

Barbara BARANIAK, Maria BUBICZ

**Wpływ konserwantów na aktywność proteolityczną enzymów w sokach
otrzymanych z zielonych części roślin**

Effect of Preservatives on Activity of Proteolytic Enzymes in Green Juice Expressed from Plants

Obserwowany na całym świecie deficyt białka paszowego spowodował intensywne badania nad uzyskiwaniem różnych preparatów ze źródeł niekonwencjonalnych – m. in. biomasy drożdży, bakterii pleśni, alg, odchodów zwierzęcych, odpadów poubojowych, kryla czy wreszcie zielonych części roślin. Rośliny pastewne zasobne w białko wykorzystywane są w żywieniu zwierząt poligastrycznych. Wysoka zawartość włókna ogranicza jednak ich przydatność w żywieniu zwierząt monogastrycznych. Oddzielenie białek od balastu włókna stwarza możliwości stosowania zielonych części roślin jako dodatkowego źródła białka w żywieniu nieprzeżuwaczy, a także ludzi.

Proces odzyskiwania białek z roślin można podzielić na trzy etapy: rozdrabnianie surowca roślinnego, tłoczenie z uzyskanej pulpy soku i koagulację białek zawartych w zielonym soku. O wydajności ekstrakcji mechanicznej białek z wegetatywnych części roślin decydują dwa pierwsze etapy procesu. Uzależnione są one od gatunku i fazy rozwojowej rośliny, sposobu i stopnia jej zmacerowania, pH rozdrobnionego materiału, obecności związków fenolowych i działania enzymów hydrolitycznych i utleniających (1, 5, 6, 7, 9)

W celu podniesienia wydajności ekstrakcji prowadzone są próby reekstrakcji zielonki, alkalizowania zmacerowanego materiału lub dodawania do niego wody, roztworów detergentów oraz węglanów i fosforanów (2, 3).

Na podział białka pomiędzy sok a wytloki mają wpływ takie parametry, jak czas upływający pomiędzy zbiorem rośliny a procesem tłoczenia soku, kwasowość pulpy roślinnej czy dodatek do niej środków chemicznych w charakterze konserwantów. Ograniczenie strat białka podczas zbioru rośliny i tłoczenia soku można uzyskać poprzez obniżenie aktywności proteaz (4). Proces biosyntezy białek zostaje zahamowany w momencie ścięcia rośliny, natomiast ich proteoliza przebiega nadal (4, 8). Straty białka spowodowane działaniem enzymów proteolitycznych zarówno w materiale roślinnym, jak i w otrzymanym z niego soku, mogą sięgać aż do 50 % (4). Dlatego też celem niniejszej pracy było oznaczenie wpływu środków konserwujących dodawanych do pulp roślinnych na zmiany aktywności enzymów proteolitycznych w sokach otrzymanych w procesie tłoczenia tych pulp.

METODYKA BADAŃ

Materiałem do badań była zielonka lucerny, koniczyny, trawy, wyki, gryki, łubinu i liści buraka cukrowego zbierana przed kwitnieniem z pól doświadczalnych RZD w Felinie i IUNG w Puławach. Rośliny mielono wstępnie przy pomocy prasy śrubowej. Do tak uzyskanych pulp roślinnych dodano następujące środki konserwujące (w ilości 10 g na 1 kg pulpy): siarczyn sodu, kwas cytrynowy, kwas propionowy, kwas benzoowy, zasada sodowa. Z tak przygotowanych pulp, jak również z pulpy bez dodatków chemicznych (przyjętej za kontrolę) wyłoczono sok stosując prasę ślimakową. Materiał włóknisty usunięto z soku przy pomocy sita o średnicy $0,15 \times 10^{-3} = 100$ mesh.

Oznaczenie sumarycznej aktywności enzymów proteolitycznych prowadzono stosując jako substrat kazeinę, gdyż na tym substracie proteaza jest aktywniejsza, niż na białku liściowym. Tok postępowania był następujący: do analizy pobierano 0,5 ml odwirowanego soku roślinnego i wprowadzono do niego 4 ml 5 % roztworu kazeiny w buforze fosforanowym o pH=5,7 (4). Próbkę hydrolizowano w 40°C przez 18 godzin. Po tym czasie niezhydrolizowane białko wytrącono 4 ml 24 % TCA i pozostawiono na 20 godzin w 4°C. Osad odsączono, a ilość białka w otrzymanym przesączu oznaczono metodą Lowry (7). Pomiaru ekstynkcji dokonywano wobec próby kontrolnej. W przypadku próby kontrolnej tok postępowania był następujący: do 4 ml 5 % roztworu kazeiny o pH=5,7 wprowadzono 0,5 ml soku i natychmiast hamowano hydrolizę białka 4 ml 24 % TCA. Następnie postępowano tak samo, jak z badaną próbką. Różnica ekstynkcji pomiędzy obiema próbami stanowi ekstynkcję białka zhydrolizowanego. Ilości białka obliczono z krzywej wzorcowej, wyznaczonej dla różnych stężeń tyrozyny. Aktywność enzymatyczną wyrażono w mikromolach tyrozyny uwolnionej przez 1 ml soku w ciągu godziny.

