

О.О. Бабич, А.С. Солдатова, И.С. Разумникова

ОСОБЕННОСТИ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ФЕНИЛАЛАНИНА В ТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ ДЛЯ БОЛЬНЫХ ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ*

Выбраны оптимальные параметры проведения реакции гидролиза казеина, обеспечивающие максимальное удаление фенилаланина из полипептидной цепи, – энзиматическая система, состоящая из экзо- и эндопептидаз: термоллизин, карбоксипептидаза А и лейцинаминопептидаза, температура 50 ± 1 °С, фермент-субстратное соотношение 1:50 и продолжительность процесса $8 \pm 0,05$ ч. На основании результатов определения молекулярно-массового распределения показано, что гидролизаты казеина, полученные с использованием выбранной энзиматической системы, характеризуются высоким содержанием низкомолекулярных фракций, количество которых увеличивается в процессе реакции. С помощью метода хромато-масс-спектрометрии установлено полное высвобождение фенилаланина в процессе гидролиза. Изучена кинетика процесса биотрансформации фенилаланина в белковых гидролизатах, рассчитаны кинетические параметры: $K_m = 1731$ мкмоль, $V_m = 1,35$. Показано интенсивное накопление аммиака и транс-циннамовой кислоты в процессе биотрансформации фенилаланина.

L-фенилаланин-аммоний-лиаза, L-фенилаланин, фенилкетонурия, гидролизат, казеин, энзиматическая система, экзопептидаза, эндопептидаза.

Введение

Одним из основных факторов, определяющих здоровье человека, является питание, которое должно не только удовлетворять потребности организма в пищевых веществах и энергии, но и выполнять профилактические и лечебные функции [1]. В последние годы во всем мире особое внимание уделяется созданию специализированных и лечебных продуктов питания, которые играют важную роль в предотвращении возникновения различных заболеваний и укреплении здоровья. Правильно организованное питание с включением специализированных и лечебных продуктов способствует благоприятному течению болезни, повышению защитных свойств организма, активизирует течение анаболических процессов, что приводит к восстановлению здоровья. При некоторых заболеваниях применение рационов с включением специализированных и лечебных продуктов является единственным методом, позволяющим предупредить развитие тяжелых последствий болезни. К числу таких заболеваний относятся наследственные нарушения аминокислотного обмена [1, 2].

В настоящее время насчитывается около 60 наследственных заболеваний, связанных с нарушением обмена аминокислот. Наиболее распространенным из них является фенилкетонурия [3]. В основе заболевания лежит нарушение активности фермента фенилаланин-4-гидроксилазы, осуществляющего превращение фенилаланина в тирозин. Образовавшийся блок на пути превращения фенилаланина в тирозин приводит к накоплению и выведению продуктов аномального метаболизма, а также к развитию дисбаланса других аминокислот [4].

До настоящего времени единственным эффективным методом лечения фенилкетонурии является диетотерапия, построенная по принципу резкого ограничения количества фенилаланина, поступающего с пищей [5]. Из анализа отечественной и зарубежной литературы можно сделать вывод о том, что работы, посвященные получению гидролизатов для больных фенилкетонурией, относительно немногочисленны. Традиционная технология получения продуктов для лечения таких больных основана на селективной адсорбции или мембранном фракционировании частичных гидролизатов белка. Расщепление полипептидной цепи молекулы белка осуществляют протеазами, при этом степень гидролиза достигает 30–60 %, что не обеспечивает полного удаления фенилаланина из полипептидной цепи. В результате проведение последующей стадии (адсорбции или мембранного фракционирования) не является достаточно эффективным, поскольку при этом могут быть удалены молекулы фенилаланина, находящиеся исключительно в свободном состоянии [6].

Накоплены убедительные аналитические и экспериментальные данные о том, что данная проблема может быть с успехом решена с использованием фермента L-фенилаланин-аммоний-лиазы (PAL, КФ 4.3.1.5).

Целью настоящей работы является изучение особенностей биотрансформации фенилаланина в целенаправленных гидролизатах казеина с использованием L-фенилаланин-аммоний-лиазы с целью получения специализированных продуктов для больных фенилкетонурией.

* Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, государственный контракт № 16.740.11.0239.

Объекты и методы исследований

Объектом исследования являлся казеин. Гидролиз казеина проводили статическим методом в термостате с перемешиванием при температуре 50 ± 1 °С и рН $7,5 \pm 0,01$ (фосфатный буфер). Данные температура и рН являются оптимальными для используемых экзо- и эндопептидаз по данным литературы, а также согласно рекомендациям фирм-изготовителей. Гидролиз вели при продолжительности 4–24 ч, соотношении концентрации фермента к концентрации субстрата 1:25, 1:50 и 1:100. Все три фермента (одна эндопептидаза и две экзопептидазы) применяли совместно. Во избежание развития микрофлоры и появления неприятного запаха в колбы до начала процесса вводили 0,5%-ный толуол, который затем на заключительной стадии процесса – инактивации (температура 90–95 °С, продолжительность 5–10 мин) ферментов полностью испарялся.

Определение общего азота проводили с помощью анализатора белка RAPID N ELEMENTAR. Принцип метода заключается в определении азота за счет сжигания анализируемого вещества известной массы в условиях высокой температуры (около 900 °С) камеры в присутствии кислорода, что приводит к высвобождению углекислого газа, воды и азота, массовая доля которого детектируется прибором. Содержание общего белка рассчитывали умножением содержания общего азота на пересчетный коэффициент для белков молока, составляющий 6,38.

Определение аминного азота проводили спектрофотометрическим методом с использованием 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС). Метод основан на спектрофотометрическом определении хромофоров, образующихся при реакции первичных аминов с ТНБС. Количество аминного азота в исследуемых гидролизатах определяли по калибровочному графику, построенному для стандартных разведений известного вещества. Степень гидролиза определяли как отношение аминного азота к общему азоту.

Определение аминокислот проводили с помощью автоматического анализатора аминокислот Agasus PMA GmbH. Принцип метода состоит в катионообменном разделении аминокислот с шаговым градиентом рН и послеколоночной дериватизацией нингидрином. Для этого образцы предварительно подвергали кислотному (6 н. соляная кислота, температура 110 °С, 24–72 ч) или ферментативному гидролизу.

Молекулярно-массовое распределение белков и пептидов в получаемых гидролизатах оценивали с помощью белкового электрофореза методом Лэмли. Для разделения белков использовали денатурирующий полиакриламидный гель (12 % разделяющий и 4 % фокусирующий) с 0,1 % додецилсульфатом натрия. Электрофорез проводили на однократном электродном буфере с добавлением 0,1 % додецилсульфата натрия при 15 мА. Гель окрашивали 0,2 % Кумасси R250 (приготовленного на ледяной уксусной кислоте) при повышенной температуре в течение 7–10 мин, затем трижды промывали дистиллированной водой.

Просмотр и фотографирование гелей проводили на УФ-трансиллюминаторе TCP-20M (Vilber Lourmat,

США) при длине волны излучения 312 нм. Сохранение и обработку данных осуществляли с помощью гель-документирующей системы Vitran-Photo.

Аминокислотную последовательность образованных пептидов определяли с помощью хромато-масс-спектрометра системы Agilent 5975 С методом MALDI-TOF, заключающимся в разделении ионов по соотношению масса/заряд.

Биотрансформацию фенилаланина проводили статическим методом в термостате с перемешиванием при температуре 30 ± 2 °С и рН $8,00 \pm 0,01$ (фосфатный буфер). Биотрансформацию вели при продолжительности 2–8 ч, соотношении концентрации белка фермента к концентрации белка субстрата 1:25, 1:50 и 1:100. По окончании процесса ферментный препарат в составе гидролизата инактивировали нагреванием при 90–95 °С в течение 5–10 мин.

Определение аммиака и транс-циннамовой кислоты проводили с помощью системы капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ-105» по методике, разработанной в научно-образовательном центре при ГОУ ВПО КемТИПП.

