

PRÍSPEVOK K POZNANIU VPLYVU NÍZKYCH TEPLÔT NA NIEKTORE PROTEINÁZY MÄSA

IMRICH STEIN, EVA PAVLÍKOVÄ

Z postvitálnych pochodov prebiehajúcich v živočíšnom tele po porážke zvierata je z hľadiska kulinárnej hodnoty mäsa najvýznamnejší proces odbúrania uhľohydrátov (glykolýza) a depolymerizácia bielkovín po určitý stupeň (autolýza). Na biochemických zmenách prebiehajúcich pri zrení mäsa zúčastňujú sa natívne enzýmy mäsa a kontaminujúcej mikroflóry.

Proces autolýzy smerujúci k úplnej dekompozícii svalových bielkovín, k znehodnoteniu organoleptických vlastností východiskovej látky sa spomaľuje schladením a prakticky zastavuje zmrazením mäsa. Napriek inhibícii enzymatických pochodov dochádza k mnohým zmenám, ktoré ovplyvňujú kvalitu mraziarenského výrobku. Na týchto zmenách v značnej miere participujú enzýmy. Preto sa vplyvu nízkych teplôt na enzymatické procesy venuje zvláštna pozornosť.

P r o t e i n á z y

Kyselina mliečna vznikajúca glykolýzou prebiehajúcou po relaxácii „rigoru mortis“ zvyšuje aciditu (pH) mäsa. Vytvára na určitý čas pre pôsobenie proteolytických enzýmov, ktorých optimum pôsobenia leží v rozmedzí pH 5—6 priaznivejšie podmienky ako pre fermenty, ktorých optimum pôsobenia leží v rozmedzí pH 1—2 (pepsíny), resp. 7—9 (trypsín, peptidázy). Preto v počiatočnom štádiu autolýzy má prevahu pôsobenia enzýmov živočíšneho a mikrobiálneho typu katepsínov, resp. papaináz.

Katepsíny sú intracelulárne endoproteinázy považované za najdôležitejšie enzýmy tkanivových buniek (1), zúčastňujúcich sa na syntéze a dekompozícii bielkovín; vytvárajú substrátovou špecifitou sa odlišujúcu sústavu peptidáz a proteináz (2), ktorá pozostáva: z katepsínu A (katepsín I), hydrolyzujúceho karbobenzoxyl-glutamyl-1-tyrozín (účinkom sa podobá pepsínu = homopepsín), z katepsínu B (katepsín II) hydrolyzujúceho benzoyl-1-argininamid, podobajúci sa účinkom trypsínu (homotrypsín), z katepsínu C, ktorý hydrolyzuje glycyl-1-fenylelaninamid, z katepsínu III, ktorý hydrolyzuje 1-leucinamid (leucinaminopeptidáza) a z katepsínu IV, ktorý katalyzuje hydrolýzu karbobenzoxyl-glycyl-1-fenylalaninu.

Niektoré papainázy boli pripravené v kryštalickej forme. Katepsíny sa doteraz nepodarilo vykryštalizovať.

Obidva typy enzýmov hydrolyzujú natívne bielkoviny (želatínu, hemoglobín, edestín, kazeín), optimálne blízko pH 5,0. Aktivujú sa sulfhydrylovými zlúčeninami, glutatiónom, inaktivujú sa kovovými soľami a možno ich sledovať neutralizáciou odštepených $-COOH$ skupín (3).

Materiál a metódy

Zmes živočíšnych a mikrobiálnych katepsínov sme pripravili z hovädzej sleziny, ktorú sme po príslušnej úprave (po odstránení tukovej vrstvy, premytí vodou, fyziologickým roztokom a po zomletí) 4 hodiny extrahovali kyselinou octovou okyseleným roztokom 87 %-ného glycerínu pri 37 °C a potom filtrovali (4).

Aktivitu enzýmov sme stanovovali v rôzne koncentrovaných roztokoch želatíny pri teplote 37 °C, za rôzny čas pri príslušnom pH a rovnakom obsahu glycerínu. Enzymatická aktivita takto pripraveného extraktu bola väčšia ako aktivita extraktu s roztokom regulátora, alebo ako hodnota extraktu z preparátov pripravených sušením s acetónom a éterom.

