

УДК 637.147.2 : [66.094.941 : 577.15]

ПОДБОР ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА КАЗЕИНА

Новосёлова М. В., Борисова Г. В., Бондарчук О. Н., Малова Ю. С.

Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, г. Кемерово, Россия (650056, г. Кемерово, Бульвар Строителей, 47), e-mail: novoselova-ma@rambler.ru

Подобрана энзиматическая система, состоящая из эндо- и экзопептидаз. В качестве эндопептидазы использован термоллизин, расщепляющий полипептидную цепь по аминокислотным остаткам с гидрофобной боковой цепью, в качестве экзопептидаз – карбоксипептидаза А и лейцинаминопептидаза, катализирующие отщепление аминокислотных остатков с карбоксильного и аминного конца молекулы белка, соответственно. В качестве исходного сырья использован казеин, который является доступным и ценным в биологическом отношении источником белка, а также наиболее адаптированным к физиологическим особенностям детского организма. Экспериментально получены гидролизаты казеина с использованием энзиматической системы, состоящей из термоллизина, карбоксипептидазы А и лейциаминопептидазы, характеризующиеся высоким содержанием низкомолекулярных фракций, количество которых увеличивается в процессе реакции. Проанализировано молекулярно-массовое распределение рассмотренных гидролизатов, полученных методом электрофореза в полиакриламидном геле, где величина рН реакционной смеси изменяется незначительно и находится в пределах оптимальной работы ферментов. В процессе исследований подобраны оптимальные параметры ферментативного гидролиза казеина энзиматической системой, состоящей из термоллизина, карбоксипептидазы А и лейцинаминопептидазы: температура $50 \pm 1^\circ\text{C}$, фермент-субстратном соотношении 1:100 и продолжительности процесса $8,00 \pm 0,05$ ч.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, энзиматическая система, казеин, термоллизин, карбоксипептидаза А, лейцинаминопептидаза, гидролизаты казеина.

SELECTION OF PARAMETERS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CASEIN

Novoselova M. V., Borisova G. V., Bondarchuk O. N., Malova Y. S.

Kemerovo Technological Institute of The Food Industry, Kemerovo, Russia (650056, Kemerovo, Boulevard Builders, 47), e-mail: galinanikit@yandex.ru

Selected enzymatic system consisting of endo-and exopeptidases. As used endopeptidase thermolysin, cleaving the polypeptide chain to the amino acid residues with a hydrophobic side chain, as exopeptidases - carboxypeptidase A and leucine aminopeptidase, which catalyze the cleavage of the amino acid residues from the carboxyl and amino end of the protein molecule, respectively. The feedstock used casein, which is affordable and biologically valuable source of protein, and are adapted to the physiological characteristics of the child's body. Casein hydrolysates obtained experimentally using the enzymatic system consisting of thermolysin, karbokipeptidazy leytsioaminopeptidazy A and characterized by a high content of low molecular weight fractions, the amount of which increases during the reaction. Analyzed the molecular weight distribution of the considered hydrolysates obtained by polyacrylamide gel electrophoresis, where the pH of the reaction mixture changes slightly and within the optimum operation of enzymes. During the study selected the optimal parameters of enzymatic hydrolysis of casein enzymatic system consisting of thermolysin, carboxypeptidase A and leucine aminopeptidase: temperature $50 \pm 1^\circ\text{C}$, the enzyme-substrate ratio of 1:100 and the process time $8,00 \pm 0,05$ h.

Keywords: enzymatic hydrolysis, enzyme systems, casein, thermolysin, carboxypeptidase A, leucineaminopeptidase, casein hydrolysates.

Введение

Аллергия – это состояние повышенной чувствительности организма к определенному веществу или веществам (аллергенам).

На сегодняшний день аллергия является проблемой общественного здравоохранения глобальных масштабов. Согласно данным экспертных оценок Европейской академии

аллергии и клинической иммунологии (ЕААСI) в среднесрочной перспективе (15 лет) более половины населения Европы будет страдать тем или иным видом аллергии.

Каждый третий житель России подвержен аллергии, по данным Института иммунологии Федерального медико-биологического агентства России (г. Москва), прямые затраты на лечение одного больного составляют от 160 до 1900 долларов США в год. На сегодняшний день Международным Союзом Иммунологических Обществ (IUIS) зарегистрировано более 150 аллергенов. В зависимости от происхождения аллергены относятся к разным типам: бытовые (моющие средства, бытовая химия, косметика и т. д.), пыльцевые (пыльца растений, домашняя пыль и т. д.) и пищевые вещества. Одной из наиболее распространенных форм аллергических заболеваний (до 80 %) является пищевая аллергия. В странах ЕС прямые затраты на лечение пищевой аллергии составляют от 1,1 до 1,5 млрд. евро в год. Примерно в ту же сумму оцениваются непрямые затраты, обусловленные увеличением числа дней нетрудоспособности и снижением производительности труда. Таким образом, пищевая аллергия является серьезной медико-социальной проблемой [6].