Результаты и их обсуждение

Одним из перспективных направлений является использование белковых гидролизатов в качестве основных компонентов продуктов специального назначения [7]. При создании продуктов питания для больных фенилкетонурией важным является вопрос определения рациональных параметров гидролиза, обеспечивающего максимальное удаление фенилаланина из полипептидной цепи с целью последующей биотрансформации фенилаланина в соединения, не оказывающие токсического действия на организм больного.

В ходе исследования полагали, что, варьируя параметры технологического процесса, можно целенаправленно удалить фенилаланин из полипептидной цепи, причем ферментация энзиматическими системами, состоящими из экзо- и эндопептидаз, является наиболее доступным способом. В качестве исходного сырья использовали казеин, являющийся наиболее ценным в пищевом и биологическом отношении источником белка и наиболее адаптированным к физиологическим особенностям детского организма.

С целью удаления фенилаланина из полипептидной цепи использовали энзиматическую систему, состоящую из эндо- и экзопептидаз. Для осуществления наиболее полного гидролиза и максимального освобождения фенилаланина из полипептидной цепи ферментные препараты применяли совместно (в равных долях).

В качестве эндопептидазы использовали химотрипсин, проявляющий наибольшую активность по отношению к пептидным связям, в образовании которых принимают участие карбоксильные группы ароматических аминокислот: фенилаланина, тирозина и триптофана.

В качестве экзопептидаз выступали карбоксипептидаза А и лейцинаминопептидаза, катализирующие отщепление аминокислотных остатков с карбоксильного и аминного конца молекулы белка соответственно. Известно, что оптимальными параметрами функционирования используемых ферментов являются температура 50 ± 1 °С и рН 7,5. В связи

с этим гидролиз вели при данных условиях, варьируя параметры фермент-субстратного соотношения и продолжительности процесса.

В работе для исследования целенаправленного гидролиза казеина рассматривали следующие энзиматические системы: химо tripsин, карбоксипептидаза А и лейцинаминопептидаза; субтилизин, карбоксипептидаза А и лейцинаминопептидаза; эластаза, карбоксипептидаза А и лейцинаминопептидаза; термолизин, карбоксипептидаза А и лейцинаминопептидаза.

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что, несмотря на высокую специфичность, все исследуемые ферментные препараты отличаются способностью к целенаправленному удалению фенилаланина из полипептидной цепи. На основании полученных результатов выбраны оптимальные параметры проведения реакции гидролиза, обеспечивающие макси-

мальное удаление фенилаланина из полипептидной цепи молекулы казеина, – энзиматическая система, состоящая из экзо- и эндопептидаз: термолизин, карбоксипептидаза А и лейцинаминопептидаза, температура 50 ± 1 °С, фермент-субстратное соотношение 1:50 и продолжительность процесса $8 \pm 0,05$ ч.

К основным показателям целенаправленных гидролизатов казеина, обеспечивающих максимальное удаление фенилаланина из полипептидной цепи, относятся: массовая доля фенилаланина, степень гидролиза при определенных фермент-субстратных соотношениях и продолжительность при оптимальных параметрах работы ферментов. Состав и свойства гидролизатов казеина, полученных в результате обработки термолизином, карбоксипептидазой А и лейцинаминопептидазой, представлены в табл. 1.

Таблица 1

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

Показатель	Контроль	Фермент-субстратное соотношение, при продолжительности гидролиза, ч								
		1:100			1:50			1:25		
		4,0	8,0	24,0	4,0	8,0	24,0	4,0	8,0	24,0
Массовая доля фенилаланина, г/100 г белка	0	3,27	4,83	5,61	5,18	5,80	5,80	4,28	5,08	5,80
Степень гидролиза, %	0	28,84	45,21	64,75	50,25	65,91	86,17	34,02	44,45	58,74
pH	7,5	7,41	7,36	7,28	7,39	7,35	7,29	7,37	7,32	7,28

