



УКРАЇНА

(19) UA (11) 89616 (13) C2
(51) МПК (2009)
A61K 38/01
C12P 21/06
A61P 9/12 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ГІДРОЛІЗАТ КАЗЕЇНУ, СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ

1

2

(21) а200602131
(22) 30.07.2004
(24) 25.02.2010
(86) PCT/JP2004/010928, 30.07.2004
(31) 2003-285007
(32) 01.08.2003
(33) JP
(46) 25.02.2010, Бюл.№ 4, 2010 р.
(72) ЯМАМОТО НАОЮКІ, JP, МІЗУНО СЕЙІТІ, JP, НІСИМУРА СІНГО (ПОМЕР), JP, ГОТОУ ТАКАНОБУ, JP, МАЦУУРА КЕЙІТІ, JP, СІНОДА ТАДАСІ, JP
(73) КАЛПІС КО., ЛТД., JP
(56) JP 5015314 A, 26.01.1993
JP 2003024012 A, 28.01.2003
JP 2001136995 A, 22.05.2001
(57) 1. Гідролізат казеїну, що містить вільні амінокислоти й пептиди, одержаний гідролізом тваринного молочного казеїну до середньої довжини ланцюга не більше 2,1, вираженої кількістю амінокислотних залишків, в якому вказані пептиди містять неперетравлювані *in vivo* пептиди, що складаються із дипептидів, які мають послідовність Хаа-Pro, і трипептидів, що мають послідовність Хаа-Pro-Pro, і в якому вміст дипептидів, що мають послідовність Хаа-Pro, становить не менше 5 % мас. від загальної кількості вільних амінокислот і пептидів у гідролізаті, і вміст трипептидів, що мають послідовність Хаа-Pro-Pro, становить не менше 1 % мас. від загальної кількості вільних амінокислот і пептидів у гідролізаті.
2. Застосування гідролізату казеїну за п. 1 для одержання харчової добавки.
3. Гідролізат казеїну за п. 1, в якому дипептиди, які мають послідовність Хаа-Pro, містять Ile-Pro, Glu-Pro, Arg-Pro, Gln-Pro, Met-Pro і Tyr-Pro, і трипептиди, що мають послідовність Хаа-Pro-Pro, містять Ser-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro і Val-Pro-Pro.

4. Спосіб одержання гідролізату казеїну за п. 1, що включає стадію (A) гідролізу тваринного молочного казеїну до середньої довжини ланцюга не більше 2,1 з використанням групи ферментів, здатних розщеплювати тваринний молочний казеїн до гідролізату казеїну, що має середню довжину ланцюга не більше 2,1, виражену кількістю амінокислотних залишків, в якому група ферментів включає пептидази, здатні розщеплювати пептидний зв'язок Pro-Хаа, щонайменше один фермент із кількості нейтральної протеази I, нейтральної протеази II і лейцинамінопептидаз.
5. Спосіб за п. 4, в якому група ферментів являє собою позаклітинні ферменти, одержані з *Aspergillus oryzae*.
6. Спосіб за п. 4, в якому гідроліз здійснюють за допомогою одностадійної взаємодії із групою ферментів.
7. Спосіб за п. 4, в якому тваринний молочний казеїн являє собою казеїн коров'ячого молока.
8. Спосіб за п. 4, в якому група ферментів додатково містить щонайменше один фермент із кількості металопротеаз і серинпротеаз.
9. Спосіб за п. 4, в якому пептидази, здатні розщеплювати пептидний зв'язок Pro-Хаа, являють собою групу ферментів, що мають ізоелектричні точки в кислій області.
10. Спосіб за п. 4, в якому на стадії (A) концентрація казеїну при гідролізі тваринного молочного казеїну становить від 1 до 19 % мас. і масове співвідношення групи ферментів і тваринного молочного казеїну становить не менше 1/100.
11. Застосування гідролізату казеїну за п. 1 для одержання агента, що має активність з інгібування ангіотензинперетворювального ферменту.
12. Застосування гідролізату казеїну за п. 1 для одержання агента, що має гіпотензивний ефект.

Даний винахід стосується гідролізату казеїну, який отримують гідролізом тваринного молочного казеїну і який, як очікується, проявляє різноманітні

функції, включаючи активність по інгібуванню ангіотензин-конвертуючого ферменту і гіпотензивну дію, і придатний для різних харчових продуктів і

(19) UA (11) 89616 (13) C2

лікарських засобів, а також способу отримання такого гідролізату казеїну і його застосування.

Передумови винаходу

Повідомлялося про множинну пептидів, що мають різноманітні функції, такі як гіпотензивний ефект, антибактеріальна активність, кальцій-розчиняючий ефект та імуномодуючий ефект, і ці пептиди використовуються у харчових продуктах і лікарських препаратах.

Наприклад, пропонуються гіпотензивні пептиди, багато з яких мають активність по інгібуванню ангіотензин-конвертуючого ферменту (тут нижче позначений ACE). ACE конвертує попередник, ангіотензин I, в ангіотензин II, що має судинозвужуючу активність у живому організмі, підвищуючи при цьому кров'яний тиск. Таким чином, передбачається, що пептиди, які мають ACE-інгібуючу активність, демонструють гіпотензивний ефект, пригнічуючи виробництво ангіотензину II за допомогою інгібування ACE у живому організмі. При розробці гіпотензивних пептидів, дослідження зазвичай направлені, у першу чергу, на пептиди, які мають ACE-інгібуючу активність, так що ознакою гіпотензивної дії пептидів, що пропонуються, є, головним чином, ACE-інгібуючий ефект як показник. До даного часу запропоновано і застосовується для профілактики та лікування гіпертонії велика кількість агентів, що надають гіпотензивну дію та оцінених за їх ACE-інгібуючою активністю як показником.

При отриманні функціональних пептидів, таких як пептиди, які надають гіпотензивну дію, що оцінюється за ACE-інгібуючим ефектом, зокрема, при отриманні функціональних пептидів за допомогою перетравлювання харчового білка ферментами, після ферментативного перетравлювання зазвичай потрібні складні стадії, наприклад, концентрування, очищення і виділення перетравлених продуктів для кращого прояву функціональних ефектів.

Очікується, що як пептиди, які абсорбуються у кров у травному тракті, проявляючи свої функції у живому організмі, корисні *in vivo* пептиди, які не перетравлюються, що мають високу абсорбційну здатність і стійкість до перетравлювання відносно різних травних ферментів у живому організмі. Однак точно відомо, які пептиди сприяють підвищенню *in vivo* стійкості до перетравлювання. Таким чином, потрібна розробка продуктів ферментативного перетравлювання для харчових або лікарських препаратів і способів отримання таких продуктів, які мають високу *in vivo* стійкість до перетравлювання і можуть ефективно виявляти свої бажані функції, не зазнаючи складних способів обробки, таких як концентрування, очищення або виділення після ферментативного перетравлювання.

Наприклад, патентна публікація 1 розкриває спосіб отримання суміші низькомолекулярних пептидів, що складається, головним чином, з дипептидів і трипептидів, які мають середню довжину ланцюга не більше 3 і чудову кишкову абсорбційну здатність. Суміш пептидів готують з соєвого білка при одночасній або послідовній дії двох або більше ферментів, які мають ендопротеазну активність і по суті не маючих екзопротеазну активність, з

утворенням не більше 5% вільних амінокислот. Патентна публікація 2 розкриває функціональну їжу, що використовує продукти перетравлювання соєвого білка, і способи її отримання. Продукти перетравлювання містять як активні інгредієнти дипептид і трипептиди, які включають Ala-Tyr, Gly-Tyr-Tyr, Ala-Asp-Phe і Ser-Asp-Phe, отримані перетравлюванням термоденатурованого соєвого білка із застосуванням таких ферментів як протеази, похідні *Aspergillus oryzae*. Продукти перетравлювання переважно мають середню довжину ланцюга пептиду від 2 до 4 і містять від 20 до 30% мас. вільних амінокислот.