В настоящее время известно более 170 различных видов продуктов питания, для которых зарегистрированы проявления пищевой аллергии. Основной причиной аллергии является нарушение функционирования иммунной системы, связанное с непереносимостью отдельных компонентов пищи, в частности, молочных белков, содержащихся в коровьем молоке и продуктах его переработки. В целях снижения антигенных свойств молочное сырье можно подвергнуть тепловой обработке. Однако термоденатурация способна приводить как к разрушению областей антигенных детерминант, так и агрегации белковых молекул, экспонированию ранее скрытых антигенных детерминант [10].

Наиболее перспективным подходом для снижения аллергенности молочных продуктов является биокаталитическая конверсия молочных белков, направленная на получение их гидролизатов с заданными молекулярно-массовым распределением и остаточной антигенностью. Особенностью действия протеолитических ферментов является их специфичность по отношению к типу пептидной связи, что позволяет получать гидролизаты с различной степенью гидролиза белка [1, 7].

Цель исследования

В данном исследовании целью является подбор оптимальных параметров ферментативного гидролиза казеина энзиматической системой, состоящей из термолизина, карбоксипептидазы А и лейцинаминопептидазы.

Материалы и методы исследования

В качестве исходного сырья использовали казеин, который является доступным и ценным в биологическом отношении источником белка, а также наиболее адаптирован к физиологическим особенностям детского организма по сравнению с другими белками [5].

Метод исследования – белковый электрофорез по Лэммли. Для анализа гидролизатов использовали денатурирующий ПААГ (12 % – разделяющий и 4 % фокусирующий) с 0,1 % DS-Na. Форез проводили на однократном электродном буфере с добавлением 0,1 % DS-Na при 15 мА. Гель окрашивали 0,2 % Кумасси R250, приготовленного на ледяной уксусной кислоте, при повышенной температуре в течение 7–10 мин, затем трижды отмывали дистиллированной водой.

Результаты и их обсуждение

Известно, что казеины, в отличие от некоторых глобулярных белков, хорошо расщепляются протеиназами в нативном состоянии, поскольку уже в нативном состоянии имеют мало упорядоченную конформацию, подобную дезорганизованной структуре денатурированных глобулярных белков [3, 4, 9]. Это объясняется очень низким содержанием α -спиралей и низкой структурной организацией основных компонентов казеина, что обусловлено высоким содержанием пролина в этих белках – от 8,5 до 16 %, что, по-видимому, деформирует его в беспорядочный клубок [8].

В работе использовали энзиматическую систему, состоящую из эндо- и экзопептидаз. В качестве эндопептидазы использовали термолизин, расщепляющий полипептидную цепь по аминокислотным остаткам с гидрофобной боковой цепью. К таким аминокислотам относятся изолейцин, лейцин, валин, фенилаланин, метионин и аланин.

В качестве экзопептидаз использовали карбоксипептидазу А и лейцинаминопептидазу, катализирующие отщепление аминокислотных остатков с карбоксильного и аминного конца молекулы белка, соответственно.

Из литературных данных известно, что оптимальными параметрами работы используемых ферментов является температура $50 \pm 1^\circ\text{C}$ и pH 7,5 [2]. В связи с этим гидролиз вели при данных условиях, варьируя фермент-субстратное соотношение и продолжительность процесса.

К основным показателям целенаправленных гидролизатов казеина относятся: степень гидролиза при определенных фермент-субстратных соотношениях и продолжительность при оптимальных параметрах работы ферментов. В связи с этим определен состав девяти гидролизатов казеина. Полученные результаты исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1

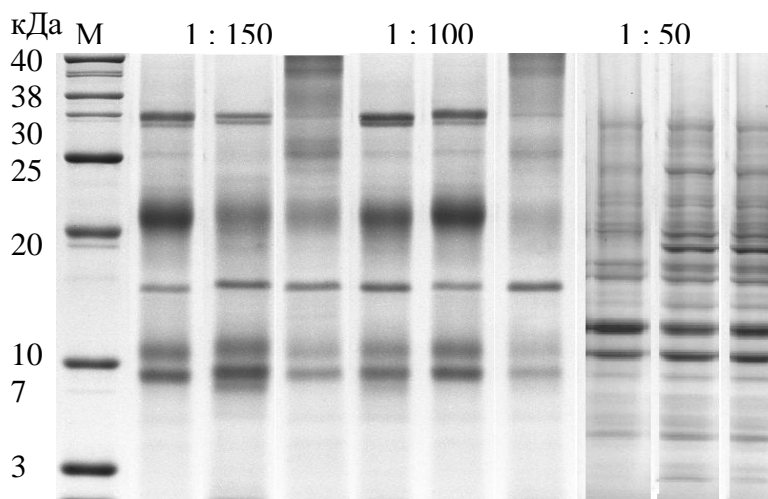
Состав и свойства гидролизатов, полученных в результате обработки термолизином, карбоксипептидазой А и лейцинаминопептидазой

