

## **Oznaczanie aktywności proteolitycznej podpuszczki oraz preparatu podpuszczkopodobnego. Wpływ wybranych czynników na koagulację białek mleka.**

*Celem ćwiczenia jest porównanie aktywności proteolitycznej preparatów koagulujących białka mleka, podpuszczki cielęcej oraz preparatu podpuszczkopodobnego z *Rhizomucor miehei*, w odniesieniu do ich zdolności koagulacyjnych wobec białek mleka. Zbadany zostanie również wpływ wybranych czynników na koagulację białek mleka przez zastosowane preparaty enzymatyczne.*

### ***Wprowadzenie***

**Peptydazy.** Zasadniczym składnikiem preparatów enzymatycznych koagulujących białka mleka są peptydazy. Peptydazy (enzymy proteolityczne) to enzymy, które z udziałem cząsteczki wody, rozrywają wiązania peptydowe obecne w białkach i peptydach. Stanowią dużą i złożoną grupę enzymów występujących w każdej komórce organizmu eukariotycznego i prokariotycznego. Funkcjonują wewnątrz komórki jak również pozakomórkowo, odgrywając ważną rolę w procesach katabolicznych (trawiennych) oraz regulatorowych. Znalazły także szerokie zastosowanie w procesach technologicznych podczas produkcji i przetwarzania żywności min.: w przemyśle mleczarskim, browarniczym, piekarskim, mięsnym.

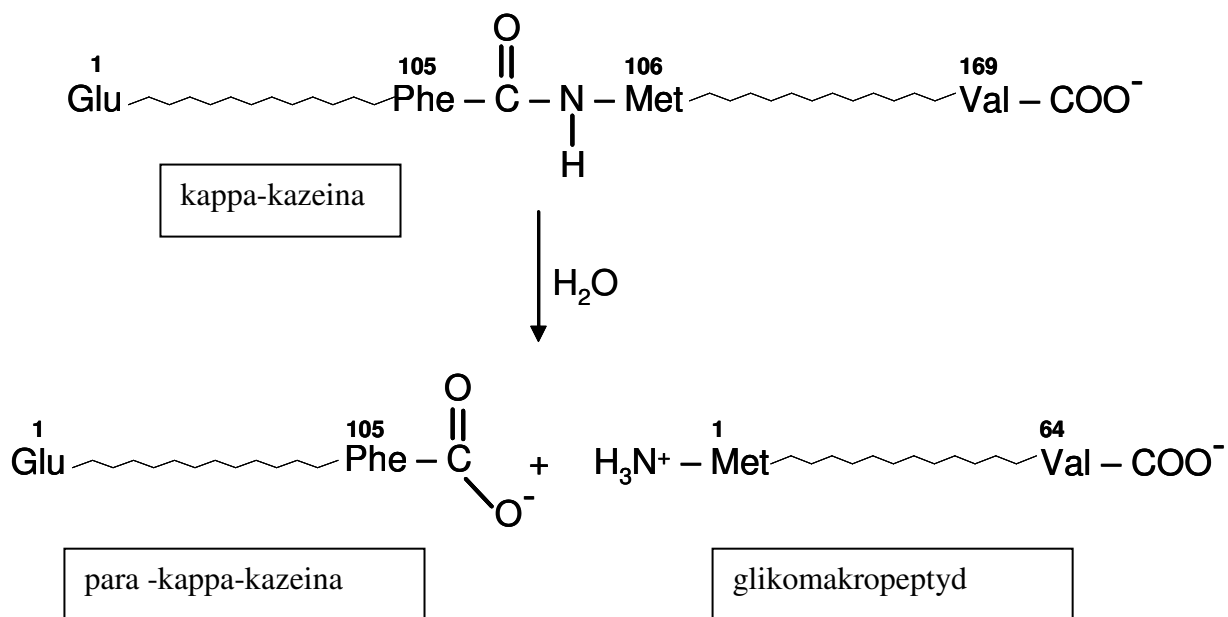
Peptydazy, stanowią w klasie trzeciej (hydrolaz) podklasę czwartą – hydrolazy peptydowe (EC 3.4). Ze względu na położenie hydrolizowanego wiązania peptydowego wyróżnia się endopeptydazy (proteinyazy), rozrywające wiązania wewnątrz łańcucha polipeptydowego oraz egzopeptydazy, hydrolizujące wiązania położone skrajnie. Egzopeptydazy, obejmują enzymy „odcinające” pojedyncze aminokwasy N-końcowe (aminopeptydazy) bądź C-końcowe (karboksypeptydazy), enzymy specyficzne dla dwupeptydowych substratów, oraz enzymy odszczepiające jednostki dwu- lub tripeptydowe.

