

УДК 637.147.2:547.784.2

Г.В. Борисова, О.В. Бессонова, А.В. Крупин**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ УДАЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ГИСТИДИНА ИЗ ГИДРОЛИЗАТОВ КАЗЕИНА**

Изучена кинетика деструкции гистидина с помощью L-гистидин-аммоний-лиазы и разработана технология удаления продуктов его биотрансформации (аммиака и уроганиновой кислоты) из гидролизатов казеина, что определяет их дальнейшее использование в качестве молочного белкового эквивалента для производства функциональных продуктов, предназначенных для питания больных гистидинемией.

Биотрансформация гистидина, L-гистидин-аммоний-лиаза, удаление аммиака, уроганиновая кислота, гистидинемия.

Введение

В настоящее время описано более 600 видов наследственных нарушений обмена. При развитии этих заболеваний поражение центральной нервной системы приводит к возникновению так называемого сложного дефекта, т. е. к различным сочетаниям интеллектуальной недостаточности с поражениями двигательной системы, недоразвитием речи, нарушениями зрения, слуха, эмоционально-поведенческими расстройствами и судорожными припадками [1].

Наследственные нарушения обмена веществ обусловлены мутациями-изменениями последовательности нуклеотидов ДНК. Мутации приводят к синтезу дефектных белков (в том числе структурных белков, ферментов, гормонов, факторов роста, белков-рецепторов). В частности, если мутация затрагивает ген, кодирующий фермент, то последний частично или полностью утрачивает каталитическую активность [2]. Подавляющее большинство наследственных нарушений метаболизма обусловлено генетическими дефектами ферментов, участвующих в обмене аминокислот, углеводов и липидов. Патогенез и клинические проявления определяются отсутствием промежуточных или конечных нормальных метаболитов и накоплением токсических метаболитов. Клиническая картина в значительной мере зависит от степени проявления (экспрессивности) мутантного гена, а также от других генетических факторов и условий окружающей среды. Самые частые и тяжелые последствия биохимических дефектов у большинства больных людей – умственная отсталость и неврологические расстройства [3].

На данный момент в России активно начали выявлять среди новорожденных детей такое заболевание, как гистидинемия, которое оказывается врожденным нарушением аминокислотного обмена. Гистидинемия – это наследственное заболевание, связанное с нарушением обмена аминокислоты гистидина. В основе заболевания лежит врожденный дефект фермента гистидин-аммиак-лиазы класса лиаз (КФ 4.3.1.3, ген HAI1, 12q22-q23), катализирующий дезаминирование L-гистидина с образованием уроганиновой кислоты и аммиака. Гистидин (L- α -амино- β -имидазолпропионовая кислота) – незаменимая аминокислота, которая обязательно должна входить в состав продуктов питания для детей раннего возраста. Также она является составной частью активного центра ферментов и источником образования гистамина в организме человека. В результате метаболического блока происходит

значительное накопление в тканях и жидкостях больного организма гистидина и продуктов его аномального метаболизма (имидазолпировиноградной, имидазолмолочной, имидазолуксусной кислот), оказывающих токсическое воздействие на центральную нервную систему [4].

Сегодня единственным эффективным методом лечения гистидинемии является диетотерапия, при которой основной принцип лечебного питания заключается в ограничении поступления гистидина с пищей в тех пределах, в которых назначенная диета наиболее адекватна особенностям метаболических процессов больного организма.

Цель данного исследования состояла в изучении и разработке технологии биотрансформации гистидина в гидролизатах белков молока с использованием L-гистидин-аммоний-лиазы и создании технологии молочного белкового эквивалента для специализированных продуктов питания.

Объекты и методы исследования

В качестве материала исследования использовали гидролизат казеина, полученный в процессе гидролиза воздействием ферментативной системой на молочный белок, состоящей из экзо- и эндопептидаз термолизина, карбоксипептидазы А и лейцинаминопептидазы при температуре $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$, фермент-субстратном соотношении 1:50 и продолжительности процесса $(8 \pm 0,05)$ ч.; L-гистидин-аммоний-лиазу 8,6 ед./мг белка (фирма Sigma), натрий лимоннокислый трехзамещенный 5,5-водный пищевой по ГОСТ 31227–2004; воду питьевую по ГОСТ 2874. Остальные использованные отечественные и импортные реактивы имели степень чистоты не ниже х.ч.

