

# Aktivita enzýmov v nevodnom prostredí

I. STEIN, I. GRAJCIAR

---

## Úvod

Suroviny a výrobky potravinárskeho priemyslu, ktorých živé tkaniva, alebo organizmus pri predpríprave na konzervovanie technologickými operáciami (napr. varením) neboli porušené, podliehajú počas dlhšieho skladovania biochemickým zmenám, ktoré sú zapríčinené pôsobením mikroorganizmov, resp. vlastných enzýmov. Neporušené sústavy enzýmov a jednotlivé enzýmy zúčastňujú sa na autolytických procesoch, ktoré znehodnocujú výrobky.

Jedným z rozhodujúcich činiteľov, ktoré ovplyvňujú kvalitatívne premeny potravinárskych výrobkov pôsobením enzýmov, je ich obsah vody. Enzymatické zmeny sú v podstate biochemické reakcie, ktoré prebiehajú v bunkách, v prostredí rôzne koncentrovaných vodných roztokov. Voda je predpokladom katalytického pôsobenia enzýmov. Vodné prostredie umožňuje vznik labilnej zlúčeniny enzýmu (E) a substrátu (S) a jej rozklad na produkt enzymatickej katalýzy (P). Uvoľnená molekula enzýmu sa opätovne zaraďuje do reakčného cyklu.



Rýchlosť priebehu reakčného cyklu závisí od vlhkosti reakčného prostredia, resp. od koncentrácie zúčastnených zložiek. Postupnou zmenou tekutého skupenstva reakčného prostredia na skupenstvo pevné, spomalí sa priebeh reakčného cyklu až sa úplne zastaví. Enzýmy, ktoré sú v dostatočne tekutom prostredí aktívne, vplyvom zníženia obsahu vody znižujú svoju aktivitu, znižujú svoju katalytickú mohutnosť, až úplne prestanú pôsobiť, napriek tomu, že zostávajú v reakčnom prostredí.

Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv obsahu vody reakčného prostredia na aktivitu niektorých natívnych oxidoredukčných enzýmov zeleného hrášku vysušeného lyofilizáciou.

## Oxidázy a ich substráty

Oxidázy tvoria skupinu respiračných enzýmov katalyzujúcich biologickú oxidáciu. Aktivujú pôsobenie vzdušného kyslíka a reagujú priamo s molekulárnym kyslíkom. Zmenou reakčného prostredia ovplyvňuje sa ich aktivita. Na indiká-

ciu zmeny aktivity, ktorá nastala zmenou koncentrácie reakčného prostredia, použili sme z natívných enzýmov lyofilizovaného zeleného hrášku oxidázu kyseliny *l*-askorbovej, fenolázy: lakkázu a mono fenoloxidázu. (1).

Fenolázy sú enzýmy, ktoré katalyzujú hydroxyláciu monofenolov na orto-difenoly a oxidáciu difenolov na orto-benzochinón. Sú to intracelulárne enzýmy, ťahko vylúhovateľné vodou. Fenolázy sa nepodarilo izolovať v kryštalickej forme. Enzýmy sa považujú za proteídy medi.

Zo skupiny fenoláz má lakkáza najširšiu substrátovú špecificitu. Katalyzuje oxidáciu mnohých substrátov ako napr. hydrochinónu, kyseliny *l*-askorbovej a jej derivátov a iných. Optimálne pôsobí pri pH 4 až 5. Monofenoláza (fenoláza) katalyzuje hydroxyláciu monofenolov na ortodifenoly. Substrátmi enzýmu sú v prírode sa vyskytujúce monofenoly. Od ostatných fenoláz sa líši úzkou substrátovou špecificitou. Optimálne pH 6,7.

Oxidáza kyseliny *l*-askorbovej (askorbáza) katalyzuje transfer elektrónov z molekuly *l*-askorbovej kyseliny a jej derivátov na molekulový kyslík, pričom sa kyselina *l*-askorbová mení na dehydroaskorbovú za súčasného vzniku molekuly vody. Pri oxidácii substrátu nastáva redukcia  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$ , ktorá sa opäť reoxiduje kyslíkom.

