

Műszeres módszer maceráz-aktivitás mérésére

ZETELAKINÉ HORVÁTH KORNÉLIA

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

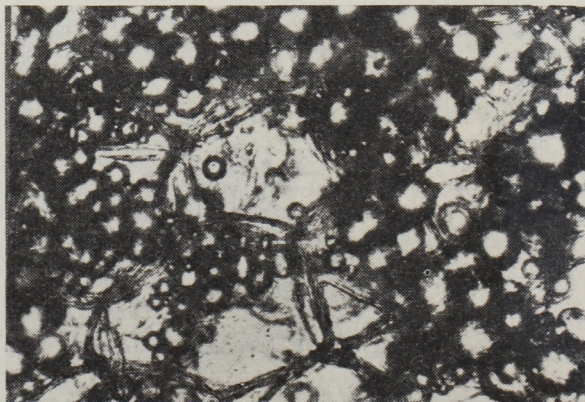
Érkezett: 1978. május 24.

A maceráz enzim létezésére fitopatológusok hívták fel a figyelmet [2, 4]. Felteelésük szerint a fitopatogén mikroorganizmusok támadásának első lépése, hogy maceráz enzimük segítségével megbontják a növényi szövetek ép felületét és szabaddá teszik az utat toxinjaik számára. A kötőanyag pektin jellegét bizonyítja, hogy Thorne [5] a sárgarépagyökér parenchima szövetét *Rhizopus stolonifer* spórával csak pektinbontó enzimbe áztatás után tudta fertőzni.

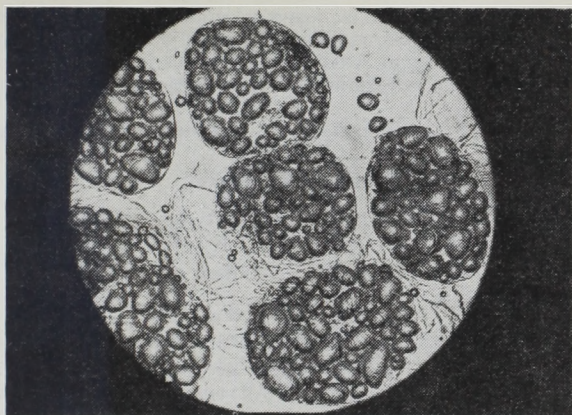
Az enzim a növényi szöveteket (1. ábra) egyedi sejtekre (2. ábra), 0,25 mm-nél kisebb sejtagglomerátumokra aprítja oly módon, hogy hatása során a sejtfalakat érintetlenül hagyja.

Az ép sejtfalak a sejtek fontos értékes tápanyagait, vitaminjait megőrzik és lehetővé teszik a feldolgozási veszteségek jelentős csökkentését.

A növényi szövetek fellazításáért, egyedi sejtekre történő bontásáért felelős maceráz enzim gyakorlati jelentősége a zöldséglevelek, zöldségkrémek, bébiételek előállításánál van. Az 1–6 hónapos csecsemők számára készítendő bébiételek diszperzitásfoka 150 μm -nél nem lehet nagyobb. Karadzsov [1] mérései szerint a főtt zöldségeket feldolgozó kolloid malmos feldolgozásnál ez az aprítottság



1. ábra. Ép burgonyaszövet mikroszkópos felvétele (100 \times nagyítás)



2. ábra. Endo-PG enzimmel lebontott burgonyaszövet mikroszkópos felvétele (100× nagyítás)

fok nem érhető el egyszeri őrléssel. Ezeknél a termékeknél célszerű lenne a nyers zöldség enzimátikus aprítása és az ezt követő egyszeri hőkezelés. Így lehetővé válna a feldolgozott termékek előfőzés kövekeztében fellépő tápanyag-vesztésének és vitaminjai hőinaktiválódásának csökkentése, a bébiételek tápértékének egyidejű növelésével.

A maceráz enzim aktivitásának meghatározására, jelen munka során, olyan egyszerű eszközt szerkesztettünk, amely lehetővé teszi, hogy a növényi szövet szubsztrátum állandóan azonos súlyterhelésnek legyen kitéve.

