

PRÍSPEVOK K SPÔSOBU HYDROLYTICKÉHO ŠTIEPENIA BIELKOVINY PERIA

I. VELIKÝ, A. KOSSACZKÁ

Katedra technickej mikrobiológie a biochémie Slovenskej vysokej školy technickej
v Bratislave

Hydrolyzáty bielkovín majú význam ako terapeutiká a dietetiká, ako zdroj čistých aminokyselín a i. Pripravujú sa z rozličných druhov bielkovín, a to enzymatickou alebo chemickou hydrolyzou.

Najobvyklejšou východiskovou surovinou je kazeín, ktorý sa obyčajne podrobuje enzymatickému štiepeniu. Hydrolyzáty bielkoviny získané týmto spôsobom má určité prednosti po stránke zastúpenia niektorých aminokyselín, najmä pokiaľ ide o ich formu. Bielkovina peria (typu keratínu), štiepenie ktorej sa sledovalo, je však odolná voči hydrolytickému účinku enzýmov, preto ju nemožno štiepiť rovnakým spôsobom ako kazeín.

Pri chemickom spôsobe štiepenia bielkoviny dochádza k určitým kvalitatívnym a kvantitatívnym zmenám v obsahu aminokyselín, ktoré sa však dajú znížiť na najmenšiu mieru zistením optimálnych podmienok procesu. Výhoda chemickej hydrolyzy v porovnaní s enzymatickou hydrolyzou spočíva v tom, že optimálne podmienky možno ľahšie presne dodržiavať, takže reprodukovateľnosť procesu a stálosť kvality výrobku je zaručená.

Hydrolyzou keratínu peria a sledovaním obsahu aminokyselín v hydrolyzátoch sa zaoberali C. G r a h a m a spolupracovníci [1], ktorí určili kvantitatívne zastúpenie aminokyselín v keratíne peria. Hydrolyzu keratínu iného pôvodu uskutočnili E. J. C o h n a J. T. E d s a l l [8], W. T. A s t b u r y [9] a iní. Cieľom ich práce bolo zistiť najmä kvalitatívny a kvantitatívny obsah aminokyselín v uvedených druhoch keratínu. Výsledky týchto, ako aj ostatných autorov sa však rozchádzajú.

Úlohou našej práce bolo využiť hydrolyzáty bielkoviny peria. Preto sme sa zamerali na sledovanie podmienok hydrolyzy.

Experimentálna časť

Podstata práce spočívala v overovaní rýchlosti a spôsobu štiepenia bielkoviny peria pri použití kyselín a alkálií za normálneho tlaku pri bode varu roztoku pod spätným chladičom.

Pre pokusy hydrolytického štiepenia sa použilo nedriapané slepačie perie. Z tejto suroviny sa odoberali priemerné vzorky na niektoré základné analýzy:

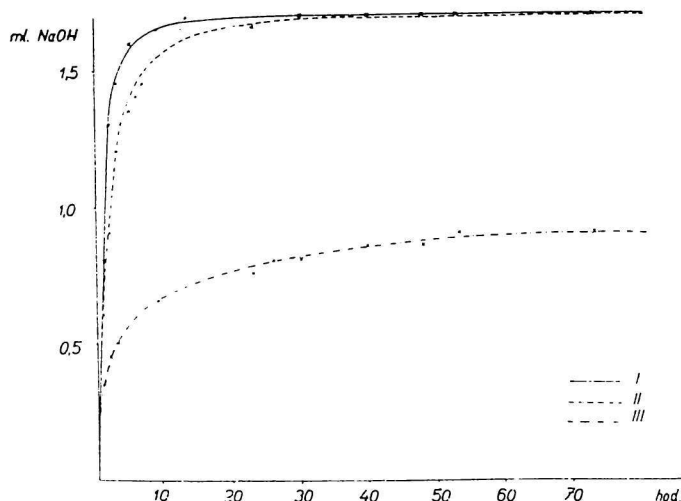
	‰
vlhkosť	10,20
popol	1,66
tuk	2,14
síra	1,78

dusík celkový	12,37
dusík na sušinu	13,77
proteíny celkové	77,30
proteíny na sušinu	86,00

