

IMPACTUL TRATAMENTELOR TEHNOLOGICE ASUPRA ACTIVITĂȚII UREAZICE A BOABELOR DE NĂUT

O. Gutium¹, drd¹, lector univ., J. Ciumac¹, dr.ing.prof.

¹Universitatea Tehnică a Moldovei

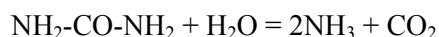
INTRODUCERE

Boabele de năut constituie o materie primă deosebită pentru alimentația umană în primul rând pentru conținutul înalt de proteine. Însă asimilarea proteinelor năutului (și a altor boabe leguminoase) este limitată de prezența așa numitor factori antitripsici. Acestea sunt compuși proteici, care afectează activitatea (antienzimatică) a tripsinei și chimotripsinei la nivelul pancreasului exocrin. Ei se leagă la un reziduu AA al enzimei și blochează centrele active ale enzimelor, care perturbă formarea complexului enzimă-substrat și, astfel, digestia proteinelor. Tratamentele tehnologice ale năutului prin efectele conjugate a temperaturii, umidității, încolțirii ar putea conduce la diminuarea factorului antitripsic și la ameliorarea performanțelor nutritive ale boabelor [1].

Inhibitorul natural din soia (inhibitorul Bowman - Birk), descoperit în anul 1946, formează, împreună cu tripsina, un complex ireversibil, indiferent de cantitatea totală de tripsină din sistem.

Pentru ca determinarea activității antitripsice este destul de complicată și anevoioasă, prezența și activitatea inhibitorului activ al tripsinei sunt adesea determinate indirect prin măsurarea activității ureazei. Aceasta enzimă este prezentă în boabele leguminoase, iar impactul factorilor tehnologici asupra ratei de inactivare a ureazei corelează bine cu impactul acelorași factori asupra inhibitorului tripsinei [2,3].

Ureaza (E.C.3.5.1.5.) este o metaloenzimă dependentă de Ni [4], care catalizează hidroliza ureei la amoniac și dioxid de carbon.



Este produsă de plante, fungi și bacterii, dar nu și de animale; ureazele prezintă omologii semnificative și mecanisme similare de catalizare, dar diferă în structurile cuaternare. În timp ce ureazele produse de plante și fungi sunt proteine homo-oligomerică de 90 kDa [5], cele produse de bacterii sunt multimerice de două sau trei complexe de subunități [6].

În același timp ureazele prezente în produsele alimentare și cele bacteriene provoacă

manifestări morbide și conduc la apariția unor boli ale tractului urinar și a regiunii gastroduodenale, incluzând cancerul [7].

În industrie ureazele imobilizate sunt larg folosite pentru eliminarea ureei din apele reziduale și din băuturile alcoolice, la încălzirea cărora ureea interacționează cu alcoolul etilic și formează uretan-substanță cu proprietăți cancerigene [8].

1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

1.1. Materiale

Boabele de năut, roada 2012, au fost colectate de Institutul de Selecție a Plantelor, or. Bălți din Republica Moldova și au corespuns cerințelor STAS - ului 8758-76.

1.2. Metode de cercetare

Tratamente tehnologice. Boabele de năut au fost supuse înmuierii (pînă la 12 ore), germinării (înmuierie în apă 12 ore și germinare pînă la 72 ore) și fierberii -2 ore. Înmuieria și fierberea au fost realizate în apă, soluții de aczi, de săruri și de zaharuri.

Uscarea și măcinarea boabelor. Boabele tratate au fost uscate în uscătorie convectivă de laborator cu circulație forțată a aerului la temperatura camerei pînă la masa constantă. Măcinarea a fost realizată în rîșniță de cafea Moulinex AR100G.

Determinarea activității ureazice. Determinarea activității ureazice se bazează pe creșterea pH-ului mediului datorită amoniacului eliberat din uree sub acțiunea ureazei reziduale din produsul analizat [9, 10]. Probele de lucru și de referință (etalon) au fost pregătite astfel:

Proba de lucru: 10 ml de soluție de uree (3% în 0.2 M tampon fosfat, pH 7.00) + 0,2 g de făină de năut.

