УДК 639.211.597.1.05

Р.В. Есипенко, Н.В. Довженко, Н.Н. Ковалев
Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОЛИЗАТОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ

В ферментолизатах двустворчатых моллюсков определено содержание растворимого белка, свободных аминокислот и пептидов. Определено влияние способов внесения молочной сыворотки на состав ферментолизатов. Рассчитано содержание редокс-аминокислот в ферментолизатах моллюсков. Определена антиоксидантная активность ферментолизатов. Показано, что более высокой антиоксидантной активностью обладают ферментолизаты моллюсков, обогащенных молочной сывороткой.

Ключевые слова: *моллюски, ферментолизаты, свободные аминокислоты, пептиды, антиоксидантная активность, молочная сыворотка.*

R.V. Esipenko, N.V. Dovjenko, N.N. Kovalev

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOME MOLLUSCS SPECIES FERMENTOLISATES

Content of soluble protein, free amino acids and peptides of bivalves fermentolysates was determined. The influence of introducing whey methods on fermentolysates composition was determined. The content of redox-amino acids of mollusks fermentolysates is calculated. The antioxidant activity of fermentolysates has been determined. It has been shown that fermentolysates of mollusks enriched with milk whey possess higher antioxidant activity.

Key words: *mollusks, fermentolysates, free amino acids, peptides, antioxidant activity, milk whey.*

Введение

В настоящее время доказано, что белки, а также другие биологически активные соединения могут быть использованы как корректоры физиологического состояния организма. Антиоксидантные пептиды постепенно принимаются в качестве пищевых ингредиентов, дополненных функциональными продуктами питания и нутрицевтиками, для позитивного регулирования окислительного стресса в организме человека.

Морепродукты являются отличными источниками высококачественных белков, которые при переваривании обеспечивают поступление в организм биоактивных пептидов с выраженной антиоксидантной, антигипертензивной, кардиозащитной активностью [1, 2, 3].

Известен широкий спектр природных и синтетических экзогенных антиоксидантов, поступающих в организм с пищей. При этом природные антиоксиданты обладают рядом преимуществ по сравнению с синтетическими, включая отсутствие побочных и кумулятивных эффектов, а также более низкую токсичность [4].

Основными классами природных антиоксидантов являются каротиноиды, тиолы, фенольные соединения и пептиды. В литературе описаны последовательности более 100 антиоксидантных пептидов, выделенных из различных источников, а также полученных при конверсии белков с использованием ферментов и / или микроорганизмов [5, 6].

Продуктами ферментативной деструкции белков являются пептиды и аминокислоты. Из литературных источников известно, что свободные аминокислоты являются слабыми

антиоксидантами, но комплексы аминокислот и дипептидов, включая гистидинсодержащие дипептиды, способны дополнять и усиливать друг друга, составляя комплекс антиокислителей [7,8]. Однако объекты с высоким содержанием белков соединительной ткани не соответствуют по аминокислотному скору по шкале ФАО / ВОЗ [9, 10].

Двустворчатые моллюски являются пищевым сырьём с невысоким содержанием свободных аминокислот, поэтому их использование в технологии белковых концентратов или пищевых добавок без дополнительного обогащения состава представляется нерациональным. Одним из способов обогащения белкового и аминокислотного состава является внесение молочной сыворотки. Гидролизаты сывороточных белков используются при производстве кондитерской, хлебобулочной, мясной продукции, входят в состав напитков и заменителей женского молока благодаря высокой пищевой ценности, отсутствию горького вкуса и низким антигенным свойствам [11]. Кроме того, ферментолизаты белков молочной сыворотки характеризуются иммуномодулирующими, цитотоксическими, антиоксидантными и пребиотическими свойствами [12].

Задачей настоящего исследования являлось определение состава и антиоксидантной активности ферментолизатов некоторых видов двустворчатых моллюсков с использованием молочной сыворотки.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись мягкие ткани корбикулы и мерценарии, выловленных в зал. Петра Великого (Японское море) в 2016 г.

В качестве ферментных препаратов для проведения ферментолиза использовали мегатерин (170 Е/г), выделенный из клеточных культур микроорганизма Bacillus megaterium (ТУ № 00479942-002-94), протамекс (670 Е/г) – из Bacillus protease (Denmark), (Гигиеническое заключение № 77.99.9.916.П.15411.10.00).

Определение содержания водорастворимого белка проводили по методу Лоури [13].