Отбор проб и подготовку их к анализу проводили по ГОСТ 26809 «Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу». Биотрансформацию гистидина проводили с помощью статического метода в термостате с перемешиванием при температуре $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$ и pH $(9 \pm 0,01)$ (фосфатный буфер). Данная температура и pH являются оптимальными для используемых L-гистидин-аммоний-лиазы в соответствии со сведениями в литературе [5], а также согласно рекомендациям фирм-изготовителей. Биотрансформацию вели при продолжительности 2–8 ч, соотношение концентрации белка фермента к концентрации белка субстрата было равно 1:25, 1:50 и 1:100. По окончании процесса ферментный

препарат в составе гидролизата инактивировали нагреванием при температуре 90–95°С в течение 5–10 мин.

Определение аммиака и уроканиновой кислоты проводили с помощью системы капиллярного электрофореза КАПЕЛЬ 105 по методике, разработанной в научно-образовательном центре при ФГБОУ ВПО «КемГИПП».

Удаление аммиака проводили с помощью ротационного испарителя ИР-1ЛТ, предназначенного для проведения работ, связанных с быстрым удалением растворителей из растворов или суспензий органических и неорганических соединений путем пленочного испарения при нормальном или пониженном давлении и контролируемой температуре [6].

Результаты и их обсуждение

В ходе исследований изучена кинетика процесса биотрансформации гистидина в белковых гидролизатах в условиях регуляции скорости с помощью различных физико-химических факторов.

На рис. 1 представлена зависимость скорости реакции биотрансформации от концентрации гистидина.

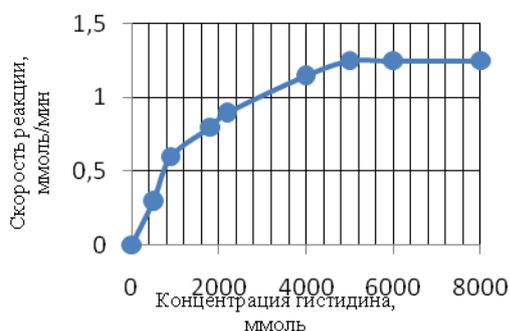


Рис. 1. Кривая зависимости скорости реакции от концентрации гистидина

В результате анализа данных, представленных на рис. 1, сделали 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 гистидина 5000 ммоль она получает свое максимальное значение. Видимо, при данной концентрации субстрата весь фермент оказывается насыщенным им и концентрация фермент-субстратного комплекса ES становится равной концентрации фермента. При

более высокой концентрации субстрата интенсивность гидролиза остается постоянной, что, очевидно, обусловлено субстратным ингибированием.

Полученные данные проанализировали с помощью метода линеаризации уравнения Михаэлиса – Ментен по Лайнуиверу – Берку и представлены на рис. 2. Методом наименьших квадратов определяли tg угла наклона, численно равный $1/V_m$, а точка пересечения экстраполированной прямой с осью ординат соответствует K_m/V_m ; точка пересечения с осью абсцисс – K_m .

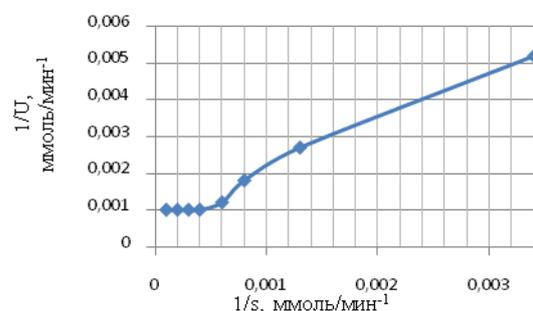


Рис. 2. Графическое определение максимальной скорости ферментативной реакции и константы Михаэлиса методом Лайнуивера – Берка

В процессе исследований установлена константа Михаэлиса, численное значение которой составило 1745 мкмоль. При этом максимальная скорость процесса биотрансформации составила 1,25 мкмоль/мин. Похожие данные получены и другими учеными в результате изучения действия L-гистидин-аммоний-лиазы в модельных условиях и составили $K_m = 1751$ мкмоль, $V_m = 1,15$. Известно, что K_m может несколько варьировать в зависимости от соотношения изоформ гистидина, вида буфера и присутствия в реакционной среде регуляторов ферментативной активности [7].

