеризованного при различных режимах молока, по данным 2DE, показала, что при всех режимах пастеризации степень деструкции нативных ПП достигает 15–27% (рис. 2).

Для идентификации методом MALDI-TOF MS мы выбрали 3 ПП из числа исчезнувших, сильно изменяющихся по содержанию и появившихся при пастеризации. Результаты представлены в таблице: ПП № 1, 2 были вырезаны из геля нативного и № 3 из пастеризованного молока.

Из идентифицированных белков коровьего молока наибольший интерес представляют ПП № 2 и № 3. Chain A of Diferric Bovine Lactoferrin исчезает при всех исследованных режимах пастеризации, за исключением 76 °С, 5 мин (рис. 1). Однако и при этом режиме его содержание значительно уменьшается. Из литературы известно, что при его дезамидировании и автофрагментации с образованием пептидных составляющих происходит нарастание антирадикальных свойств, которые могут самостоятельно проявлять антиокислительные свойства [4], что, возможно, может увеличивать антиоксидантную активность пастеризованного молока. Нами было выявлено, что белок № 3 (Chain A, Structure-Based Design Of Novel Pin1 Inhibitors (I)) появляется в молоке после его пастеризации, за исключением жестко-

го режима 65 °С, 30 мин. Это может быть вызвано разрушением жировых глобул молока и выходом в плазму дополнительных ПП. Chain A, Structure-Based Design Of Novel Pin1 Inhibitors (I) может обладать антирадикальными свойствами и также повышать антиоксидантные свойства пастеризованного молока.