Soluția de referință: 10 ml 0,2 M tampon fosfat (pH 7.00) + 0,2 g de făină de năut.

Ambele probe au fost incubate 30 min, la 30°C, sub agitare. Imediat după expirarea timpului de incubare în ambele probe s-au adăugat câte 10 ml HCl 0,1 N, probele s-au răcit rapid pînă la 20°C, apoi au fost transferate cantitativ în baloane de titrare și titrate cu soluție de hidroxid de sodiu 0,1 N pînă la pH 4,7.

Activitatea ureazică s-a calculat după formula:

$$\text{Activ. urezică} = \frac{1,4 \cdot (V_1 - V_2)}{30 \cdot E} \text{ mg N/g} \times \text{min}, \quad (1)$$

unde: V_2 – volumul soluției de hidroxid de sodiu 0,1 N folosit la titrarea probei de lucru, ml;
 V_1 – volumul soluției de hidroxid de sodiu 0,1N folosit la titrarea probei de referință, ml;
 1,4 – cantitatea de azot corespunzătoare unui ml de hidroxid de sodiu 0,1N;
 30 – durata de hidroliză, min;
 $E_{\text{azot}} = 14 \text{ mg N / ml}$.

2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cinetica de degradare enzimatică a ureei depinde de specificitatea și activitatea ureazei, concentrația enzimei și a substratului, afinitatea enzimei față de substratul sau de reacție și de factorii de mediu factorii temperatura, pH, prezența electroliților, activatorilor ori inhibitorilor [11].

Activitatea ureazică a boabelor native de năut constituie 1,16 mg N/g/min și este mult mai mică decît cea a boabelor de soia (5-10 mg N/g/min), dar mai mare decît valoarea admisă pentru preparatele proteice (max 0,5 mg N/g/min).

2.1. Impactul temperaturii

Rezultatele impactului temperaturii mediului asupra activității ureazei sunt prezentate în figura 1.

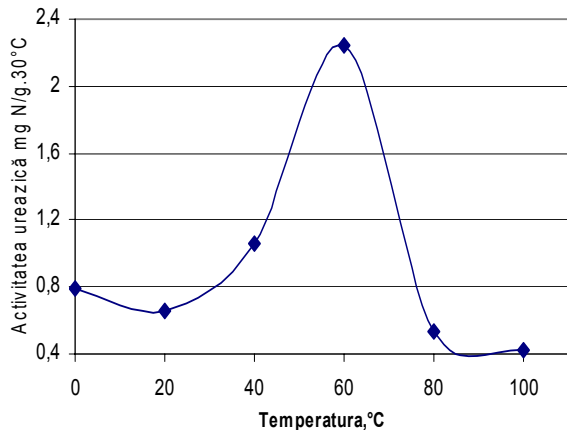


Figura 1. Dependența activității ureazice a boabelor de năut înmuiate în funcție de temperatură

Astfel odată cu creșterea temperaturii de la 0°C pînă la 60°C (picul activității ureazice) activitatea ureazei crește, iar la temperaturi mai mari de 60°C, relația dintre activitatea catalitică și temperatura este inversă. Prin urmare ureaza năutului este o enzimă termostabilă.

Temperatura activității optimele a ureazei din năut este asemănătoare cu cele ale ureazelor din unele varietăți de fasole [12], fungii *Rhizopus* [13], specia de bacterii *Yersinia enterocolitica* [14], frunzele de talpa găștii *Chenopodium album* [15], care constituie 60, 55, 65, 60°C, respectiv.

Rezistența termică relativ înaltă a ureazei este probabil determinată de conformația structurală stabilă a enzimei și de legăturile puternice ale nichelului cu centrul activ al ei. În consecință inactivarea totală a enzimei are loc doar la temperaturi destul de înalte.

2.2. Impactul înmuierii și germinării

Evoluția activității ureazice pe parcursul înmuierii și germinării boabelor de năut este prezentat în figura 2.

