

STANOVENIE ÚČINNOSTI PEKTOLYTICKÝCH ENZÝMOV NA SYNTETICKOM SUBSTRÁTE

LADISLAV ŠORMAN

Katedra chemickej technológie uhlohydrátov Slovenskej vysokej školy technickej
v Bratislave

Úvod

Pektolytické enzýmy sú jednou z pomocných látok, ktorá podstatne uľahčuje prácu v technológii ovocných štiav. Toto uľahčenie spočíva v enzymatickej degradácii pektínu, ktorý vo vylisovanej šťave pôsobí ako ochranný koloid zabraňujúci vylučovaniu kalov. Ak má byť šťava číra, pridá sa do nej určité množstvo pektolytických enzýmov, ktoré makromolekuly pektínu degradujú na nižšie zložky. Tento dej sa nazýva pektolýza a po jej prebehnutí je šťava pripravená na čerenie a na filtráciu.

Z chemického hľadiska je to skupina enzýmov, ktorá katalyzuje zmeny pektínových látok. Ide predovšetkým o *pektínesterázu* (pektázu, pektínmetylesterázu) a o *polygalakturonázy* (bakteriálne a plesňové pektinázy). Ešte donedávna sa medzi pektolytické enzýmy zaraďoval aj enzým *protopektináza*, katalyzujúci premenu natívneho protopektínu na normálny pektín (koloidne rozpustný). V súčasnej dobe sa existencia tohto enzýmu považuje za spornú [1]. Vo všetkých prípadoch transformácie protopektínu na pektín ide skôr o zmes pektínesterázy a polygalakturonázy. Maceračný účinok pektolytických enzýmov na rastlinné pletivá spočíva v striedavom pôsobení pektínesterázy a polygalakturonázy na protopektín.

Substrátové sú pektolytické enzýmy veľmi špecifické. Atakujú makromolekuly pektínových látok, pričom pektínesteráza zmydelňuje ich metoxylové skupiny [2] a polygalakturonáza hydrolyzuje ich glykozidické väzby [3].

Stanovenie účinnosti pektolytických enzýmov je spojené s viacerými ťažkosťami. Niektoré používané metódy sú pomerne prácne a časovo náročné (nefelometrická metóda, metóda porovnávania poklesu viskozity s úbytkom pektínu zraziteľného ako pektan vápenatý). Samo stanovenie účinnosti je zaťažené pomerne veľkou chybou, ktorú z veľkej časti spôsobuje variabilita zloženia prírodného materiálu (šťavy) používaného pri príprave substrátu. Viskozimetrická metóda, ktorú vypracoval V. Kyzlink [4] a zjednodušili A. Slavíčková [5] a F. Strmiska [6], používa jablčnú šťavu o refrakcii ca 11 %, získanú riedením jablčného koncentráту. V tejto práci sme sa pokúsili nahradiť jablčnú šťavu v substráte presne definovaným roztokom pektínu — syntetickou šťavou — ktorá by a) odstránila variabilitu zloženia prírodného materiálu a tým zlepšila reprodukovateľnosť metódy, b) bola by všeobecne dostupnejšia než jablčný koncentrát, pretože by ju bolo možné kedykoľvek pripraviť.

