

I. STEIN, F. KLEMPOVÁ

olo dokázané, že v potravinách tuhej konzistencie, vysušených sublimačným pôsobom (lyofilizáciou) na taký obsah vody, ktorý ich chráni pred rozmnožením mikroorganizmov, pôsobia natívne enzýmy, ktoré predchádzajúcimi technologickými operáciami (blanširovaním, varením) neboli zničené. Hoci reakcie katalyzované enzýmami prebiehajú v nich veľmi pomaly, môžu sa produkty chemických zmien vzniknuté počas dlhodobého skladovania nahromadiť v takých množstvách, že nepriamo ovplyvňujú kvalitu výrobku.

Z fyzikálnych faktorov, ktoré môžu kvalitu lyofilizovaných výrobkov počas skladovania podstatne ovplyvniť, má veľký význam okrem teploty, vlhkosti, atmosférického kyslíka aj doba prechovávanía. Lyofilizáciou sa natívne enzýmy inhibujú reverzibilne, počas skladovania sa mnohé z nich reaktivujú. Medzi reaktiváciou natívnych enzýmov inhibovaných vysušením na nízku vlhkosť medzi dobou skladovania výrobku je veľmi úzka súvislosť.

Po štúdiu vzťahov medzi vlhkosťou a medzi reaktiváciou kryosikáciou reverzibilne inhibovaných enzýmov (1) zamerali sme túto prácu na sledovanie zmeny aktivity lipoxidázy v lyofilizovaných potravinách počas dlhodobého skladovania.

## Metodika

Vplyv doby skladovania na reaktiváciu lipoxidázy sledovali sme na prirodzenom modeli — na blanširovanom, sublimačne na nízku vlhkosť vysušenom, a jemno rozomletom zelenom hrášku (lyofilizovaný 24 hod., maximálna teplota ohrevu 40 °C, teplota povrchu 25—30 °C, pracovný tlak 0,05—0,08 mm Hg, druh Edelperle, ročník 1965 o vlhkosti 1,98 %). Ako indikátor enzymatických zmien počas skladovania použili sme lipoxidázu (lipoxigenázu, 1.99.2.1), o ktorej je známe, že sa blanširovaním reverzibilne inhibuje a zúčastňuje sa na zhoršení kvality dlhodobe skladovaných lyofilizovaných výrobkov (2). Aktivita lipoxidázy v lyofilizovanom hrášku bola relatívne veľmi nízka (tab.), na začiatku skladovania pri nízkej vlhkosti takmer nulová.

Vyššiu vlhkosť sme pripravili pokropením lyofilizovaného hrášku vypočítaným množstvom vody a po dôkladnom premiešaní, stanovení obsahu vlhkosti podľa K. Fischera) a po určení počiatočnej aktivity enzýmu sme vložili vzorku do konzervových plechoviek. Vzduchotesne uzavreté plechovky sme skladovali

v termostate pri 30 °C 2—80 dní. Po uplynutí primeranej doby sme plechovku otvorili, stanovili vlhkosť a aktivitu enzýmu.

Aktivitu lipoxidázy sme stanovili manometrickou metódou Warburgovou podľa Süllmanna (2). 5 ml reakčnej zmesi zloženej z ľanového oleja (substrátu) zriedeného fosfátovým regulátorom pH 6,3, resp. redestilovanou vodou na taký obsah vody, aký mal lyofilizovaný preparát, ktorého aktivitu sme zisťovali a 200 mg lyofilizovaného preparátu tvorili celkový obsah Warburgovej nádoby. 200 mg lyofilizovaného preparátu a prísl. množstvo prakticky bezvodého oleja (1,62 %  $H_2O$ ) sme vniesli do hlavného priestoru nádoby, zmes regulátora a red. vody boli v bočnom ramienku. Po 15 min. vytemperovaní na 30 °C sme obsah bočného ramienka preliali do hlavného priestoru a pri 120 ot/min odčítavali údaje manometrov. Slepý pokus mal analogické zloženie, miesto enzymatického preparátu obsahoval 200 mg redestilovanej vody.

Aktivitu lipoxidázy a jej zmenu sme vyjadrili hodnotou koeficientu reakčnej rýchlosti  $k = x/t$  (s presnosťou  $\pm 7\%$ )  $k$  = koeficient reakčnej rýchlosti,  $x$  =  $mm^3$  spotrebovaného vzdušného  $O_2$ ,  $t$  = čas v min. Zmena aktivity prejavuje sa zmenou hodnoty  $k$ .

