## SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

# **Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

# **Korina Herceg, Sanela Kićanović**

**Određivanje aktivnosti pektolitičkih enzima u mrkvi tretiranoj visokim tlakom uz prisutstvo ugljikova dioksida**

**Mentor: dr.sc. Branka Levaj, red. prof.**

**Zagreb, svibanj, 2012.**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća u Zagrebu, pod stručnim vodstvom dr. sc. Branke Levaj, red. prof. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011/12.

Sadržaj

[1. UVOD 1](#_Toc323745239)

[2. TEORIJSKI DIO 3](#_Toc323745240)

[2.1. MRKVA 3](#_Toc323745241)

[2.1.1. Proizvodnja u svijetu i gospodarska vrijednost 4](#_Toc323745242)

[2.1.2. Morfološka svojstva 5](#_Toc323745243)

[2.1.3. Nutritivna i zdravstvena vrijednost 6](#_Toc323745244)

[2.2. PEKTINI 8](#_Toc323745245)

[2.2.1. Kemijska struktura pektina 9](#_Toc323745246)

[2.3 PEKTOLITIČKI ENZIMI 9](#_Toc323745247)

[2.3.1. Depolimerizirajući enzimi 12](#_Toc323745248)

[2.3.2. Deesterificirajući enzimi 12](#_Toc323745249)

[2.4. POLIGALAKTURONAZA 13](#_Toc323745250)

[2.4.1. Poligalakturonaza u mrkvi 15](#_Toc323745251)

[2.5. PEKTIN METILESTERAZA 16](#_Toc323745252)

[2.5.1. Smještaj u stanici 16](#_Toc323745253)

[2.5.2. Fizikalno kemijska svojstva 16](#_Toc323745254)

[2.5.3. Primarna i trodimenzionalna struktura 17](#_Toc323745255)

[2.5.4. Uloga u biljnom tkivu 19](#_Toc323745256)

[2.5.5. Utjecaj procesa na aktivnost pektin metilesteraze 19](#_Toc323745257)

[2.6. TRETMAN VISOKIM TLAKOM UZ PRISUSTVO CO2 (HPCD) 21](#_Toc323745258)

[3. EKSPERIMENTALNI DIO 25](#_Toc323745259)

[3.1. MATERIJALI 25](#_Toc323745260)

[3.2. METODE RADA 26](#_Toc323745261)

[3.2.1. Ekstrakcija enzima poligalakturonaze i pektin metilesteraze 26](#_Toc323745262)

[3.2.2. Određivanje aktivnosti poligalakturonaze 27](#_Toc323745263)

[3.2.3. Određivanje aktivnosti pektin metilesteraze 40](#_Toc323745264)

[4. REZULTATI I RASPRAVA 48](#_Toc323745265)

[4.1. Određivanje aktivnosti poligalakturonaze 48](#_Toc323745266)

[4.2. Određivanje aktivnosti poligalakturonaze tijekom skladištenja 51](#_Toc323745267)

[4.3. Određivanje aktivnosti pektin metilesteraze 55](#_Toc323745268)

[4.4. Određivanje aktivnosti pektin metilesteraze tijekom skladištenja 59](#_Toc323745269)

[5. ZAKLJUČCI 64](#_Toc323745270)

[6. LITERATURA 65](#_Toc323745271)

[SAŽETAK 76](#_Toc323745272)

[SUMMARY 77](#_Toc323745273)

# 1. UVOD

Mrkva (*Daucus carota*) je dragocjena sirovina za preradu povrća zbog svojih povoljnih nutritivnih svojstava. Minimalno procesirana, na primjer narezana ili naribana mrkva, se veoma često koristi u gotovim salatama, pri čemu je glavni problem smanjena trajnost takvih proizvoda, promjena boje na površini i ubrzano mikrobiološko kvarenje (Emmambux i Minnaar, 2003). Jedan od načina produljenja trajnosti takve mrkve je prethodno blanširanje mrkve (Howard i sur., 1994) ili pakiranje u modificiranu atmosferu (Amanatidou i sur, 2000).

Idealan proces prerade voća i povrća bio bi onaj koji inaktivira prirodnu mikrofloru i enzime uključene u procese degradacije biljnog tkiva, a da su pri tome sačuvani svi nutritivno vrijedni sastojci.

Pektolitički enzimi, osim što imaju ulogu u mekšanju biljnog tkiva tijekom zrenja, mogu biti uključeni i u procese degradacije biljnog tkiva, zbog čega ih je u minimalno procesiranom voću i povrću poželjno inaktivirati.

Kako danas potrošači preferiraju što manje prerađeno, odnosno minimalno procesirano voće i povrće radije nego konzervirano i zamrznuto, dolazi do razvoja novih ne termalnih procesa konzerviranja hrane koje omogućavaju proizvodnju sigurnih, minimalno procesiranih proizvoda visoke kvalitete, bogatih nutrijentima (Robertson i sur., 1990).

Korištenjem tih procesa, poput visokog hidrostatskog tlaka, ultrazvuka, oscilirajućeg magnetskog polja, visokog tlaka uz primjenu ugljičnog dioksiada i drugih, hrana se procesira uz minimalnu degradaciju nutrijenata, arome i boje. Tretman visokim tlakom uz prisutstvo CO2 (eng. High Pressure Carbon Dioxide, HPCD) je nova tehnologija za ne termalnu pasterizaciju ili sterilizaciju. Mnoga istraživanja su pokazala da ova tehnologija može efikasno inaktivirati mikroorganizme (Corwin i Shellhammer, 2002; Liao i sur., 2007) i enzime u biljnom tkivu (Kincal i sur. 2006; Truong i sur., 2002).

Cilj rada bio je istražiti kako HPCD tretman proveden pri različitom temperaturnom režimu utječe na aktivnost pektolitičkih enzima poligalakturonaze (PG) i pektin metilesteraze (PME) u mrkvi, te kakav je utjecaj skladištenja istih uzoraka na njihovu aktivnost.

Provedeno je vrlo malo istraživanja o aktivnosti pektolitičkih enzima u mrkvi, a metode za određivanje PG, odnosno PME su često u literaturnim radovima nepotpuno opisane, zbog čega je prvo bilo potrebno razraditi metodu kojom će se brzo i efikasno moći pratiti aktivnost pektolitičkih enzima nakon tretiranja i tijekom skladištenja tretiranih uzoraka.

# 2. TEORIJSKI DIO

## 2.1. MRKVA

Mrkva (*Daucus carota* L.) je dvogodišnja biljka povrtnica iz porodice štitarki (*Apiaceae*). Većina povrća iz porodice štitarki potječe iz kontinentalnog i mediteranskog područja Europe i Azije. To su obično dvogodišnje biljke. Mrkva, ali i ostalo povrće iz porodice štitarki, sastoji se od zadebljalog korijena i lisne mase. Zadebljali korijen mrkve bogat je nutrijentima te se koristi u prehrani.

Divlja je mrkva raširena po cijeloj Europi i Aziji. Koristi se kao povrće od pretpovijesnog razdoblja, a današnje forme razvile su se kroz višestruke mutacije od purpurno crvenih do žutih, bijelih do narančastih. Već u 10. stoljeću crvene forme došle su iz Azije u Europu, gdje se pojavio žuti mutant. Sve do 15. stoljeća bile su raširene i crvene i žute, ali su prevladavale žute forme. U 17. stoljeću pojavljuje se bijela mrkva, a iz nje je u Nizozemskoj izdvojen narančasti mutant, koji se u sljedećem razdoblju raširio po cijelom svijetu.

Prvi kultivari mrkve selekcionirani su još u 19. stoljeću.

Oplemenjivanjem se nastoji postići pravilan i ujednačen oblik zadebljalog korjena, intenzivna narančasta boja, što veća zastupljenost floema i što manja razlika u boji između floema i ksilema (slika 1.), glatka pokožica i što manja „glava“ korijena bez zelene boje. Također se traži dobra otpornost na pucanje u tlu i u pripremi za tržište. Poželjan je što veći udio suhe tvari i šećera te β-karotena (Lešić i sur., 2004).



floemfloem

ksilem

*Slika 1.* Presjek mrkve (Anon. 2, 2011)

Zukowska i sur. (1997) selekcijom su postigli genotip koji manje nakuplja nitrate u korjenu, koji mogu biti štetni za ljudsko zdravlje. Naime, nitrati se reduciraju u nitrite djelovanjem denitrificirajućih bakterija, a kad se nitriti nađu u prisutvu sekundarnih amina nastaju kancerogeni nitrozamini (Schuster i Lee, 2006).

Na svjetskom tržištu nude se brojni kultivari, koji se razlikuju po dužini vegetacije. Zbog lakšeg snalaženja u tom mnoštvu često se svrstavaju po tipu kao što je prikazano na slici 2. (Lešić i sur., 2004).



*Slika 2.* Tipovi mrkve (Lešić i sur., 2004)

### 2.1.1. Proizvodnja u svijetu i gospodarska vrijednost

Vrijednost mrkve kao povrća i namirnice sve se više cijeni, u svijetu se uzgaja na oko 630 000 ha i proizvodi se 14 028 000 t (FAO, 1992.), od toga u Europi 23 %, a još 24 % u zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza. Od europskih zemalja najviše se mrkve proizvodi u Poljskoj (32 000 ha i 672 000 t), Francuskoj (17 000 ha i 530 000 t) i u Velikoj Britaniji (18 000 ha i 672 000 t). Procjenjuje se da se u Hrvatskoj mrkva proizvodi na oko 2000 ha. To se, međutim, odnosi na proizvodnju za tržište i prerađivačku industriju. Još se znatna količina proizvodi u domaćinstvima, gdje je zastupljena u svakom obiteljskom vrtu. To nije mala proizvodnja, kada se uzme u obzir da oko 32 % stanovništva Hrvatske živi u selima i manjim naseljima.

Zbog prehrambenih navika potrošnja mrkve po stanovniku još je mala, jer se mrkva najviše troši kao dodatak juhama, dok su drugi načini pripreme manje zastupljeni.

Različiti načini proizvodnje mrkve u kontinentalnom i mediteranskom području omogućuju opskrbu tržišta svježom mrkvom tijekom cijele godine, a opskrbu industrije sirovinom od sredine ljeta do kasne jeseni.

Ulaganja po jedinici površine u odnosu na druge povrtne kulture nisu velika, a mogu se postići prinosi i do 50 t/ha. Međutim i manji prinosi mlade mrkve iz zimske proizvodnje mogu postići i veći ekonomski rezultat (Lešić i sur., 2004).

### 2.1.2. Morfološka svojstva

Primarni korijen mrkve u povoljnim uvjetima može doseći dubinu i više od 1 m. Kad se razvije oko 70 % lisne mase, počinje zadebljanje gornjeg dijela korijena, koji se u tehnološkoj zriobi koristikao namirnica. Taj zadebljali korijen sastoji se od epikotila, odnosno vrlo skraćene stabljike, hipokotila i dijela korijena na kojem se postrani nalaze korjenčići. U poprečnom presjeku zadebljalog korijena vidi se veoma tanka pokožica periderma i intenzivnije obojeno tkivo kore, sekundarnog floema, kambij i svijetlije obojeni ksilem. U floemu se nakuplja više šećera i karotena, pa se u selekciji nastoji da ksilem bude što manji, sa što manjom razlikom u intenzitetu boje.

Na skraćenoj stabljici formira se perasto sastavljeno lišće s brojnim sitnim dlakama i rascjepkanim liskama. Stabljika se tijekom prijelaza u generativnu fazu produljuje i grana, a na vrhu grana nalazi se cvat koji ima brojne cvjetove (slika 3.). Cvjetovi se sastoje od 5 lapova, 5 latica, 5 prašnika i dvodjelnog tučka. Plod je kalavac. Sastoji se od 2 jednosjemena plodića koji se kasnije razdvoje. Jednosjemeni plod koristi se kao sjeme, koje je vrlo sitno. U jednom gramu može biti 700 do 900 sjemenki (Lešić i sur., 2004).



*Slika 3.* Cvat mrkve (Anon. 3, 2012)

### 2.1.3. Nutritivna i zdravstvena vrijednost

U prehrani se mrkva upotrebljava na mnogo načina. Koristi se svježa kao salata ili kuhana kao varivo ili prilog. Konzervira se sterilizacijom, zamrzavanjem, sušenjem, a u novije vrijeme sve više se istražuju novi postupci procesiranja i konzerviranja. Važna je komponenta dječje hrane i sokova. Mrkva predstavlja kvalitetnu komponentu povrća u dnevnom obroku, što je vidljivo iz sastava hranjivih sastojaka u svježem očišćenom korijenu (tablica 1.).

