

## VPLYV NÍZKYCH TEPLÔT NA KATEPSÍNY MÄSA POST MORTEM

I. STEIN, F. KLEMPOVÄ, E. MORÄROVÄ

Enzýmy sú na teplotu veľmi citlivé. Teploty nad biokinetickým optimom inhibujú pôsobenie, vyššie teploty inaktivujú fermenty. Teploty pod biokinetickým optimom znižujú rýchlosť priebehu reakcií katalyzovaných enzýmami. Nízkymi a ultranízkymi teplotami sa enzýmy reverzibilne inaktivujú. Hranica, pri ktorej sa činnosť enzýmov úplne zastaví, nie je zatiaľ známa.

Veľká citlivosť enzýmov voči vyšším a nízkym teplotám sa využíva v priemysle a v domácnostiach na spomalenie postvitálnych zmien (autolýza) mäsa, na ktorých sa veľkou mierou zúčastňujú intracelulárne proteínázy — katepsíny.

V tejto súvislosti sme študovali vplyv nízkych teplôt na aktivitu katepsínov mäsa.

## Materiál a metódy

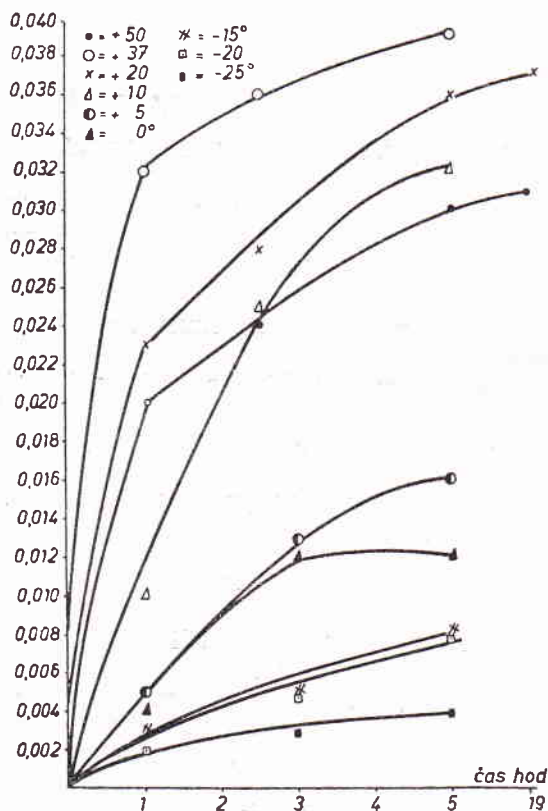
Surové roztoky katepsínov sme pripravili zo svalov *Musculus psoas minor*, *Musculus longissimus dorsi* a *Musculus semitendinosus* (bravčových a hovädzích), ktoré sa po zabíí vyoperovali na bitúнку zo zvieracieho tela. Po príslušnej úprave (odstránení tukovej vrstvy a šliach, po premytí vodou, fyziologickým roztokom a zomletí) extrahovali sme 4 hodiny pri 37 °C 87 % roztokom glycerínu okysleného kyselinou octovou na 0,15 % (pH 3,5) a filtrovali v chladničke (1).

Na sledovanie proteolýzy sme použili 0,5 % roztok práškoveho hemoglobínu pripraveného rozpustením v pufrí o pH 3,5.

2,5 ml 0,5 % roztoku hemoglobínu + 1,25 ml 87 % roztoku glycerínu (pH 3,5) vytemperovaných na príslušné teploty sme zmiešali s 1,25 ml vytemperovaného enzymatického extraktu. Roztoky sme nechali príslušnú dobu inkubovať pri optimálnom pH katepsínov v termostate, resp. chladničke.

Priebeh proteolýzy sme sledovali kolorimetrickým stanovením produktov proteolýzy, ktoré sa nevyzrážajú kyselinou trichlóroctovou, a to tryptofánu a tyrozínu (2) takto: po uplynutí príslušnej inkubačnej doby sme pridali k 5 ml vzorky 10 ml 0,3 N-kyseliny trichlóroctovej (5%-ný roztok) a po 5 min. sfiltrovali. K 5 ml filtrátu sme pridali 10 ml 0,5 N roztoku NaOH a 3 ml fenolového činidla podľa Folina a Ciocalteu a (3) zriedeného v pomere 1:2. Po desať minútovom stáí sme zmerali extinkciu modrého zafarbenia na Zeissovom spektrografe. Me-

ranie sme previedli pri vlnovej dĺžke 700 m $\mu$ . Aktivitu udávame absorpciou v % proti absorpcii slepého pokusu.



