

Karolina LABUS, Anita NIESOBSKA, Anna TRUSEK-HOŁOWNIA

e-mail: karolina.labus@pwr.edu.pl

Zakład Inżynierii Bioprocessowej i Biomedycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wroclaw

Dobór metod analitycznych do monitorowania procesu enzymatycznej hydrolizy białek

Wstęp

W trakcie procesu hydrolizy białek powstają liczne produkty (peptydy) o różnicowanej długości, które często stanowią substrat do dalszej depolimeryzacji. Reakcje te noszą nazwę następczo-równoległych. Im stosowana proteaza wykazuje niższą specyficzność, tym uzyskiwana jest większa różnorodność produktów przejściowych i wyższy końcowy stopień hydrolizy.

Do ilościowego określenia stopnia proteolizy stosowane są metody oparte m.in.: na pomiarach *pH* [Spellman i in., 2003], analizie azotu rozpuszczonego w wodnym roztworze kwasu trójchlorooctowego [Magrot i in., 1994], na pomiarach osmometrycznych [Morais i in., 2013] oraz spektrofotometrycznych, a popularna jest metoda wykorzystująca dialdehyd *o*-ftalowy (OPA) [Morais i in., 2013; Nielsen i in., 2001] do oznaczania pierwszorzędowych grup aminowych uwolnionych w wyniku reakcji. Metoda ta jest szybka, lecz jej główną wadą jest wysoka wartość absorpcji dla próby kontrolnej samego białka wyjściowego, uzyskiwana w wyniku reakcji N^o-końcowych oraz bocznych grup aminowych lizyny i argininy wchodzących w skład jego łańcuchów polipeptydowych.

Ilościowa analiza wielkości cząsteczek powstających w wyniku hydrolizy możliwa jest dzięki rozdzielaniu w klasycznej lub wysokosprawnej (SE-HPLC) filtracji żelowej [Irvine, 1997]. Metoda ta umożliwia wyznaczenie masowego profilu otrzymywanych produktów. Niemniej jednak przy bardzo zróżnicowanym składzie hydrolyzatów wymaga stosowania długich kolumn, utrzymania stałości przepływu oraz perfekcyjnie przygotowanej krzywej standardowej.

Z kolei jakościowa analiza aminokwasowego składu poszczególnych składników otrzymywanego hydrolyzatu wymaga zastosowania spektrometrii masowej [Yang i in., 2015], metody najdokładniejszej, lecz najdroższej i najbardziej czasochłonnej, co przy liczbie prób niezbędnych do wyznaczenia kinetyki procesu enzymatycznego jest dość problematyczne.

Głównym celem prezentowanej pracy był dobór odpowiednich metod analitycznych do monitorowania procesu enzymatycznej hydrolizy albuminy serum. Badania prowadzono z udziałem pepsyny. W ramach pracy sprawdzono efektywność następujących metod:

- spektrofotometrycznej metody wykorzystującej dialdehyd *o*-ftalowy (OPA),
- wysokosprawnej chromatografii cieczowej typu SE-HPLC (*Size Exclusion Chromatography*)
- klasycznej filtracji żelowej na złożu *Sephadex*[®]G-50.

Badania doświadczalne

Materiały i aparatura

Albumina z surowicy bydłowej (BSA), pepsyna A z błony śluzowej żołądka wieprzowego, SDS, dialdehyd *o*-ftalowy (OPA), ditiotretol (DTT), standardy białek 6,5 – 66 kDa (*Sigma*, Niemcy); KH₂PO₄, Na₂HPO₄·12H₂O, HCl, NaOH, Na₂B₄O₇·10 H₂O, etanol, woda do HPLC (*POCh*, Polska). Wykorzystano kolumny SE-HPLC: *BioSep-SEC-s2000* i *Yarra 3u SEC-2000* (*Phenomenex*, USA) oraz złoże do klasycznej chromatografii żelowej *Sephadex*[®]G-50 (*Sigma*, Niemcy).