Показатель	Контроль	Фермент-субстратное соотношение, при продолжительности гидролиза								
		1:150			1:100			1:50		
		4,00± ±0,05	8,00± ±0,05	24,00± ±0,05	4,00± ±0,05	8,00± ±0,05	24,00± ±0,05	4,00± ±0,05	8,00± ±0,05	24,00± ±0,05
Степень гидролиза, %	0	30,87 ±1,44	49,04 ±2,71	69,32± 3,24	53,68 ±3,51	70,51 ±3,29	90,40± 4,30	37,18 ±1,71	48,86 ±2,67	63,32± 2,94
pH	7,50	7,41	7,36	7,28	7,39	7,35	7,29	7,37	7,32	7,28

Полученные результаты свидетельствуют о том, что термолитин обладает выраженной протеолитической активностью. Данные фермент-субстратного соотношения и продолжительность гидролиза $8\pm 0,05$ ч. являются наиболее оптимальными. При уменьшении или увеличении концентрации субстрата (при фермент-субстратном соотношении 1:150 или 1:50) наблюдается снижение скорости реакции. Возможно, это связано с образованием неэффективных комплексов, в которых к активному центру фермента присоединены две или несколько молекул субстрата.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что наиболее рациональным фермент-субстратным соотношением является 1:100, при рекомендуемой литературными источниками температуре $50\pm 1^\circ\text{C}$ и pH $7,50\pm 0,01$. Величина pH реакционной смеси изменяется незначительно и находится в пределах оптимальной работы ферментов.

Для наиболее детального анализа гидролиза определено молекулярно-массовое распределение в зависимости от фермент-субстратного соотношения и продолжительности ферментации. На рис. 1 и табл. 2 представлены результаты молекулярно-массового распределения пептидов, полученных методом электрофореза в полиакриламидном геле.



М 4 8 24 4 8 24 4 8 24

Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле гидролиза термолизином, карбоксипептидазой А и лейцинаминопептидазой при фермент-субстратных соотношениях 1:50, 1:100 и 1:150 при продолжительности гидролиза $4,00 \pm 0,05$, $8,00 \pm 0,05$, $24,00 \pm 0,05$ ч, температуре $50 \pm 1^\circ\text{C}$ и рН $7,50 \pm 0,01$ (М – маркер, массовая доля белка 2,0 мг/мл в буфере 0,5М трис-НСl)

Таблица 2

Характеристика пептидов, полученных в результате гидролиза термолизином, карбоксипептидазой А и лейцинаминопептидазой

Фермент-субстратное соотношение	Характеристика компонентов после продолжительности гидролиза, ч		
	4,00±0,05	8,00±0,05	24,00±0,05
1	2	3	4
1:150	<u>27,67</u> 10,56	<u>27,67</u> 10,32	<u>29,61</u> 5,39
	<u>26,93</u> 2,80	<u>27,24</u> 2,96	<u>24,35</u> 22,91
	<u>14,54</u> 5,23	<u>14,82</u> 8,38	<u>14,74</u> 18,23
	<u>10,68</u> 16,51	<u>10,96</u> 18,70	<u>10,61</u> 19,22
	<u>8,73</u> 16,78	<u>9,02</u> 25,48	<u>8,79</u> 9,51
1:100	<u>27,30</u> 16,51	<u>27,40</u> 7,17	<u>30,00</u> 18,96
	<u>26,93</u> 3,44	<u>26,93</u> 2,86	<u>27,30</u> 3,40

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
1:100	<u>19,10</u> 42,02	<u>19,35</u> 49,90	<u>24,35</u> 18,93
	<u>14,54</u> 8,62	<u>14,54</u> 5,48	<u>19,61</u> 23,57
	<u>10,40</u> 14,42	<u>10,34</u> 17,47	<u>14,54</u> 24,64
	<u>8,51</u> 14,97	<u>8,45</u> 17,14	<u>10,61</u> 10,50
	<u>27,30</u> 16,51	<u>27,40</u> 7,17	<u>30,00</u> 18,96
	<u>26,93</u> 3,44	<u>26,93</u> 2,86	<u>27,30</u> 3,40
	<u>19,10</u> 42,02	<u>19,35</u> 49,90	<u>24,35</u> 18,93

