

Vplyv rýchlosti zmrazovania na enzymatickú oxidáciu kyseliny l-askorbovej

B. KRKOŠKOVÁ, Š. ŠULC

Pri zmrazovaní, a najmä počas mraziarenského skladovania, nastávajú v mrazených produktoch fyzikálne a chemické zmeny. Tieto zmeny sú podmienené najmä poklesom teploty a vymrznutím vody za tvorby ľadových kryštálov. Na začiatku zamrznutia často nastávajú aktivácie enzymatických systémov, ktoré nie sú podmienené poklesom teploty, ale tvorbou kryštálov. Na kvalitu mrazeného produktu, najmä na jeho fyzikálne zmeny, má rozhodujúci vplyv rýchlosť zmrazovania. Mikroskopické pozorovania rezov tkaniva ukazujú, že nielen veľkosť kryštálov, ale aj spôsob tvorby kryštálov je silne závislý od rýchlosti zmrazovania. Pri rýchlom zmrazovaní sa tvoria kryštály rovnomerne v medzibunečnom priestore i v bunkách tkaniva. Pri pomalom zmrazovaní naproti tomu zamrzá voda najmä v medzibunečnom priestore. Difúziou vody z buniek a narastaním objemu vody pri zmrazení zväčšuje sa medzibunečný priestor, zatiaľ čo bunky sa zvršujú a deformujú. Tento vplyv sa pri rôznych produktoch prejaví v rôznej miere (1). V dôsledku zväčšovania objemu vody pri zmrazovaní existuje horná hranica pre rýchlosť zmrazovania, pri ktorej veľmi rýchle zmrazená povrchová vrstva následkom zväčšenia vnútorného objemu praskne. Hlavnou príčinou zmien bunečnej štruktúry je zmena cytoplazmy spôsobená odňatím vody tvorbou ľadu. Koncentrovaný zvyšok roztoku, najmä v ňom obsiahnuté soli, ovplyvňujú koloidné zložky, takže tieto strácajú schopnosť reabsorbovať po rozmrazení vodu (2). Strata bunečných funkcií sa pri jednotlivých druhoch produktov prejavuje rozlične. Ovocie s pevným ochranným tkanivom sa mení iba málo; ovocie s veľkým intracelulárnym priestorom, ako jablká a jahody, ktorých tkanivo sa osmotickým tlakom napne, zostanú po rozmrazení uvoľnené a mäkké, zvršujú sa a strácajú značné množstvo vody. Straty šťavy znamenajú značnú stratu nutritívnej hodnoty. Odtečená šťava obsahuje vedľa minerálnych látok, najmä vitamíny a enzýmy.

Straty vitamínov v zmrazených potravinách sa prejavujú najmä ako straty vitamínu C, preto je úchova kyseliny l-askorbovej jedným z kritérií akosti. Kontrolné objektívne testy na sledovanie kvality mrazených výrobkov zahŕňajú vždy, ako jedno z dôležitých kritérií stanovenia obsahu kyseliny l-askorbovej a jej derivátov (3, 4). Straty vitamínu C počas zmrazovania a mraziarenského skladovania sú pri rôznych produktoch veľmi rozličné a sú predme-

tom rozsiahleho štúdia. Kyselina *l*-askorbová podlieha oxidatívne odbúranie principiálne dvoma cestami:

1. Autooxidáciou a oxidáciou katalyzovanou ťažkými kovmi. Pri tomto druhu oxidácie hrá dôležitú úlohu pH reakčného prostredia. Čistá autooxidácia sa začína v neutrálnom prostredí a zrýchľuje sa v alkalickom prostredí. Oxidácia katalyzovaná Cu^{++} iónmi naproti tomu dominuje v kyslom a neutrálnom prostredí.

2. Oxidáciou enzymatickou. Kyselinu *l*-askorbovú oxiduje celý rad oxidáz, ktoré obsahujú ako kofermenty, meď (askorbáza, fenolázy), alebo železo (peroxidáza, cytochrómoxidáza). Z týchto enzýmov iba askorbáza priamo aeróbne oxiduje kyselinu *l*-askorbovú, ostatné enzýmy účinkujú nepriamo, len sprostredkujú transport elektrónov medzi oxidáciou a kyselinou *l*-askorbovou. V protiklade k oxidácii katalyzovanej ťažkými kovmi, pri ktorej vzniká intermediárne H_2O_2 , pri enzymatickej oxidácii rezultuje namiesto H_2O_2 voda (5). Reakčný mechanizmus enzymatickej oxidácie v prípade enzýmu peroxidázy je nasledovný: Akceptorom vodíka je H_2O_2 prítomný v bunke alebo v reakčnom prostredí. Štúdium kinetiky peroxidázovej reakcie ukázalo, že táto reakcia prebieha cez tvorbu ternárneho komplexu: enzým — akceptor — donátor (6).