Полученные результаты свидетельствуют о том, что термолизин обладает выраженной протеолитической активностью в отношении казеина. Так, при фермент-субстратном соотношении 1:50 массовая доля свободного фенилаланина при 4,0; 8,0 и 24,0 ч составляет 89,31; 100 и 100 % соответственно. Данные фермент-субстратное соотношение и продолжительность гидролиза 8,0 ч являются оптимальными, поскольку при фермент-субстратном соотношении 1:100 степень извлечения фенилаланина при 24,0 ч гидролиза составляет 96,72 %, что, вероятно, связано с конкурентным ингибированием субстрата, а увеличение концентрации фермента и проведение гидролиза при фермент-субстратном соотношении 1:25 является нецелесообразным, что связано с высокой стоимостью фермента.

Анализ полученных данных показывает, что наиболее рациональным фермент-субстратным соотношением является 1:50 при рекомендуемой литературными источниками температуре 50 ± 1 °С и pH $7,5 \pm 0,01$. При данном соотношении процесс ферментации имеет необходимую и достаточную направленность, в результате чего степень извлечения фенилаланина из полипептидной цепи за 4,0 ч составляет 89,3 %, а за 8,0 ч достигает своего максимального значения и составляет 100 %.

При уменьшении или увеличении концентрации субстрата (при фермент-субстратном соотношении 1:100 или 1:25) наблюдается снижение скорости реакции при незначительном увеличении степени извлечения фенилаланина из полипептидной цепи. Возможно, это связано с образованием неэффективных

комплексов, в которых с активным центром фермента связаны две или несколько молекул субстрата.

На рис. 1 представлено молекулярно-массовое распределение рассмотренных гидролизатов, полученных методом электрофореза в полиакриламидном геле. Данные, представленные на рис. 1, 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.

Результаты аминокислотного анализа полученных гидролизатов позволяют сделать вывод о том, что в процессе гидролиза казеина термолизином, карбоксипептидазой А и лейцинаминопептидазой происходит наиболее интенсивное накопление ароматических аминокислот, в том числе фенилаланина, по сравнению с другими рассмотренными комбинациями ферментов, что позволяет отдать предпочтение именно этой комбинации ферментов при разработке технологий продуктов питания для больных фенилкетонурией.

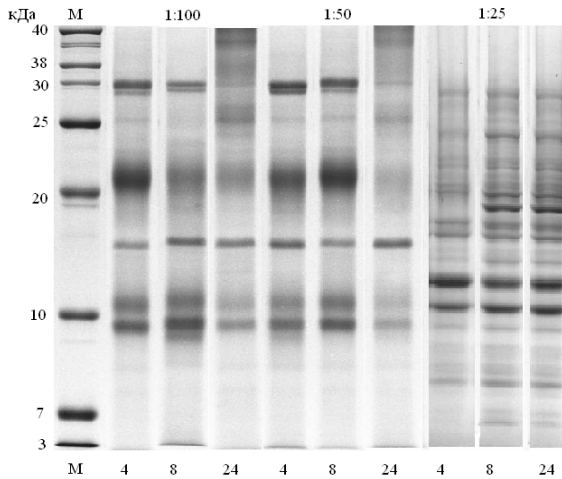


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле гидролизата казеина термолизином, карбоксипептидазой А и лейцинаминопептидазой (окрашивание кумасси бриллиантовый синий G-250) при фермент-субстратных соотношениях 1:25–1:100 и продолжительности гидролиза 4,0; 8,0 и 24,0 ч, температуре 50 ± 1 °С и рН $7,5 \pm 0,01$ (концентрация белка 2,0 мг/мл в буфере 0,5 М трис-НСl)

С целью доказательства того факта, что весь фенилаланин при выбранных параметрах процесса гидролиза высвобождается из полипептидной цепи, проведен более детальный анализ пептидных профилей и определена аминокислотная последовательность полученных фрагментов методом MALDI-TOF с помощью хромото-масс-спектрометра. Результаты проведенных исследований представлены на рис. 2 и в табл. 2.

