

Proteinlerin Geleneksel Olmayan Kaynaklarından Kollajenöz Hidrolizatları. Kısa Sığır Tendonlarının Enzimatik Hidroliz Ürünü ve Reaksiyon Şartı¹

COLLAGENOUS HYDROLYSATES FROM UNTRADITIONAL SOURCES OF PROTEINS. REACTION CONDITION AND THE YIELD OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SHORT CATTLE TENDONS

F. LANGMAIER*, M. MLADEK*, K. KOLOMAZNIK*, S. SUKOP*

* Protein and Leather Technology Institute, Faculty of Technology, Technical University, Nam.TGM 275, Zlin CZ 762 72, Czech Republic

©F. Langmaier, M. Mladek, K. Kolomaznik and S. Sukop. Collagenous Hydrolysates from Untraditional Sources of Proteins. Reaction Condition and the Yield of Enzymatic Hydrolysis of Short Cattle Tendons. International Journal of Cosmetic Science, 2001; 23(4):201-206.

Özet

2⁴ Fabrika deneylerinin istatistiksel planı kullanılarak, kısa sığır tendonlarının enzimatik hidroliz ürününe, reaksiyon şartlarının etkisi incelendi. Ürün reaksiyonu değişikliklerinin ana kaynakları olarak, başlangıç materyalinin enzimatik arındırma süresi ve arındırılmış materyalin denatürasyon süreci, karışım reaksiyonundaki proteaz konsantrasyonu ve hidroliz süresi göz önünde tutuldu. Kollajen hidrolizatın maksimum ürününe yol açacak şartları bulmak için bir girişimde bulunuldu.

Anahtar Kelimeler: Kollajen, Enzimatik hidroliz, Reaksiyon şartlarının uygunluğu, Kısa sığır tendonları

T Klin Kozmetoloji 2002, 3:178-183

Summary

The effect of reaction conditions on the yield of enzymatic hydrolysis of short cattle tendons was examined using statistical scheme of factorial experiments 2⁴. The duration of enzymatic purification of the starting material and of purified material denaturation processes, the protease concentration in reaction mixture and hydrolysis time were considered to be the main sources of reaction yield variation. An attempt was made to find the conditions leading to maximal yield of collagen hydrolysate.

Key Words: Collagen, Enzymatic hydrolysis, Reaction conditions optimization, Short cattle tendons

T Klin J Cosmetol 2002, 3:178-183

Son zamanlarda, cilt ve saç bakım kozmetik ürünlerinin unsurları olarak kullanılmak üzere yeteri kadar saf kollajen hidrolizatın hazırlanması için geleneksel olmayan bir kollajenöz hammaddenin (kısa sığır tendonları) kontrollü enzimatik hidrolizi ile ilgilenmeye başladık (1). Başlangıç kollajenöz materyalin arındırılması için alkalen ortamda maksimum etkili (pH 11.8) ticari ismi GraessexTM® (Novonordisk, Bagsvaerd, Denmark) olan mikrobiyal kaynaklı lipaz (Aspergillus) ve nötral ortamda ticari olarak uygun proteaz Neutrase 0.5^L® kullanarak arındırılmış kollajen hidrolizini gerçekleştirdik. Düşük enerjileri ve yatırım işlemlerinin, biyoteknolojik süreç olarak genellikle bilinmesi gerçeğine rağmen, ürün hidrolizatına uyarak hidroliz

şartlarının uygun hale getirilmesi, biraz pratik ilgiyle açıklanır.

Deneyel Metod ve Sonuçlar

İstatistiksel metodlar, özellikle 2⁴ tipi fabrika deneylerinin planı, kullanılarak, kollajenöz hidrolizat ürünü üzerinde reaksiyon şartlarının etkisi incelendi (2-4). Deneylerde gözlenen değişken, standart Kjeldahl metoduyla tahmin edilen suda eriyen forma değişen amidik azotun yüzdesiydi. Suda erimeyen fraksiyonda kalan azotun miktarı da, aynı yolla tahmin edildi. İzleyen faktörlerin, kollajen hidrolizinde değişikliğe neden olacağı göz önünde tutuldu:

(A) Başlangıç sonuçları (1), %1 ticari olarak uygun lipaz içeren (GraessexTM®) %1000'lik bir

hacimli (v/w, başlangıç materyal ağırlığına relatif olarak) bir alkalen banyoda (%1 hacimli sikloheksilamin ekleyerek pH 11.8'e erişildi) kollajenöz başlangıç materyalini arındırma düşüncesine yöneltti. Süreç, 38°C'lik bir ısıda yönetildi. Bu şartlar altında, hidrolizat ürününü etkileyebilecek tek faktör, arındırma sürecinin süresi olacaktır. Bu faktörün en düşük seviyesi 24 saatte ve en yükseğide 72 saatte yerleştirilmiştir.

