

Módszer tejalvasztó enzimek készítmények proteolitikus aktivitásának meghatározására

VÁMOSNÉ VIGYÁZÓ LILLY, POZSÁRNÉ HAJNAL KLÁRA,
VAJDICSNÉ ÁBROK ERZSÉBET ÉS HEGEDÜSNÉ
VÖLGYESI ERZSÉBET

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

Érkezett: 1971. december 7.

A sajtgyártásban alkalmazott borjúgyomor-oltóenzim (rennin) helyettesítésére hasonló tulajdonságú állati vagy növényi (mikroba) eredetű készítményekkel számos országban folyik kutatás. Az utóbbi években a világpiacon több mikroba eredetű készítmény jelent meg, pl. a Pfizer & Co. (USA) „Sure Curd”, a Meito Sangyo (Japán) „Meito Rennet” és a Novo (Dánia) cég „Rennilase” elnevezésű terméke. A rennin-hatású készítmények általában pH 6,0 körül aktív fehérjebontó enzimeket tartalmaznak.

A sajtgyártásban való alkalmazhatóságuk fontos kritériuma, hogy proteolitikus aktivitásuk a rennin-aktivitáshoz viszonyítva ne legyen túl nagy, mert ebben az esetben a képződött alvadék – legalább részben – újra feloldódna és nem keletkezne megfelelő konzisztenciájú sajt (1, 2). A különféle eredetű tejalvasztó enzimek készítmények proteolitikus aktivitása azonban nagyon különböző lehet. Ez az aktivitás meghatározásánál, illetve a készítmények aktivitásának összehasonlításánál a következő nehézségeket okozhatja:

1. A nagy aktivitású készítmények esetében a szubsztrátum-telítettség nem áll fenn a reakció egész tartama alatt.

2. A nagyobb aktivitású készítményeknél az átalakult szubsztrátum mennyisége nem a teljes reakcióidő alatt arányos a reakcióidővel.

Mindkét esetben a reakciósebesség az aktivitásmérés során ellenőrizhetetlenül csökken.

Ezenfelül nehézséget okozhat, ha az enzimaktivitás – enzimkoncentráció függvény nem lineáris, hanem a különféle készítmények esetében különböző görbéknek felel meg. Ebben az esetben az enzimek készítmények aktivitásértékei egyáltalán nem összehasonlíthatók, sőt ugyanarra az enzimre is különböző értékeket kapunk, ha – a mérési határokon belül – különböző bemérésekből indulunk ki.

A fenti hibák elkerülésére az Intézetünkben használt és régebben közölt módszert (1) számos enzimek készítmény esetében felülvizsgáltuk. Közleményünkben a jelentős tejalvasztó és proteolitikus aktivitású, Chinoin gyártmányú semleges proteáz-készítménnyel kapott eredményeinkről számolunk be.

Anyagok és módszerek

A hivatkozott aktivitásmérő módszer lényege a következő:

Szubsztrátumként Hammarsten-kazeint használunk. Az enzimes bontást 35 °C-on és pH 6,0-on 1 óra hosszat végezzük. A reakciót a végtérfogatra számított 2 g/100 ml triklórecetsavval (TCA) állítjuk le, majd a TCA-ban oldható bomlástermékek mennyiségét biuret-reakció alapján spektrofotometriásan 313 nm-nél határozzuk meg, inaktivált enzimet tartalmazó vakpróbával szemben. A mért extinkciót kazeinből készített kalibrációs görbe alapján számítjuk át mg, ill. μmol kazeinre.

A biuret-reakció spektrofotometriás mérési határaitra való tekintettel a proteolitikus enzimaktivitás egységének (E) azt az enzimmennyiséget választottuk, amely a mérési körülmények között (pH 6,0 és 35 °C) 1 óra alatt 2,5 mg kazeint bont el.

Az enzimkoncentrációt 1 g vagy – folyékony készítmény esetén – 1 ml enzimre számítva adjuk meg.

Eredmények

Az enzimkészítmény koncentrációja és a bomlástermék mennyisége közötti összefüggést 1 óra reakcióidő alkalmazásával az $1/a$ ábra mutatja. Mint látható, az elbontott szubsztrátum mennyisége nem arányos a készítmény koncentrációjával.

Mint az $1/b$ ábra mutatja, az elbontott szubsztrátum mennyisége a készítménykoncentráció négyzetgyökével arányos, tehát az enzim a Schütz-szabályt követi (3).

