

POKUSNÉ PODKLADY K NÁVRHU NOVEJ TECHNOLOGIE GLAZUROVANIA MRAZENÉHO MÄSA

(K referátu o základnom výskume a realizácii jeho výsledkov)

JÁN ARPAI

Mikrobiologické oddelenie Výskumného ústavu mraziarenského v Bratislave

Zistením, že časť mikroorganizmov izolovaných z mrazeného mäsa sa vyznačuje zvýšenou proteolytickou aktivitou sa ešte neuzavreli výskumné práce, o ktorých sme referovali v predchádzajúcich rokoch (1, 2, 3, 4). Pokračovali sme v nich so zameraním na objasnenie mechanizmu zmien kinetiky enzymatických procesov po zmrazovaní. Pritom sme objavili fenomén mrazovej selekcie fyziologicky silnejších, resp. enzymaticky aktívnejších organizmov. Zistili sme, že tieto tvoria súčasť extrémne mrazuvzdornej zložky mikróbovej populácie (5, 6). Potom sme pristúpili k prácam, ktorými sa skúmali činitele limitujúce kinetiku mikrobiálnych enzýmov, menovite proteáz po zmrazovaní. Pri týchto pokusoch sme kládli zvláštny zreteľ na možnosti využitia výsledkov v praxi. Snažili sme sa najmä úpravou prostredia dosiahnuť inhibíciu enzymatickej aktivity. Za tým účelom sme sledovali predovšetkým vplyv aktuálnej acidity média na rýchlosť enzymatickej hydrolýzy. pH prostredia sa dá technologicky totiž pomerne ľahko ovplyvniť. Okrem toho sa na základe skúseností z predchádzajúcich prác (7, 8) dalo očakávať, že inhibičný účinok pH sa pri súčasnom pôsobení nízkych teplôt synergeticky vystupňuje a to sa môže v praxi využiť na zvýšenie konzervárenského efektu zmrazovania.

Z uvedeného už vyplýva, že ťažisko nasledujúcich pokusných prác leží v stanovení pH-aktivitných kriviek bakteriálnych proteáz. Študovali sme baktérie izolované z mrazeného mäsa. Z metodických príčin to boli tie isté druhy, ktoré sme sledovali už od začiatku pokusov s proteolytickými enzýmami vzhľadom na to, že sa vyskytujú často na mrazenom mäse a sú biochemicky veľmi aktívne (9). Pozornosť sme venovali diferenciacii aerobov od anaerobov, špecifícite peptidáz, aktivácii kationmi a výskytu ektosekrecie popri endosekrecii. Vychádzali sme pritom nielen z poznatkov našich pokusov zhrnutých do predchádzajúcich oznámení o tejto tématike, ale aj z literárnej štúdie. Z nej treba uviesť menovite práce Bergera a spolupracovníkov (10), Bensusana a spolupracovníkov (11), Kaplana (12), Rotmana (13), Gruttera a Zimmermana (14), ako aj Chalupek (15, 16, 17), lebo z nich sme čerpali pri zostavení pracovného postupu.

Materiál a metódy

Aktivita mikróbných enzýmov je vo vysokej miere závislá od fyziologického stavu patričného organizmu, resp. od podmienok životného prostredia. To sa obvykle špecifickým spôsobom prejavuje na výsledkoch, ktoré sa stávajú málo reprodukovateľnými. Preto bolo tak dôležité venovať sa spočiatku metodologic-kému výskumu (1, 2, 3), ktorým sme pracovné podmienky do takej miery spres-nili, že sme získavali reprodukovateľné a s primeranou štatistickou významnosťou vyhodnocovateľné výsledky (18). Aj z tohto dôvodu sme, pokiaľ to bolo možné, pracovali s rovnakým bakteriálnym materiálom a substrátmi ako pri sledovaní základných vlastností proteáz kryorezistentných mikroorganizmov (1, 2, 3, 4). Vzhľadom na to, že sme v publikáciách už podrobne opisali základné pracovné podmienky, tu ich uvádzame už len v stručnosti, pokiaľ sme sa od nich podstatne neodchýlili.

Mikroorganizmy sme vybrali pomedzi druhmi, ktoré tvoria dominu-júce zložky mikrofóry mrazených potravín, menovite mäsa, z ktorého sa aj izo-lovali (19). Z metodických príčin sa pri pokusoch rozdelili na aeroby a na anaeroby. V prvej skupine sa sledovali *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Esche-richtia coli*, *Proteus vulgaris* a *Pseudomonas fluorescens*. Do druhej skupiny sa zaradili *Clostridium carnis* a *Clostridium sporogenes*.

Kultivácia aerobov sa robila v 20 litrových Roux-bankách, ktoré obsahovali 10 litrov mäsopeptónového bujónu s prísadou 0,5 % glukózy. pH média sa upra-vilo na 6,8. Za inokulum slúžilo pol litra 24 hodinovej kultúry vyrastenej v pôde rovnakého zloženia ako pri kultivácii. U anaerobov sa postupovalo odlišne len v tom, že sa použili 10 litrové banky, ktoré sa naplnili živným médiom až po sklenenú zátku, aby sa tým vytesnil vzduch. Kultúry sa inkubovali pri teplote 37 °C po dobu 24 hodín. Bunkový materiál sa zbral odstredením a uložil do chlad-ničky pri teplote 0 až 1 °C. Použitie kontaminovaného materiálu sa vylúčilo bak-terioskopickou kontrolou.

Extrakcia bakteriálnych buniek, metodicky spresnená pò predbežných pokusoch, sa robila tým spôsobom, že sa bunkový materiál sprvoti zmrazoval v čase jedného týždňa pri teplote -30 °C a nasledovne rozmrazoval v teplej vode. Tento proces sa až päťkrát zopakoval. Potom sa biomasa rozdrvila rozmiešaním v sklenom piesku, ktorý sa pridával v pomere 1 : 3. Toluen v približne desať-násobnom objeme sa pribral ako vyluhovadlo. Opatrným pridávaním 0,1 N NaOH sa pH udržiavalo v rozpätí 6,8—7,0. Extrakcia trvala 24 hodín. Teplota sa pri tom zvlášť neupravovala, t. j. vyluhovanie sa dialo pri izbovej teplote. Roztok sa od-stredil pri 4000 ot/min. až do vyčírenia, týmto sa získal surový enzymatický extrakt, ktorý sa zahustil vo vákuovej odparke pri teplote nepresahujúcej 40 °C. Koncentrát vnútrobunkových enzýmov sa prečistil 15 hodinovou dialýzou do destilovanej vody. Po skúške hydrolytickej účinnosti, resp. počas pokusov sa pre-parát uchovával pod toluenom v chladničke pri teplote okolo 0 °C. Pokusy trvali v priemere dva týždne.

