

PROTEOLYSIS OF PLANT PROTEINS AND ITS UTILIZATION IN FOOD INDUSTRY

PROTEOLÝZA RASTLINNÝCH BILEKOVÍN A JEJ VYUŽITIE V POTRAVINÁRSTVE

Sendrejšová E., Urminská D.

Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika.

E-mail: sendrejo@afnet.uniag.sk, Dana.Urminska@uniag.sk

ABSTRACT

The aim of our work was proteolysis (enzymatic hydrolysis) of plant proteins, wheat, barley and oat. We used 0.1% and 1 % protein substrates which we hydrolyzed with the use of 0.5% and 1% of proteolytic enzymes, Trypsin, Subtilizin A, Subtilizin BPN' and „Nitrazym“ (alcalic Ser-protease of subtilisin type prepared at KBB FBP SPU in Nitra) at a temperature of 37°C and optimum pH for 15 – 360 minutes. From results it follows that the most suitable is albumine bovine and less suitable were prolamin proteins of wheat grain. The optimum of hydrolysis time was 30 minutes. Molecular weights of hydrolyzates prepared by Trypsin are about 24 kDa and in the range 45 kDa-66 kDa, by Subtilizin A to 28 kDa, by Subtilizin BPN' in the range 45 kDa-66 kDa and by „Nitrazym“ in the range 14 kDa-27 kDa and 5-6 kDa.

Keywords: wheat, barley, oat, plant proteins, enzymatic hydrolysis, proteases

ABSTRAKT

Cieľom našej práce bola proteolýza (enzýmová hydrolýza) rastlinných bielkovín, pšenice, jačmeňa, ovsá. Použili sme 0,1% a 1% bielkovinové substráty, ktoré sme hydrolyzovali 0,5% a 1% proteolytickými enzýmami, Trypsín, Subtilizín A, Subtilizín BPN', „Nitrazým“ (alkalická Ser-proteáza subtilizínového typu pripravená na KBB FBP SPU v Nitre), pri teplote 37°C a optimálnom pH počas 15 – 360 minút. Z výsledkov vyplýva, že najvhodnejším substrátom je hovädzí sérový albumín, najmenej vhodným, sú prolamínové bielkoviny zrna pšenice. Optimálnym časom hydrolýzy je 30 minút. Molekulová hmotnosť hydrolyzátoov pripravených Trypsínom je okolo 24 kDa a 45 kDa–66 kDa, Subtilizínom A do 28 kDa, Subtilizínom BPN' 45 kDa–66 kDa a „Nitrazýmom“ 14 kDa–27 kDa a 5–6 kDa.

Kľúčové slova: pšenica, jačmeň, ovos, rastlinné bielkoviny, enzýmová hydrolýza, proteázy

ÚVOD

Proteolýza - enzýmová hydrolýza sa za posledné roky ukázala ako veľmi účinný, a z hľadiska zachovania výživovej hodnoty potravín, aj ako šetrný spôsob úpravy funkčných vlastností potravín.

Hydrolyzáty rastlinných bielkovín majú široké perspektívne využitie ako náhrada bielkovín živočíšneho pôvodu. Enzýmovou hydrolýzou sa získa z pôvodnej bielkoviny zmes štiepných produktov od vysokomolekulových peptidov, cez nízkomolekulové peptidy až po aminokyseliny. Konečné zloženie hydrolyzátu závisí od použitia konkrétneho enzýmu a od stupňa naštiepenia bielkoviny (Krkošková – Šimková, 1998).

Nutričná kvalita získaných bielkovinových hydrolyzátov závisí od obsahu peptidov s nízkou molekulovou hmotnosťou. Nízkomolekulové peptidy sú totiž ľahšie resorbované črevnou sliznicou ako voľné aminokyseliny (Webb, 1990). Predpokladá sa, že optimálnu molekulovú hmotnosť z hľadiska trávenia má peptid zložený asi z 20 zvyškov aminokyselín. Výrazný vplyv na uvedené vlastnosti bielkovinových hydrolyzátov má aj substrátová špecifita proteáz, ktoré hydrolyzujú bielkoviny na rozdielne peptidy, často aj na voľné aminokyseliny (Gopalkrishnan, 2000).

