

Enzýmová hydrolýza bielkovín hrachu

BERNADETTA KRKOŠKOVÁ - MÁRIA ŠIMKOVÁ - HELENA STRÁŽNICKÁ

SÚHRN. Sledovala sa enzýmová hydrolýza bielkovín hrachu. Ako substrát boli v hydrolyzačných pokusoch použité laboratórne pripravené koncentráty bielkovín hrachu. Priebeh hydrolýzy sa sledoval pri použití rôznych koncentrácií substrátu a potravinárskych enzýmov neutrázy, alkalázy a pepsínu. Na sledovanie zmien bielkovinovej skladby v priebehu hydrolýzy sa použila SDS-PAGE elektroforéza.

Kinetika hydrolyzačných reakcií bola pri použití rozličných enzýmov rôzna, s narastajúcim stupňom hydrolýzy sa na separačných géloch zvyšoval počet pásov prislúchajúcich menším štepom legumínu a vicilínu, ako aj pásov pre menšie štepy albumínu.

Rastlinné produkty predstavujú veľmi významnú zložku ľudskej potravy. Čoraz častejšie sa stretávame v ľudskej populácii s alergickými ochoreniami na určité druhy potravín. Jednou z takýchto potravín sú aj strukoviny, a to najmä arašidy a sója, ale aj hrach. V priebehu technologického procesu spracovania potravín možno alergény spôsobujúce alergické ochorenia čiastočne alebo úplne eliminovať, a to:

- mechanickým procesom oddeľovania bielkovín,
- tepelným spracovaním,
- chemickými reakciami,
- enzýmovou hydrolýzou.

Enzýmová hydrolýza predstavuje jednu z možností znižovania alergenicity potravín. Enzýmovou hydrolýzou sa okrem chemických zmien významne ovplyvňuje fyzikálna štruktúra a textúra potravín. Umožňuje širšie využitie bielkovín a modifikáciu ich funkčných vlastností [1].

Ak sa hovorí o enzýmovej modifikácii potravinárskych bielkovín, rozumie sa použitie izolovaných enzýmov v hydrolyzačnom procese. V našich experimentoch sme použili potravinárske enzýmy neutrázu, alkalázu a pepsín.

Ing. Bernadetta KRKOŠKOVÁ, Csc., RNDr. Mária ŠIMKOVÁ, Ing. Helena STRÁŽNICKÁ, CSc.,
Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 820 06 Bratislava.

Proces enzýmovej hydrolýzy možno charakterizovať nasledujúcimi základnými parametrami:

- koncentráciou substrátu,
- pomerom enzým - substrát (E/S),
- pH,
- teplotou,
- stupňom hydrolýzy (DH), ktorý je definovaný ako pomer počtu rozštiepených peptidových väzieb k celkovému počtu peptidových väzieb.

Koncentrácia substrátu, pomer enzým - substrát a teplota ovplyvňujú rýchlosť reakcie. Enzýmovou hydrolýzou sa získa z pôvodnej bielkoviny zmes štiepných produktov od vysokomolekulových peptidov, cez nízkomolekulové peptidy až po aminokyseliny. Konečné zloženie hydrolyzátu závisí od použitého konkrétneho enzýmu a od stupňa naštiepenia bielkoviny [2].

V príspevku prezentujeme výsledky štúdia enzýmovej hydrolýzy bielkovín zo strukovín potravinárskymi enzýmami neutráza, alkaláza a pepsín.

Materiál a metódy

V hydrolyzačných pokusoch sme ako substrát použili koncentráty bielkovín hrachu, pripravené v laboratóriu extrakciou pomletého hrachu [3,4]. Na enzýmovú hydrolýzu sa použili potravinárske enzýmy Alkalase 2,4 L, enzým Neutrase 0,5 L a 1,5 MG - komerčné výrobky firmy Novo-Industri a Pepsin - výrobok firmy Léčiva Praha.

Enzým alkaláza je bakteriálna alkalická proteínáza (endoproteínáza serínového typu), ktorá sa získava z vybraného kmeňa *Bacillus licheniformis* submerznou fermentáciou. Enzým neutráza je bakteriálna proteínáza, ktorá sa získava z kmeňa *Bacillus subtilis*.

Pri pokusoch s alkalázou a neutrázou sa priebeh hydrolýzy sledoval pH-stat metódou, ktorú doporučuje výrobca týchto enzýmov na sledovanie priebehu procesu. Pri tomto postupe sa monitoruje pH a hydrolyzačná zmes sa titruje lúhom na udržiavanie stáleho pH. Na základe množstva spotrebovaného lúhu, ktoré je úmerné dosiahnutému stupňu hydrolýzy, možno proces kontrolovať [5].

