

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ГИДРОЛИЗА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ ЭКЗО- И ЭНДОПРОТЕАЗАМИ

Т.Н. Головач^{1,2}, Н.В. Гавриленко¹, Н.К. Жабанос², В.П. Курченко¹

¹Белорусский Государственный университет, ²РУП «Институт мясо-молочной промышленности», Минск, Республика Беларусь

В Беларуси актуальной является проблема переработки молочной сыворотки, которая представляет собой побочный продукт при производстве сыра и казеина, тогда как может служить ценным источником сывороточных белков. Она содержит около 1% белка, в состав которого входят β -лактоглобулин (β -лг), α -лактальбумин (α -ла), бычий сывороточный альбумин (БСА), иммуноглобулины, а также минорные белки: лактоферрин, лактолин, гликопротеины, лактопероксидаза и трансферрин [1]. Современные технологии ультрафильтрации позволяют получить концентраты сывороточных белков с массовой долей белка 80%. Сывороточные белки широко применяются как ингредиент в различных пищевых продуктах: напитках, десертах, мясе и хлебобулочных изделиях – для придания заданных органолептических, питательных свойств и текстуры [2].

Однако известно, что β -лактоглобулин, α -лактальбумин и бычий сывороточный альбумин являются основными аллергенами молока. Гидролиз сывороточных белков позволяет снизить их аллергенный потенциал, получить продукт с высокой питательной ценностью. В роли функциональных добавок гидролизованные белки молока имеют ряд преимуществ перед нативными: возрастают их растворимость, стабильность при тепловой обработке, пенообразование и эмульгирующие свойства [3].

Гидролизаты молочных белков нашли применение в специализированном (для спортсменов) и клиническом питании, гипоаллергенных формулах для детского питания. Кроме того, некоторые пептиды молочного белка проявляют биологическую активность: антибактериальные и антифунгальные свойства, гипотензивный и иммуномодулирующий эффект, способность понижать уровень холестерина, повышать поглощение минеральных веществ [4].

Для протеолиза сывороточных белков используется широкий спектр эндо- и экзопротеаз, среди которых можно выделить ферменты микробного (алкалаза, нейтраза, термолизин), животного (пепсин, трипсин, химотрипсин) и растительного (папаин, бромелаин, фицин) происхождения. Сравнительная характеристика использованных в работе ферментов представлена в таблице [5-10].

Таблица – Сравнительная характеристика протеолитических ферментов

Тип протеазы	Общее название	Источник	Диапазон pH	Предпочтительная специфичность
<u>Сериновая протеаза</u> Животные	Трипсин	Свиной	7-9	Lys, Arg
<u>Цистеиновая протеаза</u> Растения	Папаин	<i>Caraya latex</i>	6-7	Lys, Arg, Phe
<u>Металлопротеаза</u> Бактерии	Термолизин	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	7-9	Ile, Leu, Val, Phe
<u>Ферментативные</u>				

Тип протеазы	Общее название	Источник	Диапазон рН	Предпочтительная специфичность
<u>препараты</u> Смесь эндо- и экзопротеаз	Флейворзим	<i>Aspergillus oryzae</i>	4-8	Широкая специфичность

Целью данной работы являлось исследование закономерностей гидролиза сывороточных белков эндо- и экзопротеазами: трипсином, папаином, флейворзимом и термолизином.

Методы исследования

В работе использовали концентрат сывороточных белков, полученный методом ультрафильтрации (КСБ-УФ-55, ОАО «Березовский сыродельный комбинат», ТУ РБ 00028493.459-98), с массовой долей белка 47,2%; концентрат сывороточных белков, полученный методом ультрафильтрации (КСБ-УФ-70, ОАО «Щучинский маслосырзавод», ТУ ВУ 100377914.550-2008) с массовой долей белка 72,8% (концентрацию белка измеряли методом Лоури [11]).

Для гидролиза сывороточных белков применяли ферменты: трипсин (ГОСТ 9002-07-7, «Реахим», Россия), папаин (protease from *Papaya latex*, 10 units/mg, Sigma), флейворзим (protease from *Aspergillus oryzae*, 500 U/g, Sigma), термолизин (protease from *Bacillus thermoproteolyticus* rokko, 50-100 U/mg, Sigma). Ферментативное расщепление осуществляли в термостатируемом реакторе. Использовали 5%-ый раствор КСБ-УФ-55 и 2% - КСБ-УФ-70. Гидролиз проводили в течение 2-3 ч при 20-60⁰С и рН 5,0-10,0 и соотношении фермент/субстрат равном 4,2-42% для трипсина, 0,41-1,0% для папаина, 6,8-17,0% для флейворзима и 0,27-0,68% для термолизина. рН раствора сывороточных белков устанавливали с использованием 2Н НСl или 1Н NaOH. Ферменты инактивировали при 95⁰С в течение 10 мин, после чего пробы немедленно замораживали при -20⁰С для последующего анализа.

Продукты ферментативного гидролиза сывороточных белков анализировали с использованием SDS-электрофореза в полиакриламидном геле [12]. Для оценки электрофореграмм применяли графический редактор Adobe Photoshop 7.0. Степень протеолиза определяли как относительное количество расщепленного белка, выраженное в %.

Результаты и обсуждение

В данном исследовании изучены закономерности гидролиза сывороточных белков экзо- и эндопротеазами путем оценки глубины протеолиза основных сывороточных белков - β -лактоглобулина (β -лг) и α -лактальбумина (α -ла) - в различных условиях ферментации. Особенности ферментативного расщепления белковых субстратов определяются как оптимальными условиями проявления активности ферментов, так и физико-химическими свойствами расщепляемых белков. Лактоглобулин – один из основных белков молока, составляющий 50% сывороточных белков и 12% общего белка молока. Молекулярная масса мономера β -лг равна 18 362 Да для генетического варианта А и 18276 – для варианта В [13]. Первичная структура белка представлена цепью из 162 аминокислот с 5 цистеиновыми остатками, четыре из которых образуют дисульфидные мостики (Cys₆₆-Cys₁₆₀ и Cys₁₀₆-Cys₁₁₉) с пятым свободным тиолом (Cys₁₂₁). Отличие в строении между вариантами А и В заключается в замене на Glu и Ala для варианта В в позициях Asp₆₄ и Val₁₁₈ варианта А соответственно. Вторичная структура белка представлена β -складчатыми слоями (43%) и α -спиралями (10%) и неорганизованными структурами (47%) [14]. Белковую глобулу делят

на восемь относительно дискретных структур (А-Н), где антипараллельные β -складчатые слои образуют форму сглаженного конуса, изнутри богатого гидрофобными аминокислотными остатками [15]. Изоэлектрическая точка β -лг рI 5,2. Белок растворим в широком диапазоне рН. При рН 3,5-5,2 β -лг существует преимущественно в форме октамера, а в случае рН>рI – в виде димера. Когда рН<3,5 или рН>6,5, преобладает мономерная форма белка. В жестких щелочных условиях (рН>9) происходит необратимая денатурация β -лг [14].

