

Povrchovoaktívne vlastnosti roztokov niektorých proteínov

JAROSLAV ZEMANOVIČ - LUBOMÍR VALÍK

Súhrn. V práci sa sledovali povrchovoaktívne vlastnosti vodných roztokov proteínov, α -kazeínu a trypsínu, pričom sa zistil významný vplyv pH na povrchové napätie vodných roztokov proteínov. Najnižšie povrchové napätie bolo pri pH 6. Ďalej sa sledovali zmeny povrchového napätia pri hydrolyze kazeínu za prítomnosti trypsínu a extracelulárnych proteínáz produkovaných pomocou *Brevibacterium linens*. Kinetika zmien povrchového napätia bola počas hydrolyzy u uvedených enzýmov rozdielna. Za prítomnosti trypsínu ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) kleslo počas hydrolyzy povrchové napätie z $50,0$ na $45,0 \text{ mN.m}^{-1}$.

Proteíny ako makromolekuly sa od seba odlišujú obsahom jednotlivých aminokyselín, ich sekvenciou a rôznym priestorovým usporiadaním vo vodnom prostredí. V proteínoch sú časti molekuly s hydrofilným alebo hydrofóbnym charakterom, čím sa vytvára predpoklad pre pozitívnu adsorpciu na fázových rozhraniach a pre povrchovoaktívne javy. U proteínov je známa tvorba koloidných roztokov a tvorba micel.

Proteíny sa využívajú prakticky hlavne pri výrobe potravín pre priaznivé účinky v komplexných potravinárskych systémoch napríklad na tvorbu peny, úpravu viskozity, ako dispergačný prostriedok a na väzbu vody príp. tuku [1, 4]. Niekedy je účelné zlepšiť funkčné vlastnosti proteínov modifikáciou ich molekúl. Na takúto modifikáciu sa využívajú viaceré metódy. Jedna z nich je založená na parciálnej enzýmovej hydrolyze za katalytického účinku rôznych proteínáz. Iná metóda využíva chemickú modifikáciu molekúl proteínu, väčšinou naviazaním alkylu s počtom od 2 do 10 [2]. V oboch prípadoch sa jedná

Ing. Jaroslav Zemanovič, CSc., Ing. Lubomír Valík, CSc., Katedra mlieka, tukov a hygieny potravín, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

o zmenu hydrofilnej alebo hydrofóbnej povahy určitej časti molekuly proteínu. Študované sú aj fyzikálne a iónové interakcie tenzidov, napríklad alkylsírany s proteínmi [3].

Keďže povrchové napätie je jeden z významných parametrov povrchovoaktívnych javov, zamerali sme sa na jeho stanovenie v roztokoch kazeínu, α -kazeínu a trypsínu, ako aj priebehu enzýmovej hydrolýzy kazeínu.

Materiál a metódy

Kazeín podľa Hammerstena bol od fy Fluka AG, trypsín od fy Léčiva, Praha, mal proteolytickú aktivitu $30,0 \text{ nkat.mg}^{-1}$. α -kazeín sme pripravili metódou, využívajúcou na delenie kazeínov močovinu. Extracelulárne proteínázy *Brevibacterium linens* sme pripravili v práškovej forme z produkčného kultivačného média po kultivácii *B. linens* zrážaním organickým rozpúšťadlom. Získaný preparát mal proteolytickú aktivitu $3,0 \text{ nkat.mg}^{-1}$.

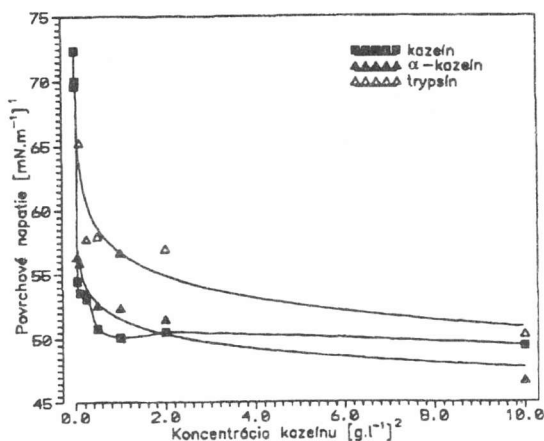
Povrchové napätie sme merali krúžkovou metódou pomocou prístroja du Nouy podľa ČSN 68 1101 pri 20°C a pri 40°C v priebehu enzýmovej hydrolýzy kazeínu.