Podmienky hydrolýzy:

- koncentrácia substrátu: v hydrolyzačnej zmesi sa pohybovala v rozmedzí od 23 g.l⁻¹ do 43,2 g.l⁻¹ (koncentrácia bielkovín sa určila na

základe stanovenia dusíka Kjeldahlovou metódou a prepočtom N x 6,25),

- koncentrácia enzýmu: v jednotlivých pokusoch pomer E/S varíroval od 0,059 AU.g⁻¹ do 1,15 AU.g⁻¹ (AU - Ansonova jednotka vyjadrujúca enzýmovú aktivitu enzýmu),
- reakčná teplota: 50 °C,
- pH hydrolyzačnej zmesi: 7 (neutrása), 8 (alkaláza).

Teplota hydrolyzy a pH reakčnej zmesi boli zvolené ako optimum pre použitý enzým.

Celková hmotnosť hydrolyzačnej zmesi sa v jednotlivých pokusoch pohybovala od 1500 ml do 1870 ml.

Trvanie hydrolyzy varírovalo od 30 min do 210 min.

Pre hydrolyzačné experimenty bolo zostavené laboratórne zariadenie, ktoré pozostávalo:

- z temperovanej hydrolyzačnej nádoby s miešadlom a elektródami na kontrolu pH,
- cirkulačného kvapalinového termostatu,
- digitálneho pH metra,
- byrety.

Priebeh hydrolyzy a dosiahnutý hydrolyzačný stupeň (DH) sa sledoval na základe spotreby NaOH. Stupeň hydrolyzy je definovaný ako pomer počtu rozštiepených peptidových väzieb (na hmotnostnú jednotku bielkoviny) k celkovému počtu peptidových väzieb a udáva sa v percentách [5].

V prípade hydrolyzy pepsínom sa disperzie pripravené z hrachovej múky, resp. z bielkovinového koagulátu hydrolyzovali za štandardných podmienok 24, resp. 48 hodín a množstvo rozštiepenej bielkoviny sa zisťovalo na základe stanovenia obsahu bielkovín v substráte Kjeldahlovou metódou [6].

Na charakterizovanie bielkovinovej skladby extraktov i bielkovinových frakcií sa aplikovala analýza pomocou postupov SDS-PAGE elektroforézy.

SDS-PAGE analýzy sa vykonali modifikovaným postupom podľa Laemliho [7], na zariadení Mighty Small II (zariadenie pre elektroforézu firmy Hoefer Pharmacia Biotech.). Elektroforéza na SDS-polyakrylamidových géloch sa vykonala po redukcii vzoriek β-merkaptóetanolom.

Podmienky elektroforézy:

- koncentrácia separačného gélu: 12,5 %,
- koncentrácia vzorkového gélu: 4 %,

trvanie elektroforézy: 4 hodiny pri 70 V, 13 A (vzorkový gél) a 130 V, 22 A (separačný gél).

Po elektroforéze sa gély farbili roztokom Coomassie Brilliant Blue R 250 v zmesi rozpúšťadiel metanol : voda : kyselina octová (4,5 : 4,5 : 1) počas 2 hodín. Na odfarbenie sa použila zmes etanol : glycerol : voda (2 : 1 : 7). Na základe analýzy štandardných zmesí nízkomolekulových a vysokomolekulových bielkovín sa pre SDS-PAGE gély zostrojili kalibračné čiary.

Výsledky a diskusia

Výsledky sledovania priebehu enzýmovej hydrolýzy sú zhrnuté v tabuľkách 1. a 2. V tabuľke 1. sú uvedené parametre enzýmovej hydrolýzy bielkovín hrachu enzýmom neutráza. Ako substrát sa použili koncentráty bielkovín. Stupeň hydrolýzy sa pohyboval v rozsahu od 10,32 % po 15,12 %. Substrát pripravený extrakciou pri neutrálnom pH sa na separačnom géli rozdelil na 6 pásov, pričom legumínu a jeho podjednotkám prislúchali pásy pri molekulovej hmotnosti 60 a 35-37 kDa a vicelínu pásy pri 50 a 29 kDa. Pásy albumínov boli pri 26 kDa a 17-18 kDa. Pri hydrolyzačnom stupni 10 vykazovali hydrolyzáty 5 pásov. V porovnaní so zložením substrátu sa stratil

TABUĽKA 1. Enzýmová hydrolýza bielkovín hrachu neutrázou.

TABLE 1. Enzymatic hydrolysis of pea proteins by neutrase.

