

Pektolytické enzýmy a metódy stanovenia ich aktivity

KATARÍNA JURÍKOVÁ

Súhrn. Práca sa zamerala na štandardizáciu metód stanovenia aktivity pektolytických enzýmov a na charakterizáciu pektínov ako substrátov pektináz. Na stanovenie aktivity pektolytických enzýmových prípravkov, pre ktoré nie sú vypracované metódy Komisie expertov FAO/WHO (JECFA), navrhuje sa používať viskozimetrickú metódu, aktivitu polygalakturonázy stanovovať spektrofotometricky metódou redukujúcich sacharidov a aktivitu pektínesterázy metódou titrácie uvoľňovaných karboxylových skupín.

Technické preparáty pektolytických enzýmov používané v potravinárskom priemysle pri spracovaní ovocných štiav sú zložené zmesi enzýmov rôznej špecifity. Obvykle obsahujú polygalakturonázy (EC 3.2.1.15, EC 3.2.1.67), pektínlyázy (EC 4.2.2.2) a pektínesterázy (EC 3.1.1.11) v rôznom pomere [1]. Priemyselne sa pripravujú z plesní (*Aspergillus niger*) [2], ale ich producentmi môžu byť aj niektoré baktérie (*Clostridium*, *Erwinia*, *Bacillus*) [3-6] alebo môžu byť rastlinného pôvodu (pektínesterázy) [7]. Z ľudského intestinálneho traktu sa izolovali dva druhy baktérií, *Bacteroides pectinophilus* a *B. galacturonicus*, ktoré produkovali extracelulárnu pektínesterázu (EC 3.1.1.11) a exopektátlyázu [8].

Endopolygalakturonáza v kombinácii s pektínesterázou redukuje viskozitu ovocných štiav, exopolygalakturonáza degraduje molekuly kyseliny polygalakturónovej na kyselinu oligogalakturónovú alebo monogalakturónovú [9].

Substrátom používaným na stanovenie aktivity pektolytických enzýmov sú pektíny, resp. kyselina pektínová alebo pektan sodný. Pektín je polymér, obsahujúci jednotky kyseliny D-galakturónovej, ktoré sú viazané α -1,4-glykozidickými väzbami, a jej sodné, draselné, vápenaté, príp. amónne soli. Obsahujú aj neutrálne cukry, ako L-arabinózu, D-galaktózu a L-ramnózu. Určitá

RNDr. Katarína Juríková, Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

časť voľných karboxylových skupín kyseliny galakturónovej je esterifikovaná metanolom. Táto časť sa označuje ako stupeň esterifikácie pektínu a vyjadruje sa ako percento z celkového obsahu kyseliny galakturónovej [10].

Pektíny sa nachádzajú v rastlinných tkanivách, ktoré vyplňajú medzibunkové priestory, tzv. stredné lamely. Sú to rozpustné, koloidné materiály, so značnou kapacitou absorpcie vody. Tvoria sa počas zrenia ovocia z nerozpustného prekursora, tzv. protopektínu, ktorý je určitým spôsobom viazaný na celulóзовé komponenty bunkovej steny [11]. Protopektín sa považuje za nerozpustný precursor vo vode rozpustného pektínu a nachádza sa v bunkových stenách [12].

Pektíny sa získavajú vodnou extrakciou vhodných rastlinných materiálov, zvyčajne citrusových plodov alebo jabĺk. V poslednom čase sa podarilo získať a charakterizovať pektín aj z kiwi [13]. Z vlastností charakterizujúcich pektíny ako substráty pektináz sú dôležité najmä stupeň polymerizácie, obsah voľných karboxylových skupín, esterifikovaných skupín, čistého pektínu a vlhkosti [14]. Iní autori charakterizujú pektíny vzhľadom na obsah kyseliny galakturónovej a stupeň esterifikácie [15, 16], ktorý je dôležitý pri posúdení aktivity endopolygalakturonázy a pektínesterázy.

Na vyjadrenie aktivity pektolytických enzýmov sa používajú jednotky, získané rôznymi metódami a podmienkami stanovenia ich aktivity. Výber metódy stanovenia ich aktivity závisí od skupiny enzýmov, ktoré treba charakterizovať.

