

Gravimetriás maceráz-aktivitás mérés

ZETELAKINÉ, HORVÁTH KORNÉLIA

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

Érkezett: 1978. május 24.

A maceráz enzim a sejtek közötti, főleg pektin anyagokból álló [1] kötőszövetet bontja. Az oldhatatlan protopektin bontásával a növényi szövetek sejtjeit oly módon választja szét, hogy eközben a sejtfalakat nem kásorítja. KAWAI [2] szerint ilyen jellegű maceráló hatás főleg azon pektinbontó enzimeknek tulajdonítható, amelyek elfolyósító és nem cukrosító hatással rendelkeznek. E típushoz tartozik a jelen munkában alkalmazott és a KÉKI-ben előállított endo-poligalakturonáz [3], amely segítségével sejtméretéig aprított, homogén zöldséglevék és gyümölcs-nektárok, zöldség- és gyümölcskrémek állíthatók elő [6]. Az endo-poligalakturonázzal készült gyümölcs ill. zöldséglevék, koktélok stabilabbak és nagyobb beltartalmi értékkel rendelkeznek a hagyományos technológiával előállított termékeknél, mivel a sértetlen sejtek megőrzik eredeti tápanyag- és vitamintartalmukat.

Az enzim gazdaságos alkalmazása optimális körülményeket igényel. Az optimális körülmények eltérők a különböző zöldség- és gyümölcsféléknél, sőt azonos zöldségfélék esetében a fajták függvényében is változnak. Célzerű ezért az optimális körülmények meghatározása minden feldolgozandó termék esetében.

Jelen munka során a gravimetriás maceráz-aktivitás mérésével olyan módszert kívántunk kidolgozni, amely rendkívül egyszerű, analitikai mérlegen kívül más műszert nem igényel, éppen ezért az ország bármely kisebb, kevésbé jól felszerelt üzemében, laboratóriumában könnyen reprodukálható.

1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Szubsztrátum

Jelen munka során a maceráz-aktivitás optimális körülményeinek kimérésére szubsztrátumként *Rózsa* burgonyafajtát alkalmaztunk.

A mérési módszerek leírása

A burgonyaszövetből dugófúró segítségével 10 mm átmérőjű hengereket készítettünk. A hengereket kettős pengével ellátott vágóeszköz segítségével 20 mm-es darabokra vágtuk (*1. ábra*), súlyukat (megközelítően 1 g) analitikai mérlegen négy tizedes pontosságig meghatároztuk. A szubsztrátumokat ezután 15 cm³-es kémcsövekbe helyeztük. Rápipettáztunk 5 cm³ enzimoldatot és 50 °C hőmérsékleten 1,5 h inkubáltuk.

Az inkubációs idő végén a burgonyahengerekről itatóspapírral eltávolítottuk a nedvességet, majd súlyukat a fenti pontossággal visszamértük.

A maceráz enzim hatását a súlycsökkenés eredeti súlyra vonatkoztatott százalékos értékével jellemeztük.

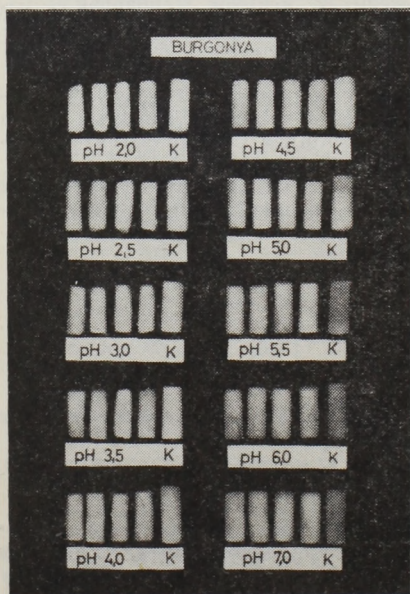
Kontrollként pufferben inkubált burgonyahengerek szolgáltak, amelyek súlycsökkenését a vizsgált minták súlycsökkenéséből levontuk.

A mérések minden esetben 5 párhuzamosban történtek.

