

WPLYW BAKTERYJNEGO PREPARATU PROTEOLITYCZNEGO „PROTEOPOL BP” NA HYDROLIZĘ BIAŁKA NIEKTÓRYCH PASZ

*Bogna Kłosińska-Rycerska, Janina Malanowska,
Regina Sawicka-Żukowska, Grażyna Zięba*

Instytut Przemysłu Fermentacyjnego w Warszawie
Dyrektor: prof. dr hab. Tadeusz Gołębiewski

Enzymy proteolityczne, katalizujące hydrolizę wiązań peptydowych, różnią się wieloma właściwościami takimi jak: występowanie, pochodzenie, budowa centrum aktywnego, mechanizm reakcji katalitycznych, zakres działania w różnych warunkach pH i temperatury. Stosowany w niniejszej pracy bakteryjny preparat proteolityczny, otrzymany z hodowli *Bacillus subtilis* w Instytucie Przemysłu Fermentacyjnego, zawiera głównie enzymy proteolityczne należące do grupy obojętnych metaloproteinaz oraz alkalicznych proteinaz serynowych. Należy zaznaczyć, że obojętne proteinazy *Bacillus* są jednymi z najbardziej aktywnych: jeśli porównać np. aktywności względne neutralnej proteiny *B. subtilis*, papainy, chymotrypsyny, pepsyny i chymopapainy w stosunku do kazeiny, to wynoszą one odpowiednio: 18 000, 2250, 1823, 1653 i 850 jednostek.

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było przebadanie działania „Proteopolu BP” na białko różnych składników mieszanek paszowych stosowanych w żywieniu zwierząt. W badaniach stosowano dwie formy preparatu o różnym stopniu oczyszczenia, a mianowicie:

A — preparat otrzymany przez wytrącenie alkoholem, wykazujący aktywność w stosunku do hemoglobiny około 450 tys. JH/g;

B — preparat otrzymany przez suszenie rozpyłowe cieczy pohodowlanej (po oddzieleniu biomasy), wykazujący aktywność w stosunku do hemoglobiny około 140 tys. JH/g.

Enzymy proteolityczne obu preparatów działają w zakresie pH od 5,0 do 11,0 (optymalne pH wynosi około 7,0), w temperaturach od 0 do 65°C (optymalna temperatura wynosi 45-50°C).

Jako substraty zastosowano głównie komponenty wchodzące w skład

mieszanek paszowych przeznaczonych między innymi dla drobiu, tj. jęczmień, pszenicę, żyto, owies, kukurydzę, soję, śrutę sojową poekstrakcyjną, susz z zielonki i mączkę rybną. Hydrolizie enzymatycznej poddawano poszczególne substraty zmielone na mąkę, zwilżone wodą w stosunku 1:10, w temperaturze 40°C, w czasie 1-7 godzin. Preparat proteolityczny dodawano w dwóch dawkach 0,5 i 0,05%, obliczonych w stosunku do użytego substratu. Hydrolizę prowadzono w pH 7,0, optymalnym dla działania bakteryjnych enzymów proteolitycznych oraz w pH zmiennym w zakresie 4,5 → 2,5 → 7,0 celem zbliżenia się do warunków występujących w przewodzie pokarmowym drobiu (hydroliza modelowa). Wartość pH zmieniano po różnym czasie, zależnie od łącznego czasu trwania hydrolizy — schemat przedstawiono w tabeli.

Tabela

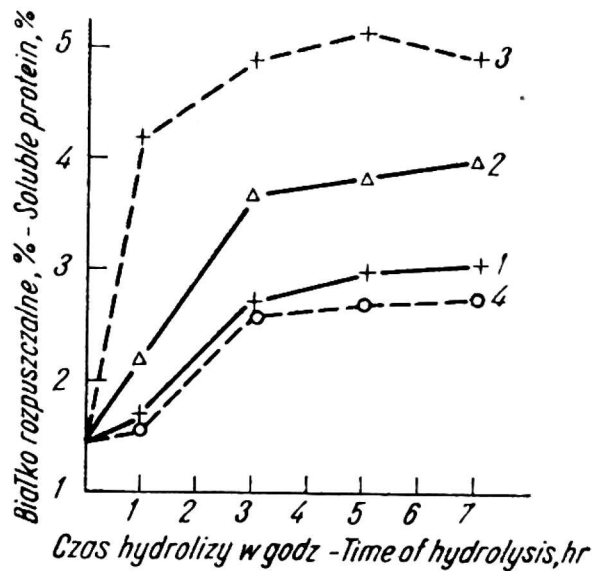
Schemat zmian pH w czasie trwania hydroliz modelowych
Diagram of pH changes during model hydrolysis