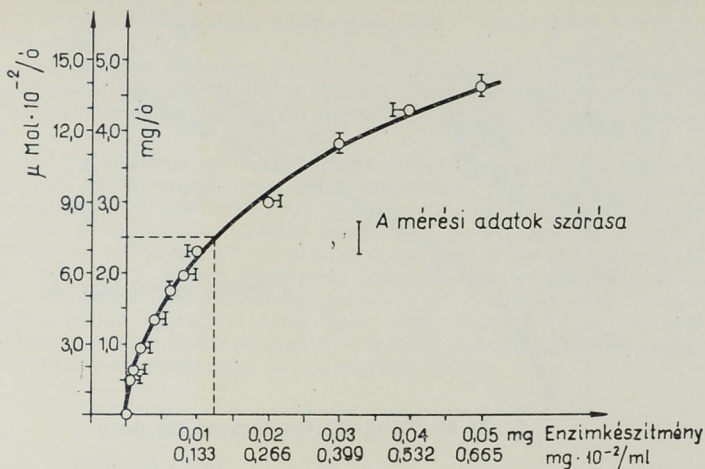
A választott (a 7,5 ml reakcióelegyben egységnyi aktivitásnak megfelelő) készítménykoncentrációval meghatároztuk a reakcióidő és a lebontott kazein mennyisége közötti összefüggést 15–105 perc reakcióidővel ($2/a$ ábra).

Ez az összefüggés sem lineáris, hanem az aktivitás a reakcióidő négyzetgyökével arányos ($2/b$ ábra).

A $2/a$ ábrából az is látható, hogy a 60 perces reakcióidőhöz tartozó reakciósebesség – az $x = 60$ pontban a görbéhez húzott érintő meredeksége – 6,5-szer kisebb, mint a kezdeti reakciósebesség.

Megvizsgáltuk, hogy a görbe elhajlását nem az enzimnek a reakció során történő inaktiválódása vagy a szubsztrát-telítettség hiánya okozza-e. Erre Selwyn (4) grafikus módszerét alkalmaztuk. Eszerint, ha a mérés folyamán az enzim nem inaktiválódott és a szubsztrátum-telítettség fennállt, akkor az átalakult szubsztrátum mennyiségét az enzimkoncentráció és a reakcióidő szorzatának függvényében ábrázolva, a különböző enzimkoncentrációkkal és reakcióidőkkel felvett mérési adatok egy görbére esnek.

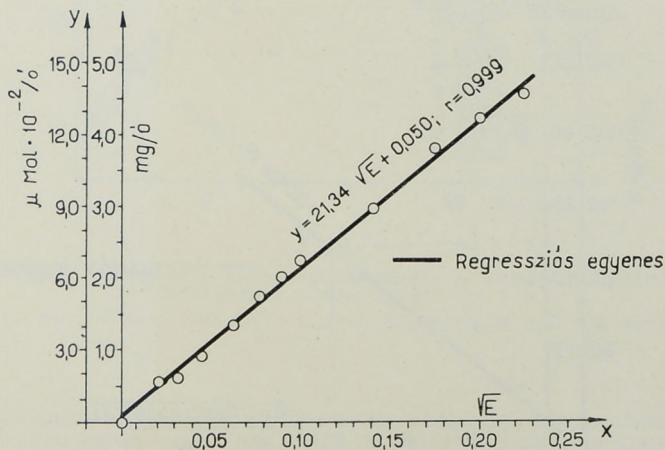
Elbontott kazein



1/a ábra

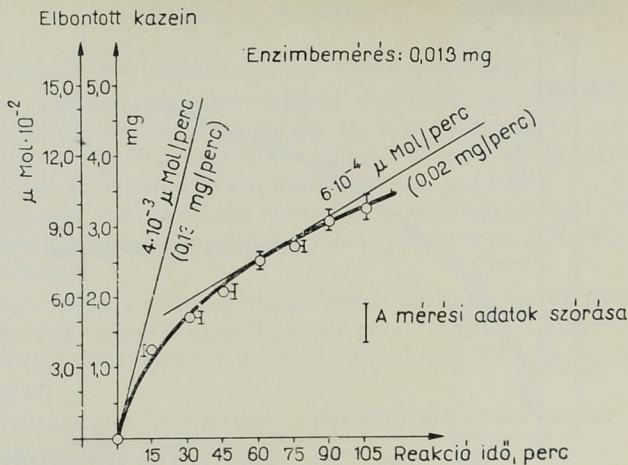
Az enzimm koncentráció (bemérés) és az elbontott kazeinmennyiség összefüggése
 pH = 6,0, t° = 35 °C, reakcióidő 1 h, szubsztrátum-koncentráció 1,33 mg/ml

Elbontott kazein



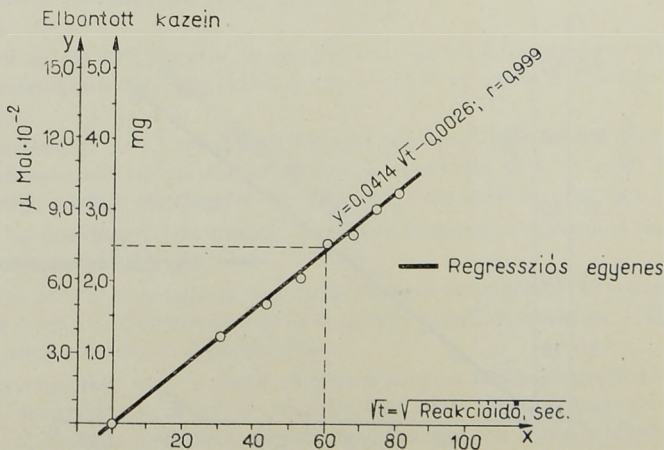
1/b ábra

Az enzimm koncentráció négyzetgyöke és az elbontott kazeinmennyiség közötti összefüggés
 pH = 6,0, t° = 35 °C, reakcióidő 1 h, szubsztrátum-koncentráció 1,33 mg/ml,
 E = enzimbemérés mg



