

Pektolytické enzýmy z fermentácie kyseliny citrónovej

St. KRČMAR,

Výskumný ústav liehovarov a konzervární, Bratislava

Napriek tomu, že pektolytické enzýmy patria medzi najstaršie technicky vyrábané, ich výroba sa neustále intenzívne rozvíja. Upúšťa sa od málo aktívnych preparátov a začínajú sa vyrábať účinnejšie, s aktivitou takmer desásobne vyššou, pri prakticky nezmenenej cene. Hľadajú sa stále nové, lacnejšie zdroje pektolytických enzýmov, zaručujúce dostatočne efektívnu výrobu enzymatického preparátu.

Veľmi výhodným zdrojom je fermentácia kyseliny citrónovej na melasovom substráte. Vysoká aktivita pektolytických enzýmov sa tu dosahuje vďaka prítomnosti veľkého množstva rôznych degradačných produktov pektínu, ktoré pôsobia v priebehu fermentácie ako induktory biosyntézy týchto enzýmov.

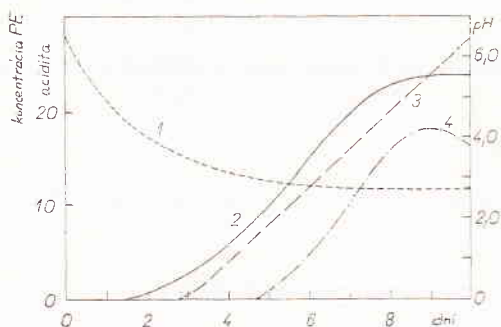
Pektolytické enzýmy patria podľa klasifikácie IUB do rôznych skupín, hoci ich účinok sa v zásade prejavuje rovnako. Glykanohydrolázy s depolymerizujúcim pôsobením, ako endopolýgalakturonáza a endopolymetylgalakturonáza, spôsobujú predovšetkým pokles viskozity šfavy v dôsledku hydrolýzy pektínu na oligosacharidy. Rovnako sa prejavujú aj pektátlyázy, pri pôsobení ktorých sa depolymerizácia dosiahne štiepaním pektínu, pričom vzniká nenasýtený derivát kyseliny galakturónovej s dvojitou väzbou medzi 4. a 5. uhlíkovým atómom. Prírastok nenasýtených väzieb sa sleduje spektrofotometricky meraním v UV oblasti spektra.

Sacharifikačne pôsobiace enzýmy, ako exopolýgalakturonáza alebo analogicky pôsobiace exopektatlyázy, odšepujú od neredukujúceho konca základné stavebné jednotky pektínovej makromolekuly a stanovujú sa na základe prírastku redukujúcich skupín jodometricky.

Z technického hľadiska sú najdôležitejšie enzýmy s depolymerizačným účinkom, v dôsledku ktorého dochádza k zníženiu viskozity pektolýzovanej šfavy, umožňujúcemu úspešné a ekonomické spracovanie. Je to predovšetkým endopolýgalakturonáza, atakujúca pektín značne deesterifikovaný a endopolymetylgalakturonáza, pôsobiaca na pektín s normálnym stupňom esterifikácie.

Syntéza pektolytických enzýmov počas deväťdňovej fermentácie, ktorej priebeh znázorňuje obr. 1, je ovplyvňovaná predovšetkým fyziologickým stavom produkčného mycélia a aciditou fermentačného substrátu. Syntéza pektolytických enzýmov, a to predovšetkým endopolýgalakturonázy, začína sa v 3. dni

fermentácie, keď už hodnota pH klesá na 3,0. Potom je zvyšovanie hladiny pektolytických enzýmov v substráte až do konca fermentácie konštantné. V mycéliu sa začínajú hromadiť enzýmy až v 6. dni fermentácie. Enzymatický komplex v mycéliu má o niečo odlišné zloženie ako v substráte, pretože sa o niečo zvyšuje podiel endopolymetylglakturonázy.



Obr. 1. Pribeh biosyntézy pektolytických enzýmov v priebehu fermentácie kyseliny citrónovej. 1 — pH; 2 — acidita substrátu (ml 1N NaOH na 10 ml vzorky); 3 — koncentrácia pektolytických enzýmov v substráte (g/ml); 4 — koncentrácia pektolytických enzýmov v mycéliu (g/g).