Mimobunkový enzymatický materiál sa získal tak, že sa zvyšok kulti-vačnej tekutiny 30 minútovým odstredením pri 4000 ot./min. oddelil od bakté-riových buniek. Tekutá fáza sa sterilizovala filtráciou cez Jena-filter G-5. V prí-

padoch, keď proteázová aktivita filtrátu bola slabá, zvýšila sa účinnosť roztoku zahustením vo vákuu po takú mieru, aby čas merateľnej hydrolyzy substrátu bol metodicky porovnateľný.

Purifikácia enzýmov sa robila adsorpciou na kaolín v slabokyslom roztoku. Postupovalo sa tak, že sa enzymatický roztok, resp. filtrát okyselil riedenu kyselinou octovou na pH 4,5; po pridávaní kaolínu sa 15 minút pretrepávalo na mechanickej trepačke a po 24-hodinovom státi v chladničke sa filtrovalo. Čirý filtrát sa opísaným spôsobom ešte raz adsorpcne prečistil. Po filtrácii sa adsorbát rozmiešal v 1 % čpavkovom roztoku a po 2-hodinovom státi sa znova filtroval. Táto elúcia sa opakovala. Zbývajúci filtrát sa preskúšal na hydrolytickú aktivitu. Pri správnom pracovnom postupe bol enzymaticky neúčinný, t. j. proteázy prešli celkom do eluátu.

Substráty pre kvantitatívne stanovenie peptidázovej aktivity sa pripravovali o koncentrácii 0,066 M peptidu. Použil sa d,l - leucylglycin (zkratka LG); d,l - alanylglycin (AG); diglycin (GG); d,l - alanyldiglycin (AGG); d,l - leucyldiglycin (LGG) a triglycin (GGG). Uvedené čisté chemikálie sme obdržali od nár. pod. Lachema, Brno. Pri meraní želatinolytickej aktivity proteináz slúžila za substrát želatina (Ž) v koncentrácii 5 % s použitím pracovného postupu podľa Gruttera a Zimmermana (14).

Meranie aktivity peptidáz sa robilo manometrickou metódou, ktorej teóriu a praktické uskutočnenie, resp. spôsob vypočítania sme už podrobne opisali (2). Tu sa len poznamenáva, že stupeň proteázy sa vyčísľuje vo výsledkoch ako percento hydrolyzy jednej z opticky aktívnych zložiek racemického peptidického substrátu. Inkubačný čas bola obvykle 1 hodina a inkubačná teplota pri meraní bola 40 °C. Prípadné odchýlky od tejto metodologickej normy sú poznamenané pri výsledkoch. pH prostredia, ako premenná veličina, sa nastavovalo na hodnoty celých čísiel v rozpätí 4 až 9. Okyslenie prostredia sa dosiahlo kyselinou octovou, v prípade alkalizácie sa použil lúh sodný. pH sa kontrolovalo potenciometricky za použitia sklenenej indikačnej elektródy.

Aktivovanie enzýmov spočívalo v pridaní Mg^{++} vo forme 0,003 M $MgCl_2$. Z aktivovaného enzymatického roztoku sa odobralo 10 ml, ktoré sa zmiešali s dvojnásobným množstvom acetónu a po 1 min. státi sa odstredilo. Zrazenina sa suspendovala v rovnakom objeme destilovanej vody a opäť sa odstredovalo. Z číreho roztoku sa odobral 1 ml ako enzymatický agens, ktorý sa zmiešal so substrátom. Ďalšie stanovenie proteolytickej aktivity sa potom robilo štandardnou technikou.

Kinetika hydrolytického štiepenia sa skúmala v závislosti od koncentrácie katalyzátora podľa jednoduchého vzťahu reakcie nultého radu:

$$x = K \cdot t$$

v ktorej x je množstvo substrátu rozloženého v čase t , pričom K je koeficient rýchlosti reakcie. Ďalej sa analyzovala reakčná rýchlosť v závislosti od zmeny koncentrácie substrátu podľa rovnice pre reakcie unimolekulové obdobne ako v predošlých prácach (1).

Z rovnice:

$$K = -\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$$

sme mohli vypočítať koeficienty reakčnej rýchlosti (K), lebo boli známe veličiny: t . . doba trvania reakcie, x . . množstvo reakčných produktov vzniknutých za čas t , takže $a - x$ vyjadruje koncentráciu, resp. množstvo substrátu na konci času t , keď sa počiatočná koncentrácia označila a . Uvedený vzorec pre výpočet kinetiky má svoje oprávnenie s prihliadnutím na to, že druhý limitujúci reakčný činiteľ, t. j. voda bola v prostredí prítomná v nadbytku, zmeny jej množstva reakciu prakticky neovplyvňovali a tak nebolo treba s týmto činiteľom počítať. Bolo však treba uvažovať o spolupôsobení dvoch, poprípade viac enzýmov alebo enzymatických komplexov proteolytickej povahy, pre ktoré platí všeobecný vzťah:

$$\frac{d(S_1 + S_2)}{dt} = -(k_1 S_1 + k_2 S_2)$$

kde S_1 a S_2 vyjadrujú počiatočné množstvá, resp. koncentrácie substrátov, kým k_1 a k_2 sú príslušné rýchlostné konštanty jednotlivých enzýmov. Tieto konštanty sa vypočítali na základe hodnoty enzymaticky vyvolaných zmien na substráte, ktorú pre ľubovoľne zvolenú časovú jednotku t označujeme ako veličinu D , podľa rovnice:

$$k = \frac{\ln D}{t}$$

Funkcia konštanty k je zrejmá pri vyjadrení vzťahu počiatočnej koncentrácie substrátu (S) ku koncentrácii súčtu reakčných spodín na konci reakcie (Σ) po reakčnom čase t , ako

