

Anna TRUSEK-HOŁOWNIA, Alicja PRZYBYŁ, Andrzej NOWORYTA

e-mail: anna.trusek-holownia@pwr.edu.pl

Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

## Zagospodarowanie odpadowej serwatki w kierunku aktywnych peptydów

### Wstęp

**Serwatka** stanowi uboczny produkt podczas przetwórstwa mleka, przy uzyskiwaniu serów dojrzewających, podpuszczkowych jak i twarogów. Jest to tzw. odciek, który pozostaje po reakcji strącania kazeiny. W zależności od gatunku oraz pochodzenia mleko może się nieznacznie różnić, głównie pod względem ilościowym. Zawartość poszczególnych składników w serwatce zmienia się także w zależności od pory roku, jak również okresu laktacji zwierzęcia [Zal, 1992].

Ze względu na zawarte w serwatce białka oraz laktozę uznaje się ją za wartościowy produkt uboczny, ale równocześnie zalicza się do odpadów uciążliwych ekologicznie. Wartości współczynników BZT<sub>5</sub> i ChZT są wysokie, wynoszą odpowiednio 30 g O<sub>2</sub> dm<sup>-3</sup> oraz 60÷80 g O<sub>2</sub> dm<sup>-3</sup>. Serwatka jest medium trudnym do utylizacji. Jednocześnie skala jej wytwarzania stale się powiększa (szacuje się, że jej światowa produkcja wynosi obecnie 145·10<sup>6</sup> Mg na rok), a wymagania legislacyjne dotyczące ekologicznego aspektu gospodarki odpadami stają się coraz bardziej restrykcyjne.

Z wymienionych wyżej powodów rośnie zainteresowanie wielokierunkowym przetwarzaniem serwatki. Obecnie efektywnie zagospodarowuje się ok. 50% serwatki, a z tej ilości ok. 45% wykorzystuje się bezpośrednio jako serwatkę ciekłą, 30% jako sproszkowaną, 15% to odzyskana laktoza i bezlaktozowe produkty uboczne, a 10% stanowią preparaty białek serwatkowych [Bednarski, 2001].

**Białka serwatkowe** są mieszaniną trzech głównych składników, które stanowią ok. 80% całkowitej frakcji białkowej oraz 20% innych białek występujących w niewielkich ilościach, wśród których znajdują się również enzymy. Proteiny wchodzące w skład głównej frakcji to: α-laktoglobulina, β-laktoglobulina oraz immunoglobuliny.

**Hydroliza białek** wykorzystująca proteazy (enzymy hydrolizujące białka) ma tę przewagę nad metodą chemiczną, że w wyniku reakcji powstają różnej długości peptydy o znanej sekwencji aminokwasów, wynikającej ze specyficzności zastosowanego biokatalizatora.

W pracy zaprezentowano propozycję alternatywnego zagospodarowania serwatki. Dobierając odpowiednio zarówno enzym jak i parametry prowadzenia reakcji można uzyskać produkt o pożądanym składzie. Mieszanina peptydów stanowi już interesujący produkt, może być też źródłem związków o wyjątkowych właściwościach leczniczych. Bioaktywne sekwencje to oligopeptydy począwszy od dipeptydów. W rzadkich przypadkach aktywny produkt zawiera więcej niż 10 aminokwasów [Dziuba i Fornal, 2009].

Celem pracy było określenie podatności białek serwatkowych na działanie dostępnych handlowo proteaz. Badano szybkość procesu hydrolizy oraz skład mieszaniny reakcyjnej w czasie. Na tej podstawie próbowano rozpoznać mechanizm cięcia białek przez dany biokatalizator. Określono również całkowitą wydajność procesu hydrolizy białek serwatkowych dla każdej zastosowanej proteazy. Mając na uwadze wykorzystanie produktów interesujące jest pozyskanie frakcji poniżej 1 kDa (co odpowiada średnio peptydom złożonym z max 8-9 reszt aminokwasowych).

### Materiały i metody

**Substrat** stanowiła serwatka po produkcji serów kozich firmy *Kozia Łąka* (Łomica k. Jeleniej Góry). W badaniach rozcieńczano ją do uzyskania stężenia białka 15 g·l<sup>-1</sup>. Stężenie białka oznaczano metodą *Lowry'ego* [1951].

**Enzymy:** termolizyna (Cat#58656, *Calbiochem*), subtylizyna A (P4860, *Sigma Aldrich*), trypsyna (T4799, *Sigma-Aldrich*).

**Odczynniki:** odcz. *Lowry'ego* (*Sigma Aldrich*), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH, CaCl<sub>2</sub>, odcz. *Folina-Ciocalteu* (*POCH*).