V našej výskumnej práci sme venovali veľkú pozornosť štúdiu enzymatickej oxidácie kyseliny *l*-askorbovej v prítomnosti peroxidáz. Túto reakciu sme podrobne študovali z hľadiska vplyvu koncentrácie peroxidu vodíka, rôznej aktivity enzýmu, ako aj rôznej teploty. Preštudovali sme rozsah teplôt od $+5^\circ\text{C}$ po -30°C (7). Ďalej sme sledovali vplyv sacharózy v rôznej koncentrácii na enzymatickú oxidáciu kyseliny *l*-askorbovej pri teplote -18°C (8).

V predkladanej práci sa zaoberáme sledovaním priebehu enzymatickej oxidácie kyseliny *l*-askorbovej v modelových systémoch, zmrazených rôznou rýchlosťou, počas skladovania pri teplote -18°C .

Usporiadanie pokusov

Modelové systémy sme pripravili rovnakým spôsobom a v rovnakom rozsahu koncentracii reagujúcich látok, ako sme popísali v predchádzajúcej práci (9). Ako reakčné prostredie sme použili zmes metylalkoholu a vody v pomere 1 : 1. Jednotlivé zložky reakčnej zmesi sme naďavkovali do PVC túb a dokonale premiešali. Zmrazovali sme v dusíkovom kúpeli, resp. v kúpeli pripravenom z pevného CO_2 v etylalkohole s presne nastavenou teplotou -40°C a -60°C . Vzorky sme po zmrazení skladovali pri teplote -18°C počas 9 mesiacov. Hneď po zmrazení a počas skladovania v pravidelných intervaloch sme odoberali vzorky a obsah kyseliny *l*-askorbovej sme stanovili chromatograficky (10).

Výsledky pokusov a diskusia

V tabuľkách 1–3 sú výsledky stanovení obsahu kyseliny *l*-askorbovej vo vzorkách zmrazených rôznou rýchlosťou počas skladovania pri -18°C .

V tabuľkách 4 a 5 sú vypočítané rýchlostné konštanty za rôznych podmienok reakcie.

Vplyv rýchlosti zmrazovania na úchovu kyseliny *l*-askorbovej sa bezprostredne po zmrazení neprejavil. Pri žiadnej zo sledovaných teplôt sme počas

Tabuľka 1

Koncentrácia H_2O_2 Mol/liter	Aktivita peroxidáz	Hneď	Po zmra- zení	Dni					Mesiace					
				1	3	6	12	18	1	1,5	2	3	6	9
1	$(19 \cdot 10^{-2})$	100	100	31,6	2,5	0								
0,1		100	98,8	73,3	55,0	36,6	21,7	5,4	0					
0,001		100	100	80,8	68,3	62,5	60,8	59,5	57,0	52,4	49,1	40,0	17,5	5,0
0,0001		100	100	82,5	79,8	74,1	72,0	70,8	68,5	66,2	64,1	61,6	58,0	54,0
1	$(38 \cdot 10^{-2})$	100	95,0	63,3	33,3	6,0	0							
0,1		100	96,6	76,6	71,0	62,5	48,0	24,1	5,5	0				
0,01		100	99,1	83,0	76,6	68,3	65,0	63,6	60,0	57,2	53,5	46,6	35,8	25,0
0,0001		100	98,3	85,0	81,6	75,0	73,8	72,5	70,0	69,1	68,3	62,5	58,0	55,3
1	$(75 \cdot 10^{-2})$	100	96,0	63,2	43,1	18,5	3,6	0						
0,1		100	98,0	78,0	73,3	66,5	62,3	58,0	47,0	33,5	25,0	12,4	0	
0,01		100	100	85,0	79,0	72,4	70,3	69,0	67,5	61,8	57,8	49,6	33,0	26,6
0,0001		100	96,4	89,0	86,8	85,0	80,7	79,6	76,2	74,8	73,2	66,8	62,8	60,0
1	$(150 \cdot 10^{-2})$	100	98,0	68,5	54,0	35,0	23,8	17,4	0					
0,1		100	100	82,2	76,8	67,9	64,5	61,0	55,6	52,5	50,0	45,8	37,7	18,4
0,01		100	100	84,8	81,4	77,3	73,6	71,1	68,2	65,1	59,4	54,5	46,0	42,0
0,0001		100	100	90,1	88,0	86,6	79,3	79,8	77,8	76,0	74,7	68,0	65,0	61,1