S praktickým používaním pektolytických enzýmov v potravinárstve pri čírení ovocných štiav súvisí vyjadrovanie tzv. pektinolytickej aktivity, t.j. celkovej schopnosti pektináz degradovať pektín. Metóda stanovenia je viskozimetrická. Niektorí autori sledujú pokles viskozity pektínového roztoku vplyvom enzýmu za použitia Oswaldovho kapilárneho viskozimetra [14, 17-19], iní sledujú pokles viskozity jablčnej šťavy definovaných vlastností pomocou Höpplerovho viskozimetra [20, 21]. Aktivita polygalakturonázy (EC 3.2.1.15) degradujúcej molekuly kyseliny polygalakturónovej sa stanovuje spektrofotometrickým sledovaním vzrastu redukujúcich sacharidov pri použití kyseliny dinitrosalicylovej [18, 22-24] alebo Nelson-Somogyiho činidla [19, 25, 26]. Pektínesteráza (EC 3.1.1.11) katalyzuje deesterifikáciu pektínu, pričom sa jej aktivita stanovuje titračnou analýzou uvoľnených karboxylových skupín alebo metanolu [27]. Enzymová aktivita sa zvyčajne vyjadruje v ekvivalentoch esteru uvoľneného za časovú jednotku [28, 29]. Iní jednotku pektínesterázy definujú ako množstvo enzýmu, ktoré uvoľňuje jeden μmol titrovateľných karboxylových skupín za časovú jednotku za definovaných podmienok [30].

Ďalší spôsob vyjadrenia aktivity pektolytických enzýmov, s ktorým sa môžeme stretnúť pri prípravkoch zo zahraničia, je v jednotkách AJDU (apple

juice depectinizing units). Tieto jednotky sa stanovujú koreláciou času depektinizácie jablčnej šťavy definovaných vlastností neznámou pektinázou s depektinizačným časom štandardnej pektinázy známej aktivity – štandardom F [30, 31].

Na detekciu tvorby pektolytických enzýmov sa vyvinula i metóda používajúca Petriho misky s agarom obsahujúcim pektín, založená na schopnosti voľných karboxylových skupín pektínu viazať farbivo. Táto metóda sa po určitom dopracovaní môže stať i kvantitatívnou, pretože je dostatočne citlivá: detekčný limit pre polygalakturonázu je 3,5 U, pre pektínmetylesterázu 2.10^{-3} U a pre pektínlyázu 3.10^{-3} U [32].

Vzhľadom na to, že FAO, resp. WHO nemá zatiaľ odporúčania pre špecifikáciu pektolytických enzýmov, cieľom práce bol výber, optimalizácia a overenie metód vhodných na stanovenie katalytickej aktivity pektináz i na charakterizáciu pektínov ako ich substrátov.

Materiál a metódy

Enzýmové prípravky. V práci sa použili tieto enzýmové prípravky (ich pôvod je uvedený v zátvorke): Leozým (ČSSR), Phylazyme-10 (MLR), Pektolas (Holandsko), Pektináza (BLR).

Substrát. Ako substrát pektolytických enzýmov sa používali pektíny rastlinného pôvodu koncentrácie 5 g.l^{-1} jablčnej šťavy, pochádzajúce od rôznych výrobcov: jablčné pektíny – bulharský, východočeský, typ LM/400 Uniceptina Bergamo, typ NS-2, typ NL-68, typ NB (NSR); citrusový pektín typ A – genu pectin (Dánsko), resp. kyselinu pektínovú pripravenú v laboratóriu (5 g.l^{-1} jablčnej šťavy).

Charakterizácia substrátu. Stanovenie obsahu voľných karboxylových skupín, čistého pektínu a vlhkosti sušením pri 70°C 16 hodín sa robilo podľa Návrhu RVHP z r. 1987 [14]. Stanovenie obsahu kyseliny galakturónovej a stupňa esterifikácie, ako aj straty vlhkosti sušením pri 150°C 2,5 h sa robilo podľa Návrhu PN 6/86 [15], ktorá metodicky vychádza z postupov odporúčaných Komisiou expertov pre potravinárske aditíva pri FAO/WHO [16].

Aktivita pektolytických enzýmov. Na stanovenie aktivity polygalakturonázy (EC 3.2.1.15, EC 3.2.1.67) viskozimetricky sa použila metóda založená na meraní zmeny viskozity pektínového roztoku v jablčnej šťave pôsobením pektolytických enzýmov meraním času pádu guľôčky medzi dvoma značkami na Höpplerovom viskozimetri. Aktivita sa vyjadrila v stupňoch pektolytickej mohutnosti ($^\circ\text{PM}$) [20, 21].

Pri spektrofotometrickom meraní aktivity polygalakturonázy (EC 3.2.1.15) založenom na meraní vzrastu redukujúcich sacharidov pri použití Nelson-Somogyiho činidla sa použila ako substrát kyselina pektínová (5 g.l^{-1}). Aktivita polygalakturonázy sa vyjadrila v nkataloch [24, 32-35].