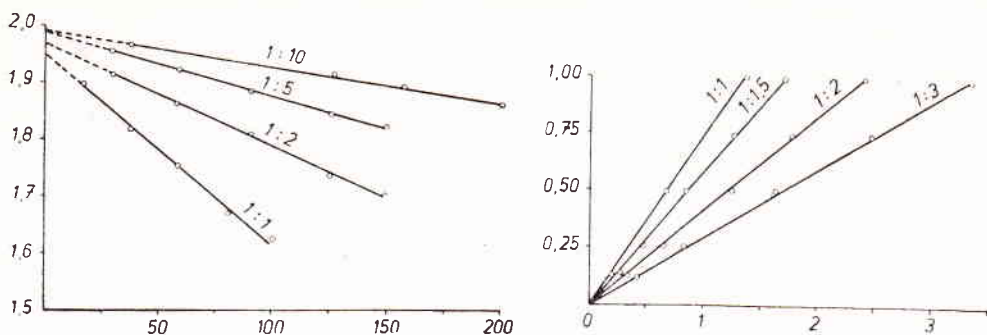
$$\Sigma = S (1 - e^{-kt}).$$

Na základe uvedených rovníc bolo možné robiť rozbor kinetiky hydrolýzy, ktorej číselné výsledky sa vyjadrili v mikroekvivalentoch hydrolyzovanej peptickej reťaze na mol množstva alebo percento koncentrácie substrátu ako uvedené pri výsledkoch.

V ý s l e d k y

Výsledky štúdia proteolytickej aktivity sledovaných druhov baktérií možno zhrnúť nasledovne:

Bacillus megaterium dával biomasu, z ktorej bol pripravený enzymatický preparát hydrolyzujúci dipeptidy podľa reakčnej kinetiky prvého radu, kým tripeptidy sa štiepili v približne lineárnej závislosti od času, t. j. podľa reakčnej kinetiky nultého radu. Grafy na obrazoch 1 a 2 znázorňujú jednak závislosť reakčnej rýchlosti od koncentrácie preparátu a jednak od koncentrácie substrátu. Pri ďalších pokusoch bola koncentrácia substrátu konštantná podľa požiadaviek metodiky na stanovenie aktívnej pH krivky. Ako vyplýva z číselných údajov zostavených do tabuľky 1 (s príslušnými údajmi o koncentrácii preparátov v tabuľke 2), sa namerál najväčší peptidolytický účinok vnútrobunkových enzýmov na substráte AG, na ktorom po 1 hodinovej inkubácii pri teplote 40 °C v prostredí o pH=8 sa dosiahla až 84 %-ná hydrolýza. V súlade s týmto nálezom boli výsledky sledovania hydrolýzy tripeptidov, pomedzi ktorými sa najväčšmi štiepil AGG, t. j. až na 76 % pri zachovaní predpísaných inkubačných podmienok. Okys-



Obráz 1. Rýchlosť hydrolyzy d,l-alanylglycínu pri rôznej koncentrácii enzymatického preparátu pripraveného z buniek *Bacillus megaterium*. Pomer riedenia štandardného enzymatického preparátu (koncentrácia bielkovín 1,75 mg/ml) vyznačený nad priamkami. Na osi poradníc: log podielu nehydrolyzovaného substrátu v %, na osi úsečiek: čas reakcie v minútach.

Obráz 2. Závislosť medzi koncentráciou substrátu a peptidolytickou aktivitou za podmienok ako pri obraze 1. Nad priamkami je vyznačený pomer riedenia štandardného substrátu (0,066 M AG). Na osi poradníc: koncentrácia enzymatického preparátu $\times 100$, na osi úsečiek: aktivita v hodnote rýchlostnej konštanty $K \times 100$.

lením prostredia aktivita peptidáz výrazne poklesla. Pri pH 4 sa sledované substráty už prakticky nehydrolyzovali, vynímajúc LG, na ktorom sa ešte zaznamenal 14 %-ný rozklad. Za daných metodických podmienok činil pri pH 5 peptidázový účinok 0 až 20 %, pričom pomerne najvyššia kvóta hydrolyzy sa namerala opäť na LG. Aj filtrát kultivačnej tekutiny katalyzoval štiepenie peptidov. Prekvapilo, že kým bunkový extrakt najrýchlejšie štiepil AG, resp. AGG, zatiaľ filtrát bol na tieto substráty najmenej účinný. Ani pre relatívnu acidofilnosť vnútrobunkovej LG-peptidázy sme v aktivite filtrátu nenašli obdobnosť. Výrazný rozdiel bol aj z hľadiska želatinolytickej schopnosti preparátov získaných z bunkového materiálu a z filtrátu kultivačnej tekutiny. Treba tiež poznamenať, že želatínovú pôdu intenzívne skvapalňovala rastúca kultúra *Bacillus megaterium*, avšak jej filtrát mal už len veľmi slabý proteolytický účinok. Uvedené kvantitatívne rozdiely a zvlášť kvalitatívna špecifickosť, ktorou sa od seba líšili bunkové preparáty od mimobunkových enzýmov vo filtráte, svedčili o tom, že sledované kultúry sa vyznačujú pravou sekréciou ektoenzýmov, podmienenou aktívnym metabolizmom. Naše výsledky sa nedali vyhodnocovať v súlade s názorom, že aktivita filtrátu pochádza z endoenzýmov, ktoré sa dostali do prostredia z lyzovaných buniek (20). K výsledkom pokusov s *Bacillus megaterium* možno ešte dodať, že aktivácia proteáz pomocou Mg^{++} nepriniesla signifikantné kladné výsledky.