Koncentrácia H_2O_2 Mol/liter	Aktivita peroxidáz	Hneď	Po zmra- zení	Dni					Mesiace					
				1	3	6	12	18	1	1,5	2	3	6	9
1	$(19 \cdot 10^{-2})$	100	100	38,3	7,5	0								
0,1		100	96,6	71,6	60,8	56,0	48,5	31,6	18,6	0				
0,01		100	97,5	78,3	66,6	60,5	58,3	55,8	52,5	48,8	44,6	36,6	23,3	12,8
0,0001		100	100	90,8	83,3	76,6	75,5	74,4	72,5	70,0	68,1	65,6	59,1	53,0
1	$(38 \cdot 10^{-2})$	100	96,6	50,0	43,3	25,0	0							
0,1		100	95,8	78,3	63,3	61,0	57,5	54,2	46,6	38,0	19,8	2,5	0	
0,01		100	99,1	80,0	69,1	65,0	62,3	61,5	60,0	60,0	55,0	52,0	40,0	31,6
0,0001		100	98,3	93,8	86,6	82,5	79,2	77,3	73,3	70,8	69,1	67,3	63,3	55,0
1	$(75 \cdot 10^{-2})$	100	100	71,5	65,0	47,2	30,8	20,0	0					
0,1		100	97,5	82,4	77,5	71,0	63,2	58,5	49,8	38,3	26,3	13,3	5,0	0
0,01		100	100	82,8	78,6	74,8	70,0	65,0	62,5	59,4	56,3	55,0	40,8	35,0
0,0001		100	100	89,1	86,8	82,7	80,0	77,8	73,2	72,3	70,0	66,3	65,4	60,0
1	$(150 \cdot 10^{-2})$	100	100	74,1	55,0	49,1	35,5	23,3	19,5	6,6	0			
0,1		100	100	81,6	75,9	72,0	65,3	58,3	57,5	50,5	46,6	40,4	24,6	10,6
0,01		100	97,1	88,3	85,0	81,3	74,5	67,5	65,5	63,0	60,5	55,8	49,5	42,3
0,0001		100	100	93,3	88,9	86,2	80,0	74,5	73,7	68,7	68,2	67,5	65,5	64,0

Tabuľka 3

Koncentrácia H ₂ O ₂ Mol/liter	Aktivita peroxidáz	Hneď zmra- zení	Dni					Mesiace						
			1	3	6	12	18	1	1,5	2	3	6	9	
1		100	40,9	19,6	6,7	0								
0,1	(19.10 ⁻²)	100	66,3	57,3	50,7	40,9	29,0	14,7	0					
0,01	100	100	77,6	68,0	63,6	60,6	58,0	50,4	42,7	36,0	22,5	13,3	4,3	
0,0001		100	86,3	81,9	75,9	69,2	64,3	60,6	58,3	56,6	55,0	47,0	43,4	
1		100	54,5	32,7	13,2	0								
0,1	(38.10 ⁻²)	100	69,8	61,0	56,3	46,8	38,1	28,9	16,8	4,8	0			
0,01	200	100	87,5	81,1	75,6	66,9	61,8	51,8	45,8	39,2	27,0	20,8	13,2	
0,0001		100	89,2	83,5	76,6	71,6	66,7	63,6	61,5	59,3	57,5	51,8	45,6	
1		100	66,4	52,8	45,3	30,8	19,3	9,0	5,7	0				
0,1	(75.10 ⁻²)	100	80,2	77,2	58,2	52,1	48,2	43,7	30,8	26,1	18,3	16,0	17,6	
0,01	400	100	87,3	85,2	75,0	68,6	65,1	60,0	56,0	50,9	44,5	41,6	31,6	
0,0001		100	93,6	88,6	81,5	77,8	73,1	68,1	62,5	61,3	55,6	50,0	48,3	
1		100	78,9	71,5	65,8	52,3	44,0	33,3	20,1	16,6	13,3	7,8	0	
0,1	(150.10 ⁻²)	100	85,3	81,7	75,5	69,5	64,8	60,9	51,0	44,1	37,5	30,0	22,1	
0,01	800	100	90,3	88,0	84,9	74,8	71,5	67,5	64,8	60,7	55,0	50,8	45,8	
0,0001		100	96,8	91,5	85,7	78,5	75,6	69,5	65,0	63,3	61,0	57,4	54,5	

