

Enzymatické procesy pri nízkych teplotách

I. STEIN, F. KLEMPOVÁ, I. GRAJCIAR

Friebeh enzymaticky katalyzovaných procesov v rastlinných a živočíšnych surovinách sa zmrazením spomaľuje, no nezastaví. Konzervovanie chladom alebo zmrazením zabezpečuje zachovanie kvality len na určitú — od teploty zmrazenia a prechovávaní — závislú dobu.

Teploty, ktoré ležia pod teplotami biokineticky optimálnymi (pod 40 °C), enzýmy a sústavy enzýmov v podstate nepoškodzujú. Na rozdiel od vyšších teplôt (nad 30—40 °C), ktorými sa hlavne bielkovinový komponent enzýmov denaturuje, znášajú mnohé enzýmy nízke a ultranízké teploty relatívne dobre. Lipáza napríklad si zachovala svoju aktivitu po 7 a pol ročnom prechovávaní pri —9,4 až —12 °C, pepsín, trypsín a kľag vydržali —191 °C bez straty aktivity (1). Zdá sa, že nízke teploty neporušujú zloženie molekuly enzýmov a ich štruktúrnú stavbu. Katalytickú schopnosť enzýmov ovplyvňujú nepriamo tým, že menia skupenstvo prostredia, v ktorom enzymaticky katalyzované reakcie prebiehajú.

Teplota a skupenstvo bunečného obsahu

Je známe, že predpokladom katalytického pôsobenia enzýmov je pohyblivosť molekúl enzýmov a pohyblivosť látok, ktorých rozklad urýchľujú — substrátov. Keď medzi molekulou enzýmu a substrátu dôjde k reakcii, vytvorí sa labilná zlúčenina enzým — substrát, ktorá sa rozkladá na výsledný produkt za súčasného uvoľnenia molekuly enzýmu, ktorý sa opäť zapojí do reakčného cyklu. Keď nevznikne zlúčenina (enzým — substrát) nenastane enzymatická katalýza, teda enzým nepôsobí.

Pohyblivosť a reakcia enzýmu a substrátu sú možné len v prostredí tekutom, polotekutom, prípadne rôsolovitom. Postupnou zmenou tekutého skupenstva na skupenstvo tuhé spomalí sa pohyb molekúl enzýmov a substrátu, spomalí sa priebeh enzymatických reakcií až sa prakticky úplne zastaví.

Väčšina potravín, ktorých kvalitu chceme zmrazením zachovať, obsahuje relatívne veľké množstvo vody, príp. bunečnej šťavy. Pri znižovaní teploty bunečného obsahu postupne sa voda vymrazuje, t. j. nastáva premena zo skupenstva kvapalného do skupenstva pevného za súčasného koncentrovania bunečného obsahu. Znížením podielu kvapalnej fázy prostredia spomalí sa

pohyb molekúl enzýmov a substrátov, spomali sa priebeh enzymatických reakcií, dochádza k relatívnemu stabilizovaniu stavu panujúceho v momente zá-
sahu nízkej teploty.

Medzi teplotou zmrazenia a medzi tekutým obsahom bunky, resp. percentuálnym obsahom vody v tekutej forme je úzka súvislosť.