Vizsgált enzimmészítmények

Az almaléridítő poligalakturonáz (PG 177) egy *Asp. foetidus* törzs szubmersz fermentációval, előállított [3] terméke (KÉKI Kísérleti Üzemi gyártás). A készítmény endo-poligalakturonáz (endo-PG) aktivitása ($SPA_{75}^{Na-pektát}$): $245 \text{ l h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, endo-PMG aktivitása ($SPA_{75}^{Pomosing}$): $34 \text{ l h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, almaléridítő-PG aktivitása ($SPA_{75}^{almalé}$): $177 \text{ l h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. (Az almalé szubsztrátum frissen készült, Jonathan almából, specifikus viszkozitását 1,0-re állítottuk, pH-értéke (állítás nélkül) 3,8 volt. A pektin liáz (PL) és pektin metilészteráz (PME) enzimek Pomosing pektin (Pomosing Werke GmbH, NSZK) szubsztrátumon (észterezettség 70%) meghatározott aktivitásai 0,65 ill. $11,3 \mu\text{mol min}^{-1}$ értékeknek adódtak.

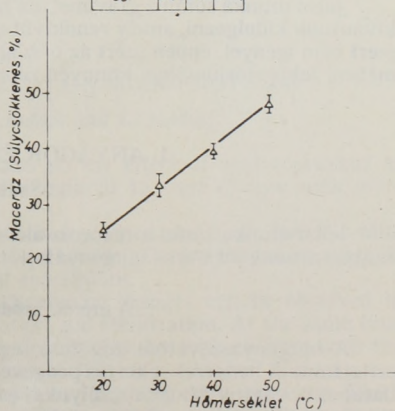
Az endo-PG enzimmészítmény (PG 225) *Aspergillus awamori* törzs szubmersz fermentációjával készült a KÉKI kísérleti üzemében [6]. Aktivitása: endo-PG



1. ábra. Az aktivitásmérésnél alkalmazott burgonyahengerek

PG 225

Hőmérs. °C	40	30	20
50	*****	*****	*****



2. ábra. A PG-225 endo-PG készítmény maceráz hatásának hőmérséklet optimuma

(SPA₇₅^{Na}-pektát): 4000 l h⁻¹ g⁻¹; endo-PMG (SPA₇₅^{P_{omosin}}): 8,79 l h⁻¹ g⁻¹. A készítmény almaléridítő-PG, pektin liáz és pektin metilészteráz aktivitással nem rendelkezett.

Enzimaktivitás mérési módszerek

A fenti enzimek aktivitás mérését az előző munkánkban leírtak szerint végeztük [4].

Matematikai statisztikai módszerek

Kiszámítottuk a mérési eredmények szórását, valamint az eredmények egyes paraméterek hatására bekövetkező változásának szignifikancia-szintjét.

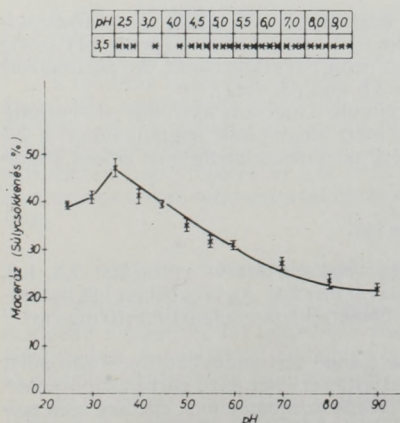
2. EREDMÉNYEK

A maceráz-aktivitás optimális körülményei

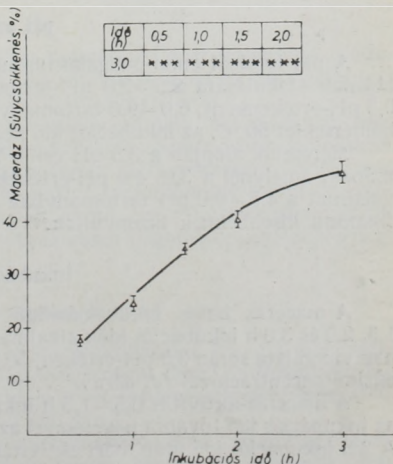
Hőmérséklet optimum

A PG-255 endo-PG enzim maceráz hatásának hőmérséklet optimumát 20–50 °C hőmérséklet tartományban vizsgáltuk, 3,5 pH-értéken McIlvain puffer alkalmazásával, 3 h inkubációs idővel (2. ábra).