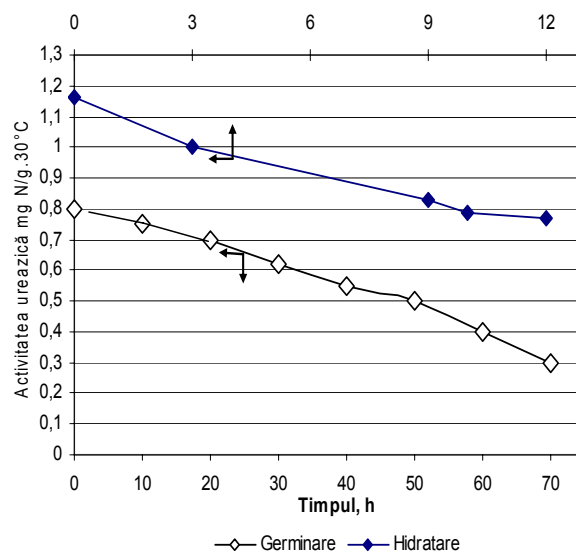


Figura 2. Dependența activității ureazice de durata de înmuier și de germinare a boabelor de năut

Astfel activitatea ureazei scade gradual atât la înmuieria boabelor cât și la germinarea lor. Rezultate asemănătoare au fost relatate pentru boabele de soia [16, 17], lentile și mazăre [18].

Scăderea activității enzimatică poate fi determinată pe de o parte de legivarea enzimei în mediul de înmuier și de modificările biochimice și fizico-chimice care intervin în procesul germinării.

Orf și colegii (2007) au arătat că în timpul germinării are loc transformarea enzimelor în subunități cu masă moleculară redusă, dar care din

punct de vedere imunochimic sunt identice cu cele de origine inițială [19,20]. Acestea au solubilitate mărită și difundează ușor în mediul apos [21]. În rezultat activitatea ureazică a boabelor scade.

2.3. Impactul duratei tratamentului termic și a compoziției mediului de fierbere

Impactul duratei tratamentului termic și a compoziției mediului de fierbere este prezentat în figurile 3 și 4.

Fierberea boabelor în apă distilată în decurs de 4 ore antrenează o reducere semnificativă a activității ureazice de la 0,79 mg N/g/min pînă la 0,18 mg N/g/min. Valoarea activității ureazice reziduale după fierbere depinde de prezența aditivilor în mediul de fierbere.

Prezența acizilor (citric și oxalic) și a sărurilor (NaCl, NaHCO₃ și extract de cenușă) accelerează viteza de inactivare și diminuează activitatea reziduală a ureazei după fierbere, iar zaharurile (zaharoza și fructoza) au un impact protector asupra inactivării și măresc valoarea activității reziduale a ureazei.

Dependența activității ureazice de concentrarea și natura acizilor din mediu este determinată de modificarea pH-ului și poate fi explicată de schimbările structurale care au loc în proteina enzimatică odată cu variația pH-ului. Structura terțiară a enzimei depinde de multiple interacțiuni intramoleculare, în primul rînd de legăturile de hidrogen dintre grupările funcționale ale aminoacizilor enzimei. Modificarea pH-ului afectează și gradul de ionizare a catenelor laterale a aminoacizilor, structura terțiară, perturbă conformația nativă și provoacă denaturarea enzimei [22].

Prezența sărurilor mărește forța ionică a mediului- un alt parametru important, care influențează conformația proteică și activitatea enzimelor, în special în cazul în care enzimele și substratul au sarcini electrice. Această influență este destul de complexă și specifică fiecărei enzime.

Modificarea forței ionice a mediului afectează natura polară a proteinelor și solubilitatea lor. În acelaș timp prezența sărurilor intervine și în stabilitatea grupărilor hidrofobe a proteinelor. Apa interacționează cu regiunile hidrofobe, iar prezența ionilor solvatați provoacă expunerea lor la suprafață și precipitarea enzimelor [23]. Toate acestea conduc la scăderea activității enzimelor.

Zaharurile au un impact protector asupra activității enzimatice [24], și denaturării chimice și termic a proteinelor [25].