Aktivita pektínesterázy (EC 3.1.1.11) pri 30°C sa stanovovala titráciou uvoľňovaných karboxylových skupín do neutrálneho pH, pričom za jednotku pektínesterázovej aktivity sa považuje také množstvo esterických skupín, ktoré je hydrolyzované 1 g enzýmového prípravku za 1 min pri 30°C [14].

Princípom stanovenia aktivity enzýmov v AJDU jednotkách je porovnanie času potrebného na depektinizáciu jablčnej šťavy obsahujúcej pektín (5 g.l^{-1}) pri pH 3,5 a 45°C neznámym prípravkom k času depektinizácie štandardom F, ktorý v 1 ml obsahuje 15 AJDU. Konečný bod depektinizácie sa stanovil pomocou 90 % izopropylalkoholu [36].

Bielkoviny sa stanovili postupom podľa Lowryho a kol. [37].

Podrobný opis všetkých použitých metód sa nachádza v správe pre priebežnú oponentúru výskumnej úlohy štátneho plánu RVT P11-529-810/04.01 [38].

Výsledky a diskusia

Charakterizácia substrátu

Pri stanovovaní aktivity pektolytických enzýmov treba použiť substrát definovaných a známych vlastností, ktoré by mohli ovplyvniť výsledky stanovení.

Charakterizácia pektínov ako substrátov pektináz je založená na zisťovaní obsahu voľných karboxylových skupín, esterifikovaných skupín a čistého pektínu. Pektíny musia spĺňať aj kritérium obsahu vlhkosti, ktorá nemá presahovať 8 % [14].

Podľa odporúčaní Komisie expertov pre potravinárske aditíva (JECFA) sa pektíny charakterizujú o.i. vzhľadom na obsah kyseliny galakturónovej, stupeň esterifikácie a stratu vlhkosti sušením, ktorá pri 105°C za 2,5 h nemá prekročiť 12 % [16].

Obsah kyseliny galakturónovej v pektínoch použitých v tejto práci sa pohyboval od 72,3 do 79,2 % pektínu, stupeň esterifikácie bol od 59,9 do 79,2 %, strata vlhkosti sušením sa pohybovala od 9,2 do 12,46 % (tab. 1), čo je v súlade s kritériom, ktoré vyžaduje limit FAO/WHO [16]. Dva typy pektínov, a to jablčný bulharský a jablčný východočeský, sa charakterizovali aj postupmi podľa Návrhu RVHP normy na stanovenie aktivity pektolytických enzýmov

Tabuľka 1. Charakterizácia pektínov stanovená podľa
Návrhu PN 6/86 a podľa FAO, FNP [7]
Table 1. Pectine characterization determined according to
the Recommendation PN 6/86 and the FAO, FNP [7]

Pektín ¹	Obsah kyseliny galakturónovej ² [%]	Stupeň esterifikácie ³ [%]	Strata vlhkosti sušením ⁴ [%]
jablčný, bulharský ⁵	77,1	79,2	10,735
jablčný, východočeský ⁶	72,34	78,42	9,21
citrusový, dánsky ⁷	74,82	71,8	9,8
jablčný LM 400 ⁸			
Unipectina, Bergamo	78,4	59,9	9,955
jablčný, NS-2, NSR ⁹	79,22	71,38	12,46

¹Pectine; ²Galacturonic acid content; ³Degree of esterification; ⁴Loss of humidity by drying;
⁵Apple, Bulgarian; ⁶Apple, East-Bohemian; ⁷Citrus, Danish; ⁸Apple LM 400; ⁹Apple NS-2,
FRG.

[14]. Obsah voľných karboxylových skupín bol pri oboch pektínoch 4,2 %, obsah esterifikovaných karboxylových skupín bol pri bulharskom pektíne vyšší – 9,27 % ako pri východočeskom – 7,74 %, obsah čistého pektínu bol pri bulharskom 55,66 %, pri východočeskom 49 %. Obsah vlhkosti oboch pektínov prekročil limit povolený v Návrhu normy z 8 na 14 %, pričom ani po predĺženom čase sušenia na 32 hodín sa táto hodnota nezmenila (tab. 2).

Tabuľka 2. Charakterizácia pektínu stanovená podľa Návrhu RVHP normy [14]
Table 2. Pectine characterization determined according to the Recommendation of
COMECON standard [14]

Pektín ¹	Obsah voľných COOH skupín ² [%]	Obsah esterifikovaných COOH skupín ² [%]	Obsah čistého pektínu ⁴ [%]	Obsah vlhkosti ⁵ [%]	
				Sušenie 16. hod. ⁶	Sušenie 32 hod. ⁷
jablčný, bulharský ⁸	4,2	9,27	55,66	14,39	14,38
jablčný východočeský ⁹	4,2	7,74	49,0	14,03	14,04

¹Pectine; ²Content of free COOH groups; ³Content of esterified COOH groups; ⁴Content of pure
pectine; ⁵Humidity content; ⁶Drying of 16 h; ⁷Drying of 32 h; ⁸Apple, Bulgarian; ⁹Apple, East-
Bohemian.