Vplyv zmeny koncentrácie prostredia (vlhkosti, obsahu vody) zisťovali sme na zmene aktivity spomenutých enzýmov lyofilizovaného zeleného hrášku.

## Metodika

Na vytvorenie žiadaného reakčného prostredia o rozličnej vlhkosti (obsahu vody), použili sme glycerín p. a. odvodnený na 0,3 % vody destiláciou vo vákuu. Riedením bezvodého glycerínu fosfátovým regulátorom o rôznom pH sme pripravili reakčné prostredie pre sledovanie aktivity enzýmov pri rôznej vlhkosti (uvádzanej v objemových percentách vody).

Zdrojom enzýmov bol práškový lyofilizovaný zelený hrášok (lyofilizovaný 24 hodín, maximálna teplota ohrevu 40 °C, teplota povrchu 25–30 °C, pracovný tlak 0,05–0,008 mm Hg), druh Edelperle (ročník 1965) o vlhkosti 1,98 % vody).

Ako substráty sme použili kryštalicke preparáty, hydrochinon pre lakkázu, fenol pre monofenolázu a kyselinu *l*-askorbovú pre oxidázu kyseliny askorbovej. 50 mg kryštalickeho substrátu sme pridávali do roztoku glycerínu zriedeného na príslušnú koncentráciu fosfátovým regulátorom pH 6,1 pre lakkázu, pH 5,7 pre askorbázu a pH 6,7 pre fenolázu.

Aktivitu enzýmov sme stanovili manometrickou metódou podľa Warburga a to lakkázu modifikáciou podľa Gregga a Müllera (2) fenolázu podľa Adamsa a Nelsona (3), askorbázu podľa Lovett-Janison a Nelsona (4).

Celkový obsah hlavnej nádoby tvoril 5 ml reakčnej zmesi glycerínu a regulátora 50 mg kryštalickeho substrátu a 200 mg lyofilizovaného zeleného hrášku. Kališok reakčnej nádoby obsahoval filtračný papier nasiaknutý 20 %-ným KOH.

Do série sledovaných vlhkostí zaradili sme slepé pokusy obsahujúce kryštalicke substrát (50 mg) a zmes regulátora a glycerínu. Experimentálne sme si overili, že medzi rôzne koncentrovanými roztokmi glycerínu, regulátora a príslušnými substrátmi po dobu 3 hodín nenastáva reakcia (spotreba kyslíka). Taktiež sme si overili, že enzymatická aktivita 200 mg lyofilizovaného zeleného

hrášku nie je ovplyvnená po dobu trvania pokusov rôznymi množstvami bezvodého glycerínu. Hodnoty slepých pokusov ( $\mu\text{l O}_2$ ) zmesi glycerín + regulátor + hrášok sme z nálezu odčítali.

Po 15 minútovom temperovaní sme stanovili spotrebu kyslíka ( $\mu\text{l}$ ) pri  $30^\circ\text{C}$ , 120 kyvov/min v 10 min. intervaloch po dobu 3 hodín.

Aktivitu enzýmov sme vyjadрили koeficientom reakčnej rýchlosti nulmolekulárnej reakcie

$$k = \frac{x}{t}$$

kde  $k$  = koeficient reakčnej rýchlosti,  $x$  =  $\mu\text{l O}_2$ ,  $t$  = doba účinku enzýmu.

Na vyjadrenie špecifickej aktivity používame výraz

$$Q_{O_2} = \frac{\mu\text{l O}_2}{\text{mg suš. čas v min.}} \quad (\text{dýchací koeficient})$$