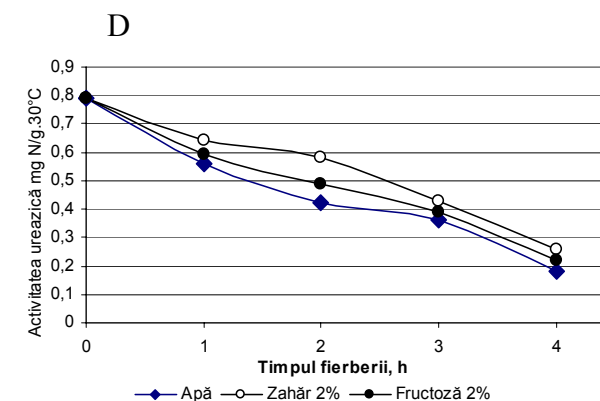
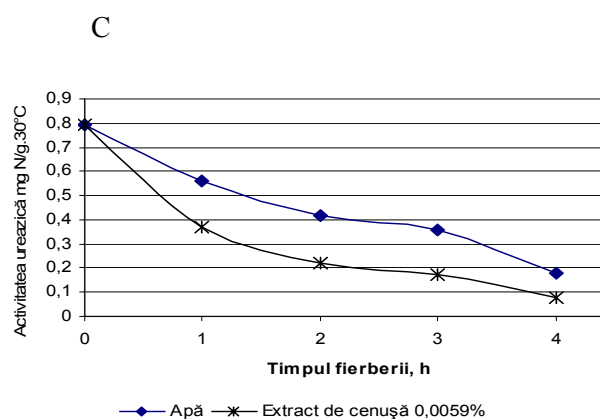
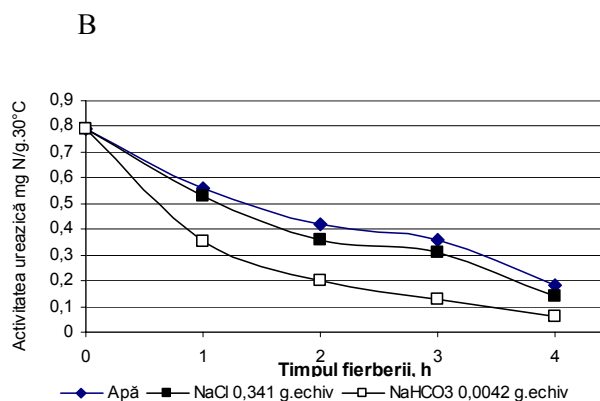
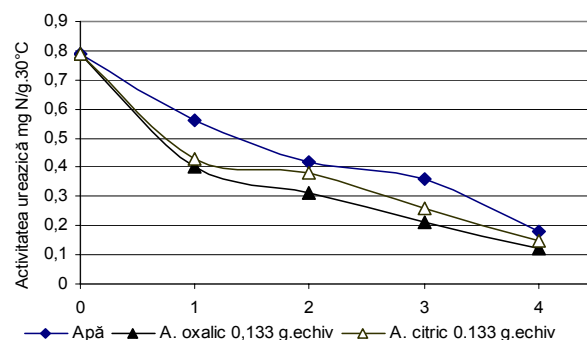


Figura 3. Impactului duratei de fierbere a boabelor de năut (înmuiate preliminar 10 ore) în apă și în soluții de acizi alimentari (A), săruri (B), extract de cenușă (C) și zaharuri (D) asupra activității ureazice.