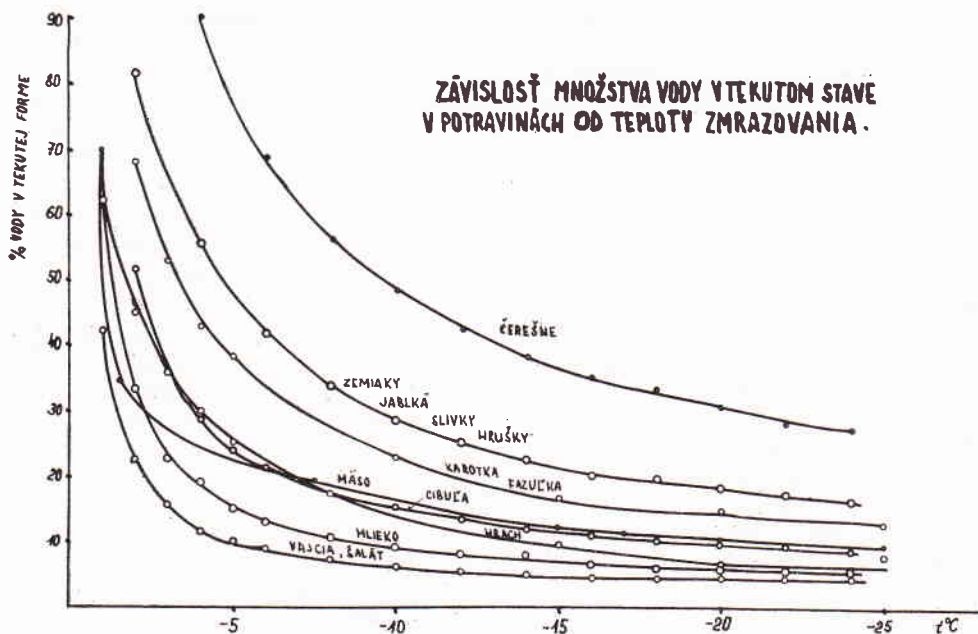
Tabuľka 1

% vody v tekutej forme									
t °C	čerešne	zemiaky jablká slivky	cibuľa	mlieko	vajcia šalát	mäso	hrach	karotka fazuľka	paradajky
—1				62,2	42,2	70,0	70,0		70,0
—1,5						34,5			
—2		81,4	52,8	33,5	22,7		45,0	68,0	43,0
—3				23,0	15,6		36,0	53,0	31,0
—4	90,9	55,6	28,8	19,3	12,6		30,0	43,0	26,0
—5				15,4	10,2	24,4	25,0	38,0	23,0
—6	63,6	41,7	21,6	13,2	9,0				
—7						19,5			
—8	56,1	34,0	17,5	10,9	7,5				
—9									
—10	48,4	28,0	15,1	9,2	6,3	16,3	14,0	23,0	13,0
—11									
—12	42,6	25,6	13,6	8,5	5,9				
—12,5						14,0			
—13									
—14	38,4	23,0	12,2	7,6	5,2				
—15						12,5	10,0	17,0	8,0
—16	35,2	20,4	11,3	6,9	4,8				
—17									
—17,5						11,5			
—18	33,3	20,0	10,5	6,4	4,8				
—19									
—20	31,0	18,5	10,0	6,3	4,8	10,6	9,0	15,0	6,0
—21									
—22	28,6	17,5	9,7	6,1	4,8				
—23									
—24	27,5	16,5	9,0	5,9	4,8				
—25						9,6			
—32,5						8,7	8,0	13,0	6,0

Proces vymrazenia vody, podľa priebehu kriviek, možno rozdeliť do troch fáz. Prvá fáza prebieha v rozpätí 0 až —4 °C, je charakterizovaná konverziou pomerne veľkého množstva (60 %) vody do skupenstva pevného. V druhej fáze v rozpätí —4 až —15 °C sa rýchlosť konverzie spomaľuje, pričom obsah pevného skupenstva sa zvýši na 80—90 % celkového obsahu vody. V tretej etape sa konverzia ešte viac spomali, premena posledných 10 % vody prebieha asymptomaticky, takmer paralelne s teplotou od —15 °C, aby — pravdepodobne — pri teplote okolo —60 až —70 °C až na niekoľko desiatin percenta

sa premenila na skupenstvo pevné. V praktických podmienkach, kedy teplota zmrazenia nedosahuje kryohydrátový bod, zostáva vo výrobokoch určitá časť vody v kvapalnej forme.