Obr. 1. Priebeh proteolýzy v závislosti od času a teploty.

## Výsledky

Priebeh proteolýzy katalyzovanej sústavou katepsínov sleduje chod monomolekulárnej reakcie v závislosti od času, a to v rozmedzí teplôt +50 až -35 °C (obr. 1, tab. 1).

Mechanizmus dekompozície bielkovín sa teplotou neporuší, multienzymatická sústava katepsínov sa vplyvom teploty – na rozdiel od vplyvu pH – nerozčleňuje (4, 5), a to bez ohľadu na svalstvo, z ktorého bol extrakt pripravený.

Teplota nad biokinetickým maximom a pod ním spomaľuje rýchlosť proteolýzy. Hodnota koeficientu reakčnej rýchlosti

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$$

(kde  $a = 1$ ,  $x$  = rozdiel v % absorpcie,  $t$  = čas v hodinách) sa klesajúcou teplotou znižuje (tab. 2). Obr. 2.

Grafickým znázornením vzťahu logaritmu reakčnej rýchlosti  $k$  k recipročnej hodnote teploty  $1/T$  podľa empirickej Arrheniovej rovnice

$$\ln k = -\frac{E}{R} \left[ \frac{1}{T} \right] + \text{konšt.}$$

( $E$  = aktivačná energia v cal/mol,  $R$  = plynová konštanta,  $T$  = absolútna teplota a  $k$  = koeficient reakčnej rýchlosti) získali sme miesto priamky krivku (obr. 3, tab. 3).

Tabuľka 1

Pribeh proteolýzy v závislosti od času a teploty, % absorpcie				
Teplota v °C	Čas v hodinách			
	1	3	5	19
50	20	24	30	31
37	32	36	39	42
20	23	28	36*	38
10	10	25	32	37
5	5	13	16	30
0	4	12	12	28
-15	3*	5	8	21
-20	2	5	8	17
-25	2	3	4	12

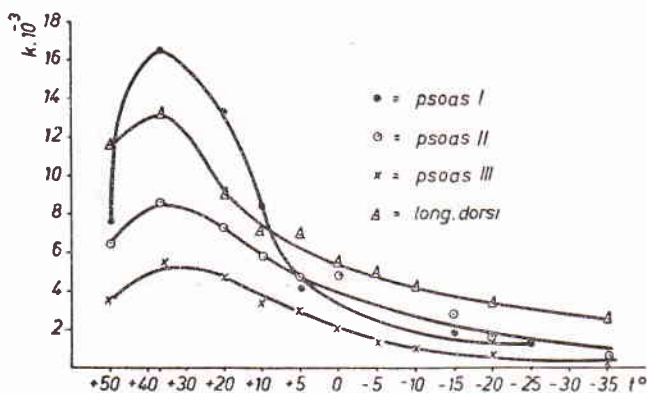
\* Interpoláciou.

Tabuľka 2

t °C	k 10 <sup>-3</sup>			
	M. <i>psaos minor</i>			M. <i>longissimus dorsi</i>
	I	II	III	
+50	7,65	6,4	3,73	11,48
+37	16,23	8,61	5,36	13,38
+20	13,36	7,15	4,59	9,03
+10	8,33	5,78	3,53	7,0
+5	4,20	4,89	2,87	6,95
0	3,49	4,76	2,16	5,54
-5	—	—	1,49	5,03
-10	—	—	1,03	4,22
-15	2,08	2,90	—	—
-25	1,26	—	—	—
-30	—	—	—	—
-35	—	0,88	0,41	2,71