Na podstawie rodzaju reszt aminokwasowych zlokalizowanych w centrum aktywnym, endopeptydazy podzielono na następujące podpodklasy: serynowe (EC 3.4.21), cysteinowe (EC 3.4.22), aspartyłowe (EC 3.4.23), treoninowe (EC 3.4.25), metaloproteinyazy (EC 3.4.24) oraz endopeptydazy o nieznanym mechanizmie katalitycznym (EC 3.4.99). Proteinyazy aspartyłowe, do których należą enzymy wykorzystywane na ćwiczeniach, zawierają w centrum aktywnym dwie reszty kwasu asparaginowego, kluczowe dla katalizowanych przez te enzymy reakcji. Najwyższą aktywność proteinyazy aspartyłowe wykazują w zakresie pH 1.5-5.0, stąd często są zwane kwaśnymi proteinyazami.

Peptydazy charakteryzują się niską specyficznością w stosunku do rozkładanego substratu, natomiast wykazują preferencje w stosunku do reszt aminokwasowych tworzących rozrywane wiązanie. Na przykład pepsyna, enzym trawienny, wydzielany przez śluzówkę żołądka, hydrolizuje wiązania peptydowe utworzone przez aminokwasy aromatyczne oraz kwaśne oraz między waliną a leucyną (Bańkowski 2006).

**Chymozyna** (EC 3.4.23.4), zwana także renniną, należy do endopeptydaz. Jest to enzym produkowany przez błonę śluzową żołądka młodych ssaków (krowy, świnie, koty, foki, owce) w postaci nieaktywnej (zymogenu) tzw. prochymozyny. Prochymozyna w kwaśnym środowisku soku żołądkowego, ulega aktywacji do chymozyny w wyniku autokatalitycznej hydrolizy wiązania peptydowego pomiędzy Phe42 a Gly43. Dojrzała, aktywna chymozyna występuje w postaci dwóch izoenzymów, A i B, różniących się jednym aminokwasem. Optimum pH dla aktywności proteolitycznej cielęcej chymozyny A to 4,2, natomiast dla chymozyny B to 3,7.

Chymozyna katalizuje reakcję hydrolizy wiązania peptydowego pomiędzy Phe105 oraz Met106 łańcucha polipeptydowego kappa-kazeiny (rys.1).



Rys. 1. Hydroliza wiązania peptydowego w kappa-kazeinie przez chymozynę

Chymozyna, w dużych ilościach występuje zwłaszcza w trawieńcu cieląt. Sekrecja chymozyny do soku żołądkowego utrzymuje się na wysokim poziomie w ciągu kilku-kilkunastu tygodni po narodzinach, po czym maleje, a rolę głównego enzymu trawiennego białek w soku żołądkowym stopniowo przejmują pepsyna. U 3-tygodniowych cieląt karmionych wyłącznie mlekiem matki stosunek chymozyny do pepsyny w soku żołądkowym wynosi 90:10, natomiast po 6 miesiącach, gdy wprowadzane jest do diety również inne pożywienie, stosunek ten wynosi 30:70. Chymozyna poprzez koagulację białek mleka umożliwia dłuższe zatrzymanie pokarmu w żołądku, co z kolei umożliwia efektywniejsze działanie innych enzymów trawiennych. Poza bardzo ważną rolę fizjologiczną, chymozyna znalazła zastosowanie w przemyśle spożywczym do produkcji serów podpuszczkowych.

Zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Federacji Mleczarskiej, termin **podpuszczka** powinien być zarezerwowany dla preparatu enzymatycznego, zdolnego do koagulacji białek mleka, izolowanego z trawieńców młodych przeżuwaczy, zawierającego głównie chymozynę, ale też pepsynę i inne enzymy trawienne (np. lipazy). Handlowe preparaty podpuszczki zawierają chymozynę oraz pepsynę przeważnie w stosunku 80:20 lub 75:25. Peptydazy innego pochodzenia, również zdolne do koagulacji białek mleka, zaleca się nazywać koagulantami białek mleka.

