

A pektolízis vizsgálata

VAS KÁROLY

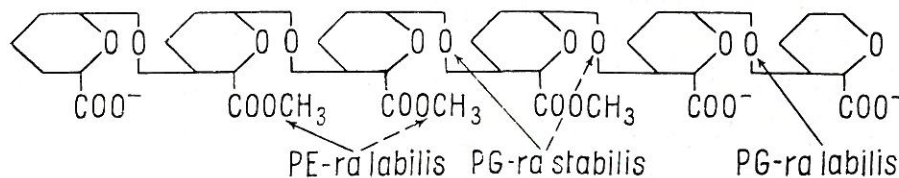
Konzerv-, Hús- és Hűtőipari Kutató Intézet, Budapest

Bevezetés

A pektinnek, ennek a növényvilágban igen elterjedt poliuronidnak enzimes bomlása, a pektolízis fontos szerepet játszik a természetben. A talajba került növényi részek pektintartalma pektolízis révén tárul fel. A pollenszemcsék pektint bontó enzimeji oldják fel a hibe pektinben dús falvastagodásait beporzáskor. A növényi kórokozók rendszerint ezeknek az enzimeknek a segítségével támadják meg a növényt: a pektintartalmú sejtfa, illetőleg sejtközi réteg oldásával meg-lazítják a sejtszerkezetet. Az emberi szervezetbe a táplálékkal belekerülő pektint — miután az emberi szervezet nem termel pektolízist okozó enzimeket — a bél-flóra mikroorganizmusai bontják le.

A pektint bontó enzimeket a gyakorlat igen sok helyen alkalmazza. Így felhasználják például gyümölcslevelek, must, bor előállításánál részben a lékitermelés fokozására, részben pedig derítésre, a levek szűrhetővé tételére. Egyes helyeken alkalmazzák a len és kender áztatásánál, galakturonsav, illetőleg ezen keresztül C-vitamin előállításánál, kis metoxilszámú pektinek készítésénél, az emésztést előmozdító preparátumokban (a növényi ételek pektintartalmának emésztésére) stb.

A pektin bontását nem egy enzim végzi. Az eddigi irodalom legalább három fermentumról beszél. A még csak bizonytalanul ismert, kétes szerepű *protopektináz* mellett (mely valószínűleg a növényi szövetekbe tartóvázként beépített protopektint teszi oldhatóvá) a jobban ismert *pektinmetilészteráz* (PE) a pektin metoxilcsoportjait hidrolizálja, végülis pektinsavat és metilalkoholt hagyva vissza reakciótermék gyanánt; a *poligalakturonáz* (PG) viszont a pektinsav vagy a részben metilezett pektin glükozid-kötéseit bontja el egészen a d-galakturonsavig (1. ábra)-



1. ábra

A pektint bontó enzimek hatása a pektinmolekulára. Lineweaver és Jansen (7) szerint

Az említett enzimek közül mindegyik jobban működik, ha a másik is jelen van. A nem-metilezett pektinsav gátolja a PE működését, PG jelenlétében viszont ez a gátlás megszűnik, mert a lánc hosszában megbontott pektinsav már nem akadályozza a reakciót. A PG a teljesen metilezett pektinsavat nem támadja

meg. Hatás csak akkor következik be, ha vagy enzimműködés (PE), vagy egyéb okok következményeként részben vagy egészben pektinné vagy pektinsavvá demetilálódik a teljesen metilezett poligalakturonsav.

A PG az állatvilágban igen kevésbé elterjedt enzim (mindössze néhány csigánál található meg), annál gyakrabban fordul elő a növényvilágban, különösen a *Tallophtya*-ban. Ritkán, illetőleg kis töménységben lehető fel magasabbrendű növényekben. A PE ezzel szemben az utóbbiakban is nagyon elterjedt (citromfélék, paradicsom, dohány stb.).

A kereskedelmi pektin-bontó enzimmészítményeket általában mikroorganizmusok, elsősorban penészek tenyészetéből állítják elő.

A PG és a PE kimutatása, illetőleg meghatározása egymás mellett nem egyszerű kérdés. — A PG-nál még aránylag könnyű a feladat, mert észtermentes pektinsav-szubsztrátummal dolgozva, a PE hatása kikapcsolható, a bomlási termékek pedig bizonyítottan nem befolyásolják a reakció sebességét. Mégis itt is nehézséget jelent, hogy a rövidebb láncok iránt az enzim affinitása kisebb, úgy hogy a reakció végül nagyon meglassul. — A PE-nál azonban igen nagy komplikációt okoz az a már említett tény, hogy a pektinsav mint reakciótermék zavarja a demetilálás további menetét, amit a szennyezésésként rendszerint jelenlevő PG bizonytalan mértékben küszöböl ki a lánc hosszúság csökkentésével. Itt tehát a PE igazi aktivitásának mérése a PG előzetes teljes elválasztását (pl. adszorpció) teszi szükségessé. Nehézséget jelent továbbá egyebek közt az is, hogy különböző pufferek különbözőképpen befolyásolják, azonos pH esetén is, az enzimeket. Tehát egyenként vizsgálni ezeket a fermentumokat elég körülményes dolog. A jelenlegi gyakorlat számára azonban az enzimek együttes működésének eredménye, a pektin lebontása (pl. a gyümölcslevek derülése, a lékitermelés fokozódása stb.) a fontos, ennek az összhatásnak a mérése pedig már valamivel egyszerűbb, ha elméletileg kevésbé definiált is az, amit így mérünk.

Az enzimes pektinbontás vizsgálatára leginkább elterjedt módszerek a következők:

1. Pektátmeghatározás. A kalciummal kicsapható bontatlan pektintartalmat az enzimhatás kezdetén és végén megállapítva, következtetni lehet az enzim aktivitására.

2. Ehhez hasonló, de még kevésbé kvantitatív a különböző elektrolitokkal kicsapható pektintartalom fogyásának mérése, illetőleg becslése.

3. Az alkohollal kicsapható rész mennyiségének csökkenése szintén alkalmas a bomlás folyamatának nyomonkövetésére.

4. A pektin forgatóképessége a pektolízis folyamán csökken és így ez utóbbi vizsgálatára felhasználható.

5. A pektinoldatok áramlási kettőstörése nagyon durván ugyan, de némileg mégis tájékoztat a bomlás mértékéről.

6. A pektin kötő- (zselirozó) képessége érzékenyen befolyásolható a pektolízissel, úgy hogy az utóbbi tanulmányozására ez felhasználható.

7. A növényi szövetek protopektintartalmának bomlására a burgonya-, sárgarépaszeletekre gyakorolt lazító hatás alapján lehet következtetni.

8. Ólomacetáttal hevítve, a pektin narancssárga színt ad, a galakturonsav téglapirosat, tehát a vörös szín intenzitásának növekedése a pektolízis előrehaladását jelzi.

9. Gyakorlati próba, mely azonban nehezen végezhető el egységesen és reprodukálhatóan, a pektintartalmú levelek szűrődési sebességében bekövetkező változások mérése.

10. Ehhez hasonló természetű, de sokkal szabatosabban megvalósítható vizsgálatok a viszkozitásváltozás meghatározásán alapuló eljárások. A gyakorlat ma általában ezeket alkalmazza gyors üzemi vizsgálatok céljaira. A részlegesen, vagy egészen lebontott pektinoldatok viszkozitása egészen az oldószeréig lecsökkenhet. A molekulásúly és a viszkozitás közötti összefüggés nem teljesen definiált, ezért ezt a módszert kinetikai tanulmányokra sokan nem tekintik alkalmasnak, a gyakorlat számára azonban döntő adatokat szolgáltat, hiszen a levek szűrhetősége például éppen a viszkozitás csökkenésével függ össze.

11. Gyakran alkalmazzák a PG-hatás regisztrálására a redukáló aldehidcsoportok száma növekedésének mérését. Az α -1,4 glükozidkötés bontásakor felszabaduló aldehidcsoportok hipojoditos (Willstätter-Schudel-féle) meghatározása alkalmas a PG-hatás kimutatására.

12. A PE vizsgálatára a reakció közben felszabadult metilalkohol desztillációja és oxidációs vagy kolorimetrikus módszerekkel való meghatározása, továbbá a felszabaduló karboxilcsoportok folyamatos (esetleg elektrometrikus) titrálása lúggal jól felhasználható. Ez utóbbi eljárás az előbb említett hipojoditos módszerrel együtt gyümölcsleveknél nem válik be, mert ezekben egyrészt erős pufferhatással, másrészt sok redukáló anyaggal kell számolni, ami miatt a kis változások nem mérhetőek biztonsággal.

13. Itt kell megemlíteni még azt a gyakorlati módszert is, mely a gyümölcslevelek derülésének, a kicsapódó anyagok ülepedésének sebességét szabályos időközönkénti fényképezéssel rögzíti.

Kísérleti rész

A jelen vizsgálatokkal célunk az volt, hogy összehasonlító képet kapjunk egyes vizsgálati módszerekről és különböző enzimpreparátumok hatékonyságáról, melyeket részben külföldről szereztünk be, részben pedig penészek tenyésztésével magunk állítottunk elő.

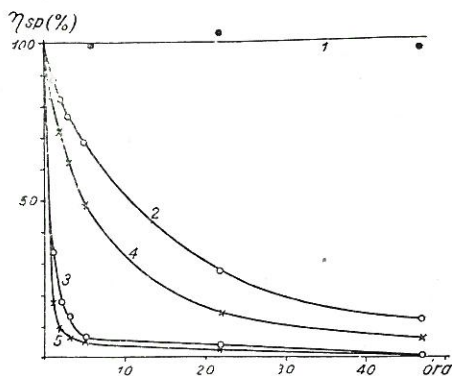
Kísérleteinket egyrészt tiszta, körülbelül 30% észterezettségű svájci gyártmányú kereskedelmi porpektinből előállított oldatokkal végeztük, másrészt natív állapotú pektinoldatokkal, azaz frissen préselt gyümölcslevekkel, miután a legújabb irodalmi adatok [például S c h u b e r t (12)] szerint igen nagy eltéréseket okozhat az eredményben az a tény, hogy teljesen metilezettnek mondható natív pektinnel, vagy pedig a kipreparálás közben mindig részlegesen demetilált pektinnel állunk-e szemben. Az elvégzett nagyszámú vizsgálatból itt csak néhány példát ragadunk ki.

Viszkozitás-mérések

A vizsgálatok a MNOSz szerinti módosított Ostwald-féle viszkoziméterrel (4. ábra) történtek Höppler-féle ultratermosztáttal beállított hőmérsékletű vízfürdőben.