Roztoky proteínov mali pH 8,0. Pri príprave roztokov kazeínu a α -kazeínu sme úplné rozpustenie dosiahli po 3-minútovom zahriatí vo vriacom vodnom kúpeli.

Enzýmovú hydrolýzu kazeínu sme uskutočnili v 100 ml 1,0 %-ného roztoku pomocou pH-statu pri pH 8,0 a 40°C za pôsobenia trypsínu alebo proteínáz *B. linens*. Priebeh enzýmovej hydrolýzy sme sledovali stanovovaním voľného tyrozínu v supernatante po vyzrážaní proteínu s TCA pomocou Folínovho činidla.

Výsledky a diskusia

Závislosť povrchového napätia od koncentrácie kazeínu, α -kazeínu a trypsínu vo vodnom roztoku je na obr.1. Uvedené proteíny sme si zvolili z toho dôvodu, že ich používame pri modelovom štúdiu enzýmovej hydrolýzy a zaujíma nás povrchová aktivita vznikajúcich produktov. Povrchové napätie 1 % vodných roztokov bolo u kazeínu



Obr.1. Zmena povrchového napätia v závislosti od koncentrácie kazeínu, α -kazeínu a trypsínu vo vodnom roztoku.

Fig.1. Change in surface tension in dependence upon casein, α -casein and trypsin concentration in water solution.

1 - Surface tension, 2 - Casein concentration.

Tabuľka 1. Peniaca schopnosť a povrchové napätie roztokov proteínov (Kitabatake a Doi, 1982).

Table 1. Foaming ability and surface tension of protein solutions (Kitabatake a Doi, 1982).

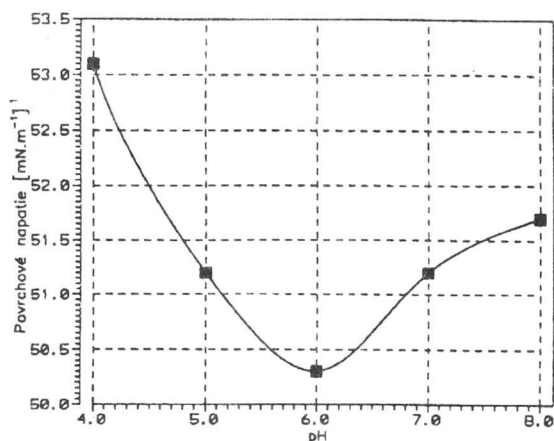
ROZTOK PROTEÍNU ¹	PENIACA SCHOPNOSŤ ²	POVRCHOVÉ NAPÄTIE ³ [mN.m ⁻¹]
Želatína	220,4	46,3
α_{s1} -kazeín	210,5	47,8
Hemoglobín	204,6	41,8
BSA	201,8	45,2
Kazeín	198,2	46,4
Srviatka - typ 50	164,7	44,2
Sójový proteín	153,5	42,1
Vaječný albumín	152,8	42,5
Srviatka - typ 50K	144,8	44,6
IgM	98,0	49,1
Lyzozým	80,5	44,3

1 - 1 % roztoky proteínov, 3 - povrchové napätie 120 min po vytvorení nového povrchu.

1 - 1 % protein solution, 2 - Foaming ability, 3 - Surface tension 120 min after creating new surface.

49,7 mN.m⁻¹, u α -kazeínu 46,7 mN.m⁻¹ a u trypsínu 50,3 mN.m⁻¹. Publikované hodnoty pre kazeín sú nižšie a síce 46,4 mN.m⁻¹, ako je uvedené v tab.1. [4]. Krivky priebehu povrchového napätia mali priebeh totožný ako u typických tenzidov. Odhadnuté kritické micelárne koncentrácie boli v rozmedzí 0,05 - 0,15 g.l⁻¹. Pri meraní povrchového napätia u roztokov proteínov je treba uvažovať okolnosť, že nameraná hodnota je závislá od času.