Pośród koagulantów białek mleka powszechnie stosowane są obecnie w przemyśle mleczarskim enzymy pochodzenia mikrobiologicznego, szczególnie te wytwarzane przez grzyby. Na ćwiczeniach używany będzie preparat koagulujący mleko wytworzony przez grzyba *Rhizomucor miehei*, który ze znanych preparatów podpuszczkopodobnych wykazuje właściwości najbardziej zbliżone do chymozyny cielęcej. Preparat ten zawiera aspartylową proteinazę wydzielaną pozakomórkowo do płynu hodowlanego, wykazującą najwyższą aktywność proteolityczną w pH 4,1, która podobnie jak chymozyna hydrolizuje wiązanie pomiędzy Phe105 a Met106 kappa-kazeiny. Znaczny procent serów podpuszczkowych (w skali światowej) produkowanych jest z również z zastosowaniem preparatów otrzymywanych w wyniku heterologicznej ekspresji genów kodujących cielęcą chymozynę w komórkach *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* oraz *Kluyveromyces lactis*. Preparaty koagulujące mleko

pochodzenia roślinnego nie znalazły szerszego zastosowania z powodu dużej aktywności proteolitycznej, powodującej gorzki smak sera.

Podpuszczka zwierzęca, jak również preparaty koagulujące mleko innego pochodzenia, w postaci handlowej występują głównie jako roztwory o mocy (tj. zdolności do koagulacji/ścinania białek mleka) 1:10 000 lub 1:15 000, co oznacza, że jedna objętość preparatu może skoagulować 10 000 lub 15 000 objętości mleka w ciągu 40 minut, w temperaturze 35°C. Do produkcji sera, stosuje się także preparaty w postaci proszku lub tabletek, które cechuje zazwyczaj około 10-krotnie wyższa moc w stosunku do postaci płynnej.

### **Działanie podpuszczki oraz preparatu podpuszczkopodobnego na białka mleka.**

Najlichnieszą grupę białek mleka stanowią kazeiny (~80%). Główne frakcje kazein występujące w mleku to: alfa-s1 ( $\alpha$ -s1), alfa-s2 ( $\alpha$ -s2), beta ( $\beta$ ) oraz kappa ( $\kappa$ ) kazeina. W świeżym mleku, białka kazeiny występuje głównie w postaci sferycznych skupisk, zwanych micelami (średnica 30-300nm), równomiernie rozprowadzonych w całej objętości mleka. Alfa- i beta-kazeiny to wysoko ufosforylowane białka, które w świeżym mleku zachowują się jak kwas, tworząc sól z jonami wapnia czyli kazeinian wapnia. Kappa-kazeina zawiera tylko jedną ufosforylowaną resztę seryny, co czyni ją rozpuszczalną w obecności jonów wapnia. Zlokalizowana na powierzchni miceli  $\kappa$ -kazeina stabilizuje je, a jej mocno glikozyłowany hydrofilowy C-koniec łańcucha polipeptydowego, wystający ponad powierzchnię miceli, zapewnia micelom odpowiednie uwodnienie i zapobiega agregacji.

Koagulacja kazeiny przez podpuszczkę i preparaty podpuszczkopodobne następuje w dwóch fazach. **Pierwsza faza** ma charakter enzymatyczny. W wyniku hydrolizy wiązania peptydowego pomiędzy Phe105 oraz Met106 w  $\kappa$ -kazeinie, ma miejsce odszczepienie z cząsteczek  $\kappa$ -kazeiny C-końcowego fragmentu łańcucha polipeptydowego, tzw. glikomakropeptydu i powstanie para- $\kappa$ -kazeiny. Glikomakropeptyd zawiera 64 reszty aminokwasowe, jest łatwo rozpuszczalny w wodzie i przechodzi do roztworu. Glikomakropeptyd jest także rozpuszczalny w 3% kwasie trichlorooctowym (TCA), co zostanie wykorzystane w metodzie Ansona na dzisiejszym ćwiczeniu. Usunięcie hydrofilowego C-końca  $\kappa$ -kazeiny sprawia, że w **fazie drugiej** w obecności jonów wapnia micelle agregują i tworzy się skrzep para-kazeiny (dokładniej para-kazeinianu wapnia). Skrzep powstaje wskutek hydrofobowych oddziaływań pomiędzy micelami, nasilających się w wyniku odłączenia glikomakropeptydu, a co za tym idzie utraty otoczki hydratacyjnej oraz obniżenia elektrostatycznych sił odpychania między micelami.