Bacillus subtilis po stránke peptidázovej účinnosti sa líšil od predtým charakterizovaného druhu baktérií už v tom, že pri použití LG ako substrátu pôsobila prítomnosť Mg^{++} v médiu aktívne. V tomto prípade sa dosiahlo zvýšenie peptidázovej mohutnosti o vyše 50 %. Na ostatných substrátoch miera aktivácie nedosiahla hranicu štatistickej významnosti ($P < 0,05$). Ďalší rozdiel oproti enzymatickej aktivite predtým opísaného bacila sme videli v tom, že pri pH optime peptidáz (7,5 až 8) sa najrýchlejšie štiepil LG, kým extrakty buniek *Bacillus megaterium* boli za takýchto podmienok najaktívnejšie na AG a len po okyslení

Tabuľka 1

Vplyv pH prostredia na hydrolytickú aktivitu vnútrobunkových a mimobunkových peptidáz a želatínolytických proteáz baktérií vyskytujúcich sa na mrazenom mäse

Substrát	pH	<i>B. megaterium</i> ‰hydr./ /1 hod.		<i>B. subtilis</i> ‰hydr./ /1 hod.		<i>E. coli</i> ‰hydr./ /1 hod.		<i>Proteus vulgaris</i> ‰hydr./ /1 hod.		<i>Ps. fluorescens</i> ‰hydr./ /1 hod.		<i>Cl. carnis</i> ‰hydr./ /1 hod.		<i>Cl. sporogenes</i> ‰hydr./ /1 hod.	
		endo	ekto	endo	ekto	endo	ekto	endo	ekto	endo	ekto	endo	ekto	endo	ekto
AG	9	12	1	15	2	62	8	33	7	6	10	0	0	0	0
	8	84	16	34	14	70	26	58	18	27	30	11	3	0	0
	7	51	11	30	8	41	19	54	17	24	18	28	9	0	0
	6	30	4	21	6	8	10	25	6	12	15	12	6	0	0
	5	8	0	4	1	0	2	6	1	0	0	0	0	0	0
LG	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	18	10	23	0	65	5	19	0	12	8	0	0	0	0
	8	53	35	76	8	46	21	32	9	35	29	18	5	0	0
	7	48	37	55	5	24	16	30	10	21	20	32	14	0	0
	6	26	12	21	3	10	11	21	5	13	16	15	10	0	0
GG	5	20	4	8	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	11	4	0	0	43	10	18	0	5	6	0	0	0	0
	8	57	39	24	5	48	28	29	11	17	25	13	4	0	0
	7	46	34	19	10	26	10	31	13	12	18	27	12	0	0
AGG	6	15	12	10	5	14	5	19	8	5	12	15	5	0	0
	5	0	0	0	0	2	0	3	0	0	2	3	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	23	4	23	4	38	8	0	0	7	9	0	0	0	0
	8	76	12	64	12	61	29	17	8	18	31	20	3	11	7
LGG	7	48	8	57	9	40	23	15	5	15	17	26	12	28	13
	6	25	3	17	3	23	7	6	1	6	15	11	7	19	4
	5	17	0	2	0	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	14	3	15	2	55	4	18	3	4	11	0	0	3	0
GGG	8	67	42	72	11	58	22	33	8	15	24	16	12	30	20
	7	53	35	60	9	47	20	30	9	15	18	29	18	48	32
	6	18	14	15	3	32	13	23	5	3	10	13	10	16	14
	5	0	0	6	0	0	2	8	0	0	0	3	0	0	2
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Želatína	9	10	0	20	8	37	12	0	0	3	13	0	0	0	0
	8	43	30	78	28	53	30	14	3	9	24	8	0	5	2
	7	44	26	70	22	35	23	13	5	5	16	12	7	8	5
	6	21	12	25	11	3	3	5	1	2	12	3	2	3	0
	5	13	2	10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Želatína	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	8	0	12	5	0	0	15	4	2	0	0	0	11	3
	8	27	12	32	18	0	0	48	12	38	25	0	0	52	24
	7	35	8	51	10	0	0	69	15	78	40	0	0	71	36
	6	21	5	19	8	0	0	53	10	44	18	0	0	36	15
Želatína	5	3	0	7	0	0	0	24	5	10	2	0	0	17	1
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabuľka 2

Koncentrácia bielkovín v enzymatických preparátoch

Mikroorganizmus	Množstvo bielkoviny (v mg/ml) v preparátoch	
	z biomasy	z filtrátu
<i>Bacillus megaterium</i>	1,75	0,362
<i>Bacillus subtilis</i>	1,37	0,231
<i>Escherichia coli</i>	1,93	0,275
<i>Proteus vulgaris</i>	2,22	0,291 0,582*
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,19	0,425
<i>Clostridium carnis</i>	1,56	0,382 0,687*
<i>Clostridium sporogenes</i>	1,03	0,433 0,750*

* Po koncentrovaní

prostredia a tým spojenej inhibície AG-peptidáz sa javila LG-peptidáza ako naj-účinnejšia. Na základe výsledkov tejto časti pokusov ťažko nájsť koreláciu medzi dipeptidázovou a tripeptidázovou aktivitou. Tak napr. sa štiepil GG len málo, naproti tomu GGG za rovnakých podmienok veľmi intenzívne. Podobnú voľnosť vo vzťahoch sme našli aj medzi ostatnými sledovanými dipeptidovými a tripeptidovými substrátmi. Rýchlosť rozkladu tripeptidov bola len málo signifikantne vyššia než dipeptidov. Príslušné štatisticky vyhodnotené číslo $t = 1,580$ je väčšie ako konvenčná hranica prípustnej pravdepodobnosti a leží pri danom rozpätí stupňov voľnosti $N = 6$ pod hodnotou $P = 0,1$. Číselné výsledky sa nachádzajú opäť v tabuľke 1, z nich vidieť aj to, že popri peptidázach obsahujú bunky aj želatinolytické proteínázy, ktoré sa v malom množstve našli aj vo filtráte média.

Escherichia coli sa niekedy opisuje ako neproteolytický druh baktérií, keďže neskvapalňuje želatínovú pôdu (21). Z jej buniek sa však dajú vyextrahovať viaceré peptidázy a to vo väčšom množstve za aerobných kultivačných podmienok než za anaerobných. Číselné hodnoty rozborov sú zapísané do tabuľky 1 a svedčia o tom, že proteázy *Escherichia coli* boli v prostredí o aktuálnej acidite nad pH 9 a pod pH 5 prakticky inaktívne. Už na tomto mieste, t. j. pri hodnotení pH-aktívnej krivky tohto potravinársky významného mikróba, možno poukázať na to, že sme k obdobným výsledkom dospeli pri analýze proteolytickej aktivity všetkých pokusných organizmov a tým získali reálny podklad pre zavedenie novej úpravy do mraziarenskej technológie, ktorá môže na fyzikálne-chemickom podklade vystupňovať konzervačný účinok nízkych teplôt.