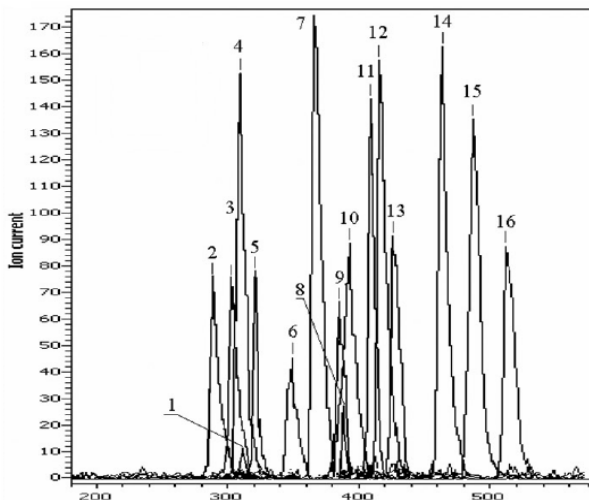


Рис. 2. Хромотограмма пептидов, полученных в результате обработки термолизином

Результаты анализа пептидных профилей гидролизата казеина

№ пика	Молекулярная масса, Да	Порядок расположения в полипептидной цепи	Аминокислотная последовательность
1	1197	55–64	LSKDIGSEST
2	763	100–104	KEDVPS
3	915	205–210	ENSEKTT
4	972	81–88	SSSEEIVP
5	914	22–28	KHQGLPQ
6	773	185–190	GTQYTD
7	705	118–122	KYKVP
8	683	179–182	WYYV
9	616	195–199	SDIPN
10	642	125–129	EIVPN
11	385	173–176	AYP
12	585	145–148	QQKE
13	443	161–163	YPE
14	439	92–94	EQK
15	416	17–19	PKH
16	368	48–50	GKE

Анализ данных, представленных на рис. 2 и в табл. 2, свидетельствует о том, что в составе полученных фрагментов полностью отсутствует фенилаланин, что позволяет использовать подобранные параметры гидролиза для изучения процесса биотрансформации фенилаланина с помощью L-фенилаланин-аммоний-лиазы.

L-фенилаланин-аммоний-лиаза характеризуется высокой специфичностью к фенилаланину по сравнению со всеми остальными ферментами его метаболизма. Общая схема процесса биотрансформации фенилаланина представлена на рис. 3.

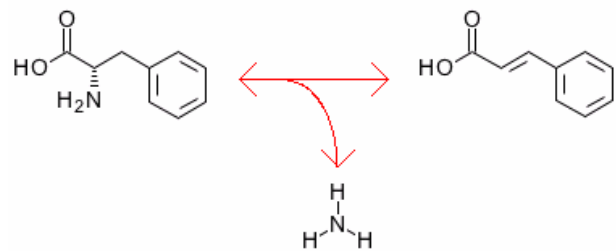


Рис. 3. Общая схема биотрансформации фенилаланина

В ходе исследований предпринята попытка изучения кинетики процесса биотрансформации фенилаланина в белковых гидролизатах в условиях регуляции скорости с помощью различных физико-химических факторов. Для этого в процессе формирования массива экспериментальных данных из серии опытов рассчитывали константы Михаэлиса-Ментен, максимальной скорости биотрансформации и продолжительности ферментативной обработки с учетом оптимальных параметров, необходимых для работы фермента (рН среды и температура). Полученные оптимальные параметры могут

быть в дальнейшем использованы при разработке технологии молочного белкового эквивалента для специализированных продуктов питания.

На рис. 4 представлена зависимость скорости реакции биотрансформации от концентрации фенилаланина.