(B) Genel bir kural olarak, proteinlerin denatürasyonu, sonraki enzimatik hidrolizi kolaylaştırır; böylece, 95°C'lik bir ısıda %500'lük bir hacimle (v/w başlangıç materyalinin ağırlığına dayanan) bir su banyosundaki arındırılmış başlangıç materyalinin denatürasyon süresinin etkisi uygun hareketlendirici altında, değişiklik faktör B olarak seçildi. Yukarıda anlatılan şartlar altında faktörün alt seviyesi 15 dakikada ve üst seviyesi 30 dakikada yerleştirildi.

(C) Bundan sonraki, denatüre kollajenin enzimatik hidrolizi, proteaz Neutrase 0.5^L® ekleyerek, denatürasyon banyosunda (45°C'ye soğutulduktan sonra) gerçekleştirildi. Bu reaksiyon devresinde, ürünün hidrolizi, proteaz aksiyonunun zamanından etkilenebilir (bu reaksiyon devresinin reaksiyon zamanı). Proteaza maruz kalmanın

süreleri 2⁴ fabrika deneylerinin reaksiyon planlarındaki faktör C karışım reaksiyonunun uygun hareketlendirici ve sabitleştirilmiş ısı (45°C) altında 1 ve 3 saat ile gerçekleştirildi.

(D) Karışım reaksiyonundaki proteazın konsantrasyonunun, önden giden faktör C ile birbirini etkileyebileceği ve hidroliz reaksiyonunun ürününü etkileyeceği umuldu. Faktör D'nin etkisi %0,1 (w/w alt seviye) ve %1.0 (w/w üst seviyesi) seviyelerinde çalışıldı.

Genel olarak, deneysel şartlar şu şekilde tanımlanabilir. Her bireysel deney, %1'lik bir ticari lipaz GraessexTM® (başlangıç kollajenöz materyal ağırlığına relatif olarak) içeren, 38°C'da, %1'lik (w/v) sikloheksilamin ekleyerek pH'sı 11.8'de kurulmuş, %1000'lik bir hacimli (başlangıç materyalinin ağırlığına relatif olarak) bir alkalen arındırma banyosunda yaklaşık uzunlamasına boyutu 1 cm olan partiküller üzerine kurulmuş, başlangıç kollajenöz materyalin arındırılmasını içerir. Bireysel deneyler için zaman periyodu 24 saat (alt seviye) veya 72 saati (üst seviye) (faktör A, Tablo 1'e bakınız).

Reaksiyon karışımının erimeyen fraksiyonu filtrelendi ve nötral reaksiyonda suyla filtre üzerinde yıkandı. Suda iyice yıkanmış erimeyen

Tablo 1. Kısa sığır tendonlarının enzimatik hidrolizi için deneysel şartlar ve veriler

Deney No	Faktör A arındırma süresi (saat)	Faktör B denatürasyon süresi (dakika)	Faktör C hidrolizi süresi (saat)	Faktör D proteolitik hazırlama konsantrasyonu (%)	Başlangıç hammaddenin toplam azotundaki % azot		
					Arındırma banyosu	Suda eriyen	Suda erimeyen
1	24	30	1	0.1	5.95	71.03	23.02
2	72	30	3	0.1	2.27	87.32	10.41
3	24	30	3	1.0	6.26	90.53	3.21
4	24	15	1	0.1	7.85	65.51	26.64
5	24	15	3	0.1	13.73	76.15	10.13
6	24	30	3	0.1	5.90	86.46	7.64
7	72	30	3	1.0	6.84	90.76	2.40
8	72	15	3	0.1	17.45	82.55	0.00
9	72	30	1	0.1	2.01	78.98	19.01
10	72	30	1	1.0	7.13	81.33	11.54
11	72	15	3	1.0	4.20	92.98	2.82
12	72	15	1	1.0	10.42	82.26	7.32
13	72	15	1	0.1	24.46	58.45	17.09
14	24	30	1	1.0	5.78	82.44	11.78
15	24	15	3	1.0	4.37	92.73	2.90
16	24	15	1	1.0	0.89	84.62	11.49