2/a ábra

A reakcióidő és az elbontott kazeinmennyiség összefüggése
 pH = 6,0, $t^\circ = 35^\circ \text{C}$, enzimbemérés: 0,013 mg, szubsztrátum-koncentráció
 $0,17 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$, szubsztrátum-koncentráció
 $1,33 \text{ mg/ml}$



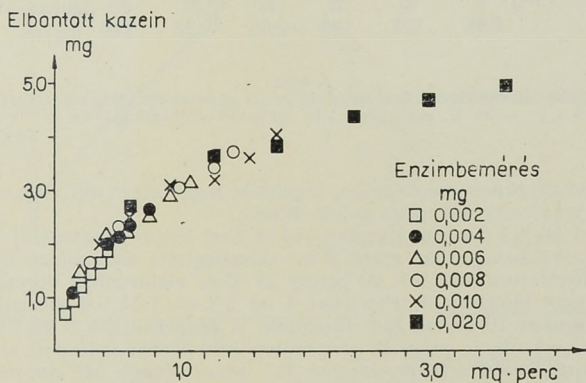
2/b ábra

A reakcióidő négyzetgyöke és az elbontott kazeinmennyiség közötti összefüggés
 pH = 6,0, $t^\circ = 35^\circ \text{C}$, enzimbemérés: 0,013 mg, szubsztrátum-koncentráció
 $0,17 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$, szubsztrátum-koncentráció
 $1,33 \text{ mg/ml}$

A 3. ábrából látható, hogy a Selwyn-féle összefüggés értelmében a vizsgálat körülményei között a szubsztrátum-telítettség fennáll és inaktíválódás nincs. Tehát az aktivitásmérési körülményeket ebből a szempontból helyesen választottuk meg.

A 4. ábra az elbontott kazein mennyiségét a szubsztrátum-koncentráció függvényében mutatja. Ebből is látható, hogy a meghatározásokhoz használt szubsztrátum-koncentráció (1,33 mg/ml) a szubsztrát-telítettség tartományába esik.

A továbbiakban az enzimekoncentráció és a reakcióidő csökkentésével végeztünk aktivitásmeghatározásokat különböző szubsztrátum-koncentrációk alkalmazásával. A kísérletek célja az volt, hogy a körülmények megfelelő változtatásával az elbontott kazein mennyisége és a reakcióidő között lineáris összefüggést találjunk, amelynek alapján a kezdeti reakciósebesség kiszámítható. Amint az 5. ábrából látható, az eddig alkalmazott szubsztrátum-koncentrációk esetében az enzimekoncentrációt kb. $\frac{1}{3}$ -ára csökkentve (a 7,5 ml reakcióelegyben 0,0131 mg helyett 0,005 mg-ot alkalmazva), a 0–30 perc reakcióidő-tartományban igen jó közelítéssel ($r = 0,9899$) lineáris összefüggést kaptunk az elbontott kazein mennyisége és a reakcióidő között.



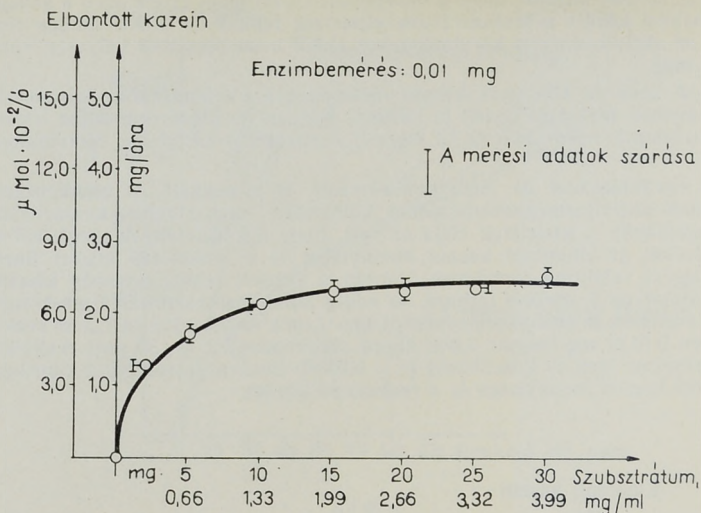
3. ábra

Az enzimbemérés és a reakcióidő szorzatának összefüggése az átalakult szubsztrátum mennyiségével (Selwyn-f. ábrázolás)

pH = 6,0, $t^\circ = 35^\circ\text{C}$, reakcióidő 1 h, szubsztrátum-koncentráció 1,33 mg/ml

Kovariancia-analízissel (5) megállapítottuk, hogy a 0–30 perc reakcióidő alatt elbomlott kazein mennyisége a 0,66–4,00 mg/ml szubsztrátum-koncentráció-tartományban egy közös egyenessel írható le. Ez azt jelenti, hogy méréseinket a szubsztrátum-telítettség körülményei között végeztük.