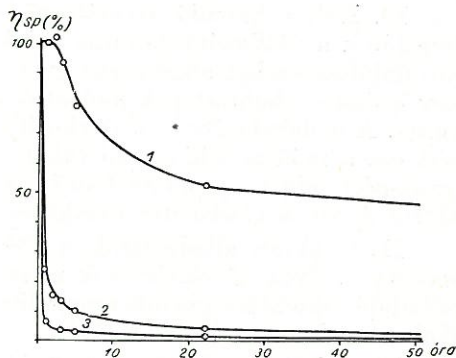
Az enzim minőségének és töménységének hatása pektinoldatok bontására

Porpektint 0,2% nátriumbenzoáttal együtt csapvízben enyhe melegítéssel oldottunk (pH = 3,6, refrakció: 1%, spec. viszkozitás: 1,80 25 C°-on). 0,01, 0,1 és 1%-nyi enzimekészítménnyel összekeverve a pektinoldat 300 ml-es adagjait,



2. ábra

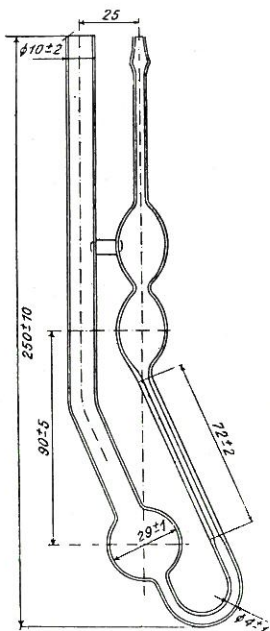
Az enzimek készítmény minőségének és töménységének hatása pektinoldat viszkozitásának változására. — 1. enzim nélkül. 2. 0,01% 850.2.2.3. jelz. saját enzimek készítmény. 3. 0,10% 850.2.2.3., 4. 0,01% Pektinol K. 5. 0,10% Pektinol K.



3. ábra

Az enzimek készítmény minőségének és töménységének hatása számócalé viszkozitásának változására. 1. enzim nélkül. 2. 0,01% 850.2.2.3. ill. Pektinol K. 3. 0,10% 850.2.2.3. ill. Pektinol K.

megvizsgáltuk, hogy különböző idők elteltével 24 C°-os hőmérsékleten hogyan változik az elegy viszkozitása. Tekintettel arra, hogy bontás közben a tapasztalat szerint mindig keletkezik egy kevés pelyhes csapadék az oldatokban, mely az alkalmazott Ostwald-féle viszkoziméter kapillárisát eltömíthetné, pontosan 3 perces, 3000 f/p-es centrifugálást alkalmaztunk (kis szögcentrifugában) minden mérés előtt és az oldat tisztáját töltöttük a viszkoziméterbe. »Pektinol K dopp. konz.« jelzésű külföldi enzimmel és egy saját gyártású laboratóriumi készítménnyel (850.2.2.3.) végezve a fenti vizsgálatokat, az adatok egy része az 2. ábrában látható eredményeket adta. A viszkozitásértékeket a specifikus viszkozitás kezdeti (eredeti) értékének százalékában adtuk meg.



4. ábra

A kísérlethez használt módosított Ostwald-viszkoziméter [Földiák, Pállay, Vámos és Zakar szerint (2)]

Látható, hogy a viszkozitáscsökkenés 0,01%-nyi enzimek készítmény adagolása esetén a Pektinol K-nál gyorsabb, 0,1%-nál közel egyforma sebességű, 1%-nál pedig valamivel lassabb, mint a saját készítménynél. A gyakorlatilag szokásos 6—8 órás behatás esetén 0,1%-os adagolás mindkettőnél annyira lecsorítja a viszkozitást, hogy a derülés, illetőleg a szűrhetőség teljesnek mondható.

Az enzim minőségének és töménységének hatása számócalé derítésére

Egy másik kísérletben frissen készített számócalevet 0,2% nátriumbenzoáttal tartósítva, centri-

fugálással való tisztításnak vetettünk alá (pH = 3,8, refrakció 8%, spec. viszkozitás: 3,74 22 C°-on). 0,01, 0,1 és 1%-nyi enzimkészítménnyel elkeverve 500—500 ml levet, a mintákat 22 C°-on való állás közben időnként, szabványosan végrehajtott centrifugálás után (3000 f/p, 10 perc) 22 C°-on viszkozításra megvizsgáltuk. Az eredmény egy részét a 3. ábra mutatja be.

Látható, hogy a számócalé igen nagy kezdeti viszkozitása kevés (0,01%) enzim hatására is gyorsan lecsökken, mégpedig mind a két enzimmel nagyjából azonos mértékben. Itt mindenesetre a lé saját enzimtartalmával is számolnunk kell, mert a kontrol viszkozitása is jelentős csökkenést szenvedett a vizsgálat tartama alatt.

A hőmérséklet hatása pektinoldatok bomlására

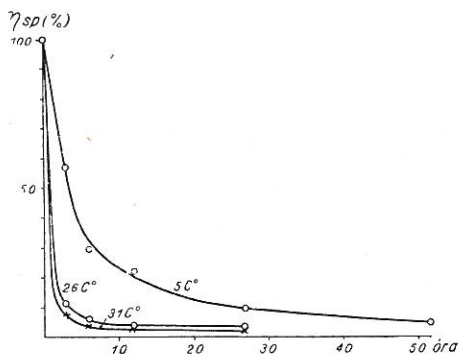
A hőmérsékletnek a pektolízisre gyakorolt hatását a következő kísérlettel vizsgáltuk. 0,75%-os, 0,15% nátriumbenzoátot tartalmazó, centrifugálással üledékmentesített pektinoldat (pH = 3,9, spec. viszkozitás: 3,4, 25 C°-on) különböző mintáit 0,2% külföldi, illetőleg saját enzimkészítménnyel elkeverve, egyes üvegeket 5, másokat 26, 31, 36, illetőleg 40 C° hőmérsékletű jégszekrénybe, illetőleg termosztátba tettünk és figyeltük viszkozitásuk időbeli változását. A mérések

1. táblázat

A hőmérséklet szerepe pektinoldat enzimhatásra bekövetkező viszkozitásváltozásában

(1) Az enzimkészítmény jelzése	(2) A bontás idő- tartama (óra)	(3) Az oldat spec. viszkozitása (25 C°-on) a kezdeti érték százalékában				
		A bontás hőmérséklete (C°) (4)				
		5	26	31	36	40
Enzim nélkül (5)	3	100	101	102	105	107
	6	105	105	105	105	105
	12	103	105	105	103	107
	27	102	108	107	111	116
873. (0,2%)	3	3,8	4,4	5,0	4,4	3,5
	6	3,2	4,4	2,1	1,5	1,2
	12	2,6	1,2	1,2	0,9	1,5
	27	4,1	0,9	0,9	0,6	1,5
	52	0,9	—	—	—	—
	96	0,6	—	—	—	—
902.1. (0,2%)	3	57,3	10,9	7,4	5,9	5,3
	6	30,0	5,9	4,1	3,8	3,5
	12	22,0	3,8	3,8	4,4	2,1
	27	10,0	3,2	0,9	1,2	1,2
	52	5,0	—	—	—	—
	96	2,1	—	—	—	—
Pektinol K (0,2%)	3	12,6	3,2	3,2	1,2	10,3
	6	10,0	—	4,7	2,1	1,2
	12	7,4	1,5	0,9	0,9	2,1
	27	4,1	3,2	0,9	0,9	0,9
	52	3,8	—	—	—	—
	96	1,8	—	—	—	—

előzetes, szabványosan végrehajtott centrifugálás után (3000 f/p, 10 perc) 25 C°-on történtek. Az eredményeket az 1. táblázat tünteti fel.



5. ábra

A hőmérséklet szerepe pektinoldat enzimhatásra bekövetkező viszkozitásváltozásában

[Husemann, Loës és Lötterle (3)] cellulóz, xilán és mannán kevert enzim (Luizym) hidrolízisének tanulmányozása során felemlítik Ekens t a m (1) közelítő képletének alkalmazhatóságát. Ez utóbbi szerint a cellulóz savas bontásánál a reakciósebességi állandó (k) hozzávetőleg kiszámítható a két meghatározott időponthoz (t_1 , t_2) tartozó polimerizációs fokok (P_1 , P_2) ismeretében:

$$k = \frac{1}{t_2 - t_1} \left(\frac{1}{P_2} - \frac{1}{P_1} \right)$$

Husemann és munkatársai (3) az enzim cellulóz-, xilán- és mannán-hidrolízist is elsőrendű reakcióknak véve, kiszámították a bontás sebességi »állandóját«. Az adatok azonban azt mutatják, hogy ez sokszor nem állandó érték, hanem — egy eset (a xilán-kénsavészter) kivételével — az idő előrehaladtával szabályosan csökken (egyes esetekben a kezdeti értékek $1/3$ — $1/9$ -edére): tehát nem elsőrendű reakció. Tudatában annak, hogy nem tiszta enzimmennyel állunk szemben, hanem olyan keverékkel, melynél az egyik enzimkomponens a másik számára vagy az ellen dolgozik, mégis megkíséreltük a fenti képlet alkalmazását a reakció »bruttó rendűségének« megállapítására. A polimerizációs fok helyett a mindenkori specifikus viszkozitás adatokat vettük számításba azon az alapon, hogy S t a u d i n g e r (14) szerint azonos töménységű lineáris kolloidok viszkozitása (η_{sp}) a polimerizációs fokkal arányos:

$$\lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right) = K_m \cdot P$$

ahol K_m a karakterisztikus viszkozitási állandó, P a polimerizációs fok, c a koncentráció. A specifikus viszkozitást a kezdeti érték százalékában kifejezve, a képlet az eddigiekben ismertetett esetekben a 2. táblázatban feltüntetett értékeket adja.

Egyes esetektől (*-gal jelezve) eltekintve a k értéke a hidrolízis előrehaladtával aránylag csekély és nem egyirányú ingadozást mutatott. Így feltételezhető, hogy a bruttó reakció átlagosan elsőrendű, ill. az elsőrendű reakciók kinetikai törvényszerűségeit követi.

Az 1. táblázat adatai közül a 902. 1. jelzésű készítménnyel kapott viszkozitásváltozások egy részét az 5. ábra szemlélteti (a másik két enzimmel még a legalacsonyabb hőfokon is túl gyors változásokat kaptunk ahhoz, hogy a grafikonban jól fel lehessen tüntetni azokat).

Reakciókinetikai megfontolások

Az eddigiekben ismertetett viszkozitásváltozásokat megpróbáltuk kinetikailag értékelni. Az irodalomban nem található meg a viszkozitás-csökkenésben nyilvánuló enzim pektinhidrolízis ily értelmű tárgyalása. A legújabb időkben egyes szerzők

2. táblázat
Az enzimes pektinbontás sebessége

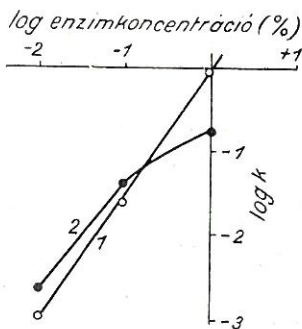
(2) A kísérlet sorszáma:	(1) k (óra ⁻¹)				
	1	2	3	4	5
Enzimekészítmény (3)	850.2.2.3	850.2.2.3.	902.1.	Pektinol K	Pektinol K
Szubsztrátum (4)	(5) pektin	(6) szamócalé	(5) pektin	(5) pektin	(6) szamócalé
Szubsztrátum- koncentráció (%) (7)	1,0	?	0,75	1,0	?
Kezdeti spec. viszkozitás (8)	1,80	3,74	3,4	1,80	3,74
pH	3,6	3,8	3,9	3,6	3,8
Enzim- koncentráció (%) (9)	0	24 C°-on	22 C°-on	24 C°-on	22 C°-on
	0,01	0	0,0003	0	0,0003
	0,10	0,0012	0,03*	0,0024	0,03*
	0,20	0,0250	0,14*	0,0399	0,11*
	1,00	0,90*	—	0,175*	—
Hőmérséklet (C°) (10)				0,2% enzim	
	5			0,0035	
	26			0,021	
	31			0,036	
	36			0,046	
40			0,045		

* Az első (néhány) órában mért érték (nem középérték) (11)

A sebességi állandónak az enzimekoncentrációtól való függése a 6. ábrából tűnik ki.