Содержание пептидов определяли по методу Лоури после осаждения высокомолекулярных белков ТХУ [14].

Аминокислотный состав исследованных образцов проводили на аминокислотном анализаторе L-8800 (Hitachi, Япония).

Оценка эффективности антиоксидантов проводилась по их способности подавлять реакцию окисления $ABTS^{+}$ пероксильными и алкоксильными радикалами, образующимися при термическом (37 ^{o}C) разложении АВАР (2, 2'-азобис (2-аминопропан) гидрохлорид) [15].

Результаты и обсуждение

Обогащение продуктов белками молочной сыворотки возможно двумя способами: внесение сыворотки в ферментолизат моллюсков и ферментолиз тканей моллюсков в среде молочной сыворотки (совместный ферментолиз).

Ранее проведенными исследованиями установлено, что оптимальное время ферментолиза мягких тканей мерценарии и корбикулы под действием протамекса и мегатерина составляет 2,5–3 ч при активности ферментов 2,5–3 П/Е, соотношение водного гомогената тканей моллюска и молочной сыворотки составляло 1 : 1 [16, 17].

С целью оценки влияния молочной сыворотки на состав продуктов в сублимированных ферментолизатах моллюсков был определен состав белковых компонентов (табл. 1).

Таблица 1

Содержание водорастворимого белка, пептидов и свободных аминокислот в ферментолизатах моллюсков, мг/г

Table 1

Content of water-soluble protein, peptides and free amino acids in mollusc fermentolysates, mg / g

Образец*	Фермент	Белок	Пептиды	Аминокислоты	Сумма редокс-аминокислот
Корбикула					
1	Протамекс	420±16,0	10,3±0,3	49,2	1,8
2		540±23,0	12,0±0,5	59,5	2,1
3		580±27,0	15,4±0,7	79,2	4,3
1	Мегатерин	440±16,0	12,1±0,5	43,3	1,2
2		530±22,0	15,0±0,7	57,6	2,5
3		570±26,0	27,0±16,0	75,0	3,7
Мерценария					
1	Протамекс	270±8,0	9,0±0,4	107,1	7,5
2		300±15,0	15,0±0,75	111,1	8,6
3		320±16,0	20,0±1,0	146,6	11,2
1	Мегатерин	270±8,1	9,0±0,4	100,4	6,6
2		310±15,5	14,0±0,7	106,7	5,8
3		300±15,0	19,0±0,95	138,4	8,9

Примечание. 1 – ферментолизат ткани, 2 – ферментолизат + сыворотка, 3 – совместный ферментолиз.

Проведенные исследования показали, что обогащение ферментолизата мягких тканей моллюсков молочной сывороткой повышает концентрацию растворимого белка на 10–30 % при использовании протамекса и на 15–20 % – при использовании мегатерина. Ферментолиз мягких моллюсков в среде молочной сыворотки способствовал повышению концентрации растворимого белка в продуктах на 19–38 % в случае протамекса и на 12–30 % в случае использования мегатерина.

Сравнение состава образцов 2 и 3 позволяет оценить степень биоконверсии белков молочной сыворотки. Как видно из данных табл. 1, ферментолиз тканей моллюсков в молочной сыворотке под действием протамекса способствовал увеличению концентрации растворимого белка в образцах на 6,5–7,0 %. В то же время под действием мегатерина, только в случае использования мягких тканей корбикулы, количество растворимого белка повышалось на 7,5 %. Ферментолиз мягких тканей мерценарии в молочной сыворотке не оказывал влияния на содержание белка в продукте.

Как известно, продуктами протеолиза белков являются пептиды и аминокислоты. Проведенное исследование показало, что содержание пептидов в сублимированных ферментолизатах моллюсков составляло 9–12 мг/г. Увеличение содержания пептидов в продуктах совместного ферментолиза зависело от использованного ферментного препарата и вида моллюска. Так, использование мегатерина увеличивало содержание пептидов на 111–123 % в случае использования мягких тканей мерценарии и корбикулы соответствен-

но. При использовании протамекса аналогичный результат был получен при использовании мягких тканей мерценарии, в то время как повышение содержания пептидов при использовании мягких тканей корбикулы составило только около 50 %.