Однак дані ферментативні продукти перетравлювання соєвого білка мають компоненти, які повністю відрізняються від компонентів продуктів ферментативного перетравлювання тваринного молочного казеїну. Таким чином, вказані вище патентні публікації нічого не пропонують з приводу способів отримання з тваринного молочного казеїну як вихідного матеріалу продуктів перетравлювання казеїну та гідролізату казеїну, які мають високу концентрацію активних інгредієнтів і чудову абсорбційну здатність у живому організмі і можуть використовуватися без необхідної складної обробки, такої як концентрування, очищення і виділення.

З іншого боку, патентні публікації 3 і 4 пропонують способи отримання пептидів, що мають різні функції, перетравлюванням тваринного молочного казеїну з використанням ферментів, таких як протеази та пептидази, і конкретних функціональних пептидів, які отримуються даними способами.

Однак розкриті у даних публікаціях продукти ферментативного перетравлювання призначені для отримання конкретних пептидів як активних інгредієнтів. Відповідно, у даних публікаціях відсутні вказівки відносно гідролізу тваринного молочного казеїну до середньої довжини ланцюга не більше 2,1, конкретного способу гідролізу та ефективності гідролізату казеїну, який має конкретну середню довжину ланцюга.

Патентна публікація 1: JP-5-252979-A

Патентна публікація 2: JP-2003-210138-A

Патентна публікація 3: JP-6-128287-A

Патентна публікація 4: JP-2001-136995-A

Короткий опис винаходу

Метою даного винаходу є забезпечення гідролізату казеїну, що містить *in vivo* пептиди, які не перетравлюються, і вільні амінокислоти, що має мінімальну *in vivo* ферментну перетравлюваність і, як очікується, виявляє функції, наприклад, гіпотензивний ефект у живому організмі.

Іншою метою даного винаходу є забезпечення способу отримання вказаного вище гідролізату казеїну, який дозволяє легко і ефективно отримувати вказаний вище гідролізат казеїну без необхідності включення складних процесів.

Ще однією метою даного винаходу є забезпечення агента, що має ACE-інгібуючу активність або гіпотензивний ефект, який містить *in vivo* пептиди, що не перетравлюються, і вільні амінокислоти, надає, як очікується, чудову гіпотензивну дію в живому організмі і застосовний для різних функціональних харчових продуктів або лікарських препаратів.

Заявники даного винаходу провели інтенсивні дослідження для досягнення вказаних вище цілей, виявивши, що при гідролізі тваринного молочного казеїну до середньої довжини ланцюга не більше 2,1, вираженої кількістю амінокислотних залишків, можна отримати гідролізат казеїну, що містить вільні амінокислоти і низькомолекулярні пептиди, наприклад, трипептиди і дипептиди, в якому ефективно утворюються вільні амінокислоти та молекули *in vivo* пептидів, що не перетравлюються, які мають залишок Pro.

Заявники даного винаходу також виявили, що *in vivo* пептиди, що не перетравлюються, які мають залишок Pro на карбоксильному кінці, мають, як очікувалося, високу стійкість до перетравлювання відносно *in vivo* пептидаз, так що цілком ймовірно для таких пептидів, що не перетравлюються, повністю виявляти свої функції в живому організмі, і що гідролізат казеїну має високий вміст пептидів з хорошою *in vivo* абсорбційною здатністю, таких як дипептиди і трипептиди, так що гідролізат казеїну здатний повністю проявляти різні функції, наприклад, гіпотензивний ефект, у живому організмі, здійснюючи, таким чином, даний винахід.

Крім того, заявники даного винаходу виконали дослідження по пошуку ферментів, які ефективно продукують гідролізат казеїну за даним винаходом, серед різних відомих ферментів, виявивши, що конкретний клас ферментів здатний з високою мірою ефективності продукувати гідролізат казеїну за даним винаходом.

Згідно з даним винаходом запропонований гідролізат казеїну, що містить вільні амінокислоти і пептиди, отриманий гідролізом тваринного молочного казеїну і такий, що має середню довжину ланцюга не більше 2,1, виражену кількістю амінокислотних залишків. Більш конкретно, даний винахід стосується вказаного вище гідролізату казеїну, в якому пептиди містять *in vivo* пептиди, що не перетравлюються, які складаються з дипептидів, що мають послідовність Хаа-Pro, і трипептидів, які мають послідовність Хаа-Pro-Pro, і в якому вміст дипептидів, що мають послідовність Хаа-Pro, не нижче 5% мас. від загальної кількості пептидів і вільних амінокислот у гідролізаті і вміст трипептидів, що мають послідовність Хаа-Pro-Pro, не нижче 1% мас. від загальної кількості пептидів і вільних амінокислот у гідролізаті. Позначення Хаа, що використовується тут, може являти собою будь-яку амінокислоту.

Згідно з даним винаходом запропонований також вказаний вище спосіб отримання гідролізату казеїну, що включає стадію (A) гідролізу тваринного молочного казеїну до середньої довжини ланцюга не більше 2,1 за допомогою групи ферментів, здатних перетравлювати тваринний молочний казеїн у гідролізат казеїну, що має середню довжину ланцюга не більше 2,1, виражену кількістю амінокислотних залишків.

Згідно з даним винаходом, запропонований також агент, що має ACE-інгібуючу активність або гіпотензивний ефект, який містить вказаний вище гідролізат казеїну як активний інгредієнт.

Згідно з даним винаходом запропоновано також застосування вказаного вище гідролізату казеїну у виробництві функціональних харчових продуктів

або лікарських препаратів, що має ACE-інгібуючу активність або гіпотензивний ефект.

Гідролізат казеїну за даним винаходом містить вільні амінокислоти і низькомолекулярні пептиди, такі як *in vivo* пептиди, що не перетравлюються, які отримуються гідролізом тваринного молочного казеїну до середньої довжини ланцюга не більше 2,1, вираженої кількістю амінокислотних залишків. Таким чином, очікується, що даний гідролізат казеїну при пероральному прийомі виявляє чудову *in vivo* абсорбційну здатність і різні функції у живому організмі і застосовний для різних функціональних харчових продуктів, лікарських препаратів і харчових домішок. Наприклад, даний гідролізат казеїну передбачається для використання в агенті, що має ACE-інгібуючу активність або гіпотензивний ефект, який містить даний гідролізат як активний інгредієнт.

Даний спосіб включає стадію (A) гідролізу тваринного молочного казеїну до середньої довжини ланцюга не більше 2,1 із застосуванням групи ферментів, здатних перетравлювати тваринний молочний казеїн у гідролізат казеїну із середньою довжиною ланцюга не більше 2,1, вираженою кількістю амінокислотних залишків. Отже, спосіб допускає легке і ефективне отримання гідролізату казеїну за даним винаходом. Таким чином, даний спосіб корисний у промисловому виробництві гідролізату казеїну за даним винаходом.

Короткий опис креслень

На фіг. 1 представлений графік, що показує результати оцінки *in vivo* абсорбційної здатності і стійкості до перетравлювання Хаа-Pro і Хаа-Pro-Pro, виконаної у прикладі 1.

На фіг.2 представлений графік, що показує результати експерименту по визначенню гіпотензивного ефекту порошків гідролізату казеїну, який залежить від дози, отриманих у прикладі 1.

На фіг.3 представлений графік, що показує співвідношення між схемою елюювання зв'язаного білка з лінійним градієнтом від 0 до 0,6 M NaCl та протеолітичною активністю в прикладі аналізу 1.

На фіг.4 представлений графік, що показує співвідношення між часом перетравлювання казеїну з використанням групи ферментів і ACE-інгібуючою активністю гідролізату казеїну, отриманого у прикладі 3.

На фіг. 5 представлений графік, що показує співвідношення між середньою довжиною ланцюга і ACE-інгібуючою активністю гідролізату казеїну, отриманого гідролізом казеїну з використанням групи ферментів у прикладі 3.

Переважаючі варіанти винаходу

Тепер даний винахід буде пояснений детально. Гідролізат казеїну за даним винаходом містить вільні амінокислоти і пептиди, отримані гідролізом тваринного молочного казеїну до певного діапазону величин середньої довжини ланцюга, вираженої кількістю амінокислотних залишків. Кількість вільних амінокислот і пептидів переважно складає не менше 80% мас, більш переважно від 80 до 90% мас. від загальної кількості гідролізату казеїну.