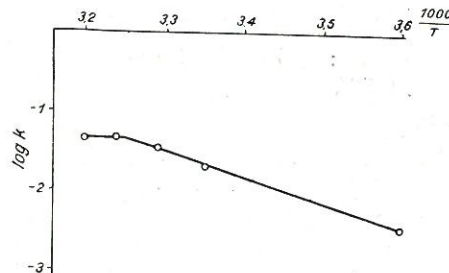
A reakciósebességi állandónak a hőmérséklettől való függését a 2. táblázat 3. rovatának alapján a 7. ábrával szemléltetjük, ahol az Arrhenius-féle összefüggés:

$$\log k = B - \frac{A}{T}$$



6. ábra

Az enzimekoncentráció és az aktivitás összefüggése. 1. 850.2.2.3. 2. Pektinol K.



7. ábra

A hőmérséklet és a bomlás sebességének összefüggése

(A és B konstansok, T az abszolút hőmérséklet) felhasználásával a reakciósebességi állandó logaritmusának értékeit az abszolút hőmérséklet reciprokjának függvényében tüntettük fel.

5 és 36 °C között az összefüggés lineárisnak tűnik. A reakció »aktiválási energiája« (E_A) a hajlásszögből (A) vagy a

$$\ln k = 2,303 \cdot B - \frac{E_A}{RT};$$

$$E_A = \frac{4,575 \cdot T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \log \frac{k_2}{k_1}$$

összefüggésből 14 400 cal/mol-nak adódik. A Q_{10} értéke az 5 és 36 °C közötti sávban körülbelül 2,3.

Itt érdemes megemlíteni, hogy Matus (8) adatait a fenti képlettel k -ra átszámítva, 0 és 25% észterezttségű pektin használata esetében nagyjából állandó, elsőrendű reakcióra valló sebességi állandókat kapunk. Az 50, 75 és 100%-os észterezttségű pektinnel folytatott kísérletei erősebb (>40%) mérvű viszkozitáscsökkenéseknél már szabályosan csökkenő k -értékeket adnak, itt tehát a reakció már nem mondható elsőrendűnek. Matus maga a viszkozitás-adatokat nem értékelte ki reakciókinetikai szempontból, csak a jódfogyasztásból vonta le azt a következtetést, hogy a reakció nem követi az elsőrendű reakciók szabályait.

Gyakorlati módszerek

A meghatározott bontáshoz szükséges idő mérése

Gyakran használatos az enzimológiában a reakciók sebességének egy meghatározott mértékű átalakulás (például bontás) létrejöttéhez szükséges idő mérésével való jellemzése. Az átalakulás lehet például egy mmol-os bontás, vagy a kezdeti koncentráció felének, egyharmadának stb. megfelelő változás. Az ehhez tartozó idők reciprokja az aktivitással egyenesen arányos.

Az ismertett grafikonokból megállapítható felezési idők arányából számított sebességi állandó arányok az előbb számítottakkal nagyjából megegyeztek. Természetesen a grafikus kiértékelésnek számos nehézsége miatt a pontosság itt nem túlzott mértékű.

A meghatározott idő alatt bekövetkező bontás mérése

A »bontási fok«. — Weber és Deuel (15) az aktivitás mérésre azt ajánlották, hogy szigorúan meghatározott körülmények között a létrejövő specifikus viszkozitáscsökkenést az eredeti érték százalékában fejezzük ki (»bontási fok«). Ennek a jellemző számnak a meghatározása úgy történik, hogy sűrített, pektinmentes almalészörpöt 1,047–1,048 sűrűségűre hígítunk (pH = 3,5 körül, viszkozitás: 1,5 cpoise 20 °C-on), majd 0,15% benzooesavas nátriummal keverjük össze, 0,5% száraz pektint oldunk fel benne (viszkozitás: 5–14 cpoise 20 °C-on). 90 ml ilyen oldathoz 10 ml 2% enzimmal készült, szűrt kivonatot adunk (40 °C-on 2 óráig extrahálva az enzimméreganyagot). Pontosan 6 óráig 20 °C-on tartjuk a keveréket, majd megmérjük a viszkozitását. Ha i_k = a viszkoziméter kezdetben tapasztalt kifolyási ideje, i = az adott pillanatban tapasztalt érték, i_v = a teljesen lebontott oldat kifolyási ideje, akkor a bontási fok (B):

$$B = \frac{i_k - i}{i_k - i_v} \cdot 100 (\%)$$

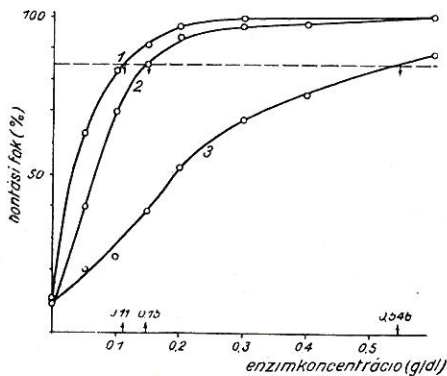
Ez az érték a specifikus viszkozitás százalékos csökkenésével azonos szám.

A »standard pektolitos erő«. — K y z l i n k (6) azt javasolja, hogy a bontási fok meghatározását különböző enzimkoncentrációknál végezzük. Elgondolása szerint az így nyert adatokból interpolálással meg lehet állapítani azt az enzimtöménységet, mely adott feltételek között (20 C°, pH = 3,5—3,9, 6 óra) a pektinmentes-sűrítményből készült almalében oldott 0,2%-nyi 70—75%-os észterezettségű, nagy polimerizációs fokú pektin specifikus viszkozitását az eredeti érték 85%-ával csökkenti. Ebből a gyakorlat számára egyszerűen kiszámítható, hogy 1 kg vizsgált készítmény hány liter fenti levét tud a jelzett mértékben lebontani. Ez a szám a »standard pektolitos erő« (S. P. E.). A 85%-os bontás a gyakorlatban elégségesnek bizonyult.

Ipari méretben előállított pektint bontó enzimekészítményeink közül a 964.2, a 964.11 és a 964.31 jelzésűeket használtuk fel az egyik kísérletsorozatban a S. P. E. meghatározására. (Az eredeti definíciótól eltérőleg itt *nativ* pektin-oldattal, azaz friss gyümölcslével dolgoztunk.) Az alkalmazott szubsztrátum frissen préselt almalé volt (aranyrenett, darálás után rongyon préselés kézzel; pH = 3,20, refrakció: 13,7%, pektin által okozott specifikus viszkozitás: 3,50 19,5 C°-on). 200 ml-es adagokba 0—1200 mg enzimekészítményt mérve, 20—21 C°-os vízfürdőben 6 óráig tartottuk a mintákat. Ezután 19,5 C°-on meghatároztuk (durva rongyon való átszűrés után) a lé viszkozitását, amiből a bontási fokot kiszámítottuk. Az eredményt a 8. ábra mutatja be.

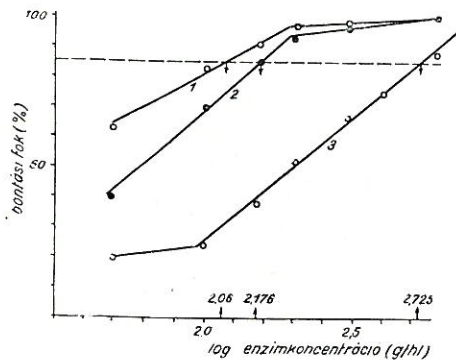
Tehát a 85%-os bontáshoz literenként 1,1, 1,5 illetve 5,46 g enzim kellett, vagyis a vizsgált három készítmény 1—1 kg-ja (1000 : 1,1 =) 909, 667, ill. 183 liter almalében képes az abban levő eredeti, pektin által okozott specifikus viszkozitást 85%-kal lecsökkenteni.

Miután R e i d (11) kimutatta, hogy az enzimekoncentráció logaritmusa és a bontási fok — legalábbis 80%-os bontási fok alatt — lineáris összefüggést ad, megkíséreltük a K y z l i n k-féle számokat félig logaritmikus koordináta-rendszerben interpolálással megkapni (9. ábra).



8. ábra

A hatékonyság meghatározása három enzimekészítménynél 1. 964.2. jelz. készítmény. 2. 964.11. jelz. készítmény. 3. 964.31. jelz. készítmény



9. ábra

A hatékonyság meghatározása három enzimekészítménynél. 1. 964.2 jelz. készítmény. 2. 964.11 jelz. készítmény. 3. 964.31 jelz. készítmény

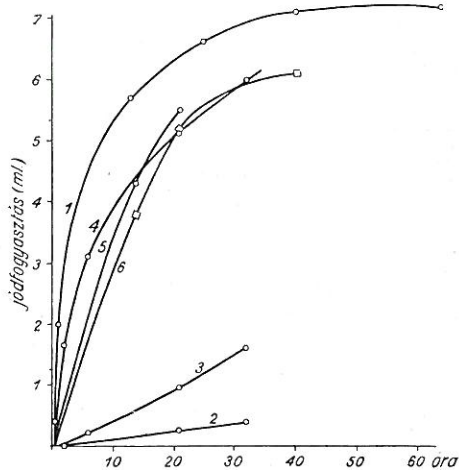
A 9. ábrából láthatóan tehát 115, 150 illetve 531 g/hl az enzimszükséglet, ami azt jelenti, hogy 970, 667, illetve 188 l levét lehet 1—1 kg enzimekészítménnyel 85%-osan lebontani.

Reid szerint az értékelés azon az alapon is történhet, hogy az 1 hl-hez szükséges enzimmennyiségeket összehasonlítva, megállapítjuk, hogy egy standard készítményhez képest (melynek aktivitását önkényesen 100%-nak vesszük) hány százalékos a kérdéses preparátum. Jelen esetben tehát, ha a 115 g/hl-est 100%-osnak vesszük, akkor a 150 g/hl-es 77%-os, az 531 g/hl-es 22%-os.

Redukálóképesség-mérések

Mint már láttuk, az enzimhatásra felszabaduló aldehidosoportok száma növekedésének jodometriás mérésével a PG hatása jól követhető. Kísérleteinkben a következő technikát alkalmaztuk [Jermyn és Tomkins (4)]: 10 ml vizsgálandó oldathoz 50 ml vizet és 3 ml 1 N NaOH-ot adva, 20 ml 0,1 N I₂-dal reagáltattuk, majd pontosan 10 perc elteltével 10 ml 1 N HCl-val való savanyítás

után azonnal 0,1 N Na₂S₂O₃-tal megtitráltuk a felesleges jódot. A vakpróbában (pektinoldat + enzimkivonat rögtön az összeöntéskor titrálva) elfogyott jód mennyiségét levonva a tapasztalt jód fogyasztásból, megkaptuk a redukálóképesség növekedését.