*Tablica 1.* Nutritivni sastav mrkve (Lešić i sur., 2004)

|  |  |
| --- | --- |
| SASTOJCI | UDIO (%) |
| Voda | 86,5-93,0 |
| Proteini | 0,5-1,2 |
| Masti | 0,1-0,3 |
| Ugljikohidrati | 5,8-8,8 |
| Šećeri | 4,8 |
| Vlakna | 0,6-1,32 |
| Minerali | 0,7-1,0 |

Sto grama mrkve ima energetsku vrijednost 36-46 kcal odnosno 151-192 kJ.

Mrkva je nutritivno vrijedno povrće te ima blagotvoran učinak na zdravlje. Svježa mrkva bogata je mineralima (tablica 2.)

*Tablica 2.* Mineralni sastav mrkve (Lešić i sur., 2004)

|  |  |
| --- | --- |
| MINERALNA TVAR | mg/100 g |
| kalij | 198-355 |
| kalcij | 25-59 |
| fosfor | 20-43 |
| željezo | 0,5-2,68 |
| jod | 0,0038-0,043 |

te je vrijedan izvor vitamina (tablica 3.) u ljudskoj prehrani.

*Tablica 3.* Vitaminski sastav mrkve (Lešić i sur., 2004)

|  |  |
| --- | --- |
| VITAMIN | mg/100 g |
| β karoten | 3,6-12,0 |
| B1 | 0,05-0,08 |
| B2 | 0,03-0,12 |
| B3 | 0,4-1,5 |
| B5 | 0,23-0,31 |
| B6 | 0,038-0,12 |
| B7 | 0,005 |
| C | 5-9 |
| E | 1,5-3 |
| K | 0,08 |
| Folna kiselina | 0,005-0,0089 |

Mrkva je bogata β-karotenom koji djeluje kao prekursor za sintezu vitamina A, pa se preporuča kao bogat izvor vitamina A (Lešić i sur., 2004).

Karotenoidi u mrkvi imaju povoljan učinak na zdravlje, imaju provitaminska svojstava te su povezani s antioksidacijskim svojstvima mrkve.

Karotenoidi su biljni pigmenti odgovorni za narančastu boju povrća poput mrkve, a intenzitet boje se smatra pouzdanim pokazateljem visoke nutritivne vrijednosti. Toplinska obrada može dovesti do degradacije karotenoida i promjene u boji mrkve (Marx i sur., 2003), o čemu treba voditi računa prilikom optimiranja procesnih parametra.

Mrkva je također dobar izvor fenolnih spojeva koji imaju jaku antioksidacijsku aktivnost i kao takvi smanjuju oštećenja stanica uzrokovana djelovanjem slobodnih radikala, te imaju antibakterijska i antikancerogena svojstva (Naczk i Shahidi, 2003).

Udio fenolnih spojeva u mrkvi utječe na njene senzorske karakteristike - boju (Zhang i sur., 2005), gorčinu (Kreutzmann i sur., 2008) ili aromu (Naczk i Shahidi, 2003).

Najvažniji fenolni spojevi u mrkvi su klorogenska kiselina, kafeinska kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, zajedno s derivatima cinaminske kiseline.

Na koncentraciju fenolnih spojeva utječe kultivar (Zhang i Hamauzu, 2004; Alasalvar i sur., 2005), te uvjeti skladištenja (Leja i sur., 1997) i prerade (Gebczynski, 2006).

Tako na primjer povećanjem temperaturnog režima prilikom prerade dolazi do povećanog gubitka fenolnih spojeva (Goncalves i sur.,2010).

## 2.2. PEKTINI

Pektini su spojevi iz skupine anionskih heteropolisaharida i čine sastavni dio staničnih stjenki svih biljnih organizama. Na taj način sudjeluju u formiranju brojnih fizioloških i strukturalnih osobina stanične stjenke te omogućuju normalno funkcioniranje stanice (Seymour i Knox, 2002). Pektin je u staničnoj stjenci dio središnje lamele i primarne stanične stjenke, a povezujući celulozu i hemicelulozu stvara složenu strukturu koja daje čvrstoću određenim dijelovima biljke (Fishman i sur., 1992).

Pektini u biljkama imaju ulogu u prijenosu iona i zadržavanju vode u stanici (vežu na sebe pojedine ione i vodu te bubre), uvjetuju veličinu pora stanične stjenke, te sudjeluju u zaštiti stanice od patogenih mikroorganizama i mehaničkih oštećenja. Zahvaljujući sposobnosti da na sebe vežu šećer, vodu, aromatične i mineralne tvari (ioni Ca, Fe, K), pektini omogućuju odvijanje brojnih biokemijskih reakcija.

Upravo zahvaljujući jedinstvenim detaljima strukture, pektinske tvari u voću i povrću utječu na njihovu teksturu, čvrstoću ali i na reološka svojstva pulpe voća (Sharma et al., 1996).

Pektini nisu samo strukturni elementi, već sudjeluju i u procesima rasta, razvoja i starenja biljaka (Darvill i sur., 1988).

Najvažnije svojstvo pektina je sposobnost želiranja, odnosno stvaranja gela. Želiranje pektina je djelomično taloženje paktina pri čemu on prelazi iz topljivog sol-stanja u netopljivo gel-stanje, u kojem su molekule nepokretne i međusobno povezane vodikovim ili ionskim vezama. Do stvaranja tih veza dolazi pri promjeni naboja molekula čemu pridonosi djelovanje prisutnih kiselina i šećera (Towle i Christensen, 1973).

Također, pektin se smatra vrlo važnim dijetalnim vlaknom za koje je dokazano da snižava kolesterol u krvi (Endress, 1991). U prilog tome, jednim istraživanjem je potvrđeno da je pektin prirodni reducent masti jer je sposoban formirati vodeno-bazni gel koji obuhvaća i veže molekule masti (Duxbury, 1991; Pszczola, 1991).

Dokazano je i da posjeduje zadovoljavajuća emulgirajuća svojstva te kao takav ima primjenu u vodeno-uljnim emulzijama kao što su salatni dressing i slični umaci (Oakenfull and Scott, 1984).

### 2.2.1. Kemijska struktura pektina

Kemijska struktura pektinskih tvari je predmet mnogih znanstvenih istraživanja. Pektinske tvari imaju primarnu, sekundarnu, tercijarnu te kvartarnu strukturu. Primarna struktura je intenzivno proučavana za razliku od kvartarne strukture o kojoj ovise mnoga pektinska svojstva. Također, boljim poznavanjem kvartarne strukture i uvjeta u kojima se mijenja mogli bi se na molekularnoj razini razumjeti određeni mehanizmi djelovanja pektina.

Kemijska struktura je različita ovisno o vrsti voća i povrća, fiziološkom stanju ploda, da li je pektinska tvar središnje lamele ili primarne stanične stjenke. No, osnovni im je kemijski sastav ipak vrlo sličan. Glavna komponenta je D - galakturonska kiselina povezana α(1-4)-glikozidnom vezom u lanac čije su karboksilne skupine potpuno ili djelomično esterificirane metanolom (Towle i Christensen, 1973). Na glavni lanac D-galakturonske kiseline, koja je mjestimično isprekidana jedinicama ramnoze, vezani su kraći bočni lanci različite duljine izgrađeni većinom od neutralnih šećera: D-galaktoze, L-arabinoze, D-glukoze, D-ksiloze i rijetko od D-manoze, L-fruktoze i D-glukuronske kiseline (Fishman i sur., 1992). Mjesta na kojima su bočni lanci gusto raspoređeni čine tzv. „čupavi“ dio molekule, dok fragmenti sastavljeni od galakturonske kiseline s malo ramnoze i rijeđim bočnim lancima predstavljaju „glatki“ dio molekule pektina (Dreher, 1979).

## 2.3 PEKTOLITIČKI ENZIMI

Za vrijeme životnog ciklusa voća i povrća, odvija se niz kompleksnih, međusobno ovisnih fizioloških procesa koji nastaju kao posljedica brojnih biokemijskih reakcija u biljnom tkivu. To su procesi sa visokom kataboličkom i anaboličkom aktivnošću koje direktno povećavaju funkcije enzimskih sistema, izazivajući sintezu novih (Eagerman i dr., 1976; Marquis i sur., 1994).

Životni ciklus voća i povrća karakteriziraju procesi rasta, zrenja i dozrijevanja te upravo u fazi dozrijevanja dolazi do niza biokemijskih reakcija, naročito uvjetovanih aktivnošću pektolitičkih enzima te posljedično dolazi do mekšanja plodova, promjena njihove građe i strukture.

Iz toga razloga mnogo je istraživanja posvećeno problematici utjecaja pektolitičkih enzima u biljnom tkivu s obzirom da imaju glavnu ulogu u razgradnji pektina i glavnu ulogu u mekšanju staničnog tkiva, potom, dovode do gubitka postojanosti stanične stijenke te do porasta propusnosti (Bosch i sur., 2005; Moustacas, 1991; Bordenave, 1996).

Prema Jarvisu, depolimerizacija je najčešći uzrok degradacije pektina čime se postepeno povećava broj kratkih segmenata pektina što negativno utječe na izgled i prihvatljivost tkiva, kako u svježem voću i povrću tako i u poluproizvodima i gotovim proizvodima od voća i povrća.

S obzirom da su najvjerojatniji uzrok depolimerizacije upravo pektolitički enzimi, kako bi se sačuvala poželjna čvrstoća tkiva preporučuje se inaktivacija enzima i to posebice pektin metilesteraza i poligalakturonaza (Anthon i Barret, 2002).

U svrhu toga jedan od ciljeva naše studije je bio pronalazak odgovarajućih parametara, primjenjene netermičke tehnologije (HPCD tretmana), koji najviše inaktiviraju aktivnost pektolitičkih enzima a ujedno najmanje narušavaju teksturu te sukladno tome fizikalno.kemijska svojstva ploda.

Općenito, pektolitički enzimi se mogu podijeliti na depolimerizirajuće i deesterificirajuće. Depolimerizirajući enzimi kataliziraju cijepanje lanca pektina, dok deesterificirajući enzimi kataliziraju odcjepljivanje esterskih grupa sa molekule pektina.

U razgradnji pektina sudjeluje veliki broj enzima koji se mogu podijeliti na one koji djeluju na homogenom dijelu pektina, koji se sastoji od lanca galakturonske kiseline te one koji djeluju na heterogenom dijelu pektinske molekule koji pored galakturonske kiseline sadrži i ramnozu i bočne lance (Lozano, 2006).

Pektolitički enzimi mogu se klasificirati (tablica 4.) s obzirom na način djelovanja te s obzirom na supstrat na koji djeluju (Yadav i sur, 2009).

*Tablica 4.* Klasifikacija pektolitičkih enzima (Yadav i sur., 2009)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Tip | | | E.C.br. | Supstrat | Način djelovanja | Proizvod |
| Esteraze | | \*PME | 3.1.1.11 | Pektin | Hidroliza | Pektinska kiselina + metanol |
| \*PAE | 3.1.1.6 | Pektin | Hidroliza | Pektinska kiselina + etanol |
| Depolimeraze | Hidrolaze | Endo \*PG | 3.2.1.15 | Pektinska kiselina | Hidroliza | Oligogalakturonati |
| Egzo PG | 3.2.1.67 | Pektinska kiselina | Hidroliza | Monogalakturonati |
| Liaze | Endo \*PAL | 4.2.2.2 | Pektinska kiselina | Transeliminacija | Nezasićeni oligogalakturonati |
| Egzo PAL | 4.2.2.9 | Pektinska kiselina | Transeliminacija | Nezasićeni digalakturonati |
| Endo \*PL | 4.2.2.10 | Pektin | Transeliminacija | Nezasićeni metiloligogalakturonati |

\*PME – pektin metilesteraza

\*PAE – pektin acetilesteraza

\*PG – poligalakturonaza

\*PAL – pektat liaza

\*PL – pektin liaza

### 2.3.1. Depolimerizirajući enzimi

*Endo-poligakturonaza*

Endo-pligalakturonaza (3.2.1.15) hidrolizira α(1-4) glikozidnu vezu u pektinskom lancu na način da cijepa samo one veze koje se nalaze pored slobodne karboksilne grupe (Schobinger, 2001).

*Egzo-poligalakturonaza*

Egzo-poligalakturonaza (3.2.1.67) hidrolizira α(1-4) glikozidnu vezu u pektinskom lancu na kraju lanca.

*Endo-pektat liaza*

Endo-pektat liaza (4.2.2.2) razgrađuje α(1-4) glikozidnu vezu u pektinskom lancu nasumice, mehanizmon trans-eliminacije tako da spaja C4 i C5 nezasićenih oligogalakturonana. Proizvode ju pektolitičke bakterije i glavna je bakterijska depolimeraza.

