

УДК 577.151.6 (0432)

Г.П. Петюх, к.б.н., доц.
 Н.А. Романова, студ.
 К.М. Гаркава, д.б.н., проф.

ЕФЕКТИВНІСТЬ ГІДРОЛІЗУ ПРОТЕЇНІВ МОЛОЧНОЇ СИРОВАТКИ СЕРИНОВИМИ ПРОТЕАЗАМИ

Досліджено релятивну ефективність ензиматичного гідролізу ізоляту молочної сироватки WPI з використанням семи ферментів класу серинових протеаз у трьох концентраціях за рН 7,0 та 50 °С. Найефективнішою виявилася протеаза R у концентрації 0,0002 г/мл.

Research of relative enzymatic whey protein isolate (WPI) hydrolysis efficiency was conducted. Seven enzymes in three concentrations by рН 7.0 t=50°C were used. The most efficient showed to be Protease R in concentration 0,0002 g/ml.

гідроліз, молочна сироватка, серинові протеази

Постановка проблеми

Сирну сироватку довгий час вважали побічним продуктом молочної промисловості, але через її високе біологічне споживання кисню 35 000 мг/л порівняно з 300 мг/л для побутових стічних вод [1] молочна сироватка являє небезпеку для навколишнього середовища. Саме цей фактор підштовхнув до вивчення нових можливих напрямів застосування та розробки продуктів, отриманих модифікацією сироватки.

Частковий гідроліз протеїнів молочної сироватки може виявити або змінити функціональні властивості пептидів у цьому продукті, чим значно розширює можливості його використання. Гідролізована молочна сироватка може бути джерелом протеїнів, придатних для харчування немовлят і осіб зі знизженими перетравлювальними можливостями.

Гідроліз сироватки специфічними ензимами, за яким слідує зручний процес розділення фракцій, може також знизити вміст фенілаланіну у продукті, що робить його придатним для дієтичного харчування хворих на фенілкетонурию [2].

Частковим гідролізом молочної сироватки з використанням певних протеаз можуть бути отримані біологічно активні продукти, що не мають гіркої присмаку [3].

З причини широкого різноманіття ферментних препаратів, які можуть бути застосовані для гідролізу протеїнів молочної сироватки, потрібне масштабне дослідження, щонайперше, їх порівняльної ефективності за ідентичних температури та рН.

Згідно зі Свендсеном та Адлер-Ніссеном [4], визнаним є те, що під час розщеплення пептидних зв'язків сериновими протеазами реакція проходить за кінетикою Міхаеля – Ментена.

У випадку протеолізу молочної сироватки сериновими протеазами виникає конкуренція за активний сайт ферменту між оригінальним субстратом та пептидами, які постійно утворюються, що помітно знижує швидкість гідролізу.

Наявність інгібування продуктом у такому процесі вже було доведено [1; 5].

Рівняння із врахуванням конкурентного інгібування має вигляд [1; 2]:

$$V = \frac{V_m * [S]}{K_m \left(1 + \frac{I}{k_i} \right) + [S]}$$

де

I – молярна концентрація інгібітору;

S – молярна концентрація субстрату;

K_m, k – параметр кінетичної моделі.

Методи дослідження

Під час експерименту було використано рідкі ферментативні препарати Alcalase© 2.4L, Flavourzyme 100L та порошкоподібні Protease N, M, R та Neutrase 0.8L виробництва корпорації Novozymes. Рівень гідролізу становить 19 %. Усі використовувані ферменти належать до класу серинових протеаз або серинових ендопептидаз – ферментів, які розщеплюють пептидні зв'язки білків та характеризуються наявністю залишку амінокислоти серину в активному сайті ферменту.

Алказала 2.4 L – протеаза, отримана із *Bacillus licheniformis* шляхом глибинної ферментації мікроорганізму. Густина становить 1,320 г/см³. Flavourzyme 100L отриманий із ферментаційної бражки *Aspergillus oryzae*. Цей фермент має молекулярну масу приблизно 67 кДа. Оптимальна активність спостерігається за умов, коли рН становить 7,0, а температура 58–60 °С для зв'язку Z-Ala-Ile.

Протеаза М – екстракційна лужна серинова протеаза, синтезується *Bacillus pumilus*. Молекулярна маса становить 32 кДа. Максимальна активність спостерігається за рН 10,0 та температури 55 °С.

Протеазу N отримують глибинною ферментацією *Vacillus subtilis*, оптимальна температура активності – 55 °С, рН – 7,0, молекулярна маса 52 кДа.

Нейтраза – бактеріальна протеаза, синтезується *Vacillus amylofaciens* – кремний дрібногранульований порошок. Оптимальні умови ферменту – 55 °С, рН 7,0.

Ізолят протеїнів молочної сироватки WPI – білий або кремний порошокподібний продукт із однорідною текстурою та нейтральним запахом. Виробляється висушуванням пастеризованої молочної сироватки і видаленням небілкових фракцій кількома техніками очищення, а саме преципітацією, фільтруванням та діалізом. Отриманий на виході продукт містить не менше 94 % білка. Для отримання продукту з потрібним рН можуть додаватися відповідні реагенти.

Усі вимірювання оптичної густини проводились на приладі Tecan GENios Pro™ з довжиною хвилі 562 нм з використанням стандартної планшети на 96 лунок.