10. ábra

Pektinoldat szabad aldehidtartalmának növekedése különböző enzimek hatására. 1%-os pektinoldathoz 18 C°-on hozzáadva 20 tf%-nyi a következő oldatokból: 1. 4%-os Pektinol K kivonat. 2. B 468: Penic. sp. 3. C 196: Fusarium sp. 4. N 152: Aspergillus foetidus. 5. N 175: Aspergillus foetidus. 6. V 77: Asperg. sp. penészek tenyészcsoportjai

Egy kísérletsorozatban laboratóriumban előállított enzimek készítményeket vizsgáltunk meg porpektinből készült oldatra gyakorolt hatás szempontjából. 1%-os pektinoldathoz (0,15% nátriumbenzoáttal tartósított, centrifugált) a vizsgálandó tenyészcsoportokból (C 196, V 77, N 175, N 152, B 468) 20 tf%-ot, Pektinol K 4%-os kivonatából pedig szintén 20 tf%-ot adagoltunk. 18 C°-on reagáltatva az elegyet, különböző időpontokban mintákat véve, meghatároztuk a jódredukáló képességet. Az eredményeket a 10. ábra mutatja be.

Látható, hogy a jód fogyasztás az idő előrehaladtával szabályos emelkedést mutat, vagyis az enzim hatására láncszakadás közben egyre több szabad aldehidosoport keletkezik. Ennek a reakciónak a lefolyása nem elsőrendű reakcióra valló.

Az idő függvényében ábrázolva a $\log(a-x)$, illetőleg az $\frac{1}{a-x}$ értékeit, nem kapunk egyenes vonalat, ami azt mutatja, hogy itt sem tisztán elsőrendű, sem tisztán másodrendű reakcióról nincsen szó. (x a keletkezett aldehid mennyiségét jelzi, a pedig az összesen felszabadítható aldehidtartalmat.)

A jodometriás módszer a pektinbontó enzimek összehasonlító értékelésére csak tiszta porpektin használata esetén alkalmas. Gyümölcsnél, mint már említettük, a sok egyéb redukáló anyag miatt a vakpróba értéke olyan nagy volna, hogy ez az aránylag kis változások pontos értékelését lehetetlenné tenné.

Zavarosság-mérések

Érdekes tény, hogy a pektinbontás vizsgálatára szolgáló sokféle módszer között az irodalom sehol sem tesz említést az oldat zavarosságának kvantitatív tanulmányozásáról. Ez annál különösebb, mert gyakorlati szempontból ezeket az enzimeket jelenleg elsősorban derítésre, tehát zavaros gyümölcslevek kristálytiszttá alakítására használják. A pektinbontó enzimekkel foglalkozva, önként felvetődött az a gondolat, hogy a bontást a zavarosság *kvantitatív* mérésével kövessük. Erre a célra két módszert próbáltunk ki. Ezenkívül egy kvalitatív eljárást is alkalmaztunk.

1. Egyrészt Pulfrich-féle nefelométert használtunk. A 18 mm belső átmérőjű kémcsőben elhelyezett oldatot L. 2. szűrő és 4-es opálüveg standard alkalmazásával vizsgáltuk és mértük a kémcsőre eső fény Tyndall-effektus által 135 fokos szögben létrejövő szóródását. A nyert értékeket az említett standard opálüveg fény-szórásának százalékában fejeztük ki.

Várható, hogy amint a pektinmolekula bontása megtörténik, a részecskék száma és nagysága változást szenvedve, a szórt fény intenzitása csökken. A *R a y l e i g h* képlete értelmében ugyanis:

$$I = \frac{I_0 \cdot 9 \cdot \pi^2 \cdot V^2 \cdot N}{\lambda^4 \cdot x^2} \left(\frac{n_1^2 - n^2}{n_1^2 + 2n^2} \right)^2 \cdot \sin^2 \alpha$$

ahol I_0 a ráeső, síkban poláros, λ hullámhosszú fénysugár, I pedig az α szögben szórt fény intenzitása, x a távolság a Tyndall fénykúp és az észlelő között, n_1 a részecske, n pedig a szuszpendáló közeg törésmutatója, V a részecske térfogata, N a térfogategységben levő részecskék száma. Adott mérési körülmények között a többi faktort állandónak véve

$$I = A \cdot N \cdot V^2$$

Ha tehát egy molekula 3 egyenlő részre esik szét, akkor

$$I' = A \cdot 3N \left(\frac{V}{3} \right)^2 = \frac{I}{3}$$

vagyis a szórt fény intenzitása az eredetinek $\frac{1}{3}$ -ára esik vissza. Mindez a fény hullámhosszához képest kicsi és szigorúan gömbalakú molekulákra vonatkozik.

A fény hullámhosszához képest már el nem hanyagolható méretű részecskék esetén bizonyos korrekciókat kell alkalmazni. Pálcaalakú nagyobb részecskékre vonatkozóan *N e u g e b a u e r* (10), illetőleg *S c h u l z* és *H a r b o r t h* (13) megállapításai szerint Pulfrich-féle nefelométernél a következő faktorial (z) kell megszorozni a *R a y l e i g h*-képlettel kapott I -értékeket:

$$z = 1 - 0,64 \left(\frac{l}{\lambda} \right)^2$$

ahol l a részecske hosszúsága. (A képlet akkor érvényes, ha l nem nagyobb, mint $0,3 \cdot \lambda$). 5330 Å-nél (L 2 szűrő) 1000–1300 Å hosszú pektinmolekula esetén sem okoz z értéke igen nagy eltérést a gömbalakú részecskékkel szemben.

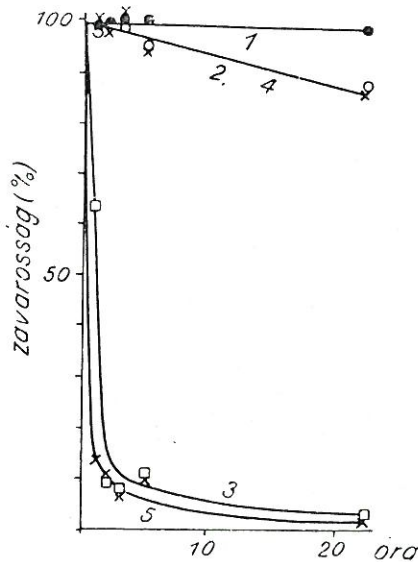
2. A zavarosságot mértük az oldaton átengedett fény extinkciójának meghatározásával is Pulfrich-féle fotométerben, olyan szűrővel, mely az esetleges színes oldattal a lehető legkisebb fényelnyelést mutatja (általában a 7500 vagy a 6650 Å-ös súlypontú S 75-ös, ill. 66-os szűrő). Az értékeket extinkciós modulusban, tehát az 1 cm hosszú kuvettában kapott extinkcióban fejeztük ki.

3. A zavarosság enzim hatására bekövetkező csökkenésének *kvalitatív* érzékelésére, illetőleg rögzítésére alkalmaztuk a fényképezési eljárást. A zavarosság észlelésére, a lehetőleg egyforma üvegekben elhelyezett oldatokat erős fényforrással átvilágítottuk, a fényforrás és az üvegek közé erős fekete vonalkézassal ellátott pergamentpapírt téve. Minél kevésbé zavaros az oldat, annál jobban látszik át rajta a háttér vonalozottsága.

Mind a három most említett módszer előfeltétele, hogy a vizsgálatra kerülő oldatok durva szennyeződést ne tartalmazzanak. Ennek eltávolítása volt a legnehezebb probléma. Itt még rendszeres tanulmányokra van szükség annak megállapítására, hogy melyik »előtisztítási« eljárás reprodukálható a legjobban és adja a legmegbízhatóbb eredményt. Vattás vagy kvalitatív szűrőpapíron történő »szabvány körülmények közötti« szűrést, továbbá meghatározott körülmények betartásával végrehajtott centrifugálást próbáltunk ki eddig. A szűrő pórus-nagyságának, a centrifugálás sebességének és időtartamának az eredményre gyakorolt befolyását még tovább kell tanulmányozni. Eddig mindenesetre azt tapasztaltuk, hogy meghatározott készülékben, adott ideig, adott fordulatszám melletti centrifugálással az adatok eléggé reprodukálhatónak bizonyulnak.

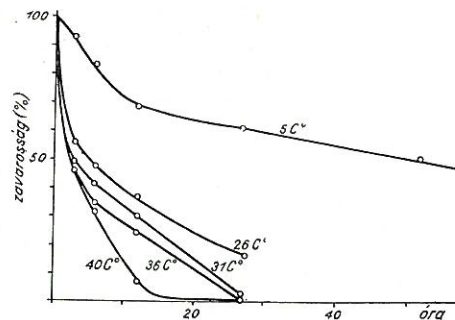
Az enzim minőségének és töménységének hatása számócalé tisztulására (Pulfrich-fotométer)

A 3. ábrában szereplő számócalé pektolízise során mértük a szabványosan megszürt minták extinkcióját 6650 Å-ös súlypontú (S 66) fényszűrővel. A szűrést kis (5 cm átmérőjű) Büchner-tölcséren elhelyezett kvalitatív szűrőpapíron át a palackba tett kémcsőbe szívással végeztük, körülbelül 20 ml-t gyűjtve össze a felvitt körülbelül 22–24 ml-nyi folyadékból. Az eredményeket a 11. ábra szemlélteti (a lé kezdeti extinkciós modulusa 1,05 volt).



11. ábra

Az enzimkészítmény minőségének és töménységének hatása számócalé zavarosságának változására. 1. kezeletlen. 2. 0,01% 850.2.2.3. jelz. készítmény. 3. 0,10% 850.2.2.3. jelz. készítmény. 4. 0,01% Pektinol K. 5. 0,10% Pektinol K.



12. ábra

A hőmérséklet szerepe pektinoldat zavarosságának enzimhatásra létrejövő változásában

Különösen kisebb fokú zavarosságok jobban mérhetőek és számszerűleg is pontosabban, ha az extinkció helyett a szórt fény intenzitását mérjük nefelométerben. Egy 2 g/dl-es pektinoldat pl. 0,36% 850. 2. 2. 3. jelzésű enzim kivonatjával kezelve, 0,28 extinkciós modulust (7500 Å) és 1658% nefelométerben mért zavarosságot adott. 24 C°-on tartva 25 óráig, az extinkciós modulus értéke 0,03-ra (10,7%), a nefelométer-adat pedig 183-ra (11%-ra) esett. A későbbiekben lehetőség szerint inkább a nefelométerrel dolgoztunk.

A hőmérséklet hatása pektinoldat tisztulására (Pulfrich-nefelométer)

Pektinoldat zavarosságának enzimes bontáskor való változását a hőfok függvényében, az 1. táblázatban leírt kísérlet során Pulfrich-nefelométerrel, L. 2. szűrővel és 4-es opálüveggel, 18 mm belső átmérőjű csőben vizsgálva, a 3. táblázat zavarossági adatait kaptuk.