### Przygotowanie substratu i roztworów enzymów

W celu usunięcia z skrzepów kazeinowych roztworu, które obecne są w serwatce jako pozostałość (zanieczyszczenie) po produkcji sera, serwatkę wirowano przez 30 min. przy 9000 obr./min w temperaturze 4°C. Wytrącony osad oddzielano od supernatantu filtrując układ na sączku celulozowym. Tłuszcz występujący w serwatce usuwano zgodnie z procedurą opisaną w pracy *Almecija i in.*, [2007]. Dodano CaCl<sub>2</sub>, tak aby jego stężenie wynosiło 1,2 g·dm<sup>-3</sup>. Roztwór doprowadzano następnie do pH 7,3 za pomocą 6M NaOH. Serwatkę podgrzewano do 55°C i utrzymywano tę temperaturę przez 8 min. Po ostudzeniu wirowano ponownie przez 30 min. w temperaturze 4°C przy obrotach 9000 obr./min. Supernatant zlewano z nad wytrąconego osadu. Zawarte w nim białka rozfałdowywano inkubując przez 30 min. w temperaturze 60°C.

Roztwory enzymów przygotowywano w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,0.

### Przebieg procesu

Reakcję hydrolizy prowadzono w okresowym reaktorze mieszalnikowym wyposażonym w płaszcz grzewczy. Temperatura procesu odpowiadała optymalnej dla danego biokatalizatora: 60°C dla termolizyny, 40°C dla subtylizyny A i 25°C dla trypsyny. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20,0 ml (18,0 ml serwatki + 2,0 ml roztworu enzymu). Próbkę do analizy pobierano w określonych odstępach czasu: przez pierwsze 2 min. co 15 s, następnie w 5, 10, 15, 30 min. i w 1, 2, 5 i 24 godzinie. Zatrzymanie reakcji następowało poprzez gwałtowne ochłodzenie roztworu w łaźni lodowej, do temperatury 4°C. W celu zahamowania ewentualnego wzrostu mikroorganizmów do reaktora dodawano 5 mg NaN<sub>3</sub>.

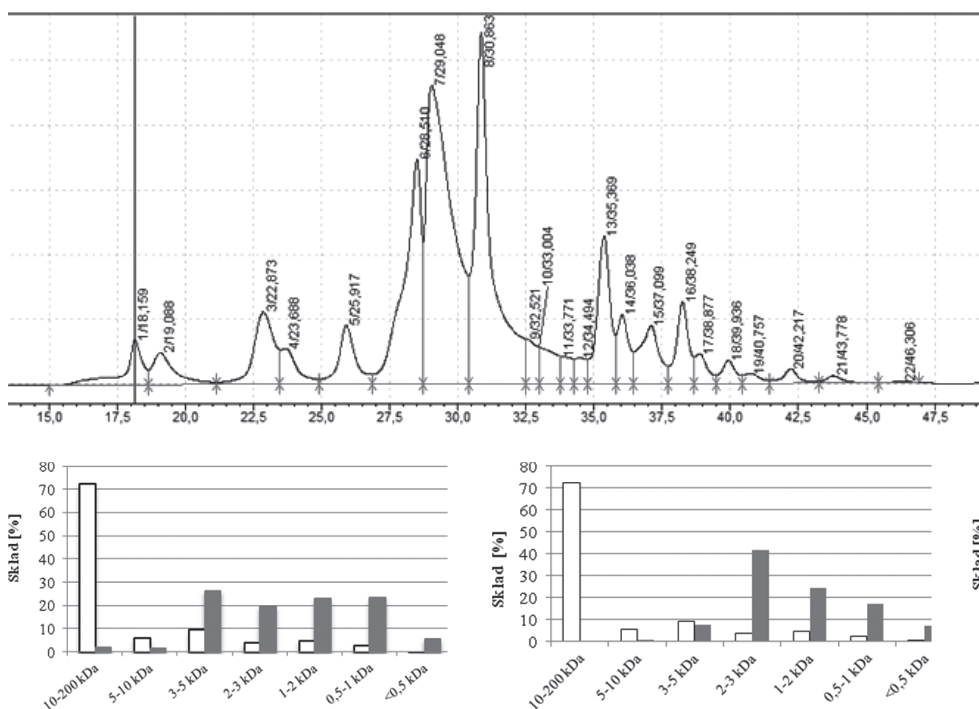
### Analiza chromatograficzna

**Aparatura.** Do rozdzielania chromatograficznego poszczególnych składników reakcji hydrolizy serwatki wykorzystywano zestaw wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) z detektorem UV firmy *Shimadzu* oraz kolumnami do filtracji żelowej połączonymi szeregowo *BioSep-SEC s2000* i *Yarra SEC-2000* (*Phenomenex*).