Известно, что температурное воздействие затрагивает трехмерную структуру β -лг. Хотя β -лг обнаруживается в молоке в виде димера, белок легко диссоциирует на мономеры в температурном диапазоне 30-55⁰С, но данный процесс является обратимым [16]. Установлено, что критическое конформационное изменение наступает при 63⁰С, когда на 19% уменьшается содержание β -складчатых слоев [17]. Разрушение β -слоев является определяющим для инициации сульфгидрил-дисульфид индуцированной агрегации. При повышении температуры разворачивание А-Н структур β -лг приводит к необратимой денатурации в следующем порядке: D-E структуры (55-60⁰С); C-D и α -спирали (60-65⁰С); A-B, A-I и E-F (65-70⁰С); A-H, B-C, и F-G (75-80⁰С) [18]. При 80⁰С под действием температуры происходит практически полное разворачивание молекулы, исключая G-H пару, связанную дисульфидным мостиком, который формирует наиболее термически устойчивый элемент в молекуле β -лг. Дисульфидные связи и сульфгидрильные группы играют важную роль в конформационных изменениях β -лг. Поперечные ковалентные связи могут формироваться между молекулами β -лг в результате окисления Cys₁₂₁ с образованием S-S связи и/или путем SH-индуцированного S-S перехода [19]. При рН 9 и 11 межмолекулярная полимеризация S-S протекает при комнатной температуре с последующим полным необратимым разворачиванием β -лг. При рН 3, 5 и 7 полимеризация происходит только после нагревания до 80, 75 и 70⁰С соответственно, что подтверждает преобладание SH/S-S переходов над окислением SH/S-S групп [20]. Хотя β -лг является наиболее изученным белком, его физиологическая роль служит предметом многочисленных дискуссий. Показано, что β -лг способен связывать ретинол и защищать его от окисления [19].

Вторым по значимости белком молочной сыворотки является α -лактальбумин (α -ла) – глобулярный белок, вовлеченный в биосинтез лактозы, молекулярная масса которого составляет 14 175 Да [21], а изоэлектрическая точка - рI 4,8. Белок имеет форму эллипса, состоящего из двух различных долей. Одна доля представлена четырьмя спиралями, а другая – двумя β -слоями и петлеподобными цепями [22]. Лактальбумин – Са-зависимый металлопротеин, способный связывать цинк и другие металлы. Ионы кальция взаимодействуют в области карманоподобных углублений в структуре белка, богатых Asp-остатками. Стабильность при температурном воздействии на α -ла уменьшается при удалении кальция и апо- α -ла подвергается необратимой денатурации. В молекуле белка отсутствуют свободные тиольные группы, содержится четыре дисульфидных мостика, которые ограничивают гибкость структуры α -ла в определенных условиях [22]. Белок денатурирует при температуре 64⁰С и рН 7,0 [23].

Для получения гидролизата описанных выше белков использовали трипсин (3.4.21.4) - протеолитический фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз пептидных связей, образованных остатками основных аминокислот - аргинина и лизина. [5]. Трипсин - фермент большинства позвоночных. Синтезируется в поджелудочной железе в форме неактивного предшественника (профермента) трипсиногена, который в двенадцатиперстной кишке в результате отщепления N-концевого 6-членного фрагмента превращается в трипсин. Молекула бычьего трипсина (молекулярная масса около 24 кДа) состоит из 223 аминокислотных остатков, образующих одну полипептидную цепь, и содержит 6

дисульфидных связей; его изоэлектрическая точка - pI 10,8 Фермент проявляет каталитическую активность в диапазоне pH 7,0-9,0. Ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} повышают гидролитическую активность трипсина [6]. Трипсин относится к группе так называемых сериновых протеиназ и содержит в активном центре остаток серина, выступающего в роли нуклеофила. Активный центр трипсина состоит из трех аминокислотных остатков: Ser₁₉₅, His₅₇ и Asp₁₀₂, образующих систему переноса заряда [5]. Механизм каталитического гидролиза включает нуклеофильную атаку Ser₁₉₅ на карбонильную группу субстрата с образованием ацилфермента, который затем гидролизуется водой [5]. В трипсине участок активного центра, отвечающий за специфическое связывание субстратов, содержит фиксированный отрицательный заряд, обусловленный карбоксильной группой боковой цепи Asp₁₈₉. Этим объясняется тот факт, что трипсин расщепляет только пептидные связи, к которым примыкают остатки Arg и Lys, несущие в нейтральной среде положительный заряд [7].

Папаин – гидролитический фермент класса цистеиновых протеаз (EC 3.4.22.2), выделенный из папайи (*Carica papaya*). Фермент содержит 212 аминокислотных остатков, стабилизированных 3 дисульфидными мостиками, молекулярная масса составляет 23,4 кДа. Трехмерная структура папаина представлена 2 различными структурными доменами с мостиком между ними. В области соединения двух доменов располагается активный центр, образованный каталитической триадой аминокислот: Cys₂₅, His₅₉, Asp₁₅₈. Оптимум каталитической активности папаина наблюдается при pH 6,0-7,0. Специфическое взаимодействие с аминокислотами Lys, Arg, Phe, в частности наблюдается нуклеофильная атака карбоксильной группы аминокислот [8]. Механизм разрыва пептидных связей включает депротонирование цистеина₂₅ гистидином₁₅₉. Asp₁₅₈ способствует ориентации имидазольного кольца His₁₅₉, что определяет возможность депротонирования. Cys₂₅ затем совершает нуклеофильную атаку углерода карбонильной группы пептидной связи, в результате чего образует аминотерминальный пептид и формируется ковалентный тиоацилферментный переходный комплекс (интермедиат). Далее фермент деацетируется в результате взаимодействия с молекулой воды, и происходит отсоединение карбокси-терминального пептида [5]. В иммунологии папаин известен своей способностью расщеплять Fc участок иммуноглобулинов от Fab антиген-связывающей части. Папаин используется для разделения клеток на первом этапе получения культур клеток. Папаин также используется как компонент различных ферментных препаратов, например Assizyme [8].

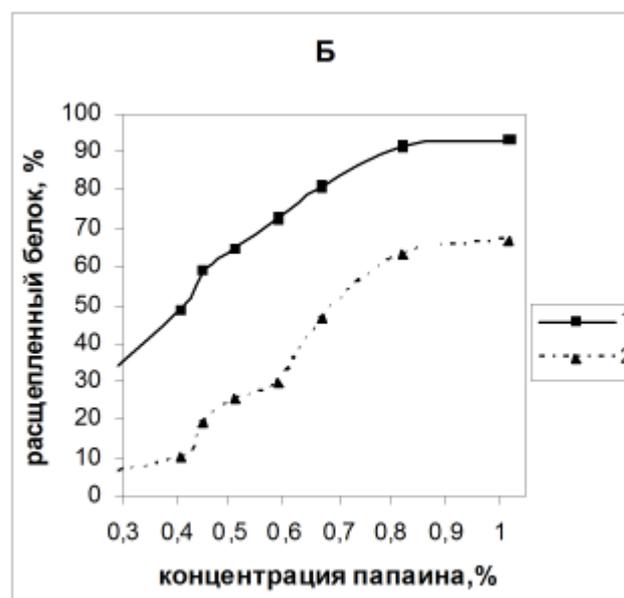
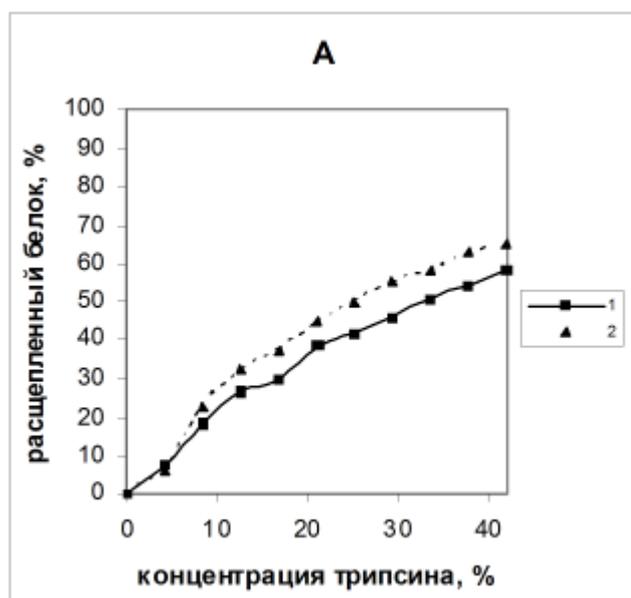
Флейворзим - комплексный ферментный препарат, обладающий эндо- и экзопротеолитической активностью; полученный путем глубинного культивирования селекционного штамма *Aspergillus oryzae*. Для флейворзима характерна широкая субстратная специфичность и диапазон проявления каталитической активности [9].