3. táblázat

A hőmérséklet szerepe pektinoldat zavarosságának enzimhatásra bekövetkező változásában

(1) Az enzimkészítmény jelzése	(2) A bontás időtartama (óra)	(3) Az oldat zavarossága (nefelométer-adatok a kezdeti érték százalékában)				
		(4) A bontás hőmérséklete (C°)				
		5	26	31	36	40
Enzim nélkül (5)	3	99	100	99	104	102
	6	103	103	103	103	107
	12	104	105	106	106	107
	27	107	113	115	110	117
873. (0,2%)	3	43,6	28,5	25,2	17,1	13,0
	6	38,1	20,9	7,8	4,8	3,7
	12	28,6	3,6	2,9	2,5	2,6
	27	29,1	2,2	2,2	2,0	2,1
	52	4,3	—	—	—	—
	96	2,2	—	—	—	—
902.1. (0,2%)	3	92,6	55,7	48,6	47,9	45,5
	6	82,7	47,5	40,7	34,2	31,2
	12	68,4	36,4	29,7	24,1	6,5
	27	60,8	15,8	2,0	0,9	0,7
	52	51,5	—	—	—	—
	96	31,4	—	—	—	—
Pektinol-K (0,2%)	3	64,3	35,0	31,3	30,5	28,4
	6	54,7	30,7	12,7	3,2	0,5
	12	44,0	3,3	0,4	0,5	0,2
	27	39,4	0	0	0	0
	52	31,4	—	—	—	—
	96	3,4	—	—	—	—

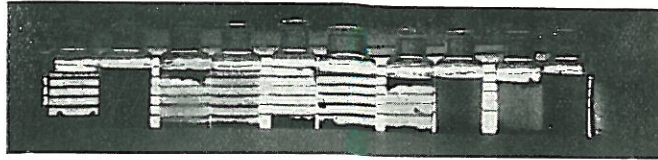
A kezdeti értéket, (863—7 [deszt. víz] =) 856%-ot 100-nak véve, fejeztük ki a megadott időpontokban 20 ml-es hegyesvégű centrifugacsövekben 3000 f/p mellett 10 percig centrifugált és dekantált oldat zavarosságát. A 902. l. jelzésű készítménnyel kapott értékeket grafikusan a 12. ábra szemlélteti.

Az ábrából jól kivehető a növekedő hőmérsékletek fokozott zavarosságcsökkentő hatása.

A zavarosság csökkenésének fotografikus rögzítése

A fényképezéssel történő zavarosság-regisztrálás bemutatására a 13. ábra szolgál.

Két éve mélyhűtéssel tárolt egres frissen kipréselt, centrifugálással üledékmentesített, erősen zavaros, viszkózus levébe különböző laboratóriumi készítésű enzimpreparátumokat mérve, 36 C°-on kloroform jelenlétében hagytuk állni a mintákat. A 95. órában történt a 13. ábrán bemutatott fénykép felvétele (a külső kép a minták többségénél már 10 óra múlva is hasonló volt).



13. ábra

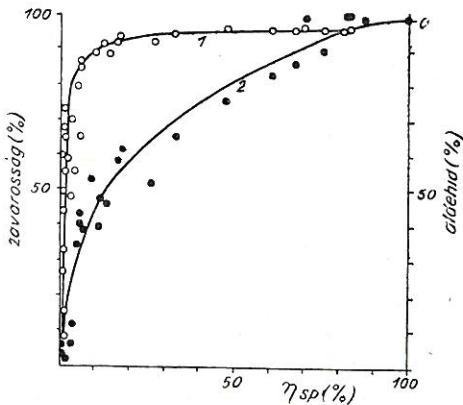
Különböző penésztörzsek tenyészetének hatása egreslé tisztulására. (Fényképes rögzítés)

A viszkozitás, a redukálóképesség és a zavarosság összefüggése

Fontosnak látszott, hogy a pektolízis vizsgálatára szolgáló három fentebb ismertetett eljárást egymással összehasonlítsuk. Bontási kísérletek folyamán az időnként vett mintákat ezért több szempontból megvizsgáltuk. Két ilyen kísérletet közelebbről ismertetünk.

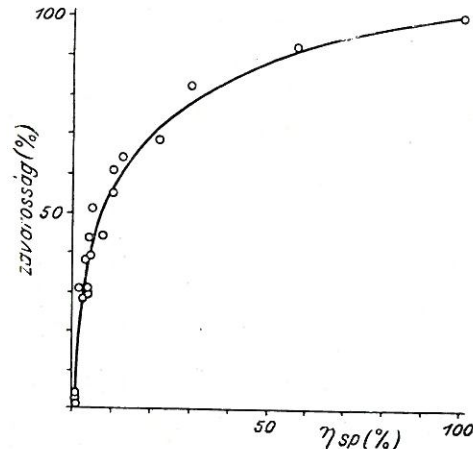
A redukálóképesség és a zavarosság a viszkozitás függvényében

A 2. ábránál jelzett körülmények között meghatároztuk minden egyes alkalommal a viszkozitás mellett a pektinoldat jódredukálóképességét és a zavarosságát



14. ábra

A zavarosság, a viszkozitás és a szabad aldehydtartalom változásának összefüggése enzimes pektinbontásnál. 1. a szabad aldehydtartalom és a viszkozitás összefüggése. 2. a zavarosság és a viszkozitás összefüggése



15. ábra

A zavarosság és a viszkozitás változásának összefüggése enzimes pektinbontásnál

4. táblázat

A viszkozitás, a szabad aldehidtartalom és a zavarosság változásának összefüggése enzimes pektinbontásnál

	(1) Enzimekészítmény		(4) Az enzimes bontás időtartama 24 C°-on (óra)					
	(2) jelzés	(3) konc. (%)	1	2	3	5	22	47
(5) Specifikus viszkozitás 25 C°-on (a kezdeti érték %-ában)		0	100	—	—	99	103	97
	850.2.2.3.	0,01	87,8	81,7	76,1	68,4	27,2	11,7
		0,10	33,4	17,8	12,8	6,1	3,9	0,5
		1,00	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	Pektinol K	0,01	83,4	71,1	61,2	47,8	13,9	6,1
		0,10	17,2	9,5	7,2	5,0	2,2	0,5
1,00		5,6	1,7	3,9	1,1	0	0	
(6) Felszabadult aldehid-tartalom (az összes aldehid %-ában)		0	4,3	—	—	—	3,9	6,4
	850.2.2.3.	0,01	—	4,3	4,2	4,2	8,2	12,3
		0,10	5,9	7,2	9,0	13,5	29,8	40,6
		1,00	27,1	32,5	35,2	45,1	67,3	84,9
	Pektinol K	0,01	4,1	3,8	4,1	3,8	11,3	15,8
		0,10	8,1	11,3	14,9	20,3	41,1	52,4
1,00		35,2	—	45,1	51,0	66,4	74,0	
(7) Zavarosság (nefelométer- adatok a kezdeti érték %-ában)		0	100	—	—	—	100	100
	850.2.2.3.	0,01	100	100,3	90,1	86,5	51,6	39,4
		0,10	65,0	62,3	47,4	39,9	11,2	3,6
		1,00	43,2	27,6	—	—	6,3	5,2
	Pektinol K	0,01	100,1	100,1	83,5	76,0	45,5	34,8
		0,10	58,3	53,5	39,4	33,6	2,5	3,4
1,00		42,6	7,6	5,6	6,7	0,2	0,2	

is. A nefelométerrel kapott zavarosságot a kezdeti érték (554%) százalékában, a redukálóképességet pedig az elméletileg lehetséges maximális érték (11,09 ml 0,1 N jódoldat) 10 ml 1%-os 30% metilezettességű pektinoldat) százalékában fejeztük ki. Az adatokat a 4. táblázat tartalmazza.

Ha a 4. táblázat adatait összefoglalva, grafikont készítünk, az abszcisszán a mindenkor specifikus viszkozitást, az ordinátán pedig az ezekhez az értékekhez tartozó aldehidszázalékokat, illetőleg zavarossági adatokat tüntetjük fel, akkor a 14. ábrán látható képet kapjuk.

A zavarosság a viszkozitás függvényében

A zavarosság és a viszkozitás viszonyára lényegileg azonos értelmű összefüggést kapunk, ha az 1. és a 3. táblázat értékeit tüntetjük fel az előbbi módon grafikonban. Az 5 C°-ra vonatkozó adatokat a 15. ábra mutatja be.

Az eredmények értékelése

Jól látható, hogy mind a zavarosság csökkenése, mind a szabad aldehid-tartalom növekedése később következik be, mint a viszkozitás csökkenése. Mind a

két érték csak akkor kezd erősebben változni, amikor a specifikus viszkozitás már jelentősen csökkent. Időbeli sorrendben a pektolízis folyamán először a viszkozitás csökken, azután a zavarosság mérséklődik, végül a redukálóképesség erősödik.

Kertes (5) feltette, hogy a poligalakturonsavat a $[(G)_m]_n$ képlet fejezi ki helyesen, vagyis az m galakturonsavanhidrid-egységből (G) álló poligalakturonsav-láncokból n darab összeáll és ezzel másodlagos aggregátum vagy polimer képződik asszociáció révén. Így ha kezdetben csak az n értéke csökken, akkor redukáló csoport-többlet alig keletkezhet, viszont a viszkozitás erősen csökkenhet. A továbbiak során az m értéke csökken és ekkor szabadul fel az aldehidtartalom zöme.

Merrill és Weeks (9) ezzel szemben a hőhatásra bekövetkező pektinbontás vizsgálata alapján arra a következtetésre jut, hogy itt másodlagos aggregátumokról nem lehet szó, mert a viszkozitáscsökkenés folyamatának »aktiválási energiája« — melyet a meghatározott mérvű bontás létrejöttéhez szükséges időkből számítottak ki — túl nagy ehhez (28000 cal/mol). Szerintük a viszkozitáscsökkenésekor is glükózid-hidrolízis játszódik le, mely kezdetben azért nem mutatható ki, mert a vizsgálati módszerek túl érzékenek. Az a tény, hogy a jelen munkában a viszkozitáscsökkenésből számított »aktiválási energia« az enzim közreműködése ellenére is elég nagy (14.400 cal/mol), nagyobb, mint a másodlagos kötések (hidrogénkötés, van der Waals erők stb.) bontásánál tapasztalt legmagasabb aktiválási energiák (9000 cal/mol), valószínűvé teszi, hogy az enzimes pektinbontás során fellépő viszkozitáscsökkenés is elsődleges kötések felszabadulása révén jön létre.

Minél nagyobb a pektin észterezettségi foka, annál nagyobb mértékű az 50% viszkozitáscsökkenés elérésével együttjáró aldehidfelszabadulás. Például tiszta pektinsavnál az 50%-os viszkozitáscsökkenést 0,3—2,0% glikozidhidrolízis kíséri, 72% észterezettséggű pektinnél körülbelül 15%, 100% észterezettség esetén (glikolészter) 57% [Matus (8)].

A jelen munka ezen továbbmenőleg rámutat arra a szakirodalomban eddig még nem vizsgált tényre, hogy a zavarosságcsökkenés is hasonló értelmű viszonyban van a viszkozitáscsökkenéssel. Számszerűleg azonban itt a kép más. Míg például 50%-os viszkozitáscsökkenés 4—5% aldehidfelszabadulással jár, addig a zavarosságcsökkenés 12—20% között mozog; 75%-os viszkozitáscsökkenéshez 7—8% aldehidfelszabadulás és 26—36% zavarosságcsökkenés tartozik.