fraksiyon %500'lük bir hacimde dağıtıldı (v/w, başlangıç kollajenöz materyalin ağırlığına dayanarak) ve dağılım, 15 ve 30 dakikalığına 95°C'da ısıtılarak denatüre edildi (Faktör B, Tablo 1'e bakınız). Banyonun 45°C'ye soğutulmasından sonra, özelleştirilmiş bir miktarda Neutrase 0.5^L® reaksiyon süspansiyonuna eklendi (başlangıç materyal ağırlığının %0.1-1.0'i, faktör D, Tablo 1'e bakınız) ve hidroliz fabrika deneyinin listesine bağlı olarak uygun hareketlendirici ile 1-3 saat yönetildi (Faktör C, karşılaştırmalı Tablo 1).

O periyoddan sonra, proteaz aksiyonu reaksiyon karışımının 5 dakika 90°C'da ısıtılmasıyla inhibe edildi ve suda erimeyen fraksiyon filtrasyon ile ayrıldı. Amidik azot içeriği, standart Kjeldahl metodu kullanılarak reaksiyon karışımının eriyen ve erimeyen bölümlerinde belirlendi ve başlangıç proteinaseöz materyalindeki % relatif azot içeriği şeklinde tanımlandı. Sonuçlar, izleyen bireysel faktör seviyeleriyle beraber, Tablo 1'de sunuldu.

Kullanılan şartlar altında arındırma banyosundaki (sürecin giriş operasyonu) azot içeriği, arındırma sürecinin reaksiyon süresinden veya diğer değişkenlerle [Graessex konsantrasyonu ve reaksiyon ısısı, banyo hacminin sabit olması bakınız (1)] etkilenir. 24 ve 72 saat sonra (2) arındırma banyosundaki ortalama azot içeriğinin sıfır farklılık hipotez edilmesi, reaksiyon süresinin

24 saatten 72 saate yükseltilmesiyle, arındırma banyosundaki azot oranının %6.34'den %9.19'a yükseleceğini (başlangıç proteinaseöz materyalin azot içeriğine dayanarak) göstermektedir. Ortalamalar (%3.06'ya erişen) arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (2). Uzamış bir arındırma süresi daha büyük miktarda proteinaseöz materyal kaybıyla sonuçlanır ve böylece pratik nedenlerle en düşük zaman seviyesi tercih edilir.

Reaksiyon karışımının suda erimeyen ve suda eriyen bölümlerindeki amidik azot içeriği, prensip olarak, öncelikle hariç tutulamayacak seviyelerindeki arındırma sürecinin etkisi ve doğal bir tamamlayıcısıdır. Bütün bunları gözönünde tutarak; 2⁴ fabrika deneyinin değişiklik analizi için sadece % suda eriyen amidik azotun verileri kullanıldı (2 seviyede 4 faktör). Bireysel faktörlerin ve etkileşimlerinin istatistiki anlamlılığı, Fisher-test (F-test) kullanılarak tahmin edildi (3,5,6). Değişiklik analizinin sonuçları Tablo 2'de özetlenmiştir.

Bu fabrika deneyi şartlarının çatısında, suda eriyen azotun ürünü, polinom tipte iyi güvenilirlikli (korelasyon katsayısı 0.956) olarak tanımlandı:

$$N\% = 41.485 - 0.088A + 0.801B + 0.080635C \\ + 42.197D + 0.0037AB + 0.026AC \\ - 0.0645AD - 0.102BC - 0.901BD \\ - 3.078CD \quad (1)$$

Tablo 2. Kısa sığır tendon hidrolizi ürününde 2⁴ fabrika deneyi faktörlerinin değişikliği ve etkileşimlerinin analizi

Faktör	Karelerin toplamı	d.f.	Ortalama kare	F kriteri
A: Arındırma süresi	1.66410	1	1.66410	0.13
B: Denatürasyon süresi	70.5600	1	70.56000	5.56
C: Hidroliz süresi*	562.40123	1	562.4012	44.33
D: Proteaz konsantrasyon*	519.84000	1	519.8400	40.98
Etkileşim AB	6.6564	1	7.1552	0.56
Etkileşim AC	7.1552	1	6.6564	0.52
Etkileşim AD	7.7562	1	7.7562	0.61
Etkileşim BC	9.4249	1	9.4249	0.74
Etkileşim BD*	147.9872	1	147.987	11.62
Etkileşim CD	30.6916	1	30.696	2.42
Kalan	63.4313	5	12.686	-

