

Enzymová hydrolýza kazeínu v membránovom reaktore

JAROSLAV ZEMANOVIČ—DAGMAR ŠTOLFOVÁ—JARMILA SILLOVÁ

Súhrn. Porovnali sme priebeh enzymovej hydrolýzy kazeínu za prítomnosti trypsínu v pH-state za štandardných podmienok a v membránovom reaktore. Ultrafiltrát z membránového reaktora obsahoval 7 aminokyselín, predovšetkým tyrozín, fenylalanín a histidín. Inhibícia produktom nemala rozhodujúci vplyv na uvoľnenie aminokyselín. Ku koncu hydrolýzy sa vo zvýšenej miere uvoľňovali nízkomolekulové peptidy.

Teoretická časť

Pre priebeh enzymovej hydrolýzy proteínov je charakteristické spomalenie reakcie po určitom čase hydrolýzy [1]. Spomalenie hydrolýzy kazeínu sa vysvetľuje možnosťami: a) autolýzou a inaktiváciou enzýmu, b) vznikom fragmentov kazeínu, ktoré pôsobia ako inhibítory enzýmu, c) výskytom fragmentov kazeínu obsahujúcich peptidové väzby chránené vnútri natívneho proteínu. Experimentálne boli vylúčené prvé dve možnosti. Zahriatím na 100 °C a pôsobením ultrazvuku došlo k sprístupneniu niektorých peptidických väzieb a k zvýšeniu stupňa hydrolýzy v porovnaní so štandardným postupom. Tým sa neobjasnila otázka vplyvu produktov na priebeh hydrolýzy. Jedna z hlavných možností ako odstraňovať reakčné produkty z hydrolyzovanej zmesi je použitie membránového reaktora [2, 3]. Enzymový membránový reaktor sa použil aj na hrubé rozdelenie produktov hydrolýzy podľa molekulovej hmotnosti, jednotlivé produkty sa ďalej identifikovali pomocou HPLC a analýzou aminokyselín [4].

Úlohou našej práce bolo sledovať priebeh enzymovej hydrolýzy kazeínu v membránovom reaktore a zistiť prípadný inhibičný účinok koncových produktov na kinetiku enzymovej hydrolýzy.

Ing. Jaroslav Zemanovič, CSc., Ing. Dagmar Štolfová, Ing. Jarmila Sillová, Katedra mlieka, tukov a hygieny požívatín. Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Materiál a metódy

Na hydrolyzu sme použili laboratórne pripravený kazeín a proteínazu trypsín (Léčiva, Praha). Podmienky hydrolyzy: pH 8,0, 45 °C, trypsín 0,04 mg · ml⁻¹ a 250 ml 1 % roztoku substrátu, reakcia prebiehala v pH-state.

Zapojenie pH-statu: reakčná nádoba s 250 ml 1 % roztoku substrátu s temperovaním, miešaním magnetickým miešadlom, meraním pH, prívodom roztoku NaOH čerpadlom a recirkuláciou reakčnej zmesi pomocou peristaltického čerpadla cez ultrafiltračný prvok Chiraplat (Chirana, Stará Turá) pri tlaku 20 kPa. Tlak sme nastavili tak, aby sme získali 100 ml filtrátu za 10 minút. Odfiltrovaný roztok sme v retentáte nahradili vodou upravenou na pH 8,0 a 45 °C.

Ako kontrolu sme uskutočnili enzýmovú hydrolyzu 1 % roztoku kazeínu za štandardných podmienok bez ultrafiltrácie.