Experimentálna časť

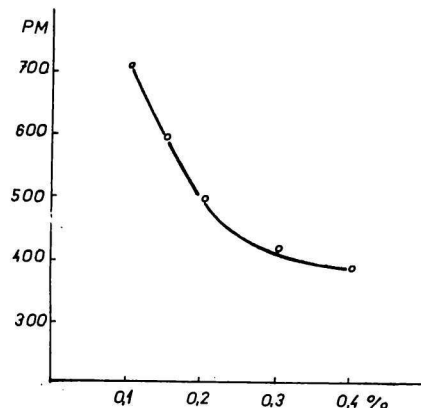
Pri pokusoch sme vychádzali z modelového roztoku, ktorý obsahoval tieto zložky: sacharózu, kyselinu vínnu, dusičnan sodný, katechín, benzoan sodný, pektín a vodu. Pri voľbe jednotlivých zložiek sme sa pokúsili do určitej miery napodobniť zloženie prírodnej jablčnej šťavy, ktorú pre tieto ciele používa V. Kyzlink [4]. Volili sme bežné, ľahko dostupné chemikálie, ktoré by reprezentovali základné zložky jablčnej šťavy: cukry, kyseliny, dusíkaté látky, triesloviny a minerálne látky. V experimentálnej práci sme skúmali význam jednotlivých komponentov šťavy vo vzťahu k aktivite pektolytických enzýmov. Pri skúmaní vplyvu tej-ktorej zložky zostávalo zloženie syntetickej šťavy konštantné a menila sa len koncentrácia skúmanej zložky.

Aktivitu pektolytických enzýmov vyjadrujeme pektolytickou mohutnosťou (PM). PM vyjadruje počet litrov šťavy obsahujúcej 0,2% pektínu o definovaných vlastnostiach, ktorej viskozitu zníži 1 kg enzymatického preparátu po 6 hodinách pôsobenia za štandardných podmienok o 85 % [4].

Výsledky a diskusia

Závislosť PM od koncentrácie pektínu v syntetickej šťave

Na meranie sme pripravili sériu syntetických štiav s variabilným obsahom pektínu, ktorého stupeň esterifikácie bol 70,5%. Výsledky merania sú prehľadne uvedené na grafe 1.



Graf 1. Závislosť pektolytickej mohutnosti od koncentrácie pektínu v šťave.

Z nameraných hodnôt možno usúdiť, že pektolytická mohutnosť enzýmov veľmi silne závisí od koncentrácie pektínu v šťave. Preto z hľadiska štandardizácie treba Kyzlinkom navrhovanú koncentráciu pektínu v prírodnej šťave [4], t. j. 0,2 % veľmi presne dodržiavať aj pri syntetickej šťave.

Závislosť PM od stupňa esterifikácie použitého pektínu

Pre pokus sme pripravili 5 typov syntetických štiav s rôznymi druhmi pektínov. Použili sme tieto druhy:

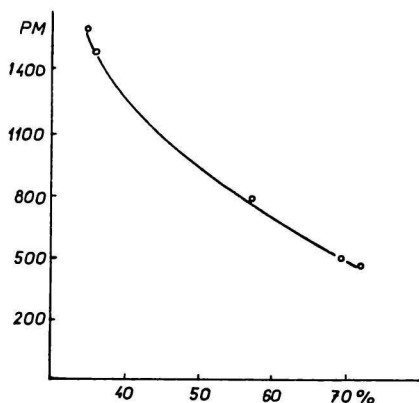
1. francúzsky pektín „červená páska“ stupeň esterifikácie 35,1 %
2. francúzsky pektín „fialová páska“ stupeň esterifikácie 36,1 %
3. francúzsky pektín „zelená páska“ stupeň esterifikácie 57,9 %
4. bulharský pektín stupeň esterifikácie 69,0 %
5. švajčiarsky pektín stupeň esterifikácie 70,5 %

Závislost PM od stupňa esterifikácie použitého pektínu prehľadne zobrazuje graf 2.

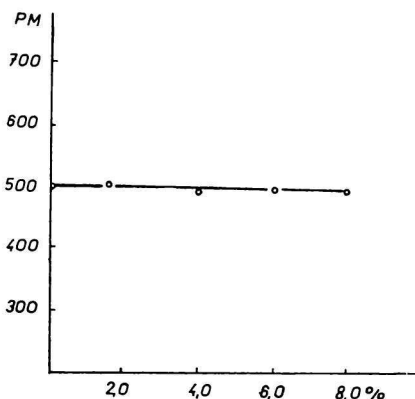
Ako vidieť, stupeň esterifikácie použitého pektínu má rozhodujúci vplyv na veľkosť stanovenej účinnosti pektolytických enzýmov. V záujme presného stanovenia PM je preto nevyhnutné používať Kyzlinkom odporúčaný [4] stupeň esterifikácie pektínu okolo 70,0 % aj v prípade syntetickej šťavy. V opačnom prípade sa dopúšťame veľkých chýb voči normalizovanému hodnoteniu. Napríklad pri pektíne s polovičným stupňom esterifikácie je odchýlka až 200 %.