Metody

Hydrolizę albuminy serum z wykorzystaniem pepsyny prowadzono w termostatowanych reaktorach mieszalnikowych (37°C) przy *pH* 2,0. Roztwór BSA (poddany uprzednio procesowi rozfałdowania w 60°C przez 30 min.) oraz proteazy preinkubowano oddziel-

nie w 37°C przez 10 min. Reakcję rozpoczynano poprzez zmieszanie tych roztworów. Następnie, w odpowiednich odstępach czasu, pobierano z reaktora próbki i zatrzymywano reakcję przy użyciu 2,0 M NaOH doprowadzając *pH* do wartości 6,8÷7,0. Pobrane próbki przechowywano do dalszych analiz w temp. -18°C.

Stopień hydrolizy wyznaczano metodą spektrofotometryczną opartą o reakcję dialdehydu *o*-ftalowego (OPA) z wolnymi grupami aminowymi w obecności ditiotretolu (DTT). W tym przypadku intensywność absorpcji światła związku powstającego w reakcji (uzyskiwana przy 340 nm) jest wprost proporcjonalna do liczby wolnych grup aminowych. W obliczeniach stosowano krzywą standardową wyznaczoną dla różnych ilości aminokwasu modelowego (seryny), która wyrażona była zależnością:

$$A_{340} = 1,202 \cdot 10^{-21} \cdot x \quad (1)$$

gdzie *x* - liczba cząsteczek z wolną grupą -NH₂ w 1 litrze roztworu. Natomiast stopień hydrolizy (DH) wyznaczano zgodnie ze wzorem:

$$DH = \frac{A}{B} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie:

DH – stopień hydrolizy [%]

A – liczba cząsteczek z wolną grupą -NH₂ po danym czasie reakcji w 1 litrze hydrolyzatu

B – maksymalna liczba cząsteczek z wolną grupą -NH₂ możliwa do uzyskania w wyniku hydrolizy wszystkich wiązań peptydowych w 1 litrze substratu białkowego (BSA)

Rozkład mas cząsteczkowych w hydrolyzatach BSA wyznaczano wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową SE-HPLC. W tym celu rozdział prowadzono na połączonych szeregowo kolumnach *BioSep-SEC-s2000* i *Yarra-3u-SEC-2000* w następujących warunkach pomiarowych: 0,1 M bufor fosforanowy *pH* 6,8; 0,6 mL·min⁻¹; 214 nm; 25 °C; 60 min.

Masę cząsteczkową poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej wyznaczano na podstawie krzywej standardowej:

$$\log(M_{cz\acute{a}st.}) = -0,1296 t_{retencji} + 5,2143 \quad (3)$$

wykonanej dla wzorcowych związków o znanej masie cząsteczkowej (albumina serum – 66 kDa; anhydraza węglanowa – 29 kDa; cytochrom C – 12,4 kDa; aprotynina – 6,5 kDa, cyjanokobalamina – 1,3 kDa).

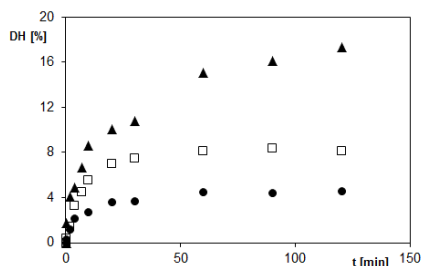
Rozdział uzyskanych hydrolyzatów ze względu na masę cząsteczkową przeprowadzono za pomocą klasycznej filtracji żelowej na złożu *Sephadex*[®]G-50. Przed rozpoczęciem procesu kolumnę (300 x 15 mm) kondycjonowano 0,1 M buforem fosforanowym *pH* 6,8 (eluent), a następnie na szczyt złoża nanoszono próbkę hydrolyzatu albuminy serum o objętości 1,0 mL i przy ustalonym natężeniu przepływu wynoszącym 0,2 mL·min⁻¹ zbierano frakcje o objętości 1,0 mL. W wyjściowym roztworze rozdzielanego hydrolyzatu oraz we wszystkich uzyskanych frakcjach mierzono absorpcję przy długości fali λ = 280 nm. Masy cząsteczkowe rozdzielonych produktów wyznaczano na podstawie krzywej standardowej:

$$\log(M_{cz\acute{a}st.}) = -0,0401 V_{elucji} + 2,5136 \quad (4)$$

sporządzonej dla wzorcowych związków o znanej masie.

Wyniki i dyskusja

Reakcję enzymatyczną przeprowadzono dla trzech stężeń BSA w obecności pepsyny jako biokatalizatora i dla każdej z tych reakcji wyznaczono stopień hydrolizy substratu białkowego w zależności od czasu trwania procesu testem OPA.