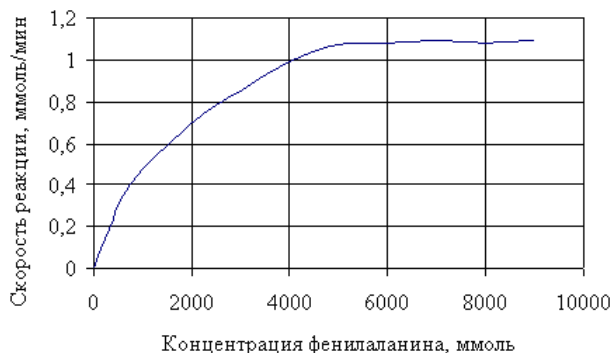


Рис. 4. Кривая зависимости скорости реакции от концентрации фенилаланина

В результате анализа данных, представленных на рис. 4, можно сделать вывод о том, что зависимость скорости реакции биотрансформации от концентрации субстрата описывается классической гиперболической кривой. Характер подобной зависимости изучали при различных концентрациях субстрата от 300 до 9000 ммоль. Из графика видно, что при низких значениях субстрата скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата. Однако при достижении концентрации фенилаланина 5000 ммоль скорость реакции достигает своего максимального значения. Видимо, при данной концентрации субстрата весь фермент оказывается насыщенным им и концентрация фермент-субстратного комплекса становится равной концентрации фермента. При более высокой концентрации субстрата интенсивность гидролиза остается постоянной, что, очевидно, обусловлено субстратным ингибированием.

Полученные данные проанализировали методом линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен по Лайнуверу-Берку (рис. 5). Методом наименьших квадратов определяли тангенс угла наклона, численно равный $1/V_m$, а точка пересечения экстраполированной прямой с осью ординат соответствует отношению K_m/V_m ; точка пересечения с осью абсцисс – K_m .

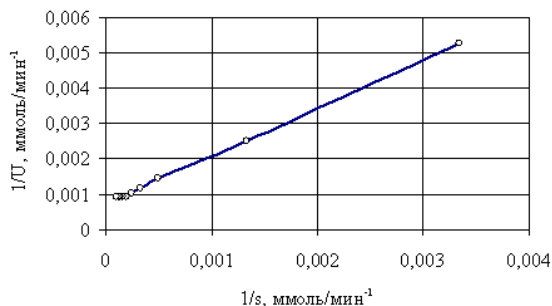


Рис. 5. Графическое определение максимальной скорости ферментативной реакции и константы Михаэлиса методом Лайнувера-Берка

В процессе рассчитана константа Михаэлиса-Ментен, численное значение которой составило 1725 мкмоль. При этом максимальная скорость процесса биотрансформации 1,2 мкмоль/мин. Аналогичные данные ($K_m = 1731$ мкмоль, $V_m = 1,35$) были получены и другими исследователями в процессе изучения действия L-фенилаланин-аммоний-лиазы в модельных условиях [8]. Известно, что K_m может несколько варьировать в зависимости от соотношения изоформ фенилаланина, вида буфера и присутствия в реакционной среде регуляторов ферментативной активности.

Дальнейшие исследования направлены на изучение накопления продуктов реакции в процессе биотрансформации фенилаланина под действием L-фенилаланин-аммоний-лиазы при установленных параметрах реакции: $K_m = 1731$ мкмоль, $V_m = 1,35$. Известно, что оптимальными параметрами работы L-фенилаланин-аммоний-лиазы являются температура 50 ± 1 °C и pH 7,5. В связи с этим изучена динамика накопления аммиака и транс-циннамовой кислоты в процессе реакции ($\lambda = 254$ нм; тетраборатный буфер pH = 9,2; напряжение 25 кВ). Результаты, полученные в ходе исследования, представлены на рис. 6.

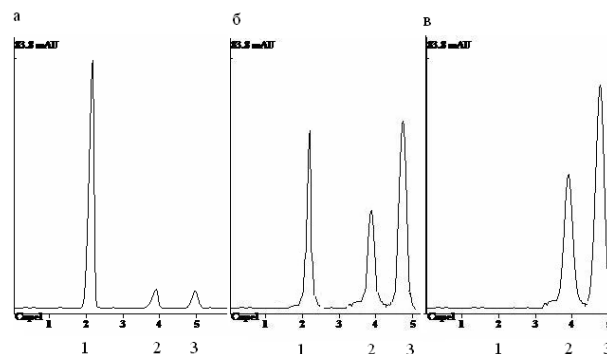


Рис. 6. Динамика накопления аммиака и транс-циннамовой кислоты в процессе биотрансформации фенилаланина под действием L-фенилаланин-аммоний-лиазы в течение: а – 2,0 ч; б – 4,0 ч; в – 8,0 ч; 1 – фенилаланин; 2 – аммиак; 3 – транс-циннамовая кислота

