

## Enzymová hydrolýza proteínov

JAROSLAV ZEMANOVIČ—JARMILA SILLOVÁ—DAGMAR ŠTOLFOVÁ

Súhrn. Urobila sa enzymová hydrolýza kazeínu, kukuričného gluténu, sójového izolátu, proteínov srvátky za prítomnosti proteináz trypsinu a Alcalase v pH-state pri 50 °C a pH 8,0. Pri hydrolýze kazeínu sa menil pomer uvoľneného tyrozinu k celkovým uvoľneným aminokyselinám v závislosti od pH a času hydrolýzy. Pri vyššom pH štiepenie peptidových väzieb prebiehalo prednostne za vzniku peptidov a s nižšou tvorbou voľných aminokyselín. Z rôznych substrátov sa najrýchlejšie hydrolyzovali proteíny srvátky. V rôznych hydrolyzátoch mali dominantné zastúpenie histidín, tyrozin + fenylalanín a leucín.

### Teoretická časť

Hoci proteinázy patria medzi enzýmy, ktoré sú vyrábané v najväčšom meradle, v potravinárskom priemysle sa zatiaľ používajú iba málo.

Enzymová hydrolýza rôznych proteínov pozostáva z hydrolýzy určitých peptidových väzieb, pričom vznikajú rôzne peptidy a voľné aminokyseliny. Tento proces sprevádzajú zmeny fyzikálnych, fyzikálno-chemických a iných funkčných vlastností príslušného proteínu. Prejavuje sa to v zmene viskozity roztoku, chuti, rozpustnosti a povrchovoaktívnych vlastností proteínu [15].

Prehľad všetkých aspektov enzymovej hydrolýzy proteínov zhrnul Adler-Nissen [1].

Najviac sa enzymová hydrolýza proteínov využíva pri výrobe mliečnych produktov, pričom sa predovšetkým hydrolyzuje kazeín. Kazeín nie je definovaný proteín, najväčší podiel tvorí  $\alpha_{s1}$ -  $\beta$ - a  $\kappa$ -kazeín. Tieto sa výrazne líšia primárnou a sekundárnou štruktúrou [14]. Na základe tejto skutočnosti je správnejšie skúmať enzymovú hydrolýzu týchto definovaných proteínov [2—5].

---

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

V uvedených prácach sa pri enzýmovej hydrolýze použili  $\alpha$ - a  $\beta$ -kazeín a enzýmy produkované kmeňmi *Lactobacillus helveticus* a *L. casei*, ako aj chymozín, trypsin a plazmín.  $\kappa$ -kazeín sa používa na štiepenie väzby Phe 105—Met 106 [6]. Svoje opodstatnenie má aj skúmanie faktorov ovplyvňujúcich hydrolýzu kazeínu [7, 9, 10], gluténu [8], proteínov repkového [9, 10] a sójového [10] semena.

Významnou zložkou enzýmového hydrolyzátu nie sú len voľné aminokyseliny, ale aj peptidy rôznej veľkosti. Na delenie týchto peptidov sa využíva HPLC [4, 5, 11, 12]. Z hľadiska mechanizmu hydrolýzy niektoré peptidy sú koncovými produktami reakcie. Svoj význam tu má aj stupeň fosforylácie proteínov. Na preparačné delenie peptidov z kazeinového hydrolyzátu sa využilo dvojstupňové delenie, pričom po gélovej filtrácii sa zaradila afinitná chromatografia s imobilizovaným kovom [13].

Neprijemnou stránkou enzýmovej hydrolýzy je vznik peptidov horkej chuti [16, 17]. Názory na veľkosť horkých peptidov sú rôzne, ale všeobecne sa usudzuje, že príčinou horkej chuti sú hydrofóbne aminokyseliny ako leucín, fenylalanín a prolín.