Kritik değer $F_{(1,5)}^{0.95} = 6.61$

*İstatistiksel anlamlı faktörler ($F^{0.95} > F$ kritik)

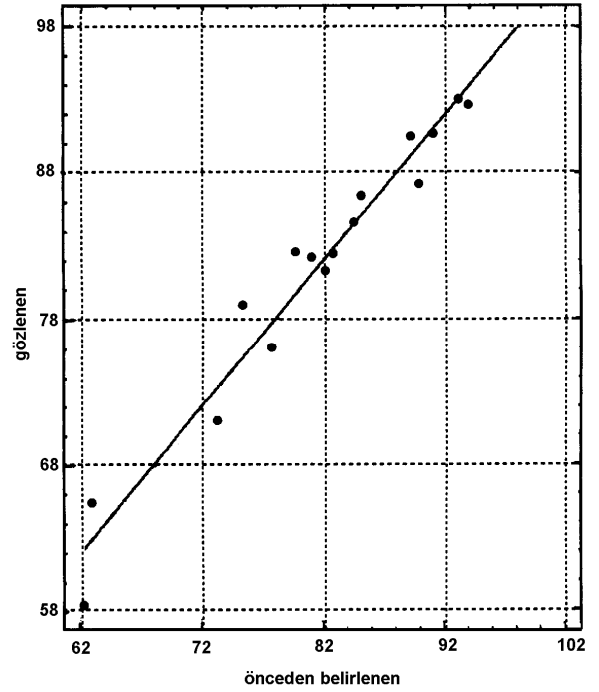
A, B, C ve D; etkisinin gözlemlendiği fabrika deneyinin faktörleridir (Tablo 1'e bakınız). AB, AC, AD, BC, BD ve CD uygun faktörleri etkileşimleridir ve %N'de, kollajenöz hidrolizat ürünü tanımlamak için gözönünde tutulan, toplam azotun suda eriyen azot bölümünün ürünüdür.

Yaklaşık polinominin yardımıyla hesaplanan sonuçlarla uyumlu deneysel sonuçlar, gerçeği Resim 1'deki grafik şekilde gösterilmiştir.

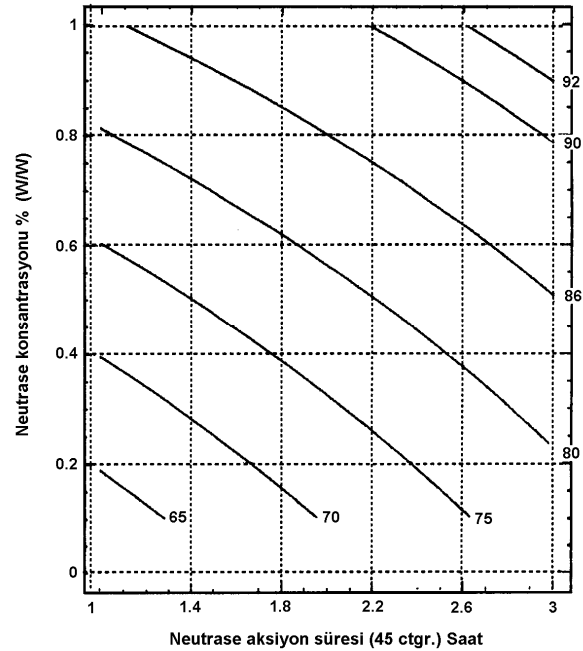
Yukarıda bahsedilen polinomiye kullanarak proteaz konsantrasyonu (faktör D, Tablo 1'den) vb. reaksiyon zamanı (faktör C, Tablo 1'den) koordinatlarındaki benzer hidroliz ürününün yatay çizgileri, iyi güvenilirlikle yapılandırılabilir. Bazıları Resim 2'de gösterilmiştir.