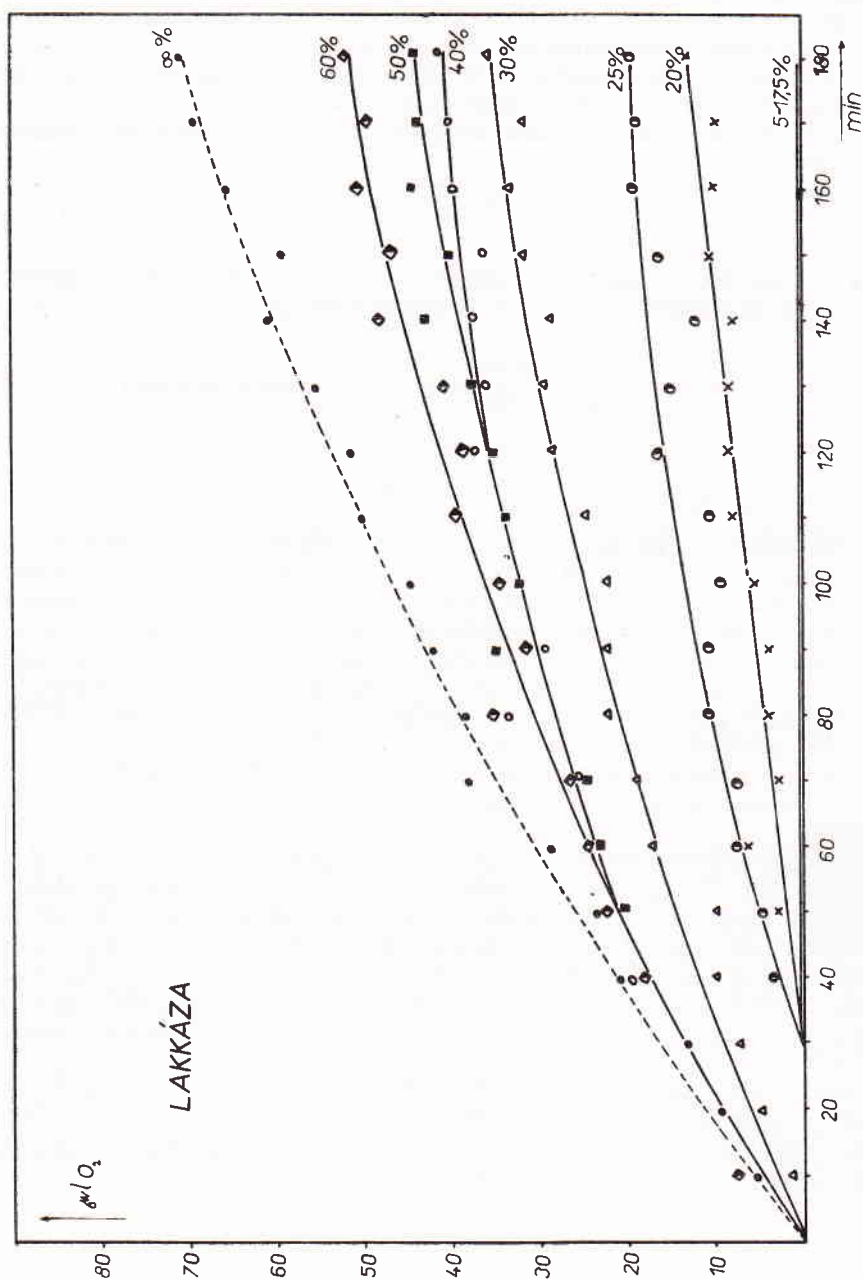
### V ý s l e d k y

V reakčnom prostredí bezvodého glycerínu a relatívne malého množstva vody (5–10 %) pri optimálnom pH a teplote  $30^\circ\text{C}$  v priebehu 3 hodín nenastáva enzymatická katalýza. Inhibícia enzýmov je pri týchto reakčných podmienkach prakticky úplná. Postupným zvyšovaním obsahu vody v reakčnom prostredí intenzita inhibície sa znižuje natoľko, že za daných pokusných podmienok (12,5 % vody) možno pozorovať pomerne slabú aktivitu oxidázy kyseliny *l*-askorbovej, kým pôsobenie lakkázy a fenolázy je podmienené vyššou vlhkosťou reakčného prostredia (17,5–20 % vody).