Aktivita pektolytických enzýmů

Meranie aktivity viskozimetricky. Vzhľadom na to, že Návrh ON na česko-sloveský enzýmový prípravok Leozým [12], vychádzajúci z práce prof. Kyzlinka [11], predpisuje stanovenie aktivity na základe znižovania viskozity jablčnej šťavy po 6-hodinovej pektolýze pri 20 °C, v prvej časti našich experimentálnych prác sme sa zamerali na posúdenie vhodnosti uvedenej metódy na stanovovanie aktivity pektolytických enzýmů. Mierou aktivity enzýmu je štandardná pektolytická mohutnosť preparátu, ktorá sa vyjadruje v stupňoch pektolytickej mohutnosti (°PM). °PM udáva počet litrov pektínovej šťavy, ktorých viskozita zníži 1 kg pektolytického preparátu po 6 hodinách pôsobenia za štandardných podmienok práce o 85 % maximálnej možnosti [11, 12]. Touto metódou sme stanovili pektolytickú aktivitu enzýmového prípravku Leozým, a to použitím viacerých pektínů domácych i zahraničných výrobců. Aktivita Leozýmu v závislosti od použitého substrátu sa pohybovala od 24697 do 42572 °PM (tab. 3).

Priebeh pektolýzy po 6-hodinovej hydrolýze znázorňuje obrázok 1. V ďalších experimentoch sa z dôvodů dostupnosti a vhodných vlastností používal bulharský pektín, s ktorým aktivita Leozýmu stanovená pri 20 °C bola 30303 °PM.

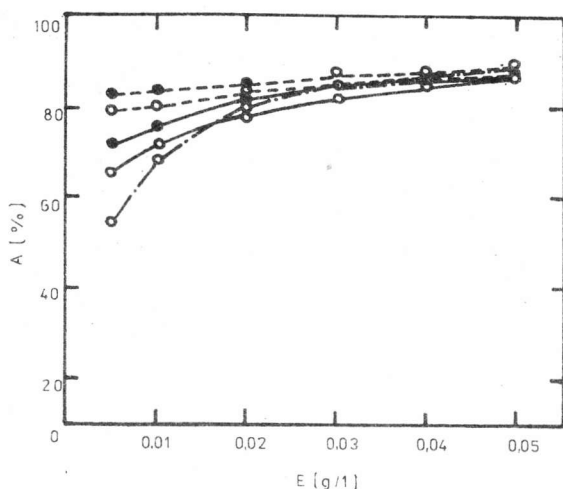
Pri definovaní podmienok stanovenia aktivity enzýmů v sústave SI sa odporúča teplota 30 °C. Preto aktivita Leozýmu a dvoch ďalších pektolytických enzýmů sa stanovila i pri teplote 30 °C (tab. 4). Zvýšením teploty o 10 °C sa aktivita enzýmových prípravků zvýšila 1,1 až 1,7-krát. Najvyšší rozdiel aktivít medzi 20 a 30 °C sa pozoroval pri najmenej aktívnom Phylazyme-10.

Tabuľka 3. Aktivita Leozýmu stanovená viskozimetricky pri 20 °C podľa Návrhu ON [12] v závislosti od pôvodu použitého pektínu

Table 3. Leozym activity viscosimetric determined at 20 °C according to the Recommendation ON [12] in dependence on the origin of the pectine

Pektín ¹	Aktivita Leozýmu ² [°PM]
jablčný, bulharský ³	30 303.03
jablčný, východočeský ⁴	24 696.9
citrusový, dánsky ⁵	31 526.7
jablčný LM 400 ⁶	
Unipectina, Bergamo	34 482.76
jablčný NS-2, NSR ⁷	42 572

¹Pectine; ²Leozym activity; ³Apple, Bulgarian; ⁴Apple, East-Bohemian; ⁵Citrus, Danish; ⁶Apple LM 400; ⁷Apple NS-2, FRG.



Obr. 1. Porovnanie priebehu pektolýzy pôsobením Leozýmu na pektín rôznych výrobcov. A – stupeň odbúrania pektínu po 6-hodinovej pektolýze pri 20 °C, E – koncentrácia Leozýmu.

● — ● bulharský pektín, o — o východočeský pektín, o — — o dánsky citrusový pektín, ● — · — ● západonemecký pektín LM 400, ● — — — ● západonemecký pektín NS-2.