Tartışma

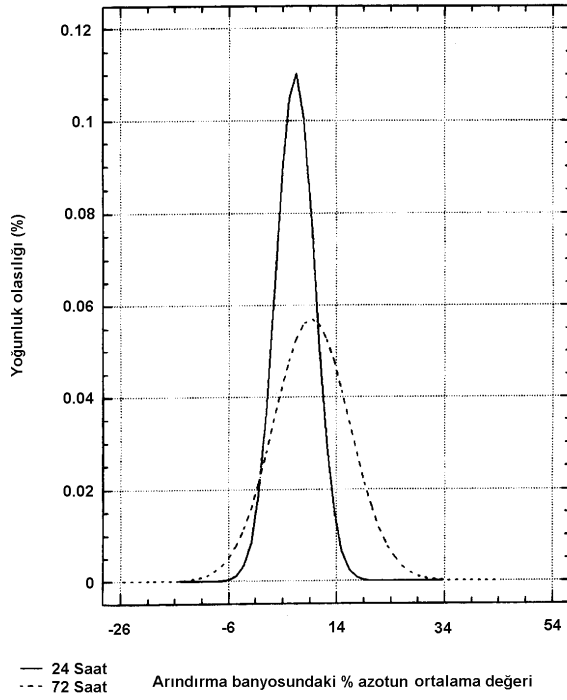
Kısa sığır tendonları relatif olarak saf bir kollajenöz maddedir, böylece orta derecede arındırma gerekir. Enzimatik arındırmanın reaksiyon süresinin artmasıyla, artan miktarda kollajen arındırma banyosuna geçer ve pratik bir bakış açısıyla, düşük bir arındırma süresi (45°C'da 24 saat) tercih edilir. Aynı nedenle, önceki deneylerde gösterildiği gibi (bakınız [1]); asit bir ortamda aşırı arındırma olduğundan alkalin bir ortamda arındırma süreci tercih edilir. Değerlendirmek zor olduğundan, kısa sığır tendonlarının kalitesinin arındırma banyosundaki kollajenin eriyebilirliğini etkilemesi gözönünde tutulmadı. Tablo 1'deki sonuçlardan hesaplanan ve Resim 3'de gösterilen 24 ve 72 saat sonra arındırma banyosundaki ortalama azot içeriğinin yoğunluk eğrisinin bir olasılığı; problemi anlatabilir. Deneysel sonuçlardaki değişikliğin analizi (Tablo 2); arındırılmış kısa sığır tendonlarının enzimatik hidroliz ürününde kullanılan şartlar altında; proteaz konsantrasyonu (faktör D) ve hidroliz süresi (faktör C) ile etkilenmenin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. F-değeri; Fisher-testin kritik değerine gittikçe yaklaşırsa bile (5); denatürasyon süresi (95°C'da, faktör B)'nin kendisi anlamlı olarak ürünü düzeltmez, ama reaksiyon karışımındaki (faktör D ile etkileşim) proteaz konsantrasyonu ile etkileşiminin, hidroliz ürünü



Resim 1. Enzimatik hidrolizin (Tablo 1'le karşılaştırın) deneysel sonuçlarının tamamsal haritası ve sonuçları; yaklaşık polinom denklemleri dayanarak hesaplandı. Sonuçlar, başlangıç kollajenöz materyaldeki azottan, % suda eriyen azot olarak tanımlandı.



Resim 2. Nötraz 0.5 L® konsantrasyonu (%w/w) ve 45°C'de hidroliz süresi (saat) koordinatlarındaki sığır kısa tendonlarının hidrolizinin (başlangıç materyalinin toplam azotundan % suda eriyebilen azot olarak tanımlanır) benzer ürünün yatay çizgileri.



Resim 3. 24 ve 72 saatlik arındırma süreleriyle arındırma banyosundaki (başlangıç materyalinin toplam azotuna dayanan) ortalama azot içeriğinin yoğunluk olasılığı.

için istatistiksel anlamlılığı vardır. Beklendiği gibi denatürasyon süreci iyi, kollajenoz hidrolizat ürünü için gereken enzimatik hidroliz süresinin kısalmasıyla sonuçlanır, ama iyi bir reaksiyon ürünü için kısa bir denatürasyon zamanı (15 dakika 95°C'da) yeterlidir (kullanılan deneysel şartlar altında). Kalan faktörlerin ve etkileşimlerinin; hidroliz ürünü üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi yoktur.

Kollajenöz hidrolizat ürününe bağlılık (başlangıç kollajenoz materyaldeki azot içeriğine dayanarak, %suda eriyebilen azot olarak tanımlanabilir) kullanılan deneysel şartlar altında benzer hidroliz ürünü eğrilerinin hesaplanması için kullanılabilir; bir polinomiyle (denklem [1]) iyi güvene yaklaşabilir (Resim 2).