Особливо переважно, щоб гідролізат мав точний вміст *in vivo* пептидів, що не перетравлюються, наприклад, пептидів, які складаються з дипеп-

тидів, що мають послідовність Хаа-Pro, і трипептидів, що мають послідовність Хаа-Pro-Pro. Пептиди можуть являти собою солі пептидів.

Для цілей даного винаходу середню довжину ланцюга можна виразити як співвідношення загальної кількості молей пептидів і вільних амінокислот, що генерується гідролізом тваринного молочного казеїну, по відношенню до кількості молей усіх амінокислот у кислотному гідролізаті казеїну тієї самої маси. Тут кислотний гідролізат казеїну отримують перетравлюванням казеїнового білка до окремих амінокислот.

Середню довжину ланцюга можна визначити, наприклад, оцінюючи молярні концентрації аміногруп у гідролізатах методом ОРА, використовуючи реагент ОРА (орто-фталальдегід), який забарвлюється при взаємодії з аміногрупами, і виразити наступним чином:

середня довжина ланцюга = (кількість молей аміногруп у кислотному гідролізаті казеїну)/(кількість молей аміногруп у ферментативному гідролізаті казеїну).

Вираз «in vivo пептиди, що не перетравлюються», який використовується тут, означає дипептиди Хаа-Pro і трипептиди Хаа-Pro-Pro, які мають Pro на карбоксильному кінці, що мають високу стійкість до перетравлювання відносно in vivo пептидаз при абсорбції у кишечнику в живому організмі.

Згідно з даним винаходом середня довжина ланцюга гідролізату, отриманого гідролізом тваринного молочного казеїну, складає не більше 2,1, переважно від 1,1 до 2,1, більш переважно від 1,3 до 2,1, виражена кількістю амінокислотних залишків. При середній довжині ланцюга більше 2,1 вміст бажаних дипептидів і трипептидів, а також вільних амінокислот є низьким, і, отже, низьким є вміст бажаних in vivo пептидів, що не перетравлюються, які абсорбуються і in vivo.

Вміст дипептидів, що мають послідовність Хаа-Pro, у гідролізаті казеїну за даним винаходом зазвичай складає не менше 5% мас, переважно від 5 до 25% мас. від загальної кількості пептидів і вільних амінокислот у гідролізаті. При вмісті менш необхідних 5% in vivo абсорбційна здатність знижується, і прояв функцій є недостатнім.

Вміст трипептидів, що мають послідовність Хаа-Pro-Pro, у гідролізаті казеїну за даним винаходом зазвичай складає не менше 1% мас, переважно від 1 до 5% мас. від загальної кількості пептидів і вільних амінокислот у гідролізаті. При вмісті менш необхідного 1% мас. in vivo абсорбційна здатність знижується, і прояв функцій є недостатнім.

У казеїновому гідролізаті за даним винаходом Хаа у дипептидах, що мають послідовність Хаа-Pro, і в трипептидах, що мають послідовність Хаа-Pro - Pro, може бути будь-якою амінокислотою.

Гідролізат казеїну за даним винаходом може переважно містити He-Pro, Glu-Pro, Arg-Pro, Gin-Pro, Met-Pro і Tyr-Pro як дипептидів, що мають послідовність Хаа-Pro, і Ser-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro і Val-Pro-Pro як трипептидів, які мають послідовність Хаа-Pro - Pro.

Гідролізат казеїну за даним винаходом особливо ефективно демонструє АСЕ-інгібуючу актив-

ність і гіпотензивну дію, якщо містить такі дипептиди і трипептиди.

Гідролізат казеїну за даним винаходом, крім пептидів, містить вільні амінокислоти. Вміст вільних амінокислот зазвичай складає від 35 до 50% мас, переважно від 40 до 45% мас. від загальної кількості пептидів і вільних амінокислот у гідролізаті.

Гідролізат казеїну за даним винаходом крім пептидів і вільних амінокислот може необов'язково містити, наприклад, ліпід, золу, вуглевод, харчові волокна і воду, які зазвичай містяться у тваринному молочному казеїні, що є у продажу в кількості приблизно від 10 до 20% мас. Деякі або всі дані інгредієнти можна видалити, якщо потрібно.

Гідролізат казеїну за даним винаходом можна, наприклад, отримати способом за даним винаходом, що включає стадію (А) гідролізу тваринного молочного казеїну до середньої довжини ланцюга не більше 2,1 з використанням групи ферментів, здатних перетравлювати тваринний молочний казеїн у гідролізат, що має середню довжину ланцюга не більше 2,1, виражену кількістю амінокислотних залишків.

Тваринний молочний казеїн є білком з високим вмістом Pro і встановленою безпекою для застосування в харчових і подібних продуктах і може являти собою, наприклад, казеїн з коров'ячого молока, кіньського молока, козячого молока і овечого молока, причому переважний коров'ячий молочний казеїн.

Концентрація казеїну в тваринному молочному казеїні, який гідролізується, не має особливих обмежень і для ефективного отримання гідролізату за даним винаходом переважно може складати від 3 до 19% мас.

Група ферментів, що використовуються в способі за даним винаходом, може бути будь-якою групою ферментів, в якій ферменти здатні перетравлювати тваринний молочний казеїн у гідролізат, що має середню довжину ланцюга не більше 2,1, виражену кількістю амінокислотних залишків, вибрані і комбіновані придатним чином. Наприклад, можна переважно використовувати групу ферментів (Х), що включає пептидази, здатні розщеплювати пептидний зв'язок Pro-Хаа на карбоксильному кінці Хаа-Pro-Хаа або Хаа-Pro-Pro-Хаа.

Група ферментів (Х) може переважно містити серинпротеїнази, що мають серин в активному центрі, або металопротеїнази, які мають метал в активному центрі. Металопротеїнази можуть являти собою нейтральну протеазу I, нейтральну протеазу II або леїцинамінопептидазу. Використовуючи, щонайменше, одну з даних металопротеїназ, можна ефективно отримати цільовий гідролізат за короткий час і навіть при одностадійній взаємодії, що переважно. Пептидази, здатні розщеплювати пептидний зв'язок Pro-Хаа, можуть переважно являти собою ферменти, які мають ізоелектричні точки в кислій ділянці.

Група ферментів або група ферментів (Х) може являти собою, наприклад, групу позаклітинних ферментів, похідних koji, наприклад, Aspergillus oryzae. Така група позаклітинних ферментів може являти собою групу, отриману культивуванням клітинного тіла у придатному середовищі та екст-

ракцією водою ферментів, що продукуються позаклітинно. Особливо переважною є група позаклітинних ферментів, похідних *Aspergillus oryzae* і таких, що мають ізоелектричні точки в кислій ділянці.

Група позаклітинних ферментів, похідних *Aspergillus oryzae*, може являти собою комерційний продукт, наприклад, SUMIZYME FP, LP або MP (всі зареєстровані торгові марки виробництва SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD.), UMAMIZYME (зареєстрована торгова марка виробництва AMANO ENZYME, INC.), Sternzyme B11024 і PROHIDROXY AMPL (обидві торгові марки виробництва HIGUCHI INC.), ORIENTASE ONS (зареєстрована торгова марка виробництва HANKYU BIOINDUSTRY CO.) і DENAZYME AP (зареєстрована торгова марка виробництва NAGASE SEIKAGAKU), причому особливо переважний SUMIZYME FP (зареєстрована торгова марка виробництва SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD.).

Такі ферменти, що є у продажу, зазвичай мають специфічні оптимальні умови. Умови, наприклад, кількість ферментів, які використовуються, і час взаємодії можна відповідним чином відрегулювати в залежності від групи ферментів, що використовуються, таким чином, щоб можна було отримати гідролізат казеїну за даним винаходом.

Для гідролізу можна, наприклад, додати групу ферментів до водного розчину тваринного молочного казеїну при масовому співвідношенні група ферментів/тваринний молочний казеїн не нижче 1/1000, переважно від 1/10 до 1/1000, більш переважно від 1/10 до 1/100, найбільш переважно від 1/10 до 1/40.

Умови реакції можна вибрати відповідним чином в залежності від групи ферментів, що використовуються, таким чином, щоб отримати цільовий гідролізат казеїну. Зазвичай можна здійснювати взаємодію при температурі від 25 до 60°C, переважно від 45 до 55°C, рН від 3 до 10, переважно від 5 до 9, більш переважно від 5 до 8. Час ферментативної взаємодії зазвичай складає від 2 до 48 годин, переважно від 7 до 15 годин.