Термолизин - фермент класса гидролаз (EC 3.4.24.27), катализирующий расщепление пептидных связей, образованных остатками гидрофобных аминокислот (Ile, Leu, Val, Phe, Met, Ala). Со значительно меньшими скоростями катализирует гидролиз связей, образованных остатками Tyr, Gly, Trp и Ser. Не способен расщеплять пептидные связи, образованные с участием остатка пролина. Молекулярная масса термолизина составляет 34,6 кДа. Фермент продуцируется бактерией *Bacillus thermoproteolyticus*. Одна молекула термолизина содержит один ион Zn^{2+} , необходимый для проявления ферментативной активности, и четыре иона Ca^{2+} , ответственных за стабильность фермента. В активный центр кроме иона Zn^{2+} входят остатки Glu₁₄₃ и His₂₃₁ [10]. Расположенный фиксировано с другими лигандами в молекуле белка ион цинка способен существенно увеличивать

электрофильную природу атома углерода карбонильной группы субстрата [7]. Согласно предложенной модели каталитического действия [5], ион цинка образует хелатные связи с имидазольной группой His₂₃₁ и боковой цепью Glu₁₄₃ карбоксильная группа которой выступает в роли нуклеофильного центра, атакующего карбонильную группу субстрата с образованием в качестве промежуточного продукта ангидрида. Для термоллизина характерна низкая специфичность, поэтому продуктами его расщепления являются многочисленные короткоцепочечные пептиды, которые используются для секвенирования с целью установления первичной структуры белков [10].

Одним из параметров, определяющим интенсивность протекания ферментативной реакции, является концентрация фермента. На рисунке 1 отражена степень расщепления субстратов α -лактальбумина и β -лактоглобулина при различных концентрациях ферментов: трипсина, папаина, флейворзима и термоллизина.

Установлено, что при увеличении концентрации ферментов наблюдается возрастание степени протеолиза обоих белковых субстратов. В результате эксперимента показано, что при концентрации трипсина 25,2% через два часа протеолиза расщепляются около 50% α -ла и 40% β -лг, а при 42,0% протеолизу подвергаются 65 и 60% белка соответственно (рисунок 1А). При увеличении содержания папаина 0,41-1,02% количество расщепленного β -лг возрастает с 49 до 93%, а α -ла – с 10 до 67% (рисунок 1Б). Также получена зависимость степени протеолиза сывороточных белков от концентрации флейворзима. При увеличении содержания флейворзима 5,4-13,6% количество расщепленного β -лг возрастает с 9 до 47%, тогда как α -ла – с 37 до 83% (рисунок 1В). В случае использования термоллизина при увеличении содержания термоллизина 0,004-0,01% количество гидролизованного β -лг возрастает с 26 до 73% и α -ла – с 67 до 98% (рисунок 1Г).



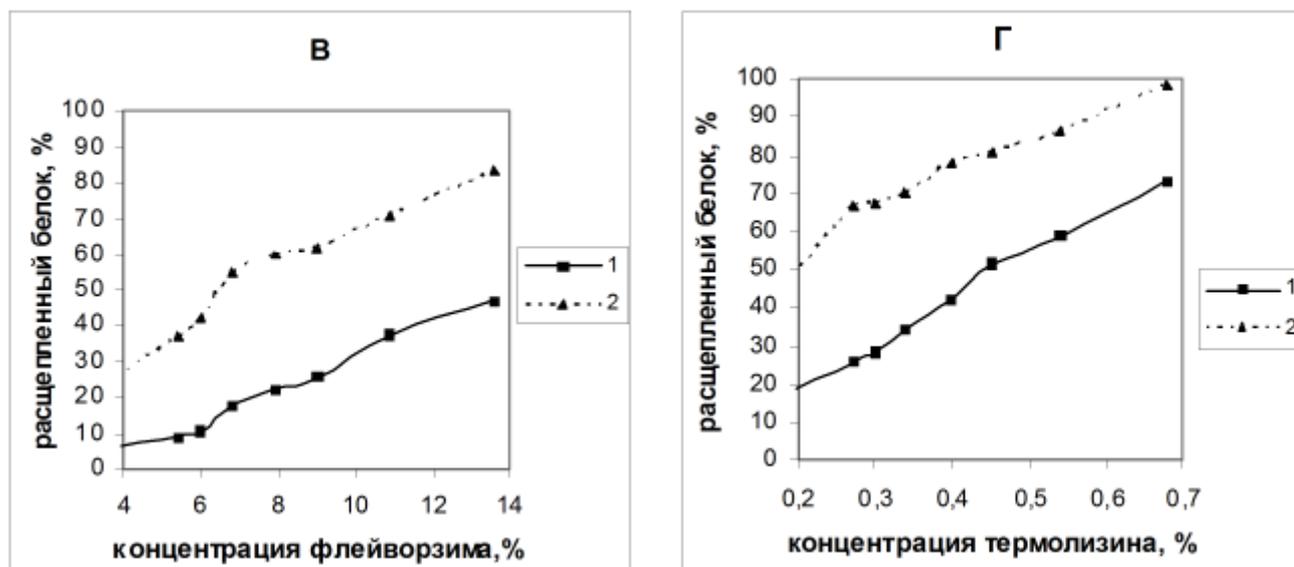


Рисунок 1 – Зависимость степени расщепления β -лактоглобулина (кривая 1) и α -лактальбумина (кривая 2) от концентрации ферментов:

А – трипсином 4,2%-42%, 37⁰С, рН 8,0, 2 ч; Б – папаином 0,41-1,02%, 37⁰С, рН 6,3, 2 ч; В – флейворзимом 6,8-17,0%, 37⁰С, рН 6,3, 2 ч; Г – термолизинном 0,27-0,68%, 50⁰С, рН 6,3, 2 ч

Таким образом, учитывая соотношение α -ла: β -лг=2,5, характерное для молочной сыворотки [3], в указанных условиях для ферментов трипсина, папаина, флейворзима и термолизина характерна различная субстратная специфичность в отношении основных сывороточных белков, что связано как с особенностями ферментативного катализа протеазами различных классов, так и с конформационным состоянием белковых субстратов в данных условиях гидролиза.

Так как глубина гидролиза белковых субстратов прямо пропорциональна продолжительности ферментативного процесса, исследована зависимость степени протеолиза сывороточных белков от продолжительности ферментативной реакции. По результатам эксперимента показано, что наиболее эффективно гидролиз трипсином протекает в первые 60 мин ферментативной реакции. Также установлено, что в течение первого часа из гидролизу подвергаются около 30% α -ла и β -лг, а по истечении 4 часов ферментативной реакции – около 60 % α -ла и 70% β -лг. Полученные данные указывают на более интенсивный гидролиз β -лг, помимо преобладания данного белка в исходной сыворотке (рисунок 2А).