Було взято дванадцять однакових пробірок із таким маркуванням: 1a, 1b, 2a, 2b ... 6b. Процес проводили на водяній бані за температури 50 °С. Додали 1 мл субстрату – 2 % розчину WPI із чітко встановленим (автоматичним рН-метром) рН 7,0. Базовий розчин ферменту готували розведенням 1μl коцентованого ферменту у 50 мл фосфатного буфера. Після термостатування субстрату у шість пробірок (контрольних, 1a – 3b) було додано 5 мл 5 % – трихлороцтової кислоти (ТСА), яка викликає денатурацію білків, довжина поліпептидного ланцюга яких більша, ніж 120 – 130 амінокислотних залишків. Після цього додавали розчини ферменту у відповідних розведеннях (табл. 1).

Таблиця 1

Концентрація ферментів відповідно до номера пробірки

Номер пробірки	Розведення ферменту	Номер пробірки	Розведення ферменту
1a контроль	1:5000	2b контроль	1:10000
1b контроль	1:5000	3a контроль	1:20000
2a контроль	1:10000	3b контроль	1:20000
4a дослід	1:5000	5b дослід	1:10000
4b дослід	1:5000	6a дослід	1:20000
5a дослід	1:10000	6b дослід	1:20000

Через 10 хв гідроліз у тестових пробірках зупиняли додаванням 5 мл ТСА.

Після того, як гідроліз було припинено, пробірки виймали та поміщали у крижану воду для швидкого охолодження. Потім осад денатурованого білка відфільтровують на фільтрі червоної стрічки, далі заповнюють стандартну планшету на 96 лунок для проведення спектрофотометричного аналізу. Для калібрування використовували стандартні розчини білка бичої сироватки.

Колориметрична детекція протеїну відбувалася поєднанням відомої біуретової реакції (редукція Cu^{+2} до Cu^{+1}) та специфічного виявлення іону Cu^{+1} біхіноніновою кислотою (утворення хелатного комплексу двома молекулами кислоти та іоном Cu^{+1}) [6]. Водорозчинний хелатний комплекс має пурпурний колір та максимальну адсорбцію за довжини хвилі 562 нм, що залишається майже незмінною зі зростанням концентрації білка в широкому діапазоні концентрацій (20–2,000 μl).

Висновки

У результаті проведених досліджень було встановлено, що найбільш ефективним ферментом за таких умов є протеаза R, кількість новоутворених ТСА-розчинних олігопептидів у разі її використання становила 861,606 при концентрації 0,0002 мг/мл. Середню активність розщеплення виявили протеази A та M, а також нейтраза та алкалаза (Novozymes Neutrase 0,8L, Alcalase 2,4L). Найнижчу активність виявив Flavourzyme 100L (табл. 2).

Таблиця 2

Концентрація низькомолекулярного білка у пробах до і після проведення гідролізу

Фермент	Розведення	Концентрація білка, мг/мл		Утворення білка, мг/мл
		конт-рольна	дослідна	
Alcalase 2.4 L	1:5000	235,134	654,438	419,305
	1:10000	247,658	611,654	363,996
	1:20000	261,496	539,223	277,726
Flavourzyme 1000L	1:5000	244,195	289,273	45,078
	1:10000	260,492	316,148	55,656
	1:20000	268,902	420,210	151,308
Protease N	1:5000	252,889	619,126	366,236
	1:10000	274,867	621,615	346,748
	1:20000	269,257	553,826	284,569
Neutrase 0,8L	1:5000	269,656	891,677	622,021
	1:10000	263,803	616,902	353,099
	1:20000	279,122	475,011	195,889
Protease A	1:5000	258,592	820,917	562,325
	1:10000	268,202	877,866	609,664
	1:20000	263,778	929,883	666,105
Protease M	1:5000	194,793	463,953	269,160
	1:10000	235,346	530,568	295,222
	1:20000	229,266	687,456	458,191
Protease R	1:5000	252,490	1114,096	861,606
	1:10000	255,575	1021,910	766,335
	1:20000	251,307	972,038	720,730

Не всі ферменти показали більшу ефективність зі збільшенням концентрації, протеази А, М (Protease А, М) та Flavourzyme мали кращий результат у разі більшого розведення. Зі збільшенням концентрації стеричні перешкоди гальмують процес гідролізу, що є особливо критичним саме для цих ферментів. Особливо помітним такий ефект виявився для протеази М. Зі збільшенням розведення удвічі концентрація ТСА-розчинних білків зросла на 162, 969 мг (28,3 %).

Література

1. *Viotto, W. H.* Ultrafiltração de soro doce de queijo minas frescal - efeito de pré-tratamento do soro no desempenho da membrana de ultrafiltração e na composição e solubilidade do concentrado protéico de soro // PhD Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil (1993).
2. *Kinetic Model for Whey Protein Hydrolysis by Alcalase Multipointimmobilized on Agarose Gel Particles / R. Sousa Jr, G. P. Lopes, P. W. Tardioli, R. L. C. Giordano, P. I. F. Almeida, R.C. Giordano // Brazilian Journal of Chemical Engineering. – 21/ 02, April - June 2004. – P. 147–153.*
3. *Mann E.* Whey Products and Their Uses // Dairy Industries International, December, 2000. – P. 13–14.
4. *Adler-Nissen J.* Enzymatic hydrolysis of food protein. – London: Elsevier Applied Science Publishers; 1986.
5. *Segel I.H.* Enzyme Kinetics. – A Wiley-Interscience Publication, 1975.
6. *Kinetics of the Initial Stage of Milk Protein Hydrolysis by Chymotrypsin / Vorob'ev M.M., Levicheva I.Y. Belikov V.M. // Applied Biochemistry and Microbiology. 1996. – 32. – P. 219–222.*

Стаття надійшла до редакції 03.03.09.