### 2.3.2. Deesterificirajući enzimi

*Pektin metilesteraza*

Specifičan enzim koji katalizira cijepanje metil esterskih grupa pri čemu nastaju metanol i slobodne jedinice D-galakturonske kiseline, tj. niskoesterificirane pektininske kiseline (stupanj esterifikacije 5 do 10%) ili pektinske kiseline (Schobinger, 2001).

*Pektin acetilesteraza*

Esteraza čijim cijepanjem nastaje etanol i slobodne jedinice D-galakturonske kiseline. Proizvod je mnogih mikroorganizama te je mnogo otpornija na kemijsku inaktivaciju od pektin metilesteraza (Schobinger, 2001).

## 2.4. POLIGALAKTURONAZA

Poligalakturonaza je enzim koji katalizira hidrolizu pektina u biljnom tkivu. Zbog toga ima primjenu u prehrambenoj industriji gdje se koristi za razgradnju pektina. Na primjer nativnog pektina prisutnog u voćnom tkivu u proizvodnji voćnog soka što olakšava i dovodi do potpunije ekstrakcije. Također, za razgradnju pektinskih molekula u soku nakon prešanja u svrhu provedbe procesa bistrenja (Rojas i sur., 2011).

Enzim poligalakturonaza se također koristi pri degumiranju biljnih vlakana u proizvodnji tekstila i obradi otpadnih voda. Osim što se prirodno nalaze u biljnom tkivu, mogu se proizvoditi pomoću bakterija, kvasaca i plijesni. Bakterije proizvode uglavnom alkalne i termostabilne poligalakturonaze, dok su plijesni glavni proizvođači kiselih poligalakturonaza (Torres, 2006).

Kao što je prikazano na slici 4. (Anon. 1, 2010) ovaj enzim cijepa samo demetiliran pektinski lanac te tako smanjuje prosječnu duljinu pektinskog lanca. To vodi do promjena u teksturi poput mekšanja biljnog tkiva. Kako bi se sačuvala poželjna čvrstoća tkiva preporučuje se inaktivacija enzima (Anthon i Barrett., 2002). Inaktivacija enzima se najčešće provodi termičkim tretmanom, poput blanširanja, pasterizacije ili komercijalne sterilizacije. No sve se više u tu svrhu ispituju mogućnosti primjene novih tehnologija poput visokog tlaka ili pulsirajućeg magnetskog polja. Stavovi o primjeni novih tehnologija u svrhu inaktivacije enzima još su uvijek kontraverzni, zbog čega se provode brojna istraživanja upravo na tom području (Hendrickx i sur., 1998; Van Loey i sur., 2002).

Poligalakturonaze su hidrolitičke depolimeraze s egzo i endo aktivnošću (Torres, 2006).

Endo-poligalakturonaza (E.C. 3.2.1.15) nasumično hidrolizira α-1,4 galakturonsku vezu u pektinskoj kiselini pri čemu nastaju oligogalakturonazne jedinice. Endo-poligalakturonaze cijepaju samo galakturonske veze koje se nalaze pored slobodne karboksilne grupe, pa s porastom stupnja esterifikacije aktivnost enzima opada (Schobinger, 2001).

Endo-poligalakturonaza je narasprostanjenija pektin-depolimeraza. Nalazi se u plodovima, stablu i lišću mnogih viših biljaka, a proizvode je i razni mikroorganizmi, patogene i saprofitne gljivice (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Monilia*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Sclerotinia* i *Coniothvrium*). To je jedina pektin-depolimeraza, koju proizvode kvasci, a neke od baktrija koje ju proizvode su *Erwinia carotovora* i *Pseudomonas marginalis*.

Optimalni pH za djelovanje endo-poligalakturonaze s pektinskom kiselinom kao supstratom je između 3,5 i 5,6. Ako se pak kao supstrat koriste oligomeri, optimalan pH za djelovanje endo-poligalakturonaza je niži. Optimalna temperatura za njenu aktivnost je 40-45 °C.

Glavni produkti hidrolize katalizirane posredstvom endo-poligalakturonaze su mono i digalakturonske kiseline, ali se mogu naći i neki viši oligomeri.

Egzo-poligalakturonaza (E.C. 3.2.1.67) s nereducirajućih krajeva hidrolizira α-1,4 galakturonsku vezu u pektinskoj kiselini.

Egzo-poligalakturonaza je znatno rijeđa u prirodi nego endo-poligalakturonaza. Nalazi se u mrkvi, kao jedina pektin depolimeraza, te u mnogima gljivama (*Aspergillus niger*, *Coniothyrium diplodielle*, *Rhizopus tritici* itd.) (Schobinger, 2001).

Optimalni pH za djelovanje egzo-poligalakturonaze se kreće između 4,0 i 5,6, osim enzima podrijetlom iz *Erwinia aroideae*, kojem je optimalni pH 7,5. Osim enzima podrijetlom iz *Erwinia aroidea* koji kao krajnji produkt daje digalakturonsku kiselinu, sve poznate egzo-poligalakturonaze iz pektinske kiseline proizvode samo galakturonsku kiselinu (Torres, 2006; Schobinger, 2001).



*Slika 4.* Djelovanje poligalakturonaze (Anon. 1, 2010)

### 2.4.1. Poligalakturonaza u mrkvi

U mrkvi, enzim poligalakturonaza je prisutan u vrlo malim količinama (Stratilova i sur., 1998). Od poligalakturonaza, u mrkvi je prisutna egzo-poligalakturonaza (Konno i sur., 1981).

Istraživanje Anthon i Barret (2002) je pokazalo da je energija aktivacije poligalakturonaze 411 kJ/mol slična kao i kod pektin metil esteraze, no za razliku od nje, za inaktivaciju poligalakturonaze u mrkvi potrebna je viša temperatura (iznad 75°C), kao što je vidljivo na slici 5. Od svih enzima u mrkvi upravo je za inaktivaciju poligalakturonaze potrebno primjeniti najvišu temperaturu (do 81 °C), što znači da se inaktivacijom poligalakturonaze inaktiviraju i drugi enzimi u mrkvi. Upravo zbog toga bi se PG mogla koristiti kao test enzim kod provjere ukupne enzimske aktivnosti u mrkvi. Visoka temeperaturna stabilnost ovog enzima sugerira mogućnost rezidualne aktivnosti enzima i nakon termičkog tretiranja mrkve.

Fiziološka uloga poligalakturonaze u korjenastom povrću poput mrkve još nije dovoljno istražena te još nije sasvim poznato, ako uječe, kako utječe na kvalitetu svježe mrkve (Anthon i Barret, 2002).



*Slika 5.* Utjecaj temperature na rezidualnu aktivnost poligalakturonaze u mrkvi (Anthon i Barret, 2002)

## 2.5. PEKTIN METILESTERAZA

Pektin metilesteraza je specifičan enzim koji katalizira hidrolizu metil-esterskih grupa sa lanca homogalakturonana, mijenjajući pri tome njegovu izvornu strukturu te oslobađajući slobodne jedinice pektinske kiseline ili niskoesterificirane pektininske kiseline (stupanj esterifikacije 5 – 10%), alkohol metanol te protone.

Osjetljivost i nestabilnost homogalakturonana, izmjenjene strukture uslijed djelovanja PME, podložan je daljnjim promjenama, bilo da sudjeluju u procesu stvaranja gela u tkivu pomoću kalcijevih iona ili da je supstrat za djelovanje depolimerizirajućih iona.

Kao predmet istraživanja pokazala se od iznimne važnosti i za biologe i za prehrambene tehnologe (Jolie i sur., 2010).

### 2.5.1. Smještaj u stanici

Pektin metilesteraza je širokorasprostranjem enzim, identificaran u višim biljkama i to njihovom plodu, cvijeć, lišću, stabljici pa i korijenu (Rexova-Benkova, 1976).

Prilikom molekularnog istraživanja homogenog područja pektin metilesteraze dobiveni su rezultati koji nisu mogli sa sigurnošću potvrditi da li je prilikom hidrolize direktno vezana svojim aktivnim dijelom za pektin ili se samo nalazi u njegovom susjedstvu (Morvan, 1998; Quentin, 1997).

### 2.5.2. Fizikalno kemijska svojstva

Pektin metilesteraza je enzim srednje veličine sa molarnom masom u rasponu od 25 do 50 kDa. Aktivna je kao monomer (Bordenave, 1996).

Behen i sur. (2003) su utvrdili da pH pektin metilesteraze varira od niskih 1.3 u nekim gljivama do visokih 11 u rajčici. U biljnom organizmu pretežno ima neutralan ili lužnati pH a to se može objasniti njihovom čvrstom povezanošću sa slabo kiselom staničnom stijenkom (Bordenave, 1996).

Općenito uspoređujući PME iz biljaka, gljiva ili bakterija, nekoliko istraživanja je utvrdilo jedino u gljiva kiseli pH za što je predloženo objašnjenje mogućeg utjecaja eksperimentalnih uvjeta, postupka tretiranja i sadržaj tkiva (Micheli, 2001; Micheli i sur., 2000).

### 2.5.3. Primarna i trodimenzionalna struktura

Jako veliki broj biljnih i bakterijskih pektin metilesteraza su već određene, neovisno da li prema proteinskom ili genskom nizu (Laurent i sur., 1993; Markovic, 1986, Markovic, 2002; Bordenave i sur., 1996).

Iako striktno iste kemijske građe, istraživanje je pokazalo da se pektin metilesteraze biljnog organizma strukturno prilično razlikuju (Markovic, 2002; Jenkins i sur., 2001; markovic i sur., 1992)

Uspoređujući lanac aminokiselina primarne strukture potvrđeno je da sve biljne pektin metilesteraze imaju 5 segmenata visoke sličnosti, 6 striktno očuvanih, aktivnih ostataka i nekoliko funkcionalno važnih aromatskih ostataka (Pelloux i sur., 2007; Markovic i sur., 2004). Istraživanjima je pronađena i razlika u aminokiselinskom sadržaju između biljne, bakterijske i PME gljiva. Najdominantnija razlika je u dijelovima sa His, Cys te aromatskim prstenovima (Markovic i sur., 2004).

Također, razlike su pronađene i u broju disulfidnih veza unutar primarne strukture. Tako na primjer, PME rajčice ima dva disulfidna mosta, bakterijska PME ima jedan disulfidni most a u PME kod mrkve uopće nisu pronađeni disulfidni mostovi (Di Matteo i sur., 2005; Johansson i sur., 2002;D'Avano i sur., 2003; Markovic i sur., 1992)

U istraživanju su usporedbom trodimenzionalne strukture PME u mrkvi i PME u rajčici dokazane sljedeće tvrdnje (Di Matteo i sur., 2005; Johansson i sur., 2002):

Oba enzima su pokazala visoku sličnost u cjelokupnom 3D prikazu topologije koja je okarakterizirana prikazom strukture paralelnih dvostrukih *β*-uzvojnica koje se sastoje od tri paralelnih *β*-dijelova (PB1, PB2, PB3) međusobno isprepletenih petljama (T1, T2, T3) koje su ispupčene van dvostruke uzvojnice, kao što je prikazano na slici 6.

Područje unutar dvostruke *β*-uzvojnice je hidrofobno a pektinska spona je smještena u maloj, plitkoj, tekućinom ispunjenoj pukotini koja se nalazi duž molekule a zaštićena je petljama. Centralni dio te pukotine je obuhvaćen sa nekoliko aromatskih prstenova (Tyr, Phe, Trp).

Pektinska molekula i aktivna strana PME isprepletene kroz konfiguraciju dvostruke uzvojnice mogle bi biti smještene unutar te pukotine (Jenkins i sur., 2001; D'Avino i sur., 2003; Di Matteo i sur., 2005; Johansson i sur., 2002).



*Slika 6*. 3D struktura pektin metilesteraze iz mrkve (Johansson et al., 2002)

1. Struktura dvostruke β-uzvojnice sa tri paralelna dijela (PB1-smeđe;PB2-zeleno;PB3-žuto)
2. Prikaz P zavoja umreženih unutar mreže petlja koja predtavlja glavnu formu katalitičkog područja
3. Prikaz smještaja pektinske spone unutar reaktivne pukotine
4. Prikaz aktivne strane molekule sa 5 katalitički važnih ostataka (Gln113, Gln135, Asp136, Arg225

### 2.5.4. Uloga u biljnom tkivu

Unutarstanična pektin metilesteraza je uključena u metabolizam stanične stijenke te ima važnu ulogu u fiziološkim procesima koji su povezani sa vegetativnim i reproduktivnim razvojem biljke (Wolf i sur., 2009; Pelloux i sur., 2007). To uključuje stanično povećanje volumena, ukrućivanje stanice, staničnu adheziju, dozrijevanje voća, razvoj i rast drva, razvoj lišća, klijanje sjemenja te razvoj polena (Krichevskky i sur., 2007; Ren i sur., 2000; Tian i sur., 2006).