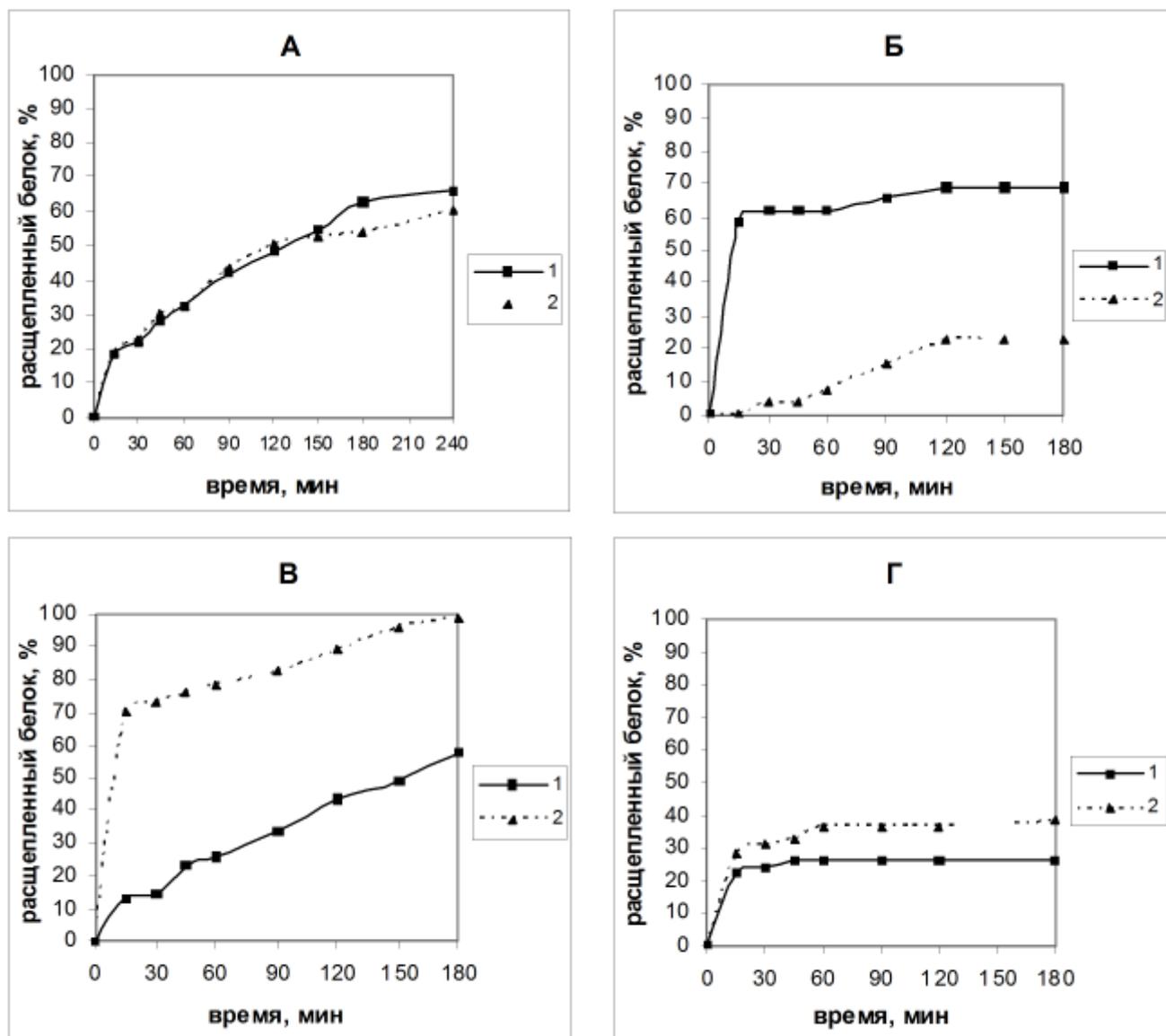


Рисунок 2 – Зависимость степени расщепления β -лактоглобулина (кривая 1) и α -лактальбумина (кривая 2) от продолжительности гидролиза:

А – трипсином 25,2%, 37⁰С, рН 8,0, 4 ч; Б – папаином 0,54%, 37⁰С, рН 6,3, 3 ч; В – флейворзимом 17,0%, 37⁰С, рН 6,3, 3 ч; Г – термолизином 0,27%, 50⁰С, рН 6,3, 2 ч

В эксперименте с использованием папаина установлено, что наиболее эффективно гидролиз β -лг осуществляется в первые 15 мин ферментативной реакции (рисунок 2Б, кривая 1) и составляет около 59% расщепленного белка. В случае α -ла показано постепенное расщепление белкового субстрата в течение 120 мин (рисунок 2Б, кривая 2), в диапазоне 120-180 мин не отмечено снижение концентрации белка. Также установлено, что по истечении 3 часов гидролиза папаином расщепляются около 23% β -лг на пептиды с молекулярной массой менее 18 кДа и протеолизу подвергаются около 58% α -ла (рисунок 2Б). По результатам эксперимента с использованием флейворзима показано, что наиболее эффективно гидролиз α -ла протекает в первые 15 мин ферментативной реакции (рисунок 2В, кривая 2) и составляет около 70% расщепленного белка. В случае β -лг показано постепенное расщепление белкового субстрата в ходе всего ферментативного процесса (рисунок 2В, кривая 1). Также установлено, что после 3 часов гидролиза флейворзимом наблюдается

практически полное расщепление α -ла на пептиды с молекулярной массой менее 14 кДа и протеолизу подвергаются около 58% β -лг (рисунок 2В).

В случае гидролиза сывороточных белков термолизинном выявлено, что наиболее эффективно гидролиз протекает в первые 15 мин ферментативной реакции (рисунок 2Г) и составляет около 28% α -ла и 22% β -лг. Также установлено, что после 3 часов гидролиза протеолизу подвергаются около 26% β -лг и 38% α -ла (рисунок 2Г), что указывает на низкую интенсивность гидролиза белковых субстратов с 15-180 мин ферментативного процесса.

Таким образом, наиболее эффективно гидролиз папаином, флейворзимом и термолизинном протекает в первые 15 мин ферментативной реакции, и 60 мин – для трипсина, о чем также свидетельствует интенсивное снижение рН системы, связанное с образованием и накоплением продуктов гидролиза.

В указанных условиях, учитывая соотношение α -ла: β -лг=2,5 в сыворотке [3], для трипсина и папаина показано преимущественное расщепление β -лг, что может быть обусловлено сходными механизмом каталитического действия [5, 7] и аминокислотными сайтами расщепления, конформационным состоянием субстрата [13-19], тогда как для флейворзима характерна значительно бóльшая субстратная специфичность к α -ла, связанная с рядом особенностей организации третичной структуры α -ла [22-23] и спектром субстратной специфичности протеаз, входящих в указанный ферментный препарат. Для термолизина не выявлены значительные различия в интенсивности гидролиза α -ла и β -лг, что связано с широким спектром действия термостабильной протеазы [10]. Следовательно, данные явления объясняются различной субстратной специфичностью ферментов к белкам молочной сыворотки и влиянием измененных условий среды на следующие этапы протеолиза.

рН ферментативной системы является одним из основных факторов, определяющих конформационные переходы в белковых молекулах, что оказывает влияние как на протеолитическую активность фермента, так и на доступность сайтов гидролиза белковых субстратов.