Ферментативну взаємодію можна припинити, інактивуючи ферменти. Як правило, для припинення взаємодії інактивують ферменти при температурі від 60 до 100°C.

Після припинення ферментативної взаємодії отриманий осад можна переважно видалити центрифугуванням або за допомогою різних фільтрів за бажанням.

Крім того, з отриманого гідролізату можна видалити пептиди, які мають гіркий смак або запах, що можна здійснити, застосовуючи активоване вугілля, гідрофобну смолу або подібне. Наприклад, можна додати до гідролізату від 1 до 20% мас. активованого вугілля відносно кількості казеїну, що використовується, і провести взаємодію протягом 1-10 годин для видалення таких гірких і таких компонентів, які пахнуть. Використане активоване вугілля можна видалити звичайним способом, наприклад, центрифугуванням або мембранним фільтруванням.

Реакційну рідину, яка містить гідролізат казеїну, отриману на стадії (A), можна додати, як є, до рідких продуктів, наприклад, напоїв. Для підви-

щення універсальності гідролізату казеїну за даним винаходом реакційну рідину можна переважно концентрувати і висушити до порошоків.

Такі порошки можна використовувати як різні функціональні харчові продукти, домішки для них, лікарські препарати та їх активні інгредієнти. Порошки можна необов'язково змішати з різними допоміжними домішками для поліпшення поживного балансу або смаку. Приклади таких допоміжних домішок можуть включати різні вуглеводи, ліпіди, вітаміни, мінерали, підсолоджуючі речовини, смакові агенти, пігменти та агенти для поліпшення текстури.

Порошки, що містять гідролізат казеїну за даним винаходом, можна використовувати, додаючи, наприклад, до напоїв, йогурту, рідких харчових продуктів, желе, цукерок, стерилізованих в автоклаві (retort) харчових продуктів, таблетованих солодошів, печива, бісквітів, хлібу, сухого печива, шоколаду і подібному, або готуючи препарати у вигляді капсул, таблеток і подібного.

Оскільки гідролізат казеїну за даним винаходом можна використовувати вказаним вище способом, даний гідролізат можна ефективно застосовувати у виробництві функціональних харчових продуктів, таких як різні ізотонічні напої, звичайні напої, звичайні харчові продукти, харчові домішки, поживні функціональні харчові продукти, що приносять вкладену у них користь для здоров'я, або у виробництві лікарських препаратів.

У прикладах, що обговорюються далі, встановлено, що гідролізат казеїну за даним винаходом має АСЕ-інгібуючу активність і гіпотензивний ефект, так що даний гідролізат можна використовувати, наприклад, як агент для виробництва функціональних харчових продуктів, що мають таку активність і ефект, або як агент для виробництва лікарських препаратів.

Якщо гідролізат казеїну за даним винаходом використовують як агент, що має АСЕ-інгібуючу активність або гіпотензивний ефект, переважна доза даного агента для перорального введення людині зазвичай така, що допускає прийом від 0,1 до 100 мг/кг, переважно від 1 до 20 мг/кг пептидів і вільних амінокислот у гідролізаті казеїну на введення. Таким чином, кількість гідролізату казеїну за даним винаходом або агента, що має АСЕ-інгібуючу активність або гіпотензивний ефект, якщо його використовують при додаванні у різні напої, харчові продукти або лікарські препарати, можна вибрати відповідним чином, беручи до уваги вказане вище дозування.

Згідно зі способом за даним винаходом гідролізом тваринного молочного казеїну при одностадійній взаємодії з групою ферментів, що включає вказану вище групу ферментів (X), можна отримати Хаа-Pro-Pro, яка міститься в тваринному молочному казеїні, зокрема, Ile-Pro-Pro і/або Val-Pro-Pro, різні функції яких, включаючи гіпотензивну і антистресову дію, встановлені, з високим виходом, близьким до теоретичного отримання, наприклад, не нижче 60%, переважно не нижче 70% у порівнянні з традиційними способами. Отже, даний спосіб є не тільки способом отримання гідролізату казеїну за даним винаходом, але також ефективним способом виробництва перетравлених продук-

ктів, що містять значну кількість цільового Хаа-Pro-Pro, або очищених продуктів з тваринного молочного казеїну або харчового білка, що має високий вміст Хаа-Pro-Pro.

ПРИКЛАДИ

Тепер даний винахід буде пояснений більш конкретно з посиланням на приклади, приклад аналізу і порівняльні приклади, які є тільки ілюстративними і не призначені для обмеження даного винаходу.

Приклад 1 і порівняльні приклади з 1 по 8

Додавали 1 г казеїну з коров'ячого молока (виробництва NIPPON NZMP) до 99 г дистильованої води приблизно при 80°C і ретельно перемішували. До суміші додавали 1N розчин гідроксиду натрію (виробництва WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), доводячи рН до 7,0. Для отримання розчину субстрату доводили температуру до 20°C.

До отриманого таким чином розчину субстрату додавали кожний з різноманітних ферментів, показаних у таблиці 1, таким чином, щоб масове співвідношення фермент/казеїн складало 1/25. Здійснювали взаємодію суміші при 50°C протягом 14 годин і потім піддавали її автоклавній обробці при 110°C протягом 10 хв для інактивації ферментів, отримуючи при цьому розчин продуктів ферментативного перетравлювання казеїну. Отриманий розчин продуктів ферментативного перетравлювання сушили розпиленням, отримуючи порошки.

Проводили аналіз інгредієнтів отриманих таким чином порошків. Білок визначали методом Kjeldahl і амінокислоти за допомогою амінокислотного аналізатора. Кількість, отримана відніманням кількості амінокислот з кількості білка, приймали за кількість пептидів. Далі визначали кількість ліпідів способом із застосуванням кислотного гідролізу, золу прямим спалюванням і воду способом з використанням сушильної шафи. Кількість кожного інгредієнта віднімали з 100%, підсумок приймали за кількість вуглеводів. У результаті визначено, що порошки містять 35,8% мас. амінокислот, 45,7% мас. пептидів, 6,6% мас. води, 0,2% мас. ліпідів, 4,1% мас. золи і 7,6% мас. вуглеводів.

Визначення середньої довжини ланцюга

Середню довжину ланцюга амінокислот і пептидів, які містяться в отриманих порошках, встановлювали, визначаючи кількість молей, що використовують реагент ОРА, який взаємодіє з аміногрупами вільних амінокислот і пептидів у порошках, аналогічно визначаючи кількість молей кислотного гідролізату казеїну, і оцінюючи співвідношення цих двох величин. Результати показані в таблиці 1.

Розчиняли 40 мг орто-фталальдегіду (гарантований реагент для флуоресцентного аналізу, що проводиться NACAL TESQUE, INC.) в 1 мл метанолу і додавали 100 мкл β-меркаптоетанолу. Розчин орто-фталальдегіду розводили до 25 мл, використовуючи 25 мл 100 мМ розчину тетраборату натрію, заздалегідь змішаного з 2,5 мл 20% додецилнатріюсульфату, і потім до 50 мл дистильованою водою, отримуючи реагент ОРА.

Кожний зразок порошку 1% ферментативного гідролізату казеїну, отриманий взаємодією з кожним ферментом (таблиця 1) розчиняли у придат-

ному розчиннику при придатній концентрації і центрифугували при 15000 об/хв протягом 10 хв. Відбирали 50 мкл супернатанту. Потім додавали 1 мл отриманого вище реагенту ОРА, ретельно перемішували і залишали при кімнатній температурі на 5 хв. Вимірювали поглинання при 340 нм, використовуючи абсорбціометр (торгова марка Ubest-35 виробництва JASCO CORPORATION).

Отримували 1 % кислотний гідролізат казеїну, розбавлений належним чином, і проводили на ньому аналогічні вимірювання, отримуючи калібровочну криву, з якої визначали співвідношення поглинання і молярної концентрації. Середню довжину ланцюга розраховували згідно з наступною формулою:

середня довжина ланцюга = (молярна концентрація 1 % кислотного гідролізату казеїну)/(молярна концентрація кожного зразка 1% ферментативного гідролізату казеїну).