Priebeh kriviek vymrazenia úzko súvisí s obsahom vody a aspoň jej adsorpcie, zakotvenia v materiáli. Rýchle vymrazenie v prvej etape súvisí s lokalizáciou vody vo väčších a menších kapilárach zmrazeného objektu (voľná voda). Molekuly vody sú v nich za normálnych teplôt pohyblivejšie, pri níz-



Graf 1.

kejších teplotách sa rýchle zostavujú. Asymptotický priebeh krivky by mohol svedčiť o veľmi silných adsorpcných silách, ktorých prekonanie vyžaduje vysokú energiu. Molekuly vody pokrývajú plochu vrstvou unimolekulárnou (2). Konvexná časť krivky by mohla znázorňovať konverziu vody adsorbovanej na povrchu bielkovín a iných komponentov v multimolekulárnych vrstvách, ktoré sa postupne znižovaním teploty stenčujú, až nakoniec zostáva vrstva monomolekulárna (viazaná voda). Jednotlivé druhy adsorpcie sa nedajú od seba ohraničiť a vzájomne sa prelínajú.

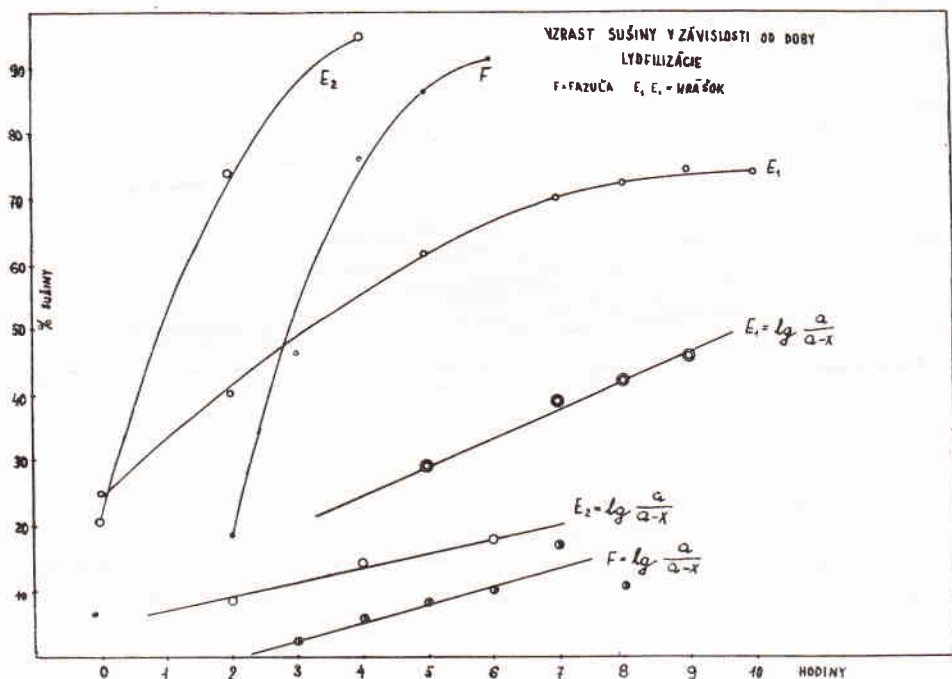
Vymrazovanie je pochod desorpcie vody, pričom voda ostáva v materiáli v skupenstve pevnom, a len jej časť (reziduálna) v skupenstve tekutom.

Zmrazenie je v podstate jedna forma odnímania tekutej vody z reakčného prostredia, v ktorom prebiehajú biochemické procesy ovplyvňujúce kvalitu a trvanlivosť rastlinných a živočíšnych potravín. Líši sa od iných spôsobov konzervovania, od lyofilizácie alebo sušenia teplou cestou v tom, že pri týchto

spôsoboch sa voda z materiálu odstraňuje (sublimáciou, vyparovaním), kým pri zmrazovaní ostáva v materiáli, len v inom skupenstve.

Nízke teploty možno teda — do istej miery, považovať za ukazovateľov obsahu vody (bunečnej šťavy) v bunkách rastlinných a živočíšnych tkanív, udávajúcich nepriamo koncentráciu, t. j. obsah vody tekutého prostredia. Nízka teplota zastavuje biochemické pochody v materiáli, ktoré zapríčiňujú jeho kazenie. Tieto pochody sa však úplne nezastavia, dokiaľ výrobok úplne nepremrzne.