Установлено, что при гидролизе сывороточных белков трипсином для β -лг характерно резкое возрастание интенсивности протеолиза при возрастании рН исходного раствора сывороточных белков: при рН 6,0 гидролизу подвергаются менее 10% белка, тогда как в случае рН 10,0 за 2 часа расщепляются около 80% субстрата (рисунок 3А, кривая 1). Для α -ла также присуще возрастание степени протеолиза при увеличении рН системы, но эффективность протеолиза изменяется менее интенсивно. Так при рН 6,0 расщепляются около 20% белка; когда рН раствора сывороточных белков возрастает до 10,0, протеолизу подвергаются около 60% α -ла (рисунок 3А, кривая 2). Показано, что с увеличением рН ферментативной системы β -лг расщепляется более эффективно, чем α -ла, помимо преобладания данного белка в исходной сыворотке.

В эксперименте с гидролизом сывороточных белков папаином отмечено, что для β -лг характерно резкое возрастание интенсивности протеолиза при увеличении рН исходного раствора сывороточных белков: при рН 5,0 данный белок практически не подвергается гидролизу, тогда как в случае рН 6,0 за 2 часа расщепляются около 57% субстрата (рисунок 3Б, кривая 1); возрастание степени протеолиза наблюдается на диапазоне рН 6,0-8,0, но с меньшей интенсивностью. Так при рН 8,0 гидролизу подвергаются около 72% β -лг. На диапазоне рН 8,0-10,0 наблюдается снижение степени протеолиза указанного белка, причем при рН 9,0 и 10,0 количество расщепленного белка постоянно и составляет около 67% (рисунок 3Б, кривая 2). Для α -ла при рН 5,0 расщепления белкового субстрата не выявлено, но при увеличении рН до 6,0 наблюдается резкое возрастание степени протеолиза до 19%, причем при дальнейшем увеличении рН ферментативной системы до 10,0 интенсивность протеолиза возрастает незначительно и количество расщепленного белка увеличивается до 25% (рисунок 3Б, кривая 2).

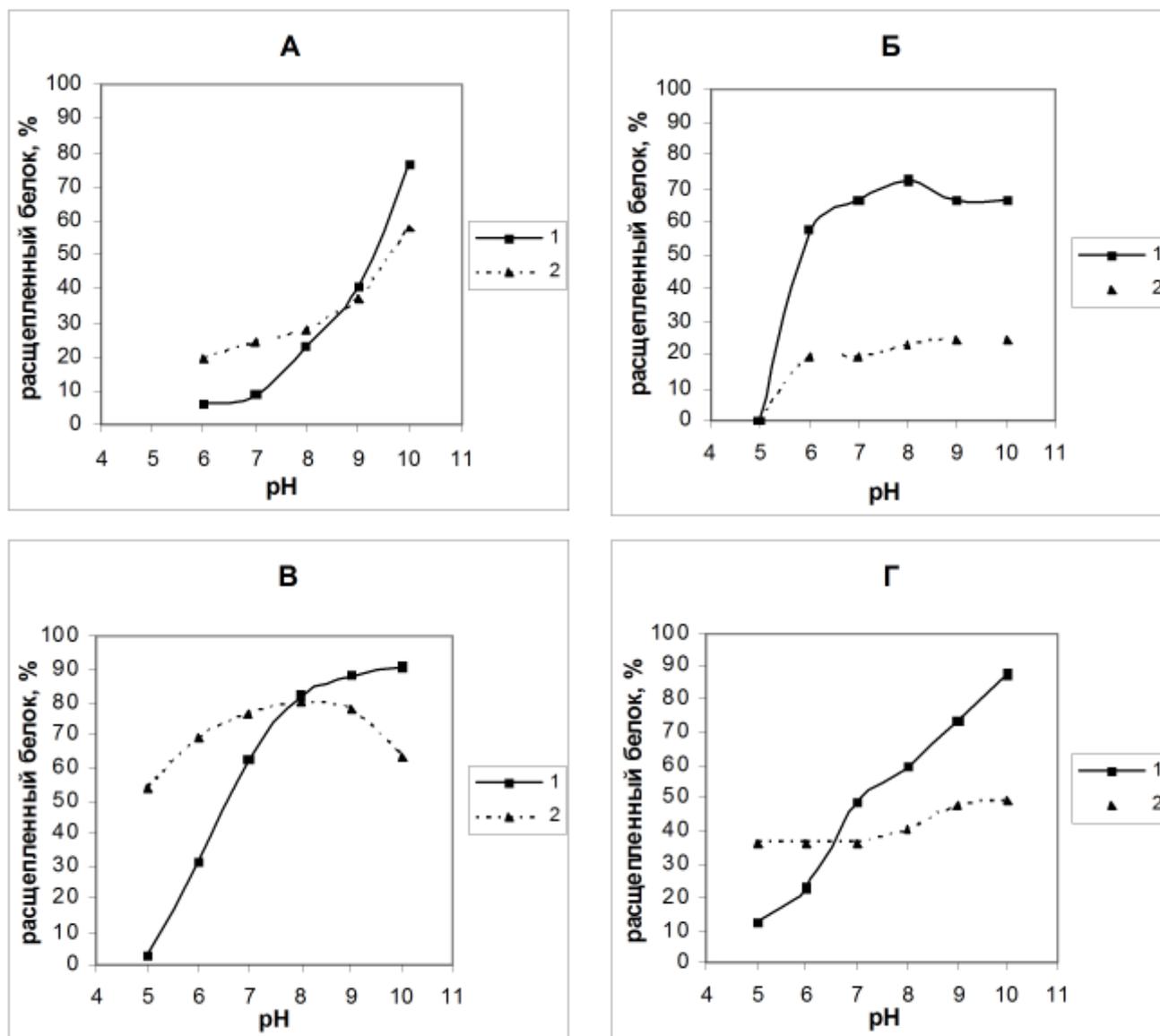


Рисунок 3 – Зависимость степени расщепления β-лактоглобулина (кривая 1) и α-лактальбумина (кривая 2) от рН:

А – трипсином 12,6%, 37⁰С, рН 6,0-10,0, 2 ч; Б – папаином 0,54%, 37⁰С, рН 5,0-10,0, 2 ч; В – флейворзимом 13,6%, 37⁰С, рН 5,0-10,0, 2 ч; Г – термолизином 0,27%, 50⁰С, рН 5,0-10,0, 2 ч

Установлено, что при расщеплении β-лг флейворзимом наблюдается значительное возрастание интенсивности протеолиза при увеличении рН исходного раствора сывороточных белков: при рН 5,0 данный белок практически не подвергается гидролизу, тогда как в случае рН 8,0 за 2 часа расщепляются около 82% субстрата (рисунок 3В, кривая 1), причем на диапазоне 8,0>рН>10,0 степень протеолиза возрастает лишь на 10%. Для α-ла оптимальным для расщепления является диапазон рН 7,0-9,0; при значениях рН<7 и рН>9,0 наблюдается снижение степени протеолиза данного белка (рисунок 3В, кривая 2). Установлено, что в случае рН 8,0, 37⁰С в течение 2 часов гидролизу подвергаются около 82% α-ла.

В случае гидролиза сывороточных белков термолизином выявлено, что для β-лг характерно резкое возрастание интенсивности протеолиза при увеличении рН исходного раствора сывороточных белков: при рН 5,0 данный белок практически не расщепляется (~13%), тогда как в случае рН 8,0 за 2 часа гидролизу подвергаются около 59% субстрата

(рисунок 3Г, кривая 2), причем на диапазоне $8,0 < \text{pH} < 10,0$ степень протеолиза возрастает приблизительно на 30%. Для α -ла не показано существенного изменения степени протеолиза в исследуемом диапазоне pH. Так при pH 9,0 в течение 2 часов на пептиды менее 14 кДа расщепляются около 48% α -ла (рисунок 3Г, кривая 2).