## V ý s l e d k y

V lyofilizovaných preparátoch skladovaných dlhšiu dobu stúpa aktivita lipoxidázy. Reverzibilne inhibovaný enzým sa časom reaktivuje. Reaktivácia (rozdiel medzi aktivitou lipoxidázy na začiatku skladovania preparátu a na konci pokusu) závisí — pri inak konštantných podmienkach úchovy — nielen od doby prechovávaní, ale i od aktivity enzýmu na začiatku skladovania. Čím je aktivita enzýmu nižšia, tým je vyššia po uplynutí určitej doby (napr.  $k = 0,034$  pri vlhkosti 3,12 % na začiatku a  $k = 0,495$  po 66 dňoch;  $k = 1,66$  pri 31,25 %  $H_2O$  na začiatku a  $k = 2,960$  po 55 dňoch). Počiatočná aktivita lipoxidázy závisí vo veľkej miere od vlhkosti preparátu. Hodnota relatívnej reaktívácie, čiže koľkonásobne sa zväčší počiatočná aktivita počas skladovania, je závislá od počiatočnej vlhkosti preparátu.

Aktivita lipoxidázy v závislosti od doby skladovania — za konštatnej vlhkosti a teploty speje k dosiahnutiu určitého maxima.

Z priebehu kriviek znázorňujúcich pôsobenie lipoxidázy v prostredí upravenom na rovnakú vlhkosť možno usúdiť, že doba skladovania nemá vplyv na mechanizmus odbúrania substrátu. Rozdiel v aktivite lipoxidázy sa prejavuje len rôznou polohou ( $tg\alpha$ ) kriviek, pričom v najnižšej polohe je krivka znázorňujúca priebeh katalýzy na začiatku skladovania a nízkej vlhkosti a v najvyššej polohe je krivka znázorňujúca priebeh reakcie po rôznej dobe skladovania a vysokej vlhkosti preparátu.

## D i s k u s i a

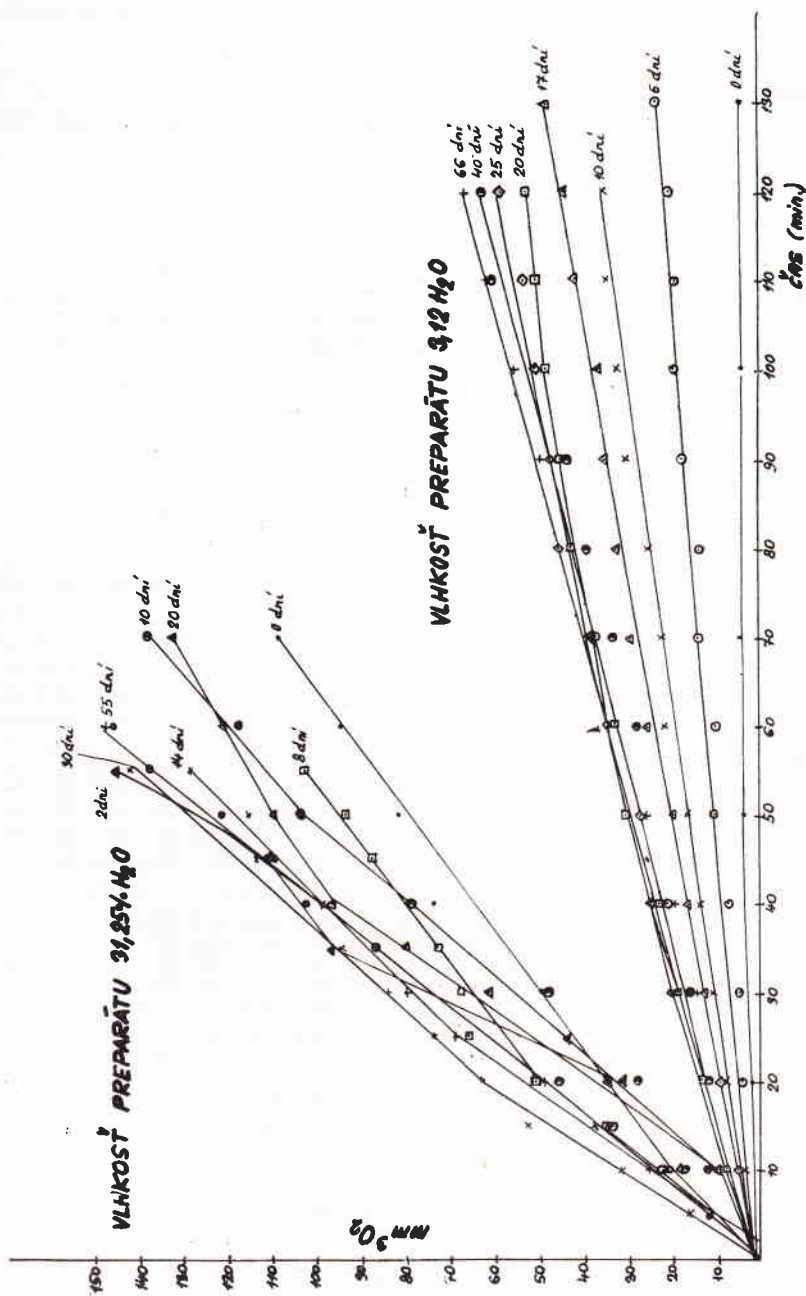
Pri dlhšom skladovaní nastávajú zmeny v kvalite lyofilizovaných výrobkov. Sú to zmeny, na ktorých sa zúčastňujú natívne enzýmy, ktoré sa vplyvom zvyškovej vlhkosti a doby prechovávaní ako napr. lipoxidáza reaktivovali.