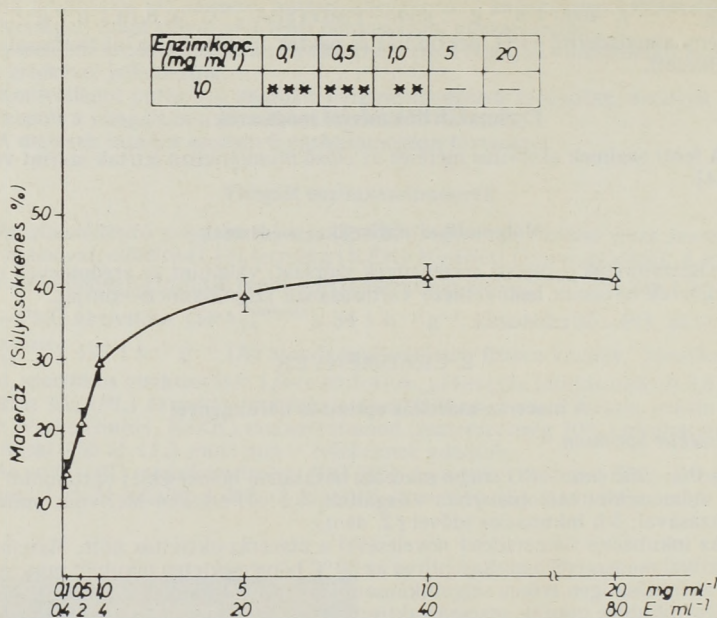
Az inkubációs hőmérséklet növelésével a maceráz-aktivitás nőtt. Matematikaai statisztikai módszerrel összehasonlítva az 50 °C hőmérsékleten inkubált minták maceráz aktivitása igen erősen szignifikánsan nagyobb volt, a 40, 30 ill. 20 °C hőmérsékleten inkubált minták maceráz-aktivitásánál. A hőmérséklet további növelése egyrészt az enzim inaktiválódása, másrészt a szövet denaturalódása miatt nem volt célszerű.



3. ábra. A PG-225 endo-PG készítmény maceráz hatásának pH-optimuma



4. ábra. A PG-225 endo-PG készítmény maceráz hatása az inkubációs idő függvényében



5. ábra. A PG-225 endo-PG készítmény maceráz hatása az enzimm koncentráció függvényében

pH optimum

A pH hatását endo-poligalakturonáz készítmény (PG-225) maceráz-aktivitásának alakulására 2,5–9,0 pH-tartományban vizsgáltuk, mégpedig pH 6,0-ig 0,5 pH-értékenként, 6,0–9,0 tartományban pedig pH értékenként. Az alkalmazott hőmérséklet 50 °C, az inkubációs idő pedig 3 h volt (3. ábra).

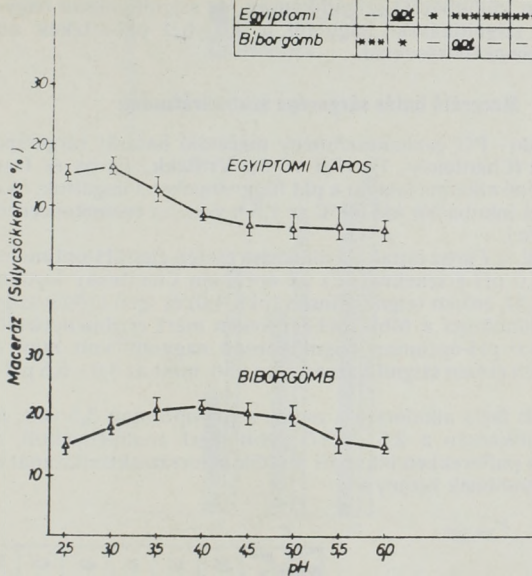
Méréseink alapján a 3,5 pH érték bizonyult a maceráz aktivitás pH-optimumának, amelynél a 3,0, 4,0 pH-értékeken mért aktivitások szignifikánsan, a 2,5 valamint a 4,5–9,0 pH tartományban mért aktivitások pedig igen erősen szignifikánsan kisebbeknek bizonyultak.