1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Szubsztrátum

Szubsztrátumként az egységes szövetállományú, (parenchyma sejtekből álló) burgonyaszövetet használunk. Minden esetben azonos (*Rózsa*) burgonya fajtával dolgoztunk.

A burgonyagumókból mikrotóm segítségével 1 mm vastagságú szeleteket készítettünk, amelyekből dugófúró segítségével vágtuk ki a szubsztrátumként használt 10 mm átmérőjű szövetkorongokat.

A mérési módszer

A speciális, elmozdulást akadályozó, állványban levő cm^3 -es kémcsövek aljára 3 mm átmérőjű furattal ellátott műanyag hengereket helyeztünk. A hengerekre feltettük a burgonyakorong szubsztrátumokat, amelyeket az előzővel azonos méretű műanyaghengerekkel rögzítettünk.

Ezután minden kémcsőbe gyorsan bepipettáztunk $2,5 \text{ cm}^3$ enzimoldatot, majd egy 100 g súlyú kupakkal ellátott, 2 mm alsó és 6,5 mm felső átmérőjű rézrudat helyeztünk a műanyaghengerek közé rögzített burgonyaszületre.

Az inkubálás 40°C hőmérsékletű termosztátban történt. A reakcióidő során az enzim fellazítja a burgonyaszületeket és lehetővé teszi a rézrúd áthatolását.

A reakcióidő végpontjának azt az időpontot tekintettük, amikor a rézrúd a burgonyakorongon áthatolva a kémcső aljába esett (3. ábra).

A rézrudak végén levő kupakok fémes végződése a kémcsőtartóra helyezett fémérintkezőkre esve, egy áramkör zárásával kapcsolja be az illető kémcsőhöz tartozó lámpát az állvány hátlapján. A fényjelzés lehetővé teszi az állvány belső sorai-ban elhelyezett, kevésbé jól látható minták reakcióidő-végpontjainak pontos ész-lelését.

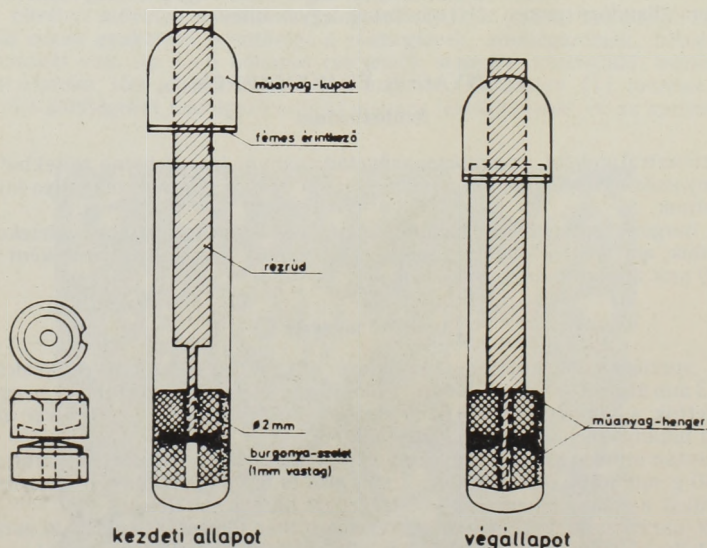
Az ábrákon feltüntetett eredmények 5–7 párhuzamos mérés átlagértékei.