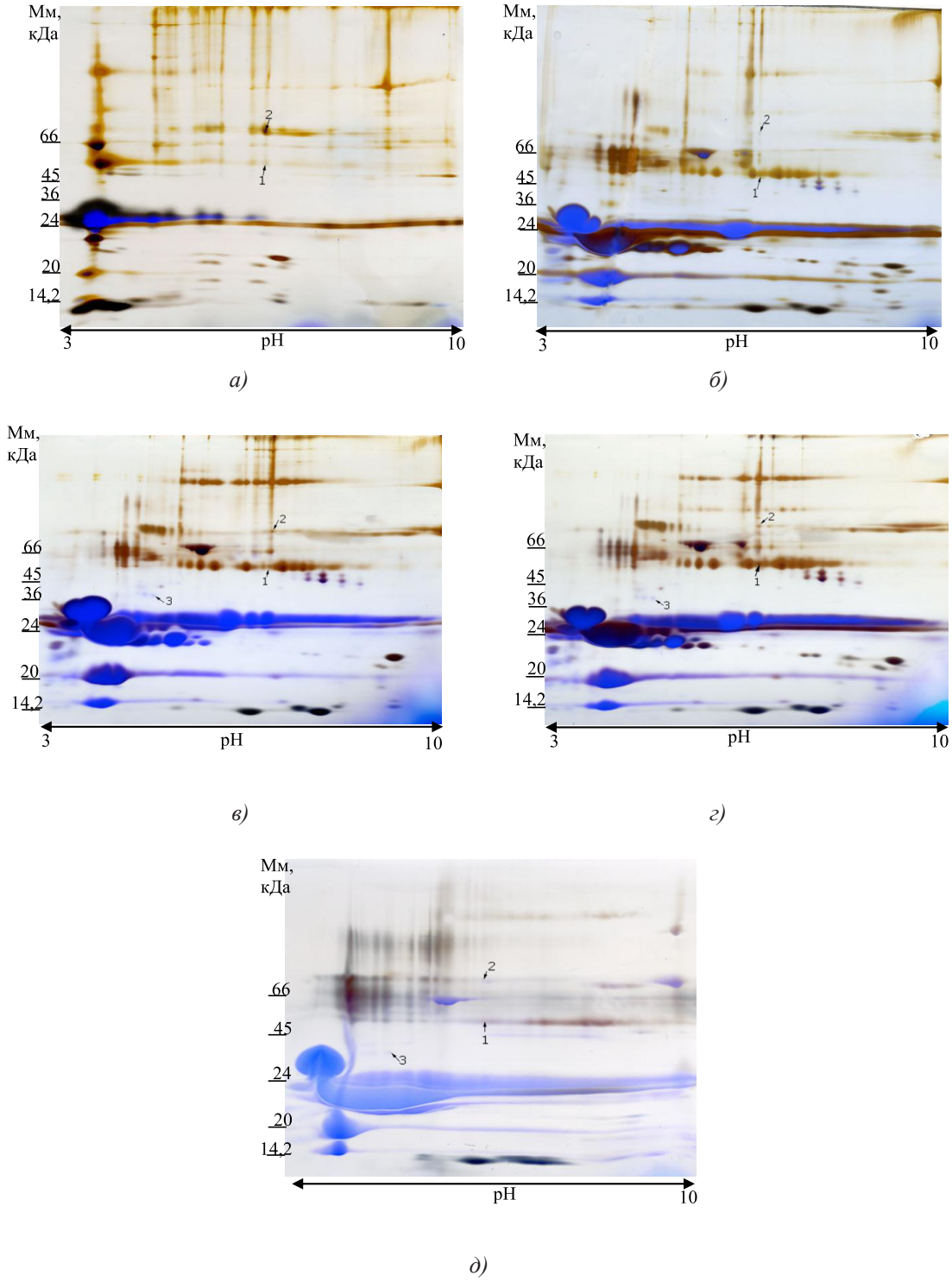

Рис. 1. Влияние промышленных режимов пастеризации на полипептидный состав коровьего молока (нагрузка 690 мкг белка на гель): а) контроль; б) 65 °С, 30 мин; в) 76 °С, 5 мин; г) 90 °С, 20 сек; д) 95 °С, 5 мин

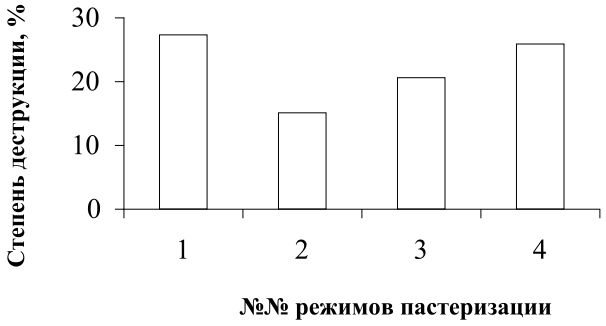

Рис. 2. Влияние режимов обработки на деструкцию полипептидов молока (Деструкция: количество разрушенных ПП в % от количества в нативном молоке)

Белки, идентифицированные из коровьего молока
(для ПП № 1, 2 достоверны значения выше 71 единицы mowse score;
для ПП № 3 достоверны значения выше 72 единиц mowse score)

№ пятна	мМ/pI в геле	мМ/pI теор.	Достоверность mowse score	№ белка по базе NCBI	Название белка
1	55/6,5	53/6,7	170	gi|2136760	Glycoprotein antigen MGP 57/53, mammary gland – bovine;
2	76/6,6	100/6,8	177	gi|157830374	Chain A of Diferric Bovine Lactoferrin
3	35/4,8	14/7,1	76	gi|259090316	Chain A, Structure-Based Design Of Novel Pin1 Inhibitors (I)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможном повышении антиоксидантной активности молока при его пастеризации, а также позволили выявить режимы термообработки (76 °С, 5 мин и 90 °С, 20 сек), приводящие к наименьшим изменениям в полипептидном спектре молока, что представляет как теоретический, так и практический интерес.

Список литературы

1. База данных «NCBI» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.matrixscience.com (дата обращения 15.01.11).

2. Балакирева Ю.В., Зайцев С.Ю., Каримова Ф.Г., Акулов А.Н., Ахмадуллина Ф.Ю. Влияние режима пастеризации на полипептидный состав молока // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 2. – С. 170–173.

3. Балакирева Ю.В., Зайцев С.Ю., Каримова Ф.Г., Акулов А.Н., Ахмадуллина Ф.Ю. Влияние режима пастеризации на полипептидный состав молока // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2011. – Т. 207. – С. 60–65.

4. Белизи С. Изменение антиокислительных свойств лактоферрина из женского молока в процессе дезамидирования / С. Белизи, И.Н. Назарова, В.Н. Прокофьева // Биохимия. – 2001. – Т. 66. – Вып. 5. – С. 712–717.

5. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1976. – 332 с.

6. Программа «Fliker» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://open2dprot.sourceforge.net\Flicker (дата обращения 18.10.10).