Sledovanie aktivity pektolytických enzýmov je spoľahlivým indikátorom fyziologického stavu produkčného mikroorganizmu, pretože akákoľvek prekonaná a prerastená kontaminácia bakteriálna alebo fungálna sa nepriaznivo odráža v poklese tvorby pektolytických enzýmov. Maximálna aktivita enzýmov zodpovedá vždy maximálnemu výťažku kyseliny citrónovej.

Ako zdroj pektolytických enzýmov je možné využiť tak mycélium, ako aj vyfermentovaný melasový substrát. Mycélium sa musí dôkladne rozomlieť a extrahovať vodou, pričom sa získa dosť zriedený, ale relatívne čistý extrakt. Aktivita pektolytických enzýmov je v extrakte asi päťnásobne nižšia ako vo vyfermentovanom substráte, pretože mycélium obsahuje iba 25 % z celkovej aktivity kultúry. Preto sme pri izolácii volili také izolačné postupy, zahŕňajúce metodiky, technicky využívané iba v poslednom čase — odsolovanie na ionexoch, adsorpcia bielkovín na gélovité substancie s nasledujúcou elúciou enzýmu do zlomku pôvodného objemu vhodným pufrum. Takýto postup sme si vypracovali na báze kalciumfosfátového gélu po odstránení iónov rušiacich adsorpciu na gél desalináciou na kolónach s katexom v H^+ -cykle a anexom v OH^- -cykle. Elúciu sme robili pri využití zmeny pH pomocou citrátových pufrov, obsahujúcich na zlepšenie vsoľovacieho („salting-in“) efektu amóniové soli minerálnych kyselín. Takto získaný preparát je veľmi čistý, obsahuje iba menšie množstvá iných hydrolytických enzýmov (glukoamyláza, celulóza).

Nakoľko enzymatické preparáty tohto typu u nás nenašli doteraz použitie, vypracovali sme pre potreby konzervárenského priemyslu postup izolácie pektolytických enzýmov priamo z vyfermentovaného substrátu, založený na ich precipitácii organickým rozpúšťadlom za chladu, pri súčasnej prítomnosti vhodnej filtračnej hmoty — napr. kremeliny. Použitie úkvapu a voľba optimálnych tepelných podmienok nám umožnili získať preparáty s aktivitou nad 10 000 °PM ekonomicky veľmi výhodne.

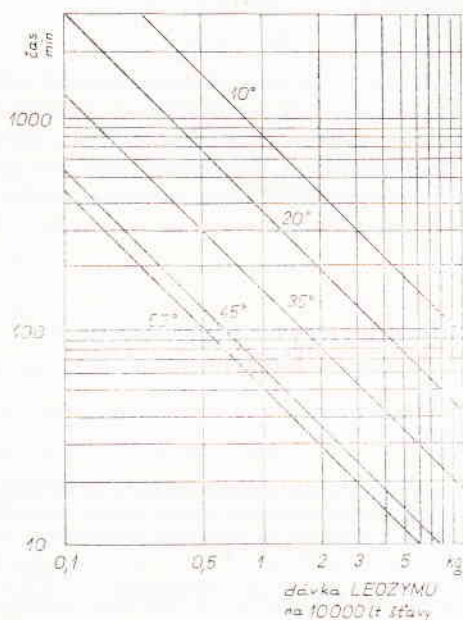
V súčasnosti sa pripravuje výroba tohto preparátu pod názvom LEOZYM v závode SLOVLIK Leopoldov.

Preparát pektolytických enzýmov, získaný pri fermentácii kyseliny citrónovej, má niekoľko pozoruhodných vlastností. Je to predovšetkým optimálna hodnota pH, ktorá je oproti bežným preparátom posunutá viac do kyslej oblasti (pH 2,8–4,8), v ktorej sa pohybuje pH väčšiny ovocných štiav.

Veľmi dobrá je tepelná stabilita LEOZYMU, ktorý pri pektolýze stráca aktivitu badateľne až pri teplotách nad 55 °C. Optimálna teplota je 45–50 °C.

Neprítomnosť pektínesterázy predznačuje LEOZYM aj na použitie vo vinárstve, pretože tu niet nebezpečenstva zvyšovania hladiny metanolu v mušte. Taktiež neobsahuje negatívne pôsobiace oxidázy.