Łączny czas hydrolizy w godzinach Total time of hydrolysis, hr	Czas trwania hydrolizy w minutach w poszczególnych pH Time of hydrolysis (minutes) in particular pH		
	4,5	2,5	7,0
1	15	15	30
3	30	30	120
5	60	60	180
7	60	60	300

Efekt hydrolizy bez i z dodatkiem preparatu enzymatycznego „Proteopol BP” oceniano na podstawie wzrostu ilości białka rozpuszczalnego, oznaczanego metodą Lowry’ego.

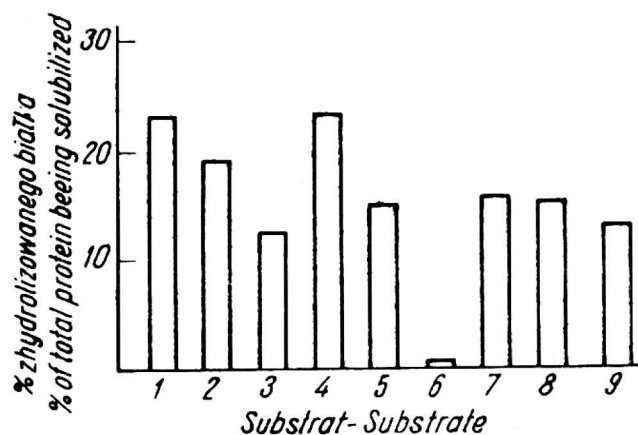
Jako przykład przeprowadzonych doświadczeń przedstawiono na rysunku 1 wyniki hydrolizy ziarna jęczmienia. Otrzymane dane wykazują, że badany preparat enzymatyczny działa najkorzystniej w pH 7,0. Zmiana pH środowiska (hydroliza modelowa) nie inaktywuje enzymów proteolitycznych zawartych w preparacie, lecz zmniejsza tylko efekt hydrolizy.

W podobny sposób jak jęczmień, przebadano kolejno wszystkie wyżej wymienione składniki mieszanek paszowych, stwierdzając indywidualną podatność poszczególnych substratów na działanie preparatu enzymatycznego. Na rysunku 2 przedstawiono procent zhydrolizowanego białka otrzymany po 5 godz. hydrolizy przy pH 7 i dawce preparatu 0,5%. Procent hydrolizy obliczono w stosunku do zawartości składnika w substracie, po uwzględnieniu efektu hydrolizy w próbie kontrolnej (to znaczy po odjęciu efektu hydrolizy bez dodatku preparatu enzymatycznego).



Rys. 1. Wzrost frakcji rozpuszczalnej białka podczas hydrolizy ziarna jęczmienia prowadzonej z zastosowaniem "Proteopolu BP" (A); 1 — preparat w dawce 0,05%, zmienne pH (hydroliza modelowa), 2 — preparat w dawce 0,5%, zmienne pH (hydroliza modelowa), 3 — preparat w dawce 0,5%, stałe pH 7,0, 4 — kontrola bez preparatu, zmienne pH (hydroliza modelowa)

Fig. 1. Increase of soluble protein fraction during hydrolysis of barley grain with "Proteopol BP" (A); 1 — preparation added in 0,05%, changing pH (model hydrolysis), 2 — preparation added in 0,5%, changing pH (model hydrolysis), 3 — preparation added in 0,5%, constant pH 7,0, 4 — control without preparation, changing pH (model hydrolysis)