Fig. 1. Comparison of the pectolysis under the effect of Leozym on pectine of different provenience. A – pectine degradation after 6-hour's pectolysis at 20 °C, E – Leozym concentration.

● — ● Bulgarian pectine, o — o East-Bohemian pectine, o — — o Danish citrus pectine, ● — · — ● West German pectine LM 400, ● — — — ● West German pectine NS-2.

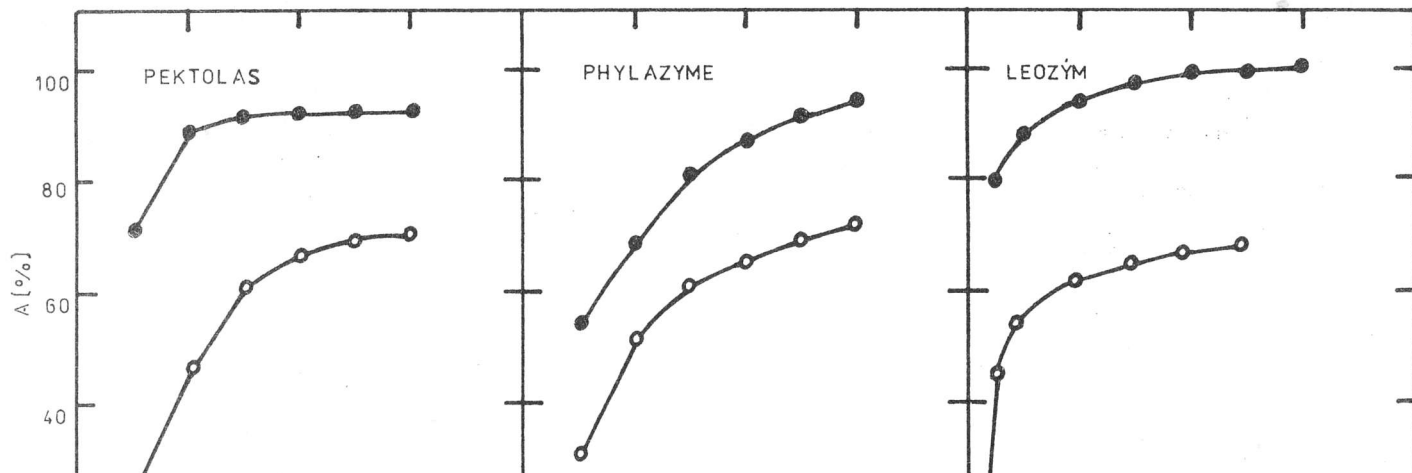
Tabuľka 4. Vplyv teploty na aktivitu pektolytických enzýmových prípravkov stanovenú viskozimetricky po 6-hodinovej pektolýze

Table 4. The influence of temperature on the activity of pectolytic enzyme preparations determined viscosimetrically after 6-hour's pectolysis

Enzýmový prípravok ¹	Aktivita ² [°PM]	
	20 °C	30 °C
Leozým 6	30 303	43 478
Phylazyme-10	1 852	3 333
Pektolas	52 027	58 820

¹Enzyme preparation; ²Activity.

Pri enzýmových prípravkoch Leozým, Phylazyme-10 a Pektolas sa porovnávala ich aktivita po uplynutí 6-hodinovej a 1-hodinovej hydrolýzy pektínu pri 30 °C. Priebeh pektolýzy sledovaný viskozimetricky znázorňuje obrázok 2 a vypočítané údaje o aktivite enzýmových prípravkov uvádza tabuľka 5. Z uvedených výsledkov vyplýva, že rýchlosť odbúrania pektínu je lineárne zá-



Tabuľka 5. Porovnanie aktivity enzýmov po 1-hodinovej pektolýze pri stupni odbúrania pektínu 30 % (A) a po 6-hodinovej pektolýze pri stupni odbúrania pektínu 85 % (B)

Table 5. Comparison of the activity of enzymes after 1-hour's pectolysis at 30% pectine degradation (A) and after 6-hour's pectolysis at 85% pectine degradation (B).

Enzymový prípravok	Aktivita ² [°PM]	
	A	B
Leozým	28 571	43 478
Phylazyme-10	10 000	3 333
Pektolas	77 000	58 823

¹Enzyme preparation; ²Activity.

vislá od koncentrácie enzýmu iba v určitom intervale koncentrácií enzýmových prípravkov a dá sa exaktnejšie porovnať pri kratších časoch pektolýzy. Na posúdenie aktivity pektolytických enzýmov sú teda vhodnejšie podmienky 1-hodinovej pektolýzy a stupeň odbúrania pektínu 30 % ako 6-hodinová pektolýza a stupeň odbúrania 85 %.