Aktivita lipoxidázy stúpa — pri konštantnej vlhkosti preparátu a teploty

Aktivita lipoxidázy lyofilizovaného hrášku v závislosti od vlhkosti a doby skladovania

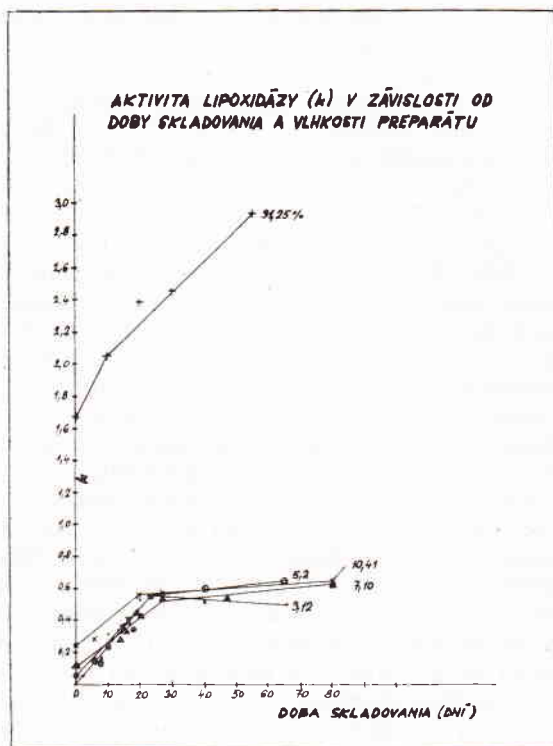
Vlh- kost %	Doba sklad. dni	Čas v min													k=x/t
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
3,12		nm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>													
	0	0	1	0	0	3	—	4	—	4	4	3	3	4	0,034
	0	0	3	4	6	9	9	13	—	17	19	19	20	23	0,152
	10	3	7	10	13	16	21	22	25	30	32	34	35	—	0,320
	17	5	8	12	16	19	25	29	32	35	36	41	44	48	0,393
	20	6	12	18	23	30	33	37	42	45	48	50	52	—	0,535
	25	8	12	19	23	26	33	38	45	46	50	53	58	—	0,561
	40	6	12	15	20	27	27	33	39	43	50	60	62	—	0,513
66	3	8	13	19	25	33	38	45	49	55	61	66	—	0,495	
5,20	0	0	0	2	3	5	3	5	—	—	—	—	—	—	0,047
	8	0	1	3	4	7	10	12	13	15	17	19	18	21	0,132
	10	3	3	5	5	10	14	21	—	22	26	27	33	—	0,227
	18	3	6	10	13	18	20	25	29	35	41	50	54	—	0,364
	24	7	13	18	23	28	32	38	45	51	57	58	60	—	0,571
	40	6	13	19	23	29	35	38	46	57	61	65	70	—	0,595
	65	9	16	23	26	30	36	40	42	45	65	67	69	—	0,643
7,10	0	0	0	0	4	4	6	8	10	11	—	—	—	—	0,125
	6	0	1	3	4	6	10	13	13	13	15	16	—	—	0,135
	8	0	0	2	3	3	7	11	11	13	18	20	23	—	0,152
	14	2	5	5	13	15	16	20	26	21	25	29	—	—	0,270
	16	3	4	9	11	10	11	14	16	18	18	23	24	—	0,351
	18	4	10	13	18	23	28	33	37	40	43	48	53	—	0,449
	20	4	11	13	14	17	25	31	36	41	46	50	57	—	0,433
	27	5	11	20	24	34	38	41	45	49	55	60	63	—	0,571
	47	0	5	11	16	21	26	39	45	53	62	69	78	—	0,524
	80	7	12	16	22	31	40	46	55	62	69	75	82	—	0,640
10,41		3	5	6	12	13	16	20	22	24	26	29	—	—	0,264
		4	7	9	13	13	16	20	20	25	26	—	—	—	0,280
		7	5	9	11	13	17	20	22	26	31	33	37	38	0,285
		3	6	10	14	18	21	26	27	29	30	32	—	—	0,329
		3	11	13	14	18	18	27	33	—	—	—	—	—	0,400
		5	7	11	16	19	22	27	34	42	49	56	62	70	0,508
		7	14	19	22	30	34	40	42	46	49	53	5	—	0,563
		5	15	16	28	30	36	43	47	51	55	58	61	—	0,583
		6	11	17	25	27	29	36	44	56	65	73	82	—	0,587
		8	12	27	23	30	49	57	57	63	70	78	85	—	0,697
31,25	0	20	34	49	73	81	94	108	—	—	—	—	—	—	1,660
	2	11	27	47	78	103	122	138	—	—	—	—	—	—	1,681
	8	9	34	60	86	109	121	132	—	—	—	—	—	—	2,078
	10	17	30	96	110	146	—	—	—	—	—	—	—	—	2,240
	14	22	50	68	87	93	103	—	—	—	—	—	—	—	2,180
	20	31	45	77	102	121	146	—	—	—	—	—	—	—	2,388
	30	25	48	79	99	120	147	—	—	—	—	—	—	—	2,466
	55	31	62	83	113	142	—	—	—	—	—	—	—	—	2,960