Az egyenes egyenletéből a kezdeti reakciósebesség $7,41 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{mol/perc}$, vagyis az enzimek aktivitása $7,41 \cdot 10^{-4}$ NE.



4. ábra

A szubsztrátumkoncentráció és az elbontott kazeinmennyiség összefüggése
 pH = 6,0, t° = 35 °C, reakcióidő 1 h, enzimmennyiség 0,174 × 10⁻² mg/ml

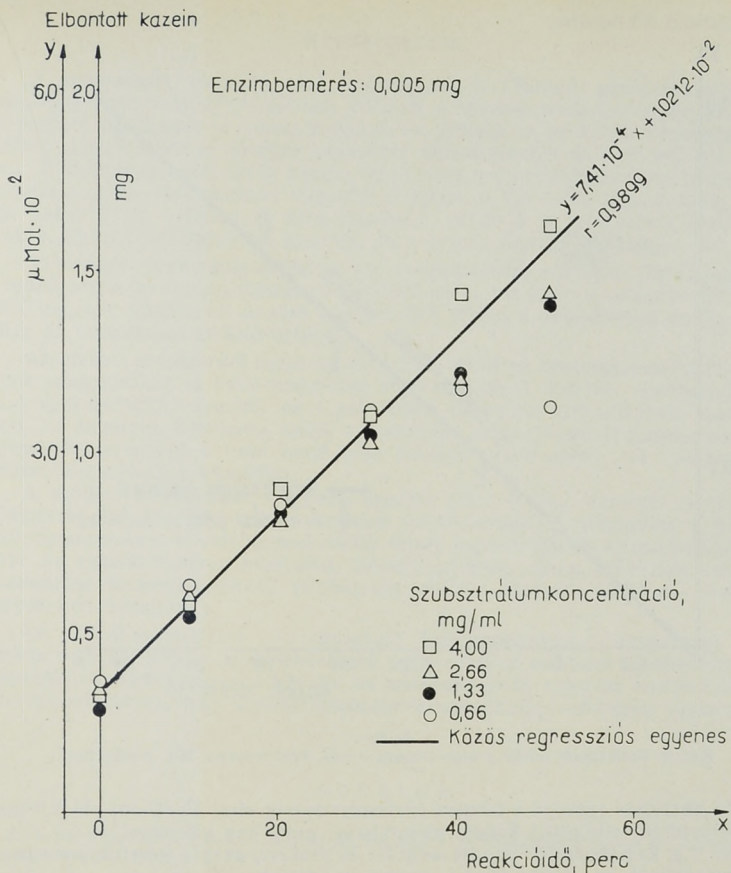
Az eredményeknek megfelelően, régebben ismertetett aktivitásmérő módszerünket (1) a következőképpen módosítottuk:

2 ml, 0,1 M, pH 6,0 foszfátpuffert (6) és 2 ml 1%-os kazeinoldatot kémcsőben 35 °C-ra előmelegítünk, majd 2 ml előmelegített enzimmel hozzáadás után a szubsztrátum bontását 20 percig 35 °C-os vízfürdőben végezzük. A lebontatlan, nagy molekulájú fehérjéket 4 ml 5%-os TCA-val kicsapjuk, majd 10 perc állás után 10 percig centrifugáljuk. A szupernatáns 5 ml-éhez 0,5 ml 25%-os CuSO₄-ot adunk, majd 10 perc múlva 2 ml NaOH-t. 10 perc eltelté után lecentrifugáljuk, majd a szupernatáns 313 nm-nél (vagy 546 nm-nél) mérjük az összehasonlító oldattal szemben.

Az összehasonlító oldat készítésekor ugyanúgy járunk el, mint a reakcióelegy esetében, csak az enzimmel hozzáadása előtt a szubsztrátumot 4 ml TCA-oldattal kicsapjuk.

A TCA-val nem kicsapható (elbontott) fehérje mennyiségét a szupernatánsban a mért extinkció értékéből, kazeinből készített kalibrációs görbe alapján számítjuk. A kalibrációs görbét 1%-os kazein-oldat hígításaival készítjük, 0,2–2,0 mg/ml (0,006–0,06 μmol/ml) koncentrációig: 5 ml különböző hígítású kazein-oldathoz 0,5 ml 25%-os CuSO₄-ot, majd 10 perc múlva 2 ml 12%-os NaOH-t adunk. 10 perc állás után lecentrifugáljuk, majd a szupernatáns extinkcióját 313 nm-nél (vagy 546 nm-nél) mérjük az összehasonlító oldattal szemben. Ebben az esetben az összehasonlító oldat a kazein helyett 5 ml desztillált vizet, valamint a reagenseket tartalmazza (0,5 ml CuSO₄+2 ml NaOH).

A kalibrációs görbe Spektromom 203. műszeren 313 nm-nél történő méréshez a 6. ábrán látható.