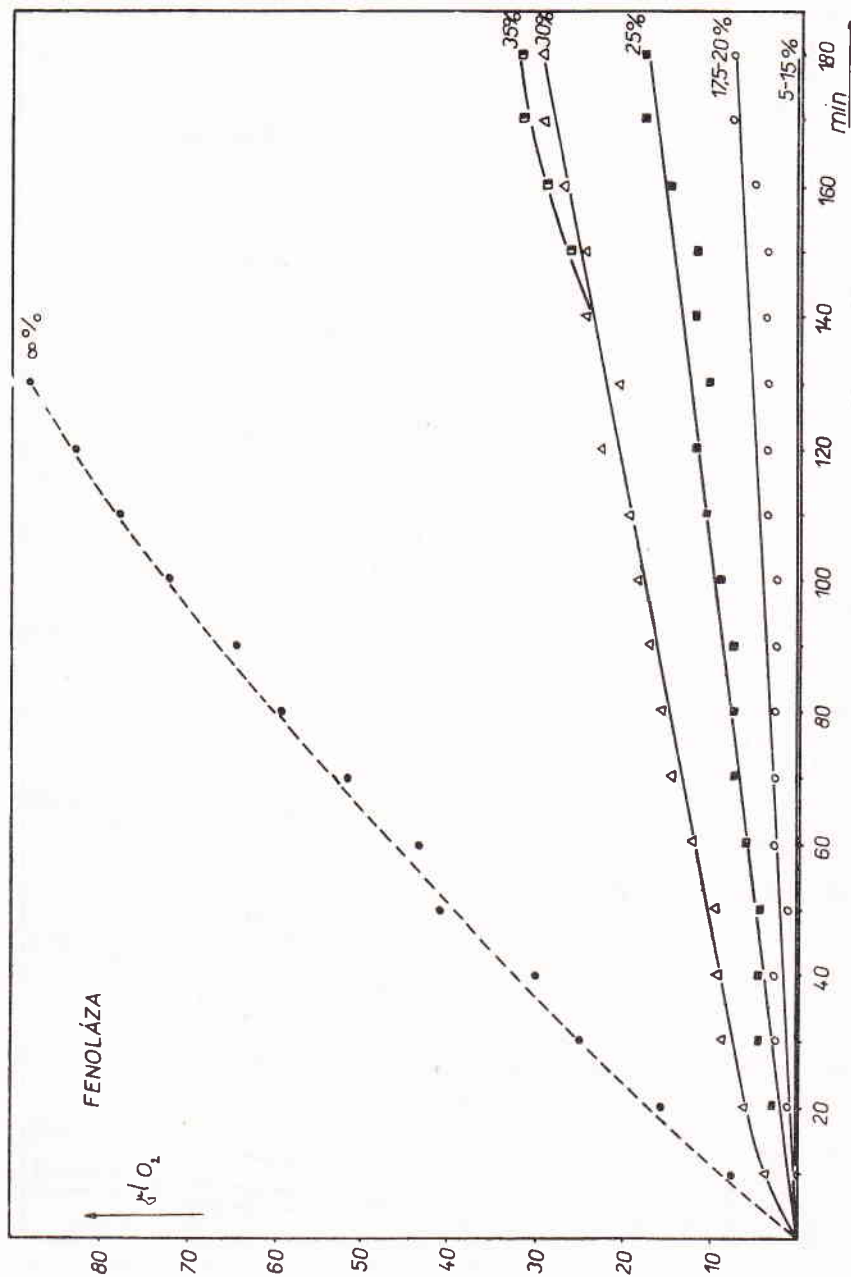
Stúpajúcou vlhkosťou aktivita enzýmov sa zvyšuje. Pri nekonečnom zriedení, t. j. za optimálnych podmienok pôsobenia dosahuje aktivita enzýmu relatívne maximum.