Parametre hydrolýzy ¹	Substrát ²				
	Koncentrát bielkovín hrachu ³				
Množstvo bielkoviny ⁴ [g]	46,5	43,5	39,0	48,0	67,3
Koncentrácia bielkoviny ⁵ [g.l ⁻¹]	31,0	29,0	26,0	30,0	36,0
Pomer enzým - substrát ⁶	0,32	1,03	1,15	0,56	0,67
Trvanie hydrolýzy ⁷ [min]	Hydrolyzačný stupeň ⁸ [%]				
10	9,23	8,29	12,09	8,60	9,16
30	10,00	9,14	14,51	9,58	10,74
60	10,51	9,47	15,12	10,32	11,09
90	10,77	9,81	15,12	10,32	11,27
120	11,02	9,98	15,12	10,32	11,27
150	11,02	10,15	-	-	-
180	11,02	10,32	-	-	-

1 - hydrolysis parameters, 2 - substrate, 3 - concentration of pea proteins, 4 - total amount of protein, 5 - protein concentration, 6 - enzyme - substrate weight ratio, 7 - duration of hydrolysis, 8 - degree of hydrolysis.

TABUĽKA 2. Enzymová hydrolýza bielkovín hrachu alkalázou.
TABLE 2. Enzymatic hydrolysis of pea proteins by alkalase.

Parametre hydrolýzy ¹	Substrát ²				
	Hrach ³	Koncentrát bielkovín hrachu ⁴			
Množstvo bielkoviny ⁵ [g]	64,8	34,5	37,5	37,5	60,7
Koncentrácia bielkoviny ⁶ [g.l ⁻¹]	43,2	23,0	25,0	25,0	32,5
Pomer enzým - substrát ⁷	0,111	0,139	0,128	0,128	0,059
Trvanie hydrolýzy ⁸ [min]	Hydrolyzačný stupeň ⁹ [%]				
10	6,80	8,85	7,20	7,67	4,80
30	-	13,45	10,64	11,27	7,92
60	12,15	16,34	-	14,09	-
90	13,60	17,87	-	15,65	-
120	-	-	-	17,06	-
150	-	-	-	17,53	-
180	-	-	-	18,16	-

1 - hydrolysis parameters, 2 - substrate, 3 - pea, 4 - concentration of pea proteins, 5 - total amount of protein, 6 - protein concentration, 7 - enzyme - substrate weight ratio, 8 - duration of hydrolysis, 9 - degree of hydrolysis.

pás prislúchajúci vicelínu s 50 kDa a zvýraznil sa pás pri 29 kDa. Nezistili sa pásy pre podjednotky legumínu v rozsahu 35-37 kDa. Výrazný pás sa zistil pre albumín s 26 kDa a objavili sa pásy pre menšie albumíny, resp. štepy vicilínu v rozsahu 18-14 kDa. Pre hydrolyzáty so stupňom 11 sa zistilo 7 pásov, z toho 5 zreteľne oddelených. Pre legumínové podjednotky sa zistil pás prislúchajúci kyslým polypeptidom s 43 kDa a 9 kDa, pre vicelínové štepy pás pri 29 kDa. Okrem výrazného pásu pre albumín pri 26 kDa sa ukázali pásy pre malé molekuly v rozsahu 20-14 kDa. V hydrolyzáte s najvyšším stupňom hydrolýzy sa identifikovalo 5 pásov - intenzívne pásy pre albumíny s 26, 19 a 17 kDa.

V tabuľke 2. sú uvedené parametre enzymovej hydrolýzy bielkovín hrachu alkalázou. V prípade hydrolýzy alkalázou sme ako substrát použili okrem koncentráta bielkovín aj pomletý sušený hrach. Jednotlivé hydrolýzy sa riadili tak, aby sa získali hydrolyzáty s rozličným stupňom hydrolýzy. Stupeň hydrolýzy sa pohyboval v rozsahu od 7,92 % po 18,16 %. Ako vidieť z výsledkov, pri hydrolýze alkalázou sme dosiahli vyšší stupeň hydrolýzy. Reakčná rýchlosť hydrolýzy sa s časom znižovala, a to úmerne úbytku substrátu. Najväčší nárast hydrolyzačného stupňa sa dosiahol v prvých 30 až 60 minútach hydrolýzy pri použití oboch enzýmov. V prípade použitia enzýmu neutráza sa po 60 min stupeň hydrolýzy nemenil, pri hydrolýze s enzýmom

alkaláza došlo ešte po 60 min k miernemu zvýšeniu hydrolyzačného stupňa, čo zodpovedá aj charakteristike hydrolyzačných kriviek enzýmov neutráza a alkaláza pri použití rôznych bielkovinových substrátov [4].