Hydrolyza uvedenej suroviny sa vykonala pôsobením minerálnych kyselín, zmesi minerálnych a organických kyselín, ako aj alkálií. Kyslá i alkalická hydrolyza sa uskutočnila za týchto podmienok:

Na návažok peria sa pridalo desaťnásobné množstvo minerálnej kyseliny (6 N-HCl alebo 8 N-H₂SO₄). Pre alkalickú hydrolyzu sa použila suspenzia hydroxydu bárnateho v pomere 100 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O v 600 ml vody. Orientačne sa vykonala hydrolyza za použitia zmesi kyseliny soľnej a kyseliny mravej, ako aj alkalická hydrolyza, pri ktorej sa použil hydroxyd vápenatý o rôznych koncentráciách.

Hydrolyzovalo sa pri bode varu pod spätným chladičom za normálneho tlaku. Doba hydrolyzy bola 73 hodín. V priebehu hydrolyzy sa rýchlosť štiepenia bielkoviny kontrolovala stanovením množstva aminodusíka formolovou titráciou. Vzorky sa odoberali v hodinových intervaloch. Výsledky štiepenia bielkoviny hydrolyzou kyselinou soľnou, kyselinou sírovou a hydroxydom bárnatým znázorňuje obr. 1. Na osi poradnic sú uvedené



Obr. 1. Grafické znázornenie priebehu hydrolyzy keratínu peria podľa formolovej titrácie. I. kyslá hydrolyza 6 N-HCl, II. kyslá hydrolyza 8 N-H₂SO₄, III. alkalická hydrolyza Ba(OH)₂.

množstvám 0,05 N-NaOH spotrebovaného na 20 ml neutrálnej vzorky, pripravenej zriedením 2 ml hydrolyzátu v 50 ml destilovanej vody. Na osi úsečiek je doba hydrolyzy. Prvá vzorka sa odoberala hneď na začiatku hydrolyzy.

Z grafického znázornenia priebehu sledovaných hydrolyz vidieť značný rozdiel medzi alkalickou a kyslou hydrolyzou. Naproti tomu rozdiel medzi sledovanými kyslými spôsobmi hydrolyzy kyselinou soľnou a kyselinou sírovou je za uvedených podmienok takmer nepatrný. Značný rozdiel medzi alkalickou a kyslou hydrolyzou čo do množstva aminodusíka sa zdôvodňuje deštruktívnym účinkom hydroxydu bárnateho na bielkovinu peria

a jej štiepne produkty — peptidy a aminokyseliny. Podobný priebeh sa pozoroval aj pri ďalších alkalických hydrolyzách.

V tab. 1 sú uvedené množstvá aminodusíka vyjadrené v percentách na pôvodný návažok peria, stanovené v hydrolyzátach v určitých časových intervaloch. Tab. 2 udáva

Tabuľka 1

Hod.	% N—NH ₂		
	HCl	H ₂ SO ₄	Ba(OH) ₂
5	10,08	8,82	2,2
10	10,52	10,14	4,47
20	10,65	10,52	5,04
40	10,71	10,71	5,36
75	10,71	10,71	5,67

Tabuľka 2

Hod.	% N—NH ₂		
	HCl	H ₂ SO ₄	Ba(OH) ₂
5	94,08	82,35	20,54
10	98,22	94,66	41,70
20	99,45	98,22	47,06
40	100,00	100,00	50,10
75	100,00	100,00	52,94

množstvo aminodusíka v percentách na množstvo aminodusíka na konci hydrolyzy za použitia kyseliny soľnej. Z tabuliek vidieť, že množstvo aminodusíka pri kyslej hydrolyze je takmer dvojnásobné vzhľadom na množstvo aminodusíka v alkalických hydrolyzách.