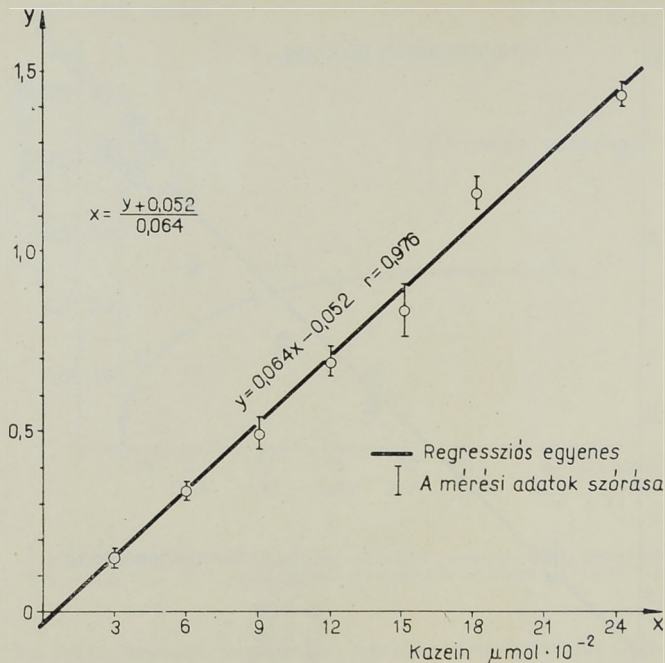
5. ábra

A reakcióidő és az elbontott kazeinmennyiség összefüggése csökkentett enzimbemérésű és rövidebb reakcióidő esetén

pH = 6,0, $t^\circ = 35^\circ\text{C}$, reakcióidő 0–60 perc, enzimbemérés $0,66 \times 10^{-3}$ mg/ml, szubsztrátum-koncentráció 0,66–4,00 mg/ml

Az egyes szubsztrátum-koncentrációkkal kapott összefüggések regressziós egyenesi és azok korrelációs koefficiensei:

Szubsztrátum-koncentráció, mg/ml	A regressziós egyenes egyenlete	Korrelációs koefficiens, r
0,66	$y = 4,828 \cdot 10^{-4} x + 1,3862 \cdot 10^{-2}$	0,9970
1,33	$y = 6,264 \cdot 10^{-4} x + 1,123 \cdot 10^{-2}$	0,9987
2,66	$y = 7,104 \cdot 10^{-4} x + 9,038 \cdot 10^{-3}$	0,9901
4,00	$y = 8,170 \cdot 10^{-4} x + 9,463 \cdot 10^{-3}$	0,9981



6. ábra

Kazein kalibrációs görbe a biuret-módszerhez, Spektromom 203. műszerhez

Az aktivitás egysége a bemért enzimmennyiség által 35 °C-on, pH 6,0 mellett percnként elbontott kazein mennyisége μmol -ban kifejezve.

Az 1 g készítményre vonatkoztatott aktivitást, azaz a készítmény enzimmennyiségét az alábbi képlet szerint számítjuk:

$$NE/g = \frac{(D_{313} + 0,052) \cdot 2000}{0,064 \cdot e}$$

ahol NE = a proteolitikus aktivitás nemzetközi egységben kifejezve

D_{313} = a 313 nm-nél mért extinkció

e = a bemért enzim mennyisége, mg-ban

2000 = az átszámítási tényező 1 g készítményre

0,052 és 0,064 az extinkció átszámítási tényezői a kalibrációs görbe alapján.

Folyékony enzimmennyiség esetén az enzimmennyiséget ml-re vonatkoztatva adjuk meg. Ebben az esetben „e” a bemért enzimmennyiség felét ml-ben jelenti, a képlet számlálójában szereplő 2000 szorzótényezőt pedig elhagyjuk.

Következtetések

A módosított aktivitásmérő módszerrel a Chinoin proteázkészítmény enzimaktivitása $7,41 \cdot 10^{-4}$ NE-nek adódott a kezdeti reakciósebesség alapján. Az eredeti módszerrel – amint a 2/a ábrán látható – az 1 órás reakcióidőhöz tartozó reakciósebesség alapján számított aktivitásérték $6 \cdot 10^{-4}$ NE-nek felel meg. A különbség a két érték között tehát nem nagy, különösen, ha tekintetbe vesszük a módosított módszer nagyobb szórását. A két érték hasonlósága azonban valószínűleg véletlen és nem általános érvényű a tejalvasztó készítményekre. Erről a közeljövőben kísérleti úton is meg fogunk győződni.

Az enzimkoncentráció értéke a két meghatározás esetében jelentősen különbözött, mivel az eredeti módszernél 0,0131 mg, a módosított módszernél pedig 0,005 mg volt a bemérés: az első esetben 45,8 NE/g, a másodikban pedig 148,2 NE/g az enzimkoncentráció értéke.

Az eredeti módszernél mind az aktivitás, mind az enzimkoncentráció értékének számításakor az 1 óra reakcióidő alatt elbomlott kazein mennyiségéből 60-al való osztással nyertük az 1 perc alatt átalakult szubsztrátum mennyiségét. Ez az eljárás helytelen, mivel a reakcióidő és az elbomlott kazein mennyiségének összefüggése 1 órán belül nem lineáris (2/a ábra). A módosított módszer ezt a hibát kiküszöböli.