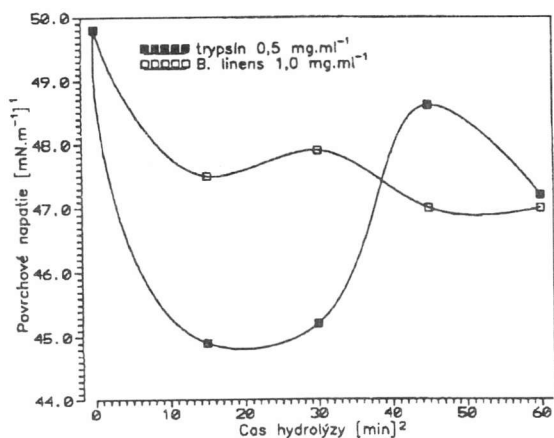
Keďže u proteínov je veľmi významná hodnota pH, zmerali sme povrchové napätie 1 % vodného roztoku kazeínu pri rôznych hodnotách pH. Výsledky sú na obr.2. Pri poklese pH klesali aj hodnoty povrchového napätia po pH 6. Pri pH 5,0 sa roztok kazeínu zmenil, získal gélový charakter a pri pH 4 došlo k vyzrážaniu kazeínu. Pri týchto hodnotách pH sa nedalo uvažovať o 1% roztokoch.



Obr.2. Vplyv pH na povrchové napätie vodného roztoku kazeínu 1 g.l⁻¹, merané krúžkovou metódou pri 20 °C.

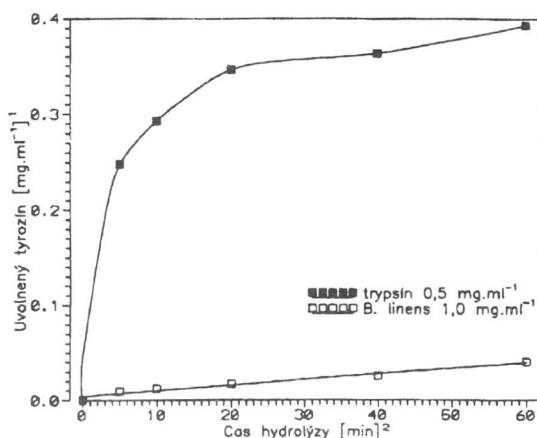
Fig.2. An Influence of pH on the surface tension of water solution of casein 1 g.l⁻¹ measured by ring method at 20 °C.
1 - Surface tension.

Na obr.3. je znázornená zmena povrchového napätia v priebehu enzýmovej hydrolýzy kazeínu. Pomerne zložité zmeny v povrchovom napätí boli potvrdené opakovanými pokusmi. Uvoľnené množstvo tyrozínu bolo za prítomnosti trypsínu výrazne vyššie ako u proteínáz *B. linnens*. Je to dôsledok vyššej aktivity trypsínu ako aj odlišnej špecificity na peptidové väzby. Ukázalo sa, že vznik produktov hydrolýzy s rôznou povrchovou aktivitou sa nedá zachytiť stanovením tyrozínu. Podľa na-



Obr.3. Zmena povrchového napätia pri hydrolyze kazeínu za prítomnosti trypsínu a proteínáz *B. linens*. Kazeín $10,0 \text{ g.l}^{-1}$, trypsin $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, *B. linens* $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Fig.3. Change of surface tension during casein hydrolysis in the presence of trypsin and *B. linens* proteinases. Casein $10,0 \text{ g.L}^{-1}$, trypsin $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, *B. linens* $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$
1 - Surface tension, 2 - Time of hydrolysis.

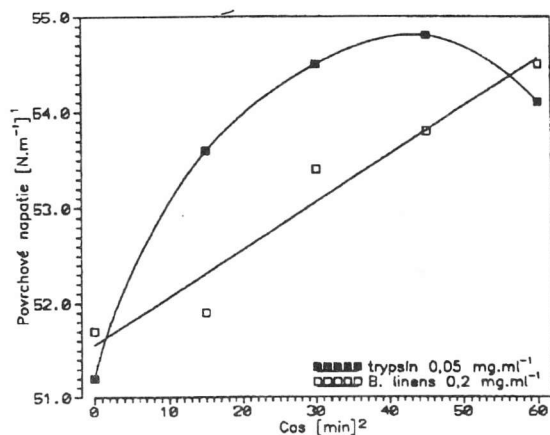


Obr.4. Priebeh uvoľnenia tyrozínu pri hydrolyze kazeínu za prítomnosti trypsínu a proteínáz *B. linens*.

Fig.4. Course of tyrosine release during hydrolysis of casein in the presence of trypsin and *B. linens* proteinases. Casein $10,0 \text{ g.L}^{-1}$, trypsin $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, *B. linens* $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$
1 - Released tyrosine, 2 - Time of hydrolysis.