Таблиця 1

	Походження ферменту	Комерційний фермент	Середня довжина ланцюга
Приклад 1	<i>Aspergillus oryzae</i>	SUMIZYME FP ¹⁾	1,4
Порівняльний приклад 1	Селезінка свині	Тріпсин ²⁾	6,0
Порівняльний приклад 2	<i>Bacillus subtilis</i>	SUMIZYME CP ³⁾	4,1
Порівняльний	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	PROTEASE S ⁴⁾	4,5
приклад 3			
Порівняльний приклад 4	Папайя	Очищений папайн ⁵⁾	7,9
Порівняльний приклад 5	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	Термоаза ⁶⁾	4,6
Порівняльний приклад 6	<i>Rizopus niveus</i>	NEURASE F3G ⁷⁾	4,9
Порівняльний приклад 7	<i>Rizopus delemar</i>	SUMIZYME RP ⁸⁾	4,0
Порівняльний приклад 8	Ананас	BROMELAIN ⁹⁾	5,5

1), 3), 5), 7): вироблені SHIN NIHON CHEMICAL CO LTD.; 2): вироблений HIGUCHI, INC.; 4): вироблений AMANO ENZYME, INC.; 5): вироблений NAGASE & CO., LTD.; 6): вироблений DAIWA KASEI K.K.; 7): вироблений NOVOZYME JAPAN.

Визначення амінокислот, що складають пептиди

Порошки, отримані у прикладі 1, розчиняли у придатній кількості дистильованої води і аналізували, використовуючи автоматичний аналізатор пептидів (торгова марка PPSQ-10 виробництва SHIMADZU CORPORATION) для визначення амінокислотних залишків від N-кінця в порошках. Результати показані у таблиці 2. До речі, автоматичний аналізатор пептидів не детектує вільні амінокислоти. Загальна кількість п'ятих амінокислотних залишків становила 120 пмоль, і загальна кількість шостих амінокислотних залишків становила 100 пмоль. З даних результатів виявлено, що більшість пептидів, які містяться в порошках, являють собою дипептиди і трипептиди. Виявлено також, що процент пептидів, які мають Про як другий залишок, становить 49,5%, що дуже багато, і процент пептидів, які мають Про як третій залишок, становить 29,8%, що також багато.

Таким чином, очікується, що порошки містять значну кількість Хаа-Pro і Хаа-Pro-Pro, які мають

високу стійкість до ферментативного перетравлювання *in vivo* протеазою, так що дані пептиди є оптимальними для використання як функціональні пептиди.

Таблиця 2

Амінокислота	1-ий залишок (пмоль)	2-ий залишок (пмоль)	3-ий залишок (пмоль)	4-ий залишок (пмоль)	Вміст у казеїні (% мас.)
Asp	82	304	115	63	6,6
Glu	139	127	89	121	20,5
Asn	55	49	46	91	включено в Asp
Gln	80	97	104	80	включено в Glu
Ser	105	36	27	16	5,23
Thr	31	16	25	18	4,2
His	28	94	58	0	2,6
Gly	256	38	33	16	1,9
Ala	323	101	58	30	2,8
Tyr	725	114	52	28	5,4
Arg	13	7	6	8	3,6
Met	182	43	36	10	2,5
Val	869	127	196	64	6,1
Pro	42	1371	431	186	10,1
Trp	94	46	26	6	1,3
Phe	800	88	60	28	4,6
Lys	81	33	57	19	7,5
Ile	350	37	17	10	5,1
Leu	400	39	50	10	9,4
Усього	4317	2767	1447	387	100,0

Оцінка абсорбційної здатності та стійкості до перетравлювання Хаа-Pro-Pro у живому організмі

Для оцінки абсорбційної здатності і стійкості до перетравлювання в живому організмі пептидів, що мають послідовність Хаа-Pro або Хаа-Pro-Pro і містяться в порошках ферментативного гідролізату казеїну, отриманого в прикладі 1 і показаного в таблиці 1, досліджували на щурах абсорбцію пептидів у кров після перорального введення таким чином.

Двом двотижневим щурам SD (Sprague Dawley) вводили перорально 500 мг/тварину кожного з Val-Pro-Pro, наприклад, Хаа-Pro-Pro і Gly-Gly як дипептиду, що не має Pro. Відбирали зразки крові з воротної вени з інтервалами і визначали абсорбцію кожного пептиду в кров. Результати показані на фіг. 1.

Фіг.1 підтверджує, що Gly-Gly легко перетравлюється *in vivo*, так що детектується Gly, тоді як Val-Pro-Pro вбирається в кров відносно стабільно. На основі даних результатів очікується, що дипептиди і трипептиди, які мають послідовності Хаа-Pro і Хаа-Pro-Pro, відповідно, демонструють високу абсорбційну здатність і стійкість до перетравлювання в живому організмі.

Оцінка гіпотензивного ефекту

Кожний з порошків гідролізату казеїну, отриманих у прикладі і порівняльних прикладах, показаному в таблиці 1, вводили перорально п'яти 27-тижневим спонтанно гіпертензивним щурам (SHR) (самцям) при дозі 32 мг/кг маси тіла. Вимірювали кров'яний тиск до введення і через 5 годин після

введення способом накладення манжети на хвіст за допомогою Tail-cuff PB-98 (виробництва SOFTRON), оцінюючи зміну кров'яного тиску. Як контроль замість порошків вводили казеїн і проводили таку саму оцінку. Перед вимірюванням кров'яного тиску щурів нагрівали у заздалегідь нагрітій камері (виробництва CSI JAPAN) при 45°C протягом 8 хв. Результати показані в таблиці 3.

З таблиці 3 виявлено, що при використанні казеїну як контролю не спостерігали зміни кров'яного тиску, тоді як при введенні порошків прикладу 1 спостерігали гіпотензивну дію. З іншого боку, не спостерігали зміни кров'яного тиску при використанні порошків порівняльних прикладів. Таким чином, показано, що гідролізат казеїну прикладу 1, що містить конкретну кількість Хаа-Pro і Хаа-Pro-Pro і має середню довжину ланцюга не більше 2,1, надає чудову гіпотензивну дію.

Крім того, згідно з описаним вище способом, гіпотензивну дію, що залежить від дози, досліджували, використовуючи порошки гідролізату казеїну, отримані у прикладі 1. Результати показані в таблиці 4 і на фіг.2.

Оцінка ACE-інгібуючої активності

ACE з бичачої легені (виробництва WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) розчиняли в 0,1М боратному буфері при pH 8,3 у кількості 0,1 Од., отримуючи розчин ACE. Вносили в пробірку 80 мкл розбавленого розчину ферментативного гідролізату, отриманого 50-разовим розбавленням порошків кожного представленого в таблиці 1 ферментативного гідролізату дистильованою водою, 200 мкл 5 мМ розчини піпурил-гістидил-лейцин (виробництва SIGMA) і 20 мкл отриманого вище розчину ACE і проводили взаємодію при 37°C протягом 30 хв. Потім взаємодію припиняли, додаючи 250 мкл 1N соляної кислоти. Потім додавали 1,7 мл етилацетату і перемішували. Відбирали 1,4 мл етилацетатного шару, помішували в іншу пробірку і випарювали при 120°C протягом приблизно 60 хв, отримуючи висушений продукт. Висушений продукт розчиняли в 1 мл дистильованої води і визначали поглинання екстрагованої етилацетатом піпурової кислоти при 228 нм. Як контролі визначали поглинання розчину без розбавленого розчину ферментативного гідролізату і розчину без розбавленого розчину ферментативного гідролізату і розчину ACE. З отриманого поглинання розраховували ACE-інгібуючу активність згідно з наступною формулою. Результати показані в таблиці 3.