Przedstawiony mechanizm koagulacji kazeiny, jest szeroko wykorzystywany w technologii otrzymywania serów podpuszczkowych, a sam przebieg procesu jest uzależniony m.in. od: temperatury, zawartości wapnia w mleku, wartości pH, stężenia soli. Optymalna temperatura dla koagulacji białek mleka przez podpuszczkę oraz preparat z *Rhizomucor miehei* to odpowiednio 45°C oraz 42°C, ale w praktyce wykorzystywane są niższe temperatury (30-32°C) w celu uniknięcia nadmiernej twardości skrzepu. Temperatura nie tylko ma wpływ na fazę enzymatyczną koagulacji białek mleka (zgodnie z regułą Van't Hoffa wzrost temperatury o 10 °C powodują średnio 2-krotny wzrost szybkości reakcji enzymatycznej), ale również na fazę drugą, agregację miceli. W temperaturze poniżej 16°C, proteoliza  $\kappa$ -kazeiny nadal ma miejsce, ale agregacja miceli, jest mocno ograniczona lub nie zachodzi wcale, stąd koagulacja mleka przeważnie nie jest obserwowana. Druga faza koagulacji kazeiny zależna jest również od obecności w mleku jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , które oddziałują elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi resztami aminokwasowymi (głównie z grupami -COOH oraz ufosforylowanymi grupami -OH) sąsiadujących ze sobą miceli, „spinając” micelle ze sobą i stabilizując tworzące się agregaty. Na ćwiczeniach jony wapnia zostaną usunięte z roztworu w wyniku związania przez szczawian amonu.

**Aktywność proteolityczna preparatów koagulujących mleko.** Ze względu na specyficzne działanie chymozyny, preparaty podpuszczki charakteryzują się wysoką zdolnością koagulacyjną

wobec białek mleka a zarazem niską całkowitą aktywnością proteolityczną. Chymozyna, poprzez efektywną hydrolizę tylko jednego wiązania w  $\kappa$ -kazeinie (Phe-Met), prowadzi do uwolnienia glikomakropeptydu i powstania skrzepu para-kazeiny. Wiązania występujące w  $\alpha$ - i  $\beta$ - kazeinie są rozszczepiane przez chymozynę w znikomym stopniu. Stąd, w wyniku proteolizy kazeiny przez chymozynę uwalniana jest z kazeiny niewielka ilość peptydów. Jest to cecha porządana w przemyśle mleczarskim, gdyż nadmierna proteoliza może niekorzystnie wpływać na konsystencję skrzepu sera (powoduje jego rozluźnienie), a duża liczba uwolnionych z kazeiny peptydów może powodować gorzki smak sera ze względu na dużą zawartość aminokwasów hydrofobowych. Proteazy aspartylowe z *Rhizomucor miehei* poza wiązaniem Phe105-Met106 w  $\kappa$ -kazeinie hydrolizują również wiązania pomiędzy Phe/Leu, Phe/Tyr, Leu/Tyr, Phe/Phe. Jednak pomimo znacznie wyższej, w stosunku do chymozyny, całkowitej aktywności proteolitycznej częstość występowania gorzkiego smaku skrzepów sera jest niska.

**Zasada metody Ansona.** Na ćwiczeniu aktywność proteolityczna preparatów koagulujących białka mleka będzie oznaczana metodą Ansona. Metoda ta polega na pomiarze ilości tyrozyny i tryptofanu zawartych w peptydach uwolnionych w trakcie hydrolizy kazeiny, które nie wytrącają się 3-procentowym kwasem trichlorooctowym (TCA).

Hydrolizę kazeiny prowadzi się inkubując roztwór kazeiny z badanym preparatem enzymatycznym w pH 6,5, czyli w pH świeżego mleka (typowe pH podczas produkcji serów podpuszczkowych) i w temp. 37°C. Reakcję enzymatyczną przerywa się dodając TCA. Kwas trichlorooctowy wytrąca znajdujące się w roztworze białka, które usuwa się przez sączenie. W przesączu pozostają uwolnione z kazeiny peptydy, które są rozpuszczalne w 3-procentowym TCA. Oznaczenie zawartości tyrozyny i tryptofanu w uwolnionych peptydach wykonuje się fotometrycznie przy użyciu odczynnika Folina-Ciocalteu. Końcowa barwa jest wynikiem redukcji kwasu fosfomolibdenowego i fosforowolframowego (zawartych w odczynniku Folina-Ciocalteu) do błękitu fosfomolibdenowego przez tyrozinę i tryptofan zawarte w peptydach w środowisku zasadowym. Natężenie końcowej barwy jest wprostproporcjonalne do ilości tyrozyny i tryptofanu w próbie, a tym samym do ilości peptydów uwolnionych w trakcie hydrolizy kazeiny. Dla uproszczenia, aktywność proteolityczną wyraża się w  $\mu$ molach tyrozyny w oparciu o krzywą wzorcową przygotowaną dla tego aminokwasu.