Дальнейшие исследования были направлены на изучение накопления продуктов реакции в процессе биотрансформации гистидина под действием L-гистидин-аммоний-лиазы при найденных параметрах реакции: $K_m = 1751$ мкмоль, $V_m = 1,15$. Известно, что оптимальными параметрами работы L-гистидин-аммоний-лиазы является температура (30 ± 1) °С и pH 8,5. В связи с этим изучена динамика накопления аммиака и уроканиновой кислоты в процессе реакции ($\lambda = 254$ нм; тетрабортный буфер pH=9,2; напряжение = 25кВ). Результаты данных, полученных в ходе исследования, представлены на рис. 3.

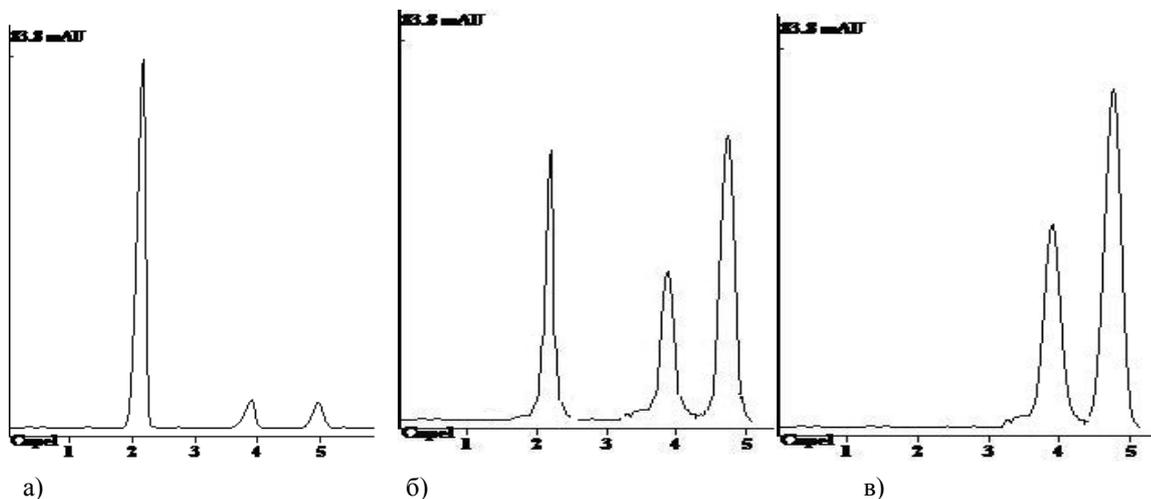


Рис. 3. Динамика накопления аммиака и уроканиновой кислоты в процессе биотрансформации гистидина под действием L-гистидина-аммоний-лиазы в течение: а) $(2 \pm 0,05)$ ч; б) $(4 \pm 0,05)$ ч; в) $(8 \pm 0,05)$ ч; 1 – гистидин; 2 – аммиак; 3 – уроканиновая кислота

В результате анализа данных, представленных на рис. 3, можно сделать вывод о том, что в процессе биотрансформации происходит интенсивное накопление аммиака и уроканиновой кислоты, что свидетельствует о превращении гистидина под действием L-гистидина-аммоний-лиазы в продукты реакции. Так, массовая доля гистидина за $(2 \pm 0,05)$ ч составила 71,3% от первоначального значения, за $(4 \pm 0,05)$ ч – 32,06%, а при $(8 \pm 0,05)$ ч достигает своего минимального значения.

Аминокислотный состав полученных гидролизатов представлен в табл. 1.

Таблица 1

Аминокислотный состав гидролизатов казеина, полученный в результате биотрансформации L-гистидина-аммоний-лиазы

Аминокислоты г /100 г	Казеин*	Гидролизат
Незаменимые, всего, в том числе:	40,32	25,29
Валин	5,36	0
Изолейцин	6,15	4,8
Лейцин	11,66	10,61
Лизин	8,9	4,69
Метионин	3,3	3,39
Треонин	4,27	1,8
Триптофан	0,68	0
Фенилаланин	5,8	0
Заменимые, всего, в том числе:	59,68	33,75
Аланин	5,39	3,7
Аргинин	4,45	3,42
Аспарагиновая кислота	3,33	1,62
Гистидин	3,33	2,8
Глицин	2,42	0,92
Глутаминовая кислота	14,59	7,83
Пролин	12,97	4,2
Серин	3,84	1,02
Тирозин	7,56	7,04
Цистеин	1,8	1,2
Всего	100	59,04

* Приведены результаты собственных исследований.