(Pre známu ťažkosť reprodukcie výsledkov sme pokusy viackrát opakovali a porovnali s výsledkami dosiahnutými u čerstvej sleziny. V tabuľkách uvádzame priemerné hodnoty.)

Uvoľnené $-COOH$ skupiny sme stanovili titráciou podľa Waldschmidta-Leitza (5), upravenou podľa Goldsteina (6); táto metóda bola pre naše účely najvhodnejšia. Ku 1 ml skúmaného roztoku sme pridali 2 kvapky 0,5 % alkoholického roztoku tymolftaleínu ako indikátora; titrovali sme alkoholickým roztokom 0,02 N-KOH, až kým sme dostali modré zafarbenie. Potom sme pridali 9 ml koncentrovaného etanolu tak, aby koncentrácia titrovaného roztoku bola 90 %. Po pridaní alkoholu sme odfarbenú kvapalinu dotitrovali do svetlomodrej farby. Titrovali sme paralelne dve vzorky. Pri pokusoch blízkych izoelektrickému bodu želatíny sme zrazeninu odstránili centrifugovaním a na titráciu sme použili supernatantnú kvapalinu.

Skúšaný materiál zabalený do celofánového vrecúška sme zmrazovali v chladničke, v mraziarenskom pulte (pomalé zmrazovanie) alebo v termoskách s chladiacou zmesou (pevný CO_2 + metanól) na teploty +4,0, -1, -8, -18 a -30 °C. Pomalé rozmrazovanie sme robili ponechaním vzorky pri laboratórnej teplote, rýchle rozmrazenie sme dosiahli rozpustením odváženého množstva zmrazenej hmoty v roztoku regulátora vytemperovaného na 37 °C.

Pri sledovaní vplyvu proteolýzy v závislosti od času prejavovali sa nepravdivé výsledky, zapríčinené sprievodnými látkami extraktu, ktoré ovplyvnili

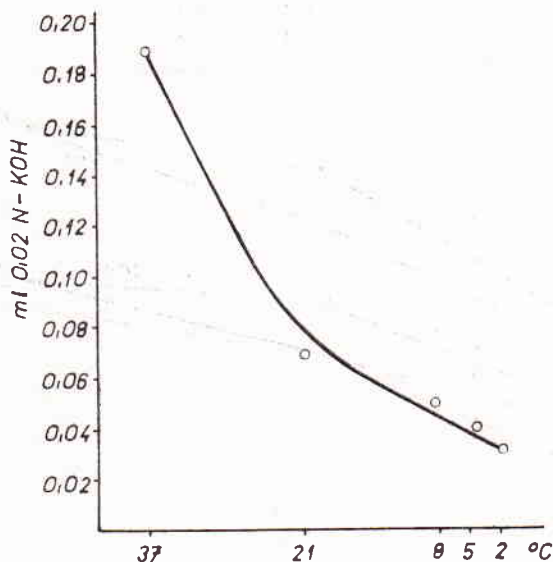
indukčný čas reakcie. Preto aktivitu enzýmov vyjadrujeme množstvom alkoholického roztoku 0,02 N-KOH, obyčajne po 24 hod. pôsobení, spotrebovaného na neutralizáciu $-\text{COOH}$ skupín uvoľnených po odčítaní korekčných hodnôt.

V ý s l e d k y

Zmeny, ktoré nastali v aktivite katepsínov nízkymi teplotami, sledovali sme nepriamo t. j. až po defrostácii. Výsledky sú preto značne ovplyvnené rýchlosťou rozmrazovania. Preto závery z výsledkov poskytujú len približný obraz o dejoch, ktoré sa odohrávajú v svalových bunkách pri nízkych teplotách.