### Odczynniki:

1. 10-procentowy roztwór podpuszczki cielęcej (chymozyna:pepsyna – 75:25) w 0,1-molowym buforze fosforanowym o pH 6,5.
2. 1-procentowy roztwór preparatu podpuszczkopodobnego z *Rhizomucor miehei* w 0,1-molowym buforze fosforanowym o pH 6,5.
3. 0,1 M bufor fosforanowy o pH 6,5.
4. 2-procentowy roztwór kazeiny w 0.1 M buforze fosforanowym o pH 6,5.
5. 7,5-procentowy TCA.
6. 0,5 M NaOH.
7. Odczynnik Folina-Ciocalteu.
8. 10-procentowy roztwór mleka odtłuszczonego (mleko w proszku) w 0,01 M CaCl<sub>2</sub> (przesączyć przez trzy warstwy gazy).
9. 0,05-procentowy roztwór preparatu podpuszczkopodobnego z *Rhizomucor miehei* w 0,01 M CaCl<sub>2</sub>.
10. 0.25 M szczawian amonu.

### Wykonanie:

#### 1A. Oznaczanie aktywności proteolitycznej podpuszczki - indywidualnie

**Hydroliza enzymatyczna kazeiny.** Otrzymany w kolbie miarowej na 10 ml roztwór podpuszczki cielęcej (1) uzupełnić do kreski 0,1 M buforem fosforanowym (3) i dobrze wymieszać. Do trzech czystych probówek (2 próby pełne i jedna materiałowa) odmierzyć 2 ml roztworu kazeiny (4) i

umieścić je w łaźni wodnej w temp. 37°C. Po 5 min do dwóch probówek (próby pełne) dodać 1 ml podpuszczki z kolby miarowej na 10 ml, szybko wymieszać i inkubować wszystkie trzy próby w temp. 37°C dokładnie przez 15 min. Po 15 min do wszystkich trzech probówek dodać 2 ml TCA (5), a do próby materiałowej także 1 ml podpuszczki z kolby miarowej na 10 ml. Wszystkie próby wymieszać i pozostawić przez 30 min w temperaturze pokojowej w celu całkowitego wytrącenia osadu białek. Następnie próby przesączyć do czystych probówek przez sączki z bibuły.

**Fotometryczne oznaczenie tyrozyny i tryptofanu w uwolnionych z kazeiny peptydach.** Do kolejnych trzech czystych probówek odmierzyć po 1 ml klarownego przesącza z dwóch prób pełnych i z próby materiałowej. Następnie do każdej probówki dodać po 2 ml 0,5 M NaOH (6) i po 0,6 ml odczynnika Folina-Ciocalteu (7) - zawartość probówek bardzo dobrze wymieszać! Po 10 minutach odczytać wartości absorbancji prób pełnych i materiałowych w fotometrze ustawionym na zero przy długości fali 670 nm wobec wody destylowanej.

### **1B. Oznaczenie aktywności proteolitycznej preparatu podpuszczkopodobnego - indywidualnie**

Oznaczenie wykonać jak w punkcie 1A, wykorzystując w miejsce podpuszczki cielęcej (1), preparat podpuszczkopodobny z *Rhizomucor miehei* (2).

### **2. Wpływ temperatury na koagulację białek mleka przez preparat podpuszczkopodobny – w parach**

Do trzech czystych probówek odmierzyć po 2 ml roztworu mleka (8). Jedną probówkę umieścić w wodzie z lodem, drugą w łaźni wodnej w temp. 25°C, trzecią w łaźni wodnej w temp. 37°C. Po około 5 minutach dodać do każdej probówki 1 ml 0,05-procentowego preparatu podpuszczkopodobnego z *Rhizomucor miehei* (9). Po 5, 10, 20 i 30 minutach inkubacji enzymu z białkami mleka, zaobserwować pojawianie się skrzepów para-kazeinianu wapnia poprzez delikatne rolowanie probówki pod kątem około 30°. Obserwacje przedstawić w sprawozdaniu.