Závislost PM od koncentrácie sacharózy v šťave

Prípravili sme 6 typov syntetických štiav s variabilným obsahom sacharózy. Cieľom pokusu bolo zistiť, či je sacharóza v syntetickej šťave nevyhnutná z hľadiska presnosti určenia aktivity pektolytických enzýmov. Výsledky sú uvedené na grafe 3.



Graf 2. Závislost pektolytickej mohutnosti od stupňa esterifikácie použitého pektínu.



Graf 3. Závislost pektolytickej mohutnosti od koncentrácie sacharózy v šťave.

Z nameraných hodnôt možno usudzovať, že obsah sacharózy v syntetickej šťave podstatne neovplyvňuje aktivitu pektolytických enzýmov, teda sacharóza nie je v šťave potrebná.

Závislost PM od koncentrácie dusičnanu sodného v šťave

Pre pokus sme pripravili 10 typov syntetických štiav s variabilným obsahom NaNO_3 . Jeho vplyv na PM udáva graf 4.

Namerané hodnoty poukazujú na to, že prítomnosť NaNO_3 v syntetickej šťave značne ovplyvňuje veľkosť nameranej PM. Najvyššiu aktivitu prejavujú pektolytické enzýmy pri koncentrácii NaNO_3 asi 0,4 %. Túto koncentráciu možno za metodicky daných podmienok považovať za optimálnu.

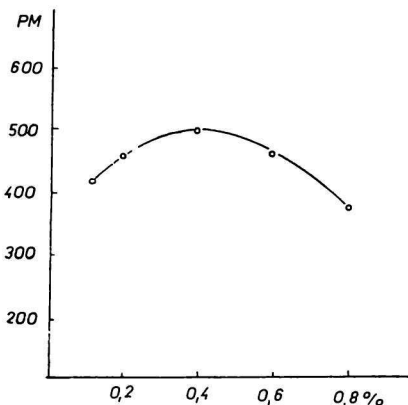
Závislost PM od koncentrácie katechínu v šťave

Prípravilo sa 6 typov syntetických štiav s rôznym obsahom katechínu, reprezentujúceho triesloviny v prírodných šťavách. Výsledky vypočítané z nameraných hodnôt udáva graf 5.

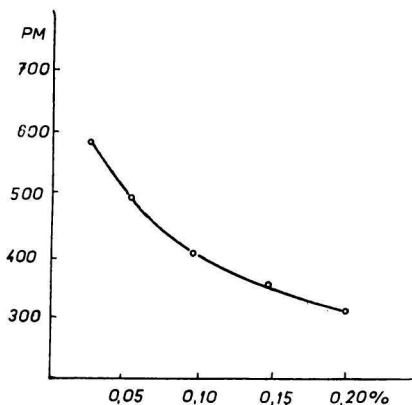
Z grafu 5 vidieť, že katechín má značný brzdiaci vplyv na aktivitu pektolytických enzýmov. S rastúcou koncentráciou katechínu nameraná PM klesá. Koncentráciu katechínu 0,05 % vzhľadom na obsah trieslovín v prírodnom materiáli možno považovať za optimálnu.

Závislosť PM od koncentrácie benzoanu sodného v syntetickej šťave

Prihliadajúc na zloženie syntetickej šťavy, môže dôjsť k nežiadúcemu rastu niektorých mikroorganizmov, čo má za následok znehodnotenie šťavy. Cieľom pokusu bolo zistiť, či benzoan sodný ovplyvňuje aktivitu pektolytických enzýmov, či ho teda možno použiť na konzervovanie syntetickej šťavy. Výsledky meraní sú uvedené na grafe 6.