Очевидно, что в изученном диапазоне pH показаны существенные различия оптимальных параметров гидролиза для каждого белка. Согласно литературным данным о структуре сывороточных белков, наличие дисульфидных мостиков в белковых глобулах играет важную роль в конформационных перестройках белкового субстрата. Изменение пространственной структуры белков приводит к экспонированию участков полипептидной цепи, ранее скрытых в глубине белковой глобулы, в частности возникновению/удалению сайтов гидролиза в белковом субстрате.

При протеолизе β -лг необходимо учитывать целый ряд факторов: оптимум активности и субстратную специфичность ферментов (таблица 1), конформационные перестройки белковой глобулы, вызванные изменениями pH, которые могут приводить к агрегации/диссоциации мономеров β -лг, разворачиванию/стабилизации белковой глобулы. Так по литературным данным [12] при pH 9 межмолекулярная полимеризация S-S протекает при комнатной температуре с последующим полным необратимым разворачиванием β -лг, тогда как при pH 7 полимеризация происходит только после нагревания до 70°C [17]. При $\text{pH} > 6,5$ преобладает мономерная форма белка, а в жестких щелочных условиях при $\text{pH} > 9$ происходит необратимая денатурация β -лг [12]. С одной стороны процессы межмолекулярного взаимодействия усложняют доступ фермента к сайтам расщепления, но с другой - полимеризация при pH 9 и более приводит к необратимой денатурации белковой глобулы и возникновению новых сайтов гидролиза. Таким образом, для β -лг характерна общая закономерность при гидролизе трипсином, папаином, флейворзимом и термолизином – увеличение интенсивности протеолиза в при возрастании pH ферментативной системы, что обусловлено денатурационными процессами в молекуле β -лг в щелочных условиях, а также оптимумами активности ферментов (таблица 1). В случае гидролиза указанного белка трипсином наиболее приемлемым является pH 9,0, так как оптимум ферментативной активности трипсина наблюдается в диапазоне pH 7,0-9,0 [6]. При расщеплении β -лг папаином оптимальным для гидролиза белкового субстрата папаином является pH 8,0, что объясняется как денатурационными процессами в молекуле β -лг в щелочных условиях, а также оптимумом активности фермента [8], для которого предпочтительным является гидролиз в нейтральных условиях среды. В случае гидролиза β -лг флейворзимом предпочтительным является расщепление при pH 8,0, так как дальнейшее возрастание pH ферментативной системы не приводит к значительному возрастанию степени протеолиза данного белка, что объясняется диапазоном каталитической активности компонентов ферментативного препарата [9]. Для гидролиза β -лг термолизином показано возрастание количества расщепленных субстратов в изученном диапазоне pH 5,0-10,0, но с учетом оптимальной активности фермента при pH 7,0-9,0 [10], более приемлем гидролиз при pH 9,0.

В случае α -ла, наиболее вероятными факторами, влияющим на интенсивность гидролиза белка при различных pH являются субстратная специфичность ферментов, оптимум их каталитической активности, SH/S-S переходы в белковой глобуле, инициированные изменением pH, а также денатурация белка в жестких щелочных условиях, оптимум активности протеаз [22-23]. При гидролизе трипсином активность расщепления α -ла возрастает с увеличением pH, но с учетом диапазона pH, в котором проявляется активность фермента и оптимума гидролиза β -лг, наиболее приемлемыми условиями для совместного гидролиза основных сывороточных белков трипсином является pH 8. Очевидно, что для гидролиза α -ла папаином необходимы нейтральные условия среды, что обуславливается оптимумом каталитической активности фермента 6,0-7,0 и

конформационным состоянием α -ла при pH 6,0. Следовательно, наиболее оптимальным для гидролиза поликомпонентной белковой системы папаином является pH 6,0-8,0. Для α -ла оптимальным для расщепления флейворзимом является диапазон pH 7,0-9,0, что обусловлено оптимумом активности протеаз ферментного комплекса, активно расщепляющих α -ла, в связи с чем гидролиз поликомпонентной белковой системы (α -ла и β -лг) флейворзимом целесообразно проводить при pH 8,0. Для α -ла при гидролизе термолизинном не показано существенного изменения степени протеолиза в исследуемом диапазоне pH; несмотря на увеличение протеолитической активности термолизина, наличие -S-S- мостиков обеспечивает ограничение подвижности структуры α -ла, усиливающееся с увеличением pH системы [22-23]. Поэтому более предпочтительным для совместного гидролиза белковой системы термолизинном является pH 9,0.

Температурное воздействие является мощным фактором, вызывающим конформационные переходы в белковых молекулах. На следующем этапе была получена температурная зависимость степени протеолиза сывороточных белков ферментами трипсином, папаином, флейворзимом и термолизинном. Для β -лг и α -ла показана общая закономерность - увеличение интенсивности расщепления белков с возрастанием температуры ферментативной системы (рисунок 4).