Inkubációs idő

A maceráz hatás inkubációs idő függvényében történő változását 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 és 3,0 h inkubációs idők alkalmazásával mértük. Az inkubációs idő hatásának vizsgálata során 3,5 pH-értéken, 50 °C hőmérsékleten dolgoztunk 10 mg cm⁻³-1 enzimm koncentrációval (4. ábra).

A maceráz-aktivitás 0,5–1,5 h inkubációs idő tartományban lineárisan nőtt, az inkubációs idő további növelésével az aktivitás értékét jelző görbe ellaposodott. A 3 h inkubációs idő után mért aktivitás-értékek azonban ennek ellenére igen erősen szignifikánsan kisebbnek bizonyultak a rövidebb inkubációs idők alkalmazása után mért maceráz aktivitások értékeinél.

Fajta \ pH	25	30	35	40	45	50	55	60
Egyiptomi l	--	0,06	*	**	**	**	**	**
Biborgomb	**	*	--	0,06	--	--	*	**



6. ábra. A PG – 225 endo – PG készítmény maceráz hatása a pH-függvényében különböző cékla fajták szubsztrátumként történő alkalmazása esetén

Enzimkoncentráció

A PG – 225 endo – PG enzim készítmény maceráz hatását különböző enzimkoncentrációk adagolása mellett vizsgáltuk. Az alkalmazott pH és inkubációs idő: pH 3,5 és 3 h az inkubációs hőmérséklet pedig 50 °C volt (5. ábra).

A maceráz hatás 0,1 – 1,0 mg cm³⁻¹ enzimkoncentráció tartományban lineárisan nőtt, nagyobb koncentrációknál azonban a reakciósebesség erősen lecsökkent. Az 5 mg cm³⁻¹ enzimkoncentráció alkalmazása esetén mért maceráz-aktivitás még erősen szignifikánsan nagyobb volt az 1 mg cm³⁻¹ enzimkoncentrációjú reakciókeverékben mért értéknél, az 5 és 10 ill. az 5 és 20 mg cm³⁻¹ enzimkoncentrációk alkalmazása esetén mért maceráz hatás között azonban szignifikáns különbség nem volt.

Maceráló hatás cékla szubsztrátumon

A PG 225 endo – PG enzim céklasövet maceráló hatását 2,5 – 6,0 pH tartományban vizsgáltuk két különböző céklafajta *Egyiptomi lajos* és *Biborgomb* fajták esetében. A méréseknél alkalmazott inkubációs idő és hőmérséklet 1,5 h és 50 °C, az enzimkoncentráció pedig 1 mg cm³⁻¹ volt (6. ábra).

Az enzim maceráló hatása a pH-függvényében eltérő volt a vizsgált két céklafajtánál. A *Biborgomb* fajtánál a pH-optimum 4,0-nek bizonyult, amelynek alkalmazása során mért maceráz-aktivitás nem különbözött szignifikánsan a 3,5, 4,5 ill.