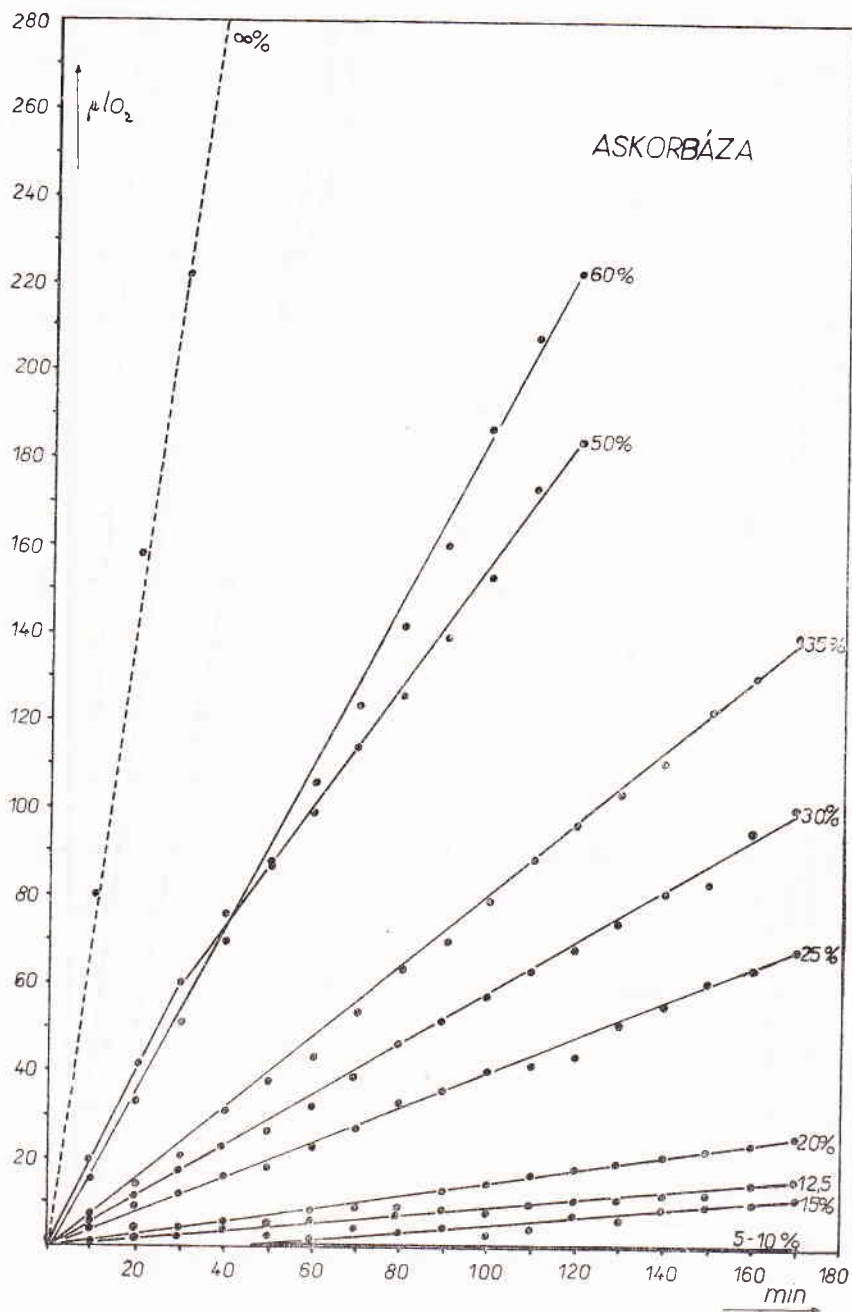
Z priebehu kriviek znázorňujúcich oxidáciu substrátov v závislosti od doby pôsobenia (obr. 1) vyplýva, že vlhkosť (obsah vody) v reakčnom prostredí neovplyvňuje mechanizmus pôsobenia enzýmu. Za inak konštantných reakčných podmienok (pH, teplota) sa vplyv koncentrácie reakčného prostredia prejavuje rôznou polohou ( $\text{tg } \alpha$ ) kriviek, pričom v najnižšej polohe je krivka znázorňujúca priebeh katalýzy pri nízkom obsahu vody a v najvyššej polohe je krivka znázorňujúca priebeh reakcie pri nekonečne zriedenom reakčnom prostredí.

Priebeh reakcií katalyzovaných enzýmami sleduje v tomto prípade chod veľmi blízky nulmolekulárnej reakcii. Koeficient  $k$  vo vzťahu  $k = x/t$  vyjadruje priebeh katalýzy s presnosťou  $\pm 6\%$ . Zmena aktivity v dôsledku dehydratácie prejavuje sa zmenšovaním hodnoty  $k$ .