Vplyv teploty reakčného prostredia na aktivitu

Znižovaním teploty reakčného prostredia sa aktivita enzýmov znižuje. Počiatočný prudký pokles sa po dosiahnutí určitého stupňa spomaľuje a potom postupuje ako hyperbola približujúca sa asymptote. Aktivita enzýmov sa nezasta-



T a b u l k a 1

t °C	aktivita ml KOH
37	0,19
21	0,07
8	0,05
5	0,04
2	0,03

Obr. 1. Vplyv teploty substrátu na aktivitu katepsínu

vuje ani pri teplote -191°C (7). Nízke teploty znižujú len rýchlosť pôsobenia enzýmov. Inhibícia je reverzibilná a je zapríčinená fyzikálnou zmenou reakčného prostredia a znížením rozpustnosti enzýmov (obr. 1).

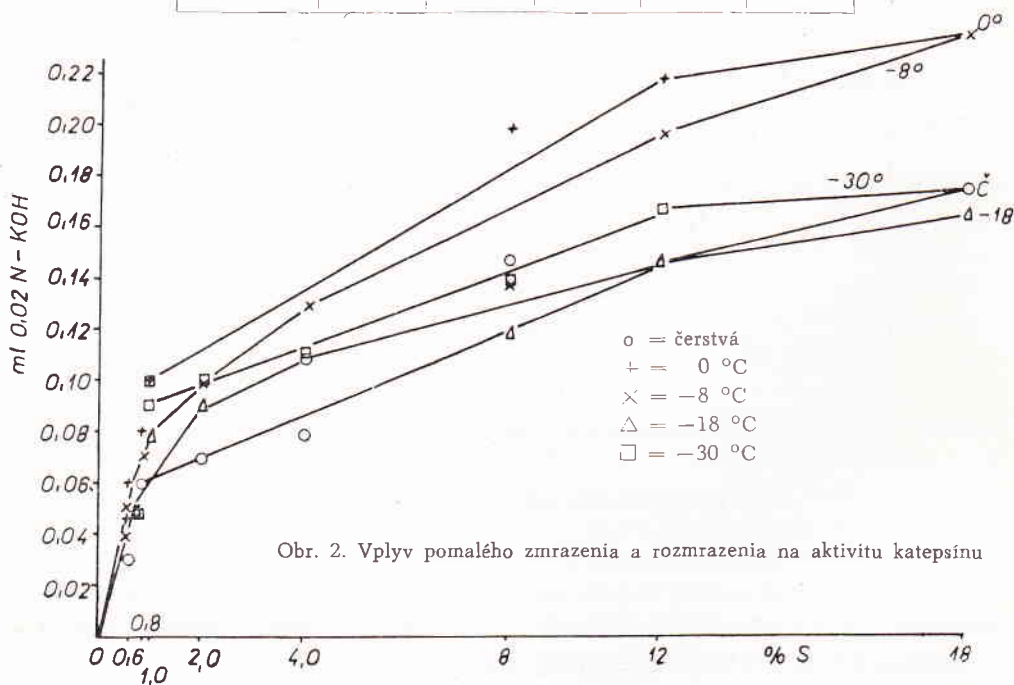
Vplyv rýchlosti zmrazenia a defrostácie na aktivitu

Aktivitu v značnej miere ovplyvňuje rýchlosť, ktorou sa v bunkách dosahuje inhibujúca teplota a rýchlosť, ktorou sa dosahuje pôvodná teplota.

Extrakt pripravený z pomaly (30 hod.) zmrazených a z pomaly rozmrazených (24 hod.) vzoriek boli o 20–50% aktívnejšie (pri pH:4,5, t° :37 $^{\circ}$ a t = 24 hod.) ako extrakt z nezmrazených vzoriek.