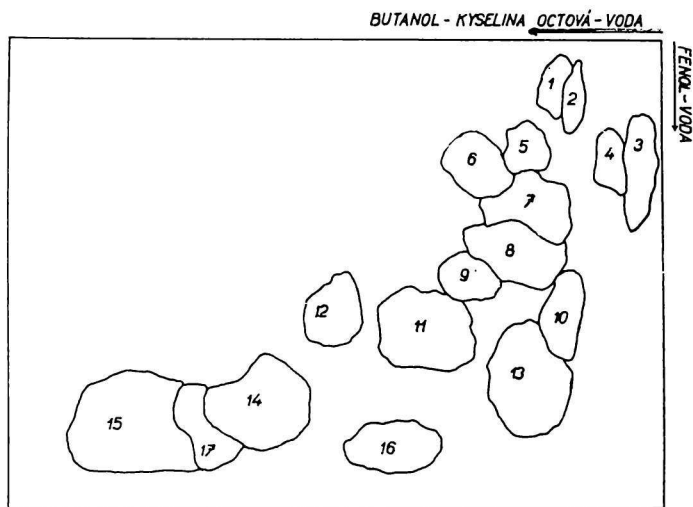
Súčasne sa uskutočňovala hydrolyza peria za tých istých podmienok bez odoberania vzoriek. V získaných hydrolyzátach sa stanovil obsah celkového dusíka a aminodusíka. Zistené hodnoty sú uvedené v tab. 3. Aj z týchto hodnôt vidieť, že pri alkalicknej hydrolyze

Tabuľka 3

Hydrolyza	% celkového N na návažok	% celkového N na sušinu	% N—NH ₂ na návažok	% N—NH ₂ na sušinu
HCl	12	13,37	11,14	12,4
H ₂ SO ₄	11,56	12,87	10,25	11,41
Ba(OH) ₂	8,05	8,964	6,613	7,364

dochádza k najväčšiemu odbúraníu dusíkatých látok. Zistilo sa, že v alkalicom hydrolyzáte ostáva iba 65,9 % dusíka z pôvodného množstva dusíka v perí a len 53,47 % vo forme aminodusíka. Pri kyslej hydrolyze za použitia kyseliny soľnej ostáva z celkového dusíka peria 97,03 % a aminodusíka 90,05 %. Pri použití kyseliny sírovej ostane z celkového množstva dusíka 93,5 % a aminodusíka 82,9 %. Porovnanie obsahu dusíka a aminodusíka v príslušnom hydrolyzáte s pôvodným obsahom dusíka v perí ukazuje, že straty na dusíku pri kyslých hydrolyzách sú malé.

V získaných hydrolyzátoch sa sledoval obsah aminokyselín kvalitatívne a orientačne i kvantitatívne pomocou chromatografie na papieri. Pri chromatografickom stanovení sa ako rozpúšťadlo použila jednak zmes butanol—kyselina octová—voda v pomere 4 : 1 : 5, jednak zmes fenol—voda v pomere 4 : 1. Pracovalo sa na chromatografickom papieri Whatman 4. Aminokyseliny sa detegovali postriekaním roztokom ninhydrínu v etanole (obr. 2).



Obr. 2. Dvojrozmerný chromatogram kyslého hydrolyzátu keratínu peria. Aminokyseliny: 1. kyselina asparágová, 2. ?, 3. cysteín, 4. cystín, 5. ?, 6. kyselina glutamová, 7. serín, 8. glycín, 9. treonín, 10. histidín + lyzín, 11. alanín, 12. tyrozín, 13. arginín, 14. valín + metionín, 15. leucín + izoleucín, 16. prolín, 17. fenylalanín.

Chromatograficky sa zistili tieto aminokyseliny: kyselina asparágová, kyselina glutamová, cystín, cysteín, metionín, serín, glycín, treonín, histidín, lyzín, alanín, tyrozín, arginín, valín, leucín, izoleucín, prolín, fenylalanín, tryptofán a dve neidentifikované, na ninhydrín reagujúce škvrny, pravdepodobne vápenaté soli niektorých z prítomných aminokyselín.

Ako vidieť, spôsob hydrolyzy bielkoviny peria má značný vplyv na kvalitu hydrolyzátu a teda i na jeho biologickú hodnotu vzhľadom na rozličné možnosti použitia.