Vizsgált enzimek készítmények

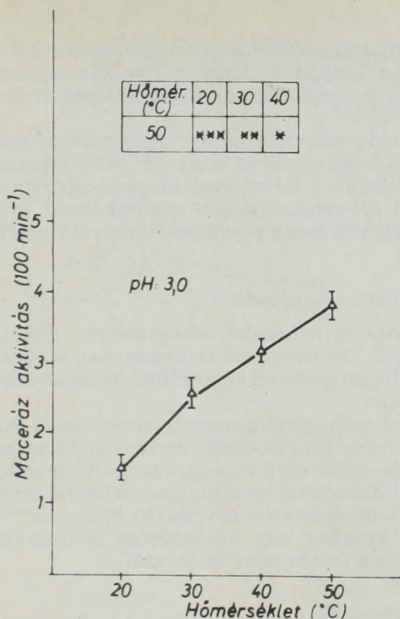
Az almaléderítő poligalakturonáz (PG–177) egy *Asp. foetidus* törzs szub-mersz fermentációjával állítottuk elő a KÉKI Kísérleti Üzemében [6]. A készit-mény endo-poligalakturonáz (endo–PG) aktivitása ($SPA_{75}^{Na-pektát}$) $245 \text{ l h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, endo–PMG aktivitása ($SPA_{75}^{Pomoszín}$) $34 \text{ l h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ és almaléderítő–PG aktivitása ($SPA_{75}^{almalé}$) $137 \text{ l h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. (Az almalé szubsztrátum frissen készült Jonathan almá-ból, specifikus viszkozitását 1,0-re állítottuk, pH-értéke (állítás nélkül) 3,8 volt. A pektin liáz (PL) és pektin metilészteráz (PME) enzimek Pomoszín pektin (Pomoszín Werke, GmbH NSZK) szubsztrátumon (észterezettségi fok 70%) meghatározott aktivitásai $0,65$ ill. $11,3 \mu\text{mol min}^{-1}$ értékeknek adódtak.

Az endo–PG enzimek készítmény (PG–225) *Aspergillus awamori* törzs szub-mersz fermentációjával készült szintén a KÉKI Kísérleti Üzemében [10]. Endo–PG ($SPA_{75}^{Na-pektát}$): $4000 \text{ l h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ endo–PMG ($SPA_{75}^{Pomoszín}$): $8,79 \text{ l h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. A készítmény almaléderítő–PG, PL és PME aktivitással nem rendelkezett.

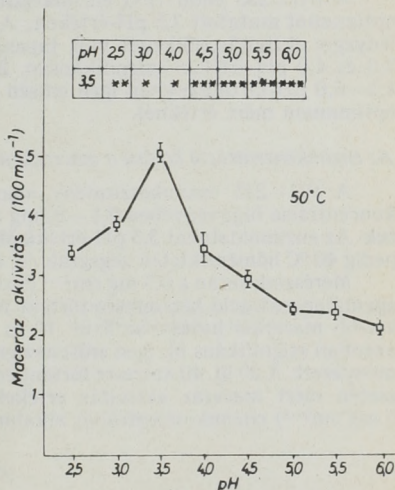
A maceráz-aktivitásmérés



3. ábra. A KÉKI-ben maceráz méréshez szerkesztett készülék vázlatos rajza. A műanyag henge-
rek metszete ill. felülnézete



4. ábra. A PG-225 endo-PG készítmény maceráz-aktivitásának hőmérséklet optimuma



5. ábra. A PG-225 endo-PG készítmény maceráz-aktivitásának pH optimuma

Enzimaktivitás mérési módszerek

A fenti enzimek aktivitás mérését az előző munkánkban leírtak szerint végeztük [9].

Matematikai statisztikai módszerek

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

A maceráz-aktivitás optimális körülményei

Hőmérséklet

A PG-225 endo-PG készítmény maceráló hatását 20, 30, 40 és 50 °C hőmérsékleten vizsgáltuk 10 mg cm³⁻¹ enzimkoncentrációjú, 3,0 pH-értékű McIlvain pufferben (4. ábra).

Az enzimkészítmény maceráz-aktivitása az inkubációs hőmérséklet növelésével nőtt. 50 °C-nál nagyobb hőmérséklet alkalmazása azonban a szövet állományvesztése miatt nem lehetséges.

Az 50 °C hőmérsékleten mért maceráz-aktivitás szignifikánsan nagyobb volt a 40 °C-on inkubált minták eredményénél és erősen szignifikánsan ill. igen erősen szignifikánsan nagyobb a 30 ill. 20 °C-on inkubált minták aktivitás-értékeinél.