Следует отметить, что в проведенных экспериментах, в результате высокоспецифичного действия L-гистидина-аммоний-лиазы происходит образование метаболитов: аммиака и уроканиновой кислоты. Аммиак, будучи конечным продуктом азотистого обмена в организме человека и животных, является высокотоксичным соединением. Поэтому концентрация аммиака должна сохраняться на низком уровне (в норме уровень его не превышает 60 мкмоль/л). В связи с этим была разработана технология удаления продуктов биотрансформации из полученных гидролизатов.

Удаление из полученных гидролизатов казеина побочных продуктов биотрансформации гистидина (аммиака и уроканиновой кислоты) позволили привести разработанную технологию в соответствие с требованиями, предъявляемыми к продуктам без гистидина или с низким его содержанием [8].

Очистку гидролизата проводили в два этапа. На первом этапе осуществляли удаление аммиака. Из научной литературы известно, что аммиак является бесцветным газом с резким характерным запахом, почти вдвое легче воздуха, хорошо растворим в воде. При повышении температуры растворимость аммиака падает и он испаряется. В связи с этим предпринята попытка определения оптимальных параметров удаления аммиака путем варьирования параметрами технологического процесса: температурой и продолжительностью при давлении 0,75 МПа. Результаты полученных исследований представлены на рис. 4.

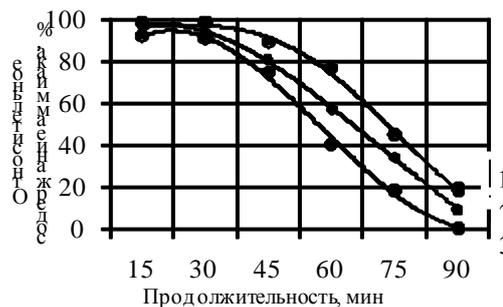


Рис. 4. Динамика удаления аммиака в процессе очистки: 1 – при $(60 \pm 5)^\circ\text{C}$; 2 – при $(70 \pm 5)^\circ\text{C}$; 3 – при $(80 \pm 5)^\circ\text{C}$

В результате анализа данных можно сделать вывод о том, что при температуре $(60\pm 5)^\circ\text{C}$ массовая доля аммиака уменьшается на 76,5%, при $(70\pm 5)^\circ\text{C}$ – на 89,5%, что не обеспечивает достаточно полного удаления аммиака и не позволяет использовать данные параметры очистки при разработке технологии молочного белкового эквивалента для функциональных продуктов питания специального назначения, соответствующего требованиям действующих стандартов [8].

Однако при температуре $(80\pm 5)^\circ\text{C}$ и продолжительности процесса 90 мин наблюдается полное удаление аммиака из реакционной смеси.

На втором этапе проводили очистку полученных гидролизатов от уруканиновой кислоты. Удаление уруканиновой кислоты из растворов проводили путем осаждения при низкой температуре. Поэтому дальнейшие исследования были направлены на подбор условий для максимального удаления уруканиновой кислоты: температуры и продолжительности обработки. Результаты полученных исследований представлены на рис. 5.

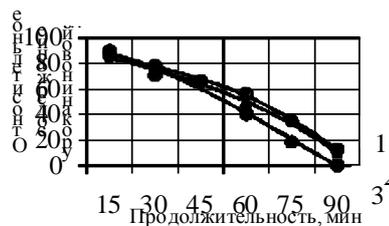


Рис. 5. Динамика удаления уруканиновой кислоты в процессе очистки: 1 – при температуре $(60\pm 5)^\circ\text{C}$; 2 – при температуре $(70\pm 5)^\circ\text{C}$; 3 – при температуре $(80\pm 5)^\circ\text{C}$

В результате анализа данных можно сделать вывод о том, что оптимальными условиями для удаления уруканиновой кислоты являются: температура $(0\pm 5)^\circ\text{C}$, продолжительность процесса (90 ± 1) мин. Спектры поглощения аммиака и уруканиновой кислоты до и после очистки представлены на рис. 6.