AKTIVITA LIPOXIDÁZY V LYOFILIZOVANOM HRÁČKU V ZÁVISLOSTI OD DOBY  
PRECHOVÁVANIA PRI KONŠTANTNEJ VLNKOSTI.



skladovania — v závislosti od doby skladovania a taktiež rastie pri konštantnej dobe a teplote prechovávaní so stúpajúcou vlhkosťou (1).

Medzi týmito v tuhom prostredí lyofilizovaného hrášku prebiehajúcimi chemickými procesmi možno pozorovať podobnosť, ktorá dáva podklad pre



hypotézu, že zvyšková voda, voda, ktorá sa lyofilizáciou z produktu neodstránila, môže byť príčinou toho, že v prostredí zdanlivo suchom a tuhom prebiehajú enzymatické procesy.

Súvislosť medzi aktivitou enzýmov a medzi vlhkosťou preparátu vyjadruje — ako je známe — sorpčná izoterma, ktorá je analogická terme enzýmov v ich závislosti od relatívnej vlhkosti obklopujúcej atmosféry (1). Z priebehu sorpčných, resp. enzýmových teriem sa usudzuje na spôsob zakotvenia, resp. adsorpcie vody v tuhých práškovitých preparátoch na vzduchu hygroskopických, ku ktorým možno zaradiť aj sublimačne vysušené potraviny. Nazdávame sa, že v preparátoch vysušených na veľmi nízku vlhkosť vytvára zvyšková voda monomolekulárnu vrstvu, v preparátoch vysušených na vlhkosť zodpovedajúcu asi 60 % relatívnej vlhkosti vzduchu je zvyšková voda uložená v polymolekulárnej vrstve a pri vlhkosti zodpovedajúcej viac ako 70 % rel. vlhkosti vzduchu je voda kondenzovaná v kapilárach látky. So spôsobom zakotvenia vody úzko súvisí aktivita natívnych enzýmov lyofilizovaných preparátov. Najväčšia akti-



vita enzýmov sa pozorovala pri vlhkosti odpovedajúcej viac ako 60—70 % rel. vlhkosti vzduchu a minimálna, keď voda vytvára monomolekulárny film.