Nové možnosti pri realizácii enzýmovej hydrolýzy poskytuje membránová technológia a membránové reaktory. V priebehu reakcie sa odstraňuje vznikajúci produkt a celý proces možno realizovať ako kontinuálny [5, 18]. Veľkosť molekuly produktu možno regulovať veľkosťou pórov v membráne. V takomto systéme je stále tá istá proteináza až do jej inaktívácie, čo zvyšuje jej využitie.

Cieľom práce bolo hlbšie preskúmať parametre ovplyvňujúce enzýmovú hydrolýzu vybraných proteínov pri použití preparátov proteináz trypsin a Alcalase.

## Materiál a metódy

Na enzýmovú hydrolýzu sme použili zdroje proteínov uvedené v tab. 1, ktoré boli v práškovej forme. Čerstvý kukuričný glutén sme získali v Slovenských škrobárňach v Bolerázi. Pri navažovaní substrátov sme zohľadnili skutočný obsah proteínov.  $h_{\text{tot}}$  slúži na vypočítanie stupňa hydrolýzy ( $DH$ ) zo spotreby roztoku NaOH, potrebného na neutralizáciu odhydrolyzovaných karboxylových skupín. Ako proteinázy sme použili trypsin (Léčiva, Praha) a Alcalase (Novo Industri, Dánsko).

Roztoky substrátov sme pripravovali rozpúšťaním navážky v 5—10 ml 0,1 mol.l<sup>-1</sup> NaOH vo vriacom vodnom kúpeli počas 5 minút. Potom sme po zriedení vodou upravili pH na hodnotu 8,0 a doplnili vodou na požadovaný objem.

Postup pri hydrolýze: 20 ml roztoku substrátu, pH 8,0 sme v pH-state za miešania vytemperovali na 50 °C a pridali 5 ml roztoku proteináz. V príslušných časových intervaloch sme odoberali 1 ml vzorky a pridali 1 ml 0,1 mol.l<sup>-1</sup>

Tabuľka 1. Obsah proteínov v použitých substrátoch  
Table 1. Protein content in used substrates

Substrát <sup>1</sup>	$h_{\text{tot}}$ [mol . kg <sup>-1</sup> ]	Proteíny* <sup>2</sup>	Pôvod
Kazeín <sup>3</sup>	8,2	81,8	pripravený zrážaním v kyslom prostredí <sup>8</sup>
Sójový izolát <sup>4</sup>	7,8	88,3	Purina, Belgicko <sup>9</sup>
Kukuričný glutén <sup>5</sup>	9,2	42,0	Škrobárne, Boleráz
Proteíny srvátky <sup>6</sup>	8,8	40,2	laboratórne pripravené <sup>10</sup>

$h_{\text{tot}}$  — počet peptidových väzieb v proteíne v mol . kg<sup>-1</sup>; Number of peptide bonds in protein as mol kg<sup>-1</sup>.

\* — Kjeldahlova metóda; Kjeldahl method.

1 — Substrate, 2 — Proteins, 3 — Casein, 4 — Soybean protein isolated, 5 — Corn gluten, 6 — Whey proteins, 7 — Origin, 8 — Prepared by precipitation in acid medium, 9 — Purina, Belgium, 10 — Prepared in a laboratory.

NaOH na zastavenie reakcie. Tento roztok sme použili na stanovenie stupňa hydrolýzy  $DH$ . Na udržovanie pH 8,0 v pH-state sme používali 0,1 mol . l<sup>-1</sup> NaOH.

Na stanovenie stupňa hydrolýzy sme použili 4 metódy.  $DH_{\text{OH}}$  sme počítali z celkovej spotreby roztoku NaOH v priebehu hydrolýzy [1].  $DH_{\text{pep}}$  sme počítali z množstva nerozštiepených peptidových väzieb stanovených biuretovou metódou.  $DH_{\text{tyr}}$  sme počítali z množstva uvoľneného tyrozinu stanoveného Folínovým činidlom.  $DH_{\text{AK}}$  sme počítali na základe stanoveného množstva uvoľnených aminokyselín pomocou ninhydrínového činidla [19]. Príslušný  $DH$  je podiel stanovenej a pôvodnej hodnoty vyjadrený v %.