Nadalje, pektin metilesteraza je povezana sa zaštitom biljaka od biotičkog i abiotičkog stresa kao što su indirektna obrana od kukaca, insekata, topline, hladnoće te direktna zaštita preko interakcije sa otrovnim (virulentnim) faktorima kao što su virusi (Dorokhov i sur., 1999; Chen i sur., 2003; Chen i sur, 2000).

Aktivnost PME dovodi do deesterifikacije pektinske molekule te je ona podložna trima osnovnim promjenama.

Prvo, uslijed deesterifikacije, pektini mogu agregirati u gel strukturu povezanu ionima kalcija, povećavajući time čvrstoću stanične stjenke (Willats i sur., 2001).

Drugo, katalitička aktivnost pektin metilesteraze čini pektin otvorenijim i osjetljivijim na djelovanje poligalakturonaze koja uzrokuje depolimerizaciju i mekšanje staničnog tkiva (Bosch, 2006).

Treći utjecaj je preko oslobođenih protona tijekom katalitičke reakcije pektin metilesteraze pri čemu uzrokuje zakiseljenost okolne domene te samim time sniženje pH stanične stijenke. Pretpostavlja se da to može reducirati aktivnost PME a aktivirati druge stanične enzime kao što su PG i PL te potom njihovim djelovanjem dolazi do gubitka postojanosti stanične stjenke te do porasta propusnosti (Bosch i sur., 2005;Moustacas, 1991; Bordenave, 1996).

### 2.5.5. Utjecaj procesa na aktivnost pektin metilesteraze

Cilj obrade svježeg voća i povrća je eliminacija, inaktivacija ili redukcija mikroorganizama i enzima (uključujući i PME), da bi se osigurala zdravstveno ispravna hrana za ljudsku upotrebu.

Tradicionalno, termičko procesiranje je najprimjenjenija tehnologija s obzirom da učinkovito inaktivira patogene mikroorganizme te enzime odgovorne za kvalitetu.

Termička stabilnost pektin metilesteraze je iz tog razloga jako detaljno dokumentirana u raznim kinetičkim studijama.

Jednim istraživanjem narančinog soka je utvrđeno da postoje 3 termička oblika pektin metilesteraze. Pronađena su dva izoenzima (PME-1 i PME-2), oni su temperaturno osjetljivi, te treći oblik PME-3 koji je temperaturno stabilan te ima veću molekulsku masu (Velazquez-Estrada i sur., 2011.).

Općenito, PME je prilično termolabilna, inaktivira se lako na temperaturi ispod 70°C (Duvetter i sur., 2009). Međutim njezine termostabilne forme mogu ostati aktivne i uzrokovati tehnološke probleme i zamućenje soka od naranče (Cameron i sur., 1998;Versteeg i sur., 1980.).

Termička stabilnost, količina i aktivnost pojedinog izooblika pektin metilesteraze najviše ovisi o okolnim faktorima, pH, ionskoj jakosti, dodatku aditiva (šećera, poliola) te stupnju čistoće (Balogh i sur., 2004; Plaza i sur., 2008).

Također, s porastom temperature pojačava se deesterifikacija pektina skroz do kritične točke gdje počinje prevladavati denaturacija proteina. Istraživanjima je utvrđeno da je optimalna temperatura za aktivnost pektin metilesteraze između 45°C i 55°C, ovisno o izvoru enzima i okolnim uvjetima (Duvetter i sur., 2009).

Upravo zbog visoko-temperaturnih procesa, koji s jedne strane odlično inaktiviraju neželjene mikroorganizme i enzime a s druge pogoduju i uništavaju nutritivna i organoleptička svojstva, potrebno je, u svrhu što bolje ravnoteže kvalitete i zdravstvene ispravnosti koristiti kombinacije različitih tretmana. Postoji veliki broj znanstvenih istraživanja koji se bave upravom tom problematikom, pronalaskom novih, alternativnih, ne-termičkih metoda za inaktivaciju enzima i mikroorganizama. Jedna od novijih metoda je i HPCD koja se temelji na kombinaciji nižih temperatura, nižih tlakova uz prisustvo CO2.

Iz tih razloga se jako veliki broj studija počeo baviti proučavanjem stabilnosti PME i kod različitih tlakova. U prilog tome, Duvetter i dr. su dokazali da je PME barotolerantna (Jolie i sur., 2010). Stabilnost pri određenom tlaku može može varirati ovisno o izvoru PME. Tako na primjer, pektin metilesteraza u mrkvi pokazuje veću osjetljivost na tlak od 600 MPa od pektin metilesteraze u rajčici koja je dokazala izvanrednu postojanost čak i kod vrijednosti tlaka od 1 GPa (Ly-Nguyen i sur., 2003; Sila i sur., 2007).

U proučavanju utjecaja različitih vrijednosti tlaka u istim vrstama ( ispitivani uzorci su bili mrkva, naranča i rajčica) utvrđeno je da određeni oblik PME može pokazati značajne razlike u stabilnosti na tlak (Duvetter i sur., 2009; Plaza i sur., 2007).

## 2.6. TRETMAN VISOKIM TLAKOM UZ PRISUSTVO CO2 (HPCD)

Potrošači sve više mijenjaju svoje prehrambene navike i imaju sve veće zahtjeve za svježim voćem i povrćem te proizvodima lišenih kemijskih aditiva, konzervansa i sličnih dodataka. Iz tog razloga sve je veći broj znanstvenih i industrijskih istraživanja usmjeren pronalasku tehnologije sa minimalnim nutritivnim, fizikalno kemijskim i organoleptičkim promjenama.

HPCD tretman se rapidno razvio kao nova, ne-termička tehnologija koja dokazano ima izvanrednu sposobnost inaktiviranja različitih mikroorganizama bez izlaganja hrane negativnim utjecajima topline a da pritom očuva sve pozitivne fizikalno-kemijske, nutritivne i senzorske karakteristike (Damar i Balaban;2006).

Osnovni princip HPCD tretmana je baziran na otapanju CO2 u stanici pomoću primjene visokog pritiska. Nakon naglog spuštanja, dekompresije na atmosferski tlak, dolazi do funkcionalnog oštećenja stanice (Balaban i sur., 1991), do povećane permeabinosti te lakšeg prodiranja CO2 u samu stanicu.

Dokazano je da efikasno uništava 12 gram pozitivnih bakterija, 10 gram negativnih bakterija, 8 bakterijskih spora te 8 gljivičnih spora (Zhang i dr., 2006).

Također, nizom istraživanja je dokazano da učinkovito inaktivira mnoge unutarstanične, urođene enzime, uključujući polifenol oksidaze (Pozo i dr., 2007; Chen i dr.,1992; Liu i dr.,2008), peroksidaze (Liu i dr., 2008.), lipogenaze (Liao i dr., 2009.) te pektin metilesterazu (Arreola i dr., 1991; Park i dr., 2002, Zhi i dr., 2008; Zhou i dr., 2009.).

U prilog tome, Park i dr. (2002) su istraživali utjecaj HPCD-a na kvalitetu soka od mrkve. Tretirali su sok HPCD-om i visokim tlakom te dokazali da je tretman sa 4.9 MPa HPCD i 600 MPa ultra visokog tlaka najbolje djelovao na inaktivaciju enzima mrkve.

Također, s obzirom da pektolitički enzimi, posebice pektin metilesteraza djeluje na smanjenje mutnosti soka, mnoga istraživanja su pokušala upravo HPCD metodom riješiti taj problem. Tako su Arreola i dr. (1991) nakon tretiranja narančinog soka HPCD-om dokazali odličnu stabilnost mutnosti u narančinom soku.

Bi i dr. (2011) su istraživali učinke HPCD-a na prirodne mikroorganizme, prirodnu aktivnost enzima, štetu na staničnim membranama i tvrdoću svježe odrezanih mrkvi. Utvrdili su da je tvrdoća ostala zadovoljavajuća uz gubitak od svega 7.9 % a aktivnost pojedinih enzima se smanjila za čak 89%.

Zhi i dr. i dokazali da se primjenom HPCD tretmana u soku od jabuke aktivnost pektin metilesteraze može smanjiti za čak 94.57% uz temperaturu od 48°C i tlak od 30 MPa.

Zhou i dr. su također utvrdili da značajno smanjenje enzimske aktivnosti u mrkvi i breskvi primjenom tlaka od 107 MPa i temperature od 25°C.

Također, Balaban i sur. (1991) su uočili da više temperature i tlakovi HPCD tretmana dovode do većeg postotka enzimske inaktivacije.

Iz svega priloženog može se konstatirat da upravo sinergično djelovanje temperature i tlaka uz prisustvo CO2 omugućuje različitu kombinaciju i primjenu parametara tlaka i temperature uz postizanje učinkovitih rezultata.

Park i Lee (2002.) su utvrdili da bi takva kombinacija trebala biti dobar kandidat zbog učinkovite inaktivacije enzima odgovornih za narušavanje kvalitete, mikroorganizama te zbog lakoće u upotrebi.

Svrha primjene CO2 u HPCD tretmanu leži u sposobnosti penetracije CO2 kroz staničnu membranu gdje narušava ravnotežu pH gradijenta koje biljno tkivo nastoji održavati. Time dolazi do smanjenja unutarstaničnog pH i do inhibicije vrlo važnog metaboličkog sistema enzima. Samim time, primjena CO2 je vrlo poželjna s obzirom da enzimska aktivnost raste s porastom pH.

U tu svrhu Park i Lee (2002) su u svom istraživanju utvrdili da HPCD tretman smanji pH mrkvinog soka sa 6.5 na pH 4.4.

HPCD uživa toliku popularnost zato što je to tehnologija koja se bazira na kombinaciji nekoliko tretmana koji time ima veliku prednost pred zasebnim tretmanima jer omogućuje inaktivaciju enzima na temperaturama gdje termička inaktivacija nije učinkovita (Balaban i dr., 1991) te pri niskim tlakovima koji neće dovesti do ireverzibilne denaturacije proteina (Hendrick i dr., 1998).

Prednost HPCD tretmana u odnosu na blanširanje se najviše ogleda u mogućnosti primjene puno nižih temperatura uz jednaki učinak na inaktivaciju enzimske aktivnosti (Bull i sur., 2004).

S obzirom da sok od mrkve ima slabo kiseo pH, u odnosu na narančin sok, breskvu ili sok od jabuke, postoji veći rizik od bakterijskog kvarenja te se kod primjene blanširanja moraju primijeniti visokotemperaturni tretmani da bi se zaštitilo od kvarenja. Tako visoke temperature narušavaju vitaminsko mineralni sastav mrkve, posebice negativno utječu na *β*-karotene (Khan i dr., 1975).

Iako je osnovna svrha blanširanja inaktivacija enzima, istiskivanje intraceluralnog zraka kako bi se spriječile reakcije oksidacije, smanjenje volumena proizvoda, uništenje mikroorganizama, priprema sirovine za daljnju preradu (Herceg, 2011), istraživanjima je utvrđeno da može doći do gubitka arome i okusa, omekšavanja ploda te gubitka svježine kao pozitivne senzorske karakteristike (Farnworth i dr., 2001).

Primjena samog visokog hidrostatskog tlaka (100-800 MPa) učinkovito suzbija mikroorganizme i inaktivira enzime odgovorne za degradaciju namirnica uz zadržavanje kvalitete proizvoda, posebno u smislu očuvanja arome, teksture i boje (Herceg, 2009). No, upotreba jako visokih tlakova, iznad 310 MPa, koji su potrebni za barotolerantne patogene bakterije, mogu dovesti do ireverzibilne denaturacije proteina (Hendrich i dr., 1998).

Denaturacija i konformacijske promjene koje se događaju na proteinima zbog djelovanja visokog tlaka znatno utječu na funkcionalnost enzima te mogu izazvati povećanje ili smanjenje njihovih bioloških aktivnosti. I najmanja promjena u strukturi može dovesti do promjene enzimske aktivnosti (Herceg, 2011).

U prilog tome Seyderhelm i dr. (1996) su utvrdili da je enzimska inaktivacija bila to veća što bio viši hidrostatski tlak.

Nienaber i Shellhammer (2001) su ispitali djelovanje visokog hidrostatskog tlaka na sok naranđe i utvrdili da je za potpunu inaktivaciju PME potreban tlak od 800 MPa.