Jedným zo spôsobov ako zvýšiť využiteľnosť bielkovín je aplikácia proteolytických enzýmov predovšetkým mikrobiálneho pôvodu na úpravu polymérnych zlúčenín na oligo- až monoméne (Perrot a i., 1999, Yeboah a i., 1999, Clemente, 2000).

Enzymaticky hydrolyzované bielkoviny sa využívajú ako aditívne látky s funkčnými účinkami a ako výživové zložky špeciálnych diétnych prípravkov.

MATERIÁL A METODIKA

Ako substráty pre proteolýzu (enzymatickú hydrolýzu) sme použili samostatné jednotlivé bielkovinové frakcie, pripravené extrakciou zo pšeničného, jačmenného a ovseného šrotu. Za účelom odstránenia použitého extrakčného roztoku a prípravy suchého preparátu bielkovín sme jednotlivé frakcie lyofilizovali a aplikovali na SDS-PAGE. Pre porovnanie účinku proteáz na rôzne bielkoviny sme uskutočnili hydrolýzu aj s hovädzím sérovým albumínom (BSA) a ovoalbumínom (OA) vaječného bielka.

V práci sme aplikovali najrozšírenejšie komerčne dostupné proteolytické enzýmy, Trypsín, Subtilizín A, Subtilizín BPN' a enzým pripravený na KBB FBP SPU pracovne nazvaný „Nitrazým“. V pokusoch sme použili 0,1% a 1% substráty, ktoré sme hydrolyzovali 0,5% a 1% enzýmovými preparátmi o rôznej aktivite pri teplote 37°C počas 15 – 360 minút.

pH optimum jednotlivých enzýmov reakciou s rovnakým množstvom enzýmu o rôznej aktivite v 1g preparátu sme stanovili pomocou univerzálneho tlmivého roztoku podľa Theorella a Stenhagena v roztoku pH 4,0 – 11.

Hydrolytickú účinnosť jednotlivých enzýmov sme stanovili pomocou tzv. formolovej titrácie, pri ktorej sa množstvo voľných aminokyselín v reakčnej zmesi stanovuje titračne ako počet mg aminodusíka.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V enzýmových reakciách je pH základnou reakčnou podmienkou. Z výsledkov sme zistili, že Trypsín je proteáza s pH optimom 7,5, Subtilizín A je proteáza s pH optimom 8,0. Pre Subtilizín BPN' je pH optimum 10,5 a pre „Nitrazým“ je pH optimum 9,0 – 9,5. Do hydrolytických zmesí sme použili fosforečnanový tlmivý roztok, ktorého pH vždy zodpovedalo pH optimu daného enzýmu.

V reakčnej zmesi ktorá obsahovala Trypsín sa najviac aminokyselín uvoľnilo v reakcii s hovädzím sérovým albumínom. Pri reakcii Trypsínu s 0,1% aj 1% hovädzím sérovým albumínom bola najintenzívnejšia hydrolyza už do 30 minút, kedy sa uvoľnilo 15,82 mg N a 20,02 mg N. Ďalším vhodným substrátom je ovoalbumín, z ktorého sa za daný čas uvoľnilo 14,14 mg N a 15,26 mg N pričom takmer rovnakú hydrolyzu sme zistili aj keď sme do reakčnej zmesi aplikovali pšeničné albumíny a globulíny, z ktorých sme získali 13,72 mg N a 15,26 mg N. Nevhodnými substrátmi sú gliadíny a gluteníny, u ktorých ani po 360 minútach reakcie nenastal výraznejší hydrolytický rozklad. Optimálnymi podmienkami hydrolyzy je 0,1% koncentrácia albumínového substrátu, 0,5% koncentrácia Trypsínu a čas hydrolyzy 30 minút.

Pri hydrolyze bielkovín Subtilizínom A sme najúčinnější rozklad dosiahli v reakčnej zmesi, ktorá obsahovala hovädzí sérový albumín, pričom najvýraznejšie uvoľnenie aminokyselín nastalo do 30 minút. Ďalšími vhodnými substrátom je ovoalbumín a pšeničné albumíny a globulíny. V porovnaní s týmito bielkovinami sa hydrolyza glutenínov zrealizovala len s asi s 1/3- účinnosťou a gliadíny sa prejavili ako nevhodný substrát.