Пищевая и биологическая ценность продуктов во многом определяется количественным содержанием свободных аминокислот. Определение скора свободных аминокислот показало, что их содержание в ферментолизатах корбикулы в два раза меньше, чем в ферментолизатах мерценарии. Накопление свободных аминокислот в продуктах, полученных при совместном ферментолизе, зависело от вида используемого моллюска. Так, ферментолиз тканей мерценарии в среде молочной сыворотки под действием двух исследованных ферментных препаратов увеличивал содержание свободных аминокислот на 37–38 %. В то же время при аналогичных условиях ферментолиза мягких тканей корбикулы повышение содержания свободных аминокислот составило 61–73 %.

Проведенное определение состава ферментолизатов мягких тканей моллюсков свидетельствует о различной атакуемости белков сырья исследованными ферментными препаратами и, как следствие, различном количественном составе продуктов протеолиза.

Из литературных источников известно, что наиболее физиологически активными являются пептиды с низкой молекулярной массой, за счет содержания остатков редокс-активных аминокислот (Tyr, Trp, Met, Cys, His) [18].

Проведено исследование по определению антиоксидантной активности ферментолизатов моллюсков по отношению к ABTS–иону.

Результаты проведенного исследования представлены в табл. 2.

Таблица 2

Антиоксидантная активность продуктов из двустворчатых моллюсков с использованием молочной сыворотки, мкмоль/кг сухого веса

Table 2

Antioxidant activity of bivalve mollusc fermentolysates obtained using whey, μmol / kg dry weight

Образец	Фермент	Корбикула	Мерценария
1	Протамекс	8,7±0,4	14,3±0,5
2		9,7±0,3	18,3±0,6
3		6,4±0,2	16,6±0,5
1	Мегатерин	10,4±0,4	10,7±0,4
2		10,6±0,4	21,5±1,1
3		8,3±0,3	13,7±0,4

Примечание. Нумерация образцов, как в табл. 1.

Во-первых, следует отметить, что ферментолизаты моллюсков, полученные с использованием двух ферментов, характеризуются различным уровнем антиоксидантной активности (АОА). Наибольшую АОА проявлял ферментолизат из мягких тканей мерценарии (14,3 мкмоль/кг), полученный с использованием протамекса.

Во-вторых, внесение молочной сыворотки в ферментолизаты моллюсков сопровождалось увеличением антиокислительной способности. Следует отметить, что наибольшее увеличение антиокислительной активности при обогащении продуктов отмечено для мерценарии: внесение молочной сыворотки в ферментолизат, полученный с использованием

протамекса – увеличивало его антиокислительные свойства на 4,0 мкмоль/кг, а при использовании мегатерина – на 10,8 мкмоль/кг.

Проведение совместного ферментолиза мягких тканей моллюсков и молочной сыворотки приводило к снижению АОА в продуктах по сравнению с продуктами, обогащенными молочной сывороткой. Следует отметить, что АОА продуктов совместного ферментолиза практически во всех случаях оказалась ниже, чем у продуктов, полученных при ферментолизе мягких тканей моллюсков.

Исключением является продукт, полученный при ферментолизе мягких тканей мерценарии и молочной сыворотки. В данном случае совместный ферментолиз не оказывал влияния на антиоксидантную активность продукта.

Следует отметить, что антиоксидантная активность ферментолизатов не коррелировала с содержанием свободных и редокс-аминокислот (см. табл. 1). По-видимому, антиоксидантные свойства полученных ферментолизатов обуславливаются сочетанным действием свободных аминокислот и пептидов. Снижение антиоксидантной активности в образцах, полученных методом совместного ферментолиза, косвенно указывает на дозозависимый эффект действия, что требует дополнительного изучения.

Таким образом, в результате проведенного исследования следует сделать заключение, что обогащение ферментолизатов моллюсков увеличивает количественное содержание в них водорастворимого белка, пептидов и свободных аминокислот, что оказывает влияние на антиоксидантную емкость продуктов. Наибольшей антиоксидантной активностью характеризуются продукты ферментолиза мерценарии, обогащенные молочной сывороткой.

Список литературы

1. Jensen, I.J. Preclinical and clinical studies on antioxidative, antihypertensive and cardioprotective effect of marine proteins and peptides / I.J. Jensen, H.K. Mæhre // Mar. Drugs. – 2016. – Vol. 14. – P. 128–136.

2. Dai-Hung Ngo , Se-Kwon Kim Marine Bioactive Peptides as Potential Antioxidants Curr Protein Pept Sci. – 2013. – № 14. – P. 189–198.