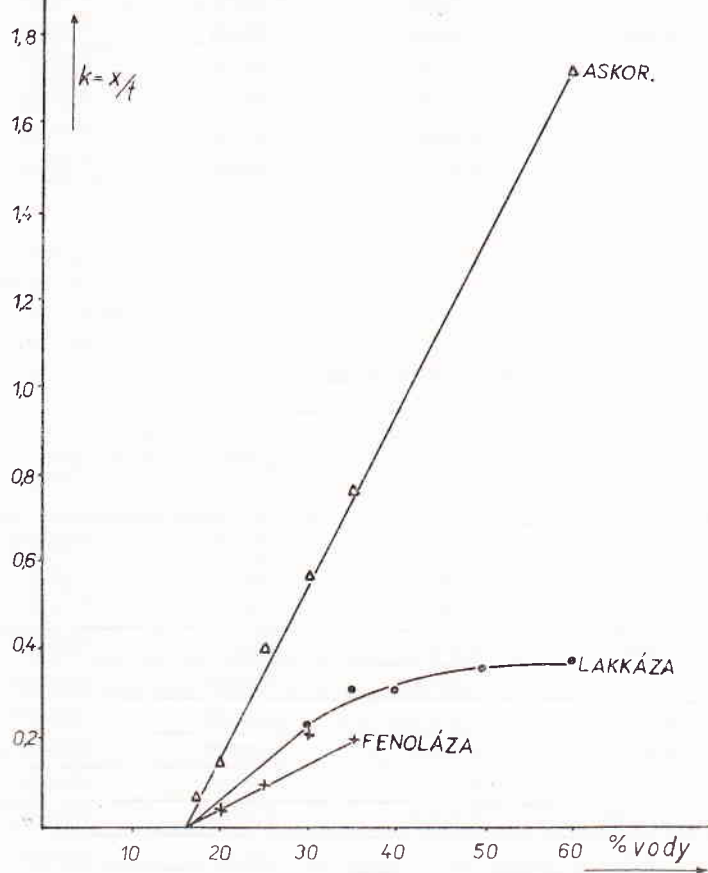


Obr. 1 a, b, c: Vplyv vlhkosti reakčného prostredia na aktivitu askorbázy, fenolázy, lakkázy.





VPLYV VLHKOSTI REAKČNÉHO  
PROSTREDIA NA AKTIVITU ( $k$ )



Obr. 2.

T a b. 1a. Lakkáza

Obj. % vlhkosti	$Q_{0_2}^{30}$	$Q_{0_2}^{60}$	$Q_{0_2}^{120}$	$Q_{0_2}^{170}$
	0,00220	0,00240	0,00213	0,00132
5	0	0	0	0
10	0	0	0	0
12,5	0	0	0	0
15	0	0	0	0
17,5	0	0	0	0
20	0	0,00022	0,00038	0,00024
25	0	0,00062	0,00069	0,00036
30	0,00012	0,00143	0,00118	0,00066
35	0,00022	0,00201	0,00146	0,00077
40	0,00000	0,00203	0,00155	0,00082
50	0	0,00205	0,00159	0,00091
60	0	0,00228	0,00162	0,00096

T a b. 1b. Askorbáza

Obj. % vlhkosti	$Q_{0_2}^{30}$	$Q_{0_2}^{60}$	$Q_{0_2}^{120}$	$Q_{0_2}^{170}$
	0,03703	0,02708	0,01479	0,00684
5	0	0	0	0
10	0	0	0	0
12,5	0,00040	0,00012	0,00030	0,00021
15	0	0,00051	0,00033	0,00024
17,5	0,00022	—	0,00046	0,00029
20	0,00065	0,00066	0,00077	0,00049
25	0,00193	0,00187	0,00205	0,00127
30	0,00287	0,00265	0,00285	0,00186
35	0,00337	0,00278	0,00404	0,00266
40	0,00337	0,00362	0,00408	—
50	0,00845	0,00822	0,00768	—
60	0,00993	0,00879	0,00926	—



T a b. 1c. Fenoláza

Obj. % vlhkosti	$Q_{O_2}^{30}$	$Q_{O_2}^{60}$	$Q_{O_2}^{120}$	$Q_{O_2}^{170}$
	0,00417	0,00362	0,00345	—
5	0	0	0	0
10	0	0	0	0
12,5	0	0	0	0
15	0	0	0	0
17,5	0,00022	0,00022	0,00011	0,00015
20	0,00043	—	0,00016	0,00015
25	0,00075	0,00050	0,00050	0,00033
30	0,00120	0,00097	0,00092	0,00054
35	0,00143	0,00102	0,00092	0,00059
40	—	—	—	—
50	—	—	—	—
60	—	—	—	—

## D i s k u s i a

Pôsobenie enzýmov úzko súvisí s obsahom vody reakčného prostredia. Postupným znižovaním obsahu vody v reakčnom prostredí reprodukovali sme — do určitej miery — pochod odnímania vody sušením.