Hydrolyzou enzýmom Subtilizín BPN' sme zistili, že najvhodnejším substrátom je hovädzí sérový albumín (BSA), v reakcii s ktorým sme pri 0,1% koncentrácii substrátu a 0,5% koncentrácii enzýmu za 30 minút získali 10,36 mg N, pričom v reakcii s ovoalbumínom sme dosiahli takmer rovnaké množstvo produktu, 9,10 mg N.

Z rastlinných bielkovín boli pre hydrolyzu najvhodnejším substrátom albumíny a globulíny. Podobne ako v prípade Trypsínu a Subtilizínu A, ani pri použití Subtilizínu BPN' nemalo predĺženie času hydrolyzy výraznejší vplyv na množstvo uvoľnených aminokyselín.

Najvhodnejšími substrátmi pri hydrolyze enzýmom „Nitrazým“ boli opäť albumínové bielkoviny, v poradí hovädzí sérový albumín, ovoalbumín a pšeničné albumíny a globulíny, kedy sa v reakcii 0,1% substrátu s 0,5% enzýmom uvoľnilo 30 minútovou hydrolyzou 10,92 mg, 10,78 mg a 8,68 mg aminodusíka. V uvedenej reakčnej zmesi sme však predĺžením času hydrolyzy na 60 minút zaznamenali najvýraznejší nárast množstva produktov, a to 14,4% v reakcii so pšeničnými albumínmi a globulínmi.

Pre zavedenie metódy na stanovenie molekulových hmotností získaných hydrolyzáto, peptidov, sme využili metódu elektroforetickej determinácie v polyakrylamidovom géli s využitím komerčných nízkomolekulových a vysokomolekulových štandardov. Testované hydrolytické reakčné zmesi obsahovali 1% substrát BSA a 1% enzým pri teplote 37°C počas

15 – 360 minút v prostredí optimálneho pH. Produkt bol lyofilizovaný a aplikovaný do PAGE.

Hydrolýzou Trypsínom sme získali zmes, ktorá obsahovala predovšetkým peptidy s molekulovou hmotnosťou okolo 24 kDa a pomerne vysoké množstvo peptidov s hmotnosťou 45 kDa – 66 kDa. Zvyšovaním času hydrolýzy dochádzalo k úplnému rozkladu nízkomolekulových peptidov. Subtilizín A hydrolyzoval bielkovinový substrát podstatne lepšie. Vznikla zmes peptidov so širším intervalom molekulových hmotností. Väčšina produktov má molekulovú hmotnosť do 28 kDa a to aj v čase hydrolýzy 120 minút. Podstatne menšie je zastúpenie peptidov s molekulovou hmotnosťou nad 45 kDa.

Zistili sme, že Subtilizín BPN' štiepil hovädzí sérový albumín najmä na peptidy s hmotnosťou 45 kDa – 66 kDa, čo je nedostatočné a nevyhovujúce. Ďalšie frakcie mali hmotnosť asi 27 kDa a 14 kDa, čo je už pre využitie na prípravu potravín alebo krmív vhodný produkt.

Po pôsobení „Nitrazým“ sme získali produkt s veľmi širokým spektrom molekulových hmotností. Podľa intenzity elektroforeogramu usudzujeme, že najväčšiu časť tvoria peptidy s hmotnosťou 14 kDa – 27 kDa. Stanovili sme aj prítomnosť nízkomolekulárnych peptidov s hmotnosťou 5 – 6 kDa. Môžeme teda predpokladať, že na prípravu hydrolyzátov bielkovín je „Nitrazým“ vhodnejším enzýmom ako komerčný Subtilizín BPN'.