Tabuľka 3. Vzťah medzi  $\log k \cdot 10^{-3}$  a  $1/T$

°C	T	1/T	Log k. 10 <sup>-3</sup>			M. long d.
			Musculus psoas			
			I	II	III	
50	323	0,00309	0,88366	0,80618	0,57054	1,05994
37	310	0,00322	1,21032	0,93500	0,72916	1,12646
20	297	0,00341	1,12531	0,85431	0,66181	0,95569
10	283	0,00353	0,92065	0,76193	0,54777	0,84510
5	278	0,00365	0,54283	0,67761	0,33445	0,74351
— 5	268	—	—	—	0,17319	0,70157
—10	263	—	—	—	0,01284	0,62531
—15	258	0,00387	0,31806	0,46240	—	—
—20	253	0,00395	0,22272	0,10721	0,00799	0,53403
—25	248	0,00403	0,10037	—	0,00628	—
—30	—	—	—	—	—	—
—35	238	—	—	0,09448	—	0,43297



Obr. 2. Vzťah medzi  $k \cdot 10^{-3}$  a teplotou.

Priebeh krivky znázorňujúcej vzťah medzi  $\log k$  a  $1/T$  v rozmedzí +37 až -25 °C nevykazuje charakteristický zlom (6), z ktorého by sa dalo usudzovať na štrukturálnu zmenu multienzymatickej sústavy katepsínov. Plynulé zakrivenie kriviek v pozorovanom teplotnom rozmedzí nájdeme aj u iných enzýmov napr. Kristiakovsky a Lumry pri hydrolýze močoviny ureázou (7) alebo Meier, Tappela a Volman (8) na fosfatáze a peroxydáze naznačuje, že nedošlo k rozloženiu komplexnej molekuly katepsínov (obr. 3).

Priebeh jednotlivých kriviek — hoci enzymatický extrakt bol pripravený z rôznych, pôvodom sa líšiacich surovín — nevykazuje podstatné rozdiely.

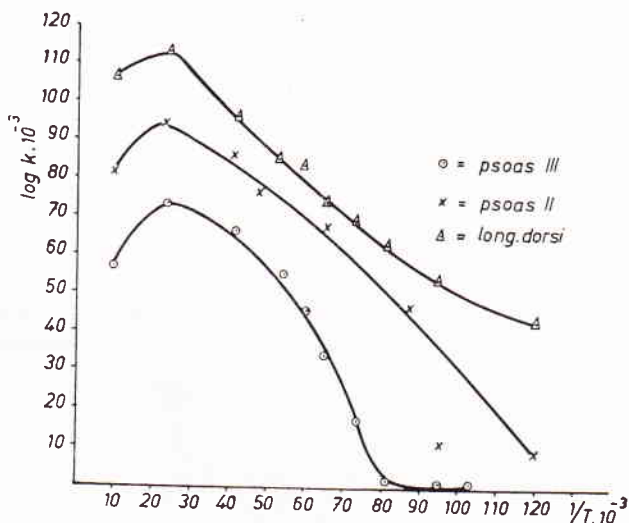
Aktivačnú energiu reakcií sme vypočítali pomocou rovnice:

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{E}{R} \left[ \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right],$$

z ktorej

$$E = \frac{4.575 \cdot T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \cdot \log. \frac{k_2}{k_1}$$

( $R$  = plynová konštanta 1,985 cal/mol stupeň,  $E$  = aktivačná energia,  $k_2$  a  $k_1$  koeficienty reakčnej rýchlosti pri  $T_2$  a  $T_1$ ).



Obr. 3. Vzťah medzi  $\log k \cdot 10^{-3}$  a  $1/T \cdot 10^3$

Tabuľka 4. Hodnoty aktivačnej energie

t °C		M. psoas minor			M. longissimus dorsi
		I	II	III	
cal/mol					
priemer	50 — 37	23558	30589	29540	32697
	37 — 20	1950	1975	1637	1732
	20 — 10	7571	3400	4317	4164
	10 — 5	—	5035	6466	—
	5 — 0	5543	—	8316	6790
	0 — -37	5013	3470	5147	4228
	0 — -5	—	—	—	2805
	- 5 — -10	—	—	—	4891
	0 — -15	4715	4696	—	—
	-10 — -20	—	—	—	5468
	-15 — -20	7150	—	—	—
	-20 — -25	5729	—	—	—
priemer	-20 — -35	—	—	—	1833
	0 — -25	5865	—	—	5468