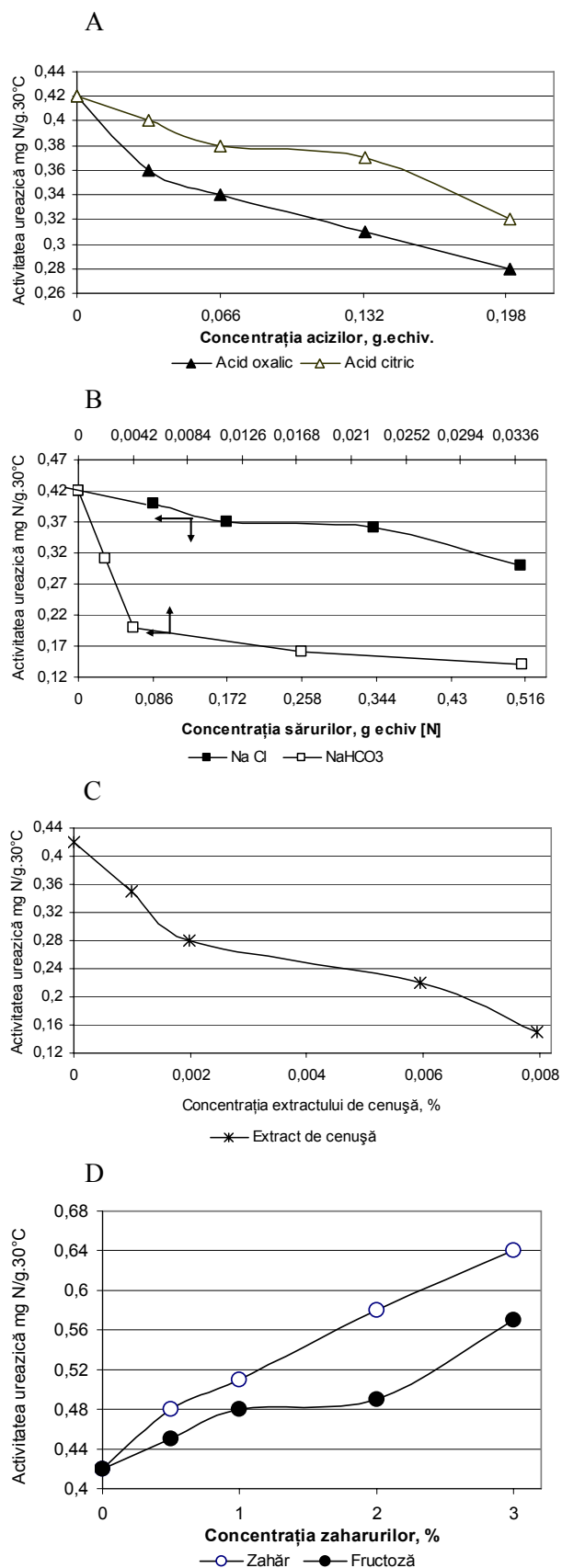


Figura 4. Impactului compozitiei mediului de fierbere (2h) a boabelor de năut asupra activității uriazice A) acizi; B) săruri; C) extract de cenușă; D) zaharuri.

Natura exactă a interacțiunilor care guvernează stabilitatea mediată de zaharuri asupra proteinelor nu este încă foarte clară. Xie G, Timasheff S. (1997) consideră că hidratarea preferențială a zaharurilor (care sunt și cosolvenți) limitează hidratarea și stabilizează structura pliată a proteinelor.

Aceiași autori afirmă că un alt factor care ar provoacă hidratarea preferențială a proteinelor poate fi creșterea tensiunii superficiale a mediului. Bolen și colaboratorii [26], au arătat că interacțiunile cumulative dintre aminoacizii catenelor laterale și substanțele osmolite (inclusiv zaharoză) favorizează desfășurarea proteinelor, iar efectul stabilizator al lor este determinat de interacțiunile peptidă-osmolit.

CONCLUZII

Activitatea ureazică a boabelor native de năut constituie 1,16 mg N/g/min și este mai mică decât cea a boabelor de soia (5-10 mg N/g/min), dar mai mare decât valoarea admisă pentru preparatele proteice (max 0,5 mg N/g/min). La înmuierea și germinarea boabelor activitatea uriazică scade cu 25 și 74% respectiv. Valoarea activității reziduale a ureazei după fierberea boabelor depinde de durata fierberii și compoziția mediului de fierbere.

Prezența sărurilor și acizilor în mediul de fierbere accelerează procesul de inactivare a ureazei, iar zaharurile au efect protector asupra inactivării.

Bibliografie

1. **Lessire, M., Leclercq B.** Variabilité de la valeur énergétique de la graine de soja traitée pour les volailles. *INRA Prod. Anim.*, 1(4), pag. 265-270, 1988.
2. **Allan, K., Belter, P. A., Anderson R. L.** Urease Activity in Soybean Meal Products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Issue, Vol. XXXIII, No.8, pag. 360-363, 1956.
3. **Krička, T., Jurišić, V., Voća, Curić, N., Brlek Savić, D., Matin, A.** Amino Acid Composition, Urease Activity and Trypsin Inhibitor Activity after Toasting of Soybean in Thick and Thin Layer. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol. 74, No. 3, pag. 209-213, 2009.
4. **Takishima, K., Suga, T.** The structure of jack bean urease. The complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. *Eur J. Biochem* 175: pag. 151-165, 1988.