Medzi aktivitou enzýmov a medzi nízkymi teplotami existuje vzťah; je to vlastne vzťah medzi aktivitou nativných enzýmov a medzi obsahom vody prítomnej v bunkách tkanív v tekutom skupenstve. Tento vzťah je prakticky známy: hlbokým zmrazovaním na veľmi nízke a ultranízké teploty sa predlžuje trvanlivosť výrobkov. Dezintegračné pochody, katalyzované enzýmami a inými katalyzátormi sa spomaľujú. Pri nie dosť hlbokom zmrazení sa rýchlosti spomínaných reakcií spomaľujú nedostatočne, čo skracuje trvanlivosť a znižuje nutričnú hodnotu výrobkov.



Graf 2.

Priebeh kriviek znázorňujúcich konverziu tekutého skupenstva na skupenstvo pevné v závislosti od teploty je podobný krivkám znázorňujúcim zväčšovanie obsahu sušiny napr. sušiny zmrazeného hrášku a fazuľky pri lyofilizácii.

Nízke teploty a rýchlosť enzymatických pochodov

Nízke teploty spomaľujú rýchlosť chemických reakcií, teda aj pôsobenie enzýmov. Mechanizmus pôsobenia enzýmov sa nízkymi teplotami nemení (3), mení sa len rýchlosť pôsobenia (4). Následkom zníženia obsahu tekutej zložky bunecného obsahu sa enzýmy — ako mnohé iné zlúčeniny — postupne vylučujú z roztoku, stávajú sa inaktívnymi. Proces premeny je reverzibilný, zníženie aktivity je úmerné zníženiu teploty, resp. obsahu nevymrzenej (kvalpalnej) vody.

Premena aktívnych enzýmov na enzýmy inaktívne prebieha v závislosti od teploty — resp. obsahu vody — podľa určitých pravidiel (5).

Priebeh konverzie glykogénu a sacharidov svalstva na kyselinu mliečnu, katalyzovaný sústavou glykolytických enzýmov sa teplotou mení. Znížením teploty sa glykolýza spomaľuje, koeficient rýchlosti glykolýzy $k = 1/t \ln a/a-x$ klesá. Kde t = čas, $a = 1$, x = množstvo vzniknutej kyseliny mliečnej v mg. Zníženie rýchlosti je relatívne veľké v rozpätí teplôt od $+5$ do -60 °C. Inhibícia aktivity glykolytických enzýmov pri nižších teplotách je relatívne malá. Teplotou skvapalneného vzduchu napr. sa sústava glykolytických enzýmov svalstva nezničí. Po roztopení sa intenzita tvorenia kyseliny mliečnej vo svalstve zvýšila. Z toho vyplýva, že hlboké a ultranízke teploty neničia enzýmy, ale iba retardujú ich pôsobenie.

Proteolytická aktivita bezbunecného extraktu (4) multienzymatickej sústavy katepsínov hovädzieho a bravčového mäsa sa znížovaním teploty reakčného prostredia zmenšuje. Priebeh proteolýzy katalyzovaný sústavou katepsínov, riadiaci sa v rozmedzí teplôt $+50$ až -35 °C pravidlami monomolekulárnej reakcie, sa klesajúcou teplotou spomaľuje, hodnota koeficientu rýchlosti k sa znižuje. Teplotou sa rovnomerne znižuje aktivita všetkých enzýmov multienzymatickej sústavy týchto intracelulárnych proteínáz. Vplyvom teploty nedošlo teda k hlbším premenám v štruktúrnej stavbe komplexnej molekuly katepsínov.

Intracelulárne proteínázy teoreticky nestrácajú svoju aktivitu ani pri veľmi nízkych teplotách. Aj v tomto prípade hlboké a ultrahlboké teploty nezničia, len oslabujú ich pôsobenie.

Natívne enzýmy zeleného hrášku (6) sa zmrazením inhibujú. Krezoláza, tyrozináza a kataláza sú citlivejšie proti nízkym teplotám, kým lakkáza, fenoláza, peroxidáza, askorbáza sú pomerne odolné voči teplote -30 °C pri 24 hod. ponechaní pri tejto teplote. Úplná inaktivácia sa za týchto uvedených podmienok nedosiahla. Pri konzervačných teplotách -18 až -30 °C ostáva v materiáli taká vlhkosť (toľko vody v tekutom skupenstve), že enzymatické procesy prebiehajú ešte relatívne veľkou rýchlosťou.