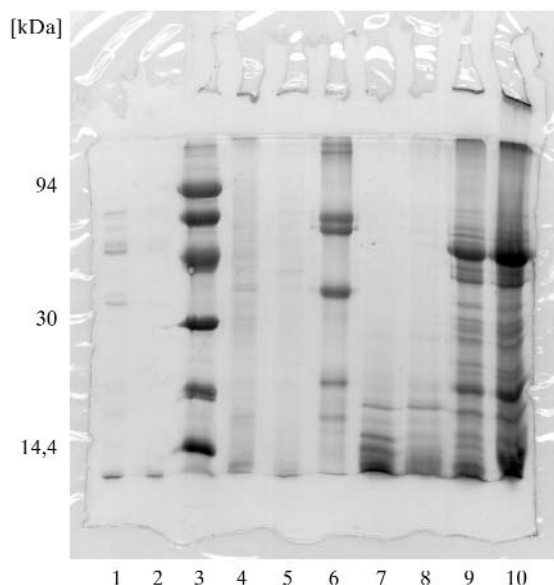
Pri experimentoch s alkalázou sa podľa hydrolýzy, resp. jej rozsahu menilo zastúpenie jednotlivých bielkovinových fragmentov v hydrolyzátoch. Substrát, pripravený alkalickou extrakciou, vykazoval na separačných géloch 6 charakteristických pásov, pre legumín v oblasti 60 kDa a jeho bázičné polypeptidy s 20-22 kDa, pre vicilín a jeho podjednotky v oblasti 50 kDa, resp. 36-38 kDa a pre albumíny s 26 a 14-14,6 kDa. Pri najmenšom rozsahu hydrolýzy (hydrolyzačný stupeň 7,92) sa na separačných géloch identifikovalo 5 pásov. V porovnaní so vzorkou substrátu sa stratil pás vicilínu pri 50 kDa a zistil sa pás pre jeho podjednotky s 30 kDa. Ukázal sa pás pre podjednotky legumínu s 43 kDa a výrazný pás pre bázičné polypeptidy pri 20 kDa. Namiesto albumínového pásu pre 26 kDa sa ukázal pás v oblasti 16 kDa pre menšie albumíny. Pri stupni hydrolýzy okolo 10 sa detegovalo 7 pásov. Najvýraznejšie pásy prislúchali albumínom s 24 a 20 kDa. Pásy pre podjednotky legumínu a vicilínu boli v pásmach nižších (34-39 kDa pre legumín, resp. 28 kDa pre vicilín). Podobný trend v zastúpení fragmentov sa zistil aj pri hydrolyzačných stupňoch 14 a 18, pričom sa zvyšoval počet pásov pre albumíny s nízkou molekulovou hmotnosťou v rozsahu od 24 kDa po 14 kDa.

Hydrolyzačné pokusy s alkalázou a neutrázou sme prerušili po dosiahnutí určitého zvoleného stupňa hydrolýzy za účelom sledovania priebehu zmien bielkovinovej skladby. V žiadnom z pokusov hydrolýza neprebehla úplne, a to najmä z časových dôvodov (veľké spomalenie reakcie pri znížení koncentrácie substrátu). Nízkou hydrolyzovateľnosť si vysvetľujeme jednak aminokyselinovou špecifitou použitých enzýmov, jednak podmienkami hydrolýzy v alkalicknej oblasti.

Hydrolýza pepsínom prebiehala odlišným spôsobom. Rozsah hydrolýzy, zisťovaný na základe koncentrácie bielkovín v substráte, bol väčší ako v prípade alkalázy a neutrázy. V experimentoch, kde sa ako substrát použila disperzia hrachovej múky, sa po 24 hodinách pôsobenia enzýmu zhydrolyzoval 47 % - 59 % podiel bielkoviny, po 48 hodinách 78 % bielkoviny. Pri substráte pripravenom z izoelektrického koagulátu bielkovín bol zhydrolyzovaný podiel bielkovín po 24 hodinách i 48 hodinách vyšší v priemere o 5 % až 10 %.

Rozdelenie bielkovín a bielkovinových fragmentov hydrolyzátoch na separačných géloch bolo odlišné od rozdelenia hydrolyzátoch alkalázových a neutrázových. Hydrolýza prebiehala hlbšie, na géloch bolo detegovaných viac pásov, najmä v oblasti malých molekulových hmotností. Zloženie hydrolyzátoch po 24 hodinách a 48 hodinách bolo prakticky totožné.