Tabuľka 2

Koncentrácia substrátu %	Extrakt zo sleziny				
	čerstvý	0 $^{\circ}$ C	-8 $^{\circ}$ C	-18 $^{\circ}$ C	-30 $^{\circ}$ C
	ml 0,02 N-KOH				
0,6	0,03	0,06	0,04	0,05	0,05
0,8	0,06	0,08	0,07	0,05	0,05
1,0	0,07	0,10	0,08	0,08	0,09
2,0	0,07	0,10	0,10	0,09	0,10
4,0	0,08	0,13	0,13	0,11	0,11
8,0	0,15	0,20	0,14	0,12	0,14
12,0	0,15	0,22	0,20	0,15	0,17
18,0	0,18	0,23	0,23	0,17	0,18
24,0	0,20	0,23	0,24	0,18	0,20



Obr. 2. Vplyv pomalého zmrazenia a rozmrazenia na aktivitu katepsínu

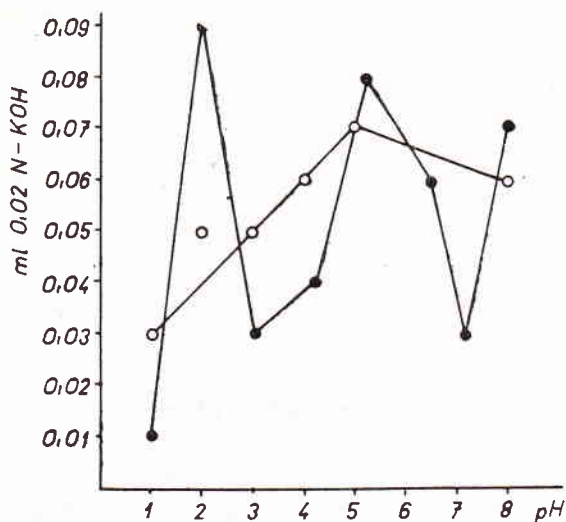
Zvýšenie aktivity katepsínov závisí od rýchlosti zmrazovania a rozmrazovania a od momentu nízko-teplotného zásahu (obr. 2).

Extrakty rýchlorozmrazené (60 min.) alebo zmrazované za krátky čas, uskladňované (4 dni) v zmrazenom stave a rýchlo rozmrazené (3 min.) mali nižšiu aktivitu ako extrakt pripravený z nezmrazenej vzorky a výluh pripravený zo sleziny skladovanej pri 0 °C, pri optimálnom pH, v 8 % roztoku želatíny pri 37 °C a za 24 hodín.

Tabuľka 3

Vzorka	pH			
	2	4	6	8
	ml 0,02 N-KOH			
čerstvá	0,01	0,15	0,11	0,03
schladená na 0 °C	0,02	0,23	0,12	0,05
zmraz. na - 8 °C	0,02	0,12	0,04	0,03
zmraz. na - 18 °C	0,02	0,14	0,09	0,04
zmraz. na - 30 °C	0,01	0,03	0,02	0,02

Keď sa autolýza, ktorá prebieha pri defrostácii, obmedzí na krátky čas, aktivita enzýmov zmrazených vzoriek sa nezvyšuje (obr. 3).



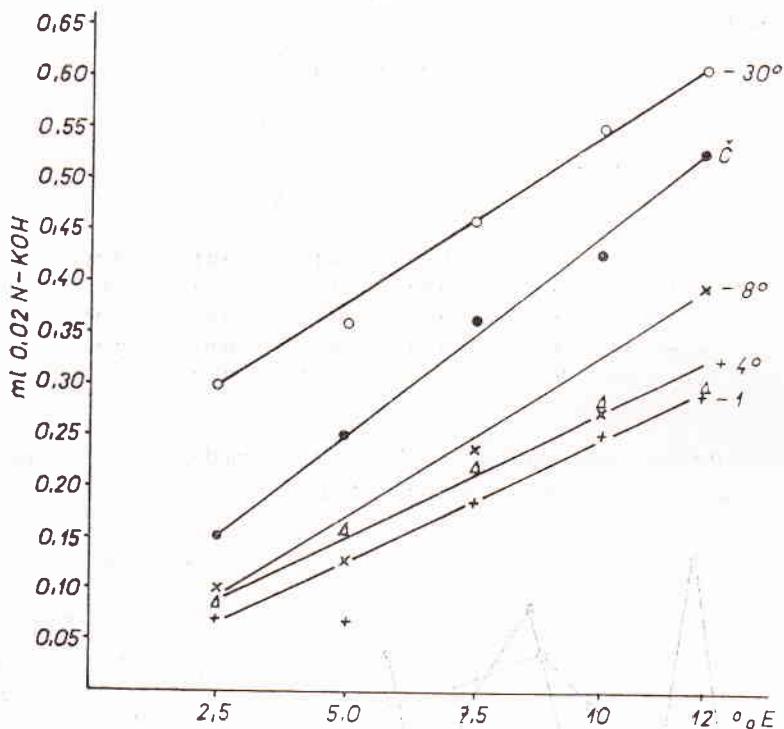
Obr. 3. Vplyv pomalého zmrazenia na aktivitu