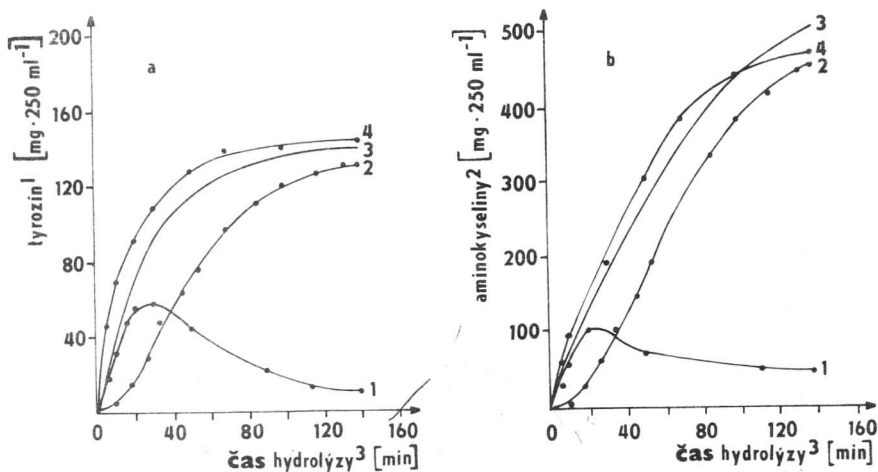
Na hodnotenie priebehu hydrolyzy sme použili spotrebu 0,5 mol · l⁻¹ NaOH pridávaného do retentátu, úbytok peptidických väzieb stanovených biuretovou reakciou, ďalej uvoľňovaný tyrozín a aminokyseliny stanovené v ultrafiltráte a retentáte pomocou Folinovho činidla, resp. pomocou ninhydrínu [5]. Stupeň hydrolyzy (DH) sme počítali ako pomer zistenej hodnoty oproti pôvodnej hodnote. Takto sme počítali DH_{OH} zo spotreby NaOH, DH_{pep} z množstva nerozštiepených peptidických väzieb, Dh_{Tyr} z množstva uvoľneného tyrozínu a DH_{AK} z množstva uvoľnených aminokyselín.

Výsledky a diskusia

V priebehu enzýmovej hydrolyzy bez ultrafiltrácie sme odoberali vzorky v určitých časových intervaloch. Pri enzýmovej hydrolyze s ultrafiltráciou sa takéto intervaly nedali dodržať, nakoľko sme odoberali 100 ml objemy filtrátu, ktoré sa neodfiltrovali vždy za rovnaký čas. Priebeh enzýmovej hydrolyzy bol charakterizovaný pomocou stanovenia uvoľneného tyrozínu, všetkých aminokyselín, množstva nerozštiepených peptidických väzieb a spotreby NaOH a grafickým znázornením získaných hodnôt na obr. 1 a 2. Súčet hodnôt zistených v retentáte a v ultrafiltráte poskytol údaj o výslednom priebehu hydrolyzy s ultrafiltráciou.

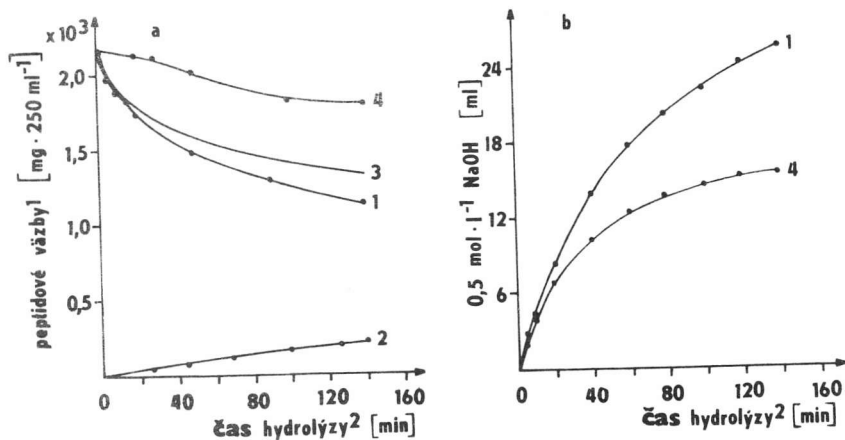
Zistili sme, že množstvo uvoľneného tyrozínu sa po 70 minútach už nemenilo a hydrolyza bez ultrafiltrácie a s ultrafiltráciou mala podobný priebeh. Obsah uvoľneného tyrozínu v retentáte a v ultrafiltráte mal charakteristický priebeh, ktorý vlastne určoval výsledný priebeh enzýmovej hydrolyzy (obr. 1a).

V prípade množstva uvoľnených aminokyselín (obr. 1b) výsledný priebeh hydrolyzy s ultrafiltráciou bol charakterizovaný vzostupom množstva aminokyselín aj na konci hydrolyzy, čomu zodpovedala aj stúpajúca spotreba NaOH (obr. 2b).