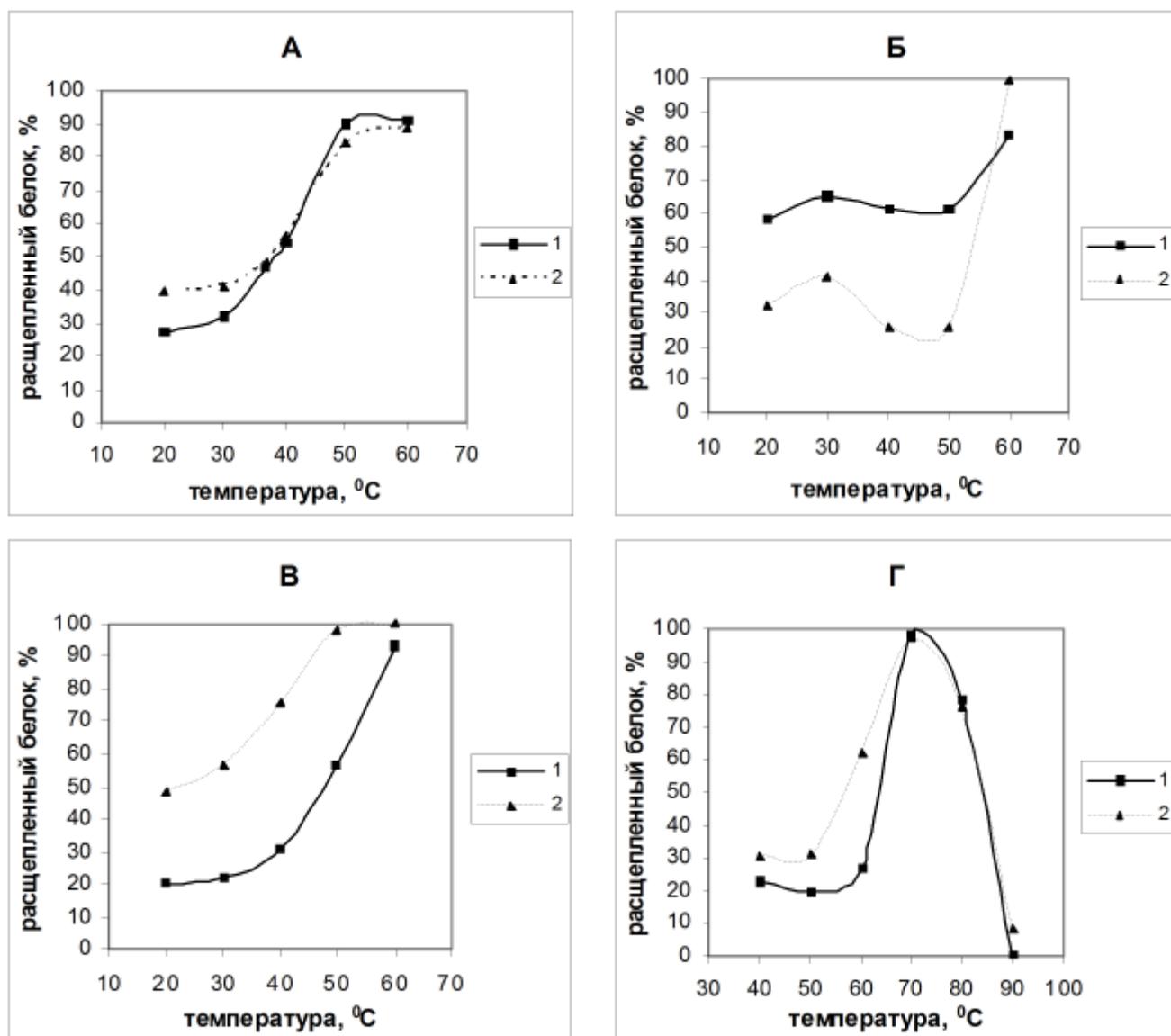


Рисунок 4 – Зависимость степени расщепления β -лактоглобулина (кривая 1) и

α -лактальбумина (кривая 2) от температуры:

А – трипсином 12,6%, 20-60⁰С, рН 8,0, 2 ч; Б – папаином 0,54%, 20-60⁰С, рН 6,3, 2 ч; В – флейворзимом 13,6%, 20-60⁰С, рН 5,0-10,0, 2 ч; Г – термолизином 0,27%, 40-90⁰С, рН 5,0-10,0, 2 ч

При использовании в ферментативном процессе трипсина установлено, что для обоих субстратов характерно резкое возрастание эффективности протеолиза на температурном диапазоне 30-50⁰С (рисунок 4А). Так при 30⁰С расщепляются около 30% β -лг и 40% α -ла, тогда как при 50⁰С гидролизу подвергаются около 90% α -ла и β -лг (рисунок 4А). Также показано, что на изученном температурном диапазоне β -лг расщепляется более интенсивно, чем α -ла, с учетом преобладания в исходной сыворотке β -лг над α -ла и β -лг (в $\approx 2,5$ раза) [3].

В эксперименте при гидролизе сывороточных белков папаином показано, что для β -лг при 20⁰С степень протеолиза составляет около 58%, тогда как при 30⁰С гидролизу подвергаются около 67% белка. Также установлено, что на диапазоне 40-50⁰С количество расщепленного белка не изменяется и составляет около 61% (рисунок 4Б), но при увеличении температуры более 50⁰С наблюдается резкое возрастание степени расщепления β -лг до 84% (рисунок 4Б, кривая 1). В случае α -ла при 20⁰С степень протеолиза составляет около 32%, тогда как при 30⁰С гидролизу подвергаются около 41% белка. Также показано, что на диапазоне 40-50⁰С количество расщепленного белка не изменяется и составляет около 26% (рисунок 4Б, кривая 2), но при увеличении температуры более 50⁰С регистрируется резкое возрастание степени протеолиза до практически полного расщепления α -ла на пептиды с молекулярной массой менее 14 кДа (рисунок 4Б, кривая 2).

Для основных белков молочной сыворотки при гидролизе флейворзимом выявлено резкое возрастание эффективности протеолиза на температурном диапазоне 40-60⁰С для β -лг и 30-50⁰С для α -ла (рисунок 4В). Так при 40⁰С расщепляются около 31% β -лг, а при 60⁰С – 93% белка (рисунок 4В, кривая 1); в случае α -ла при 30⁰С гидролизу подвергаются 49% белка, а при увеличении температуры до 50⁰С – 98% α -ла (рисунок 4В, кривая 2); при 60⁰С весь белок расщепляется на пептиды с молекулярной массой менее 14 кДа.

Ферментативный процесс с использованием термолизина характеризуется резким возрастанием эффективности гидролиза на температурном диапазоне 60-70⁰С для β -лг и 50-70⁰С α -ла (рисунок 4Г). При 60⁰С расщепляются около 26% β -лг, тогда как при 70⁰С – 98% белка (рисунок 4Г, кривая 1). Для α -ла показано, что при 50⁰С гидролизу подвергаются 31% белка, а при увеличении температуры до 70⁰С – 97% α -ла (рисунок 4Г, кривая 2), что связано большей термолабильностью α -ла [22-23]. При дальнейшем увеличении температуры эффективность протеолиза снижается (рисунок 4Г).

Известно, что тепловая денатурация β -lg начинается уже при 30⁰С, когда димерный β -lg легко диссоциирует на мономеры в диапазоне 30-55⁰С, но данный процесс является обратимым [16]. Также известно, что при рН 9 и 11 межмолекулярная полимеризация S-S за счет присутствия свободного тиола Cys₁₂₁ протекает при комнатной температуре с последующим полным необратимым разворачиванием β -лг, тогда как при рН 3, 5 и 7 полимеризация происходит только после нагревания до 80, 75 и 70⁰С соответственно [18]. Устойчивость к температурному воздействию обусловлена тем, что разворачивание белковой глобулы, приводящее к необратимой денатурации β -лг, инициируется при 55-60⁰С, когда разрушению подвергаются D-E структуры; последующее увеличение температуры до 60-65⁰С связано с денатурацией C-D пары и α -спиралей в молекуле белка [18]. Критические

конформационные перестройки наблюдаются при 63⁰С, что обусловлено уменьшением содержания β-складчатых слоев на 19% [17]. Сульфгидрил-дисульфид индуцированная агрегация является следствием разрушения β-складчатых слоев, что может привести к формированию поперечных ковалентных связей между молекулами β-лг в результате окисления Cys₁₂₁ с образованием S-S связи и/или путем SH-индуцированного S-S перехода [19]. Но практически полное разворачивание молекулы наблюдается лишь при 80⁰С, исключая G-H пару, связанную дисульфидным мостиком, который формирует наиболее термически устойчивый элемент в молекуле β-лг [19]. Таким образом, гидролиз β-лг трипсином при 40-50⁰С сопряжен с инициацией конформационных переходов в молекуле белка, приводящих к обратимой диссоциации мономеров β-лг. Кроме того, учитывая проведение реакции в щелочных условиях рН 8,0, возможна инициация реорганизации вторичной структуры, главным образом, α-спиралей, что увеличивает доступность сайтов протеолиза, ранее скрытых в белковой глобуле. Также очевидно, что ферментативная реакция ограничивается температурным оптимумом активности трипсина (рисунок 4А). Вероятно, некоторое увеличение интенсивности протеолиза β-лг папаином при 30⁰С в большей мере обусловлено температурным оптимумом активности фермента папаина, тогда как возрастание степени протеолиза белка на температурном диапазоне 50-60⁰С объясняется индукцией конформационных перестроек в белковой глобуле термостабильного субстрата β-лг. При расщеплении β-лг флейворзимом резкое возрастание интенсивности протеолиза наблюдается при 40-60⁰С, что связано с увеличением каталитической активности фермента, а в диапазоне 55-60⁰С, очевидно, уже определяется денатурационными явлениями в молекуле субстрата. В случае использования термостабильной протеазы – термолизина – для которой оптимум каталитической активности составляет 70⁰С (рисунок 4Г), активный протеолиз β-лг показан в диапазоне 60-70⁰С, когда происходят критические конформационные перестройки, что обусловлено уменьшением содержания β-складчатых слоев на 19% [17].