ACE-інгібуюча активність (%) = [(A-B)/A]x100

A: (поглинання розчину без розбавленого розчину ферментативного гідролізату, але з розчином ACE) - (поглинання розчину без розбавленого розчину ферментативного гідролізату і розчину ACE)

B: (поглинання розчину з розбавленим розчином ферментативного гідролізату і розчином і ACE) - (поглинання розчину з розбавленим розчином ферментативного гідролізату, але без розчину ACE)

Таблиця 3

Гідролізат ферменту	АСЕ-інгібуюча активність (%/мкг)	Пониження кров'яного тиску (середн. ± SD)
Приклад 1	4,1	-25,0±4,3***
Порівняльний приклад 1	0,8	-4,3±5,3
Порівняльний приклад 2	1,2	-
Порівняльний приклад 3	1,4	-3,7±6,4
Порівняльний приклад 4	1,0	2,8±5,2
Порівняльний приклад 5	1,1	-
Порівняльний приклад 6	0,9	2,9±5,4
Порівняльний приклад 7	0,7	-5,1±7,0
Порівняльний приклад 8	1,1	-4,6±6,9
Контроль	-	-2,5±7,5

Таблиця 4

Дозування порошків(мг/кг)	Зміна кров'яного тиску (мм.рт.ст.)	Стандартне відхилення
96	-31	4,3
32	-25	1,9
9,6	-14,4	3,2
0	0	6,9

Визначення пептидів у ферментативному гідролізаті

Порошки ферментативного гідролізату прикладу 1, представленого в таблиці 1, розчиняли в дистильованій воді при концентрації 10 мг/мл. З іншого боку, готують розчини 25 мкг/мл, 50 мкг/мл і 100 мкг/мл кожного хімічно синтезованого стандартного пептиду, що має послідовність, показану в таблиці 5. Данні розчини аналізували способом РХ/МС у вказаних нижче умовах. Серед піків, показаних при аналізі розчинів порошків, ідентифіковані піки, що відповідають молекулярній масі і часам утримування, які є ідентичними відповідним величинам стандартних пептидів, які представляють ті самі послідовності, що і стандартні пептиди. Піки розчину порошку порівнювали з піками стандартних пептидів, визначаючи вміст кожного представленого в таблиці 4 пептиду в розчині порошку. Результати показані в таблиці 5.

Виявлено, що кількість пептидів і вільних амінокислот у розчині, приготованому розчиненням порошків у дистильованій воді, становить 8,15 мг/мл, кількість пептидів становить 4,57 мг/мл і кількість Хаа-Pro в пептидах становить 514,5 мкг, так що процент Хаа-Pro відносно загальної кількості пептидів і вільних амінокислот у порошках становить 6,3% мас. Крім того, кількість Хаа-Pro-Pro у пептидах становить 116,5 мкг, так що процент Хаа-Pro-Pro відносно загальної кількості пептидів і вільних амінокислот у порошках становить 1,4% мас.

Апаратура, що використовується

Високоєфективний рідинний хроматограф-мас-спектрометр: LCMS-2010; системний регулятор: SCL-10Advp; автоматичний інжектор: SIL-10Advp; насос для подачі розчинників: LC-10Advp

х 2; піч колонного типу: CTO-10Avp; фотодіодний матричний детектор: SPD-M10AVP; системний дегазатор: DGU-14A (усі торгові марки виробництва SHIMADZU CORPORATION); колонка: Develosil C30-UG-3 (2,0 мм внутрішній діаметр х 150 мм довжина) (виробництва NOMURA CHEMICAL CO., LTD.)

Умови для вимірювань

Рухома фаза А: водний розчин 0,1% мас. мурашиної кислоти; рухома фаза В: 100% розчин ацетонітрилу; часова програма: 0% В (0 хв) - 7,5% В (30 хв) - 80% В (30,01 хв) - 100% В (35 хв) - 0% В (35,1 хв) - СТОП (45 хв); кількість зразка для введення: 5 мкл; температура колонки: 50°C; довжина хвилі детектування: від 200 до 300 нм; спосіб іонізації: ESI (+); швидкість потоку газу, що розпилюється: 4,5 л/хв; прикладена напруга: +4,5 кВ; CDL температура: 250°C; температура нагрівача централізованого теплопостачання: 200°C; CDL вольтаж: 0,0 В; Q-вольтаж (Q-array voltage): SCAN; спосіб аналізу: SIM вимірювання; діапазон, що досліджується: EP (m/z=245,2), IP (m/z=229,3), MP (m/z=247,3), QP (m/z=244,2), RP (m/z=272,3), SPP (m/z=300,3), VPP (m/z=312,1), IPP (m/z=326,1); час введення: 0,5 сек./Ch.

Таблиця 5

Пептидна послідовність	Концентрація в 10 мг/мл порошках (мкг/мл)
Ile-Pro	16,0
Glu-Pro	7,1
Arg-Pro	10,3
Gln-Pro	34,5
Met-Pro	18,4
Tyr-Pro	128,9
Ilnhi Xaa-Pro	299,4
Ser-Pro-Pro	2,9
Val-Pro-Pro	29,5
Ile-Pro-Pro	28,1
Phe-Pro-Pro	27,2
Ilnhi Xaa-Pro-Pro	28,8

Приклад аналізу 1

Ідентифікація ферментів

Серед позаклітинних ферментів, похідних *Aspergillus oryzae*, що використовуються в прикладі 1, ферменти, необхідні для отримання гідролізату казеїну за даним винаходом, аналізували наступним способом. До речі, усі наступні операції проводили при 4°C, якщо не вказано інше. Всі використані реагенти є гарантованими реагентами виробництва WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., якщо не вказано інше.

Вплив різних інгібуючих агентів на ферменти

Розчиняли 2000 мг SUMIZYME FP (зареєстрована торгова марка виробництва SHINNINON CHEMICAL CO., LTD.) у 10 мл 50 мМ фосфатного буфера при pH 7,2 і видаляли нерозчинні речовини за допомогою целюлозацетатної мембрани (DISMIC-25cs, діаметр по р 0,45 мкм виробництва ADVANTEC), отримуючи сирий ферментний розчин.

Взаємодію даного сирого ферментного розчину з 1% казеїном проводили так само як у прикладі 1. Потім додавали до реакційної системи інгібітор металопротеази EDTA (етилендіамінтетраоцтову

кислоту) або інгібітор серинпротеази PMSF (фенілметансульфонілфторид), середня довжина ланцюга була більшою, і не можна було отримати цільовий гідролізат. Даний факт передбачає, що металопротеаза або серинпротеаза грають важливу роль у виробництві гідролізату казеїну за даним винаходом.

Виділення за допомогою іонообмінної смоли

Активували 20 мл аніонообмінної смоли DEAE sephacel (виробництва AMERSHAM BIOSCIENCES K.K.), врівноважували її 50 мМ фосфатним буфером з рН 7,2 і набиляли скляну колонку діаметром 1,5 см x 12 см. Притому, що весь ефлюент збирали як неадсорбований зразок, сирий ферментний розчин адсорбувався при швидкості потоку 1,0 мл/хв. Потім колонку ретельно промивали 50 мМ фосфатним буфером з рН 7,2 при 10-разовій за об'ємом кількості відносно гелю і елюювали 200 мл 50 мМ фосфатного буфера з рН 7,2, що містить лінійний градієнт NaCl (від 0 до 600 мМ). Елюат фракціонували на 100 фракцій по 5 мл кожна. Для кожної фракції визначали поглинання при 280 нм, протеїназну активність і АС-інгібуючу активність.

Визначення протеїназної активності

Розчиняли 25 мг флуоресцентно-міченого (флуоресцеїнізотіоціанатом) казеїну (FITC-казеїн, виробництва SIGMA), в 5 мл 50 мМ фосфатного буфера при рН 7,2, отримуючи розчин субстрату. Змішували 10 мкл кожної фракції з 20 мкл розчину субстрату і проводили взаємодію при 55°C протягом 10 хв. Взаємодію припиняли, додаючи 120 мкл 5% розчину трихлорацетату, і отриману реакційну рідину центрифугували при 1500 об/хв. Відбирали 60 мкл супернатанту, змішували з 3 мл 0,5 М трис-гідрохлориду з рН 8,5 і проводили вимірювання, використовуючи флуориметр (F-1300, виробництва HITACHI, LTD.), визначаючи довжину хвилі збудження при 485 нм і довжину хвилі флуоресценції при 525 нм.

З результатів визначення поглинання при 280 нм кожні фракції DEAE sephacel-елюату встановлено, що приблизно 73% білка абсорбується на аніонній іонообмінній смолі. На фіг.3 показаний характер елюювання зв'язаного білка при лінійному градієнті від 0 до 0,6М NaCl і протеолітична активність.