ších predchádzajúcich poznatkov, ešte stále vznikajú polypeptidy, aj keď sa tyrozín už uvoľňuje.

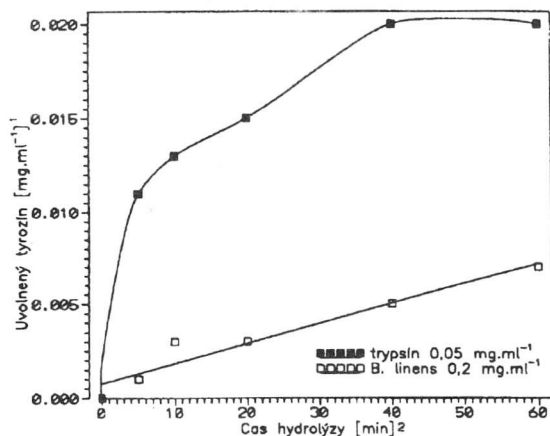
Pri desaťkrát nižšej koncentrácii kazeínu ako v predchádzajúcom prípade bol priebeh enzýmovej hydrolyzy totožný, ale povrchové napätie stúpalo, čo nám ukazujú výsledky na obr.5. a 6. Koncentraciu $1,0 \text{ g.l}^{-1}$ sme zvolili preto, lebo v oblasti kritickej micelárnej koncentrácie malý úbytok povrchovoaktívnej látky vyvolá veľkú zmenu v povrchovom napätí. Pritom je koncentrácia danej látky problematická, lebo z jednej veľkej molekuly vznikne niekoľko menších molekúl, pričom môže povrchové napätie aj klesnúť.



Obr.5. Zmena povrchového napätia pri hydrolyze kazeínu za prítomnosti trypsínu a proteínáz *B. linens*. Kazeín 1,0 g.l⁻¹, trypsin 0,05 mg.ml⁻¹, *B. linens* 0,2 mg. ml⁻¹.

Fig.5. Change of surface tension during hydrolysis of casein in the presence of trypsin and *B. linens* proteinases. Casein 1,0 g.L⁻¹, trypsin 0,05 mg.ml⁻¹, *B. linens* 0,2 mg.ml⁻¹.

1 - Surface tension, 2 - Time.



Obr.6. Priebeh uvoľnenia tyrozínu pri hydrolyze kazeínu za prítomnosti trypsínu a proteínáz *B. linens*. Kazeín 1,0 g.l⁻¹, trypsin 0,005 mg.ml⁻¹, *B. linens* 0,2 mg.ml⁻¹.

Fig.6. Course of tyrosine release during hydrolysis of casein in the presence of trypsin and *B. linens* proteinases. Casein 1,0 g.L⁻¹, trypsin 0,05 mg.ml⁻¹, *B. linens* 0,2 mg.ml⁻¹.

1 - Released tyrosine, 2 - Time of hydrolysis.

Uvedené výsledky poskytujú informácie o povrchovom napätí niektorých roztokov proteínov. Predpokladáme, že v naznačenom smere výskumu roztokov proteínov bude účelné pokračovať.

Literatúra

1. MITCHELL, J. R.: Dev. Food Proteins, **4**, 1986, s. 291.
2. MAGDASSI, A. - STAVSKI, A. - BRAUN, S.: Tenside, **28**, 1991, s. 264.
3. DOMÍNGUEZ, J. J. G. - INFANTE, R. - ERRA, P. - JULIÁ, R.: Tenside, **18**, 1981, s. 6.
4. KITABAKE, N. - DOI, E.: J. Food Sci., **47**, 1982, s. 1218.

Do redakcie došlo 24.2.1994.

Surface active properties of solutions of some proteins

Summary

Within the scope of this work surface-active properties of aqueous solutions of proteins, α -casein and trypsin have been investigated, whereby significant impact of pH value on surface tension has been recorded. The lowest value of surface tension was observed at pH 6. Further on, changes in surface tension when applying hydrolysis of casein in the presence of trypsin and extracellular proteinases, which are generated through *Brevibacterium linens*, have been studied. Kinetics of changes in surface tension during hydrolysis for given enzymes was different. In the presence of trypsin (0.5 mg.l^{-1}), surface tension dropped down from 50.0 to 45.0 mN.m^{-1} in the process of hydrolysis.