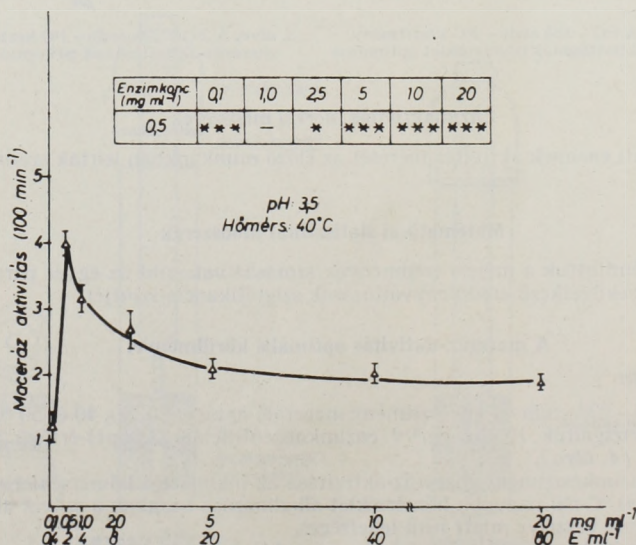
A pH hatását az enzimmészítmény maceráz-aktivitásának alakulására 2,5–6,0 pH-tartományban vizsgáltuk 0,5 pH-értékenként McIlvain puffer alkalmazásával. Az inkubációs hőmérséklet 50 °C, az enzimméret koncentráció pedig 5 mg cm³⁻¹ volt (5. ábra).

A PG–225 endo–PG enzimmészítmény maceráló hatása meglehetősen éles optimumot mutatott 3,5 pH-értéken. A 3,5-nél kisebb ill. nagyobb pH-értékeken lényeges aktivitáscsökkenés volt tapasztalható. A készítmény maceráz-aktivitása 3,0 és 4,0 pH-értéken szignifikánsan, 2,5 pH-értéken erősen szignifikánsan, míg 4,5–6,0 pH-tartományban igen erősen szignifikánsan kisebbnek bizonyult a pH-optimumon mért értéknél.

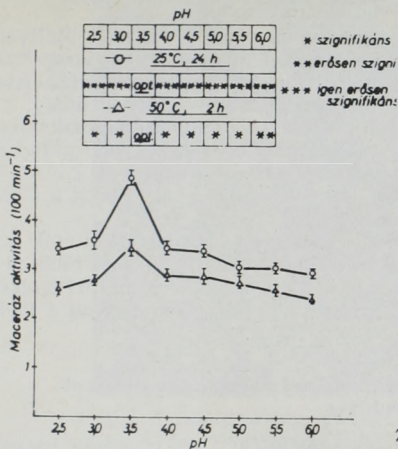
Az enzimméret koncentráció hatása a maceráz-aktivitás alakulására

A PG–225 enzimmészítmény maceráz aktivitásának alakulását az enzimméret koncentráció függvényében 0,1–20 mg cm³⁻¹ koncentráció tartományban vizsgáltuk. Az enzimméret adatokat 3,5 pH-értékű McIlvain pufferrel készítettük, az inkubálást pedig 40 °C hőmérsékleten végeztük (6. ábra).

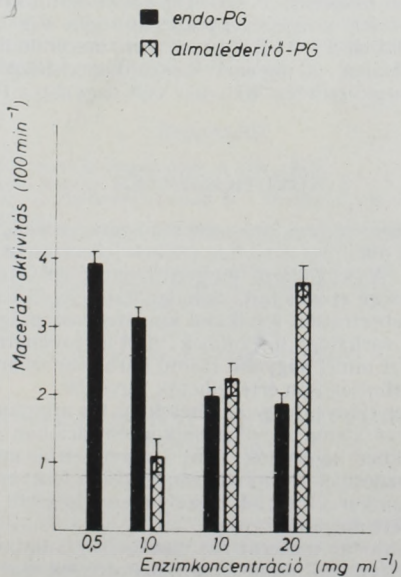
Méréseink során a 0,5 mg cm³⁻¹ enzimméret koncentráció bizonyult optimálisnak. Az enzimméret koncentráció kétszeresre történt növelése nem eredményezett szignifikánsan kisebb maceráló hatást, az 5 ill. 10 és 20-szoros enzimméret koncentráció alkalmazása azonban szignifikáns ill. igen erősen szignifikáns maceráz-aktivitás csökkenést eredményezett. A 20 ill. 40-szorosra történt enzimméret koncentráció növelés (10, 20 mg cm³⁻¹) esetén mért maceráz aktivitás értékek azonban alig különböztek a tízszeres 5 mg cm³⁻¹ enzimméret koncentráció alkalmazása esetén mért értékektől.