Vplyv vody (vlhkosti) sme sledovali na zmene aktivity lakkázy, askorbázy a fenolázy v reakčnom prostredí s rôznym obsahom vody. Zmenu aktivity sme vyjadrili koeficientom reakčnej rýchlosti nultého radu.

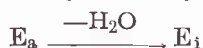
Znižovanie aktivity spomenutých enzýmov ide súbežne so znižovaním obsahu vody v reakčnom prostredí. Obsah vody v reakčnom prostredí je preto dôležitým činiteľom pri určovaní ich aktivity.

Keď vyjadríme špecifickú aktivitu množstvom  $\mu\text{l}$   $O_2$  absorbovaného 1 mg sušiny enzymatického preparátu pri 30, 60 a 120 minút pri  $30^\circ\text{C}$  ( $Q_{O_2}$ ) zistíme, že ten istý enzým napr. lakkáza je v prostredí so 60 % -ným obsahom vody 10 násobne aktívnejší ako v prostredí s 20 % -ným obsahom vody. V prostredí, kde je všetok glycerín nahradený vodou, je dýchací koeficient  $Q_{O_2}^{60}$  len o niečo vyšší (tab. 1). U oxigenázy kyseliny *l*-askorbovej je rozdiel v aktivite 15 a 60 % -ného roztoku regulátora v glyceríne 70-násobný a v prostredí bez glycerínu viac ako 200 násobný. U fenolázy sú rozdiely v aktivite menšie.

Z grafického znázornenia vyplýva, že priebeh kriviek sa od seba neliši, rozdielna je len ich poloha resp. tg  $\alpha$ , ktorý tvoria ich tyčnice s osou  $x$ . Aktivita enzýmov pri rôznej vlhkosti smeruje k rôznej hraničnej hodnote enzymatickej aktivity, pritom množstvá pôsobiaceho enzýmu a substrátu sú rovnaké. Nazdávame sa, že príčinou zmeny aktivity v závislosti od obsahu vody reakčného prostredia je pohyblivosť molekúl v zriedenejšom substráte.

Aktivita enzýmov sa mení v závislosti od obsahu vody v prostredí pôsobenia. Relatívne silne aktívne enzýmy prechádzajú s klesajúcim obsahom vody v re-

akčnom prostredí na enzýmy slabo aktívne až prakticky inaktívne. Dehydratáciou reakčného prostredia prechádzajú z formy aktívnej do formy inhibovanej



(kde  $E_a$  je enzým aktívny,  $E_i$  enzým inaktívny).

Dehydratácia reakčného prostredia je činiteľom regulujúcim aktivitu enzýmov. Enzýmy sa pritom neznicia, len sa inhibujú. Rehydratáciou reakčného prostredia sa enzýmy reaktivujú:



Inhibícia a reaktivácia enzymatického pôsobenia je výsledkom ovplyvnenia činnosti enzýmu podmienkami prostredia. Jedna z podmienok je obsah vody, — vlhkosť prostredia, v ktorom enzýmy pôsobia. Proces konverzie enzýmu aktívneho na inaktívny a opačne vykazuje určitú pravidelnosť.

Grafické znázornenie vzťahu aktivity enzýmu ( $k$ ) s objemovými percentami vlhkosti reakčného prostredia poukazuje na to, že konverzia askorbázy a fenolázy je lineárna a v grafickom znázornení je výslednicou priamka. U lakkázy grafické znázornenie inhibície zodpovedá krivke, ktorej krivke exponenciálnej (obr. 2). Podobne ako natívne oxidoreduktázy aj aktivita natívnej lipoxidázy zeleného hrášku sa mení v závislosti od obsahu vody v prostredí pôsobenia (3). Relatívne silne aktívny enzým prechádza postupne s klesajúcim obsahom vody v prostredí na enzým slabo aktívny až prakticky inaktívny (6).