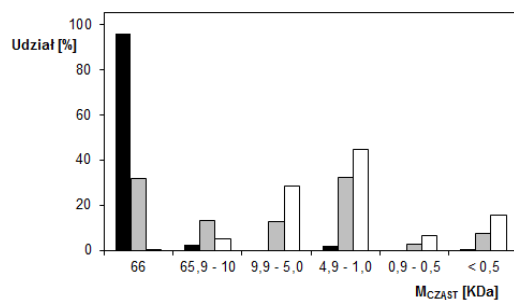


Rys. 1. Zmiana stopnia hydrolizy (DH) albuminy serum w czasie reakcji katalizowanej przez pepsynę, wyznaczona z zastosowaniem spektrofotometrycznej metody OPA. Warunki procesu: 37 °C; pH 2,0; $C_{\text{PEPSYNA}} = 0,005 \text{ gL}^{-1}$; $C_{\text{ALBUMINA}} = (\bullet) 2,5, (\square) 5,0$ oraz $(\blacktriangle) 10 \text{ gL}^{-1}$.

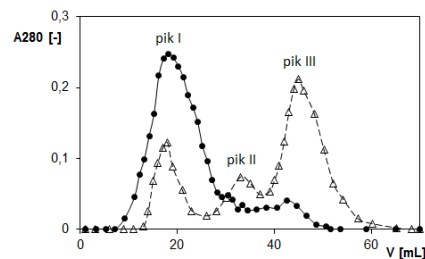
Na podstawie uzyskanych wyników (Rys.1) można stwierdzić, że zastosowana metoda pomiarowa jest odpowiednim narzędziem do kontrolowania przebiegu hydrolizy BSA, którego największą zaletą jest krótki czas analizy (2 min. na jedną próbkę). Wadą metody jest jej czułość, szczególnie istotna przy oznaczaniu niskich stopni proteolizy. Przykładowo zmiana absorbancji o 0,01 odpowiada powstaniu $8,319 \cdot 10^{18}$ cząsteczek z wolną grupą $-\text{NH}_2$, co przy stężeniu BSA 5,0 g/L odpowiada DH 0,03%. Ponadto istniało również podejrzenie (zwyerfikowane następnie wynikami z HPLC), że pomiary z zastosowaniem OPA mogą generować zawyżone wyniki. Przyczyny można dopatrywać się w zaniżonej wartości próby kontrolnej wykonanej dla substratu, wynikającej z przypuszczenia, że pewna część grup $-\text{NH}_2$ w natywnej cząsteczce białka nie reaguje z OPA, ponieważ jest niedostępna przed hydrolizą (schowana wewnątrz cząsteczki). W takim przypadku zaniżona wartość startowa będzie sprzyjać przypisywaniu wzrostu absorbancji proteolizie. W rzeczywistości jednak na skutek cięcia łańcuchów w początkowej chwili procesu, schowane uprzednio grupy aminowe będą eksponowane na zewnątrz, ale nie będzie to wynikiem bezpośredniego cięcia wiązania peptydowego, tylko częściowego rozluźnienia przestrzennego upakowania cząsteczki białka. Stosowane przed reakcją rozfałdowanie struktury BSA powinno przynajmniej częściowo ten problem zminimalizować.

W następnej kolejności zbadano efektywność wysokosprawnej chromatografii cieczowej opartej o rozdział mieszaniny poreakcyjnej na poszczególne składniki ze względu na ich masę cząsteczkową (SE-HPLC). Metoda ta umożliwia ilościowe obliczenie udziału frakcji peptydowych o danym zakresie mas cząsteczkowych i jest tym dokładniejsza, im mniejsza jest różnorodność otrzymanych produktów, co ma miejsce przy stosowaniu proteaz o wysokiej specyficzności. Przykładowe wyniki uzyskane po różnym czasie hydrolizy BSA, przedstawiające procentowy udział produktów o danym zakresie mas cząsteczkowych pokazano na rys. 2. Metoda ta pozwala również na precyzyjne wyliczenie stopnia hydrolizy wyjściowego substratu w każdym momencie trwania procesu wg schematu opisanego uprzednio [Trusek-Holownia i Noworyta, 2015].