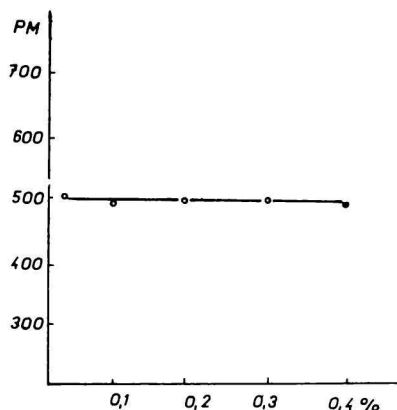


Graf 4. Závislosť pektolytickej mohutnosti od koncentrácie dusičnanu sodného v šťave.



Graf 5. Závislosť pektolytickej mohutnosti od koncentrácie katechínu v šťave.

Zistené výsledky ukazujú, že benzoan sodný v použitých koncentráciách znateľne neovplyvňuje aktivitu pektolytických enzýmov. V množstve 0,2 % možno ho dobre použiť na konzervovanie syntetickej šťavy.



Graf 6. Závislosť pektolytickej mohutnosti od koncentrácie benzoanu sodného v šťave.

*Konfrontácia účinku pektolytických enzýmov na prírodné jablčné šťavy
a na syntetické šťavy*

Pre pokus sme vzali 4 typy prírodných jablčných štiav, ktorých refrakcia sa pohybovala od 9 % do 12 %, titračná acidita, prepočítaná na kyselinu jablčnú, bola 0,50 až 0,63 %, obsah trieslovín 0,12—0,19 %. Šťavy sme vyčerili tanínom a želatínou, prírodný pektín sme rozrušili nadbytkom tekutého švajčiarskeho pektolytického prípravku „Pectinex“ pri teplote 40 °C. Po sedimentácii a filtrácii sme šťavy povarili pri 100 °C za účelom inaktívácie zvyšku pektolytických enzýmov. Po ochladení sme pH upravili na rovnakú hodnotu 3,8.

Súčasne sme pripravili 4 typy syntetických štiav a ich pH sme takisto upravili na hodnotu 3,8. Táto hodnota sa experimentálne overila ako optimálna. Výsledky sú uvedené v tab. 1 a 2.

Tabuľka 1
Zloženie prírodných jablčných štiav a nameraná PM

Označenie šťavy	Rf %	Titračná acidita v % kyseliny jablčnej	Pôvod. pH	Obsah trieslovín v %	PM
jablčná I	9,0	0,50	3,3	0,18	505
jablčná II	9,0	0,54	3,3	0,19	520
jablčná III	12,0	0,63	3,2	0,14	510
jablčná IV	12,0	0,61	3,3	0,12	502

Tabuľka 2
Zloženie syntetických štiav a nameraná PM

Označenie šťavy	Kyselina vínna v %	NaNO ₃ v %	Katechín v %	Benzoan sodný v %	Pektín v %	PM
syntetická 1	0,5	0,5	0,05	0,05	0,2	422
syntetická 2	0,3	0,4	0,02	0,1	0,2	605
syntetická 3	0,3	0,4	0,07	0,1	0,2	440
syntetická 4	0,3	0,4	0,05	0,1	0,2	505

Z hodnôt uvedených pre prirodzené jablčné šťavy vidieť pomerne malé rozdiely v nameraných PM pri jednotlivých druhoch jablčných štiav. To značí, že všetky šťavy sú vhodné na meranie aktivity pektolytických enzýmov. Zo syntetických štiav sa im najviac približuje šťava označená 4.