A módosított módszer nagyobb szórása ($\bar{V} = 9,7\%$, szemben az eredeti módszerrel kapott 6,2% átlag variációs koefficienssel) valószínűleg a kisebb enzimbemérés és a rövidebb reakcióidő miatt kapott kisebb extinkcióértékek, tehát az extinkciómérés hibájának következménye. Ezen szélesebb küvetta alkalmazásával lehet segíteni. (Ebben az esetben nagyobb térfogatú reakcióelegyet kell készíteni.)

Az enzimkoncentráció – elbontott kazeinmennyiség függvénye nem lineáris voltával kapcsolatos nehézségek a módosított módszer alkalmazásakor is fennállnak. Ezért célszerű közölni az enzimaktivitás vagy az enzimkoncentráció mellett azt is, hogy a meghatározást milyen enzim-beméréssel végeztük.

I R O D A L O M

- (1) Vámosné Vigyázó L., Pozsárné Hajnal K., Gajzágó I. és Hegedüsné Völgyesi E.: Élelmiszertudomány 3, (1–2), 13, 1969.
- (2) Velceva, P., Manafova, N.: 11. Intern. Symposium der Gärungsindustrie, Leipzig, DDR' 1968. Symposiumberichte 3, 633.
- (3) Tolnay, P.: Ipari enzimológia. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1963.
- (4) Selwyn, M. J.: Biochim. Biophys. Acta 105, 193, 1965. Budapest, 1967.
- (5) Sváb, J.: Biometriai módszerek a mezőgazdasági kutatásban. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1967.
- (6) Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H. és Jones, K. M.: Data for Biochemical Research. At the Clarendon Press Oxford, 1959.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

В. Л. Вамош, П. К. Хайнал, В. Е. Аброк и Х. Е. Вёлдеш

1. Для избежания трудностей, появляющихся при сопоставлении протеолитических ферментных концентраций с протеолитической активностью по порядку величин разных молокосвёртывающих ферментов (возможные недостатки субстратной насыщенности, снижение скорости реакции во время измерения), проверился применяемой до сих пор методом измерения активности. При исследованиях пользовались препаратом нейтральной протеазы происхождения *Vac. subtilis* изготовленного заводом ХИНОИН в виде модельного фермента.

2. При условиях измерений, соотношение между количеством расщепленного казеина и ферментной концентрации не было линейной (рис. 1/а,) количество расщепленного казеина было пропорционально с квадратным корнем ферментной концентрации (рис. 1/б).

3. При количестве ферментов с единицей активности, и 15–105 минутной времени реакции, активность пропорциональна с квадратным корнем реакции (рис. 2/а, 2/б). Поэтому скорость реакции не может быть определена экстраполяцией, а только в зависимости времени реакции активности на основании тангенса направления натянутой к кривой в точке касания принадлежащей к времени измерения (1 час). В данном случае, определённая таким способом скорость реакции на 6,5 меньше, чем величина вычисленная в точке 0 на основании натянутой к кривой касательной.

4. Как графический метод Селвина, так и зависимость между концентрацией субстрата и активностью показало, что при условиях измерений имеется насыщенность субстрата (рис. 3 и 4).

5. На основании полученных результатов были снижены как время реакции, так и навески ферментов: по сравнению с первоначальным, снижением на 1/3 навески фермента (0,005 мг/7,5 мл) в пределах времени реакции 0–30 мин., с очень хорошим приближением ($\gamma = 0,9899$) между количеством расщепленного казеина и временем реакции получилась линейная зависимость (рис. 5). Таким способом из экспериментально измеренных величин начальной скорости реакции можем определить активность фермента.

6. В пределах концентрации субстрата 0,66–4,00 мг/мл зависимость между расщепленным количеством казеина и временем реакции можно выразить общей прямой. Это также удостоверяет существование насыщенности субстрата (рис. 5).

7. На основании результатов был изменен способ измерения активности. Неизменяя концентрацию субстрата (1,33 мг/мл) были снижены на 1/3 навеска ферментов, а время реакции на 20 мин. С новым методом активность модельного фермента $7,41 \cdot 10^{-4}$ М.ед., а ферментная концентрация 148,2 М.ед./г.

EINE METHODE ZUR BESTIMMUNG DER PROTEOLYTISCHEN AKTIVITÄT DIE MILCH EINLABENDER ENZYMPRÄPARATE

L. V. Vagyázó, K. P. Hajnal, E. V. Ábrok und E. H. Völgyesi

1. Zwecks Vermeidung der bei Vergleichung der proteolytischen Enzymkonzentration von grössenordentlich verschiedenen proteolytisch aktiven Enzympräparaten entstehenden Schwierigkeiten (eventuelles Fehlen der Substrat

Gesättigkeit, Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit während der Messung), haben Verfasser ihre bisher angewandte Methode für Aktivitätsmessung überprüft. Als Modell-Enzym zu den Versuchen benützten wir das von der Chinoin-Fabrik hergestellte, *Bac. subtilis* entstammende neutrale Protein-Präparat.