Aktivačná energia pre inaktiváciu katalytickej schopnosti katepsínov z rôznych svalov pri vyššej teplote je relatívne vysoká a leží v rozmedzí 24 000–33 000 cal/mol. Aktivačná energia, ktorá ubúda v sústave znížením teploty v rozmedzí +37 °C a –35 °C, je relatívne nízka. Hoci hodnoty aktivačnej energie enzymatickej sústavy teoreticky nie sú závislé od zmeny teploty, možno v našom prípade v rozpätí teploty +37 °C – 0 °C pozorovať mierne stúpanie hodnoty  $E$ . Zdá sa, že sú zapríčinené ovplyvnením rozpustnosti niektorých citlivejších neenzymatických bielkovín, sprevádzajúcich aktívnu komplexnú molekulu enzýmu. Aktivačná energia, ktorá ubúda sústave v rozpätí teplôt od 0 až po –35 °C, pohybuje sa v medziach 5000–7000 cal/mol.

Priemery hodnôt aktivačnej energie v rozmedzí teplôt nad nulou do biokinetického maxima a pod nulou nevykazujú väčšie rozdiely.

Teplotný koeficient  $Q_{10} = \frac{k_t + 10}{k_t}$  pohybuje sa v rámci hodnôt cha-

rakteristických pre enzymatické reakcie. Zmenou teploty sa pomerne málo mení.

Tabuľka 5

t°	<i>M. psoas minor</i>			<i>M. longissimus dorsi</i>
	I	II	III	
50 — 37	0,47	0,74	0,69	0,85
37 — 20	1,2	1,2	1,2	1,4
20 — 10	1,6	1,2	1,3	1,3
10 — 5	1,9	1,2	1,2	1,0
5 — 0	1,2	1,0	1,3	1,3
priemer	1,48	1,55	1,25	1,25
0 — — 5	—	—	1,4	1,1
— 5 — —10	—	—	1,4	1,1
—10 — —20	—	—	1,6	1,2
—15 — —20	—	—	—	—
—20 — —30	1,3	—	—	—
0 — —15	1,6	1,6	—	—
—20 — —35	—	1,4	1,5	1,2
priemer	1,37	1,5	1,47	1,15

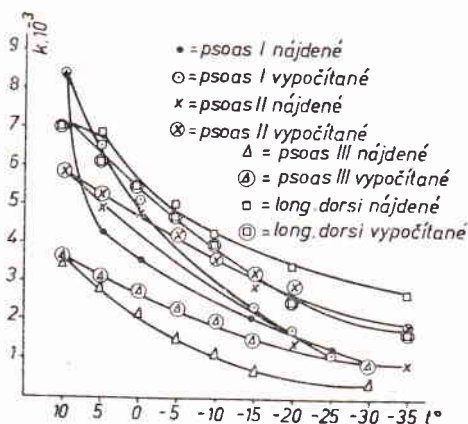
Arrheniovu rovnicu sme využili na predpoveď rýchlosti reakcie pri teplotách pod nulou a vypočítané rýchlosti sme porovnali s rýchlosťou zistenou experimentálne:

$$10g \frac{k_2}{k_1} = \frac{E (T_2 - T_1)}{\ln R \cdot T_1 \cdot T_2} = \frac{0,219 \cdot E (T_2 - T_1)}{T_1 T_2}$$

Za  $E$  sme dosadili aktivačnú energiu v cal/mol pre rozpätie teplôt +20 °C a 10 °C,  $k_2 \cdot 10^{-3}$  a  $k_1 \cdot 10^{-3}$  sú koeficienty monomolekulárnej reakcie pri teplotách  $T_2$  a  $T_1$  (tab. 2). Rozdiely medzi hodnotou koeficientu reakčnej rýchlosti  $k \cdot 10^{-3}$ , stanovenou experimentálne a vypočítanou z rovnice, udávame v % v pomere k hodnote  $k \cdot 10^{-3}$  nájdennej (+ = prevyšuje, – = menšie). Obr. 4. Tab. 6.