1:50	<u>26,93</u> 13,30	<u>26,93</u> 11,40	<u>26,93</u> 12,35
	<u>20,83</u> 10,98	<u>25,59</u> 2,30	<u>22,99</u> 6,66
	<u>17,71</u> 10,68	<u>24,35</u> 2,28	<u>20,63</u> 9,94
	<u>15,81</u> 5,97	<u>23,04</u> 6,82	<u>19,74</u> 2,50
	<u>12,16</u> 21,72	<u>20,73</u> 1,67	<u>16,60</u> 5,70
	<u>9,69</u> 13,98	<u>18,36</u> <u>6,74</u>	<u>15,60</u> 8,02
	<u>6,52</u> 2,18	<u>16,64</u> <u>5,40</u>	<u>13,44</u> 2,67
	<u>5,00</u> 7,18	<u>14,90</u> 5,04	<u>9,69</u> 10,44
		<u>13,37</u> 5,85	<u>8,03</u> 3,01
		<u>6,52</u> 3,51	<u>5,44</u> 7,57
		<u>2,42</u> 4,60	<u>5,23</u> 1,47
		<u>1,00</u> 2,10	

Данные, представленные на рис. 1 и табл. 2, свидетельствуют о том, что гидролизаты казеина, полученные с использованием энзиматической системы, состоящей из термолизина, карбоксипептидазы А и лейцинаминопептидазы, характеризуются высоким содержанием низкомолекулярных фракций, количество которых увеличивается в процессе реакции.

Таким образом, обобщая результаты эксперимента, нами выбраны оптимальные параметры проведения реакции гидролиза: при температуре $50 \pm 1^\circ\text{C}$, фермент-субстратном соотношении 1:100 и продолжительности процесса $8,00 \pm 0,05$ ч.

Список литературы

1. Головач Т. Г. Антигенные свойства нативных и термообработанных сывороточных белков и их ферментативных частичных гидролизатов / Т. Г. Головач, В. П. Курченко, Л. И. Сурвило // Труды БГУ. – 2011. – Т. 6, Ч.1. – С. 209-223.
2. Диксон М. Ферменты: В 3 т. Т.1 / М. Диксон, Э. Уэбб: Пер. с англ. – М.: Мир, 1982. – 392 с.
3. Комиссаренко С. В. Физико-химические и биологические свойства белков молока // Вопросы питания. – 1983. – № 1. – С.6-11.

4. Кремер Л. К. Влияние тепловой обработки на белки обезжиренного молока / Л. К. Кремер, А. Р. Матесон, Ж. Берри // XXI Международный молочный конгресс. Краткие сообщения. – М.: ЦНИИТЭИмясомолпром, 1982. – Т.1, Кн.2. – С.155.
5. Липатов Н. Н. Информационно-алгоритмические и терминологические аспекты совершенствования качества многокомпонентных продуктов питания специального назначения / Н. Н. Липатов, О. И. Башкиров, Л. В. Нескромная // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2002. – №9. – С.25-28.
6. Михайленко А. А. Аллергия и аллергические заболевания / А. А. Михайленко, Г. А. Базанов, М. Н. Калинин. – М., 2005. – 352 с.
7. Рытченкова О. В. Оптимизация процесса получения ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки с применением протеолитических ферментов / О. В. Рытченкова, А. А. Красноштанова // Фундаментальные исследования. – 2001. – № 8. – С. 663-666.
8. Черников М. П. Протеолиз и биологическая ценность белков. Казеины как собственно пищевые белки. – М.: Медицина, 1975. – 231 с.
9. Шульц Г. Е. Принципы структурной организации белков / Г. Е. Шульц, Р. Х. Ширмер. – М.: Мир, 1982. – 354 с.
10. Goldman A. S. Milk allergy. I. Oral challenge with milk and isolated milk proteins in allergic children / A. S. Goldman, D. W. Anderson, W. A. Sellers, S. Saperstein, W. T. Kniker, S. T. Halpern // Pediatrics. – 1963. – Vol. 32. – P. 425–443.

Работа выполнена в рамках исполнения Государственного контракта №12.527.11.0008 от 04.06.2012 года по теме «Разработка технологии получения гипоаллергенных функциональных молочных продуктов», заключённым между Министерством образования и науки РФ и ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии по федеральной целевой программе «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы».

Рецензенты:

Просеков Александр Юрьевич, доктор технических наук, профессор, ректор ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», г. Кемерово.

Попов Анатолий Михайлович, доктор технических наук, профессор, проректор по научно-инновационной работе ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», г. Кемерово.