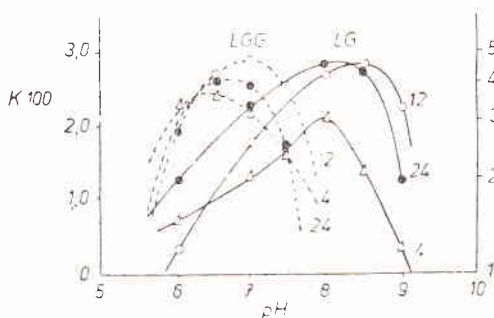
K charakteristike proteázovej aktivity tejto baktérie patrí, že z palety použitých substrátov sa najrýchlejšie štiepili AG, resp. AGG, to znamená, že tieto substráty sa za štandardných pokusných podmienok hydrolyzovali v priemere na 70 %, resp. 61 %. Dvojité pH-optimum peptidáz sa ukázalo pri porovnaní výsledkov dosiahnutých na LG a LGG ako substrátov. V prvom prípade ležalo optimum viac v alkalickkej oblasti, kým v druhom viac na kyslej strane. To viedlo k pokusom, ktorými sme študovali otázku, či enzymatická aktivita preparátov pochádza od jedného alebo od dvoch, resp. viacerých enzýmov. Pritom sme vychádzali z predpokladu, že v prípade pôsobenia jedného enzýmu bude zvýšenie aktivity počas rastu kultúry na jednom substráte také isté ako pri použití viacerých substrátov. Z patrične upraveného pokusu, pri ktorom zo súbežne naočkovovaných substrátov sa v hodinových intervaloch odobrali vzorky, sa získali základné údaje o proteolytickej aktivite, z ktorých sa vypočítala relatívna koncentrácia sekretovaného enzýmu tak, že sa delila aktivita odobratej vzorky (A_n) aktivitou predchádzajúceho odberu (A_{n-1}). Takto sa sledovala enzymatická charakteristika rastúcej kultúry. Keď počiatočnú pomernú koncentráciu enzýmu (C_p) uvedieme ako rovnú jednotke, môžeme nasledujúce relatívne koncentrácie vypočítať podľa rovnice:

$$\frac{k C_{p+1}}{k C_p} = \frac{A_{n-1}}{A_n}$$

kde k je konštanta, ktorá zodpovedá smernici krivky vyjadrujúcej hydrolytickú aktivitu ako funkciu koncentrácie enzýmu. Vzhľadom na to, že C_p sa rovná jednotke možno rovnicu písať zjednodušene:

$$C_{p+1} = \frac{A_{n-1}}{A_n}$$

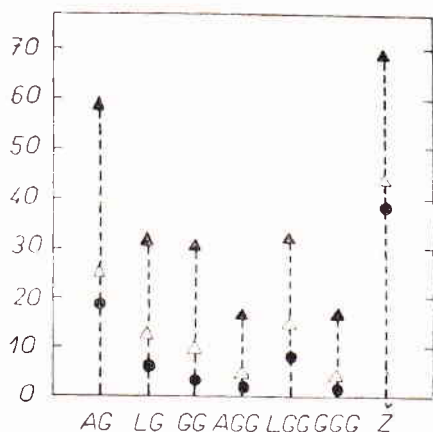
S použitím tohto vzorca získané hodnoty sa použili v ďalšom podľa návodu opísaného v metodickkej časti. Príslušné výsledky sú graficky znázornené na obraze 3. Vyjadrujú vzťahy medzi aktivitou a relatívnou enzymatickou koncentráciou



Obráz 3. Vzáťah medzi aktivitou a relatívnou enzymatickou koncentráciou v závislosti od času kultivácie *E. coli*, od pH, od substrátu. Číslo pri krivkách označuje čas kultivácie v hodinách, nad krivkami: druh substrátu, na osi poradnic vľavo: aktivita ako $k \times 100$, vpravo: log relatívnej koncentrácie enzýmov (C), na osi úsečiek: pH.

v závislosti od rastovej fázy, od pH a substrátu. Vidieť, že pri rovnakom substráte ležia krivky tesne pri sebe, resp. pod sebou. Výrazne sa však diferencujú podľa substrátu. Z toho usudzujeme na homogenitu alebo len malú nerovnorodosť LG-dipeptidázy a od nej diferencovanej-tripeptidázy. Výsledky štúdia kinetiky hydrolýzy katalyzovanej peptidázami *Escherichie coli* sa dajú zhrnúť v tom, že pri pH optime len GG, resp. GGG sa štiepili podľa reakcie prvého radu, kým ostatné substráty sa rozkladali konštantne k času, t. j. ako reakcie nultého radu. Bunky kultivované za aerobných podmienok mali z viacerých hľadísk odlišné enzymatické vlastnosti ako po anaerobnej kultivácii. Prejavovalo sa to vo špecifite k substrátu a v aktivovateľnosti horčíkom. LG-dipeptidáza aerobne pestovaných baktérií reagovala na prítomnosť Mg^{++} až 65 %-ným zvýšením aktivity, kým extrakt buniek z anaerobnej kultivácie nezvýšil za obdobných podmienok svoju peptidázovú účinnosť. Filtráty kultivačného média obsahovali tiež peptidázy. Tieto sa čo do účinnosti kvalitatívne nelíšili od vnútrobunkových extraktov, t. j. mali rovnako rozloženú aktívnu pH krivku a špecifičnosť voči substrátom. Po stránke kvantitatívnej boli však menej účinné. V starších prácach sa uvádzajú obdobné výsledky, ktoré dali základ názoru, že *Escherichia coli* nevytvára ekto-proteázy a proteolytická účinnosť filtrátu kultivačného média pochádza od enzýmov uvoľnených z lyzovaných buniek (20).