В результате анализа данных, представленных на рис. 6, можно сделать вывод о том, что в процессе биотрансформации происходит интенсивное накопление аммиака и транс-циннамовой кислоты, что свидетельствует о превращении фенилаланина под действием L-фенилаланин-аммоний-лиазы в продукты реакции. Так, массовая доля фенилаланина за 2,0 ч составила 69,8 % от первоначального значения, за 4,0 ч – 23,03 %, а при 8,0 ч достигает своего минимального значения.

Обобщая результаты проведенных экспериментов, следует отметить, что в результате высокоспецифичного действия L-фенилаланин-аммоний-лиазы на гидролизат казеина происходит превращение фенилаланина в такие метаболиты, как аммиак и транс-циннамовая кислота. Полученные данные целесообразно использовать при разработке технологий создания продуктов специального назначения для больных фенилкетонурией.

Список литературы

1. Большаков, О.В. Государственная политика в области здорового питания / О.В. Большаков // Молочная промышленность. – 1999. – № 6. – С. 5–6.
2. Диетотерапия наследственных нарушений аминокислотного обмена / Е.П. Рыбакова, Т.В. Бушуева, К.С. Ладодо и др. // Вопросы детской диетологии. – 2005. – Т. 3. – № 1. – С. 11–17.
3. Копылова, Н.В. Фенилкетонурия: классификация, диагностика, диетотерапия / Н.В. Копылова // Вопросы детской диетологии. – 2004. – Т. 2. – № 6. – С. 31–46.
4. Копылова, Н.В. ФКУ вчера, сегодня, завтра / Н.В. Копылова, А.Д. Байков, А.А. Ходунова. – М., 2004. – 47 с.
5. Ладодо, К.С. Специализированные продукты питания для детей с различной патологией / К.С. Ладодо, Г.Ю. Сажинов. – М., 2000. – 200 с.
6. Проектирование специальных молочных продуктов для детей / О.И. Башкиров, С.В. Симоненко, Т.А. Антипов и др. // Молочная промышленность. – 2007. – № 6. – С. 48–51.
7. Телишевская, Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение / под ред. А.Н. Панина – М.: Аграрная наука, 2000. – 295 с.
8. Hrazdina, G. Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways / G. Hrazdina, R.A. Jensen // Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. – 2002. – V. 43. – P. 241–267.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

SUMMARY

O.O. Babich, L.S. Soldatova, I.S. Razumnikova

**Peculiarities of phenylalanine biotransformation in technology
of food for patients suffering from phenylketonuria**

Optimum parameters of carrying out the reaction of casein hydrolysis providing the maximum removal of phenylalanine from polypeptide chains, – the enzymatic system consisting of exo- and endopeptidase have been chosen: a thermolysine, carboxypeptidase A and leucine aminopeptidase, temperature 50 ± 1 °C, enzyme-substrat parity 1:50 and process duration of 8,0 h. Based on the results of definition of molecule-mass distribution it has been shown that the hydrolysates of the casein obtained with the use of chosen enzymatic system are characterized by high content of low-molecular fractions, their quantity increasing in the course of reaction. A complete discharge of phenylalanine in the course of hydrolysis was established by means of a chromato-mass spectrometry method. Kinetics of phenylalanine biotransformation process in albuminous hydrolysates has been studied. Kinetic parameters have been calculated: $K_m = 1731$ mkmol, $V_m = 1,35$. Intensive accumulation of ammonia and trans-cinnamic acid during phenylalanine biotransformation is shown.

L-phenylalanine ammonia-lyase, L-phenylalanine, phenylketonuria, hydrolysate, casein, enzymatic system, exopeptidase, endopeptidase.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia
Phone/Fax: +7(3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