Na stanovenie aktivity pektolytických enzýmov sa podľa Návrhu RVHP normy [14] používa substrát zbavený niektorých sprievodných sacharidových zložiek a vápenatých solí. Porovnal sa preto priebeh pektolýzy a aktivita enzýmových prípravkov Pektolas, Phylazyme-10, Pektináza pri použití vyčisteného a nevyčisteného pektínu. Zistilo sa, že v prípade pektínov použitých v tejto práci nemá proces ich čistenia signifikantný vplyv na pektolytickú aktivitu sledovaných enzýmových prípravkov (tab. 6, obr. 3).

Stanovenie aktivity polygalakturonázy a pektínesterázy. Pri troch pektolytických enzýmových prípravkoch, Leozým, Pektolas a Phylazyme-10, sa stanovila aktivita polygalakturonázy (EC 3.2.1.15) metódou merania vzrastu redukujúcich sacharidov vzniknutých po hydrolýze kyseliny pektínovej pri

Tabuľka 6. Porovnanie aktivity pektolytických enzýmov s vyčisteným a nevyčisteným substrátom.

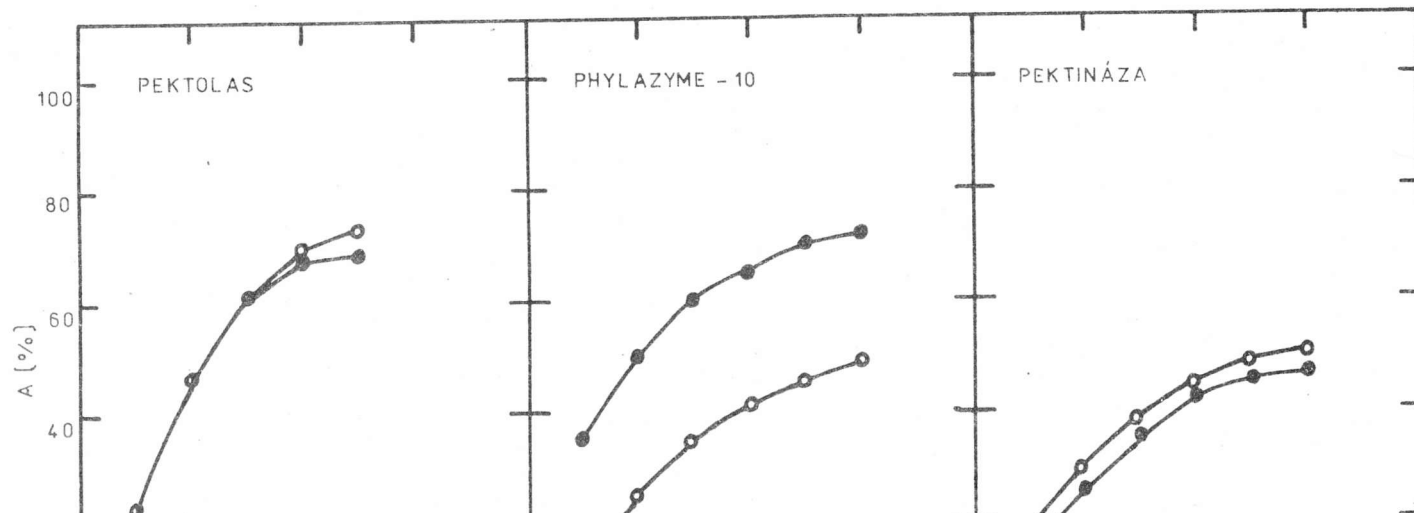
Aktivita sa stanovila viskozimetricky pri 30 °C po 1-hodinovej pektolýze

Table 6. Comparison of the activity of pectolytic enzymes with purified and unpurified substrates.

The activity was determined viscosimetrically at 30°C after 1-hour's pectolys

Enzymový prípravok ¹	Aktivita ² [°PM]	
	Nevyčistený pektín ³	Vyčistený pektín ⁴
Pektolas	76 923	76 923
Phylazyme-10	12 500	3 703
Pektináza	43 478	50 000

¹Enzyme preparation; ²Activity; ³Unpurified pectine; ⁴Purified pectine. ⁵Pectinase



30 °C. Aktivita enzýmových prípravkov stanovená touto metódou sa vyjadřila v nkat.g⁻¹. Z enzýmových prípravkov najvyššiu špecifickú aktivitu polygalakturonázy mal Phylazyme-10. Pektínesteráza (EC 3.1.1.11) katalyzuje deesterifikáciu pektínu. Enzým je špecifický pre štruktúru D-galakturónanu. Prítomnosť pektínesterázy sa stanovila v dvoch enzýmových prípravkoch, najvyššia bola pri Leozýme.