WYNIKI I DYSKUSJA

Jednym z głównych czynników zmniejszających ilość białka odzyskanego w postaci koncentratów wytrąconych z soków zielonych części roślin jest hydroliza enzymatyczna białek zawartych w tych sokach. Niskocząsteczkowe produkty tej hydrolizy nie ulegają koagulacji, pozostając w przesączu. Dlatego oznaczenie aktywności enzymów proteolitycznych oraz określenie czynników inhibitujących proteolizę ma duże znaczenie w procesie maksymalnego odzysku białek z tych soków. Przeprowadzone badania zmian aktywności enzymów proteolitycznych z pulp różnych roślin traktowanych środkami konserwującymi wykazały, że zmiany aktywności uzależnione były od gatunku rośliny i od wprowadzonego konserwantu. Enzymy w soku wyłoczonym z gryki i łubinu okazały się najmniej aktywne (0,3 $\mu\text{mol/ml/h}$), natomiast sok z lucerny i wyki charakteryzowała największa aktywność enzymów proteolitycznych (1,1 $\mu\text{mol/ml/h}$). Zastosowanie konserwantów spowodowało niewielkie wahania oznaczanej wartości dla soku z lucerny i łubinu, podczas gdy duże zmiany uzyskano dla soku z koniczyny, wyki i gryki (tab. 1).

Tab. 1. Wpływ wybranych związków chemicznych na aktywność proteolityczną enzymów w sokach otrzymanych z zielonych części roślin

Effect of the chosen chemical compounds on proteolytic activity of enzymes in the green juices expressed from plants

Roślina	Kontrola (bez konserwantu)	Siarczyn sodu	Kwas propionowy	Kwas benzoowy	Kwas cytrynowy	Wodorotlenek sodu
Liść buraka cukrowego	0,43	0,48	0,50	0,43	0,60	0,41
Koniczyna	0,64	0,66	0,12	0,36	0,42	0,62
Trawa	0,69	0,86	0,58	0,62	0,55	0,77
Lucerna	1,15	1,12	1,13	1,06	0,83	1,30
Wyka	1,13	1,15	0,55	0,70	0,58	0,98
Gryka	0,31	0,43	0,36	0,05	0,05	0,05
Łubin	0,33	0,41	0,42	0,41	0,31	0,31

Z zastosowanych konserwantów tylko siarczyn sodu podwyższał aktywność enzymów w sokach prawie wszystkich badanych roślin, natomiast obniżył tę wielkość kwas benzoesowy (tu wyjątek stanowił sok łubinu), przy czym procent zmian był różny w zależności od gatunku rośliny.

Enzymy proteolityczne są różnorodne pod względem swojej specyficzności w stosunku do substratu, a ściślej do położenia rozkładanego wiązania peptydowego. Jedne z nich hydrolizują wiązania peptydowe wewnątrz łańcucha białkowego, a inne wiązania skrajne. Mechanizm rozkładania wiązania peptydowego jest również inny – typowe enzymy roślinne papaina i ficyna zawierają w centrum aktywnym grupy – SH cysteiny. W przeprowadzonych badaniach zastosowano ten sam substrat i otrzymane zmienne aktywności enzymów proteolitycznych dla soków różnych roślin wynikają ze zróżnicowanego ich składu chemicznego. Wiadomo bowiem, iż na aktywność enzymów wpływają również inne czynniki kinetyczne, takie jak pH, stężenia współdziałających koenzymów, sprzężenia zwrotne związane z wpływem produktów reakcji jako efektorów allosterycznych i wreszcie obecność innych substancji. Obecność w pulpie roślinnej środków konserwujących zmienia aktywność enzymów poprzez zmianę pH pulpy, jak również poprzez oddziaływanie ze składnikami danej rośliny.

Badania F i n l e y' a (4) udowodniły inhibicyjny wpływ simazyny i jodooctanu na aktywność enzymów proteolitycznych w soku z lucerny. W przeprowadzonych badaniach obok różnorodnego wpływu konserwantów stwierdzono również zróżnicowany wpływ czasu na aktywność enzymów proteolitycznych (tab. 2). Dla soku otrzymanego z trawy i

Tab. 2. Wpływ czasu na aktywność proteolityczną enzymów w sokach otrzymanych z zielonych części roślin
Effect of time on proteolytic activity of enzymes in the green juices expressed from plants

Roślina	Sok otrzymany po 4 godz. od czasu ścięcia	Sok otrzymany po 28 godz. od czasu ścięcia	Sok otrzymany po 52 godz. od czasu ścięcia
Liść buraka cukrowego	0,43	0,58	0,37
Koniczyna	0,64	0,60	0,79
Trawa	0,69	0,74	0,86
Lucerna	1,15	1,28	1,14
Wyka	1,13	1,06	1,20
Gryka	0,31	0,13	0,19
Łubin	0,33	0,45	0,45

łubinu aktywność rosła z czasem – co świadczy o trwałości białek enzymatycznych występujących w tych roślinach, dla soku z gryki malała, dla liści buraka cukrowego i lucerny enzymy były aktywniejsze po 28 godzinach, niż po 52 godzinach, natomiast dla wyki i koniczyny aktywniejsze były po 52 godzinach. Procent uzyskanych zmian w zależności od czasu był różny – największy w przypadku liści buraka cukrowego i łubinu, najmniejszy dla soku wyki i koniczyny. Przyrost a późniejszy spadek aktywności enzymów w przypadku liści buraka cukrowego i lucerny mógł być spowodowany namnażaniem się na nich mikroorganizmów, które są zdolne wytwarzać i wydzielać do środowiska peptydazy i enzymy proteolityczne.