3. Ribang Wu, Cuiling Wu , Dan Liu , Xinghao Yang , Jiafeng Huang , Jiang Zhang , Binqiang Liao , Hailun He , Hao Li. Overview of Antioxidant Peptides Derived From Marine Resources: The Sources, Characteristic, Purification, and Evaluation Methods // Appl Biochem Biotechnol. – 2015. – Vol. 176 (7). – P. 1815–1833.

4. Federico Ruiz-Ruiz , Elena I Mancera-Andrade , Hafiz M N Iqbal. Marine-Derived Bioactive Peptides for Biomedical Sectors: A Review // Protein Pept Lett. – 2017. – № 24 (2). – P.109–117.

5. Dziuba D., Identification of lactobacillus strains at the species level using ftir spectroscopy and artificial neural networks // Pol. J. Food Nutr. Sci. – 2007. – Vol. 57, № 3. – P. 301–306.

6. Leo M.L., Toldra F. Food analysis // CRS Press. – 2015. – 686 p.

7. Давидович, В.В. Аминокислоты двустворчатых моллюсков: биологическая роль и применение в качестве БАД / В.В. Давидович, Т.Н. Пивненко // Изв. ТИНРО. – 2001. – Т. 129. – С. 146–154.

8. Давидович, В.В. Содержание свободных аминокислот и гистидинсодержащих дипептидов в моллюсках – перспективных источниках получения БАД / В.В. Давидович, Т.Н. Пивненко, Н.Б. Аюшин, А.Л. Шутикова // ТИНРО-Центр. НИИЭМ СО РАМН. – Владивосток, 2006. – Т. 147. – С. 331–337.

9. Битютская, О. Использование моллюска в технологии диетических продуктов / О. Битютская, В. Любчик, Т. Овсянникова // Товари і ринки. – 2012. – № 2. – С. 111–119.

10. Борисова, Г.В. Выбор ферментных препаратов с целью получения гидролизатов молочной сыворотки с низкой аллергенностью / Г.В. Борисова, М.В. Новосёлова, О.Н. Бондарчук, Ю.С. Малова // Фундаментальные исследования. Сельскохозяйственные науки. – 2012. – № 11. – С. 1164 –1167.

11. Курбанова, М.Г. Белковые гидролизаты с биологически активными пептидами / М.Г. Курбанова, И.С. Разумникова, А.Ю. Просеков // Молочная пром-сть. – 2010. – № 10. – С. 73–76.

12. Milenteva I., Dyshlyuk L., Prosekov A., Babich O., Shishin M. Deriving biologically active peptides and study of their qualities // Science Evolution. – 2016. – Vol. l, № 2. – P. 20–33.

13. Lowry O., Rosenbrough N., Parr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. –Vol. 193, № 1. – P. 265–276.

14. Гаврилин, М.В. Выбор оптимальных условий получения гидролизатов молочнокислых бактерий термокислотным способом / М.В. Гаврилин, Г.В. Сенчукова, С.П. Сенченко, В.А. Самойлов, Н.А. Гостищева // Химико-фармацевтический журн. –2007, – Т.41. - №2. –С. 54–56.

15. Bartosz G., Janaszewska A., Ertel D., Bartosz M. Simple determination of peroxide radical-trapping capacity // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1998. – Vol. 46. – P. 519–528.

16. Ковалев, Н.Н. Обоснование биотехнологии мерценарии Симпсона / Н.Н. Ковалев, Р.В. Есипенко, Д.В. Порваткин // Науч. тр. Дальрыбвтуза. – Владивосток: Дальрыбвтуз, 2015, – Т. 35. – С. 131–138.

17. Есипенко, Р.В. Сравнительная характеристика состава и свойств ферметолизатов корбикулы и мидии, полученных с использованием молочной сыворотки / Р.В. Есипенко, Н.Н. Ковалев // Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана: материалы III Междунар. науч.-практ. конф. – Владивосток: Дальрыбвтуз, 2014. – Ч. 2. – С. 50–53.

18. Самохина, Л.С. Противоязвенное действие лактоферрина и его гидролизатов / Л.С. Самохина, Г.С. Комолова, И.И. Ионова, Г.В. Семенов // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2012. – № 9. – С. 21–23.

Сведения об авторах: Есипенко Роман Владимирович, старший преподаватель, e-mail: azt@bk.ru;

Ковалев Николай Николаевич, доктор биологических наук, профессор, проректор по научной и инновационной деятельности, e-mail: kovalevnn61@yandex.ru;

Довженко Надежда Владимировна, доцент, e-mail: nadezhda@poi.dvo.ru.