Proteus vulgaris je po stránke proteolytickej aktivity dobre preskúšaný organizmus. Obzvlášť dôkladne prepracovaná bola kinetika jeho enzýmov (11). Preto sme zamerali pokusy s enzymatickým materiálom tejto baktérie výlučne na ústredný problém našej úlohy, t. j. na štúdium zmien aktivity pod vplyvom pH prostredia. Zistili sme, že optimálne pH pre účinnosť peptidáz leží tesne pod 8, kým želatinolýza prebieha najrýchlejšie pri pH 7,2. Za týchto podmienok získané



Obraz 4. Hydrolytická schopnosť preparátov pripravených z buniek *E. coli* po zmrazovaní vyznačená čiernym trojuholníkom, z biomasy nezmrazeného zbierkového kmeňa *E. coli* vyznačená prázdny trojuholníkom, porovnávaná s príslušným údajom z literatúry (10) vyznačená čiernym kružkom. Na osi poradnic: % hydrolýzy, na osi úsečiek: druh substrátu.

hodnoty hydrolýzy zodpovedali hodnotám rýchlostnej konštanty v rozmedzí od 2,23 po 1,98. Patričné konštanty Michaelis-Mentena ležali medzi $3,6 \times 10^{-6}$ a $5,2 \times 10^{-6}$ mol/liter. Naše výsledky merania peptidázovej aktivity bakteriálnych buniek *Proteus vulgaris*, ktoré sú číselne uvedené v tabuľke, sa zrejme líšili od literárnych údajov (10, 11). Naše preparáty pripravené z biomasy mali pomerne vysokú peptidolytickú aktivitu. Naproti tomu štiepna mohutnosť filtrátov a z nich

pripravených purifikovaných preparátov bola slabšia ako sa to uvádza v nám známej literatúre. Aj želatinolytická schopnosť preparátov bola vyššia v porovnaní s literatúrou. To platí najmä pre bunkové extrakty. Prejavuje sa to ako známa závislosť sekrécie ektoenzýmov od fyziologického stavu a rastovej fázy mikroorganizmu (10, 11, 20).

Vychádzajúc z prác, ktorými sme zistili výrazné zmeny v enzymatickej aktivite po zmrazovaní (1, 2, 3, 4), sme porovnávali výsledky s proteolytickou schopnosťou zbierkového kmeňa toho istého druhu, ktorý nebol vystavený účinkom zmrazovania. Toto porovnávanie je zrejmé zo stĺpcového diagramu na obraze 4. Štatistické údaje pokusných výsledkov sme analyzovali na ich vzťah k patričným hodnotám uvedeným v literatúre. Z nasledujúceho výpočtu štatistických ukazovateľov vidieť, že rozdiel medzi hodnotami aktivity enzymatických preparátov,

Pre izolát zo zmrazeného mäsa		Pre zbierkový kmeň	Pre literatúru
SX =	244	118	79
SX ² =	11680	3210	2114
(SX) ² =	59536	13924	6313
s =	23	13	14
$t_1 = 2,27$		$t_2 = 0,746$	

ktoré sme získali z baktérií prežívajúcich zmrazovanie a údajmi z literatúry je vyjadrený štatistickým ukazovateľom $t_1 = 2,27$. Toto číslo leží pri počte stupňov voľnosti $N = 12$ pod konvenčnou hodnotou $P = 0,05$ a preto treba skúmaný rozdiel považovať za významný. Naproti tomu rozdielu hodnôt aktivity enzýmov zbierkového kmeňa a príslušných údajov z literatúry prislúcha $t_2 = 0,75$. Toto číslo však leží tabulárne vľavo od konvenčnej hranice P , čím sa rozdiel stáva nesignifikantným a zhoda dosť pravdepodobnou.

Aktivácia horčíkom mala kladný výsledok len pri leucylpeptidáze, ktorej účinnosť sa tým zvýšila až o 35 %. S prihliadnutím na technologický zámer práce treba aj tu poukázať na to, že v prostredí o pH 5 a nižšie sa už nezaznamenala proteolytická aktivita sledovaného enzymatického materiálu.

Pseudomonas fluorescens dával enzymatické preparáty, ktoré prevažne pomalšie hydrolyzovali peptidické substráty ako obdobne pripravený enzymatický materiál získaný z ostatných skúšaných baktérií. Do akej miery bol tento jav podmienený osobitnými vlastnosťami použitej kultúry sme v rámci tejto práce už nesledovali, lebo *Pseudomonas fluorescens* patrí medzi mikroorganizmy, ktorých enzymatické vlastnosti sme už aj predtým študovali na štandardných kmeňoch (2, 3). Rozdiely medzi výsledkami terajších a skorších pokusov boli bezvýznamné.

Filtráty obsahovali väčšie množstvo peptidáz ako preparáty pripravené z biomas. Takýto prípad sme v rámci našich pokusov viac nezaznamenali, ako to vidieť aj z tabulárneho prehľadu číselných výsledkov. Bunkové extrakty sa však vyznačovali silnou želatinolytickou schopnosťou. Pri pH-optime dosiahla absolútne najvyššiu proteínázovú hodnotu, t. j. 78 %. Aktivitná pH-krivka mala ostro vyznačené pH-optimum pri pH 8,2 pre peptidázy a pri pH 7 pre proteínázy. pH-optima boli stabilné, nemenili sa pri poklese aktivity preparátov, ku ktorému došlo menovite po dlhšom státi. Pod pH 6 nastal prudký pokles proteolytickej účinnosti

a pri pH 5 boli sledované enzýmy prakticky inaktívne. Prítomnosť horčíkových iónov vyvolala u niektorých substrátov aktivovanie, a to predovšetkým na LG a LGG, ktorých hydrolýza sa urýchlila až o 40 %. Z toho opäť vidieť, že Mg^{++} aktivuje predovšetkým leucylpeptidázy.

Clostridium carnis nebolo ešte v nám prístupnej literatúre po stránke enzymatickej podrobnejšie opísané. Jeho sledovanie bolo sťažené tým, že mal značne nestále proteázy. Tak napr. činila strata aktivity pri izbovej teplote za 6 hodín až 23 %. Tento pokles sa však dal účinkom redukčných činidiel akými sú cystein alebo askorbová kyselina vyrovnáť. Naproti tomu horčík nebol vstave proteázy reaktivovať ani aktivovať. Vzhľadom na to, že podobne reagovali aj enzymatické preparáty pripravené z materiálu ďalšieho anaeroba, je zrejme, že tu išlo o známy mechanizmus aktivácie prostredníctvom redoxpotenciálu média, ktorý limituje životné procesy anaerobných mikróbov (23). Optimum pre aktivitu peptidáz je u *Clostridium carnis* v pomerne širokom rozmedzí okolo pH 7 a tiež zloženie média, resp. vlastnosti substrátu spôsobujú väčšie výkyvy pH optima, ako sme to nachádzali pri proteázach aerobných baktérií. Želatinolytické proteínázy sme za daných metodických podmienok ani v bunkovom extrakte ani vo filtráte nezistili. Adsorbát filtrátu prejavoval hydrolytickú schopnosť na peptidických substrátoch, pritom filtrát starších kultúr, t. j. po 48 hodinovej kultivácii, dával aktívnejšie preparáty ako u 18 hodinových kultúr. Nasvedčovalo by to opäť tomu, že v sledovanom prípade nejde o sekréciu pravých ektoenzýmov, ale o proteázy rozpadnutých buniek starnúcej kultúry. K vyhodnoteniu pokusných výsledkov treba ešte povedať, že anaerobné peptidázy štiepili tripeptidické substráty podstatne rýchlejšie než dipeptidy, ako to výrazne ukazujú údaje v tabuľke. Pre bezprostredné účely práce bolo významné, že znížením pH prostredia pod 6 sa inhibovali proteolytické enzýmy aj tohto druhu mikróba.