Фракції з 21 по 60 містять особливо велику кількість елюйованих білків. Крім того, елюйований ферментний розчин кожної фракції оцінювали на активність за генерацією АСЕ-інгібуючих компонентів при гідролізі казеїну. У результаті підтверджено, що фракції з 20 по 60 переважно мають активність за генерацією АСЕ-інгібуючих компонентів.

З іншого боку, протеїназну активність, виміряну з використанням FITC-казеїну як субстрату, спостерігали, головним чином, у фракціях з 19 по 27 (при вмісті NaCl від 0,1 М до 0,2 М), цей факт вказує, що протеїназна активність виконує важливу функцію в генерації АСЕ-інгібуючих компонентів. З даних результатів виявлено, що протеїназна активність грає важливу роль у ферментативній активності, очищаючи АСЕ-інгібуючі компоненти від казеїну.

Ідентифікація вмісних протеїназ

З DEAE sephacel-елюйованих фракцій збирали фракції з 21 по 35, що мають протеїназну актив-

ність, і проводили діаліз відносно 5 л 5 мМ фосфатного буфера з рН 7,2. Суспендували Sephacryl S-300 HR (виробництва AMERSHAM BIOSCIENCES K.K.) в 50 мМ фосфатному буфері з рН 7,2, що містить 200 мМ NaCl, повністю дегазували і набиляли скляну колонку з діаметром 18 см x 100 см. Дану колонку повністю врівноважували 50 мМ фосфатним буфером з рН 7,2, що містить 200 мМ NaCl при постійній швидкості потоку 2 мл/хв. Діалізований зразок вносили в дану колонку і отримували 100 фракцій по 10 мл кожна. Для кожної фракції визначали поглинання при 280 нм і протеїназну активність, використовуючи FITC-казеїн як субстрат.

Електрофорез на поліакриламідному гелі

Відбирали 10 мкл кожної фракції, змішували з 10 мкл буфера для зразка, складеного з 0,125 М Трис-буфера з рН 6,8, 3% SDS, 5% меркаптоетанолу, 10% гліцерину і 0,01% бромфенолового синього, нагрівали при 95°C протягом 5 хв і охолоджували при кімнатній температурі. Отриманий зразок піддавали електрофорезу згідно зі способом Laemmli (Nature, 227, 680 (1970)), використовуючи міні-пластинки (виробництва ATTO CORPORATION) і поліакриламідний гель з наміченою концентрацією за умови 30 мА на гель. По завершенні електрофорезу гель занурювали в розчин барвника Coomassie Brilliant Blue, складений з 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% метанолу і 7,5% оцтової кислоти, на 10 хв і пропускали через фільтр у знебарвлюючий препарат, складений з 5% метанолу і 7,5% оцтової кислоти, до повного знебарвлення фону. Молекулярну масу отримували за допомогою розрахунку з рухомості кожної смуги білка, використовуючи маркери молекулярної маси (виробництва AMERSHAM BIOSCIENCES K.K.).

Фракції, адсорбовані на аніонній іонообмінній смолі і такі, що мають активність за генерацією АСЕ-інгібуючих компонентів, піддавали гел'єфільтрації через смолу Sephacryl S-300 і спостерігали активність у фракціях, які відповідають молекулярній масі близько 45 кДа. Дані фракції аналізували методом електрофорезу на SDS-поліакриламідному гелі в 12,5% гелі, спостерігаючи по суті окремі смуги при 44 кДа і 40 кДа. Дані смуги вирізували і аналізували на N-термінальній послідовності. Виявлено, що смуга при 44 кДа має послідовність, яка високо гомологічна відомій нейтральній протеазі I плісняви *Koji* (*Aspergillus*), і смуга при 40 кДа має послідовність, яка високо гомологічна відомій нейтральній протеазі II плісняви *Koji* (*Aspergillus*).

З даних результатів визначено, що протеїнази, адсорбовані на аніонообмінній смолі, які генерують АСЕ-інгібуючі компоненти для казеїну, містять, щонайменше, дві протеїнази: нейтральну протеазу I і нейтральну протеазу II.

У зв'язку з подальшим гідролізом компонентів, генерованих гідролізом казеїну протеїназами, аналізували пептидази, які діють на пептиди, наступним способом.

Для ідентифікації ферментів по виробництву пептидів, що мають високий вміст Хаа-Pro і Хаа-Pro-Pro, які є відмінною ознакою даного винаходу, синтезували різні пептиди-попередники для Val-

Pro-Pro і оцінювали можливість їх перетворення в Val-Pro-Pro.

Очищення ферментів для обробки аміно-кінців 3 DEAE sephacel-елюйованих фракцій збирали фракції з 21 по 37, що мають активність по генерації ACE-інгібуючих компонентів, і проводили діаліз відносно 5 л 5 мМ фосфатного буфера з рН 7,2. Суспендували гідроксіпатит (виробництва WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) в 5 мМ фосфатному буфері з рН 7,2, повністю дегазували і набивали пластикову колонку з діаметром 1,5 см x 12 см. Дану колонку промивали 5 мМ фосфатним буфером з рН 7,2 у кількості не менше 10-кратної кількості гідроксіпатиту. Діалізовані фракції, що мають активність за генерацією ACE-інгібуючих компонентів, вносили в дану колонку з гідроксіпатитом і збирали всі фракції, що пройшли через колонку.

Визначення амінопептидазної активності

Амінопептидазну активність визначали наступним способом. Синтезований пептид Val-Val-Val-Pro-Pro розчиняли в 50 мМ фосфатному буфері з рН 7,2 при концентрації 50 мкг/мл, отримуючи розчин субстрату. Змішували 45 мкл даного розчину субстрату з 5 мкл ферментної фракції і проводили взаємодію в інкубаторі при 55°C протягом 30 хв. Взаємодію припиняли за допомогою нагрівання при 98°C протягом 5 хв. Відбирали придатну кількість даної реакційної рідини і піддавали аналізу на вискоефективному рідинному хроматографі-мас-спектрометрі (виробництва SHIMADZU CORPORATION), оцінюючи кількість генерованого Val-Pro-Pro.

Фракції, адсорбовані на аніонообмінній смолі і такі, що мають активність за генерацією ACE-інгібуючих компонентів, піддавали електрофорезу на SDS-поліакриламідному гелі в 10% гелі і вирізали смугу при 32 кДа. Основний білок екстрагували і очищали, отримуючи по суті окремий білок 32 кДа. Аналізували послідовність на N-кінці даного білка, виявивши, що послідовність до десятого залишку від N-кінця гомологічна послідовності відомої лейцинамінопептидази плісняви *koji* (*Aspergillus*). Зроблений висновок, що фракції, які мають встановлену активність за генерацією ACE-інгібуючих компонентів, містять лейцинамінопептидазу.

З даних результатів зрозуміло, що фракції, адсорбовані на аніонообмінній смолі і ті, що мають активність за генерацією ACE-інгібуючих компонентів, містять, щонайменше, лейцинамінопептидазу, яка має амінопептидазну активність, що грає важливу роль в активності за генерацією ACE-інгібуючих компонентів. Визначення карбоксил-термінальної технологічності ферментів

Розчиняли синтезований пептид Val-Pro-Pro-Phe-Leu в 50 мМ фосфатному буфері з рН 7,2 при концентрації 45 мкг/мл, отримуючи розчин субстрату. Змішували 50 мкл даного розчину субстрату з 5 мкл розчину кожного ферменту і проводили взаємодію в інкубаторі при 55°C протягом 30 хв.

Взаємодію припиняли за допомогою нагрівання при 98°C протягом 5 хв. Відбирали відповідну кількість даної реакційної рідини і аналізували на вискоефективному рідинному хроматографі-мас-спектрометрі (виробництва SHIMADZU

CORPORATION), оцінюючи концентрацію отриманого Val-Pro-Pro.

Оцінювали карбоксил-термінальну технологічність кожної DEAE sephacel-елюйованої фракції, виявивши, що фракції з 30 по 50 мають ферментативну активність по перетворенню Val-Pro-Pro-Phe-Leu в Val-Pro-Pro.