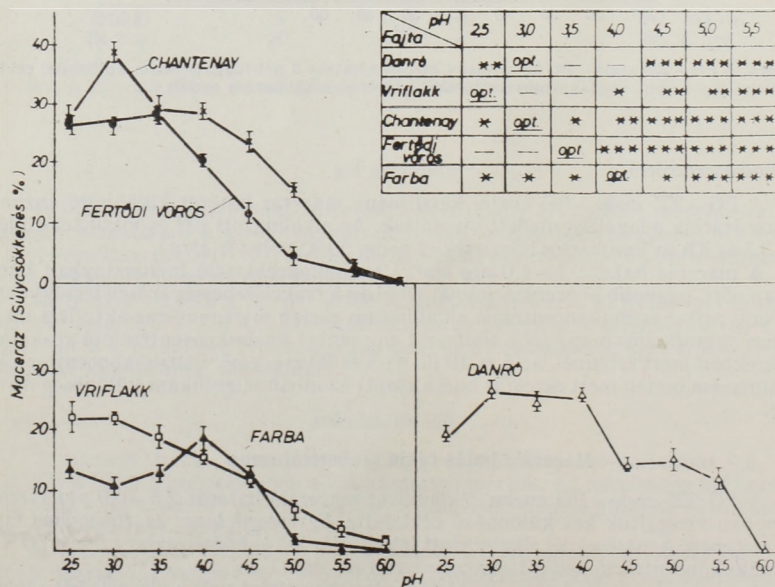
5,0 pH-értékeken mért aktivitásoktól. Az *Egyiptomi lapos* fajta szubsztrátumként történt alkalmazása esetén a pH optimum 3,0-nak adódott, amely a 2,5 pH-n mért eredményektől nem különbözött szignifikánsan, de szignifikánsan nagyobb volt a 3,5 és igen erősen szignifikánsan nagyobb a 4,0–6,0 pH-értékek alkalmazása esetén mért maceráz-aktivitásoknál.

Maceráló hatás sárgarépa szubsztrátumon

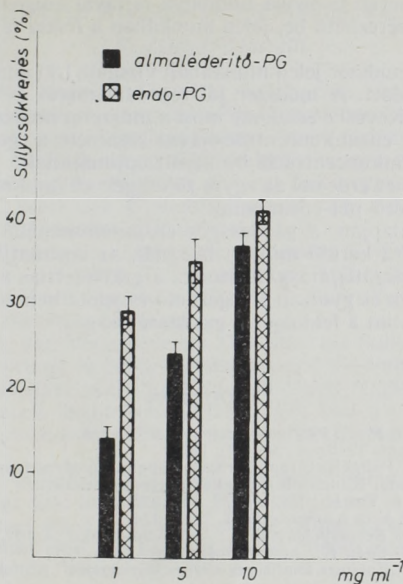
A PG 225 endo-PG enzimekészítmény maceráló hatását sárgarépa esetében öt különböző fajta (Chantenay, Fertődi vörös, Vriflakk, Farba és Danró) szubsztrátumként történő alkalmazásával a pH függvényében vizsgáltuk. Az alkalmazott hőmérséklet és inkubációs idő 50 °C és 1,5 h volt, az enzimekoncentráció pedig 1 mg cm^{-3} (7. ábra).

A Chantenay ill. a Farba fajták alkalmazása esetén éles pH-optimumok mutatkoztak a 3,0 ill. 4,0 pH-értékeknél. Ez az optimum Chantenay fajtánál szignifikánsan (pH: 2,5, 3,5), erősen szignifikánsan (pH: 4,0) és igen erősen szignifikánsan (pH: 4,5–5,5) különbözött a többi pH-értékeken mért eredményektől. A Farba fajta esetében a 4,0 pH-optimum szignifikánsan nagyobb volt mint a 2,5–4,5 pH-értékeken és igen erősen szignifikánsan nagyobb, mint az 5,0–5,5 pH-értékeken mért eredmények.

A Fertődi vörös fajta alkalmazása esetén a pH-optimum 3,5 volt, amely nem különbözött szignifikánsan a 2,5 és 3,0 pH-n mért eredményektől, azonban a 4,0–5,5 pH értékű pufferekben inkubált minták maceráz-aktivitásánál igen erősen szignifikánsan nagyobbak bizonyult.



7. ábra. A PG-225 endo-PG készítmény maceráz hatása a pH-függvényében különböző sárgarépa-fajták szubsztrátumként történő alkalmazása esetén



8. ábra

A *Vriflakk* fajta esetében 2,5–3,0 pH-optimum adódott, amely a 3,5 pH eredményétől nem különbözött szignifikánsan, de szignifikánsan nagyobb volt a 4,0 és erősen szignifikánsan nagyobb a 4,5 és 5,0 pH-n mért maceráz aktivitásoknál.