Obr. 1. Enzymová hydrolyza kazeinu za prítomnosti trypsinu štandardným postupom a v membránovom reaktore. a — množstvo uvoľneného tyrozinu, b — množstvo uvoľnených aminokyselín. 1 — retentát, 2 — ultrafiltrát, 3 — membránový reaktor (retentát + ultrafiltrát), 4 — štandardný postup.

Fig. 1. Tryptic hydrolysis of casein performed by standard method and in a membrane reactor. a — amount of released tyrosine, b — amount of released amino acids. 1 — Retentate, 2 — Ultrafiltrate, 3 — Membrane reactor (retentate + ultrafiltrate), 4 — Standard method. (1 — Tyrosine, 2 — Amino acids, 3 — Hydrolysis time.)



Obr. 2. Enzymová hydrolyza kazeinu za prítomnosti trypsinu štandardným postupom a v membránovom reaktore. a — množstvo nerozštiepených peptidických väzieb, b — spotreba $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH v retentáte. 1—4 ako v obr. 1.

Fig. 2. Tryptic hydrolysis of casein performed by standard method and in a membrane reactor. a — amount of uncleaved peptide bonds, b — consumption of $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH in the retentate. For 1—4 see Fig. 1. (1 — Peptide bonds, 2 — Hydrolysis time.)

Množstvo nerozštiepených peptidických väzieb v priebehu hydrolýzy klesalo, pričom sme zistili ich výraznejší pokles pri výslednom priebehu hydrolýzy s ultrafiltráciou (obr. 2a).

Filtrát odobraný po 43 minútach hydrolýzy obsahoval podľa analýzy na Automatickom analyzátore aminokyselín 339 (Mikrotechna, Praha) 7 aminokyselín (tab. 1). Pri porovnaní so vzájomným zastúpením aminokyselín v kazeíne sme vo filtráte zistili vyšší obsah predovšetkým tyrozínu, fenyľalanínu a histidínu.

Tabuľka 1. Vzájomné zastúpenie voľných aminokyselín v ultrafiltráte hydrolyzátu kazeínu po 43 minútach

Table 1. Distribution of free amino acids in ultrafiltrate of casein hydrolysate after 43 minutes

Aminokyselina ²	Vzájomné zastúpenie aminokyselín ¹	
	Kazeín ³ [%]	Ultrafiltrát hydrolyzátu ⁴ [%]
Val	8,2	6,0
Met	1,1	5,2
Leu	7,9	10,8
Tyr	7,4	24,5
Phe	3,7	24,5
His	5,2	18,6
Lys	7,1	10,5
Spolu ⁵	40,6	100,0

1 — Distribution of amino acids, 2 — Amino acid, 3 — Casein, 4 — Ultrafiltrate of hydrolysate, 5 — Sum.

Už pri hodnotení kinetiky enzýmovej hydrolýzy s ultrafiltráciou (obr. 1 a 2) sme spozorovali, že reakcia nie je inhibovaná produktom — uvoľnenými aminokyselinami, a že ku koncu reakcie sa vo zvýšenej miere tvorili peptidy. Pre spresnenie tohto pozorovania sme vypočítali konečné stupne hydrolýzy na základe rôznych zistených údajov. Hodnoty vypočítané pre enzýmovú hydrolýzu bez ultrafiltrácie a s ňou sú v tab. 2. Relatívne vysoký stupeň hydrolýzy sme zistili pri DH_{Tyr} a DH_{red} . Ak berieme do úvahy, že nie všetky molekuly tyrozínu a ostatných aminokyselín sú prístupné účinku enzýmu, môžeme predpokladať, že spomalenie reakcie hydrolýzy bolo zapríčinené vyčerpaním substrátu, t.j. rozštiepením teoreticky hydrolyzovateľných peptidických väzieb. Potvrďuje to skutočnosť, že z DH_{Tyr} a DH_{AK} bez ultrafiltrácie a s ňou sú takmer rovnaké, hoci odstraňovanie produktu by malo hydrolýzu výrazne zväčšiť. Hodnoty DH_{pep} a DH_{OH} v tab. 2 nám zároveň ukázali, že počet rozštiepených peptidických väzieb pri hydrolýze s ultrafiltráciou je výrazne vyšší, z čoho sa dá usudzovať,