Bežne vyrábaný preparát vykazoval pri stanovení aktivity 10 000 °PM podľa Kyzlinka. To značí, že pri podmienkach testu pri 20 °C 1 kg preparátu zníži za 6 hodín viskozitu 10 000 l šťavy, vyjadrenú číslom odbúrania A, o 85 % maximálnej možnosti; pri 50 °C za 1 hodinu.



Obr. 2. Nomogram na stanovenie dávok LEOZYMU

Praktické skúšky preparátu na rôznych substrátoch priniesli tieto výsledky:

Jablčná šťava: Veľmi dobré výsledky dávala pektolýza pri 40–45 °C po dobu 30–40 minút. Šťava bola žltozelená, rovnako aj senzorické hodnotenie bolo veľmi dobré. Pri teplotách nad 45 °C došlo k intenzívnemu hnednutiu rovnako ako pri kontrole už po 30 minútach.

Na obr. 2 sú znázornené vzťahy medzi dávkou preparátu a dobou pektolýzy pri rôznych teplotách.

Farebné šťavy: Pri 50 °C postačovalo 45 minút na dostatočnú pektolýzu drvin. Rozhodujúci efekt priniesla zvýšená extrakcia farebných látok a zachovanie chuťových vlastností.

V prípade čiernych ríbezlí sa dosiahol najlepší výsledok. 50 minút pektolýzy pri 45–50 °C postačilo na zásadnú zmenu mechanických vlastností rozdrveného ovocia, pričom výťažok šťavy dosiahol úroveň bežnú pri iných druhoch ovocia.

Hrozno: Aplikácia LEOZYMU pri pektolýze hrozna priniesla zvýšenie výlísnosti o 4–5 %. Víno z modrého hrozna bolo farebne výraznejšie pri pektolýzovanom ako pri kontrole. Veľmi dôležitým faktorom, ktorý sme zistili, je skrátenie hlavného kvasenia na polovičný čas, ďalej podstatne lepšie pre-kvasenie a senzorická kvalita vína. Nakoľko neprecipitovala kyselina polygalakturónová, nezvýšilo sa ani množstvo kalových látok po vyčistení vína pred stáčaním.

Perspektívne uvažujeme o rozvinutí výroby vysokoaktívnych enzymatických preparátov pektoláz v kombinácii s inými enzýmami pre progresívne technologické postupy. Ide predovšetkým o doplnenie enzymatického komplexu – amylázou na pektolýzu štiav z moderných lisov, pričom sa značne zvyšuje obsah škrobu, ktorý potom vyvoláva nežiadúce zákaly a zhoršuje technologickú ovládateľnosť procesu pri výrobe ovocnej šťavy.

S ú h r n

V príspevku autor naznačuje problematiku možnosti výroby pektolytických enzýmov pre konzervárenské účely z produktov výroby kyseliny citrónovej, a to priamo izoláciou zo substrátu alebo extrakciou z mycélia. Sami vypracovali spôsob výroby pektolytických enzýmov izoláciou priamo zo substrátu, ktorých výroba pod názvom LEOZYM o aktivite 10 000 °PM sa pripravuje. Tento preparát neobsahuje pektínesterázu a má veľmi dobré vlastnosti pre čírenie ovocných štiav.

Исследовательский институт спиртных и консервных заводов в Братиславе

Пектиноразлагающие энзимы из ферментации лимонной кислоты

Выводы

Автор в статье указывает на проблематику возможности продукции пектиноразлагающих энзимов для консервных целей из продуктов продукции лимонной кислоты а именно прямо при помощи изоляции из питательной основы, или при помощи извлечения из грибкицы. Они сами разработали способ производства пектиноразлагающих энзимов при помощи изоляции прямо из питательной основы, продукция которых под названием ЛЕОЗИМ активностью в 10.000 °PM подготавливается. Данный препарат не содержит пектинэстеразы и у него очень хорошие качества для кларификации фруктовых соков.

Pectolytic enzymes from fermentation of citric acid

Summary

The author deals with the problems of pectolytic enzymes production for canning from the products of citric acid manufacture directly by the isolation of the substrate or by the extraction of the Mycellium. They elaborated themselves the method of the production of pectolytic enzymes by the isolation directly from the substrate. Their product named LEOZYM with activity of 10 000 °PM is being prepared. This product does not contains any pectin esterase and its qualities for the clarification of the fruit juices are very good.