Tabuľka 4

Teplota zmrazovania °C	Aktivita peroxidáz	Koncentrácia H_2O_2 Mol/liter	Rýchlostná konštanta $k \cdot 10^{-3}/\text{deň}$
-40	100	0,01 M	3,27
	200		1,61
	400		1,73
	800		1,16
-60	100	0,01 M	2,5
	200		1,16
	400		1,05
	800		0,83
dusíkom	100	0,01 M	4,55
	200		2,66
	400		1,16
	800		0,83

zmrazovania nezistili straty kyseliny *l*-askorbovej. Je to vysvetlené krátkym trvaním zmrazovania a veľmi nízkou teplotou. Pri zmrazovaní v kúpeli CO_2 v alkohole, s teplotami -40 a -60 °C sa dosahujú efektívne zmrazovacie rýchlosti 1–2 cm/hod., čo predstavuje za podmienok pokusu zmrazovací čas okolo 5 minút. Efektívna rýchlosť zmrazovania sa pri zmrazovaní v kvapalnom dusíku ešte 10-násobne zvýši.

Zaujímavým spôsobom sa prejavil vplyv rýchlosti zmrazovania počas skladovania pri -18 °C. V tabuľke 4 sú rýchlostné konštanty enzymatickej oxidácie po zmrazení rôznou rýchlosťou v závislosti od aktivity peroxidáz. Koncentrácia H_2O_2 je 0,01 M, čo je ekvimolárna koncentrácia s koncentráciou kyseliny *l*-askorbovej na začiatku pokusu. Rýchlostné konštanty sa výrazne líšia pri vysokých aktivitách (100 a 200), kým pri nízkych aktivitách (400 a 800) sú len málo rozlíšené. K zaujímavým číslam dospejeme, ak si vyčíslime vzrast rýchlostnej konštanty so stúpajúcou aktivitou peroxidáz. Ak si rýchlostnú konštantu pri aktivite peroxidáz 800 zvolíme za jednotku, potom pri teplote zmrazovania -40 °C stúpne rýchlostná konštanta pri aktivite 200 1,4-krát a pri aktivite 100 2,8-krát. Pri teplote zmrazovania -60 °C je tento vzrast takmer rovnaký, pri aktivite 200 1,4-krát a pri aktivite 100 3-krát.

Pri zmrazovaní v kvapalnom dusíku je zväčšenie rýchlostných konštánt 2-násobné, pri aktivite 200 – 3,2-krát a pri aktivite 100 – 5,5-krát. Tento výsledok je v súhlase so zistením iných autorov (1), že pri zmrazovaní za

Tabuľka 5

Teplota zmrazovania °C	Aktivita peroxidáz	Koncentrácia H_2O_2 Mol/liter	Rýchlostná konštanta k. $10^{-3}/\text{deň}$
-40	100	1	516
		0,01	3,27
		0,0001	0,5
	800	1	20,5
		0,01	1,16
		0,0001	0,48
-60	100	1	376
		0,01	2,5
		0,0001	0,6
	800	1	16,3
		0,01	0,83
		0,0001	0,33
dusíkom	100	1	216
		0,01	4,55
		0,0001	0,58
	800	1	8,75
		0,01	0,83
		0,0001	0,38

extrémne nízkych teplôt, teda aj v kvapalnom dusíku, nastávajú aktivácie enzymatických systémov. Tento zaujímavý výsledok nás vedie k tomu, že budeme sledovať prípadné zvýšenie aktivity oxidatívnych enzýmov pri zmrazovaní rôznych druhov ovocia a zeleniny v kvapalnom dusíku.