A *Danró* fajta szubsztrátumként történő alkalmazása során a 3,0 pH-optimumon mért maceráz aktivitás nem különbözött szignifikánsan a 3,5 és 4,0 pH-n mért eredményektől, de erősen szignifikánsan nagyobb volt a 2,5 és igen erősen szignifikánsan nagyobb a 4,5–5,5 pH-n inkubált minták eredményeinél.

3. KÖVETKEZTETÉSEK

Előző munkánk [5] során különböző zöldségzöveteket próbáltunk szubsztrátumként alkalmazni a maceráz enzim aktivitásának meghatározására. Vizsgálataink során a burgonyaszövetet találtuk optimális szubsztrátumnak, amelynek parenchyma sejtéből álló szövetállománya a legegységesebb volt. Az uborka szövetből hasznosítható mezokarpium az uborka súlyának csak megközelítően 50%-a volt. Az uborkaszövet felhasználása ellen szól, hogy hozzáférhetősége aránylag rövid szezonra korlátozódik. A sárgarépaszövet rutin mérésekre történő rendszeres felhasználása azért nem célszerű, mivel a szövet meglehetősen heterogén és az egyes szövetrészek azonos arányai a szubsztrátum hengerekben nem biztosíthatók. A különböző szövetrészek bonthatósága eltérő, ezért a szövetrészek eltérő rá nyai által okozott bontódási különbségek növelnék a kísérleti hibát.

A fenti munka során Gülbaba burgonya fajtával dolgoztunk, mivel azonban ez a fajta már alig szerezhető be, jelen munkában a *Rózsa* fajta használatára térünk át.

A gravimetriás módszer jelen munkában vizsgált 130 mintájának átlagos szórása 3,98%-nak adódott. A módszer jól reprodukálható és alkalmas a maceráz hatás kimutatására. Kevésbé érzékeny mint a műszeres módszer [8], amelynek 0,5 mg cm³⁻¹ optimális enzimkoncentrációjával szemben a gravimetriás mérésnél 5–10 mg cm³⁻¹ enzimkoncentráció bizonyult optimálisnak.

Feltétlen figyelmet érdemel az egyes zöldségek különböző fajtáinak munkánk során tapasztalt, eltérő pH-optimuma.

Eredményeink alapján, a gazdaságos enzimfelhasználás érdekében, célszerű az üzemi feldolgozásra kerülő minden fajtánál, az enzimátikus dezintegráláshoz optimális pH-érték megállapítása. E munka a gravimetriás módszer alkalmazásával rendkívül könnyen és gyorsan elvégezhető és jelentősen növeli az enzimkezelés hatékonyságát, valamint a feldolgozás gazdaságosságát.

IRODALOM

- (1) *Bush, D. A. és Codner, R. C.*: Phytochemistry, 7, 863, 1968.
- (2) *Kawai, M.*: J. Ferment. Technol., 50, 698, 1972.
- (3) *Zetelaki-Horváth, K.*: Poligalakturonáztermelő *Aspergillus* törzsek szaporodásának és enzimermelésének vizsgálata. Kandidátusi értekezés, Budapest, 1972.
- (4) *Zetelaki-Horváth, K. és Vas K.*: ÉVIKE 13, 93, 1972.
- (5) *Zetelaki-Horváth, K.*: Acta Alimentaria, 3, 293, 1974.
- (6) *Zetelaki-Horváth K. és Békássy-Molnár E.*: Acta Alimentaria, 4, 167, 1975.
- (7) *Zetelaki-Horváth K. és Gátaí K.*: Acta Alimentaria, 6, 355, 1977.
- (8) *Zetelaki-Horváth K.*: „Enzimes analízis és enzimdiagnosztika” Kollokvium, Mátrafüred, 1978 (előadás).

ГРАВИМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ МАЦЕРАЗЫ

К. Зетелак-Хорват

Автор для измерения активности мацеразы разработал объективный метод основывающийся на гравиметрии, который метод энзиматическое расщепление растительных тканей определяет уменьшением веса тканевых катков стандартного вида и размера. Метод подходящий для целей рутинного исследования.

Мацеразное действие охарактеризовал процентной величиной уменьшенного веса по сравнению с первоначальным весом стандартных кусков картофельных тканей.

В процессе измерения установил оптимальные условия необходимых для проведения измерения (энзиматическую концентрацию, pH, температуру и срок инкубации). В случае моркови и столовой красной свеклы влияние pH определил и в зависимости от породы.

При использовании различных тканей в качестве субстрата, автор считал наилучшим картофель, так как с точки зрения клеточного состава является самым целостным, средне чувствительно реагирующим на мацерирующее действие (значит после ферментной обработки еще легко обрабатываемый). Односортовое растение легко заготавливаемое и долго имеет в распоряжении.

Преимуществом определения мацеразы гравиметрически является то, что не требует никаких специальных средств, в случае наличия аналитических весов и термостата, на любом месте возможно применять. Результаты измерения хорошо воспроизводимы) ошибка измерения 3,98%.

GRAVIMETRISCHE MESSUNG DER MACERASE-AKTIVITÄT

K. Zetelaki-Horváth

Zur Messung der Macerase-Aktivität wurde eine objektive gravimetrische Methode entwickelt, wobei der enzymatische Abbau der Pflanzengewebe durch die Gewichtsabnahme von Gewebezylindern vom genormten Typ und Mass bestimmt wird. Die Methode ist zu Rutinuntersuchungen geeignet.

Die Macerasewirkung wurde durch den auf das ursprüngliche Gewicht bezogenen prozentualen Wert der Gewichtsabnahme der auf das genormte Mass geschnittenen Kartoffelgewebe gekennzeichnet.

Während der Messungen wurden die optimalen Bedingungen der Messung (Enzymkonzentration, pH-Wert, Temperatur und Inkubationsdauer) bestimmt. Die Wirkung des pH-Wertes wurde im Fall von Mohrrüben und Rotrüben auch als Funktion der Varietäten bestimmt.

Bei Anwendung von verschiedenen Geweben als Substrate erwies sich die Kartoffel als beste, weil sie in bezug auf Zellbestand die einheitlichste ist, und auf Mazierwirkung mit einer mittleren Empfindlichkeit reagiert (h. d. ist nach der Enzymbehandlung noch leicht behandelbar). Ein sortenechtes Produkt ist anschaffbar und steht auch während eines langen Abschnittes des Jahres zur Verfügung.

Ein Vorteil der gravimetrischen Macerasebestimmung ist, dass keine besonderen Geräte benötigt sind und dass die Methode überall anwendbar ist, wo eine analytische Waage und ein Thermostat zur Verfügung stehen.

Die Messergebnisse sind gut reproduzierbar (Messfehler: 3,98%).

GRAVIMETRIC MEASUREMENT OF MACERASE ACTIVITY

K. Zetelaki-Horváth

An objective gravimetric method was developed for the measurement of macerase activity, based on determining the enzymatic decomposition of plant tissues by the weight decrease of tissue cylinders of type and dimension. The method lends itself to routine investigations.

Macerase activity was characterized by the percentage (referred to the initial weight) of the weight decrease of potato tissues cut to standardized dimension.

In the course of measurements the optimum conditions of measurement (enzyme concentration, pH value, temperature and incubation period) were established. The effect of pH value was determined in case of carrots and beet-roots also as a function of varieties.

On applying various plant tissues as substrates, potatoes proved to be the best ones since potato tissue is the most uniform from the aspect of cell substance and reacts at a moderate sensitivity to macerating effects (and thus it can be easily treated even after enzymatic treatment). Potato product true to variety can be obtained and is available also during most periods of the year.

The gravimetric macerase determination offers the advantage that no special tools are required and the procedure can be carried out anywhere with the use of an analytical balance and a thermostat.

The results of measurements are well reproducible (the error of measurements being 3.98%).