Ostatnią z testowanych procedur był rozdział otrzymywanych hydrolizatów BSA na frakcje o różnej masie cząsteczkowej, z wykorzystaniem klasycznej filtracji żelowej (złóżo *Sephadex*[®] G-50).



Rys. 2. Procentowy udział frakcji o zdefiniowanych masach cząsteczkowych w hydrolizatach uzyskiwanych po różnym czasie trwania reakcji hydrolizy BSA (5,0 g/L); w pH 2,0 katalizowanej w obecności pepsyny (0,005 g/L). Warunki procesu: 37 °C; pH 2,0; czas reakcji: 0,25 (czarny), 5,0 (szary) i 60 min (biały)



Rys. 3. Filtracja żelowa (*Sephadex*[®] G-50) hydrolizatów albuminy serum (5 g/L) uzyskanych po 0,5 min (linia ciągła, ●) oraz 60 min (linia przerywana, Δ) reakcji katalizowanej przez pepsynę (0,005 mg/mL) w 37 °C i pH 2,0.

Przykładowe wyniki takiego procesu uzyskane dla próbek pobranych w trakcie pepsynolizy BSA po różnym czasie reakcji przedstawiono na rys. 3. Po uwzględnieniu krzywej standardowej maksimum pik I odpowiada natywnej cząsteczce BSA (66 kDa), maksimum pik II – peptydom o średniej masie (15,8 kDa), a maksimum pik III – produktom najmniejszym (5,6 kDa). Metoda ta umożliwia rozdział hydrolizatów BSA na grupy produktów w zakresie danych mas cząsteczkowych. Główną jej wadą jest długi czas procesu (3÷ 6 h) oraz dobór odpowiednich wymiarów stosowanej kolumny. W trakcie realizacji procesu obserwowana jest również kompresja złoża, co skutkuje zwiększaniem oporów przepływu i zmianą czasu przebywania w kolumnie.

Wnioski

Połączenie zaprezentowanych metod analitycznych pozwala na efektywne monitorowanie enzymatycznej hydrolizy białek i uzyskanie pożądanej frakcji produktów.

Metoda OPA umożliwia szybkie wstępne oszacowanie postępu proteolizy, a SE-HPLC jest niezbędna w ilościowej analizie składników hydrolizatu o różnej masie cząsteczkowej i planowaniu warunków reakcji w celu uzyskania pożądanej frakcji peptydów (stopnia hydrolizy białka).

Klasyczna filtracja żelowa umożliwia wstępny rozdział mieszaniny poreakcyjnej z wyodrębnieniem frakcji produktów o pożądanym zakresie mas cząsteczkowych. Natomiast dalszy rozdział danej frakcji byłby możliwy na złożu o mniejszych porach i zastosowaniu dłuższej kolumny.

LITERATURA

- Irvine G.B., 1997. Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review. *Anal. Chim. Acta*, **352**, 387-397. DOI: 10.1016/S0003-2670(97)00322-X
- Margot A., Flaschel E., Renken A., 1994. Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis. Correlation of base consumption with soluble nitrogen content. *Process Biochem.*, **29**, 257-262. DOI: 10.1016/0032-9592(94)80066-9
- Morais H.A., Silvestre M.P.C., Silva V.D.M., Silva M.R., Silva A.C.S., Silveira J.N., 2013. Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: effect of the enzyme type and reaction time. *Am. J. Food Technol.*, **8**, 1-16. DOI: 10.3923/ajft.2013.1.16
- Nielsen P.M., Petersen D., Dambmann C., 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J. Food Sci.*, **66**, 642-646. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x
- Spellman D., McEvoy E., O'Cuinn G., FitzGerald R.J., 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *Int. Dairy J.*, **13**, 447-453. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00053-0
- Trusek-Holownia A., Noworyta A., 2015. A model of kinetics of the enzymatic hydrolysis of biopolymers – a concept for determination of hydrolysate composition. *Chem. Eng. Proc.*, **89**, 54-61. DOI: 10.1016/j.ccep.2015.01.008
- Yang Y., Boysen R.L., Chowdhury J., Alam A., Hearn M.T.W., 2015. Analysis of peptides and protein digests by reversed phase high performance liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry using neutral pH elution conditions. *Anal. Chim. Acta*, **872**, 84-94. DOI: 10.1016/j.aca.2015.02.055

Praca została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki z grantu badawczego 011/03/B/ST8/0602