Lacroix i dr. (2005) su utvrdili da se svega 20% smanjila aktivnost PME primjenom tlaka od 170 MPa

Welti-Chanes i dr. (2009) su reducirali enzimsku aktivnost u vrijednostima od 49 i 38% primjenom tlaka od 250 MPa.

Sa stajališta izbjegavanja neželjenog gubitka senzorskih i nutritivnih značajki jednako je važna aktivacija i inaktivacija enzima uzrokovana djelovanjem visokog hidrostatskog tlaka te se zato HPCD uzima kao dobra alternativa jer omogućava izbjegavanje svih ovih neželjenih karakteristika primjenom nižih tlakova (Lee i dr., 2002).

# 3. EKSPERIMENTALNI DIO

## 3.1. MATERIJALI

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti aktivnost pektolitičkih enzima, PG i PME, u mrkvi tretiranoj visokim tlakom uz prisustvo CO2 (HPCD tretman), pri različitoj temperaturi i vremenu obrade prije i nakon skladištenja, čemu je prethodila razrada metoda za određivanje aktivnosti pektolitičkih enzima. Uzorci su tretirani pri 120 bara, pri 22 i 40 °C, 5 – 45 minuta, a skladišteni su 2 tjedna oni koji su tretirani pri 22 °C/15 min, te 4 tjedna oni koji su tretirani pri 40 °C/15 min (tablica 5.) Paralelno s tim određena je i aktivnost PG i PME u netretiranoj mrkvi i tijekom skladištenja 4 tjedna. Analize su provedene nakon svakog tjedna skladištenja. Mrkva je tretirana u Italiji (Universita degli studi di Trento) na pilot postrojenju.

Istraživanje je provedeno u okviru FP7 (SEVENTH FRAMEWORK PROGRAMME) projekta, pod nazivom *Processing Raw Materials into Excellent and Sustainable End products while Remaining Fresh*.

Potpuni podaci o tretmanu i postrojenju su zaštićeni jer je projekt još uvijek u fazi istraživanja.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **TRETMAN** | | |  | **SKLADIŠTENJE (tjedni)** | | | |
| **NESKLADIŠTENI**  **UZORCI** | **I** | **II** | **III** | **IV** |
| **0** | | | **+** | **+** | **+** | **+** | **+** |
| **120 bar** | **22ºC** | **5 min** | **+** |  |  |  |  |
| **10 min** | **+** |  |  |  |  |
| **15 min** | **+** | **+** | **+** |  |  |
| **30 min** | **+** |  |  |  |  |
| **45 min** | **+** |  |  |  |  |
| **40ºC** | **5 min** | **+** |  |  |  |  |
| **10 min** | **+** |  |  |  |  |
| **15 min** | **+** | **+** | **+** | **+** | **+** |
| **30 min** | **+** |  |  |  |  |
| **45 min** | **+** |  |  |  |  |

*Tablica 5*. Prikaz analiziranih uzoraka

Tretirana mrkva je na ledu dostavljena u Zagreb (Prehrambeno-biotehnološki fakultet) nakon čega je dio uzoraka odmah podvrgnut analizi, dok je dio uzoraka analiziran nakon skladištenja pri 4°C. U okviru projekta, prema rezultatima laboratorijskih preliminarnih istraživanja, odlučeno je da se provodi skladištenje samo pojedinih uzoraka.Prilikom tretiranja korišteni su različiti parametri temperature i vremena, pri konstantnom tlaku i udjelu ugljičnog dioksida.

Kao što jre već rečeno, istraživanju je prethodila razrada metode za određivanje aktivnosti PME i PG. Naime, željela se pronaći jednostavna metoda koja će se moći koristiti za praćenje utjecaja procesa proizvodnje i skladištenja. U literaturi se tražila jednostavna i brza metoda te je nađeno više sličnih metoda s manjim razlikama, no ni jedna nije bila opisana na reproducibilan način, te je ih je bilo potrebno razraditi, ispitati i prilagoditi na naše uvjete rada.

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Ekstrakcija enzima poligalakturonaze i pektin metilesteraze

Princip metode

Provesti dobru homogenizaciju tkiva mrkve uz dodatak vode te sve grublje čestice tkiva ukloniti filtriranjem (Bi i sur., 2011).

Aparatura i pribor

1. homogenizator (ULTRA –TURRAX ®, IKA)
2. lijevak Bűchner
3. woulff boca
4. boca za filtriranje

Postupak

Nakon usitnjavanja, 10 g uzorka mrkve se homogenizira pomoću homogenizatora Ultra turrax ® s 5 mL destilirane vode. Homogenizirani uzorak se profiltrira preko filter papira Whatman No.1 pri čemu se dobije enzimski ekstrakt za određivanje aktivnosti poligalakturonaze i pektin metilesteraze.

U nastavku se prvo navodi metoda određivanja enzima koja je konačno korištena u radu, a zatim su objašnjeni koji koraci metode, zašto i kako su modificirani.

### 3.2.2. Određivanje aktivnosti poligalakturonaze

Princip metode

Aktivnost poligalakturonaze je određena prema prilagođenim metodama opisanima u radu Anthon i Barrett (2002) te radu Kono i sur. (1981), gdje se analiza enzimske aktivnosti temelji na ekstrakciji i pročišćavanju enzima iz tkiva mrkve te kolorimetrijskoj kvantifikaciji rezidua galakturonske kiseline oslobođenih iz poligalakturonske kiseline djelovanjem poligalakturonaze.

Analizirani uzorci enzimskog ekstrakata se centrifugiraju i pročišćavaju kroz gel Sephadex G-25 (Anthon i Barrett., 2002). Iz dobivenog pročišćenog enzimskog ekstrakta aktivnost poligalakturonaze se određuje kolorimetrijski pomoću karbazola (IFU).

Aparatura i pribor

1. kivete i centrifuga (MIKRO 120, HETTICH)
2. kivete i centrifuga (HETTICH, ROTOFIX 32)
3. spektrofotometar (UV UNICAM HELIOS β)
4. zračna kupelj (REACTI-THERM DRY BLOCK, PIERCE)
5. mikropipeta od 1000 µL
6. pipete, 2 ml i 5 mL
7. odmjerne tikvice, 10 mL, 25 mL
8. termometar
9. epruvete

Reagensi

1. 5.0 M NaCl
2. Sephadex G-25
3. 0.1 M acetatni pufer (pH=5.0)

3.1) octena kiselina ([C](http://hr.wikipedia.org/wiki/Ugljik)[H](http://hr.wikipedia.org/wiki/Vodik)3C[O](http://hr.wikipedia.org/wiki/Kisik)OH)

3.2) natrijev acetat (CH3COONa)

1. 0.25 % poligalakturonska kiselina
2. standard galakturonske kiseline
3. 1 M NaOH
4. 0.1 % otopina karbazola
5. koncentrirana sumporna kiselina
6. 95% etanol
7. Otopina Fehling I
   1. bakar (II) sulfat
8. Otopina Fehling II
   1. kalijev hidroksid
   2. kalijev natrijev tartarat

Priprema regensa

1. *Priprema 5.0 M NaCl*

29.2215 g NaCl se otopi u 100 mL destilirane vode.

1. *Priprema Sephadex G-25*

Sephadex se nalazi u obliku suhog praha i mora nabubriti prije upotrebe. Tijekom bubrenja je potrebno izbjegavati pretjerano mješanje.

2 g praha se pomiješa s 12 mL 0.1 M acetatnim puferom (pH=5.0) i ostavi se stajati 3 sata pri sobnoj temperaturi da nabubri. Na dno kolonice se postavi malo staklene vune, a potom se gel prelije u kolonicu i ostavi da se suvišak pufera ocijedi.

1. *Priprema 0.1 M acetatnog pufera (pH=5.0)*

6 g octene kiseline ([C](http://hr.wikipedia.org/wiki/Ugljik)[H](http://hr.wikipedia.org/wiki/Vodik)3C[O](http://hr.wikipedia.org/wiki/Kisik)OH) se otopi u 500 mL destilirane vode i 6.8 g natrijeva acetata (CH3COONa) se također otopi u 500 mL destilirane vode. Za pripremu 0.1 M acetatnog pufera (pH=5.0) pomiješa se 357 mL prethodno pripremljene octene kiseline i 643 mL pripremljenog natrijeva acetata.

1. *Priprema 0.25 % otopine poligalakturonske kiseline (*vidi *modifikacija 1)*

0.25 % otopina poligalakturonske kiseline se priprema tako da se 0.25 g standarda poligalakturonske kiseline otopi u 100 mL destilirane vode, uz zagrijavanje na 40°C. Dobivena otopina se centrifugira pri 5000 rpm/10 min kako bi se istaložile neotopljene čestice. Za daljnju analizu uzima se supernatant.

1. *Priprema standarda galakturonske kiseline*

Točno 120.5 standarda galakturonske kiseline (GA) stavi se u tikvicu od 1 L, doda se 0.5 mL natrijeva hidroksida i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Ostavi se stajati preko noći. Dobiveni standard sadrži 100 µg GA/mL. Iz dobivene otopine naprave se otopine koncentracija 10-70 µg GA/mL pipetiranjem 10, 20, 30, ..., 70 ml i dopunjavanjem do 100 ml destiliranom vodom. U priređenim razrjeđenjima provode se kolorimetrijska određivanja na 505 nm ili 525 nm. U ovom radu mjerenje je provedeno na 525 nm.

1. *Priprema 1 M NaOH*

4 g krutine NaOH se potpuno otopi u manjoj količini destilirane vode, te se otopina kvantitativno prenese u tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake.

1. *Priprema 0.1 % otopine karbazola*
   1. g karbazola(C12H9N) se otopi u 96 % etanolu i nadopuni do 100 mL.
2. *Priprema 95 % etanola*

98.89 mL 96 % etanola se nadopuni destiliranom vodom do 100 mL.

1. *Priprema otopine Fehling I*

34.65 g bakar (II) sulfata se otopi u destiliranoj vodi, kvantitativno se prenese u tikvicu od 500 mL i nadopuni do oznake.

1. *Priprema otopine Fehling II*

U tikvici od 500 ml otopi se 125 g kalijeva hidroksida i 173 g kalij natrij tartarata te se destiliranom vodom nadopuni do oznake.

#### 3.2.2.1. Pročišćavanje enzimskog ekstrakta

0.8 mL filtrata mrkve se pomiješa s 0.2 mL 5.0 M NaCl, nakon čega se centrifugira pri 10000 rpm/10 min. Supernatant se propušta kroz Sephadex gel G-25 acetatnim puferom (pH=5.0) kako bi se uklonili reducirajući šećeri iz enzimnog ekstrakta, obzirom da isti stupaju u kolornu reakciju kao reducirajući krajevi.

Dokazivanje šećera Fehling otopinom

Kako bi se isključila mogućnost prisutstva reducirajućih šećera u enzimskom ekstraktu, proveden je test s Fehling otopinom. Fehlingova otopina se uvijek priprema svježa, te se istovremeno pripremaju Fehling I i Fehling II otopina. Fehling I je plavo obojena otopina bakrova (II) sulfata, dok je Fehling II bistra vodena i lužnata otopina kalijeva natrijeva tartarata. Jednaki volumeni (0.5 mL) Fehling otopina se pomiješaju, pri čemu se dobije konačna Fehling otopina tamno plave boje. U 1 mL mješavine otopina, doda se 1 mL enzimskog ekstrakta i zagrijava se do vrenja. Ukoliko su u ekstraktu prisutni reducirajući šećeri nastat će crveno obojeni talog bakar (II) oksida (Trajković i sur, 1983). U našem slučaju crveni talog je izostao, što znači da u enzimskom ekstraktu nema prisutnih reducirajućih šećera.

3.2.2.2. Kolorimetrijsko određivanje (Karbazol metoda)( vidi *modifikacija 3*)

1.5 mL pročišćenog enzimskog ekstrakta se doda 0.25 mL 0.25 % poligalakturonske kiseline. 0.25 mL dobivene smjese se izuzme za kolornu reakciju, a preostala smjesa se inkubira pri 48°C/2 h, nakon čega ponovno slijedi kolorna reakcija.

U kolorimetrijsku reakciju ulazi 0.25 mL pročišćenog enzimskog ekstrakta zajedno s 0.25 mL 0.1 M acetatnog pufera (pH=5.0). Jednaka količina enzimskog ekstrakata i acetatnog pufera se stavi u dvije epruvete. U jednu se doda 0.25 mL0.1 % alkoholne otopine kolornog reagensa karbazola, a u drugu 0.25 mL 95 % etanola.