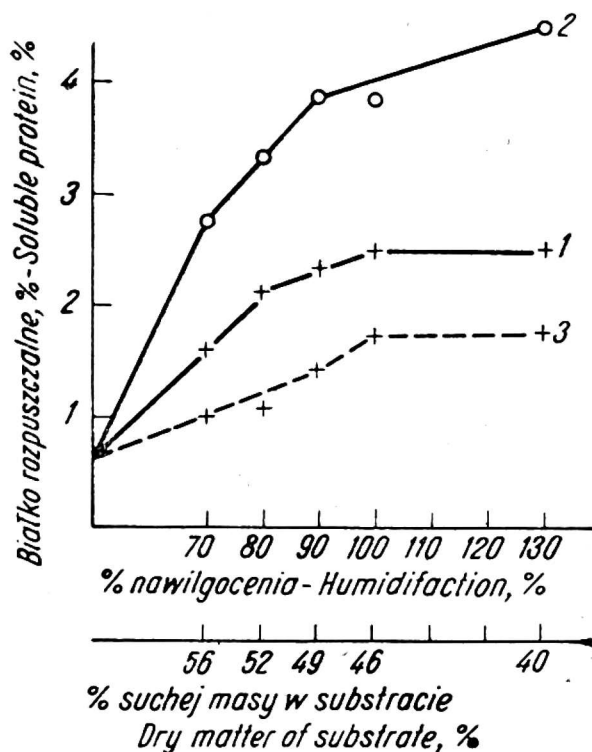


Rys. 2. Stopień hydrolizy białka różnych substratów traktowanych „Proteopolem BP" (A). Dawka preparatu 0,5%, pH 7,0, czas hydrolizy 5 godz; 1 — jęczmień, 2 — pszenica, 3 — żyto, 4 — owies, 5 — kukurydza, 6 — soja, 7 — śruta sojowa po ekstrakcji, 8 — susz z zielonki, 9 — mączka rybna

Fig. 2. Hydrolysis of protein of different substrates treated with "Proteopol BP" (A). Enzymatic preparation added in 0,5%, pH 7,0, time of hydrolysis 5 hours; 1 — barley, 2 — wheat, 3 — rye, 4 — oat, 5 — maize, 6 — soy bean, 7 — soybean oilmeal, 8 — hay, 9 — fish meal

Otrzymane dane wykazują, że łatwo ulega hydrolizie białko jęczmienia i owsa, które w około 23% w warunkach doświadczenia przechodziło w formę rozpuszczalną. Badany preparat nie naruszał praktycznie białka soi, natomiast białko w poekstrakcyjnej śrucie sojowej ulegało hydrolizie na równi z mączką rybną, czyli w około 15%.

Poza przebadaniem działania „Proteopolu BP” na różne składniki mieszanek paszowych w warunkach zwilżenia substratu w stosunku 1:10, sprawdzono dodatkowo możliwości działania preparatu przy różnym, zmiennym stopniu nawilgocenia substratu (rys. 3). Stopień nawilgocenia substratu dobrano tak, aby uwzględnić warunki występujące w przewodzie pokarmowym drobiu i zastosowano nawilgocenie w granicach od 70 do 130%, co odpowiadało suchej masie od 56 do 40%. Hydrolizę prowadzono przez 1 godzinę w temp. 40°C. W wyniku doświadczeń stwierdzono, że preparat enzymatyczny działa przy wszystkich zastosowanych warunkach nawilgocenia, przy czym efekt hydrolizy enzymatycznej wzrasta w miarę nawilgocenia substratu. Przy 100-130% nawilgocenia występują warunki zbliżone do optymalnych dla działania preparatu.