Stúpanie aktivity lipoxidázy v závislosti od doby skladovania by mohlo byť vysvetlené tým, že zvyšková voda nie je v preparáte stacionárne viazaná, ale je pohyblivá (3). Zdá sa, že po nasýtení polárnych skupín difunduje voda a zlieva sa v určitých miestach vytvárajúc akési hniezda, v ktorých vznikajú rôzne koncentrované roztoky enzýmu a substrátu umožňujúce priebeh enzymatickej katalýzy. Počet hniezd vody, rozmery a ich vzájomná vzdialenosť sú závislé od vlhkosti preparátu. Sú menšie, od seba vzdialenejšie a je ich menej pri nízkej vlhkosti preparátu. Množstvo rozpusteného substrátu a enzýmov je menšie, aktivita enzýmov je nižšia. Zdá sa, že medzi susednými hniezdami vody existuje určitá spojitosť, komunikácia difúziou molekúl vody. Rýchlosť difúzie medzi hniezdami vody závisí od vlhkosti preparátu a od doby skladovania. Pri celkovej vlhkosti zodpovedajúcej vysokej relatívnej vlhkosti vzduchu je — pravdepodobne — komunikácia rýchla, úplná, aktivita lipoxidázy je už po krátkej dobe skladovania relatívne veľká, množstvo vzniknutých reakčných produktov enzymatickej katalýzy je zrejme také, že skracuje trvanlivosť výrobku a mení jeho organoleptické vlastnosti. Pri nízkej vlhkosti prebiehajú procesy pomalšie, trvanlivosť výrobku je síce dlhšia, ale časove je predsa len obmedzená. Okrem vlhkosti lyofilizovaných výrobkov je dôležitým činiteľom ovplyvňujúcim kvalitu aj doba skladovania výrobku.

Aktivita lipoxidázy v lyofilizovanom hrášku speje k dosiahnutiu určitej maximálnej hodnoty ( $k$ ). V hniezdach vody sa konvertuje len časť z celkového substrátu obsiahnutého v lyofilizovanom preparáte. Stúpajúcu aktivitu lipoxidázy v závislosti od doby skladovania možno vysvetliť tým, že sa v hniezdach priebehom skladovania zvyšuje obsah vody, difúziou z blízkeho a ďalšieho okolia a v nej rozpustené molekuly enzýmu a substrátu vytvárajú podmienky pre zvýšenie aktivity lipoxidázy. Za krátky čas nahromadia sa také množstvá reakčných produktov, že badateľne menia kvalitu výrobku. Nedostatočne vysušený výrobok nedá sa bez újmy na kvalite dlhšiu dobu skladovať. V preparátoch z nižšou vlhkosťou dosahuje sa maximálna aktivita po dlhšej dobe, skladovateľnosť výrobku je dlhšia. Tým sa nevylučuje, aby iné, paralelne s enzymatickými pochodmi i za nízkej vlhkosti prebiehajúce procesy (neenzymaticky katalyzované pochody, reakcie produktov enzymatických zmien, napr. chinónov s inými zložkami) neovplyvnili kvalitu výrobku počas dlhého skladovania.

### S ú h r n

Pri dlhšom skladovaní nastávajú zmeny kvality, ktoré sú čiastočne zapríčinené natívnymi enzýmami lyofilizovaného výrobku. Na týchto zmenách sa zúčastňuje aj lipoxidáza. Aktivita lipoxidázy počas dlhodobého skladovania stúpa nielen v závislosti od zvyškovej vlhkosti výrobku, ale aj od doby skladovania.

## Literatúra

1. Klemková, F., Stein I.: Enzymatické procesy v lyofilizovaných potravinách, Bulletin ÚVÚPP 2, 7 (1965)
2. Klemková, F., Stein I.: Vplyv blanširovania na aktivitu lipoxidázy (lipoxidázy) a lipázy (glycerol ester hydrolázy) zeleného hrášku, Bulletin ÚVÚPP, 3, 11 (1964)
3. Acker L.: Lagerfähigkeit lufttrockener Lebensmittel, Nahrung, 2, 1045 (1958).

## Кинетика энзиматических реакций в лиофилизированных пищевых продуктах

### Резюме

При более длительном хранении замечается ухудшение качества, что вызвано, отчасти, нативными энзимами лиофилизированного продукта. В этих переменах участвует также липоксидаза. Активность липоксидазы в течение продолжительного хранения повышается не только от остаточной влажности, но и в зависимости от продолжительности хранения.

## Kinetics of the Enzymatic Reaction in Freeze-dried Foods

### Summary

Some changes of the quality rise by longer storage of the freeze-dried product partially caused by its native enzymes. The lipoxidase also participates in these changes. During long time storage the activity of the lipoxidase raises dependently not only on the residual humidity of the product but also on the time of the storage.