Tabuľka 2. Konečné stupne hydrolyzy štandardným postupom a v membránovom reaktore,
1 % roztok kazeínu, 0.04 mg. ml⁻¹ trypsin, pH 8.0, 45 °C

Table 2. Final degree of hydrolysis performed by standard method and in membrane reactor,
1 % casein solution, 0.04 mg. ml⁻¹ trypsin, pH 8.0, 45 °C

Spôsob hydrolyzy ¹	DH_{Tyr} [%]	DH_{AK} [%]	DH_{red} [%]	DH_{pep} [%]	DH_{OH} [%]
Štandardný postup ²	84	20	50	17	16
Membránový reaktor ³	83	22	54	39	26

DH_{Tyr} — stupeň hydrolyzy počítaný z množstva uvoľneného tyrozinu: Degree of hydrolysis calculated from the amount of released tyrosine.

DH_{AK} — stupeň hydrolyzy počítaný z množstva uvoľnených aminokyselín: Degree of hydrolysis calculated from the amount of released amino acids.

DH_{red} — stupeň hydrolyzy počítaný ako pomer množstva uvoľnených aminokyselín k maximálnemu množstvu len 7 aminokyselín v kazeíne: Degree of hydrolysis calculated as ratio of the amount of free amino acids and maximum amount of only 7 amino acids in casein.

DH_{pep} — počítaný z množstva nehydrolyzovaných peptidických väzieb: Degree of hydrolysis calculated from the amount of uncleaved peptide bonds.

DH_{OH} — stupeň hydrolyzy počítaný zo spotreby 0,5 mol. l⁻¹ NaOH [6]: Degree of hydrolysis calculated from the consumption of 0.5 mol l⁻¹ NaOH [6].

1 — Hydrolysis method, 2 — Standard method, 3 — Membrane reactor.

že najmä ku koncu hydrolyzy dochádza k zvýšenému odštiepovaniu nižších peptidov z molekuly kazeínu, bez uvoľňovania aminokyselín.

Nižšia hodnota DH_{OH} pri hydrolyze s ultrafiltráciou mohla byť zapríčinená prípadnou filtráciou aminokyselín bez ich neutralizácie.

Pozorovania uvedené v našej práci platia pre 1 % roztok substrátu. Tieto výsledky by sa však mali overiť aj pri vyšších koncentráciách kazeínu.

Literatúra

1. NEDKOV, P.—LILOVA, A.—ČORBANOV, B., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 368, 1987, s. 1321.
2. VISSER, S.—NOORMAN, H. J.—SLANGEN, Ch. J.—ROLLEMA, H. S., J. Dairy Res., 56, 1989, s. 323.
3. MANNHEIM, A.—CHERYAN, M., J. Food Sci., 55, 1990, s. 381.
4. LEMIEUX, L.—AMIOT, J., J. Chromatogr., 519, 1990, s. 299.
5. DAVÍDEK, J. a kol.: Laboratórní příručka analýzy potravin. Praha, SNTL 1977.
6. ADLER-NISSEN, J.: Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. Amsterdam, Elsevier 1986.

Do redakcie došlo 29. 8. 1991

Ферментный гидролиз казеина в мембранном реакторе

Резюме

Мы сравнили протекание ферментного гидролиза казеина в присутствии трипсина в pH-стате при стандартных условиях и в мембранном реакторе. Ультрафильтрат из мембранного реактора содержал 7 аминокислот, главным образом тирозин, фенилаланин и гистидин. Ингибция продуктом не имела решающее влияние на выделение аминокислот. В конце гидролиза в повышенной мере выделялись низкомолекулярные пептиды.

Enzymic hydrolysis of casein in a membrane reactor

Summary

Tryptic hydrolysis of casein in pH-stat at standard conditions and in a membrane reactor was compared. Ultrafiltrate from membrane reactor contained 7 amino acids, mainly tyrosine, phenylalanine and histidine. There was no influence of end products, on amino acid release. In the end of hydrolysis low molecular peptides were mainly released.