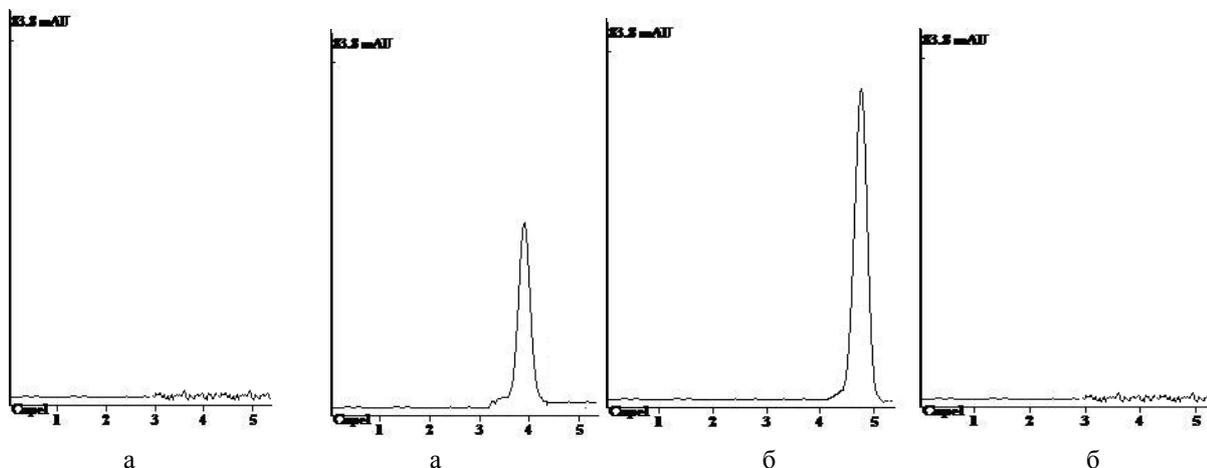


Рис. 6. Спектр поглощения: 1 – аммиака; 2 – уруканиновой кислоты; а) до очистки; б) после очистки

В табл. 2 представлено содержание продуктов биотрансформации в полученных гидролизатах.

Таблица 2

Содержание аммиака и уруканиновой кислоты до и после очистки

Наименование	Значение, мг/100 г	
	До очистки	После очистки
Аммиак	$3,27\pm 0,05$	$0,001\pm 0,0001$
Уруканиновая кислота	$5,64\pm 0,03$	$0,001\pm 0,0001$

В результате анализа данных, представленных в табл. 2, можно сделать вывод о том, что подобранные параметры очистки полученных гидролизатов от продуктов биотрансформации гистидина обеспечивают их полное удаление из реакционной смеси и позволяют использовать полученные гидролизаты в качестве молочного белкового эквивалента при производстве специализированных продуктов, предназначенных для больных гистидинемией.

Дальнейшие исследования направлены на разработку технологии молочного белкового эквивалента для специализированных продуктов питания, предназначенных для больных гистидинемией.

Список литературы

1. Просеков, А.Ю. Анализ состава и свойств белков молока с целью использования в различных отраслях пищевой промышленности / А.Ю. Просеков, М.Г. Курбанова // Техника и технология пищевых производств. – 2009. – № 4. – С. 68–71.
2. Бабаич, О.О. Биологически активные пептиды из белков молока / О.О. Бабаич, О.В. Козлова, И.С. Разумникова, А.Ю. Просеков // Молочная промышленность. – 2010. – №9. – С. 68–69.
3. Шабалов, Н.П. Детские болезни: учебник. В двух томах. Т. 2. – 5-е изд. – СПб: Питер, 2002. – 736 с.
4. 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.
5. Диксон, М. Ферменты. В трех томах. Т.1 / М. Диксон, Э.Уэбб; пер. с англ. – М.: Мир, 1982. – 392 с.
6. Патент (Европа) № 0,610,411,В1(1994). Casein hydrolysate and method for production of such casein hydrolysate / Nielsen P.M.
7. Патент США № 4600588 (1986). Milk protein hydrolysate and process of preparation / Ernster J.H.
8. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.1078-01. – М.: Минздрав РФ, 2002. – 164 с.

ФГБОУ 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

G.V. Borisova, O.V. Bessonova, A.V. Krupin

**TECHNOLOGY OF REMOVAL OF HISTIDINE BIOTRANSFORMATION PRODUCTS
FROM CASEIN HYDROLYSATES**

The kinetics of the process of histidine splitting with L-histidine ammonia-lyase is studied. The technology for removal of the biotransformation products of histidine (ammonia and urocanic acid) in casein hydrolysates is developed, which allows to use them as the equivalent of a milk protein for the production of functional foods for patients with ahistidasia.

Histidine biotransformation, L-histidine ammonia-lyase, ammonia removal, urocanic acid, ahistidasia.

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