U obje epruvete se doda, uz neprestano miješanje, 3 mL koncentrirane sumporne kiseline u roku od 7 sekundi kako bi se postigla temperatura od 85°C. Nakon toga epruvete se brzo urone u vodenu kupelj 5 minuta na 85°C, ohlade i nakon 15 minuta mjeri se apsorbancija probe prema usporednoj otopini pri 525 nm.

Slijepa proba se priprema na isti način kao i uzorak, samo što se umjesto uzorka uzima destilirana voda.

Za mjerenje se pripremaju 4 otopine:

* 1. 0.25 mL pročišćenog ekstrakat +0.25 mL 0.1 M acetatnog pufera (pH=5.0) +0,25 mL otopine karbazola + 3 mL koncentrirane sumporne kiseline
  2. 0.25 mL pročišćenog ekstrakta + 0.25 mL 0.1 M acetatnog pufera (pH=5.0) + 0.25 mL 95 % EtOH + 3 mL koncentrirane sumporne kiseline
  3. 0.5 mL destilirane vode + 0,25 mL otopine karbazola + 3 mL koncentrirane sumporne kiseline
  4. 0.5 mL destilirane vode + 0,25 mL 95 % EtOH + 3 mL koncentrirane sumporne kiseline

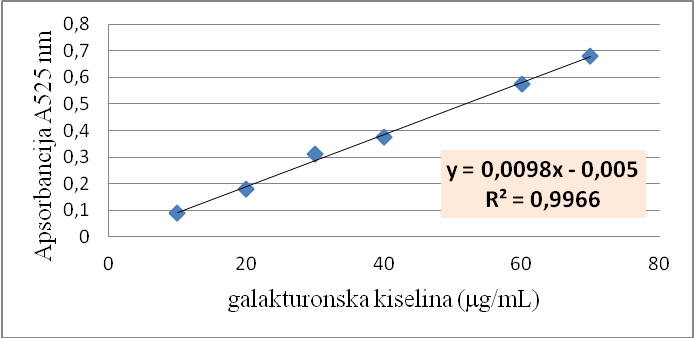
Mjerenje se provodi na sljedeći način:

1) nasuprot 2) predstavlja apsorbanciju A

3) nasuprot4) predstavlja apsorbanciju B

Izrada baždarnog pravca

Kao standard za kolorimetrijsko određivanje pektina koristi se galakturonska kiselina. Baždarni pravac (slika 7.) je izrađen korištenjem pripremljenih otopina standarda galakturonske kiseline (10-70 µg/mL) (vidi *Priprema reagensa, točka 5*). Proračun je napravljen prema dobivenoj jednadžbi pravca.



*Slika 7.* Baždarni pravac za GA dobiven primjenom karbazol metode

Uzimajući u obzir razrjeđenje (2 puta) prilikom analize, izračuna se koncentracija GA, pomoću jednadžbe pravca:

Y = 0.0098 × X – 0.005, R2 = 0,9991;

gdje je:

X - koncentracija galakturonske kiseline (μg/mL)

Y = Yt - Yo

Yt = At - B

Yo = Ao - B

At - apsorbancija inkubiranog uzorka pri 525 nm

Ao - apsorbancija uzorka prije inkubacije pri 525 nm

B = 0.031 (apsorbancija slijepe probe)

Konačan rezultat je izražen kao μg GA/ g suhe tvari.

#### 3.2.2.3. Razrada metode za određivanje aktivnosti PG

Određivanje aktivnosti poligalakturonaze prema metodi Anthon i Barrett (2002) i Kono i sur. (1981) temelji se na izolaciji enzima iz tkiva mrkve te određivanju njezine aktivnosti. Aktivnost je određivana indirektno. U enzimski ekstrakt dodaje se poligalakturonska kiselina kao supstrat, te se smjesa inkubira i u slučaju prisutne enzimske aktivnosti dolazi do oslobađanja galakturonskih jedinica. Oslobođene galakturonske jedinice se dalje određuju kolorimetrijski. Koncentracija rezidua galakturonske kiseline proizlazi iz razlike u apsorbanciji prije i poslije inkubacije. Kolorna reakcija provodi se odmah i nakon provedene inkubacije.

Prema metodi Anton i Barrett (2002), gdje je režim inkubacije proveden pri 37°C/1h i kolorimetrijskom određivanju reducirajućih šećera orcinol-sulfatnom metodom (Brűcker, 1964), dobiveni rezultati nisu pokazivali logičan slijed jer je izmjerena apsorbancija nakon provedene inkubacije bila niža od vrijednosti apsorbancija prije inkubacije. Zbog toga je provedena modifikacija metode.

***Priprema 0.25 % otopine poligalakturonske kiseline (modifikacija 1)***

Prema metodi Anthon i Barrett (2002) potrebno je pripremiti 0.5 % otopinu poligalakturonske kiseline tako da se 0.5 g poligalakturonske kiseline otopi u 100 mL destilirane vode.

No kako se topljivost poligalakturonske kiseline pokazala lošom, voda se prethodno zagrijavala na 40°C te se otopina tretirala u ultrazvučnoj kupelji, no bezuspješno.

Pod pretpostavkom da će bolja topljivost biti postignuta kod većeg razrjeđenja, pripremljena je 0.25 % otopina poligalakturonske kiseline, uz zagrijavanje na 40°C. Topljivost je bila bolja, no kako standard još uvijek nije bio potpuno otopljen, otopina se centrifugirala pri 5000 rpm/10 min kako bi se istaložile neotopljene čestice. Za daljnju analizu uzet je supernatant.

***Orcinol-sulftna metoda određivanja šećera (modifikacija 2)***

Reagensi

1. 1.6 % -tna otopina orcinola (0.16 g orcinola se otopi u destiliranoj vodi, kvantitativno se prenese u tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake)
2. Razrijeđena sumporna kiselina (H2SO4 : H2O= 3 : 2)
3. Orcinol reagens (1 mL 1.6 % otopine orcinola pomiješa se s 7.5 mL razrijeđene sumporne kiseline)

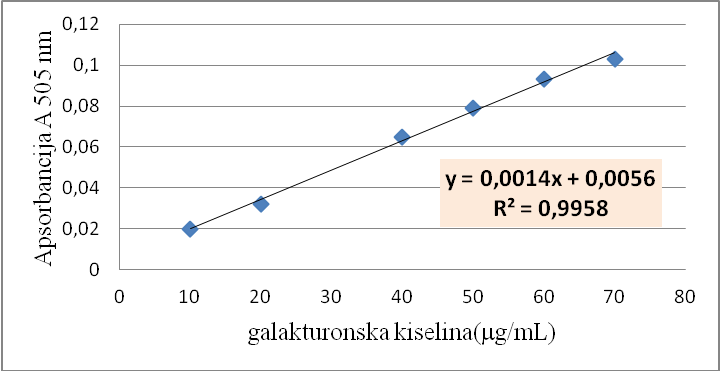
Postupak određivanja

U 1.5 mL pročišćenog enzimskog ekstrakta se doda 0.25 mL 0.25 % poligalakturonske kiseline. 0.5 mL dobivene smjese se izuzme za kolornu reakciju, a preostala smjesa se inkubira pri 37°C/1 h, nakon toga slijedi kolorna reakcija.

Pomiješa se 0.5 mL pročišćenog enzimskog ekstrakta i 4.5 mL orcinol reagensa nakon čega se provodi reakcija u uvjetima temperature 80 °C tijekom 50 minuta, te se nakon hlađenja mjeri apsorbancija.

Slijepa proba se priprema jednako kao i uzorak, ali se umjesto enzimskog ekstrakta koristi destilirana voda.

Baždarni pravac je izrađen korištenjem pripremljenih otopina standarda galakturonske kiseline (10-70 µg/mL), a proračun je napravljen prema dobivenoj jednadžbi.



*Slika 8.* Baždarni pravac za GA dobiven primjenom orcinol-sulfatne metode

Razlika apsorbanci za standardne otopine GA, dobivene primjenom orcinol-sulfatne metode, bile su vrlo niske (slika 8.), kao što su primjenom iste metode bile niske (obzirom da se promatraju razlike apsorbanci prije i nakon inkubacije) i razlike apsorbanci za svježu mrkvu.

*Tablica 6.* Preliminarni rezultati – svježa mrkva

|  |  |
| --- | --- |
| **Uzorci** | **Orcinol-sulfatnametoda**  **(A 505 nm)** |
| Bez inkubacije | 1.502 |
| Inkubacija 1h na37 °C | 1.520 |

Pretpostavljajući da je razlog tome slaba aktivnost enzima, proveden je pokušaj da se pomakne enzimska aktivnost tako da se uzorci svježe mrkve prethodno tretiraju na 37 °C/15 min. Tako tretirani uzorci analizirani usporedno s uzorcima svježe netretirane mrkve.

*Tablica 7.* Preliminarni rezultati – svježa mrkva i mrkva prethodno tretirana na 37°C/15 min

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Uzorci** | **Režim inkubacije** | **Orcinol-sulfatna metoda**  **(A 505 nm)** |
| Sježa mrkva | Bez inkubacije | 1.132 |
| Inkubacija 1h na37 °C | 0.895 |
| Mrkva predhodno tretirana na 37 °C/15 min | Bez inkubacije | 1.008 |
| Inkubacija 1h na37 °C | 1.047 |

Dobiveni rezultati, prikazani u tablici 7., pokazuju da predtretman na 37°C/15 min nije značajno utjecao na aktivnost poligalakturonaze, neovisno o datom režimu inkubacije.

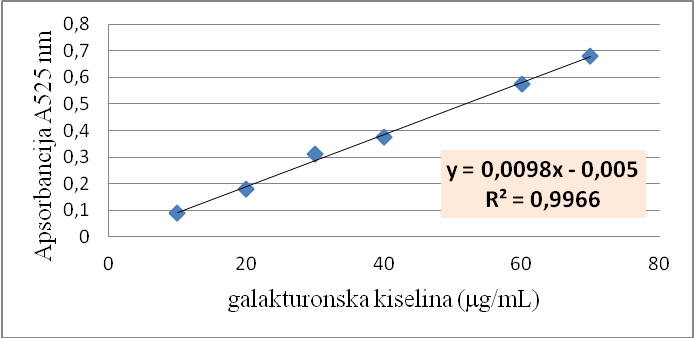
Budući se pokazalo da inkubacija od 1 h na 37°C nije dovoljna za aktivaciju enzima, vrijeme inkubacije je produljeno na 2 sata, a osim orcinol-sulfatne metode, isprobana je i druga kolorimetrijska metoda (karbazol metoda) za određivanje rezidua galakturonske kiseline, prihvaćena za određivanje galakturonske kiseline u postupku određivanja pektinskih tvari (IFU).

***Karbazol metoda (modifikacija 3)***

Kao i kod orcinol-sulfatne metode, u 1.5 mL pročišćenog enzimnog ekstrakta se doda 0.25 mL 0.25 % poligalakturonske kiseline. 0.25 mL dobivene smjese se izuzme za kolornu reakciju, a preostala smjesa se inkubira pri 37°C/1 h, nakon čega ponovno slijedi kolorna reakcija.

Kolorimetrijsko određivanje odvija se prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2.2.

Iz dobivenih baždarnih pravaca (slika 7. i slika 8.) vidljivo je da su za istu koncentraciju standarda, više vrijednosti apsorbancija dobivene primjenom karbazol metode nego primjenom orcinol-sulfatne metode.



*Slika 9.*Baždarni pravac za GA dobiven primjenom karbazol metode

Dobiveni rezultati, prikazani u tablici 9., pokazuju da se primjenom orcinol-sulfatne metode, dobiva negativna razlika apsorbancija prije i poslije inkubacije na 37°C, a produljenjem vremena inkubacije nije došlo do povećanja, već do smanjenja apsorbancije. Primjenom karbazol metode dobivena razlika apsorbancija je također bila negativna kod inkubacije u trajanju 1 h, no produljenjem inkubacije na 2 sata, došlo je do porasta apsorbance nakon inkubacije, te je razlika apsorbanci bila pozitivna.

*Tablica 8.* Preliminarni rezultati – usporedba apsorbancija dobivenih primjenom orcinol-sulfatne metode i karbazol metode te primjenom različitog vremena inkubacije

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Uzorci** | **Orcinol-sulfatna metoda**  **(A 505 nm)** | **Karbazol metoda**  **(A 525 nm)** |
| Bez inkubacije | 0.228 | 0.536 |
| Inkubacija 1h na37 °C | 0.177 | 0.469 |
| Inkubacija 2h na37 °C | 0.161 | 0.550 |

Orcinol-sulfatna metoda je nakon toga odbačena jer su inkubirani uzorci pokazivali manju vrijednost apsorbancija od ne inkubiranog uzorka.