Tabuľka 6

<i>Musculus psoas minor</i>										<i>Musculus longissimus dorsi</i>		
I $E = 7,571 \text{ cal/mol}$				II $E = 3,400 \text{ cal/mol}$			III $E = 4,317 \text{ cal/mol}$			$E = 4,197 \text{ cal/mol}$		
to	n	v	roz.	n	v	roz.	n	v	roz.	n	v	roz.
10	8,3	8,4	—	5,78	5,82	—	3,53	3,52	—	7,00	6,99	—
5	4,2	6,6	+57	4,89	5,21	+6	2,87	3,07	+7	6,95	6,11	—12
0	3,89	3,1	+46	4,76	4,69	—2	2,16	2,66	+23	5,54	5,3	—5
—5	—	—	—	—	4,15	—	1,49	2,28	+52	5,03	4,60	—9
—10	—	—	—	—	3,58	—	1,03	1,58	+82	4,22	3,96	—6
+5	2,08	2,28	+9	2,80	3,23	+1	0,63	0,41	+230	—	—	—
—20	1,67	1,70	+2	1,28	2,83	+120	—	—	—	3,42	2,99	—13
—25	1,26	1,06	—16	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—30	—	—	—	—	—	—	0,41	0,82	+100	—	—	—
—35	—	—	—	0,88	0,85	+100	—	—	—	2,70	0,70	—37

Obr. 4.  $k$  nájdené a  $k$  vypočítané podľa Arrhenia.

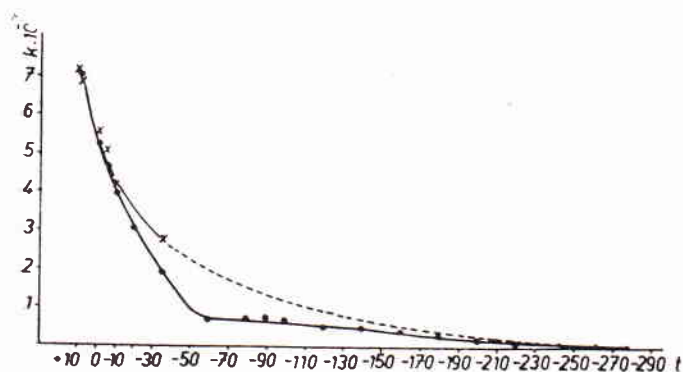
Dekompozícia bielkovín multienzymatickou sústavou katepsínov mäsa sleduje chod krivky, ktorú možno vyjadriť Arrhenovou rovnicou. Na termodynamickú formuláciu priebehu proteolýzy katepsínmi možno teda použiť túto rovnicu. Rozdiely medzi hodnotami  $k \cdot 10^{-3}$  nájdenými a vypočítanými vyplývajú z toho, že priebeh proteolýzy nesleduje presne chod monomolekulárnej reakcie.

Arrheniovu rovnicu využili sme na vypočítanie aktivity intracelulárnych proteínáz zo svalu *M. longissimus dorsi* pri nízkych a ultranízkych teplotách (tab. 7. obr. 5).

Tabuľka 7

Aktivita katepsínov *M. longissimus dorsi* pri nízkych a ultranízkych teplotách

$t^{\circ}$	$E = 4196,6$	$k_2 \cdot 10^{-3} = 9,03$
	$k_2 \cdot 10^{-3}$ nájdené	$k_1 \cdot 10^{-3}$ vypočítané
10	7,01	6,99
5	6,95	6,11
0	5,54	5,30
— 5	5,03	4,60
— 10	4,22	3,96
— 20	3,42	2,99
— 35	2,70	1,70
— 50	—	0,93
— 60	—	0,66
— 70	—	0,65
— 80	—	0,62
— 90	—	0,58
— 100	—	0,54
— 120	—	0,45
— 140	—	0,36
— 160	—	0,28
— 180	—	0,19
— 200	—	0,102
— 220	—	0,064
— 240	—	0,050
— 260	—	0,059
— 272	—	0,001096
— 273	—	0,001090



Obr. 5. Aktivita katepsínov *M. longissimus dorsi* pri nízkych a ultranízkych teplotách

Lom krivky pozorovateľný pri teplote okolo  $-60^{\circ}\text{C}$  naznačuje zmenu v štruktúre molekuly, ktorá nastala premenou vody voľnej i viazanej zo skupenstva kvapalného do tuhého. V ďalšom priebehu sa vplyv teploty na aktivitu enzýmov podstatne znižuje.