Clostridium sporogenes sme po stránke enzymatickej študovali už vo všeobecnej časti našich pokusov (1, 2, 3, 4). Tu ho charakterizujeme ako enzymaticky veľmi sa ponášajúci na vyššie opísaný anaerobný druh. Líšil sa svojou želatinolytickou aktivitou a tiež tým, že neštiepil dipeptidy. Z hľadiska pH aktivitnej krivky sa nezistili významnejšie rozdiely. Patričné číselné výsledky sú opäť zapísané do tabuľky 1.

Nedefinovaná, t. j. neidentifikovaná celková mikroflóra mäsa sa získala z homogenátu vzoriek, odobratých v súlade s požiadavkami reprezentatívnosti (24). Poskytovala peptidolytickú a želatinolytickú účinné preparáty, na ktoré zníženie pH prostredia pod 5 pôsobilo inhibične obdobným spôsobom ako na enzýmy izolovaných kultúr baktérií.

Celkove výsledky pokusov na zostavenie aktivitných pH-kriviek baktérií mrazeného mäsa sa dajú zhrnúť v tom, že proteínázová katalýza sa okyslením prostredia dá zastaviť. Treba hľadať možnosť na využitie tohto poznatku v mraziarenskej technológii.

Technologická úprava

Pri navrhovaní technologického opatrenia, ktoré vytvára pre mrazené potraviny prostredie s inhibičným účinkom na proteázy, sme vychádzali z dávnejšie už známej mraziarenskej technológie glazurovania. Táto metóda sa počíta medzi tzv. doplňujúce konzervárenské postupy, lebo akosi doplňuje konzervárenský účinok zmrazovania (25). Spočíva v tom, že sa na potraviny, menovite na mäso

necháva namrznúť ochranná ľadová vrstva. Jej hlavná funkcia záleží v zamedzení váhových strát a zhoršenia akosti vysušovaním. Okrem toho glazurovanie znižuje škodlivé následky tepelných výkyvov v mraziarenských skladoch a zlepšuje hygienu nebalene skladovaných potravín. V našich mraziarňach sa však táto technológia doposiaľ nezaviedla len preto, že si vyžaduje o niečo viac práce, zvýši sa váha manipulovaného tovaru a tiež spotreba energie na výrobu chladu pri zmrazovaní sa teoreticky zvyšuje. Hovoríme teoreticky z toho dôvodu, že za obvyklých prevádzkových pomerov pri zmrazovaní je veľké rozpätie medzi množstvom vyrobeného a spotrebovaného chladu. O vzťahu zvýšených nákladov k úspo-



Obraz 5. (fotografia) Blok deleného mäsa zmrazovaný v kovovej forme podľa metódy Duchoňa. Pri našej modifikácii sa mäso pred zmrazovaním navlhčí okyselenou vodou, čím získa ochrannú vrstvu námrazy s inhibičnou účinnosťou na proteolytické enzýmy.

rám dosiahnuteľným dlhšou skladovateľnosťou a zlepšenou akosťou, resp. nižšími váhovými stratami počas skladovania, nemáme ekonomický rozbor po ruke. Vieme však, že v zahraničí, tak napr. vo Švajčiarsku je glazurovanie zavedené.

Glazurovanie sme opísali preto, že nami navrhnutá technologická úprava je v podstate to isté len s tou obmenou, že miesto čistej vody použijeme ju s prísadou malého množstva kyseliny (mliečnej, octovej, príp. inej), ktorou sa pH sníži na 4,5 až 5. Pri našich pokusoch sme k bratislavskej vodovodnej vode, ktorá má sama osebe mierne kyslú reakciu, pridávali kyselinu mliečnu po koncentrácii 0,03 %, čím sme dosiahli požadovaný účinok. Takto sme glazurovali nielen mäso v polovičkách, ale aj mäso delené a porcované. Pritom sme použili metódu vypracovanú Duchoňom (22). Podľa nej sa delené alebo porcované mäso, balené do celofánu alebo podobne, zmrazuje v kovových formách (ako to ukazuje fotografia na obraze 5). Tento postup zmrazovania sme si upravili tak, že sme do foriem

dávali mäso namáčané alebo postriekané okyselenou vodou. Týmto sa veľké ekonomické výhody Duchoňovej metódy spojili s výhodami glazurovania a inhibičného účinku kyslého prostredia.

„Kyslá glazúra“ je po stránke technologickej podrobnejšie opísaná v patentovej prihláške č. 3696-63.