Maksimum ürün için reaksiyon şartlarının; reaksiyon süresi (45°C) ve reaksiyon karışımındaki proteaz (Neutrased 0.5 L[®]) konsantrasyonunun artmasıyla kollajen hidrolizat ürününün artmasının tanımlanması şekillerinde açık olarak belirgindir

ki, zordur. Hidrolizin, 3 saatteki %1 proteazla, başlangıç kollajenoz materyaldeki azotun %92'si suda da eriyebilen forma geçer. Arındırma sürecindeki amidik azot kaybının %6'ya erişebileceğini dikkate alarak, 3 saatlik hidroliz süresi ve reaksiyon solusyonundaki %1 proteazın şartlarının, uygun şartlara yeteri kadar yakın olduğu göz önünde tutulabilir.

Özellikle reaksiyon ürünü pudra formlarında istendiğinde, arındırma ve hidroliz fazlarındaki reaksiyon karışımlarının özelleştirilmiş hacimleriyle ilgilenilmelidir. Diğer yandan, reaksiyon karışımının filtrasyonundaki veya su buharlaşmasındaki artan maliyetlerle ilgili problemler de beklenecektir.

Bu sonuçları doğrulamak için, 24 saat 38°C'da %1'lik (w/w) lipaz Graessex TM[®] ile %1'lik sikloheksilaminle pH 11.8'de alkalize edilen %1000'lik hacimli bir banyoda (başlangıç proteaseöz maddenin ağırlığına dayanan) 500 gr kısa siğir tendonlarının enzimatik hidrolizi (%26.2 kuru madde, kuru maddede %16.5 amidik azot); ayrı bir deney olarak arındırıldı. Sulu fazda; kuru maddede 1.70 gr amidik azot belirlendi (başlangıç materyalinin azot içeriğinin %7.86'sına dayanan) sulu fazda filtrelendikten ve nötral reaksiyonda suyla filtre üzerinde solid fazın yıkanmasından sonra; solidler %500 suda dağıldı ve dağılımın 95°C ıltılmasıyla 15 dakika denatüre edildi. Dağılımın 45°C'ye soğutulmasından sonra; başlangıç proteinaseöz maddenin ağırlığına dayanan ticari olarak uygun proteaz %1 (Neutrased 0.5 L[®]) eklendi ve 45°C'da 3.5 saat arındırılmış protein (suda erimeyen) hidrolize edildi. Reaksiyon karışımı filtrelendi (eriyemeyen bölüm belirlenemedi); hacim yarılanıncaya kadar buharlaştırıldı ve başlangıç proteinaseöz materyalin azot içeriğinden; azotun %91.9'una uyan bir laboratuvar sprey, kurutucu kullanarak (kuru madde içeriğinin %97.6'sı, amidik azotun %16.9'u ile) pudra formunda kollajenöz hidrolizat elde edildi. Pudra hidrolizatın, ortalama moleküler ağırlığı (ninhidrinli primer amino gruplarının kolorimetrik tahmini, bakınız [7]). 1.32 kDa olarak bulundu (1.32x10³ g mol⁻¹). Bu sonuçlar, kollajen hidrolizatların pratik üretimi için fabrika deneylerinin iyi güvenilirliklerine işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Langmaier F, Mladek M, Kolomaznik K, and Sukop S. Collagenous hydrolysates from untraditional sources of proteins. *Int J Cosmet Sci* 2001; 23:193-9.
2. Dixon WJFJ, and Massey Jr. Introduction to statistical analysis. London: McGraw-Hill, 1969:283.
3. Beyer WH. Handbook of tables for probability and statistics. The Chemical Rubber Co. Cranwood, Parkway Cleveland, Ohio 1968: 66, 320.
4. Stange K. Angewandte statistik II. Berlin: Springer Verlag, 1971:238.
5. Fisher RA. Statistical methods for research workers. London: Olivier and Boyd, 1954:32.
6. Felix M, and Blaha K. Matematicko-statisticke metody v chemickem prumyslu. SNTL. Prague, 1962:170.
7. Davidek J, Hrdlicka J, Karvanek M, Pokorny J, Sefert J, and Velisek J. Laboratorni poirueka analyisy potraviny, SNTL, Prague, 1977:200.

**Orijinal İngilizce şeklinden Türkiye Klinikleri tarafından tercüme edilmiştir. Türkçeye tercümesinin doğruluğundan Türkiye Klinikleri sorumludur, Blackwell Science Limited veya Society of Cosmetic Chemists sorumluluk kabul etmemektedir.*

Translated by Türkiye Klinikleri Publishing House from the original English language version. Responsibility for the accuracy of the translation in the Turkish language rests solely with Türkiye Klinikleri Publishing House and is not the responsibility of Blackwell Science Limited or the Society of Cosmetic Chemists.