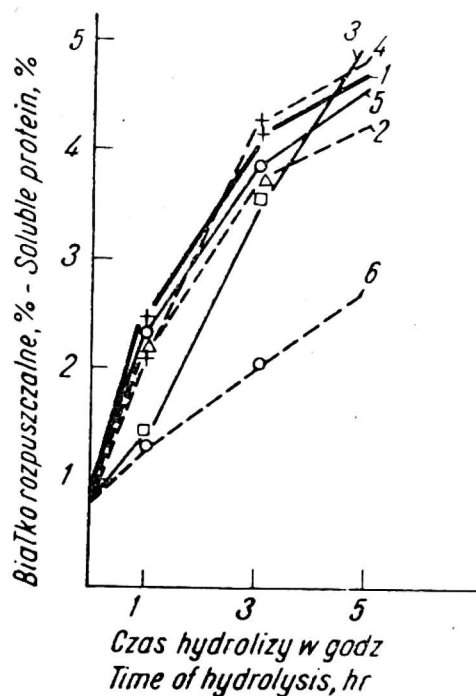


Rys. 3. Wzrost frakcji rozpuszczalnej białka podczas hydrolizy ziarna jęczmienia prowadzonej z zastosowaniem „Proteopolu BP” (B) przy różnym nawilgoceniu substratu. Czas hydrolizy 1 godz, temp. 40°C, pH naturalne ziarna; 1 — preparat w dawce 0,05%, 2 — preparat w dawce 0,5%, 3 — kontrola bez preparatu

Fig. 3. Increase of soluble protein fraction during hydrolysis of barley grain with „Proteopol BP” (B) in different humidification conditions. Time of hydrolysis 1 hour, temp. 40°C, native pH of grain; 1 — preparation added in 0,05%, 2 — preparation added in 0,5%, 3 — control without preparation

Ponadto efekt działania „Proteopolu BP” porównano z działaniem podobnego typu preparatów zagranicznych. Działanie preparatów sprawdzono stosując jako substrat jęczmień. Dawki preparatów obliczono tak, aby były jednoznaczne pod względem aktywności proteolitycznej (około 1100 JH/g substratu). Wyniki przedstawiono na rysunku 4. Wskazują one, że badany preparat wykazuje siłę proteolizującą na równi z preparatami zagranicznymi, przy czym wszystkie preparaty wykazują zbliżone zdolności hydrolizowania białka.

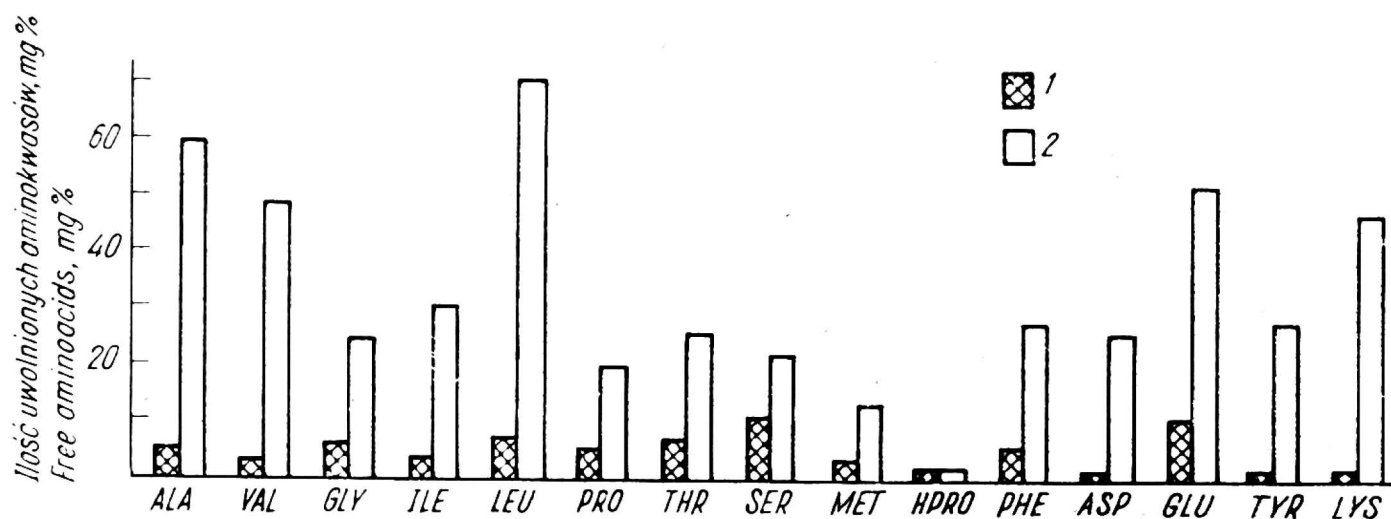
W celu dokładniejszego scharakteryzowania działania „Proteopolu BP” oznaczono ilość uwalnianych wolnych aminokwasów przy hydrolizie niektórych zbóż. Jako substraty zastosowano zmielone ziarna jęczmienia, pszenicy i owsa. Hydrolizę prowadzono w pH 7,0, przez 5 godz w temperaturze 40°, przy dawce preparatu A w ilości 0,5%. Próbę kontrolną stanowiła hydroliza w tych samych warunkach, bez dodatku preparatu enzymatycznego (w obliczeniach uwzględniano także ilość wolnych aminokwasów wprowadzanych z preparatem enzymatycznym). Zawartość wolnych aminokwasów oznaczano metodą chromatografii gazowej, przy czym tą samą metodą oznaczano także ilość aminokwasów w całym substracie po hydrolizie kwasowej.