Na základe získaných poznatkov v kontexte so štandardizáciou a výberom stanovenia aktivity enzýmových prípravkov navrhujeme stanovovať aktivitu pektolytických enzýmov viskozimetricky po uplynutí 1-hodinovej pektolýzy pri 30 °C a výpočet vzťahovať na 30 % odbúrania pektínu (A) v pektínovom roztoku, resp. spektrofotometricky meraním vzrastu redukujúcich sacharidov a vyjadrením aktivity v kataloch. Aktivitu pektínesterázy navrhujeme stanovovať titráciou uvoľňovaných karboxylových skupín [38].

Tabuľka 7. Aktivita polygalakturonázy a pektínesterázy v pektolytických enzýmových prípravkoch

Table 7. Activity of polygalacturonase and pectinesterase in pectolytic enzyme preparations

Enzýmový prípravok ¹	Aktivita ²	
	polygalakturonázy ³ [nkat.mg ⁻¹]	pektínesterázy ⁴ [AJDU.g ⁻¹]
Leozým	0.6	3.04
Phylazyme-10	5.33	1.25
Pektolas	6.83	–

¹Enzyme preparation; ²Activity; ³Polygalacturonase; ⁴Pectinesterase.

Tabuľka 8. Porovnanie aktivity pektolytických enzýmových prípravkov stanovenej sledovaním času depektinizácie viskozimetricky pri 45 °C

Table 8. Comparison of the activity of pectolytic enzyme preparations determined by measuring the depectination time viscosimetrically at 45°C

Enzýmový prípravok ¹	Aktivita ²	
	AJDU.g ⁻¹	°PM
Leozým	1700	317 057
Phylazyme-10	93	6 250
Pektolas	3923	200 000
Pektináza ³	3400	80 000

¹Enzyme preparation; ²Activity; ³Pectinase.

Stanovenie aktivity v jednotkách depektinizácie jablčnej šťavy (AJDU). Pri niektorých enzýmových prípravkoch pochádzajúcich od zahraničných výrobcov [21] sa môžeme stretnúť s vyjadrením aktivity v jednotkách AJDU (apple juice depectinizing units), ktoré sa stanovujú po uplynutí 120 až 180-minútovej pektolýzy pri 45 °C. Aktivita pektináz vyjadrená v AJDU.g⁻¹ sa stanovila pri prípravkoch Leozým, Phylazyme-10, Pektolas a Pektináza. Najvyššiu aktivitu mal Pektolas a najnižšiu Phylazyme-10 (tab. 7). Aktivita uvedených enzýmov pri 45 °C sa stanovila aj viskozimetrickou metódou po 1-hodinovej pektolýze pri stupni odbúrania pektínu 30 %. Koreláciu medzi jednotkami aktivity v AJDU.g⁻¹ a °PM sme nezistili (tab. 8).

Do redakcie došlo 2. 5. 1989

Literatúra

1. REXOVÁ-BENKOVÁ, L.: Pektolytické enzýmy – mechanizmus účinku a imobilizácia. (Výskumná správa.) Bratislava, CHÚ SAV 1981–1985.
2. WISEMAN, A.: Příručka enzymové technologie, Praha, SNTL 1980.
3. ROBERTS, D. P. – BERMAN, P. M. – ALLEN, C. – STROMBERG, V. K. – LAGY, G. H. – MOUNT, M. S., ROBERT-BAUDOVY, J., J. Bacteriol., 167, 1986, s. 279.
4. REVERCHON, S. – ROBERT-BAUDOVY, J., J. Bacteriol., 169, 1987, s. 2417.
5. TANABE, H. – KOBAYASHI, Y. – FUSHIMI, Y. – KANASAKI, H. – TADA, S., Agric. Biol. Chem., 51, 1987, s. 589.
6. JAU NEAU, A. – MORVAN, C. – DEMARTY, M. – DEVAUCHELLE, G., C. R., Acad. Sci. Paris, 302, 1986, č. 17.
7. MARKOVIČ, O. – JÖRNVALL, H., Eur. J. Biochem., 158, 1986, s. 455.
8. JENSEN, N. S. – CANALE-PAROLA, E., Appl. Environ. Microbiol., 52, 1986, s. 880.
9. OMRAN, H. – GIERSCHEK, K., Lebensm.-Wiss.-Technol., 19, 1986, s. 42.
10. KLAVONS, J. A. – BENNETT, T. D., J. Agric. Food Chem., 35, 1987, s. 159.
11. REED, G.: Enzymes in Food Processing, New York – London, Academic Press 1966, s. 73.
12. SINCLAIR, W. B.: Biochemistry and Physiology of the Lemon. Univ. of California, Div. of Agric. Natural Resources 1984.
13. LODGE, N., J. Food Sci., 52, 1987, s. 1095.
14. Návrh RVPH normy, 14.270.22-87, Enzýmové prípravky. Metódy stanovenia pektinázovej aktivity.
15. Návrh PN 6/86. Metódy skoušení práškoveho pektinu a pektinových výrobků.
16. FAO, FNP, 1981, č. 19, s. 152.
17. ROBOZ, E. – BARRAT, R. W. – TATUM, R. L., J. Biol. Chem., 1952, s. 459.
18. MÁRCUS, L. – BARASH, I. – SNEH, B. – KOLTIN, Y. – FINKLER, A., Physiol. Molec. Plant. Pathol., 29, 1986, s. 325.
19. DAHM, H. – STRELCHYK, K., J. Phytopathol., 118, 1987, s. 76.
20. KYZLINK, V.: O účinnosti filtračních enzymů při pektolýze ovocných šťáv. Praha, Průmyslové vydavatelství 1950.