Diskusia

Metodicky nevyriešená zostáva otázka, ako medzi sebou porovnávať pokusné výsledky stanovovania ukazovateľov enzymatickej aktivity mikroorganizmov, ktorým neboli špecifickým spôsobom vytvorené optimálne podmienky kultivácie. Cesta, ktorú sme zvolili, pochádza od autorov už v úvode citovaných. Pri známej závislosti enzymatickej aktivity od fyziologického stavu a rastovej fázy kultúry je však možné proti našim výsledkom a ich rozdielom voči literatúre vzniesť námietky. Štúdium kinetiky a aktivácie proteáz tvoria iba súčasť komplexnej práce, ktorou sa skúmali zmeny enzymatickej schopnosti mikroorganizmov pod vplyvom zmrazovania. Tieto zmeny sa vďaka mnohostrannému prístupu k problematike podarilo aj do značnej miery rozpoznať (1, 2, 3, 4, 6, 7). Teraz nám išlo najmä o využitie teoretických poznatkov pre praktické účely. Navrhnutá technologická úprava by strácala svoju účinnosť, keby sa bola zistila činnosť acidofilných proteáz, o ktorých sa zmieňuje literatúra (20). Naše výsledky nasvedčujú tomu, že proteázy sledovaných baktérií majú optimá okolo neutrálnej reakcie. Svojimi vlastnosťami sa zaraďujú medzi trypsin a papainázy. Popri vplyvoch prostredia bude aj interferencia medzi peptidázovou a proteinázovou aktivitou jednou z príčin rozdielov vo výsledkoch v rámci pokusov a medzi autormi. Uvádzame to ako svedectvo toho, že sme si boli vedomí zdrojov chýb a preto sme sa zamerali na sledovanie limitujúceho činiteľa enzymatickej aktivity s minimálnou závislosťou od biologických podmienok.

Súhrn

Študovala sa aktivita bakteriálnych endo- a ektopeptáz, menovite ich kinetika, substrátová špecifita, aktivovateľnosť horčíkom a stanovili sa aktivné pH-krivky. Popri diferencujúcich znakoch sa zisťovali najmä spoločné vlastnosti sledovaných enzýmov, akým je inhibičný účinok zníženej aktuálnej acidity prostredia. Na tomto základe sa vypracovala nová technologická úprava pre mraziarenskú konzerváciu potravín, predovšetkým mäsa. Záleží na tom, že sa namrazuje tenká vrstva ľadu o pH 4,5 až 5. Táto „kyslá glazúra“ zvyšuje hygienickú stránku a skladovateľnosť tým, že zabraňuje enzymatickej hydrolýze, ktorá sa nezastavuje ani pri mraziarenských teplotách. Nová technológia je teoreticky zdôvodnená pokusnými výsledkami, ktoré nasvedčujú dominancii neutro- až bazofilných proteáz u kontaminujúcej mikroflóry mrazeného mäsa.

Literatúra

1. Arpai J., Sledovanie aktivity preteolytických enzýmov u mikroorganizmov izolovaných z mrazeného mäsa (I). Mimobunkové a vnútrobunkové dipeptidázy. Kinetika pri 40, 30, 20 °C. Chem. zvesti 14, 148 (1960).
2. Arpai J., Lifková Z., Sledovanie aktivity proteolytických enzýmov u mikroorganizmov izolovaných z mrazeného mäsa (II). Manometrické stanovenie aktivity Q_{10} peptidáz na diglycinovom a triglycinovom substráte. Chem. zvesti 15, 218 (1961).

3. Arpai J., Behúň M., Lifková Z., Sledovanie aktivity proteolytických enzýmov u mikroorganizmov izolovaných z mrazeného mäsa (III). Chromatografické štúdium vplyvu zmrazovania na peptidázy. Chem. zvesti 15, 360 (1961).
4. Arpai J., Kälteeinfluss und Peptidase- Aktivität von Bakterien. Experientia 17, 170 (1961).
5. Arpai J., Vplyv zmrazovacej teploty na kvótu odumierania a fyziologického poškodenia mikroorganizmov. Biológia 16, 31 (1961).
6. Arpai J., Selective effect of freezing as reflected in growth curves. Fol. Microb. 8, 18 (1963).
7. Mazur P., Physical factors implicated in the death of microorganisms at subzero temperatures. Annals New-York Acad. of Sciences pp 610—629 (1960).
8. Arpai J., Nonlethal freezing injury to metabolism and motility of *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli*. Applied Microbiology 10, 927 (1962).
9. Noskova G., Pek G., Mojsejeva E., Vlijanije nizkich temperatur na razmnoženije i biochemičeskuju aktivnost bakterij *Achromobacter* sp. Cholodil'naja tehnika 5, 44 (1958).
10. Berger J., Johnson J. M., Peterson W. H., The proteolytic enzymes of bacteria (II). J. Bacteriol. 36, 521 (1938).
11. Bensusan H. B., Deron M. A., Walker B. S., The proteolytic enzymes of *Proteus vulgaris*. Arch. Biochem. Biophys. 49, 293 (1954).
12. Kaplan J. G., The alteration of intracellular enzymes. J. Gen. Physiol. 36, 703 (1954).
13. Rotman B., Regulation of enzymatic activity in the intact cell. J. Bacteriol. 76, 1 (1958).
14. Grutter F. H., Zimmerman L. N., A proteolytic enzyme of *Streptococcus zymogenes*. J. Bacteriol. 69, 728 (1955).
15. Chaloupka J., Proteolytické enzymy aktinomycety *Streptomyces griseus* (II). Vliv povahy a koncentrace dusiku na sekreci proteasy. Čs. mikrobiol. 1, 32 (1956).
16. Chaloupka J., Proteolytické enzymy aktinomycety *Streptomyces griseus* (III). Krátkodobá produkce enzymů. Čs. mikrobiol. 1, 241 (1956).
17. Chaloupka J., Proteolytické enzymy aktinomycety *Streptomyces griseus* (IV). Vliv iontů na tvorbu enzymů. Čs. mikrobiol. 2, 23 (1957).
18. Weber E., Grundriss der biologischen Statistik (3. vyd.) Fischer Verlag, Jena 1957.
19. Arpai J., Identifikačné práce na vyše dvesto mikróbných kultúrach izolovaných z mrazeného mäsa. Veterin. časop. 9, 186 (1960).
20. Gorbach G., Pirsch E., Über die Sekretion und die pH- Abhängigkeit der Bakterien proteasen. Enzymológia 1, 191 (1936).
21. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (7. vyd.) Edit. Williams — Wilkins Co., Baltimore 1957.
22. Duchoň T., Stanovenie optimálnych podmienok pre výrobu a spracovanie výsekového a výrobného mrazeného mäsa. Záverečná zpráva výskumnej úlohy 20.06 VÚM, Bratislava 1962.
23. Arpai J., Behúň M., O vzájomnom pôsobení medzi kyselinou askorbovou a aerobnou mikroflórou. Biológia 14, 680 (1959).
24. Hampl B., Mikrobiologické zkoumání potravin. SNTL, Praha 1956.
25. Plank R., Handbuch der Kältetechnik. Springer Verlag, Berlin 1960.