Súhrn

Sledoval sa spôsob hydrolytického štiepenia bielkoviny slepačieho peria pôsobením minerálnych kyselín a hydroxydov. Zistili sa niektoré nevýhody

alkalickej hydrolýzy v porovnaní s kyslou hydrolýzou, ktoré spočívajú najmä v deštruktívnom účinku hydroxydov na bielkoviny, pozorovanom zo zníženia množstva aminodusiáka v priebehu hydrolýzy. Nepriaznivý priebeh alkalickej hydrolýzy sa prejavil aj v kvalitatívnom a kvantitatívnom zastúpení aminokyselín vo výslednom produkte.

V získaných hydrolyzátoch sa chromatograficky zistilo 19 aminokyselín a dve ninhydrínom detegované, avšak neidentifikované škvrny.

ЗАМЕТКА К СПОСОБУ ГИДРОЛИТИЧЕСКОГО РАСПЩЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ ПЕРЬЯ

И. ВЕЛИКИЙ, А. КОШАЦКА

Кафедра технической микробиологии и биохимии Словацкой высшей технической школы
в Bratislave

Выводы

Исследован способ гидролитического расщепления белков куриного перья действием минеральных кислот и щелочей. Определены некоторые невыгоды щелочного гидролиза в сравнении с кислым гидролизом, состоящие особенно в разрушительном действии оснований на белки, наблюдаемого из понижения количества аминокислот в течении гидролиза. Неблагоприятный ход щелочного гидролиза проявился тоже в качественном и количественном составе аминокислот в финальном продукте.

В приобретенных гидролизатах хроматографически определилось 19 аминокислот и две нингидрином проявленные, но не идентифицированные пятна.

Поступило в редакцию 22. 2. 1957 г.

BEITRAG ZUR ART DER HYDROLYTISCHEN SPALTUNG VON FEDEREIWEISS

I. VELIKÝ, A. KOSSACZKA

Lehrstuhl für technische Mikrobiologie und Biochemie an der Slowakischen Technischen
Hochschule in Bratislava

Zusammenfassung

Die Autoren untersuchten die Art der hydrolytischen Spaltung von Hühnerfedereiweiss durch Einwirkung von Mineralsäuren und Hydroxyden. Es wurden einige Nachteile der alkalischen Hydrolyse gegenüber der sauren Hydrolyse festgestellt, welche namentlich in einer destruktiven Wirkung von Hydroxyden auf Eiweissstoffe beruhen und die aus der Erniedrigung der Menge des Aminostickstoffs beobachtet wurden. Der ungünstige Verlauf der alkalischen Hydrolyse kam auch im qualitativen und quantitativen Vorhandensein von Aminosäuren im Endprodukt zum Ausdruck.

In den erhaltenen Hydrolysaten wurden chromatographisch 19 Aminosäuren und zwei durch Ninhydrin sichtbargemachte, aber nicht identifizierte Flecke festgestellt.

In die Redaktion eingelangt den 22. 2. 1957

LITERATÚRA

1. Graham C., Waitkoff H., Hier S., J. Biol. Chem. 117, 529 (1949). —
2. Heintze K., Z. Lebensmitt. Untersuch. Forsch. 100, 253—260, 463—470 (1955).
- 3. Vickery H., J. Biol. Chem. 53, 495 (1922). — 4. Greenberg D. M., Burk N. F., J. Am. Chem. Soc. 49, 275 (1927). — 5. Block R. J., *Advances in Protein Chemistry II*, New York. — 6. Warner A. R. C., J. Biol. Chem. 142, 741 (1942). —
7. Neuberger A., *Advances in Protein Chemistry IV*, New York 1948, 298. —
8. Cohn E. J., Edsall J. T., *Proteins, Aminoacids and Peptides*, New York 1943, 358. — 9. Astbury W. T., *Advances in Enzymology* 3, 78 (1943). — 10. Abderhalden E., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 77, 22 (1912).

Došlo do redakcie 22. 2. 1957