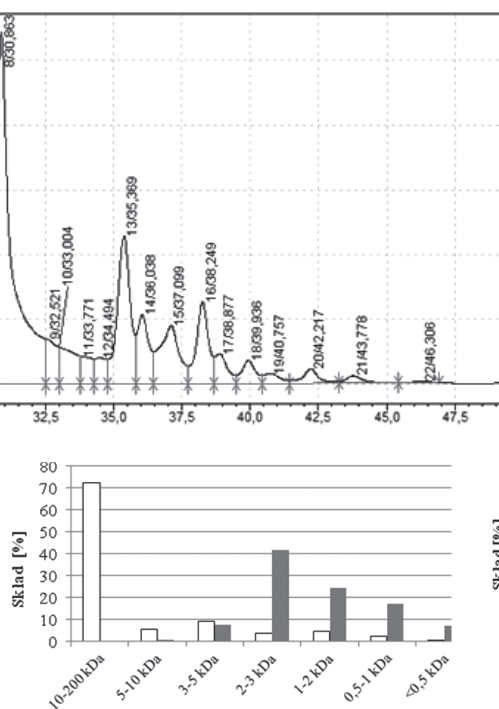
**Rozdział** prowadzono w następujących warunkach: eluent – 0,1 M bufor fosforanowy o pH 6,8; przepływ – 0,6 ml·min<sup>-1</sup>; długość fali – 214 nm; temperatura – 25 °C; czas analizy – 50 min.

**Masy cząsteczkowe** poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej wyznaczano na podstawie krzywej standardowej wykonanej dla roztworów związków o znanych masach cząsteczkowych (albumina serum – 66 kDa; owoalbumina – 44,3 kDa; anhydraza węglanowa – 29 kDa; α-laktalbumina – 14,2 kDa; cytochrom c – 12,4 kDa; aprotonina – 6,5 kDa; witamina B<sub>12</sub> – 1,3 kDa).

**Obraz chromatogramu** dla serwatki przed hydrolizą przedstawiono na rys. 1. Na podstawie uzyskanych chromatogramów układ reakcyjny podzielono na frakcję ograniczone zakresem mas cząsteczkowych i wyznaczono udział masowy tych frakcji w mieszaninie. Jako reprezentanta danej frakcji przyjęto oligomer o masie cząsteczkowej odpowiadającej wartości położenia wierzchołka piku. Przyjmując uśrednioną masę molową jednego aminokwasu jako 113 Da wyznaczono liczbę wiązań, równą liczbie aminokwasów w łańcuchu reprezentanta frakcji pomniejszonej o 1. Z kolei wykorzystując stężenie molowe danej frakcji wyznaczano liczbę zawartych w niej wiązań. Porównując liczbę wiązań występujących we wszystkich frakcjach z liczbą wiązań zawartych w surowcu uzyskuje się wartość stopnia hydrolizy danego białka. Frakcje o najniższych zakresach mas cząsteczkowych rozdzielono dodatkowo na węższe zakresy: 5÷10, 3÷5, 2÷3, 1÷2, 0,5÷1 oraz < 0,5 kDa.

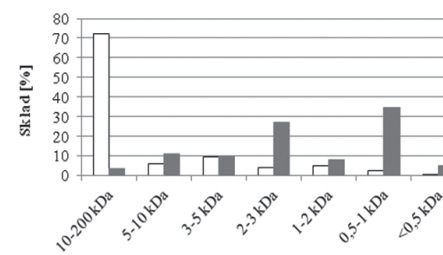


Rys. 2. Skład frakcyjny serwatki hydrolyzowanej przez termolizynę o stężeniu  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Czas reakcji 24 h. Substrat – białe słupki, produkt końcowy – szare słupki



Rys. 3. Skład mieszaniny reakcyjnej po hydrolyzie serwatki przez subtylizynę A o stężeniu  $1,345 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Czas reakcji 24 h. Substrat – białe słupki, produkt końcowy – szare słupki

Rys. 1. Chromatogram obrazujący skład białek w serwatce stosowanej w badaniach



Rys. 4. Skład frakcyjny hydrolyzatu serwatki po działaniu trypsyny o stężeniu  $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Czas reakcji 24 h. Substrat – białe słupki, produkt końcowy – szare słupki

## Wyniki i ich omówienie

Stosując poszczególne proteazy analizowano szybkość hydrolyzy (poprzez analizę wyznaczonego chwilowego stopnia hydrolyzy) przebieg zawartości poszczególnych frakcji oligomerów/peptydów w mieszaninie reakcyjnej, skład produktu końcowego.