Na základe dosiahnutých výsledkov navrhujeme ako optimálne toto zloženie syntetickej šťavy:

kyselina vínna	0,3 %
NaNO ₃	0,4 %
katechín	0,05 %
benzoan sodný	0,2 %
pektín	0,2 %
voda	do 100,00 %
pH upravené pridaním NaOH na hodnotu	3,8

Súhrn

Stanovenie účinnosti pektolytických enzýmov je zatažené pomerne veľkou chybou, ktorú spôsobuje prírodný materiál používaný pri príprave substrátu. V práci sme experimentálne študovali možnosť náhrady jablčnej šťavy v substráte definovaným syntetickým roztokom. Podávame obraz zloženia syntetického substrátu, ktorý dáva výsledky prakticky zhodné s výsledkami dosiahnutými na prírodnom materiáli. Týmto sa odstraňuje variabilita zloženia prírodného materiálu, čo sa prejavuje v zlepšenej reprodukovateľnosti výsledkov stanovenia pektolytickej mohutnosti enzymatických preparátov.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ЭНЗИМОВ НА СИНТЕТИЧЕСКОМ СУБСТРАТЕ

ЛАДИСЛАВ ШОРМАН

Кафедра химической технологии углеводов Словацкой высшей технической школы
в Братиславе

Выводы

Определение действия пектолитических энзимов сопровождается сравнительно большой ошибкой, которую способствует природный материал, применяемый при приготовлении субстрата. В работе мы исследовали экспериментально возможность замены яблочного сока в субстрате дефинированным синтетическим раствором. Предлагаем тип состава синтетического субстрата, который дает результаты практически одинаковые с результатами полученными на природном материале. Этим устраняется изменчивость состава природного материала, что проявляется в улучшенной репродуктивности результатов определения пектолитической способности энзиматических препаратов.

Поступило в редакцию 24. 6. 1960 г.

BESTIMMUNG DER WIRKSAMKEIT PEKTOLYTISCHER ENZYME AUF EINEM SYNTHETISCHEN SUBSTRAT

LADISLAV ŠORMAN

Lehrstuhl für chemische Technologie der Kohlenhydrate
an der Slowakischen Technischen Hochschule in Bratislava

Zusammenfassung

Die Bestimmung der Wirksamkeit pektolytischer Enzyme ist durch einen verhältnismässig grossen Fehler belastet, den das bei der Herstellung des Substrats verwendete natürliche Material verursacht. In der vorliegenden Arbeit untersuchten die Autoren experimentell die Möglichkeit des Ersatzes von Apfelsaft im Substrat durch eine definierte synthetische Lösung. Es wird die Zusammensetzung des synthetischen Substrats veranschaulicht, mittels welchem Ergebnisse erzielt werden, die praktisch mit den auf natürlichem Material erreichten Ergebnissen gewertet werden. Auf diese Weise wird

die Variabilität der Zusammensetzung des natürlichen Materials beseitigt, was in einer verbesserten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Bestimmung der pektolytischen Ergiebigkeit enzymatischer Präparate zum Ausdruck kommt.

In die Redaktion eingelangt den 24. 6. 1960

LITERATÚRA

1. Deuel H., Stutz E., *Über die Aktivität von Pektinenzymen*. Hauptbericht über den IV. Internationalen Fruchtsaftkongress-Stuttgart, Bonn 1956. — 2. Seegmiller C. G., Axelrod B., McCready R. M., *J. Biol. Chem.* 217, 265 (1955). — 3. Solms J., Deuel H., *Helv. Chim. Acta* 38, 321 (1955). — 4. Kyzlink V., *O účinnosti filtračních enzymů při pektolyse ovocných šťáv*, Praha 1950. — 5. Slavičková A., *Kinetika enzymatické pektolysy*, *Práce Moravsko-slezské akademie věd přírodních*, Sv. XXIV, Spis 5, Sign.: F 265, Brno 1952. — 6. Strmiska F., *Chémia výroby ovocných šťav I. Pektolytické enzymy a pektolýza*, Kandidátska dizertačná práca, Bratislava 1957.

Do redakcie došlo 24. 6. 1960

Adresa autora:

Inž. Ladislav Šorman, Bratislava, Kollárovo nám. 2, Chemický pavilón SVŠT.