В отличие от β-лг, для α-ла при возрастании температуры наблюдается более интенсивное расщепление белкового субстрата. Данное явление, вероятно, объясняется как большей термолабильностью α-ла [21-23], связанной с особенностями вторичной структуры белковой глобулы, так и меньшим сродством фермента к α-ла по сравнению с β-лг в данных условиях протеолиза (рисунок 4). По литературным данным, белок денатурирует при температуре 64⁰С и рН 7,0 [23]. В эксперименте гидролиз данного субстрата трипсином осуществляли в более жестких условиях – при рН 8,0, что, очевидно, привело к возникновению денатурационных явлений при более низкой температуре 50⁰С. Следовательно, SH/S-S переходы в белковой глобуле, инициированные изменением температуры, а также денатурация белка в жестких щелочных условиях, оптимум активности протеазы, являются комплексом факторов, определивших полученную закономерность (рисунок 4А). Относительно высокая степень протеолиза α-ла папаином при 30⁰С, наблюдаемая на диапазоне 20-50⁰С, очевидно, обусловлена оптимумом каталитической активности папаина; а возрастание интенсивности протеолиза на диапазоне 50-60⁰С, учитывая большую термолабильность α-ла в отличие от β-лг, объясняет активное расщепление α-ла в высокотемпературном режиме. Резкое увеличение интенсивности гидролиза α-ла флейворзимом в диапазоне 30-50⁰С в отличие от β-лг связано с как с большей термолабильностью α-ла, так и с увеличением каталитической активности фермента флейворзима с возрастанием температуры ферментативной системы до ≤50⁰С (рисунок 4В). При гидролизе указанного белка термостабильной протеазой, для которой оптимум

каталитической активности составляет 70⁰С, существенное возрастание интенсивности протеолиза термолабильного субстрата происходит уже с $\geq 50^{\circ}\text{C}$ (рисунок 4Г, кривая 2).

Таким образом, для эффективного протеолиза α -ла и β -лг трипсином необходим температурный режим 50⁰С, папаином - 60⁰С, флейворзимом - 50-60⁰С, термолизином - 70⁰С.

Выводы

Изучены закономерности гидролиза основных сывороточных белков (α -лактальбумина, β -лактоглобулина) ферментами трипсином, папаином, флейворзимом и термолизином в различных физико-химических условиях. Получены зависимости протеолиза белковых субстратов от концентрации фермента, в различном диапазоне температур и pH ферментативной системы. Учитывая представленные зависимости, наиболее предпочтительными условиями для совместного гидролиза сывороточных белков трипсином являются pH 9,0 и температурный режим 50⁰С, папаином - 6,0-8,0 и 60⁰С, флейворзимом - pH 8,0 и 50-60⁰С, термолизином - pH 9,0 и 70⁰С.

Литература

1. Fox P. F. The milk protein system / In *Developments in Dairy Chemistry-4*, Fox, P. F., Ed. Elsevier Applied Science: London, 1989; pp 1-53.
2. Morr C. V., Ha E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties / *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1993, 33, 431-476.
3. Creusot N. P. Enzyme-induced aggregation of whey proteins with *Bacillus licheniformis* protease / Ph.D. thesis Wageningen University, The Netherlands, 2006 with summaries in Dutch and French.
4. Iwaniak A., Minkiewicz P. Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides / *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 6(3) 2007, 5-15.
5. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: Пер. с англ. – М.: Мир, 1982. – Т.2 – 515 с., ил.
6. Антонов В. К., Химия протеолиза, М., 1983.
7. Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке: Пер. с англ. – М.: Мир, - Т.2.
8. Adler-Nissen J. Protease. In *Enzyme in food processing*, 3rd ed. Nagodawithana T. and Reed G. (eds). San Diego: Academic Press 1993, 159-203.
9. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P6110>
10. Matsubara H., *Methods in enzymology*, v. 19, ed. by G.E. Perlmann, N.Y.-L., 1970, p. 642-51; Holden H. M. [a. o.], "Biochemistry", 1987, v. 26, № 22, p. 8542-53. Л.Д. Румш.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.
12. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288с.
13. Creamer L. K., Nilsson H. C., Paulsson M. A., Coker C. J., Hill J. P., Jimer nez-Flores R. Effect of Genetic Variation on the Tryptic Hydrolysis of Bovine-Lactoglobulin A, B, and C / *J. Dairy Sci.* 87:4023–4032
14. Papiz M. Z., Sawyer L., Eliopoulos E. E., North A. C. T., Findlay J. B. C., Sivaprosadarao R., Jones T. A., Newcomer M. E., Kraulis P. J. The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein / *Nature* 1986, 324, 383-385.
15. Doucet D., Foegeding E. A. Gel formation of peptides produced by extensive enzymatic hydrolysis of β -lactoglobulin / *Biomacromolecules* 2005, 6, 1140-1148.

16. Sawyer L. β -lactoglobulin / In: P. F. Fox and P. L. H. McSweeney (eds) Advanced dairy chemistry -2003, Volume 1, 3rd Edn, Kluwer Academic/Plenum Publishers, p 319-386.
17. Prabakaran S., Damodaran S. Thermal unfolding of β -lactoglobulin: characterization of initial unfolding events responsible for heat-induced aggregation / J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 4303-4308.
18. Edwards P. J., Jameson G. B., Palmano K. P., Creamer L. K. Heat-resistant structural features of bovine β -lactoglobulin A revealed by NMR H/D exchange observations / Int. Dairy J. 2002, 12, 331-344.
19. Shimada K., Cheftel J. C. Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate / J. Agric. Food Chem. 1989, 37, 161-168.
20. Monahan F. J., German J. B., Kinsella J. E. Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulfide interchange reactions during heat-induced gelation of whey proteins / J. Agric. Food Chem. 1995, 43, 46-52.
21. Brew K., Grobler J. A. α -lactalbumin / In Advanced dairy chemistry: proteins, Fox, P. F., Ed. Elsevier Applied Science: New York, 1992; pp 191-229.
22. Chrysina E. D., Brew K., Acharya K. R.. Crystal structure of apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions / J. Biol. Chem. 2000, 275, 37021-37029.
23. Boye J. I., Alli I. Thermal denaturation of mixtures of α -lactalbumin and β -lactoglobulin: a differential scanning calorimetric study / Food Research International 2000, 33, 673-682.

REGULARITIES OF HYDROLYSIS OF WHEY PROTEINS WITH EXO- AND ENDOPROTEASES

T.N. Halavach ^{1,2}, N.V. Havrilenko ¹, N.K. Zhabanos ², V.P. Kurchenko ¹

¹Belarusian State University, ²RUF "Institute of meat and dairy industry", Minsk, Republic of
Belarus

The variations in degradation of main whey proteins β -lactoglobulin and α -lactalbumin resulting from changing some physicochemical conditions of hydrolysis (enzyme concentration, temperature, pH) with a proteinase from animal (trypsin), plant (papain), fungi (flavourzyme), bacteria (thermolysin) were discovered. Therefore the optimal conditions for hydrolysis of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with trypsin are pH 9.0 and temperature 50°C, papain – pH 6.0-8.0 and 50°C, flavourzyme - pH 8.0 and 50-60°C, thermolysin – pH 9.0 and 70°C