Miután akár láncvégi hidrolízis, akár »találomra« történő bontás (random scission) esetén — a R a y l e i g-képlet figyelembevételével — a fényszóródás és a viszkozitás változásának lineáris összefüggést kellene mutatnia, a fenti jelenleg a pektolízis folyamatának bonyolult mehanizmusára utal.

Összefoglalás

1. A viszkozitásmérések értékelése során sikerült olyan összefüggést találni, mely a nyert adatok kinetikai értelmezésére és az enzimek aktivitásának kifejezésére alkalmasnak látszik.

2. Az így kapott »reakciósebességi állandók« arra vallanak, hogy a lejátszódó reakciók bruttó rendűsége = 1.

3. A reakciósebességi állandókból az »aktiválási energia« értéke 14,400 cal/mol körülnek adódik.

4. Megkíséreltük a pektolízis folyamatát az eddig leírt módszerek mellett, illetőleg azok helyett egy, a pektin-irodalomban eddig nem szereplő eljárással, a zavarosságméréssel nyomon követni.

5. Az adatok azt mutatják, hogy időbeli sorrendben a pektinbontás során először az oldat viszkozitása csökken, ennek a folyamatnak egy későbbi szakaszában indul meg a zavarosság erősebb csökkenése; a pektolizist végül a glükozidkötések gyorsabb ütemű felszabadulása fejezi be. Ez utóbbinak gyorsuló szakaszában viszkozitásváltozás már nincs.

A jelen munka kísérleti részében nyújtott hathatós segítségéért ezúton is köszönetet kell mondanom Ásvány Ákos kartársnak (Szőlészeti Kutató Intézet).

Érkezett: 1953. április 22.

Irodalom

1. Ekenstam, A. af: Über die Celluloselösungen in Mineralsäuren, Lund, 1936. — ref.: Husemann et al., 1. cit.
2. Földiák, G., Pally, I., Vámos, R., & Zakar, P.: Ásványolaj és Földgáz Kísérleti Intézet 10. sz. közleménye.
3. Husemann, E., Loës, E. & Lötterle, R.: Die makromol. Chemie, **6**, 163, 1951.
4. Jermyn, M. A. & Tomkins, R. G.: Bioch. J., **47**, 437, 1950.
5. Kertesz, Z. I.: J. Am. Chem. Soc., **61**, 2544, 1939.
6. Kyzlink, V.: O ucinosti filtracnich enzymu pri pektolyse ovocnych stáv, Prumyslové Vydavatelství, Praha, 1950.
7. Lineveaver, H. & Jansen, E. F.: Advances in Enzymology, **11**, 267, 1951.
8. Matus, J.: Ber. schweiz. bot. Ges., **58**, 319, 1948.
9. Merrill, R. C. & Weeks, M.: J. Ann. Chem. Soc., **67**, 2244, 1945.
10. Neugebauer, Th.: Ann. d. Physik, **42**, 509, 1942—43.
11. Reid, W. W.: J. Sci. Food & Agric., **1**, 234, 1950.
12. Schubert, E.: Schweizer Brauerei-Rundschau, **62**, S. 3, Nr. 3—4, 1951.
13. Schulz, G. V. & Harborth, G.: Die makromol. Chemie, **2**, 187, 1948.
14. Staudinger, H.: Die hochmolekularen organischen Verbindungen, Springer, Berlin, 1932.
15. Weber, F. & Deuel, H.: Mitt. Lebensm.-Unters. u.-Hygiene, **36**, 368, 1945.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕКТОЛИЗА

К. Ваш

Исследовательский институт консервной, мясной и холодильной промышленности,
Будапешт

Выводы

Было исследовано несколько методов ферментативного разложения пектина и оценки разлагающего действия. Исползованные ферментативные препараты были частично иностранного происхождения (Пектинол К допл. конз.), отчасти же сырые препараты собственного производства (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*). В качестве субстрата был применен пектиновый порошок (яблочный пектин, метоксилизированностью примерно в 30%), с одной стороны, и естественный, нативный пектин (свежие фруктовые соки), консервированный 0,15—0,2%-ом бензойнокислого натрия, с другой.

Вязкость была измерена видоизмененным вискозиметром типа Оствальда (рис. 4) (обыкновенно на температуре в 25°), обычно на образцах, очищенных 10-минутным центрифугированием скоростью в 3000 оборотах в минуту. — Редукционная способность была измерена методом Вильштетера и Шуделя (по способу Джермина и Томкинса). — Исследование мутности происходило измерением (посредством фотометра Пульфриха) поглощения света (6650 Å), пропущенного через образцы, центрифугированные вышеуказанным методом, с одной стороны, и определением рассеянного света посредством нефелометра Пульфриха, с другой (фильтр Р. 2: 5330 Å, стекло № 4 для сравнения пробирка диаметра 18 мм).

При изучении уменьшения вязкости было исследовано влияние качества и концентрации фермента на растворы пектинового порошка (рис. 2) и на сок земля-

ники (рис. 3), а также влияние температуры на растворы пектина (табл. 1, рис. 5). Были сделаны попытки кинетической оценки полученных данных применением приблизительной формулы Экенштама, разработанной для гидролиза клетчатки кислотой:

$$K = \frac{1}{t_2 - t_1} \left(\frac{1}{P_2} - \frac{1}{P_1} \right)$$

где K = константа скорости изменения вязкости, P_1 и P_2 = степени полимеризации, относящиеся к моментам t_1 и t_2 . Если заменить P_1 и P_2 специфическими величинами вязкости (η_{sp}), в общем получаются довольно постоянные величины K (за исключением фруктовых соков, см. табл. 2). Это указывает на то, что процесс уменьшения вязкости протекает, повидимому, согласно кинетическим правилам какой-либо первостепенной реакции. Величина K повышается параллельно с увеличением концентрации ферментов и повышением температуры (рис. 6 и 7). «Энергия активации» процесса — около 14,4 ккал/мол. — Величины K очевидно пригодны для выражения относительной эффективности препаратов ферментов.

Хорошим оказался для измерения активности также и способ Кизлинка, основанный на «степень разложения» Вебера и Дейеля. При определении «стандартной пектолитической силы» (т. е. концентрации ферментов, вызывающей при pH 3,5–3,9 и 20° С в течение 6 часов 85%-ное специфическое уменьшение вязкости в яблочном соке, содержащем 0,2% пектина метилизованностью в 70–75%) (рис. 8), в случае меньшего числа измерений, можно повысить надежность интерполяции, если нанести концентрацию ферментов в логарифмическом масштабе. По мнению Рейда, в крайнем до степени разложения примерно в 80% наблюдается линейная связь между степенью разложения и концентрацией ферментов (рис. 9).

Данные о способности редукции иода, полученные различными препаратами плесени (рис. 10), не могут рассматриваться реакцией ни первой, ни второй степени.

Для определения пектолиза до сих пор не применялось количественное измерение мутности. Данные настоящей статьи указывают на то, что можно хорошо следить за процессом разложения пектина, особенно нефелометром. Легко удастся изучение влияния измененных концентраций ферментов (рис. 11) и температур (табл. 3, рис. 12) на отстаивание растворов пектина путем измерения мутности.

Если при искании связи между редукционной способностью, мутностью и изменением вязкости отметить мутность или содержание свободных альдегидов в зависимости от всегдашней специфической вязкости (табл. 4, рис. 14 и 15), можно установить, что при разложении пектина вначале уменьшается вязкость раствора, усиленное же уменьшение мутности начинается на более позднем этапе этого процесса. Наконец, пектолиз кончается более быстрым освобождением глюкозидных связей.

Рис. 1. Влияние пектолитических ферментов на пектиновую молекулу. По Лейнвиверу и Янсену (1950 г.).

Рис. 2. Влияние качества и концентрации препарата ферментов на изменение вязкости раствора пектина.

1 : без ферментов

2 : 0,01 % препарата ферментов № 850. 2. 2. 3. собственного производства

3 : 0,10 % препарата ферментов № 850. 2. 2. 3. собственного производства

4 : 0,01 % Пектинол К

5 : 0,10 % Пектинол К

Начальный $\eta_{sp} = 1,80$ (25° С), pH = 3,6, разложение при 24° С.

Ордината : η_{sp} (в % от начальной величины), абсцисса : продолжительность разложения (в часах).

Рис. 3. Влияние качества и концентрации препарата ферментов на изменение вязкости сока земляники.

1 : без ферментов

2 : 0,01 % № 850. 2. 2. 3. или Пектинол К

3 : 0,10 % № 850. 2. 2. 3. или Пектинол К. Начальный $\eta_{sp} = 3,74$ (22° С), pH =

3,8, разложение при 22° С. Ордината : η_{sp} (в % начальной величины); абсцисса : продолжительность разложения (в часах).

Рис. 4. Видоизмененный вискозиметр Оствальда, употребленный в опытах (по Фельдиану, Раллай, Вамошу и Закару).

Рис. 5. Роль температуры в изменении вязкости раствора пектина под влиянием ферментов. Начальный $\eta_{sp} = 3,4$ (25° С), pH = 3,9; 0,2% препарата ферментов № 902. 1. абсцисса : продолжительность разложения (в часах). Ордината : η_{sp} (в % от начальной величины); абсцисса : продолжительность разложения (в часах).

Рис. 6. Связь между концентрацией ферментов и активностью.

1 : 850. 2. 2. 3. 2 : Пектинол *K*. Раствор пектина; начальный $\eta_{sp} = 1,80$ (25°C), $\text{pH} = 3,6$, разложение при 24°C . Ордината: логарифм константы (K), вычисленной из уменьшения вязкости; абсцисса: логарифм концентрации ферментов (%).

Рис. 7. Связь между температурой и скоростью разложения. Пектиновый раствор; начальный $\eta_{sp} = 3,4$ (25°C), $\text{pH} = 3,9$, 0,2% препарата ферментов № 902. 1.

Ордината: Логарифм константы скорости разложения; абсцисса: обратная величина абсолютной температуры (T).

Рис. 8. Определение эффективности трех препаратов ферментов (№№ 964. 2. 964. 11. и 864. 31.). 1 : Препарат № 964. 2. 2 : Препарат № 964. 11. 3 : Препарат № 964. 31. Яблочный сок; η_{sp} от пектина = 3,50 ($19,5^\circ\text{C}$), $\text{pH} = 3,2$, продолжительность разложения при $20-21^\circ\text{C} = 6$ часов. Ордината: степень разложения; абсцисса: концентрация ферментов (г/100 мл).— Примечание. В данных условиях 1 кг препаратов обеспечивал 85%-ное разложение в следующем количестве вышеуказанного фруктового сока: 964. 2 — в

909 л $\left(= \frac{1000}{1,1} \right)$, 964. 11. — в 667 л $\left(= \frac{1000}{1,5} \right)$, 964. 31. — в 183 л $\left(\frac{1000}{5,46} \right)$.

Рис. 9. Определение эффективности трех препаратов ферментов. 1 : препарат № 964. 2. 2 : препарат № 964. 11. 3 : препарат № 964. 31. Ордината: степень разложения; абсцисса: логарифм концентрации ферментов (г/г) (условия опыта см. на рис. 8).