Budući da je primjenom karbazol metode bila mala razlika između apsorbancija nakon inkubacije na 37°C kroz 1 ili 2 sata, kako bi potaknuli aktivnost poligalakturonaze, inkubacija je ovaj put provedena na 48°C kroz 1 i 2 sata.

*Tablica 9.* Preliminarni rezultati–primjena karbazol metode s inkubacijom na 48°C

|  |  |
| --- | --- |
| **Uzorci** | **Karbazol metoda**  **(A 525 nm)** |
| Bez inkubacije | 0.386 |
| Inkubacija 1h na 48 °C | 0.376 |
| Inkubacija 2h na 48 °C | 0.651 |

Dobiveni rezultati, prikazani u tablici 9., pokazuju da primjenom režima inkubacije 48°C/1h nije došlo do povećanja apsorbancije, ali produljenjem vremena inkubacije na 2 sata, apsorbanca je bila gotovo dvostruko veća nego prije inkubacije. Ova vrijednost nalazi se u rasponu koncentracija obuhvaćenih baždarnom krivuljom.

Račun

Prema protokolu za određivanje aktivnosti poligalakturonaze, apsorbance 0.386 i 0.651 predstavljaju vrijednost A.

Eksperimentalno je dobiveno da je vrijednost B 0.031.

Ao(apsorbancija izmjerena prije inkubacije) = 0,355

At (apsorbancijanakon 2 sata inkubacije) = 0,620

At  - Ao = 0,265

Prema jednadžbi baždarnog pravca koncentracija poligalakturonske kiseline je 26.53 μg GA/mL, ali s obzirom na faktor razrjeđenja (f=2) koncentracija je 53.06 μg GA/mL.

Suha tvar mrkve iznosila je 11,8 g/100g

10 g mrkve razrjeđeno je s 5 mL vode, homogenizirano i filtrirano.

1 mL uzet je za daljnju analizu.

Iz toga proizlazi da je 53.06 μg GA/mL = 671 μg GA/ g suhe tvari.

Konačni rezultat kojim se izražava aktivnost poligalakturonaze je 335 μg GA/ g s.tv.

***Zaključak***

Prema dobivenim rezultatima, režim inkubacije na 48°C u trajanju od 2 sata i određivanje rezidua galakturonske kiseline primjenom karbazol metode, se smatra optimalnim u određivanju aktivnosti poligalakturonaze zbog čega je u radu primjenjena upravo ova metoda.

### 3.2.3. Određivanje aktivnosti pektin metilesteraze

Princip metode

Nakon provedene ekstrakcije enzima određivanje aktivnosti PME provodilo se pomoću metode opisane u radu Velazquez-Estrada i sur. (2011). Princip određivanja enzimske aktivnosti temelji se na titrimetrijskoj metodi pomoću pH metra mjereći oslobođene karboksilne grupe nastale hidrolizom metil-esterskih grupa sa pektinskog lanca djelovanjem pektin metilesteraze u određenom vremenskom intervalu od 30 minuta.

Aktivnost jedne jedinice PME je definirana kao 1 µmol karboksilnih grupa po minuti pri pH od 7.5 prema Velazquez-Estrada i sur. (2011).

Aparatura i pribor:

1. pH metar (S20 SevenEasy, Mettler-Toledo, Switzerland),
2. magnetska mješalica (IKA®-WERKE, RT 5P,Germany),
3. analitička vaga (Kern, ABT 220-4M, Kern &Sohn GmbH),
4. ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex),
5. mikropipeta od 1000 µL,
6. termostat
7. čaše 20 i 30 mL
8. odmjerne tikvice 100 mL
9. pipeta 20 Ml

Reagensi (vidi *modifikacija 1*)

1. 0.3 M NaCl
2. 0.02 M NaOH
3. 1% otopina pektina (Grinsted pectin SS200)

Priprema reagensa (vidi *modifikacija 2*)

1. *Priprema 0.3 M NaCl*

Na analitičkoj vagi se odvaže 1.7533 g NaCl i potpuno otopi u manjoj količini destilirane vode te se otopina kvantitativno prenese u tikvicu od 1000 mL te nadopuni do oznake.

1. *Priprema 0.02 M NaOH*

20 mL 0.1 M NaOH se otpipetira u tikvicu od 100 mL te se razrijedi sa destiliranom vodom do oznake.

1. *Priprema 1% otopine pektina (Grinsted pectin SS200) (vidi modifikacija 3)*

1 g praha citrusnog pektina se odvaže na analitičkoj vagi te otopi u manjoj količini, oko 30 mL u 0.3 M NaCl uz upotrebu magnetske miješalice i temperature od 30°C. Nakon toga, otopina se kvantitativno prenese u tikvicu od 100 mL i nadopuni s 0.3 M NaCl do oznake.

Postupak određivanja (vidi *modifikacija 4*)

U 1.25 mL profiltriranog enzimskog ekstrakta dodaje se 12.5 mL *(vidi modifikacija 5)* 1% pektinske otopine držeći na temperaturi od 30°C. Uzorak se potom titrira s 0.02 M NaOH uz kontinuirano miješanje na magnetskoj mješalici i mjerenje pH vrijednosti pomoću pH elektrode uronjene u uzorak. Kad se pH vrijednost stabilizira na 7.5, mjeri se vrijeme od točno 30 minuta (Rouse, 1955; Velazquez-Estrada i sur., 2011).

Prikaz rezultata (vidi *modifikacija 6*)

Prema Velazquez-Estrada i sur. (2011) aktivnost jedne jedinice PME je definirana kao 1 µmol karboksilnih grupa po minuti pri pH od 7.5.

Izračun enzimske aktivnosti slijedi prema formuli (1) Velazquez-Estrada i sur. (2011):

U(PME)/mL= (1)

#### 3.2.3.1. Razrada metode za određivanje aktivnosti PME

Obzirom da se prema metod Bi i sur (2011) provodila ekstrakcija enzima, isti je rad korišten prvotno i za određivanje aktivnosti PME u kojem se opisana metoda zasniva na mjerenju potrebnog vremena da se pH spusti sa 7.5 na 7.0. Metoda Bi i sur. (2011) te metoda Velazquez-Estrada i sur. (2011) baziraju se na istoj činjenici, mjere se oslobođene karboksilne grupe nastale hidrolizom metil esterskih grupa sa pektinskog lanca, primjenjuje se titrimetrijsko određivanje te se enzimskom ekstraktu dodaje pektinska otopina, no različito je vrijeme trajanja analize. Pa je tako kod Bi i sur. (2011) metode vrijeme nedefinirano a kod Velazquez\_Estrada i sur. (2011) je točno definirano vrijeme od 30 minuta trajanja analize.

Preliminarni rezultati dobiveni primjenom metode Bi i sur. (2011) prikazani su u tablici 10.

*Tablica 10.* Preliminarni rezultati – svježa mrkva

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| UZORAK | V(0.1 M NaOH)  (mL) | V(0.01 M NaOH)  (mL) | T (min) | pH | AKTIVNOST  (U/mL) |
| SM 1\* | 0.500 | 0.160 | 52 | 7.090 | 0.080 |
| SM 2\* | 0.800 | 0.250 | 60 | 7.450 | 0.121 |
| SM 3\* | 0.400 | 0.100 | 34 | 7.220 | 0.050 |

\*Svježa, netretirana mrkva

Zbog slabe aktivnosti PME pokušalo se mrkve istih uzoraka tretirati na način da se poveća njezina aktivnost pa su tako uzorci prethodno tretirani na 37°C/15 min.

*Tablica 11.* Preliminarni rezultati – termostatirana mrkva na 37°C/15 min

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| UZORAK | V(0.1 M NaOH)  (mL) | V(0.0. M NaOH)  (mL) | T (min) | pH | AKTIVNOST  (U/mL) |
| TM 1\* | 0.400 | 0.750 | 60 | 7.120 | 0.165 |
| TM 2\* | 0.400 | 0.200 | 60 | 7.050 | 0.073 |
| TM 3\* | 0.400 | 0.160 | 32 | 7.050 | 0.090 |

\*Termostatirana mrkva na 37°C kroz 15 minuta

Rezultati tako korištene metode (tablica 12.) pokazali su da se pH vrijednost spušta u zadanom intervalu, od pH 7.5 do pH 7.0 kroz vrlo različit vremenski period.

Iz prikaza rezultata (tablica 11.) utvrđeno je da nema ponovljivosti u dobivenoj aktivnosti istog uzorka jer se u ispitivanim uzorcima pH vrijednost od 7.5 do 7.0 spuštala i podizala bez vremenske pravilnosti.

U svrhu utvrđivanja jednostavne, brze a ujedno i dovoljno učinkovite metode za analizu enzimske aktivnosti pristupilo se pretraživanju literature tražeći odgovarajuću metodu. U literaturi je nađena metoda opisana u radu Velazquez i sur. (2011) koja je ispitana i obzirom da su se dobivali zadovoljavajući rezultati dalje se koristila u radu. Princip određivanja enzimske aktivnosti također se temelji na titrimetrijskoj metodi pomoću pH metra mjereći oslobođene karboksilne grupe nastale hidrolizom metil-esterskih grupa sa pektinskog lanca djelovanjem pektin metilesteraze. Razlika je u tome što je u metodi Bi i sur. (2011) vrijeme bilo neodređeno, dok s druge strane, metodom Velazquez-Estrada i sur. (2011) vremenski interval određivanja enzimske aktivnosti je bio strogo definiran. Time su se dobili bolji rezultati zbog čega je metoda Velazque-Estrada i sur. (2011) korištena u daljnjem radu.

U svrhu istraživanja učinkovitosti različitih procesa, aktivnost PME može biti izražena kao postotak preostale aktivnosti (residual activity,RA) (Velazquez, 2011.).

(RA) predstavlja omjer enzimske aktivnosti u uzorcima nakon HPCD tretmana i početne enzimske aktivnosti u netretiranim uzorcima.

*Tablica 12.* Preliminarni rezultati PME aktivnosti u svježoj mrkvi (prema radu Velazquez,2011.)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **UZORAK** | **V (0.02 M NaOH)**  **(mL)** | **T (min)** | **pH NAKON 30 MIN** | **AKTIVNOST**  **(U/mL)** |
| **SV 1\*** | 0.030 | 30 | 7.400 | 0.016 |
| **SV 2\*** | 0.030 | 30 | 7.390 | 0.016 |

\*Svježa mrkva

*Tablica 13.* Preliminarni rezultati PME aktivnosti u termički tretiranoj mrkvi (prema radu Velazquez,2011.)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **UZORAK** | **V(0.02 M NaOH)**  **(mL)** | **T (min)** | **pH NAKON 30 MIN** | **AKTIVNOST**  **U/ mL** |
| **TM 1\*** | 0.090 | 30 | 7.250 | 0.048 |
| **TM 2\*** | 0.080 | 30 | 7.270 | 0.045 |

\*termostatirana mrkva na 37°C kroz 15 minuta

***Reagensi (modifikacija 1)***

U prvoj metodi koristili smo NaOH različitih koncentracija u svrhu titriranja do pH 7.2 sa koncentriranijom lužinom te za titraciju do pH 7.5 sa slabijom lužinom. Prema literaturnom navodu Bi i sur. (2011) to je bilo u svrhu što preciznijeg postizanja pH 7.5.

Reagensi

1. 0.1 M NaOH
2. 0.01 M NaOH
3. 0.25 M NaCl
4. 0.25 % pektinska otopina (Grinsted pectin SS200)

***Priprema reagensa (modifikacija 2)***

Obzirom da smo u prvotnoj metodi koristili različite kemikalije i sama priprema istih se smatra modifikacijom.

Priprema reagensa

1. *Priprema 0.1 M NaOH*

Na analitičkoj vagi se odvaže 4 g NaOH i potpuno otopi u manjoj količini destilirane vode te se otopina kvantitativno prenese u tikvicu od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

1. *Priprema 0.01 M NaOH*

10 mL 0.1 M NaOH se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te se razrijedi s destiliranom vodom do oznake.

1. *Priprema 0.25 M NaCl*

Na analitičkoj vagi se odvaže 14.610 g krutine NaCl i potpuno otopi u manjoj količini destilirane vode te se otopina kvantitativno prenese u tikvicu od 1000 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

1. *Priprema 0.25 % pektinske otopine*

0.25 g praha citrusnog pektina se odvaže na analitičkoj vagi te otopi u volumenu od cca 30 mL 0.25 M NaCL uz upotrebu magnetske miješalice i temperature od 30°C. Nakon što se prah pektina otopi, otopina se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni s 0.25 M NaCl do oznake.