2. Unter den Versuchsbedingungen war der Zusammenhang der Menge von gespaltenem Casein-Enzymkonzentration nicht linear (Abb. 1/a), die Menge des gespaltenen Caseins war der Quadratwurze der Enzymkonzentration proportionell (Abb. 1/b).

3. Im Falle einer der Aktivitätseinheit entsprechenden Enzymmenge und 15–105 Minuten Reaktionszeit ist die Aktivität der Quadratwurzel der Reaktionszeit proportionell (Abb. 2/a, 2/b). Daher kann die Reaktionsgeschwindigkeit durch Extrapolierung nicht festgestellt werden, sondern aufgrund des Richtungstangenten desjenigen Tangenten, welcher im zur Messungszeit (1 Std) gehörendem Punkte der Funktion Aktivität-Reaktionszeit zu der Kurve gezogen wurde. Die im gegebenen Falle auf diese Weise bestimmte Reaktionsgeschwindigkeit ist 6,5-mal geringer, als der aufgrund des im 0 Punkt zur Kurve gezogenen Tangenten berechnete Wert.

4. Die graphische Methode von SELWYN, wie auch der Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Aktivität weisen darauf hin, dass unter ihren Messungsbedingungen das Substrat gesättigt war (Abb. 3, Abb. 4).

5. Aufgrund der Resultate wurde die Reaktionszeit und die Enzymmenge gleicherweise verringert: mit einer im Vergleich zur Ursprünglichen etwa auf 1/3 reduzierten Enzymeinwaage (0,005 mg/7,5 ml) erhielten sie im 0–30 Minuten Reaktionsbereich in sehr guter Annäherung ($r = 0,9899$) einen linearen Zusammenhang zwischen der Menge des gespaltenen Caseins und der Reaktionszeit (Abb. 5). Auf diese Weise wird die Bestimmung der Enzymaktivität aus experimentell bestimmten Werten der Anfangsgeschwindigkeiten ermöglicht.

6. Im Substratkonzentrationsbereich 0,66–4,00 mg/ml kann der Zusammenhang zwischen der Menge des gespaltenen Caseins und der Reaktionszeit mit einer gemeinsamen Geraden beschrieben werden. Auch dies bestätigt das Vorhandensein der Gesättigkeit des Substrates.

7. Aufgrund ihrer Ergebnisse modifizierten die Verfasser ihr zur Aktivitätsmessung dienendes Gerät. Die Substratkonzentration (1,3 mg/ml) wurde nicht geändert, die Enzymeinwaage aber auf etwa 1/3 und die Reaktionszeit auf 20 Minuten reduziert. Die Aktivität des Modell-Enzyms betrug mit der neuen Methode gemessen $7,41 \cdot 10^{-4}$ IE und die Enzymkonzentration 148,2 IE/g.

METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF ENZYME PREPARATIONS FOR MILK CLOTTING

L. V.-Vigyázó, K. P.-Hajnal, E. V.-Ábrok and E. H.-Völgyesi

1. The method applied up to the present for the determination of proteolytic activity was examined in order to eliminate the difficulties (such as the lack of substrate saturation, the decrease of the reaction rate during the measurement) occurring at the comparison of the concentration of proteolytic enzyme in enzyme preparations for milk clotting possessing proteolytic activities differing from each other by several orders of magnitude. A neutral protease preparation produced by the factory Chinoin from *Bac. subtilis* served as a model enzyme in the present investigations.

2. Under the conditions of measurement the correlation between the amount of decomposed casein and the enzyme concentration was not linear (Fig. 1/a) while the amount of decomposed casein proved to be proportional to the square root of the enzyme concentration (Fig. 1/b).

3. On applying an enzyme quantity of unit activity for reaction periods between 15 and 105 minutes, the activity was proportional to the square root of the reaction period (Fig 2/a and 2/b). Thus, the reaction rate could not be determined by extrapolation but rather on the basis of the directional tangent of the curve drawn at the point of the function activity vs. reaction rate pertaining to the actual measurement period (1 hour). In the given case, the reaction rate established in this way was lower by 6.5 than the value calculated on the basis of the tangent of the curve drawn at point 0.

4. Both the graphic method of Selwyn and the correlation substrate concentration vs. activity proved that substrate saturation actually existed under the conditions of measurement applied in the present experiments (Figs. 3 and 4).

5. As the experimental results show, both the reaction periods and the amounts of weighed enzyme were reduced. On weighing an enzyme amount of about one third of the original dose (0.005 mg/7.5 ml) and applying reaction periods from 0 to 30 minutes, the correlation observed between the amount of decomposed casein and the reaction period proved to be linear at an excellent approximation ($r = 0.9899$) (Fig. 5). In this way it is possible to determine enzyme activity from the initial values of the reaction rate measured experimentally.

6. In the domain of substrate concentration 0.66–4.00 mg/ml, the correlation between the amount of decomposed casein and the reaction period can be described by the same straight. This proves also the existence of substrate saturation (Fig. 5).