### Termolizyna

Termolizyna jest enzymem o średniej specyficzności. Wg bazy BIO-PEP jest zdolna do głębokiego pocięcia białek. W efekcie uzyskiwać powinno się frakcje maksymalnie zawierające kilkanaście podjednostek, czyli mniejsze od 3 kDa.

Badania prowadzono w szerokim zakresie stężeń enzymu od  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  do  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Dla niskich stężeń obserwowano szybką inhibicję produktową całkowicie zahamowującą reakcję już przy DH mniejszym od 2%. W zakresie stężeń od  $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  do  $0,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  uzyskano niemal identyczne końcowe przereagowanie na poziomie  $14 \pm 15\%$ . W tych eksperymentach w końcowym stadium reakcji w układzie praktycznie nie ma białek (tylko poli- i oligopeptydy) (Rys. 2). Niemniej w trakcie hydrolyzy, białka o dużej masie cząsteczkowej utrzymywały się stosunkowo długo, stąd można domniemywać, że w cząsteczce występuje wiele wiązań o wysokiej reaktywności.

### Subtylizyna A

Subtylizyna A, podobnie jak termolizyna jest enzymem o średniej specyficzności. Niemniej miejsca preferowanego cięcia rozłożone są przy innych aminokwasach, stąd jakościowo produkty powinny być częściowo inne, aniżeli w przypadku termolizyny.

Badania prowadzono dla zakresu stężenia enzymu  $0,0134$  do  $1,345 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Dla stężeń powyżej  $0,27 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , uzyskuje się maksymalny stopień hydrolyzy na poziomie 12% już po czasie 1 h. Enzym atakuje przede wszystkim duże cząsteczki. Po kilkudziesięciu sekundach reakcji w roztworze praktycznie nie ma białek, a główną frakcją (ponad 80%) stanowi frakcja  $1 \pm 10 \text{ kDa}$ , wśród której dominują polipeptydy  $3 \pm 5 \text{ kDa}$ . Udział mniejszych frakcji zależy od stężenia enzymu, niemniej ich przyrost jest już bardzo powolny. Rozkład frakcji po jednej dobie trwania reakcji przedstawiono na rys. 3. Końcowy rozkład frakcji jest bliski oczekiwaniem. Praktycznie występują tylko peptydy zawierające od kilku do kilkudziesięciu peptydów.

### Trypsyna

Trypsyna jest enzymem wysoce specyficznym, ponieważ hydrolyzuje wiązanie zawierające w pozycji P1 resztę argininy lub lizyny. Miejsca cięcia są więc łatwo przewidywalne. Mechanizm cięcia z udziałem trypsyny jest analityczny jak w przypadku subtylizyny A. Bardzo szybko rozcinane są duże białka.

Po kilkunastu sekundach reakcji, zarówno przy stężeniu enzymu  $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , jak i  $0,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , białka powyżej  $20 \text{ kDa}$  występują w niewielkiej ilości (<4%). Skład końcowej frakcji (Rys. 4) reprezentowany jest przez peptydy poniżej  $10 \text{ kDa}$ , z dominacją frakcji od  $0,5 \pm 3 \text{ kDa}$ . Całkowity stopień hydrolyzy jest na poziomie 8%.

## Wnioski

Na przykładzie trzech dostępnych handlowo proteaz pokazano, że z serwatki można w łatwy, szybki sposób pozyskać peptydy o masach cząsteczkowych od  $0,5$  do  $10 \text{ kDa}$ . Szczególnie mocne pocięcie tych białek uzyskuje się dla trypsyny (40% stanowią peptydy <1 kDa). Wśród tych peptydów znajdują się białka o właściwościach leczniczych.

W celu niedopuszczenia do dalszego przereagowania pożądaných peptydów korzystne jest zintegrowanie bioreaktora enzymatycznego dla procesu hydrolyzy z węzłem separacji membranowej (nanofiltracja).

## LITERATURA

- Almecija M.C., Ibanez R., Guadix A., Guadix E.M., 2007. Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane. *J. Membrane Sci.*, 288, 28-35. DOI: 10.1016/j.memsci.2006.10.021
- Bednarski W., 2001. *Biotechnologia żywności*. WNT, Warszawa
- Dziuba J., Fornal Ł., 2009. *Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności*. WNT, Warszawa
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-270
- Zall R.R., 1992. *Sources and composition of whey and permeate* [in:] Zadow J.G. (Ed.). *Whey and lactose processing*. 1-72, Springer Netherlands. DOI: 10.1007/978-94-011-2894-0

Praca została wykonana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki nr 2011/03/B/ST8/06029.