Teplota a inhibícia enzýmov

Zmrazením sa znižuje obsah tekutej fázy vody. Tak ako sa mení tekuté skupenstvo vody premenou na skupenstvo pevné, tak sa menia enzýmy na inaktívne podľa schémy



Rýchlosť inhibície je závislá od rýchlosti zmeny skupenstva vody (3, 4, 5, 6). Medzi inhibíciou aktivity enzýmov a medzi obsahom vody prítomnej v extrakte v tekutom skupenstve existuje vzťah, ktorý možno vyjadriť rovnicou

$$k_i = \ln \frac{k_{\max}}{k_{v\%}}$$

kde k_i = koeficient inhibície (koeficient retardácie aktivity enzýmov), k_{\max} = maximálna aktivita enzýmov pri optimálnej vlhkosti substrátu, $k_{v\%}$ = aktivita enzýmov pri vlhkosti substrátu $v\%$. Hodnota k_i vyjadruje reziduálnu aktivitu enzýmu, ktorá zostáva po zmrazení preparátu na určitú teplotu.

Medzi inhibíciou enzymatickej katalýzy a teplotou panuje vzťah, ktorý možno vyjadriť rovnicou priamky

$$y = a + bt$$

kde $y = k_i$, b = hodnota k_i pri teplote t , a = úsečka na ose x . Rovnica dovoľuje vypočítať hodnotu k_i pri ktorejkoľvek teplote v rozpätí od $+5^\circ\text{C}$ nižšie.

Súvislosť inhibície enzýmov nízkymi teplotami resp. inhibície aktivity s koeficientom reakčnej rýchlosti, vytvára predpoklad pre automatické sledovanie skladovateľnosti zmrazených výrobkov. Čím silnejšia je inhibícia aktivity natívnych enzýmov, tým dlhšia môže byť doba skladovania zmrazeného výrobku bez ujmy na jeho kvalite. Inhibícia a skladovateľnosť sú veľmi súvisiace pojmy. Koeficient inhibície je totožný s logaritmom doby skladovania vyjadreným v dňoch, alebo v mesiacoch.

S ú h r n

Enzymatické procesy sa nízkymi teplotami spomaľujú. Zmrazením kvapalného bunecného obsahu sa aktivita natívnych enzýmov znižuje v dôsledku zmeny skupenstva prostredia, v ktorom enzýmy pôsobia.

L i t e r a t ú r a

1. B. S. Lutyh, *Biodynamica* 29, 1937.
2. Kirscher, *Die wissenschaftlichen Grundlagen der Trocknungstechnik*, Berlin 1956.
3. Stein I., Klempová Fr., Morárová E., *Bulletin VÚM*, 3, 38 1963.
4. Stein I., Klempová Fr., *Bulletin VÚM*, 4, 1, 1962.
5. Stein I. a kol., Záverečná zpráva — Výskum vplyvu nízkych teplôt na enzymatické procesy významné z hľadiska potravinárskeho, VÚM Bratislava, 1962.
6. Stein I., Klempová Fr., Grajciar I., *Průmysl potravin*, 11—12, 660, 16 (1965).
7. Stein I. a kol.: Záverečná zpráva — Výskum lyofilizácie potravín z hľadiska enzýmov, VÚPP pob. Bratislava, 1965.

Энзиматические процессы при низких температурах

Выводы

Энзиматические процессы низкими температурами замедляются. После заморозения жидкого содержания клетки, активность нативных энзимов понижается вследствие изменения состояния среды, в которой энзимы действуют.

Enzymatische Prozessen bei niedrigen Temperaturen

Zusammenfassung

Durch die angeführten Versuche hat sich bewiesen, dass die enzymatischen Prozesse mittels niedriger Temperaturen verlangsamt werden. Durch Gefrieren des flüssigen Zellsaftes wird die Aktivität der nativen Enzyme vermindert in Folge der Veränderung des Aggregatzustandes des Millieus — in welchem die Enzyme wirken — verursacht.