7. On the basis of the obtained results, certain modifications were carried out in the evolved instrument for the measurement of activity. The applied substrate concentration was unchanged (1.33 mg/ml) whereas the amount of weighed enzyme was decreased to about one third, and the reaction period to 20 minutes. On using this novel procedure, the activity of the model enzyme was found to be 7.41×10^{-4} international units, and its enzyme concentration 148.2 international units/g.

MÉTHODE DE DOSAGE DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DES PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES COAGULANT LE LAIT

L. Vámos-Vigyázó, K. Pozsár-Hajnal, E. Vajdiics-Ábrok et E. Hegedüs-Völgyesi

1. Les auteurs ont soumis à un examen la méthode adoptée dans leur laboratoire, afin d'éviter les difficultés qui se produisent lors de la comparaison des activités protéolytiques de différentes préparations coagulant le lait. Puisque ces valeurs peuvent être différentes de plusieurs ordres de grandeur, il faut, chez les préparations à activité élevée, compter avec l'épuisement du substrat, ce qui amène à une diminution incontrôlable de la réaction au cours du dosage. Dans les expériences on s'est servi, en tant qu'enzyme modèle, de la préparation de protéase neutre d'origine *Bac. subtilis*, produit de l'usine pharmaceutique «Chinois», Budapest.

2. Dans les conditions du dosage la corrélation entre la quantité de la caséine décomposée et la concentration enzymatique n'était pas linéaire (Fig.

1/a), par contre, la quantité de la caséine décomposée se montrait proportionnelle à la racine carrée de la concentration enzymatique (Fig. 1/b).

3. En employant la quantité d'enzyme qui correspond à l'unité de l'activité et des temps de réaction entre 15 et 105 min., l'activité se montre proportionnelle à la racine carrée de l'activité (Figs. 2/a et 2/b). C'est pourquoilavitesse de la réaction ne se fait pas établir par extrapolation. Il faut la calculer, par contre, à partir de la pente de la tangente à la courbe de la fonction activité — temps de réaction, dans le point qui correspond au temps du mesurage (1 heure). La vitesse de la réaction ainsi déterminée est, dans le cas donné, 6,5 fois plus faible que la valeur calculée à partir de la tangente dans le point 0.

4. La méthode graphique de Selwyn, ainsi que le rapport entre la concentration du substrat et l'activité ont également prouvé que, dans les conditions du mesurage, la saturation du substrat a subsisté (Figs. 3 et 4).

5. A la base des résultats on a diminué et la durée de la réaction et la quantité d'enzyme employée: en réduisant la concentration de l'enzyme à environ 1/3 de la valeur originale (c'est-à-dire à 0,005 mg dans 7,5 ml), on a obtenu, dans l'intervalle de 0 à 30 minutes de durée de la réaction, une corrélation linéaire entre la quantité de la caséine décomposée et la durée de la réaction (Fig. 5). L'approximation de la corrélation était très bonne ($r = 0,9899$). Ainsi il devient possible d'établir l'activité enzymatique à partir des valeurs initiales de la vitesse de réaction, mesurées par voie expérimentale.

6. Dans l'intervalle de concentration du substrat entre 0,66 et 4,00 mg/ml, la corrélation entre la quantité de la caséine décomposée et la durée de la réaction se fait décrire par une droite commune, ce qui prouve également la substance de la saturation du substrat lors du dosage (Fig. 5).

7. A partir des résultats, on a modifié la méthode du dosage de l'activité. En maintenant la concentration du substrat (1,33 mg/ml) inchangée, on a réduit la concentration de l'enzyme à environ un tiers et la durée de la réaction à 20 minutes. L'activité de l'enzyme modèle, déterminée selon la méthode modifiée, correspond à $7,41 \cdot 10^{-4}$ UI (unités internationales), tandis que la concentration enzymatique de la préparation constitue 148,2 UI/g.

KÜLFÖLDI LAPSZEMLE

VERHEY J. G. P. és VOS E. A.:

„Levegőmentes porlasztás”: eljárás vakuolák nélküli porlasztott tejpor előállítására

(Air-free atomization: a methode for producing spray powders without vacuoles.)

Ned. Melk Zuiveltijdschr. 25, 73. 1971.
Ref. ZUL. 147, 2, 115, 1971.

Porlasztott tejpor általában légzárványokat tartalmaz vakuolák formájában, amelyek a tejpor 100 g-jaként kerekén 5–35 ml-t tesznek ki. Ez a

jelenség fokozott mértékben permetezőtoronyban felhasznált porlasztó korongok esetében lép fel. Megállapították azonban, hogy a tejpor vakuoláinak térfogata 100 g-ként kb. 2 ml-re megy vissza, ha a porlasztó korongokon gőzt áramoltatnak át. A részecskesűrűség még jobban magjavul (100 g-ként 0,2 ml-nél is kisebb a vakuolák tere), ha a levegőnyomással végzett permetezőeljárásnál ezt egy alacsony nyomású gőzárammal helyettesítik. Feltételezik, hogy ezáltal a részecskék által bezárt vízgőz gyorsan kondenzálódik és így a vakuolaképződés gátló-