Hydrolyzáty hrachových disperzií vykazovali 9 pásov, a to pre legumín a jeho fragmenty pri molekulovej hmotnosti 58-63 kDa, resp. 40 kDa a pre vicilín pri 31-35 kDa. Ďalších 6 pásov pre 22, 19, 17, 13, 10 a 8 kDa patrilo štepom vicilínu a albumínom. Hydrolyzáty disperzií z koagulátu bielkovín mali na separačných géloch 7 pásov. Pásky pre legumín a vicilín boli rovnaké ako v prípade hrachových disperzií a v oblasti molekulovej hmotnosti od 22



OBR. 1. SDS-PAGE bielkovín hrachu.

FIG. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of pea proteins.

- | | |
|---|--|
| 1 - hydrolyzáť bielkovín hrachu pepsínom, 24 h | 1 - hydrolysate of pea proteins by pepsin, 24 h |
| 2 - hydrolyzáť koagulátu bielkovín hrachu pepsínom, 24 h | 2 - hydrolysate of pea proteins coagulate by pepsin, 24 h |
| 3 - LMW štandard (štandardná zmes bielkovín s nízkou molekulovou hmotnosťou) | 3 - LMW (low molecular weight) standard |
| 4 - hydrolyzáť bielkovín hrachu pepsínom, 48 h | 4 - hydrolysate of pea proteins by pepsin, 48 h |
| 5 - hydrolyzáť koagulátu bielkovín hrachu pepsínom, 48 h | 5 - hydrolysate of pea proteins coagulate by pepsin, 48 h |
| 6 - HMW štandard (štandardná zmes bielkovín s vysokou molekulovou hmotnosťou) | 6 - HMW (high molecular weight) standard |
| 7 - extrakt bielkovín hrachu alkalázou, DH = 10,6 | 7 - hydrolysate of pea proteins extract by alcalase, DH = 10,6 |
| 8 - extrakt bielkovín hrachu alkalázou, DH = 18,6 | 8 - hydrolysate of pea proteins extract by alcalase, DH = 18,6 |
| 9 - extrakt bielkovín hrachu neutrázou, DH = 15,1 | 9 - hydrolysate of pea proteins extract by neutrase, DH = 15,1 |
| 10 - extrakt bielkovín hrachu neutrázou, DH = 11 | 10 - hydrolysate of pea proteins extract by neutrase, DH = 11 |

do 8 kDa boli detegované 4 pásy.

Na obr. 1. je ukážka gélu s elektroforetickým delením bielkovín vybraných hydrolyzáto.

Záver

Na základe vykonaných experimentov s hydrolyzou bielkovín hrachu rozličnými enzýmami možno urobiť nasledujúce závery:

- kinetika hydrolyzačných reakcií bola pri použití rozličných enzýmov rôzna,
- mechanizmus hydrolyzy bol pri použití alkalázy a neutrázy podobný, hydrolyza alkalázou však prebiehala za porovnateľných podmienok koncentrácie substrátu a enzýmu rýchlejšie, ako hydrolyza neutrázou,
- s narastajúcim stupňom hydrolyzy sa na separačných géloch zvyšoval počet pásov prislúchajúcich menším štepom legumínu a vicilínu, ako aj pásov pre menšie albumíny,
- pri hydrolyze alkalázou sa v porovnaní s neutrázovými hydrolyzátm vo väčšom rozsahu vytvárali alkalické polypeptidy legumínu,
- hydrolyza pepsínom prebehla v najväčšom rozsahu, na separačných géloch bol veľký počet pásov v oblasti malých molekulových hmotností.

Literatúra

1. KRKOŠKOVÁ, B.: Metódy hodnotenia a znižovania cudzorodých a prírodných toxických látok v potravinách. [Výskumná správa.] Bratislava, Výskumný ústav potravinársky 1997. 32 s.
2. KRKOŠKOVÁ, B.: Enzymatická hydrolyza bielkovín zo strukovín. Poľnohospodárstvo, 39, 1993, č. 6, s. 509-517.
3. AREMU, C. Y.: Proximate and amino acid composition of cowpea protein concentrate prepared by isoelectric point precipitation. Food Chem., 37, 1990, č. 1, s. 61-68.
4. HERMANSSON, A. M.: Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. J. Texture Stud., 9, 1978, č. 1/2, s. 33-58.
5. ADLER-NISSEN, J. - SEJR OLSEN, H.: The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. In: Functionality and protein structure (collection). ACS Symposium Series, 92, Washington D. C. 1979, s. 125-146.
6. PRÍBELA, A.: Analýza potravín. Bratislava, Slovenská technická univerzita 1982. 388 s.

7. LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature.*, 227, 1970, Aug., s. 680-685.

Do redakcie došlo 10.10.1997.