Приклад 2

Підтвердження ACE-інгібуючої активності гідролізату казеїну комбінацією очищених ферментів

З прикладу аналізу 1 встановлено, що активність за генерацією ACE-інгібуючих компонентів фракцій, адсорбованих на аніонообмінній смолі, позаклітинного ферменту з *Aspergillus oryzae* (SUMIZYME FP (зареєстрована торгова марка виробництва SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD.)) включає чотири ферментативних активності, а саме, протеїназні активності, включаючи, щонайменше, активність нейтральних протеаз I і II, амінопептидазну активність, включаючи активність лейцинамінопептидази, і активність по розщепленню карбоксильного кінця безпосередньо після проліну.

Серед адсорбованих фракцій (див. фіг.3) отримана фракція I, що має високу протеїназну активність (фракції з 1 по 35 на фіг.3), фракція II, яка має високу активність по розщепленню карбоксильного кінця безпосередньо після проліну (фракції з 36 по 55 на фіг.3), далі фракція III (фракції з 56 по 100 на фіг.3) і неадсорбовані фракції, що мають протеїназну активність.

Кожну фракцію додавали окремо або в комбінації, як показано в таблиці 6, до 1 мл 1% розчину казеїну з коров'ячого молока, проводили взаємодію при 55°C протягом 13 годин, отримуючи гідролізат казеїну. По завершенні взаємодії кожний з отриманих гідролізатів казеїну оцінювали на ACE-інгібуючу активність і середню довжину ланцюга згідно зі способом, описаним у прикладі 1. Як контроль проводили такі самі визначення на сирому ферментному розчині у кількості 1/10000, що пройшла очищення. Результати показані в таблиці 6.

Таблиця 6

Використані фракції	ACE-інгібування (%)	Середня довжина ланцюга перетравлених продуктів
Сирі ферментні фракції	79	1/8
Неадсорбовані фракції	45	3,7
Фракція I	46	2,3
Фракція II	27	2,75
Фракція III	0	-
Неадсорбовані фракції + Фракція II	70	2,1
Фракції I+II	56	1,8
Неадсорбовані фракції + Фракції I+II	77	1,7
Неадсорбовані фракції + Фракції I+II+III	78	1,6
Неадсорбовані фракції + Фракція III	52	-
Фракції I+III	40	-
Фракції II+III	12	-
Неадсорбовані фракції + Фракції II+III	68	-
Фракції I+II+III	43	-

З таблиці 6 виявлено, що компоненти, які мають сильну ACE-інгібуючу активність, містяться в неадсорбованих фракціях, фракціях, що мають

високу протеїназну активність, і до фракцій, які мають активність по розщепленню карбоксильного кінця безпосередньо після проліну. Виявлено також, що група ферментів, елюйованих приблизно при 300 мМ NaCl, генерує ACE-інгібуючі компоненти таким чином, що фракція III не потрібна.

Визначали і порівнювали середню довжину ланцюга гідролізату казеїну, отриманого гідролізом з використанням кожної фракції, що демонструє високу активність за генерацією ACE-інгібуючих компонентів. Виявлено, що середня довжина ланцюга для неадсорбованих фракцій, фракції I і фракції II, складає більше 2,1, але об'єднуючи дані фракції, отримували гідролізат казеїну із середньою довжиною ланцюга не більше 2,1.

Приклад 3

Додавали 15г казеїну з коров'ячого молока (виробництва NIPPON NZMP) до 85 г дистильованої води при температурі приблизно 80°C і ретельно перемішували. Додавали до суміші IN розчин гідроксиду натрію, доводячи рН до 7,0. Температуру доводили до 20°C, отримуючи розчин субстрату.

До отриманого таким чином розчину субстрату додавали як групу ферментів SUMIZYME FP (zareestrovana торгова марка виробництва SHIN Nihon Chemical Co., LTD.), яка являє собою позаклітинні ферменти, похідні *Aspergillus oryzae*, так що масове співвідношення фермент/казеїн складало 1/25. Проводили взаємодію даної суміші при 50°C протягом 20 годин, при цьому відбирали з інтервалами зразки реакційної рідини для оцінки ACE-інгібуючої активності і середньої довжини ланцюга відносно часу, аналогічно прикладу 1. Результати показані на фіг.4 і 5. Ферментативно перетравлений розчин, відібраний через 12 годин взаємодії, яка демонструвала максимальну ACE-інгібуючу активність, сушили розпиленням, отримуючи порошки суміші пептидів.

З фіг.4 і 5 встановлено, що ACE-інгібуюча активність зростає зі збільшенням часу взаємодії і знижується після 12 год. взаємодії. З оцінки кількості пептидів також встановлено, що ACE-інгібуюча активність зростає при середній довжині ланцюга приблизно від 1,3 до 2,1.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> CALPIS CO., LTD.

<120> ГІДРОЛІЗАТ КАЗЕЇНУ, СПОСІБ ЙОГО ОТРИМАННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 10237

<140> JP2003-285007

<141> 2003-08-01

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> Білок

<213> *Bos taurus*

<400> 1

Val Val Val Pro Pro
1 5

<210> 2

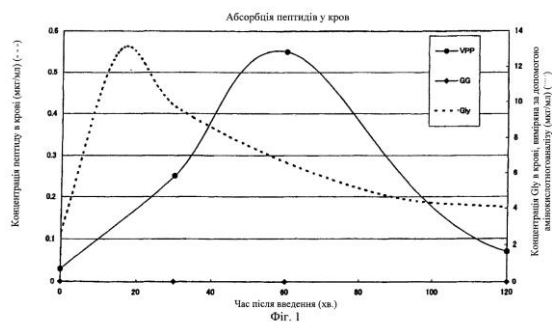
<211> 5

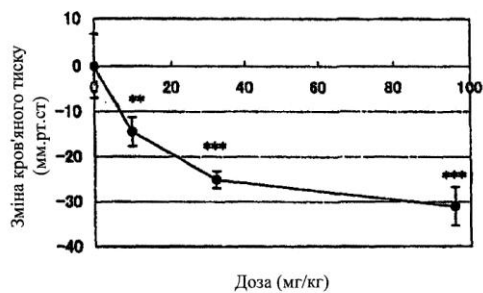
<212> Білок

<213> *Bos taurus*

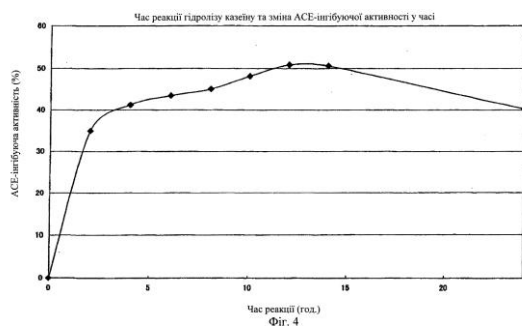
<400> 2

Val Pro Pro Phe Leu
1 5

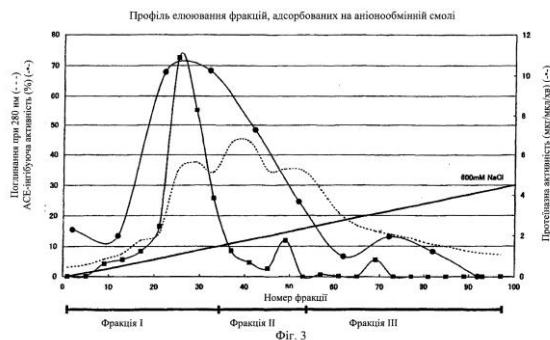




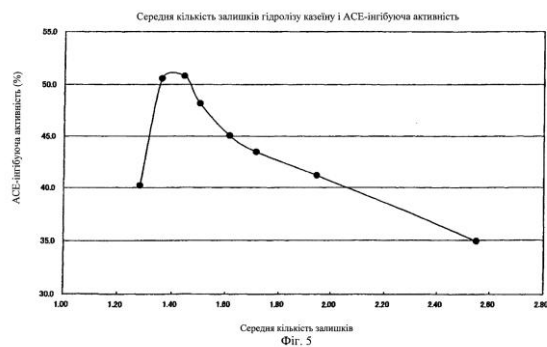
Фіг. 2



Фіг. 4



Фіг. 3



Фіг. 5