Rys. 4. Porównanie efektu działania różnych preparatów enzymatycznych na wzrost frakcji rozpuszczalnej białka ziarna jęczmienia w warunkach hydrolizy modelowej
 Fig. 4. Comparison of the action of different enzymatic preparations on the protein of barley grain in the conditions of model hydrolysis; 1 — "Proteopol BP", 2 — Brew-N-Zyme (Naarden), 3 — Protease BS 100 (Societe Rapidase), 4 — BAN + BPN (Novo), 5 — BAN 240 (Novo), 6 — kontrola bez preparatu enzymatycznego — control without enzymatic preparations

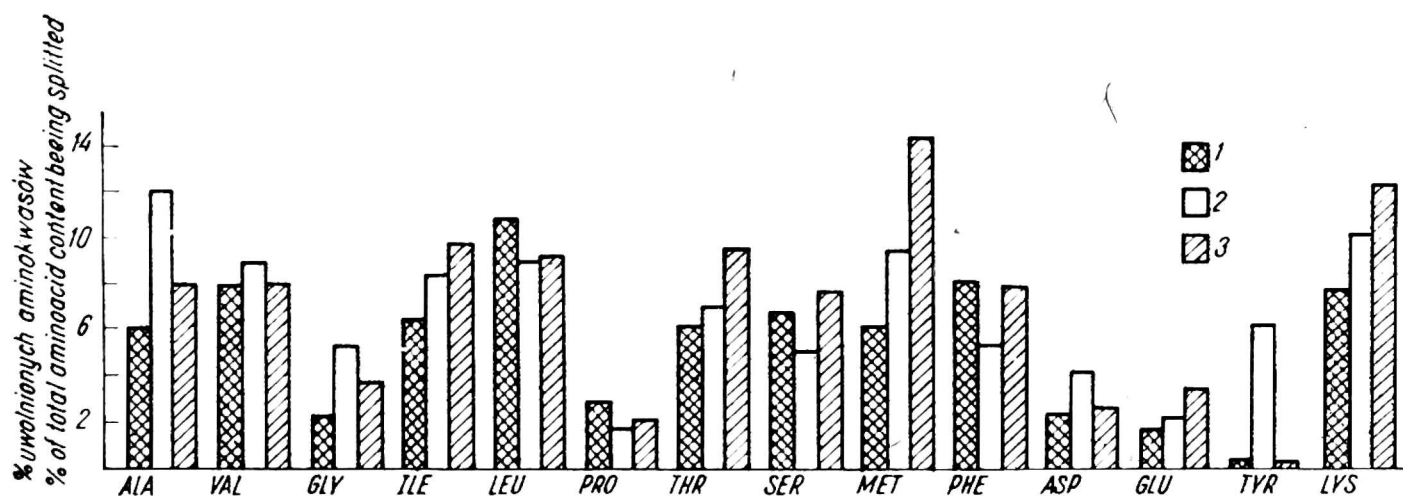
Preparaty enzymatyczne użyto w dawkach po 1100 JH/g substratu
 All enzymatic preparations used in dozes 1100 units/g of substrate

Na rysunku 5 przedstawiono ilości poszczególnych aminokwasów uwalnianych podczas hydrolizy ziarna jęczmienia prowadzonej bez, i z dodatkiem preparatu proteolitycznego; na rysunku 6 — procent aminokwasów uwolnionych podczas hydrolizy trzech różnych zbóż, prowadzonej z zastosowaniem ww preparatu (procent obliczono po odjęciu ilości aminokwasów w próbie kontrolnej oraz wprowadzonej z preparatem enzymatycznym w stosunku do ilości poszczególnych aminokwasów w całym ziarnie).