Рис. 10. Повышение содержания свободных альдегидов в растворе пектина под влиянием различных препаратов ферментов. К 1%-ному раствору пектина добавлено (при 18°C) 20 объемных % вегетационных растворов следующих плесеней: 1 : 4%-ная вытяжка из препарата Пектинол *K*. 2 : В 468: *Penic. sp.* 3 : С 196: *Fusarium Asp.* 4 : N 152: *Aspergillus foetidus.* 5 : N 175: *Aspergillus foetidus.* 6 : V 77: *Asperg. sp.*

Ордината: потребление иода 10 мл-ами реакционной смеси (в мл 0,1 N I_2); абсцисса: продолжительность разложения (при 18°C , в часах).

Рис. 11. Влияние качества и концентрации препарата ферментов на изменение мутности сока земляники. 1 : без обработки 2 : 0,01% препарата № 850. 2. 2. 3. 3 : 0,10% препарата № 850. 2. 2. 3. 4 : 0,01% Пектинол *K* 5 : 0,10% Пектинол *K*

Начальная мутность: экстинкционный модуль при 6650 Å: 1,05, начальный $\eta_{sp} = 3,74$ (25°C), $\text{pH} = 3,8$, разложение при 22°C . Ордината: мутность (в % от начальной величины); абсцисса: продолжительность разложения (в часах).

Рис. 12. Роль температуры в изменении мутности раствора пектина под влиянием ферментов. Начальная мутность: 856, начальный $\eta_{sp} = 3,4$ (25°C), $\text{pH} = 3,9$; 0,2% препарата ферментов № 902. 1. Ордината: мутность (в % от начальной величины); абсцисса: продолжительность разложения (в часах).

Рис. 13. Влияние различных штаммов плесеней на отстаивание сока крыжовника. (Фиксация фотографированием.)

Рис. 14. Связь между изменением мутности, вязкости и содержания свободных альдегидов при разложении пектина ферментами.

1 : связь между содержанием свободных альдегидов и вязкостью

2 : связь между мутностью и вязкостью

Раствор пектина; начальный $\eta_{sp} = 1,80$ (25°C), начальная мутность = 554, максимум потребления иода: 11,09 мл 0,1 N I_2 (10 мл реакционной смеси, $\text{pH} = 3,6$, разложение при 24°C 0,01, 0,10 и 1,0%-ными препаратами Пектинол *K*. и № 850. 2. 2. 3. Ординаты: слева: мутность (в % от начальной величины), справа: концентрация освобожденных альдегидов (в % общего содержания альдегидов); абсцисса: специфическая вязкость (в % от начальной величины).

Рис. 15. Связь между изменением мутности и вязкости при разложении пектина ферментами. Раствор пектина; начальный $\eta_{sp} = 3,4$ (25°C), начальная мутность = 856, $\text{pH} = 3,9$; 0,2% препарата ферментов № 902. 1.; разложение при 5°C . Ордината: мутность (в % от начальной величины); абсцисса: η_{sp} (в % от начальной величины).

Untersuchungen über den enzymatischen Pektinabbau

K. VAS

Forschungsanstalt für die Konserven-, Fleisch-, und Kälteindustrie, Budapest

Zusammenfassung

Mehrere Methoden zum enzymatischen Abbau von Pektin und zur Auswertung der Abbauwirkung wurden untersucht. Die angewendeten Enzympräparate waren teils Handelserzeugnisse

(Pektinol K dopp. konz.), teils selbst hergestellte (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*) Rohrpräparate. Als Substrat dienten mit 0,2% Natriumbenzoat haltbaremgemachte Lösungen von Apfelpektin (Veresterungsgrad cca. 30%) und von nativem Pektin (frische Fruchtsäfte).

Die Viskositätsmessungen wurden in modifizierten Ostwaldschen Viskosimetern ausgeführt (Abb. 4.) mit Proben, die 10 Minuten lang zentrifugiert (3000 Umdrehungen pro Minute) und dann dekantiert wurden. — Die Bestimmung des Reduktionsvermögens erfolgte nach der Methode von *Willstätter* und *Schudel* (in der Ausführung von *Jermyn* und *Tomkins*). — Die Trübung wurde in den zentrifugierten (s. oben) Proben teils durch Bestimmung des durchgelassenen Lichtes (bei 6650 bzw. 7500 Å), teils durch Messung des gestreuten Lichtes [Filter L 2(5530 Å), Vergleichsglas 4, Reagenzglasdurchmesser 18 mm] im *Pulfrich*-Nephelometer untersucht.

Beim Studium der *Viskositätsverminderung* wurde die Wirkung der Art und Konzentration der Enzympräparate auf Pektinlösungen (Abb. 2) und Erdbeersaft (Abb. 3), sowie der Einfluss der Temperatur auf die Pektolyse (Tab. 1, Abb. 5) festgestellt. Es wurde versucht die erhaltenen Zahlen mit der von *Ekenstam* auf die Säurehydrolyse von Zellulose aufgestellten Näherungsgleichung auszuwerten :

$$k = \frac{1}{t_2 - t_1} \left(\frac{1}{P_2} - \frac{1}{P_1} \right)$$

wo k die Geschwindigkeitskonstante der Hydrolyse, P_1 und P_2 die zu den Zeiten t_1 und t_2 bestimmten Polymerisationsgrade bedeuten. Nach Ersetzen von P_1 und P_2 in der obigen Gleichung durch die spezifischen Viskositätswerte (η_{sp}), wurden im allgemeinen (mit der Ausnahme von Fruchtsäften) ziemlich konstante Zahlen für k erhalten (Tab. 2), was so gedeutet werden kann, dass die Viskositätsverminderung scheinbar die Regelmässigkeiten einer Reaktion erster Ordnung verfolgt. — Der Wert von k steigt mit der Enzymkonzentration und der Temperatur parallel an (Abb. 6 und 7). Die »Aktivierungsenergie« des Prozesses ergibt sich zu etwa 14,4 Cal./Mol. Dieser bei enzymatischen Reaktionen ziemlich hohe Wert deutet darauf hin, dass die Herabsetzung der Viskosität hier, wie auch bei der Hitzebehandlung (*Merrill* und *Weeks*), durch Glykosidhydrolyse, d.h. durch Trennung primärer Bindungen erfolgt. Die Aktivierungsenergie der Trennung sekundärer Bindungen (Wasserstoffbindungen, van der Waals Kräfte usw.) pflegt auch ohne enzymatische Katalyse nicht über 9,0 Cal./Mol. zu liegen.

Die k -Werte scheinen geeignet zu sein, die relative Aktivität von Enzympräparaten auszudrücken.

Zur Bestimmung der Aktivität kann auch die auf die »Abbauzahl« (*Weber* und *Deuel*) gegründete *Kyzlinkische* Methode mit Erfolg herangezogen werden. Bei der Bestimmung der durch den letztgenannten Autor eingeführten »genormten pektolytischen Kraft« [die Menge (in Liter) mit 0,2% Pektin (Veresterungsgrad 70—75%) versetzten Apfelsaftes, die bei 20° C und pH = 3,5—3,9 von 1 kg des Enzympräparates in 6 Stunden zu 85% abgebaut werden : Abb. 8] kann die Genauigkeit der Intrapolation erhöht werden, wenn die Enzymkonzentration in logarithmischem Massstab aufgetragen wird. Nach *Reid* zeigt nämlich — wenigstens unterhalb der Abbauzahl 80% — die Abbauzahl und der Logarithmus der Enzymkonzentration einen linearen Zusammenhang (Abb. 9).

Die mit verschiedenen Pilzkulturen erhaltenen Angaben über den *Jodverbrauch* (Abb. 10) konnten weder als eine Reaktion erster, noch als eine solche zweiter Ordnung gedeutet werden.

Zum Studium der Pektolyse sind quantitative *Trübungsmessungen* in der Literatur bisher nicht vorgeschlagen worden. Die Untersuchungen zeigten, dass der Pektinabbau besonders auf nephelometrischem Wege gut verfolgt werden kann. Der Einfluss des Variierens der Enzymkonzentration (Abb. 11) und der Temperatur (Tab. 3, Abb. 12) auf die Klärung von Pektinlösungen kann mittels Trübungsmessungen erfolgreich studiert werden.

Wenn, um den Zusammenhang der Änderung von Reduktionsvermögen, Trübung und Viskosität zu finden, die Trübung bzw. die freie Aldehydkonzentration als Funktionen der spezifischen Viskosität aufgetragen werden (Tab. 4, Abb. 14 und 15), so ist es festzustellen, dass während des Pektinabbaus anfangs nur eine Erniedrigung der Viskosität, dann eine stärkere Abnahme der Trübung und zuletzt die beschleunigte Zunahme an freien Aldehydgruppen eintreten.

Abb. 1. Einwirkung pektolytischer Enzyme auf das Pektinmolekül, nach *Lineweaver* und *Jansen* (1951).

Abb. 2. Einfluss von Art und Konzentration des Enzympräparates auf die Viskositätsänderung von Pektinlösungen. 1 : ohne Enzym, 2 : 0,01% des selbst hergestellten Präparates Nr. 850. 2. 2. 3., 3 : 0,10% des selbst hergestellten Präparates Nr. 850. 2. 2. 3., 4 : 0,01% Pektinol K. 5 : 0,10% Pektinol K. Anfangsviskosität: $\eta_{sp} = 1,80$ (25° C), pH = 3,6. Abbau bei 24° C. Ordinate: η_{sp} in % des Anfangswertes; Abszisse: Dauer der Einwirkung in Stunden.

Abb. 3. Einfluss von Art und Konzentration des Enzympräparates auf die Viskositätsänderung von Erdbeersaft. 1 : ohne Enzym. 2 : 0,01% Präparat Nr. 850. 2. 2. 3. bzw. Pektinol K. 3 : 0,10% Präparat Nr. 850. 2. 2. 3. bzw. Pektinol K. Anfangsviskosität: $\eta_{sp} = 3,74$ (22° C),

pH = 3,8, Abbau bei 22° C. Ordinate: η_{sp} in % des Anfangswertes; Abszisse: Dauer der Einwirkung in Stunden.

Abb. 4. Das bei den Versuchen angewandte modifizierte Ostwaldsche Viskosimeter (nach Földiák, Pally, Vámos und Zakar).

Abb. 5. Einfluss der Temperatur auf die enzymatische Viskositätsänderung von Pektinlösungen. Anfangsviskosität: $\eta_{sp} = 3,4$ (25° C), pH = 3,9; Abbau mit 0,2% Präparat Nr. 902. I. Ordinate: η_{sp} in % des Anfangswertes; Abszisse: Dauer der Einwirkung in Stunden.

Abb. 6. Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Aktivität. 1: Präparat Nr. 850. 2. 2. 3., 2: Pektinol K. Pektinlösung; Anfangsviskosität: $\eta_{sp} = 1,80$ (25° C), pH = 3,6; Abbau bei 24° C. Ordinate: Logarithmus der aus der Viskositätsverminderung berechneten »Geschwindigkeitskonstante« (k); Abszisse: Logarithmus der Enzymkonzentration (%).