Tabuľka 4

pH	Slezina	
	čerstvá	zmrazená
	ml 0,02 N-KOH	
1,55	0,03	0,01
2,17	0,05	0,09
3,1	0,05	0,03
4,2	0,06	0,04
5,1	0,07	0,08
6,1	0,07	0,06
7,2	0,06	0,03
8,4	0,06	0,07

Pomalým zmrazovaním (72 hodín) na -30 °C a pomalým rozmrazovaním (72 hodín) sa porušila harmónia účinku enzýmov tvoriacich sústavu katepsínov.

Kým aktivita enzýmov extrahovaných z nezmrazenej sleziny s klesajúcou pH až po optimum, stúpa, možno v pôsobení extraktov zo zmrazeného preparátu pozorovať 3 charakteristické optimá, a to v zóne s pH 1,5–2,5 (homopepsín), v zóne s pH 4–6 (katepsíny) a v zóne s pH 7–8 (homotrypsín, peptidázy) v 8 % substráte pri 37 °C a za 24 hodín (obr. 4).



Obr. 4. Vplyv koncentrácie enzýmu

Kinetika proteolýzy

Vplyv koncentrácie enzýmu na aktivitu

Keď stúpa koncentrácia enzýmov, zväčšuje sa množstvo —COOH skupín uvoľnených z 8 % želatíny pri pH 4,6, t °: 37 °C a t = 24 hodín a stúpa množstvo ľahu spotrebovaného na neutralizáciu.

Priebeh hydrolýzy je takmer priamo úmerný množstvu enzýmov bez ohľadu na ovplyvnenie východiskového materiálu. Čím viac enzýmov sa uvoľňuje pri rozmrazení, tým rýchlejšie prebehne proteolýza, tým rýchlejšie sa kazi mäso

Tabuľka 5

ml enzýmov	Slezina zmrazená			schladená	
	čerstvá	-30 °C	-8 °C	-1 °C	+4 °C
	ml 0,02 N-KOH				
2,5	0,15	0,30	0,10	0,07	0,08
5,0	0,25	0,36	0,13	0,7	0,16
7,5	0,37	0,46	0,24	0,19	0,23
10,0	0,43	0,55	0,27	0,25	0,28
12,0	0,53	0,61	0,40	0,28	0,30

Vplyv koncentrácie substrátu na aktivitu

Keď sa zvyšuje koncentrácia substrátu, zvyšuje sa aj aktivita katepsínov bez ohľadu na spôsob ovplyvnenia východiskového materiálu. Krivka znázorňujúca priebeh proteolýzy pri pH: 5,0, t °C: 37 °C, t: 24 hod. v rôzne koncentrovanom substráte má tvar paraboly (pozri aj tab. 2).

Tabuľka 6

Substrát $\frac{\text{g}}{10}$	Slezina			
	čerstvá	schladená + 4 °C – 1 °C		zmrazená – 8 °C
		ml 0,02 N-KOH		
2	0,02	0,03	0,01	0,03
4	0,04	0,07	0,02	0,04
8	0,07	0,08	0,05	0,06
12	0,09	0,09	0,06	0,08

Tabuľka 7

	pH			
	2	4	6	8
	ml 0,02 N-KOH			
čerstvá	0,01	1,0	0,76	0,33
schladená na 0 °C	0,24	—	0,28	0,0
zmrazená na -8 °C	0,16	0,28	0,81	0,33
zmrazená na -18 °C	0,24	0,95	0,62	0,33
zmrazená na -30 °C	0,0	0,24	0,28	—

Aktivitná pH krivka enzymatického obsahu extraktov pripravených z rôzne ovplyvneného materiálu nepoukazuje na zmeny, ktoré by vznikli v mechanizme pôsobenia katepsínov (8 % želatiny t °C — 37 °C, t: 24 hod.).