V tabuľke 5 sú rýchlostné konštanty enzymatickej oxidácie pri aktivite peroxidáz 100 a 800 v závislosti od koncentrácie H_2O_2 . Táto závislosť je opäť výrazná pri vysokej aktivite peroxidáz. Pri aktivite peroxidáz 800, ak za základ porovnania vezmeme koncentráciu H_2O_2 0,01 M, stúpne reakčná rýchlosť pri koncentrácii H_2O_2 1 M a teplotách zmrazovania -40°C a -60°C cca 20-krát a pri zmrazovaní dusíkom 10-krát. Pri všetkých teplotách zmrazovania klesne

pri koncentrácii H_2O_2 0,0001 M reakčná rýchlosť na polovicu. Pri aktivite peroxidáz 100 sa zvýšená koncentrácia H_2O_2 prejaví veľmi výrazne. Rýchlosť reakcie stúpne pri koncentrácii H_2O_2 1 M až 100-násobne. Pri tejto vysokej koncentrácii peroxidu vodíka sa zvýšená aktivita peroxidáz po zmrazení v kvapalnom dusiku neprejavila. Pri koncentrácii peroxidu vodíka 0,0001 M sú rýchlostné konštanty pri všetkých teplotách zmrazovania takmer rovnaké.

Súhrn

Sledovali sme vplyv rýchlosti zmrazovania na enzymatickú oxidáciu kyseliny *l*-askorbovej v modelových systémoch. Pri žiadnej zo sledovaných teplôt sme nezistili stratu kyseliny *l*-askorbovej počas zmrazovania. Pri skladovaní pri -18°C sa vplyv rýchlosti zmrazovania prejavil. Pri ekvimolárnej koncentrácii H_2O_2 a kyseliny *l*-askorbovej sa prejavila výrazná aktivácia peroxidáz zmrazovaním v kvapalnom dusiku. Pri ostatných koncentráciách reagujúcich zložiek s klesajúcou teplotou zmrazovania znižovala sa i rýchlostná konštanta reakcie.

Literatúra

1. Partmann, W., Konservierung von Lebensmitteln bei tiefen Temperaturen. Umschau in Wissenschaft und Technik, Frankfurt, 1968.
2. Handbuch der Lebensmittelchemie, Band V., Teil II, Springer Verlag (1968).
3. Philippon, M. J., Quelques tests américains de contrôle des produits végétaux surgelés, Revue Pratique du Froid, 18, (1965), č. 231.
4. Olson, R. L., Objective tests for frozen food quality. Conference in Frozen Food Quality, Albany, nov. 1960.
5. Heimann, W., Mechanismus der Wirkung und der enzymatischen Zerstörung der Ascorbinsäure. Wissenschaftliche Veröffentlichungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung, Band 14, Darmstadt 1965.
6. Heimann, W. — Wisser, K., Zur Kinetik der peroxydatischen Reaktion. Die Nahrung, 12, 1968, č. 1.
7. Šulc, Š. — Krkošková, B., Vplyv teploty na oxidáciu kyseliny *l*-askorbovej v prítomnosti peroxidáz, Bulletin ÚVÚPP, V., (1966), č. 1.
8. Šulc, Š. — Krkošková, B., Vplyv sacharózy na enzymatickú oxidáciu kyseliny *l*-askorbovej pri teplote -18°C , Bulletin ÚVÚPP, IV., 1965, č. 4.
9. Šulc, Š. — Krkošková, B., Sledovanie oxidácie kyseliny *l*-askorbovej v prítomnosti peroxidáz pri nízkych teplotách. Bulletin ÚVÚPP, IV., 1965, č. 2.
10. Hais, Macek, Procházká, Papirová chromatografie, 1959.

Влияние быстроты замораживания на enzymатическое окисление *l*-аскорбиновой кислоты

Выводы

Авторы исследовали влияние быстроты замораживания на enzymатическое окисление *l*-аскорбиновой кислоты в модельных системах. Ни у какой из наблюдаемых температур авторы не обнаружили убыль *l*-аскорбиновой кислоты в процессе замораживания. При хранении при температуре -18°C влияние быстроты замораживания проявилось. При эквимоллярной концентрации перекиси водорода и *l*-аскорбиновой кислоты проявилась выразительная активность пероксидаз при замораживании в жидком азоте. У остальных концентраций реагирующих элементов при понижении температуры замораживания уменьшалась и скоростная постоянная величина реакции.

Influence of freezing rate on enzymatic oxidation of *l*-ascorbic acid

Summary

The influence of freezing rate on enzymatic oxidation of *l*-ascorbic acid in model systems was studied. The loss of *l*-ascorbic acid during freezing was determined in none of studied temperatures. In storing at -18°C the influence of freezing rate became evident. At equimolar concentration of H_2O_2 and *l*-ascorbic acid the outstanding activation of peroxidases appeared at the freezing in liquid nitrogen. In other concentration of responding components with lowering temperature of freezing also the rate constant of the reaction was lowered.