Jednotlivé voľné aminokyseliny v hydrolyzáte boli stanovené automatickým analyzátorom aminokyselín AAA 339, výrobca Mikrotechna, Praha.

## Výsledky a diskusia

Na hodnotenie enzýmovej hydrolýzy 1 % roztoku kazeínu pri rôznom pH za prítomnosti trypsínu sme použili zistené pomery množstva uvoľneného tyrozinu a množstva uvoľnených aminokyselín. Získané výsledky sú v tab. 2. Vyššie zastúpenie tyrozinu v aminokyselinách po 5 minútach hydrolýzy kleslo na hodnoty 0,40—0,47 po 30 minútach hydrolýzy. Najvyšší pomer tyrozinu k aminokyselinám bol pri pH 8,5. Stupne hydrolýzy stanovené po 30 minútach reakcie poskytli zaujímavé informácie. Množstvo uvoľnených aminokyselín klesalo so stúpajúcim pH. Boli odhydrolyzované 4/5 pôvodného obsahu tyrozinu v kazeíne, čím sa v tomto smere hydrolýza blížila k úplnému vyčerpaniu

Tabuľka 2. Enzymová hydrolýza 1 % kazeínového roztoku pri rôznom pH, trypsin 0,04 mg . ml<sup>-1</sup>, teplota 50 °C

Table 2. Enzymic hydrolysis of 1 % casein solution at various pH, trypsin 0.04 mg ml<sup>-1</sup>, temperature 50 °C

pH	Čas hydrolýzy <sup>1</sup> [min]					$DH_{AK}$	$DH_{Tyr}$	$DH_{Pep}$	$DH_{OH}$
	5	10	15	20	30				
	Tyr/AK								
7,5	0,72	0,57	0,42	0,41	0,40	15,0	81,0	12,3	10,0
8,0	0,80	0,63	0,58	0,52	0,42	13,4	76,0	23,3	13,6
8,5	0,57	0,50	0,51	0,47	0,47	12,0	79,1	30,9	17,7

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

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

$DH_{pep}$  — stupeň hydrolýzy počítaný z množstva nerozštiepených peptidových väzieb; Degree of hydrolysis calculated from the amount of uncleaved peptide bonds.

$DH_{OH}$  — stupeň hydrolýzy počítaný zo spotreby 0,1 mol . l<sup>-1</sup> NaOH; Degree of hydrolysis calculated from the consumption of 0.1 mol l<sup>-1</sup> NaOH.

Tyr/AK — pomer množstva uvoľneného tyrozinu k množstvu uvoľnených aminokyselín; Ratio of the released tyrosine amount to released amino acid amount.

1 — Hydrolysis time.

substrátu. So stúpajúcim pH stúplo aj množstvo rozštiepených peptidových väzieb, čo znamená zvýšenú tvorbu peptidov na úkor vzniku voľných aminokyselín.

V priebehu enzymovej hydrolýzy rôznych proteínov za prítomnosti proteináz Alcalase a trypsinu sme stanovili uvoľnený tyrozín, uvoľnené aminokyseliny a vypočítali stupne hydrolýzy. Výsledky sú v tab. 3. Pri 1 % srvátke s Alcalase a 1 % gluténe s trypsinom sa totálne odhydrolyzoval tyrozín. V týchto prípadoch boli aj najvyššie hodnoty  $DH_{AK}$ . Vo väčšine prípadov došlo za 120 minút takmer k zastaveniu reakcie hydrolýzy.

Analýzou voľných aminokyselín v hydrolyzáte sme zistili ich vzájomné zastúpenie v %. Výsledky sú v tab. 4. V hydrolyzáte z 2 % kazeínu a 1 % sójového izolátu pôsobením trypsinu bolo viac ako 69 % histidínu a tyrozinu + fenylalanínu. Tyrozín a fenylalanín sa nedali samostatne vyhodnotiť. V hydrolyzáte z kazeínu boli aj vyššie obsahy lyzínu — 11,7 % a arginínu — 12,7 %. V hydrolyzáte z 8 % čerstvého gluténu sme zistili pestrejšiu paletu aminokyselín, dominujúce boli tyrozín + fenylalanín, leucín a arginín. Z 8 % sójového izolátu za prítomnosti Alcalase získaný hydrolyzáat obsahoval ako hlavné aminokyseliny histidín a leucín.