Zo závislosti enzymatického pôsobenia od vlhkosti reakčného prostredia vyplýva, že ak máme zistiť skutočnú aktivitu natívnych enzýmov, je treba ich aktivitu stanoviť v prostredí, ktorého obsah vody sa rovná obsahu, za ktorého enzým v objekte pôsobí. Keď pri analytickom stanovení aktivity enzýmov táto zásada neadorujeme, vystavíme sa tomu, že nevystihneme tu aktivitu, ktorá pôsobí v objekte, ale meráme aktivitu, ktorá sa prejavuje v optimálnom prostredí.

### S ú h r n

Pôsobenie enzýmov úzko súvisí s obsahom vody v reakčnom prostredí. V prostredí s dostatočným obsahom vody sú enzýmy aktívne, s nedostatkom vody strácajú aktivitu. Dehydratáciou reakčného prostredia prechádzajú z formy aktívnej do formy inhibovanej. Inhibícia je reverzibilná. Rehydratáciou reakčného prostredia sa inhibované enzýmy reaktivujú.

Zo závislosti enzymatického pôsobenia od vlhkosti reakčného prostredia vyplýva, že ak sa má zistiť skutočná aktivita natívnych enzýmov, je treba ich aktivitu stanoviť v prostredí, ktorého obsah vody sa rovná obsahu, v ktorom enzým v objekte pôsobí.

### L i t e r a t ú r a

1. Boyer, P. D., Lardy, H., Myrbäck, K., The Enzymes I—VIII, Acad. Press, New York 1964.
2. Stein, I., Chémia a technológia enzýmov I, II, Bratislava 1956.
3. Gregg, D. C., Miller, W. H., J. Am. Chem. Soc. 62, 1374 (1940).
4. Adams, W. H., Nelson, J. M., J. Am. Chem. Soc. 60, 1472 (1938).
5. Lovett—Janison, P. L., Nelson, J. M., J. Am. Chem. Soc. 62/1409 (1940).
6. Stein, I., Klempová, F., Grajciar, I., Záverečná zpráva 1965 (ÚVÚPP).
7. Stein, I., Klempová, F., Grajciar, I., Buletín Ústredného výskumného ústavu potravinárskeho priemyslu 2, 7, (1965).

## Активность энзимов в безводной среде

### Выводы

Действие энзимов узко связано с содержанием воды в реакционной среде. В среде с достаточным количеством воды энзимы являются активными, с понижением содержания воды теряют активность. Обезвоживанием реакционной среды переходят из активной формы в форму ингибированную. Ингибция является реверзильной. Регидратацией реакционной среды ингибированные энзимы реактивируются.

Из зависимости энзиматического действия от влажности реакционной среды вытекает, что если нам нужно определить действительную активность нативных энзимов, активность энзимов должна быть определена в среде, в которой содержание воды тоже самое как в объекте, в котором энзим действует.

## Die Aktivität der Enzyme in wasserfreien Milieu

### Zusammenfassung

Der Wasser (Feuchtigkeits)- gehalt des Reaktionsmillieus beeinflusst die Wirkung der stoffeigenen Enzyme. Die bei ausreichenden Wassergehalt des Reaktionsmillieus aktiven Enzyme büßen durch Wasserentzug ihre Aktivität ein. Durch Dehydrierung des Reaktionsmillieus werden die Enzyme aus den aktiven (wirksamen) Zustand in eine unwirksame Form überführt. Die Inhibition ist reversibel. Durch Rehydratisierung des Reaktionsmillieus werden die Enzyme reaktiviert.

Aus der Abhängigkeit der Enzymwirkung von der Feuchtigkeit (Konzentration) des Reaktionsmillieus folgt das es notwendig erscheint — wenn man der wirklichen Enzymaktivität nahekomen will, ihre Wirkung womöglich in einem Reaktionsmillieu zu bestimmen, dessen Wasser (Feuchtigkeits)- gehalt denjenigen des zu prüfenden Objektes nahekommmt.