### **3. Hamowanie procesu tworzenia skrzepów para-kazeinianu wapnia przez szczawian amonu – w parach**

Do dwóch czystych probówek odmierzyć po 2 ml roztworu mleka. Następnie do jednej z nich dodać 1 ml 0,25 M roztworu szczawianu amonu (10). Obie probówki umieścić w temp. 37°C. Po około 5 minutach dodać do każdej probówki 1 ml roztworu preparatu podpuszczkopodobnego z *Rhizomucor miehei* (9). Po 5, 10, 20 i 30 minutach inkubacji enzymu z białkami mleka, zaobserwować zmiany w probówkach o opisać w sprawozdaniu.

## **Opracowanie wyników**

### **Obliczenia aktywności proteolitycznej**

1. Obliczyć średnią wartość absorbancji prób pełnych i odjąć od niej wynik próby materiałowej.
2. Na podstawie obliczonej różnicy absorbancji, odczytać z krzywej wzorcowej ilość  $\mu$ moli tyrozyny zawartej w 1 ml przesącza.
3. Obliczyć aktywność proteolityczną podpuszczki oraz preparatu podpuszczkopodobnego w  $\mu$ molach tyrozyny zawartej w peptydach uwolnionych z kazeiny w ciągu 1 minuty przez 1 g preparatu enzymatycznego.

Przykładowe obliczenia aktywności proteolitycznej preparatu podpuszczkopodobnego:

Absorbancja próby pełnej 1	Absorbancja próby pełnej 2	Średnia absorbancja prób pełnych	Absorbancja próby materiałowej	Różnica absorbancji	Ilość $\mu$ moli tyrozyny odczytana z krzywej wzorcowej dla różnicy absorbancji
0,308	0,298	0,303	0,053	0,250	0,113

W 1 ml przesączu, pobranego do reakcji barwnej, znajduje się 0,113  $\mu$ moli tyrozyny. Ponieważ 1 ml pobrano z 5 ml przesączu, stąd w całej objętości przesączu znajduje się 0,565  $\mu$ moli tyrozyny. Jest to ilość tyrozyny zawarta w peptydach uwolnionych z kazeiny przez 1 ml rozcieńczonego preparatu podpuszczkopodobnego pobranego do reakcji enzymatycznej. Ponieważ 1 ml preparatu podpuszczkopodobnego pobrano z kolbki o objętości 10 ml, stąd aktywność preparatu zawartego w kolbce równa jest 5,65  $\mu$ molom tyrozyny. Wiedząc, że kolbka przed uzupełnieniem do objętości 10 ml, zawierała 2,5 ml wyjściowego preparatu enzymatycznego przygotowanego przez rozpuszczenie 1 g w 100 ml buforu, aktywność proteolityczną preparatu podpuszczkopodobnego możemy obliczyć następująco:

- aktywność 2,5 ml wyjściowego roztworu wynosi 5,65  $\mu$ mole tyrozyny
- aktywność 1 g preparatu podpuszczkopodobnego jest równa 226  $\mu$ molom tyrozyny, a po uwzględnieniu czasu trwania reakcji enzymatycznej (15 min) aktywność ta będzie równa 15,06  $\mu$ molom tyrozyny  $\times$  1g preparatu podpuszczkopodobnego  $\times$  1 min.

Podobne obliczenia wykonać dla podpuszczki cielęcej. Porównać wyniki dla obu preparatów koagulujących mleko i wyciągnąć wnioski dotyczące zależności pomiędzy aktywnością proteolityczną tych preparatów a ich zdolnością do koagulacji białek mleka wiedząc, że moc tj. zdolność koagulacyjna 1 grama obu stosowanych na ćwiczeniach preparatów jest zbliżona i wynosi około 1:100 000 (1g koaguluje 100 l mleka).

#### ***Wpływ temperatury oraz szczawianu amonu na koagulację białek mleka***

W sprawozdaniu należy opisać wpływ temperatury na szybkość tworzenia się i jakość, pojawiających się pod wpływem działania preparatu podpuszczkopodobnego, skrzepów para-kazeinianu wapnia. W sprawozdaniu należy również opisać i wyjaśnić wpływ szczawianu amonu na koagulację białek mleka.

#### **Literatura**

1. **Anson M.L. 1938:** The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79-89.
2. **Bańkowski E.** 2006: Biochemia. MedPharm, Polska.
3. **Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B.** 2010: The production, action and application of rennet and coagulants, w: *Thechnology of cheesmaking* (B.A. Law i A.Y. Tamime, red.), Blackwell Publishing Ltd., wydanie drugie, 98-125.
4. **Preetha S., Boopathy R.** 1997: Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 573-578.
5. **Whitaker J.R., Voragen A.G.J., Wong D.W.S.** 2003: Handbook of food enzymology. Marcel Dekker Inc., New York.