5. **Polacco, J.C., Krueger, R.W., Winkler, R.G.** Structure and possible ureide degrading function of the ubiquitous urease of soybean. *Plant Physiol* 79: pag.794–800, 1985.
6. **Mulrooney, S.B., Hausinger, R.P.** Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Reviews* 27: pag. 239-261, 2003.
7. **Burne, R.A., Chen, Y.Y.** Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes. Infect.*, 2, pag. 533–542, 2000.
8. **Matsumoto, K.** Removal of urea from alcoholic beverages by immobilized acid urease. *Bioprocess Technol.*, 16, pag. 255, 1993.
9. **Jayaraman, J.** *Laboratory Manual in Biochemistry, 1st ed. Wiley Eastern Ltd. New Delhi, India, 1981.*
10. **Gost, 13979.9-69.** Jmîhi i shroty. Metodica vîpolnenia izmereni activnosti ureazy.
11. **Pervin, M. S., Jahan, M.G., Sarowar, R., Masud, A. K., Rahman, M. H., Shaha, R. K.** Effects of Some Environmental Variables on Urease in Germinating Chickpea (*Cicer arietinum L.*) Seed. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 9 No. 3, pag. 345-356, 2013.*
12. **Zameli, S., Ciurli, M.** Protein. *Biochem.68:* pag. 749-761, 2007.
13. **Neveen, S.I.G.** Purification and characterization of intracellular Urease Evzyme Isolated from *Rhizopus oryzae*. *Asian Net Scient Info; Biotech. 5(3): pag. 358-364, 2006.*
14. **Jugsharan, S.V., Neeru, B.** Molecular and biochemical characterization of urease and survival of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A in acidic pH in vitro. *Biomed Cent. Microbiol.9:* pag. 262, 2009.
15. **El-Shora, H.M.** Properties and immobilization of urease from leaves of *Chenopodium album C3*. *Bot Bull Aca Sini; pag. 42, 2001.*
16. **Banda, P.T. Rumosa-Gwaze, F I.** The role of fermentation and sprouting in the reduction of protease inhibitors in raw soyabeans, 2009.
17. **Liu, K., Markakis, P.** Effect of maturity and processing on the trypsin inhibitor and oligosaccharides of soybeans. *J. Food Sci.*, 52:pag. 222-225, 1987.
18. **Batra, V.I.P., Vasishtha, R., Dhindsa, K.S.** Effect of heat and germination on trypsin inhibitor activity in lentil and pigeon pea. *J. Food Sci. Technol.*, 23: pag. 260-263, 1986.
19. **Bates, R.P., Knapp, F.W., Arajo, P.E.** Protein quality of greenmature, dry mature and sprouted soybeans. *J. Food Sci.* 42, pag. 271-272, 1977.
20. **Orf, J.H., Hzmowitz, T.** Inheritance of a second SBTI-A2 variant in seed protein of soybeans. *Crop Sci.* 17, pag. 811-813, 2007.
21. **Hwang, D.L., Yang, W.K., Foard, D.E.** Rapid release of protease inhibitors from soybeans. *Immunochemical quantitation and parallels with lectin. Plant Physiol.* 61, pag. 30-34, 1978.
22. **Egwin, C.** Activatory Effect of Germination on Catalytic Capacity of Urease Extracted from Beans Samples. *International Journal of Biochemistry Research & Review* 3(1): pag.21-38, 2013.
23. **Harris E.L., Angal S.** *Protein purification methods: a practical approach. Oxford University Press, England, 1994.*
24. **Colaço, C.** Extraordinary Stability of Enzymes Dried in Trehalose: Simplified Molecular Biology. *Nature Biotechnology* 10, pag.1007 - 1011 (1992).
25. **Back, J.** Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry, 18 (23), pag. 5191–5196, 1979.*
26. **Bolen, D. W.** The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J. Mol. Biol* 310, pag. 955–963, 2001.