6. ábra. Az enzimméret koncentráció hatása a PG–225 endo–PG készítmény maceráz-aktivitásának alakulására



7. ábra. A PG-225 enzimkészítmény maceráz-aktivitásának pH-túrése



8. ábra. Almaléderítő-PG enzimkomplexum (PG-177) és a PG-225 endo-PG maceráz aktivitásának összehasonlítása

Az enzimmészítmény maceráz-aktivitásának hőmérséklet- és pH-tűrése

A PG-225 enzimmészítmény maceráz-aktivitásának pH-tűrését McIlvain pufferben, 2,5–6,5 pH-tartományban különböző körülmények között vizsgáltuk. 25 °C hőmérsékleten 24 h tárolás, 50 °C hőmérsékleten pedig 2 h tárolás után határoztuk meg az 5 mg cm³-1 koncentrációjú enzimmoldatok aktivitását (7. ábra).

A pH-tűrés szempontjából szintén a 3,5 pH-érték bizonyult optimálisnak mindkét tárolási hőmérsékleten. Ezen a pH-értéken észleltük a legnagyobb aktivitás különbséget, a két különböző hőmérsékleten történt tárolás között. A 2 h 50 °C történt tárolás után mért aktivitás kb. 30%-kal volt kisebb a 25 °C-on 24 h tárolt minták értékénél.

Az ábrán jól megfigyelhető, hogy az 50 °C hőmérsékleten tartott minták esetében a 3,5 pH-értéken mért aktivitás csak szignifikánsan volt nagyobb a többi pH-értéken tárolt minták maceráz-aktivitásánál, a 25 °C-on 24 h-ig 3,5 pH-értéken tárolt minták aktivitása viszont igen erősen szignifikánsan nagyobb volt a többi pH-értéken mért eredményeknél.

Almaléderítő – PG és endo – PG készítmények maceráz aktivitásának összehasonlítása

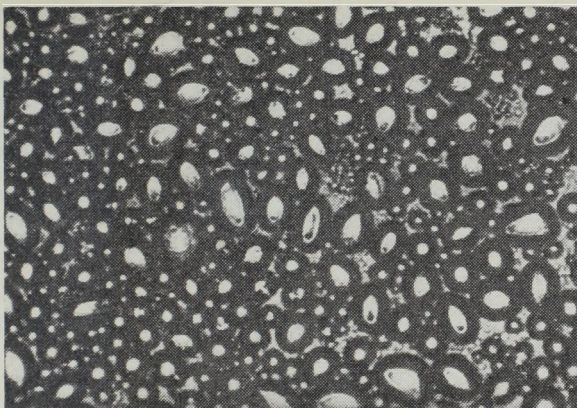
Munkánk során egy almaléderítő – PG készítmény (PG – 177) maceráló hatását is összehasonlítottuk a PG – 225 endo-poligalakturonáz enzim maceráló hatásával. Az összehasonlítás azonos enzimmolekulatartalommal (1, 10 ill. 20 mg cm³-1) történt, a PG – 225 készítménynél azonban az optimálisnak bizonyult enzimmolekulatartalmat is feltüntettük (8. ábra). A PG – 225 enzimmolekulatartalmú maceráló hatása 0,5 mg cm³-1 koncentrációban volt a legnagyobb és az aktivitás az enzimmolekulatartalom növelésével csökkent. A PG – 177 almaléderítő készítmény maceráló hatása az enzimmolekulatartalom növelésével fokozható volt. Míg 1 mg cm³-1 enzimmolekulatartalom alkalmazásánál a PG – 227 készítmény maceráló hatása kb. 33%-a a 225 készítmény aktivitásának, 20 mg cm³-1, enzimmolekulatartalom esetén a PG – 227 enzim aktivitása már megközelítően 40%-kal volt nagyobb a PG – 225 enzim aktivitásánál.