Sírovodík aktivoval enzymatický obsah extraktov zo zmrazených a nezmrazených vzoriek rovnakou intenzitou.

S ú h r n

Zrenie mäsa je prakticky výsledkom pôsobenia fermentov mäsa a enzýmov kontaminujúcej mikroflóry. Najmä aktívne pôsobia proteolytické fermenty typu katepsínov v tom čase, keď už enzýmy katalyzujúce odbúranie uhľohydrátov prestávajú pôsobiť. Kyselina mliečna, vznikajúca pri glykolýze, vyvoláva vo fyzi-kálno-chemických faktoroch prostredia rad dôležitých zmien, najmä vytvára priaz-nivé prostredie pre pôsobenie kateptických enzýmov.

Katepsíny sa nízkou teplotou reverzibilne inaktivujú. Inhibícia nastáva v dô-sledku zmeny koncentrácie reakčného prostredia vymrznutím vody, zhľukovaním vysokomolekulárnych zlúčenín na zložité symplexy, pričom z rozpustných lyo-katepsínov vznikajú nerozpustné dezmoenzýmy. Defrostáciou sa katepsíny reakti-vujú premenou dezmoenzýmov v lyoenzýmy. Aktivita reaktivovaných enzýmov v značnej miere závisí od rýchlosti zmrazovania a rozmrazovania.

Spôsob zmrazovania a rozmrazovania vplýva na aktivitu enzýmov a môže byť dôležitým činiteľom inhibície enzymatických procesov pri konzervácii zmrazo-vaním.

L i t e r a t ú r a

1. Ries E., Gersch M., Biologie d. Zelle, Leipzig, 1953.
2. Fruton S. S., Irrwing G. W., Bergmann M. jr., J. biol. Chem., 141, 763 (1941)
3. Stein I., Chémia a technológia enzýmov, Bratislava, 1956.
4. Wadschmidt-Leitz E., Deutsch W., Z. für physiolog. Chem. 167, 285 (1927).
5. Wadschmidt-Leitz E., Bek J. J., Blum E., Z. f. physiolog. Chem. 188, 17 (1930)
6. Goldstein B., Enzymológia, 1, 256 (1941).
7. Joslyn M. A., Adv. Enzym, 9, 613 (1949).

ZUR FRAGE DES EINFLUSSES DER TIEFTEMPERATUREN AUF DIE FLEISCHREIFUNG

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Fleischreifung ist das Ergebnis der Wirkung der fleischeigener Enzyme und der Fermente der kontaminierenden Mikroflora.

An der, nach Abklingen der Glykolyse verlaufenden Proteolyse sind hauptsächlich die kateptischen Proteasen beteiligt. Durch die Glykolyse gebildeten Milchsäure werden eine Reihe

von Änderungen in der Zusammensetzung der Fleischproteine verursacht und es werden günstige Bedingungen für die Wirkung der kateptischen Enzyme geschaffen.

Durch Tieftemperaturen werden die Katepsine reversibel inaktiviert. Die Enzyminhibition ist die Folge durch das Ausfrieren vom Wasser veränderten Zusammensetzung des Reaktionsmilieus, ferner der Aggregation der Hochmolekularen Verbindungen zu komplizierten Symplexe und der Veränderung der löslichen Lyo-enzyme in die unlösliche Desmoenzyme. Beim Auftauen werden die Katepsine reaktiviert durch den Übergang der Desmoenzyme in Lyo-fermente. Die Aktivität der reaktivierten Enzyme ist abhängig von der Geschwindigkeit des Gefrierens und des Auftauens.

Die Art des angewandten Gefrierprozesses und des Auftauens beeinflusst die Aktivität der Enzyme und kann ein wichtiger Faktor bei der Inhibierung der Fermentwirkung bei der Gefrierkonservierung sein.