Tabuľka 3. Enzymová hydrolýza rôznych proteínov, teplota 50 °C, pH 8,0, koncentrácia enzýmu 0,5 mg . ml<sup>-1</sup>

Table 3. Enzymic hydrolysis of different proteins, temperature 50 °C, pH 8.0, enzyme concentration 0.5 mg ml<sup>-1</sup>

Substrát <sup>1</sup>		Čas hydrolýzy <sup>2</sup> [min]							
		30	60	90	120	30	60	90	120
		$DH_{\text{Tyr}}$				$DH_{\text{AK}}$			
Alcalase									
1 %	Kazein <sup>3</sup>								
1 %	Glutén <sup>4</sup>	82	83	—	84	13	15	15	15
1 %	Sójový izolát <sup>6</sup>	82	83	84	84	13	16	—	18
1 %	Proteíny <sup>7</sup> srvátky	100	100	100	100	17	21	22	24
8 %	Glutén <sup>4</sup>	28	30	36	—	3	3	4	5
8 %	Glutén čerstvý <sup>5</sup>	46	52	62	—	9	10	15	—
8 %	Sójový izolát <sup>6</sup>	40	—	49	53	6	7	8	10
Trypsin									
1 %	Kazein <sup>3</sup>	74	80	—	—	15	19	—	—
1 %	Glutén <sup>4</sup>	95	96	98	99	24	27	29	31
8 %	Glutén <sup>4</sup>	39	43	43	—	7	10	10	—
8 %	Glutén čerstvý <sup>5</sup>	24	38	57	—	3	9	12	—

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

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

1 — Substrate, 2 — Hydrolysis time, 3 — Casein, 4 — Gluten, 5 — Gluten fresh, 6 — Soybean protein isolated, 7 — Whey proteins.

Tabuľka 4. Zastúpenie aminokyselín v hydrolyzátoch

Table 4. Distribution of amino acids in hydrolysates

Aminokyselina <sup>1</sup>	Aminokyseliny v hydrolyzátoch <sup>2</sup> [%]			
	a	b	c	d
Asp	—	—	—	1,7
Val	2,2	5,0	7,0	9,9
Leu	3,9	—	21,0	24,9
Ile	—	—	6,0	10,0
Phe + Tyr	33,8	46,6	28,0	10,7
Met	—	—	3,0	—
Lys	11,7	3,0	8,0	1,2
Arg	12,7	—	14,0	—
His	35,7	45,4	6,0	41,6
Ostatné <sup>3</sup>	—	—	7,0	—

Pokračovanie tab. 4

Continue table 4

- a — 2 % kazeínový roztok, trypsin 0,1 mg . ml<sup>-1</sup>, čas hydrolýzy 30 minút; 2 % casein solution, trypsin 0.1 mg ml<sup>-1</sup> 30 minute hydrolysis time.
- b — 1 % roztok sójového izolátu, trypsin 0,5 mg . ml<sup>-1</sup>, čas hydrolýzy 90 minút; 1 % solution of isolated soybean protein, trypsin 0.5 mg ml<sup>-1</sup>, 90 minute hydrolysis time.
- c — 8 % roztok čerstvého gluténu, trypsin 0,5 mg . ml<sup>-1</sup>, čas hydrolýzy 120 minút; 8 % fresh gluten solution, trypsin 0.8 mg ml<sup>-1</sup>, 120 minute hydrolysis time.
- d — 8 % roztok sójového izolátu, Alcalase 0,5 mg . ml<sup>-1</sup>, čas hydrolýzy 120 minút; 8 % solution of isolated soybean protein, Alcalase 0.5 mg ml<sup>-1</sup>, 120 minute hydrolysis time.
- 1 — Amino acid, 2 — Amino acids in hydrolysates, 3 — Others.