21. ON, Návrh normy na Leozým, MPVžSSR, GRT LIKO.
22. MILLER, G. L., *Anal. Chem.*, *31*, 1959, s. 426.
23. URBANEK, H. – ZALEWSKA, K. – SOBCZAK, J., *Biochem., Biophys. Acta*, *377*, 1975, s. 402.
24. AGUILAR, G. – HUITRON, C., *Enzyme Microbiol. Technol.*, *9*, 1986, s. 541.
25. REXOVÁ-BENKOVÁ, L., *Eur. J. Biochem.*, *39*, 1973, s. 109.
26. MANACHINI, P. L. – FORTINA, M. G. – PARINO, C., *Biotechnol. Lett.*, *9*, 1987, s. 219.
27. MALDONADO, M. C. – NAVARRO, A. – CALLIERI, A. S., *Biotechnol. Lett.*, *8*, 1986, s. 501.
28. DAVÍDEK a kol.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha, SNTL 1977.
29. VERSTEG, G. – ROMBOUTS, F. – PILNIK, W., *Lebensm.-Wiss.-Technol.*, *11*, 1978, s. 267.
30. GODFREY, T. – REICHEL, J.: *Industrial Enzymology*. London, Macmillan 1983, s. 522 (Data Index).
31. MKC, Enzympräparate, Standards für die Verwendung in Lebensmitteln, 1983.
32. HAGERMANN, A. E. – BLAU, D. M. – McCURE, A. L., *Anal. Biochem.*, *151*, 1985, s. 334.
33. KEIL, B. – ŠORMOVÁ, Z. a kol.: *Laboratorní technika biochemie*. Praha, Nakl. ČSAV 1959.
34. NELSON, N., *J. Biol. Chem.*, *153*, 1954, s. 373.
35. SOMOGYI, M., *J. Biol. Chem.*, *195*, 1952, s. 19.
36. MKC, Enzyme, Product Information, Hannover, 1987.
37. LOWRY, O. – ROSENBROUGH, N. – FARR, A. – RANDALLI, R., *J. Biol. Chem.*, *193*, 1951, s. 265.
38. ŠUBÍK, J. – DUDÍKOVÁ, E. – JURÍKOVÁ, K. – LEŠKOVÁ, Z.: *Mikrobiologické a biochemické metody špecifikácie enzýmových preparátov*. (Výskumná správa.) Bratislava, VÚP 1988.

Пектолитические энзимы и методы определения их активности

Резюме

Работа ориентируется на стандардизацию методов определения активности пектолитических энзимов и на характеристику пектинов в числе субстратов пектиназ. Для определения активности пектолитических энзиматических препаратов, которые не имеют разработанные методы Комиссии специалистов FAO/WHO (JECFA), рекомендуется применить вискозиметрический метод, активность полигалактуроназы определять спектрофотометрическим методом восстановления сахаридов и активность пектинестеразы методом титрования освобожденных карбоксильных групп.

Pectolytic enzymes and the methods of the determination of their activity

Summary

The work is aimed at the standardization of the methods for the determination of the activity of pectolytic enzymes and at the characterization of pectines as the pectinase substrates. For the

determination of the activity of those pectolytic enzyme preparations for which no methods are worked out by the FAO/WHO Expert Commission (JECFA), following methods are recommended: the viscosimetric method, the method of reducing saccharides is suggested for the spectrometric determination of polygalacturonase activity, and the method of titration of the carboxyl groups for the pectinesterase.