Proteolytická aktivita bezbunečného extraktu multienzymatickej sústavy katepsínov hovädzieho a bravčového mäsa sa znižovaním teploty reakčného prostredia znižuje. Hodnota koeficientu reakčnej rýchlosti  $k$  klesá. Mechanizmus priebehu proteolýzy sa teplotou nemení. Charakter reakcie ostáva v rozpätí skúšaných teplôt približne monomolekulárny.

Vplyvom teploty nedošlo teda k hlbším zmenám v štruktúrnej stavbe komplexnej molekuly katepsínov a inhibíciu aktivity nemožno vysvetľovať porušením štruktúry komplexu aktívnej molekuly. Zdá sa, že teplotou sa rovnomerne znižuje aktivita všetkých enzýmov multienzymatickej sústavy. Naproti tomu zmenou pH prostredia rozpadá sa multienzymatická sústava a v závislosti od pH stúpa aktivita jednotlivých komponentov sústavy (pepsín, trypsin, katepsín a peptidázy) (4). Funkcia aktivátorov a inhibítorov sprevádzajúcich molekulu aktívneho komplexu sa teplotou taktiež nezmenila, keďže monomolekulárny priebeh proteolýzy sa teplotou nezmenil.

Hoci grafické vyjadrovanie vzťahu  $\log k$  a  $1/T$  nedáva očakávanú priamku, ale mierne zakrivenú krivku, aká sa našla aj u iných enzýmov, empirická Arrheniova rovnica pomerne dobre vystihuje priebeh dekompozície substrátu katepsínov aj pri teplotách pod  $0^\circ\text{C}$ .

Intracelulárne proteínázy teoreticky nestrácajú svoju aktivitu ani pri absolútnom bode mrazu. Hlboké a ultrahlboké teploty nezničia enzýmy, len retardujú ich pôsobenie.

Už staršie výskumy (1) ukázali, že enzýmy vzdorujú hlbokým teplotám. Rozmrazením sa reaktivujú. Lipáza zachovala svoju aktivitu po 7 a polročnom prechovávaní pri  $-9,4^\circ$  až  $-12^\circ\text{C}$ . Podobne pepsín, trypsin a kľag vydržali teplotu  $-191^\circ\text{C}$  bez straty aktivity trombá zmrazený na  $-180^\circ\text{C}$  po 13 mesiacoch bol po roztopení plne aktívny. Bunky vydržia teplotu  $-230^\circ\text{C}$  bez umŕtvenia (11). Steppuhnovi a Utkin-Ljubovcovej sa podarilo reaktivovať katepsíny nájdené v tkanivách múmií a v svalstve mamutov z ľadovej doby (9).

Aktivačná energia potrebná na inaktiváciu katepsínov mierne stúpa s klesajúcou teplotou. Jej hodnota je podstatne menšia než hodnota  $E$ , potrebná na inaktiváciu katepsínov teplom. Zistením reakčných rýchlostí pri 2 rôznych teplotách možno vypočítať hodnotu aktivačnej energie  $E$ . Ak poznáme  $E$  a rýchlosť reakcie pri jednej teplote, možno predpovedať rýchlosť pri ktorejkoľvek inej teplote.

Relatívne malé rozdiely medzi hodnotami koeficientu reakčnej rýchlosti  $k$  nájdených pokusom a predpovedaných pomocou Arrheniovej rovnice vytvárajú možnosť lepšieho analytického sledovania intravitálnych pochodov v čerstvom a pri rôznych teplotách zmrazenom a rôznu dobu skladovanom mäse, keď bude známa súvislosť medzi kateptickou aktivitou, skladovateľnosťou a kvalitou mäsa. Zatiaľ je len málo údajov o závislosti kvality mäsa od jeho enzymatickej aktivity (proteolytickej vitality).

Výpočet aktivity katepsínov pri hlbokých a ultrahlbokých teplotách

potvrďzuje známu skutočnosť, že ani nízke ani ultrahlboké teploty, resp. vznik ľadu nezničia enzýmy, len retardujú ich pôsobenie.