Rys. 5. Porównanie ilości uwalnianych aminokwasów podczas hydrolizy ziarna jęczmienia prowadzonej bez, i z dodatkiem „Proteopolu BP” (A); 1 — hydroliza bez dodatku „Proteopolu BP”, 2 — hydroliza z dodatkiem „Proteopolu BP”

Fig. 5. Comparison of the amounts of the splitted aminoacids during hydrolysis of barley grain without and with "Protoepol BP" (A); 1 — hydrolysis without "Proteopol BP", 2 — hydrolysis with "Proteopol BP"



Rys. 6. Procent uwolnionych aminokwasów podczas hydrolizy różnych zbóż prowadzonej z zastosowaniem „Proteopolu BP” (A); 1 — pszenica, 2 — jęczmień, 3 — owies

Fig. 6. Percent of free aminoacids being splitted during hydrolysis of different grains with „Proteopol BP” (A); 1 — wheat, 2 — barley, 3 — oat

Otrzymane wyniki wskazują, że badany preparat enzymatyczny działa w podobny sposób na zastosowane zboża i większe różnice występują tylko przy niektórych aminokwasach. Ogólnie można stwierdzić, że w warunkach doświadczenia w największym stopniu uwalniane były: alana, walina, izoleucyna, leucyna, treonina, seryna, metionina, fenyloalanina i lizyna.

Na podstawie przedstawionych doświadczeń oraz innych wyników można stwierdzić, że bakteryjny preparat proteolityczny „Proteopol BP” powoduje *in vitro* hydrolizę białka prawie wszystkich przebadanych składników mieszanek paszowych i może znaleźć zastosowanie przy zwiększeniu ich przyswajalności.

B. Kłosińska-Rycerska, J. Małanowska,
R. Sawicka-Żukowska, G. Zięba

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА „ПРОТЕОПОЛЬ БП” НА ГИДРОЛИЗ БЕЛКА НЕКОТОРЫХ КОМБИКОРМОВ

Резюме

Исследовали эффективность бактериального протеолитического препарата „Протеополь БП”, произведенного Институтом бродильной промышленности, на отдельные компоненты комбикормов применяемых в кормлении животных. Энзиматическому гидролизу подвергали ячмень, пшеницу, рожь, овес, кукурузу, сою, соевый послеэкстракционный шрот и рыбную муку. Установлено, что в условиях опытов *in vitro* „Протеополь БП” действует на все исследуемые субстраты, за исключением сои, и даёт прирост растворимой фракции белка (12—25% белка преобразовалось в растворимую форму) и свободных аминокислот (отщеплялось от 0 до 14% отдельных аминокислот). Опыты показали также, что препарат „Протеополь БП” действует на белок исследуемых компонентов комбикормов подобно как зарубежные препараты такого же типа.

B. Kłosińska-Rycerska, J. Malanowska,
R. Sawicka-Żukowska, G. Zięba

EFFECT OF BACTERIAL PROTEOLYTIC PREPARATION "PROTEOPOL BP" ON HYDROLYSIS OF PROTEIN OF SOME FEEDING STUFFS

Summary

The effect of the bacterial proteolytic preparation "Proteopol BP" (made by the Institute of Fermentation Industry) on individual components used in animal feeds was studied. Barley, wheat, rye, oats, maize, soybean, soybean post-extraction oilmeal as well as hay meal and fish meal, were subjected to the enzymatic hy-

drolisis. It has been proved that under conditions of the in vitro experiments all substances, except for soybean oilmeal, were attacked by bacterial proteolytic enzymes, what resulted in an increase of soluble protein fraction (12 - 25% of total protein were solubilized) and of the content of free amino acids (from 0 to 14% of particular amino acids were split off). It has been also proved that the „Proteopol BP” effect on the protein of feed components can be similar to foreign bacterial enzymatic preparations of the same type.