V hydrolyzátach bielkovín pšeničného a jačmenného šrotu získaných reakciou s alkalickou proteázou „Nitrazým“ (KBB FBP) sme s pomocou VÚŽV Nitra stanovili aminokyselinové zastúpenie. Počas hydrolýzy pšeničného šrotu sa výrazne zvýšil obsah esenciálnych aminokyselín v hydrolyzáte. Obsah lyzínu stúpol po 6 hodinách hydrolýzy až o 100%, výrazne sa zvýšilo aj zastúpenie Phe a Arg, a to o 59% a 42%. V prípade jačmenného šrotu sme nepozorovali taký významný nárast voľných esenciálnych aminokyselín v hydrolyzáte ako u pšeničného šrotu. Najviac sa hydrolýza prejavila zvýšením obsahu Lys a His, a to o 40% a 38%, ako aj Arg o 31%.

ZÁVĚR

- Aplikované enzýmy sú alkalické proteázy s nasledovným pH optimom: Trypsín pH 7,5, Subtilizín A pH 8,0, Subtilizín BPN' pH 10,5 a „Nitrazým“ pH 9,5 - 10,0.
- Najvýraznejšou proteolytickou účinnosťou sa vyznačuje proteáza Trypsín, najmenej efektívnym bol Subtilizín BPN'.
- Proteáza „Nitrazým“ svojou aktivitou zodpovedá proteáze Subtilizín A. Hydrolýzy in vitro dokázali, že „Nitrazým“ je schopný pôsobiť na peptidové väzby rastlinných bielkovín, najmä albumínov, globulínov a v nízkej intenzite aj na gluteníny.
- Najvhodnejším substrátom je hovädzí sérový albumín, najmenej vhodným, takmer nehydrolyzovateľným, sú prolaminové bielkoviny zrna pšenice - gliadíny.

- Pre použité bielkovinové substráty je optimálnym časom hydrolýzy 30 minút, ktorý sa na základe ekonomických prepočtov môže zvýšiť na 60 minút. Predĺženie času hydrolýzy na 360 minút nemá výraznejší vplyv na množstvo získaného produktu.
- V hydrolyzáte natívnych substrátov výrazne stúpol obsah esenciálnych aminokyselín - v pšenici o 100% lyzín, 59% fenylalanín, 42% arginín, v jačmeni o 40% lyzín, 38% histidín, 31% arginín.
- Hydrolýzou Trypsínom sa získa zmes peptidov s molekulovou hmotnosťou okolo 24 kDa a 45 kDa – 66 kDa.
- Pôsobením proteázy Subtilizín A vznikla zmes peptidov prevažne s molekulovou hmotnosťou do 28 kDa.
- Subtilizín BPN' bielkoviny na peptidy s hmotnosťou 45 kDa – 66 kDa, čo je nedostatočné a nevyhovujúce. Ďalšie frakcie mali hmotnosť asi 27 kDa a 14 kDa.
- Po pôsobení „Nitrazýmu“ sa získal produkt s veľmi širokým spektrom molekulových hmotností. Najväčšiu časť tvoria peptidy s hmotnosťou 14 kDa – 27 kDa, ale bola dokázaná aj prítomnosť nízkomolekulárnych peptidov s hmotnosťou 5 – 6 kDa.

LITERATURA

Clemente A. (2000): Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. In: Trends Food Sci. Technol. 11(7): 254-262.

Gopalkrishnan M.V. (2000): Optimum time requirement for enzymic hydrolysis of food proteins. In: Journal of Food Science and Technology Mysore, 2000, p. 319-322.

Krkošková B., Šimková M. (1998): Využitie enzýmov pri úprave bielkovinovej zložky strukovín. In: Biotechnológia prípravy biologicky aktívnych látok a ich využitie v pôdohospodárstve. Nitra: SPU, 1998, s. 37–43.

Perrot C., Quillien L., Gueguen J. (1999): Identification by immunoblotting of pea (*Pisum sativum* L.) proteins resistant to in vitro enzymatic hydrolysis. In: Sci. Aliments, 19(3-4): 377-390.

Weeb E.J. (1990): Intestinal absorption of protein hydrolysis product, a review. In: Anim. Sci., v. 68, 3011-3022

Yeboah F.K., Alli I., Simpson B.K., Konishi Y., Gibbs B.F. (1999): Tryptic fragments of phaseolin from protein isolates of phaseolus beans. In: Food Chem., 67(2): 105-112.