Krivka inhibície má pri  $-60^{\circ}\text{C}$  ostrý záhyb, lom a pokračuje potom miernym spádom, asymptoticky. Vplyv na aktivitu katepsínov sa podstatne zmenší. Nazdávame sa, že pri konzervovaní mäsa mrazením nie je ekonomické znížiť teplotu pod  $-60^{\circ}\text{C}$ , pretože vplyv teploty na aktivitu enzýmov je veľmi malý. Znižovanie aktivity katepsínov teplotou dokazuje, že čím nižšia je teplota zmrazenia (až po  $-60^{\circ}\text{C}$ ), tým pomalšie prebiehajú v mäse intravitálne enzymatické procesy a tým je pravdepodobnosť predĺženia doby skladovania mäsa bez ujmy na kvalite väčšia.

## S ú h r n

Kinetika priebehu proteolýzy v rozpätí teplôt  $+50$  až  $-35^{\circ}\text{C}$  sa nemení. Multienzymatická sústava katepsínov mäsa sa hlbokými teplotami nerozkladá.

Na termodynamickú formuláciu proteolýzy intracelulárnymi proteínázami možno použiť empirickú Arrheniovu rovnicu, ktorá opisuje vzťah medzi teplotou a aktivitou enzýmov.

Stanovením reakčnej rýchlosti proteolýzy pri dvoch rôznych teplotách možno vypočítať hodnotu aktivačnej energie  $E$ . Pri znalosti  $E$  a koeficientu rýchlosti proteolýzy pri jednej teplote možno predpovedať aktivitu katepsínov pri ktorejkoľvek inej teplote. Metóda umožňuje sledovať kateptickú aktivitu čerstvého a zmrazeného mäsa počas krátkodobého a dlhodobého skladovania.

## EINFLUSS TIEFER TEMPERATUREN AUF DIE FLEISCHKATEPSINE POST MORTEM

Die Kinetik der durch die Fleischkatepsine katalysierten Proteolyse im Bereich der Temperatur  $+50^{\circ}\text{C}$  bis  $-25^{\circ}\text{C}$  ändert sich nicht. Das multienzymatische System der Fleischkatepsine wird durch tiefe Temperaturen in Einzelkomponenten nicht zerlegt.

Für die thermodynamische Formulierung der Proteolyse durch die intrazellulären Proteinasen kann die von Arrhenius aufgestellte empirische Gleichung für das Verhältniss der Temperatur und Reaktionsgeschwindigkeit verwendet werden.

Durch Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Proteolyse bei zwei verschiedenen Temperaturen kann die Aktivierungsenergie der Reaktion  $E$  ermittelt werden. Aus  $E$  und  $k$  der Proteolyse bei einer Temperatur kann die Aktivität der Katepsine bei willkürlichen Temperaturen berechnet werden.

Die Methode ermöglicht die Verfolgung der Aktivität der Katepsine (proteolytische Vitalität) von frischem und durch Gefrieren konservierten Fleisch während der kurzen oder langfristigen Lagerung.

## Literatúra

1. E. Waldschmidt, E. Leitz, Z. physiol. Chem. 208, 258 (1932).
2. M. L. Anson, J. Gen. Physiol. 22, 79 (1939).
3. O. Folin, V. Ciocalteu, J. biol. Chem. 73, 627 (1927).
4. I. Stein, E. Pavliková, Bulletin Výsk ústavu mraziarskeho 1, 21 (1962).
5. S. Buchs, Enzymologia 13, 208 (1949).
6. J. W. Sizer, Adv. Enzymol. 3, 35 (1943).
7. G. B. Kistiakowski, R. Lumry, J. Am. chem. Soc. 71, 2006 (1949).
8. V. P. Maier, A. L. Tappel, D. N. Volman, J. Am. chem. Soc. 72, 1278 (1954).
9. O. Stepphun, X. Utkin—Ljubovcovová, Bio. Z. 226, 237 (1930).
10. F. F. Nord, Ergebn. Enzforsch. 2, 23 (1933).
11. B. S. Luych, Biodynamica 29, 1937.