3. KÖVETKEZTETÉS

A maceráz-aktivitás mérésének műszeres módszere érzékenyebb a gravimetriás mérési módszernél [8] és alkalmas aktivitás értékek jellemzésére a reakcióidő reciprokának számításával. A különböző burgonyagumók szöveteinek macerációval szembeni ellenállóképessége azonos fajta felhasználása esetén sem tökéletesen azonos. Az alkalmazott szubsztrátum rendkívül kis rétegvastagsága következtében a szórásértékek (5–7%) várhatóan nagyobbak, mint a gravimetriás módszernél. Az aktivitás méréseket ezért minél nagyobb számú párhuzamosban tanácsos végezni, hogy az eredmények biztonságosan értékelhetők legyenek.

A műszeres módszer előnye, hogy a mérésekhez kis mintamennyiség (2,5 cm³) elegendő. Mivel a módszer 0,5 mg cm³-1 enzimmolekulatartalommal a legérzékenyebb, a minták nagyobb mértékben hígíthatók, mint a gravimetriás mérésnél. A módszer ezen előnye nagyon hasznosnak bizonyult számunkra, a fenti enzim izoelektromos fókuszolása során [3], amikor a frakciók csekély mennyiségéből több enzim aktivitásának alakulását kellett meghatározni.

Az endo – PG készítmény maceráz-aktivitásának pH-optimuma (pH: 3,5) eltért az almaléderítő aktivitással rendelkező készítmények maceráz-aktivitásának pH-optimumától (pH: 3,0). Az almaléderítő – PG 40 °C inkubációs hőmérsékleten mért maceráz-aktivitási görbéje 4,0 ill. 4,5 pH-értéknél egy második csúcsot is



9. ábra. Almaléderítő enzimmal lebontott burgonyaszövet mikroszkópos felvételei (100× nagyítás)

mutatott [7], amely a hemicellulázok (arabanáz, xilanáz) ill. az endo-PG pH-optimumának felel meg.

A vizsgált fenti készítményekkel történt macerálás után a burgonyaszövet mikroszkópos képe is lényeges eltérést mutatott. Az endo-PG-os bontás ép, egyedi sejteket eredményezett, míg az almaléderítő enzimmal történt szövetkezelés után a sejtfalak is teljesen szétroncsolódtak. A burgonyaszövet almaléderítő enzimmel történt kezelése után csak keményítőszemcsék és sejttermék figyelhető meg a mikroszkópos felvételen (9. ábra).

IRODALOM

- (1) Karadzsov, I. A.: Konzerv- és Paprikaipar, 6, 205, 1975.
- (2) Lapwood, D. H.: Ann. Botany, (London), 21, 167 1957.
- (3) Pozsárné, Hajnal K. és Zetelakiné Horváth K.: Kromatográfiás Vándorgyűlés, Debrecen 1977 október (előadás).
- (4) Singh, R. K. és Wood, R. K.: Annals of Botany, N. S., 20, 89, 1956.
- (5) Thorne, S.: J. Sci. Fd Agric., 26, 933, 1975.
- (6) Zetelaki-Horváth K.: Poligalakturonáztermelő Aspergillus törzsek szaporodásának és enzimmtermelésének vizsgálata. Kandidátusi értekezés, Budapest, 1972.
- (7) Zetelaki-Horváth K.: Acta Alimentaria, 3, 281, 1974.
- (8) Zetelaki-Horváth K.: Acta Alimentaria, 3, 293, 1974.
- (9) Zetelaki-Horváth K. és Vas K.: ÉVIKE 13, 93, 1972.
- (10) Zetelaki-Horváth K. és Békássy-Molnár, E.: Acta Alimentaria, 4, 167, 1975.

ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЙ МЕТОД ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ МАЦЕРАЗЫ

К. Зетелаки-Хорват

Автор для измерения активности мацеразы разработал простой метод которым возможно при идентичных условиях и объективно измерять разщепляющее действие фермента на растительные ткани. Между пластимассовые валики поставленных в пробирку закрепили картофельные ломтики стандартного сорта и толщины, на которые действует медная палочка весом

100 г с нижним диаметром 2 мм. Ферментный раствор нанесенный пипеткой на картофельные ломтики в периоде инкубации разрыхляет ткани картофеля прорывающихся под давлением медных палочек. Время впадения медяных палочек в пробирку определяет крайнюю точку реакции, ферментную активность автор охарактеризовал реципрокным временем реакции.

Метод является чувствительным и з случае применения равномерно толстых картофельных ломтиков, хорошо репродуцируемый. В данной работе установили рН активности мацеразы, оптимум температуры, а также при измерениях применяемую оптимальную ферментную концентрацию в случае ферментного комплекса яблокоосветляющей полигалактуровазы происхождения *Asp. foetidus* и авамори эндополигалактуровазного происхождения.

INSTRUMENTALE METHODE ZUR MESSUNG DER MACERASE-AKTIVITÄT

K. Zetelaki-Horváth

Zur Messung der Macerase-Aktivität wurde eine einfache Methode entwickelt, die versichert, dass die abbauende Wirkung des Enzyms auf die Pflanzengewebe auf eine objektive Weise und unter den gleichen Umständen messbar ist.

Ein in eine Eprouvette eingesetzte, zwischen Kunststoffzylindern fixierte Kartoffelschnitzel von genormter Varietät und Dicke wird dem Druck einer Kupferstange von 100 g Gewicht und 2 mm unterem Durchmesser ausgesetzt. Die Kartoffelgewebe wird durch die auf dem Kartoffelschnitzel mittels einer Pipette aufgebrauchte Enzymlösung während der Inkubationsperiode aufgelockert und das Kartoffelschnitzel wird unter dem Druck der auf ihn stützenden Kupferstange durchgerissen. Der Endpunkt der Reaktion wird durch den Zeitpunkt des Hinunterfalls der Kupferstange in die Eprouvette gegeben. Die Enzymaktivität wurde mit dem reziproken Wert der Reaktionsdauer gekennzeichnet und als 100 min⁻¹ Wert angegeben.

Bei Anwendung von Kartoffelgeweben von gleichmässiger Dicke ist die Methode empfindlich und gut reproduzierbar. Während dieser Arbeit wurden die optimalen pH-Werte und Temperaturen der Macerase-Aktivität, ferner auch die bei der Messungen anwendbaren optimalen Enzymkonzentration bei Verwendung eines aus *Asp. foetidus* hergestellten, apfelsaftklärenden Polygalakturinase Enzymkomplexes und eines aus *Asp. swamori* hergestellten endo-PG Enzympräparates festgestellt.

INSTRUMENTAL METHOD FOR THE MEASUREMENT OF MACERASE ACTIVITY

K. Zetelaki-Horváth

For the measurement of macerase activity a simple method was developed which ensures the measurement of the decomposing effect of the enzyme on plant tissues in an objective way and under identical conditions.

A potato slice of standardized type and thickness, placed in a test tube and fixed between plastics cylinders is exposed to the pressure of a copper rod of 100 g weight and 2 mm diameter at its bottom. The potato tissue is loosened on the action of an enzyme solution placed by a pipette onto the potato slice during the incubation period, and thus the potato tissue is burst under the pressure of the copper rod. The moment when the copper rod falls into the test tube serves as

end point of the reaction. Enzyme activity was characterized by the reciprocal value of the reaction period and is given in units of 100 min^{-1} .

The method is sensitive and well reproducible provided the applied potato tissues have a uniform thickness. During the present work the optimum values of pH and temperature of macerage activity, furthermore the optimum enzyme concentration to be applied at the measurements were established with the use of an apple-juice clarifying polygalacturonase enzyme complex of *Asp. foetidus* origin and of an endo-PG enzyme preparation of *Asp. swamori* origin.