Abb. 7. Zusammenhang zwischen Temperatur und Geschwindigkeit des Abbaus. Pektinlösung; Anfangsviskosität: $\eta_{sp} = 3,4$ (25° C), pH = 3,9; 0,2% Präparat Nr. 902. I. Ordinate: Logarithmus der »Geschwindigkeitskonstante« (k) des Abbaus; Abszisse: der reziproke Wert der absoluten Temperatur (T).

Abb. 8. Bestimmung der Aktivität von drei Enzympräparaten. 1: Präparat Nr. 964. 2., 2: Präparat Nr. 964. 11., 3: Präparat Nr. 964.31. Apfelsaft; von Pektin verursachte Anfangsviskosität (nach Subtraktion des Wertes bei vollkommener Spaltung) $\eta_{sp} = 3,50$ (19,5° C) pH = 3,2; Abbau: 6 Stunden bei 20—21° C. Ordinate: Abbauzahl; Abszisse: Enzymkonzentration (g/dl). — Anmerkung: unter den obigen Bedingungen kann eine Viskositätsverminderung von 85% durch 1 kg Präparat Nr. 964. 2. in (1000/1,1 =) 909 Liter, durch 1 kg Präparat Nr. 964. 11. in (1000/1,5 =) 667 Liter und durch 1 kg Präparat Nr. 964. 31. in (1000/5,46 =) 183 Liter Apfelsaft herbeigeführt werden.

Abb. 9. Bestimmung der Aktivität von drei Enzympräparaten. 1: Präparat Nr. 964. 2., 2: Präparat Nr. 964. 11., 3: Präparat Nr. 964.31. Ordinate: Abbauzahl; Abszisse: Logarithmus der Enzymkonzentration (g/hl). (Versuchsverhältnisse: wie bei Abb. 8.).

Abb. 10. Zunahme des freien Aldehydgehaltes von Pektinlösungen unter der Einwirkung verschiedener Enzymlösungen. Zu mehreren Mustern einer 1%-igen Pektinlösung wurden 20 Vol % von den folgenden Enzymlösungen hinzugefügt: 1: 4%-iger Extrakt aus Pektinol K., 2: Kulturflüssigkeit des Pilzstammes B 468: *Penic. sp.*, 3: Kulturflüssigkeit des Pilzstammes C 196: *Fusarium sp.*, 4: Kulturflüssigkeit des Pilzstammes N 152: *Asp. foetidus.*, 5: Kulturflüssigkeit des Pilzstammes N 175: *Asp. foetidus.*, 6: Kulturflüssigkeit des Pilzstammes V 77: *Asp. sp.* Ordinate: Jodverbrauch (ml 0,1 N I₂) von 10 ml Reaktionsgemisch; Abszisse: Dauer der Spaltung (bei 18° C) in Stunden.

Abb. 11. Einfluss von Art und Konzentration des Enzympräparates auf die Änderung der Trübung von Erdbeerensaft. 1: ohne Enzym., 2: 0,01% Präparat Nr. 850. 2. 2. 3., 3: 0,10% Präparat Nr. 850. 3. 2. 3., 4: 0,01% Pektinol K., 5: 0,10% Pektinol K. Anfangstrübung: Extinktionsmodul bei 6650 Å = 1,05; Anfangsviskosität: $\eta_{sp} = 3,74$ (22° C), pH = 3,8; Abbau bei 22° C. Ordinate: Trübung in % des Anfangswertes; Abszisse: Dauer der Einwirkung in Stunden.

Abb. 12. Einfluss der Temperatur auf die enzymatisch verursachte Trübungsänderung von Pektinlösungen. Anfangswert der relativen Trübung (gegen das Vergleichsglas 4): 856%. Anfangsviskosität: $\eta_{sp} = 3,4$ (25° C), pH = 3,9; 0,2% Präparat Nr. 902. I. Ordinate: Trübung in % des Anfangswertes; Abszisse: Dauer der Einwirkung in Stunden.

Abb. 13. Einwirkung von Kulturen verschiedener Pilzstämme auf die Klärung von Stachelbeerensaft (Photographische Registrierung).

Abb. 14. Zusammenhang zwischen Änderung der Trübung, der Viskosität und des freien Aldehydgehaltes beim enzymatischen Pektinabbau. 1: Zusammenhang zwischen Gehalt an freiem Aldehyd und Viskosität. 2: Zusammenhang zwischen Trübung und Viskosität. Pektinlösung; Anfangsviskosität: $\eta_{sp} = 1,80$ (25° C), Anfangswert der relativen Trübung: 554%, höchstmöglicher Wert des Jodverbrauchs: 11,09 ml 0,1 N I₂ pro 10 ml Reaktionsgemisch, pH = 3,6; Abbau bei 24° C mit 0,01, 0,10 und 1,0% Pektinol K bzw. Präparat Nr. 850. 2. 2. 3. Ordinate: links: Trübung in % des Anfangswertes, rechts: Konzentration des frei gewordenen Aldehyds in % der Gesamtaldehydkonzentration; Abszisse: spezifische Viskosität in % des Anfangswertes.

Abb. 15. Zusammenhang zwischen Änderung der Trübung und der Viskosität beim enzymatischen Pektinabbau. Pektinlösung; Anfangsviskosität: $\eta_{sp} = 3,4$ (25° C), Anfangswert der relativen Trübung: 856%, pH = 3,9; 0,2% Präparat Nr. 902. I.; Abbau bei 5° C. Ordinate: Trübung in % des Anfangswertes; Abszisse: η_{sp} in % des Anfangswertes.

Tab. 1. Einfluss der Temperatur auf die enzymatisch bewirkte Viskositätsänderung von Pektinlösungen. Anfangsviskosität: $\eta_{sp} = 3,4$ (25° C), pH = 3,9. (1) Bezeichnung des Enzympräparates, (2) Dauer des Abbaus (Stunden), (3) spezifische Viskosität der Lösung (25° C) in % des Anfangswertes, (4) Temperatur des Abbaus (°C), (5) ohne Enzym.

Tab. 2. Die Geschwindigkeit des enzymatischen Pektinabbaus. (1) k (Stunden⁻¹), (2) Nummer des Versuchs, (3) Enzympräparat, (4) Substrat, (5) Pektinlösung, (6) Erdbeerensaft, (7) Substrat-

konzentration (%), (8) Anfangswert der spezifischen Viskosität, (9) Enzymkonzentration (%), (10) Temperatur (°C), (11) aus den Angaben der ersten Stunden berechneter Wert (kein Durchschnittswert).

Tab. 3. Einfluss der Temperatur auf die enzymatisch verursachte Trübungsänderung von Pektinlösungen. Anfangsviskosität: $\eta_{sp} = 3,4$ (25 °C), pH = 3,9. (1) Bezeichnung des Enzympräparates, (2) Dauer des Abbaus (Stunden), (3) Trübung der Lösung (Nephelometerangaben in % des ursprünglichen Wertes), (4) Temperatur des Abbaus (°C), (5) ohne Enzym.

Tab. 4. Zusammenhang zwischen Änderung der Viskosität, des freien Aldehydgehaltes und der Trübung beim enzymatischen Pektinabbau. Pektinlösung: Anfangsviskosität: $\eta_{sp} = 1,80$ (25 °C), Anfangswert der relativen Trübung: 554%, höchstmöglicher Wert des Jodverbrauches: 11,09 ml 0,1 N I₂ pro 10 ml Reaktionsgemisch, pH = 3,6. (1) Enzympräparat, (2) Bezeichnung, (3) Konzentration (%), (4) Dauer der Enzymeinwirkung bei 24 °C (Stunden), (5) spezifische Viskosität der Lösung bei 25 °C (in % des ursprünglichen Wertes), (6) frei gewordener Aldehyd (in % des Gesamtaldehydgehaltes), (7) Trübung (Nephelometerangaben in % des Anfangswertes).

Investigations on the Enzymatic Degradation of Pectin

K. VAS

Institute for Research in Canning, Meat Packing and Refrigeration, Budapest

Summary

Several methods for measuring pectolysis and for the evaluation of enzyme activity have been studied.

The enzyme preparations used were partly commercial products (Pektinol K dopp. konz.), partly crude preparations made in this laboratory from moulds (*Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium* species). Powdered apple pectin (degree of esterification cca. 30 %), and native pectin (*i. e.* fresh fruit juices) served as substrates. (The solutions were preserved with 0,2% of sodium benzoate.) — Viscosity was measured in a modified Ostwald viscometer (Fig. 4), usually at 25° C, and after 10 minutes of centrifugation at 3000 r. p. m. Reductive capacity was determined with the method of Willstätter and Schudel as described by *Jermyn and Tomkins*. — Turbidity was studied partly by measuring the absorption of light by centrifuged samples (see above) in a Pulfrich photometer, and partly by determining their scattering of light in a Pulfrich nephelometer.

In the course of viscometric studies we tried to establish the effect of the quality and concentration of the enzyme preparation on solutions of powdered pectin (Fig. 2.) and on strawberry juice (Fig. 3.), and the effect of temperature on pectolysis (Table 1., Fig. 5.). A kinetic analysis of the data obtained was attempted. Using the formula of *Ekenstam*, originally worked out for the acid hydrolysis of cellulose (see in the German summary above), fairly constant figures were obtained for *k* (Table 2.) showing the decrease in viscosity of pure pectin solutions to be a process which apparently follows the rules of a first order reaction. The value of *k* increases with increase in enzyme concentration. (Fig. 6.) and in temperature (Fig. 7.). The energy of activation of the process is ca. 14,4 Cals./mol. This comparatively high value for an enzymatic reaction suggests the decrease in viscosity to be due to hydrolysis of glucoside bonds (*Merrill and Weeks*). This seems probable especially, if one considers the fact that the activation energies for the breaking of secondary bonds (hydrogen bonding, van der Waals forces) are usually not over 9 Cals./mol., even in the absence of catalysis. — The *k* values seem to be suitable to express the relative potency of enzyme preparations.

Assay of activity can also be performed by *Kyzlink's* procedure which is based on the estimation of the »Abbauzahl« (*Weber and Deuel*). With this procedure of determining the »Standard Pectolytic Power« (Fig. 8.), the accuracy of interpolation may be increased if enzyme concentrations are plotted on a logarithmic scale (Fig. 9). This is possible since, according to *Reid*, the »Abbauzahl« changes linearly with the logarithm of enzyme concentration (at least to about an »Abbauzahl« of 80 %).

Data relating to iodine-consumption of pectin solutions treated with different mould preparations (Fig. 10.) do not allow the assumption of a first or a second order reaction for the process of liberation of aldehydes.

Estimation of turbidity as a means of measuring pectolysis has not as yet been proposed in the literature. In the present study it is shown that the degradation of pectin can easily be followed by nephelometry. The influence of variations in enzyme concentration (Fig. 11.), and in temperature (Table 3., Fig. 12) on the clarification of pectin solutions can be established by this method.

If in an attempt to find the correlation of changes in reductive capacity, turbidity, and viscosity, the free aldehyde content and the turbidity are plotted as functions of specific viscosity (Table 4., Figs. 14. and 15.), it will be apparent that, during pectolysis, viscosity decreases first, then follows the decrease in turbidity, and lastly the liberation of aldehydes.