7. Программа «Mascot» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.matrixscience.com (дата обращения 15.01.11).

8. Радаева И.А. Увеличение срока хранения молочных продуктов путем использования антиоксидантов // Молочная промышленность. – 2006. – № 7. – С. 54–56.

9. Шарипова М. Р. Руководство по анализу электрофоретических гелей с помощью программы Scion Image: учебно-методическое пособие. – Казань: Казан. гос. технол. ун-т, 2004. – 12 с.

10. Щербакова Ю.В. Влияние тепловой обработки на компоненты антиоксидантной системы молока и его интегральную антиоксидантную активность: Автореф. дис. канд. биохим. наук. – Москва, 2011. – 21 с.

11. Яшин А.Я. Определение содержания природных антиоксидантов в пищевых продуктах // Пищевая промышленность. – 2007. – № 5. – С. 28–30.

12. Dubray G.A. Highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels / G.A Dubray // Analytical Biochemistry. – 1982. Vol. 119. – P. 325–329.

13. Kanofsky J.R. Quenching of singlet oxygen by human plasma/ J.R. Kanofsky // Photochem. And Photobiol. – 1990. – Vol. 51. – P. 299–303.

14. Lokhov P.G. Database search post-processing by neural network: Advanced facilities for identification of components in protein mixtures using mass spectrometric peptide mapping / Lokhov P.G., Tikhonova O.V.// Proteomics. – 2004. – Vol. 4(3). – P. 633–642.

15. Mann M. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases / M. Mann // Biol. Mass Spectrom. – 1993, – Vol. 22 (6). – P. 338–345.

References

1. Baza dannykh «NCBI» [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa: www.matrixscience.com (data obrascheniya 15.01.11).

2. Balakireva Yu. V., Zaytsev S.Yu., Karimova F.G., Akulov A.N., Akhmadullina F.Yu. Fundamentalnye issledovaniya, 2012, no. 2, pp. 170–173.

3. Balakireva Yu. V., Zaytsev S.Yu., Karimova F.G., Akulov A.N., Akhmadullina F.Yu. Uchenye zapiski KGAVM imeni N.E. Baumana, 2011, T. 207, pp. 60–65.

4. Belizi S. Izmenenie antiokislitel'nyh svojstv laktoferrina iz zhenskogo moloka v processe dezamidirovanija / S. Belizi, I.N. Nazarova, V.N. Prokof'eva // Biohimija. 2001. T. 66. Vyp. 5. pp. 712–717.

5. Osterman L.A. Metody issledovaniya belkov i nukleinovykh kislot: Electrofores i ultratsentrifugirovanie. M: Nauka, 1976, 332 p.

6. Programma «Fliker» [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa: http://open2dprot.sourceforge.net\Flicker (data obrascheniya 18.10.10).

7. Programma «Mascot» [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa: www.matrixscience.com (data obrascheniya 15.01.11).

8. Radaeva I.A. Molochnaya promyshlennost, 2006, no. 7, pp. 54–56.

9. Sharipova M.R. Rukovodstvo po analizu elektroforeticheskikh geley s pomoschyu programmy Scion Image. Kazan: Kazan State Technological University, 2004, 12 p.

10. Sherbakova Yu. V. Vliyanie teplovoy obrabotki na komponenty antioksidantnoy sistemy moloka I ego integralnuyu antioksidantnuyu aktivnost. Avtoreferat dissertatsii. Moskov, 2011. 21 p.

11. Yashin A. Ya. Pishevaya promyshlennost, 2007, no. 5, pp. 28–30.

12. Dubray G.A. Analytical Biochemistry, 1982, no. 119, pp. 325–329.

13. Kanofsky J.R. Photochem. And Photobiol, 1990, no. 51, pp. 299–303.

14. Lokhov P.G., Tikhonova O.V. Proteomics, 2004, no. 4(3), pp. 633–642.

15. Mann M. Biol. Mass Spectrom, 1993, no. 22 (6), pp. 338–345.

Рецензенты:

Ежкова Г.О., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой технологии мясных и молочных продуктов, ФГБОУ ВПО «КНИТУ», г. Казань;

Чернов В.М., д.б.н., заместитель директора, ФГБОУ науки Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань.

Работа поступила в редакцию 15.04.2015.