Tab. 3. Wpływ pH na aktywność proteolityczną enzymów w sokach otrzymanych z zielonych części roślin
Effect of pH on proteolytic activity of enzymes in the green juices expressed from plants

Roślina	pH					
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
Liść buraka cukrowego	0,35	0,44	0,34	0,24	0,18	0,09
Koniczyna	0,58	0,63	0,60	0,53	0,42	0,29
Trawa	0,59	0,69	0,63	0,55	0,46	0,38
Lucerna	1,16	1,17	1,17	1,15	0,81	0,29
Wyka	1,11	1,13	1,14	0,86	0,67	0,21
Gryka	0,23	0,31	0,27	0,19	0,04	0,02
Łubin	0,21	0,33	0,29	0,25	0,18	0,09

Najstabilniejsze w czasie, a jednocześnie najbardziej aktywne okazały się enzymy występujące w soku z lucerny i wyki. Odporność na zmiany pH soku była w przypadku tych roślin również największa (tab. 3). Dla większości badanych soków maksimum aktywności enzymów znaleziono w pH=5,0. Dalsze alkaliczowanie środowiska powodowało stopniowo inhibitowanie proteolizy, przebiegające najszybciej dla soku z gryki, bo już w pH=6,0. Z uzyskanych zależności aktywności enzymów proteolitycznych od pH wynika, iż ich zahamowanie może być spowodowane zalkalizowaniem soku do pH powyżej 8, natomiast zakwaszenie poniżej pH-4 powoduje koagulację białek obecnych w soku. Przeprowadzone badania dowodzą, iż ograniczenie strat białka poprzez inhibicję aktywności enzymów proteolitycznych jest procesem złożonym. Warunkuje go zarówno gatunek zastosowanej rośliny, jak również różnicowanie parametrów we wszystkich etapach otrzymywania koncentratów białkowych z soków zielonych części roślin.

PIŚMIENNICTWO

1. Betschart A., Kinsella J.: Extractability and Solubility of Leaf Protein. *J. Agric. Food Chem.* 21, 60. 1973.
2. Chayen I., Smith R.: The Isolation of Leaf Components. *J. Sci. Foods Agric.* 12, 502. 1961.
3. Edwards R. de Fremery P.: Use of Recycled Dilute Alfalfa Solubles to Increase the Yield of Leaf Protein. *J. Agric. Food Chem.* 26, 738. 1978.
4. Finley J. W., Pallavicini C., Kohler G. O.: Partial Isolation And Characterisation of Medicago Sativa Leaf Proteases. *J. Sci. Food Agric.* 31, 156. 1980.
5. Free B., Satterlee L.: Biochemical Properties of Alfalfa Protein Concentrate. *J. Food Sci.* 40, 85. 1975.
6. Knuckles B., Spencer R.: PRO-XAN Process: Incorporation and Evaluation of Alfalfa. *J. Agric. Food Chem.* 18, 1086. 1977.
7. Lowry O., Rosebriought N.: Protein Measurement with Follin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265. 1951.
8. Nagy S., Telek L.: Potential Use for Protein from Tropical and Subtropical and Plant Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1016. 1978.
9. Ostrowski-Meisner H. T.: Optimization of the Protein Extraction Process from Grasslands in Temperate and Subtropical Regions in Leaf Protein Concentrates. Ed. Telek L. and Graham H. D. AVT Publishing Co. INC. Westport, Connecticut, USA, 562. 1983.

SUMMARY

Proteolytic activity of plant juice from the following plants: alfalfa, clover, grass, leaves from sugar-beet, lupin, vetch, waterpepper and buckwheat as well the effect of preservatives added to the plant pulp on this activity were determined.

The activity of proteolytic enzymes in juice from clover and grass was 0.5-0.7 $\mu\text{mol/ml/h}$ and only 3.0 $\mu\text{mol/ml/h}$ for juice from lupin, sugar-beet leaves and buckwheat. The activity of enzymes was stable in a wide range of pH (4-7) for all plants juices, and in alkali solution pH 8.5 the sharp decrease of proteolytic activity was observed especially for vetch and alfalfa juices.

The strong influence of propionic acid on proteolytic activity was observed in juices from clover, grass and vetch, and the proteolytic activity was two to three times less than that found in control. The same changes of proteolytic activity were also observed with benzoic acid (in clover, grass, vetch and buckwheat), but in alfalfa juice no changes were observed.