## Literatúra

1. ADLER-NISSEN, J.: Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. Amsterdam, Elsevier 1986.
2. PAHKALA, E.—PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.—LAUKKANEN, M.—ANTILA, V., Finnish J. Dairy Sci., 47, 1989, s. 39.
3. PAHKALA, E.—PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.—LAUKKANEN, M.—ANTILA, V., Finnish J. Dairy Sci., 47, 1989, s. 63.
4. LEONIL, J.—MOLLE, D.—MAUBOIS, J. L., Le Lait, 68, 1988, s. 281.
5. VISSER, S.—NOORMAN, H. J.—SLANGER, CH. J.—ROLLEMA, H. S., J. Dairy Sci., 56, 1989, s. 323.
6. DRØHSE, H. B.—FOLTMANN, B., Biochim. Biophys. Acta, 995, 1989, s. 221.
7. NEDKOV, P.—LILOVA, A.—ČORBANOVIĆ, B., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 368, 1987, s. 1321.
8. HARDWICK, J. E.—GLATZ, E. Ch., J. Agric. Food Chem., 37, 1989, s. 1188.
9. SAVOTE, L.—GALIBOIS, I.—PARENT, G.—CHARBONNEAU, R., Nutr. Res., 8, 1988, s. 1319.
10. SAVOIE, L.—PARENT, G., Nutr. Rep. Int., 35, 1987, s. 783.
11. LEMIEUX, L.—AMIOT, J., J. Chromatogr., 473, 1989, s. 189.
12. LEMIEUX, L.—AMIOT, J., J. Chromatogr., 519, 1990, s. 299.
13. GAUTHIER, J.—AMIOT, J.—VIJAYALAKSHMI, M. A., Preparat. Biochem., 20, 1990, s. 23.
14. HOLT, G.—SAWYER, L., Protein Eng., 2, 1988, s. 251.
15. CHOBERT, J.—BERTRAND-HARB, C.—NICOLAS, M., J. Agric. Food Chem., 36, 1988, s. 883.
16. BŘEZINA, P.—CIKÁNEK, D., Mlék. Listy, 14, 1988, s. 55.
17. SOHN, K.—LEE, H., Korean J. Food Sci. Technol., 20, 1988, s. 659.
18. MANNHEIM, A.—CHERYAN, M., J. Food Sci., 55, 1990, s. 381.
19. DAVÍDEK, J. a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravin. Praha, SNTL 1977.

Do redakcie došlo 12. 8. 1991

## **Ферментный гидролиз протеинов**

### **Резюме**

Был сделан ферментный гидролиз казеина, кукурузного глютенa, соевого выделения, протеинов сыворотки в присутствии протеиназ трипсина и Alcalase в рН-стате при температуре 50 °С и рН 8,0. При гидролизе казеина менялось взаимоотношение выделенного тирозина к общим свободным аминокислотам в зависимости на рН и времени гидролиза. При высшем рН расщепление пептидных связей проходило преимущественно за возникновения пептидов и пониженном возникновении свободных аминокислот. Из разных субстратов быстрее гидролизировались протеины сыворотки. В разных гидролизатах имели доминирующее представление гистидин, тирозин + фенилаланин и лейцин.

## **Enzymic hydrolysis of proteins**

### **Summary**

Enzymic hydrolysis of casein, corn gluten, isolated soybean proteins, whey proteins was carried out in the presence of trypsin and Alcalase in the pH-stat apparatus, at pH 8,0 and 50 °C. During casein hydrolysis, the ratio free tyrosine : free amino acids was dependent on pH value and hydrolysis time. At higher pH, peptide bonds were preferentially cleaved giving rise to peptides and simultaneously, decrease in free amino acid content was recorded. The whey proteins had the highest rate of hydrolysis from the used proteins. Histidine, tyrosine + phenylalanine and leucine were the predominant amino acids in analysed hydrolysates.