***Mehanizam otapanja pektina (modifikacija 3)***

Modifikacija 3 je u biti modifikacija unutar modifikacije 2 jer je primjenom koncentriranije otopine pektina priprema iste zahtijevala određene promjene.

Kako je topljivost pektina u otopini izostala, vjerojatno zbog 4 puta veće koncentracije pektina u skoro istom volumenu, temperatura se povećala na 50°C. Topljivost je time bila bolja no još se uvijek prah pektina nije sasvim otopio, pa se otopina tretirala i u ultrazvučnoj kupelji čime su konačno postignuti zadovoljavajući rezultati.

***Modifikacija 4***

U 1 mL profiltriranog enzimskog ekstrakta dodaje se 19 mL 0.25% pektinske otopine te se miješanjem na magnetskoj miješalici sadržaj homogenizira nakon čega se provede titracija držeći uzorak cijelo vrijeme u vodenoj kupelji na 30°C. Početni pH uzorka je bio između 3,5 i 4,5.

Prvo se titrira s 0.1 M NaOH paralelno miješajući i mjereći pH vrijednost pomoću pH elektrode uronjene u uzorak. Nakon postignute pH vrijednosti od 7.2 titrira se s 0.01 M NaOH do pH vrijednosti od 7.5.

Od trenutka kad pH vrijednost dosegne vrijednost 7.5 mjeri se vrijeme potrebno da se pH spusti na 7.0.

U ispitivanim uzorcima pH vrijednost od 7.5 do 7.0 spuštala se i podizala bez vremenske pravilnosti te se iz tog razloga modificirao način određivanja PME aktivnosti.

***Modifikacija 5***

Zbog utvrđenih malih vrijednosti aktivnosti PME, na temelju kojih se nije mogla dobiti ponovljivost rezultata u analiziranim uzorcima, povećana je koncentracija pektina, smatrajući da će pridonijeti boljim rezultatima. U tu svrhu se umjesto dodanih 19 mL 0,25% pektinske otopine u 1 mL enzimskog ekstrakta u prvoj metodi dodalo 12,5 mL 1% pektinske otopine u 1,25 mL enzimskog ekstrakta.

***Modifikacija 6***

Prema Bi i sur. (2011.), jedna jedinica aktivnosti pektin metilesteraze je definirana kao broj oslobođenih karboksilnih grupa u jednoj minuti. Međutim, u radu se ne navodi formula za izračunavanje. Formula je navedena u radu (Reed, 1996), gdje je enzimska aktivnost izražena u jedinicama aktivnosti PME po mL a računa se prema prikazanoj formuli (1) :

(1)

Obzirom da su se prema metodi Bi i sur. (2011) koristile dvije otopine NaOH različitih koncentracija formula (1) za izračunavanje je modificirana te se u prikazu aktivnosti koristila formula (2):

*U (PME)/ m L*= (2)

gdje je:

V1= volumen jake lužine (0.1 NaOH)

M2= koncentracija jake lužine

V2= volumen slabe lužine (0.01 NaOH)

M2= koncentracija slabe lužine

# 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je, uz razradu metode za određivanje aktivnosti PG i PME, ispitati utjecaj HPCD tretmana, provedenog pri različitom temperaturnom režimu, kao i utjecaj skladištenja tretiranih uzoraka na enzimsku aktivnost PG i PME u mrkvi.

Vrlo je malo dostupnih literaturnih podataka s tom tematikom, a naročito onih koje se odnose na utjecaj HPCD tretmana na aktivnost PG. Naime, prema našim saznanjima ne postoje objavljeni rezultati o utjecaju HPCD na aktivnost PG u mrkvi, pa su usporedbe literaturnih podataka s rezultatima dobivenim u ovom radu samo djelomično moguće.

Uzorci mrkve bili su tretirani tlakom od 120 bar uz prisutnost CO2, pri temperaturama od 22 °C i 40 °C u vremenskom periodu od 5 min, 10 min, 15 min, 30 min i 45 min.

## 4.1. Određivanje aktivnosti poligalakturonaze

Aktivnost PG u uzorcima mrkve tretirane HPCD tretmanom, pri tlaku od 120 bar i različitim temperaturnim režimima, prikazana je u tablici 14.

*Tablica 14.* Aktivnost PG u uzorcima mrkve

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **TRETMAN** | | | **AKTIVNOST PG** | |
| **(μg/mL)** | **(μg/g s.tv.)** |
| **0** | | | 1,696 | 2,542 |
| **120 bar** | **22 °C** | **5 min** | 2,672 | 4,005 |
| **10 min** | 2,705 | 4,055 |
| **15 min** | 4,007 | 6,007 |
| **30 min** | 4,822 | 7,230 |
| **45 min** | 3,160 | 4,737 |
| **40 °C** | **5 min** | 1,439 | 2,158 |
| **10 min** | / | / |
| **15 min** | / | / |
| **30 min** | / | / |
| **45 min** | / | / |

U tablici 14. je prikazana aktivnost PG izražena kao koncentracija rezidua galakturonske kiseline u μg/mL uzorka, preračunata na topljivu suhu tvar mrkve. Vidljivo je kako svi uzorci tretirani na 22 °C, bez obzira na trajanje tretmana, pokazuju veću PG aktivnost od netretiranog uzorka i uzoraka tretiranih na 40 °C. Iz toga se može zaključiti kako tretman proveden na 22 °C uopće ne inaktivira aktivnost PG.

Uočen je značajan porast aktivnosti PG tretiranjem pri 22 °C, u vremenu od 5 do 30 minuta, s najvećom aktivnošću upravo pri 22 °C/30 min, nakon čega aktivnost opada, ali još uvijek je gotovo dvostruko veća od PG aktivnosti u netretiranom uzorku. Može se zaključiti kako HPCD tretman na 22 °C ima suprotan učinak od očekivanog, naime umjesto smanjenja, došlo je do povećanja PG aktivnosti.

S druge strane, tretman pri 40 °C, već nakon 5 minuta u potpunosti inaktivira PG.

Rezidualna aktivnost, odnosno aktivnost PG preostala nakon provedenog tretmana, prikazana je na slici 10. RA, izražena u postocima, u ovom slučaju predstavlja enzimsku aktivnost tretiranih uzoraka u odnosu na netretiranu i neskladištenu mrkvu (RA netretirane i neskladištene mrkve iznosi 100 %).

***Slika 10.* Rezidulana aktivnost (RA) PG u mrkvi nakon HPCD tretmana**

Iz slike 10. je jasno vidljivo kako mrkva tretirana na 22 °C, u svim slučajevima pokazuje rezidualnu aktivnost iznad 100 %, a kod uzorka tretiranog pri 22 °C/30 min iznosi čak 284.39 %. Rezidualna aktivnost ispod 100 % uočena je tek pri 40 °C/5 min (84.88 %), a daljnjim produljenjem vremena trajanja HPCD tretmana, aktivnost PG se u potpunosti gubi.

Prema Anthon i Barrett (2002) potrebno je primijeniti višu temperaturu blanširanja za inaktivaciju PG nego PME u mrkvi. Ukoliko je moguće napraviti usporedbu između blanširanja i HPCD tretmana, može se zaključiti kako je za inaktivaciju PG, za razliku od PME, potrebno primijeniti više temperature prilikom provođenja HPCD tretmana, isto kao i prilikom blanširanja. Prednost HPCD tretmana pred blanširanjem je u tome što primjenom relativno blagog temperaturnog tretmana biološki aktivni, termolabilni spojevi uvelike ostaju očuvani (Goncalves i sur.,2005), dok je za inaktivaciju PG blanširanjem potrebno primijeniti temperaturu iznad 75 °C (Anthon i Barrett, 2002) prilikom čega može doći do gubitka termolabilnih komponenti, što može utjecati na kvalitetu same mrkve.

Shook i sur. (2001) su istraživali utjecaj procesiranja visokim tlakom na inaktivaciju lipoksigenaza, PME i PG u rajčici. Procesni parametri uključivali su tlakove od 400, 600 i 800 MPa kroz 1, 3 i 5 minuta na 25 °C i 45 °C. Povećanje magnitude tlaka imalo je značajan utjecaj na inaktivaciju lipoksigenaze i poligalakturonaze (p < 0.05), te su tek pri 800 MPa bili u potpunosti inaktivirani. Ovdje je vidljivo kako je primjenom samo visokog tlaka, za inaktivaciju PG potrebno primijeniti čak oko 65 puta veći tlak nego kad se primjenjuje HPCD tretman koji uključuje kombinaciju visokog tlaka, ugljičnog dioksida i blagog termičkog režima. Primjenom visokih tlakova (iznad 100 MPa) može doći do promjene u teksturi (Herceg, 2009), što može narušiti kvalitetu proizvoda.

## 4.2. Određivanje aktivnosti poligalakturonaze tijekom skladištenja

Netretirani uzorci mrkve i oni tretirani pri 40 °C, skladišteni su na 4 °C kroz 4 tjedna, dok su uzorci tretirani HPCD tretmanom pri 22 °C, skladišteni kroz vremenski period od 2 tjedna. Utjecaj skladištenja na aktivnost PG (izražena u μg/mL) prikazana je na slikama 11. a, b, c.



*Slika 11.* Aktivnost PG (µg/mL) tijekom skladištenja:

a)netretirana mrkva; b) HPCD, 22 °C/15 min; c) HPCD, 40 °C/15 min

Iz slike 11. a vidljivo je kako je kod skladištenja netretiranog uzorka, nakon tjedan dana, došlo do porasta enzimske aktivnosti, ali nakon toga aktivnost ponovno opada i ostaje konstantna do kraja skladištenja.

Jednaki trend uočen je i pri skladištenju mrkve tretirane HPCD tretmanom pri temperaturnom režimu 40 °C/15 min (slika 11. c), gdje se prvotno inaktiviranom enzimu, nakon tjedan dana skladištenja, ponovno javila aktivnost. Postoji mogućnost da se prvotni porast aktivnosti javio kao posljedica utjecaja visokog tlaka na proteine, naime, tlakovi ispod 300 MPa (u našem slučaju tlak iznosi 12 MPa) uzrokuju reverzibilnu denaturaciju proteina. Poznato je da visoki tlak ima snažan utjecaj na kvarternu strukturu zbog hidrofobnih interakcija, dok je tercijarna struktura također osjetljiva na djelovanje visokog tlaka zbog odmatanja peptidnih lanaca. Utjecaj na sekundarnu strukturu je slabiji, jer do pucanja vodikovih veza dolazi tek pri jako visokom tlaku, što nije slučaj kod HPCD tretmana. No primarna struktura tijekom tretiranja ostaje netaknuta zbog kovalentnih veza koje su otporne na djelovanje visokog tlaka. Do puknuća kovalentne veze, a samim time i do ireverzibilne denaturacije, dolazi tek primjenom viših temperatura, što kod HPCD tretmana također nije slučaj (Herceg, 2009).

U istraživanju Tijskens i sur. (1998), gdje je praćen utjecaj skladištenja na aktivnost PG u breskvi, također je primijećeno povećanje aktivnosti tijekom rane faze skladištenja, te smanjenje aktivnosti tijekom kasne faze skladištenja. Takvo ponašanje aktivnosti PG, Tijskens i sur. (1998) objašnjavaju mehanizmom karakterističnim za bilo koji enzim prisutan u živom tkivu, gdje se aktivna PG generira iz enzimski neaktivnog prethodnika te se istovremeno enzimska aktivnost smanjuje zbog denaturacije PG. Naime, povećanje aktivnosti, odnosno sinteza enzima (*de novo*) se može zaustaviti daljnjom denaturacijom enzima.

Zheng i sur. (2012) su također uočili kako u mangu, skladištenjem pri sobnoj temperaturi, aktivnost PG prvotno raste, te se počinje smanjivati nakon 12 dana skladištenja, što je u korelaciji s rezultatima dobivenim u ovom radu.

Slika 11.b prikazuje utjecaj skladištenja na 4 °C kroz 2 tjedna, na aktivnost PG u mrkvi tretiranoj HPCD tretmanom na 22 °C kroz 15 min.

Trend promjene aktivnosti PG u ovom slučaju je nešto drugačiji nego što je to u netretiranoj mrkvi i mrkvi tretiranoj pri 40 °C/15 min. Naime, prilikom skladištenja tako tretirane mrkve, enzimska aktivnost od početka opada.

Unatoč razlikama u aktivnosti PG između različito tretiranih uzoraka u početnoj fazi skladištenja, u završnoj fazi skladištenja, u svim slučajevima uočava se trend smanjena aktivnosti, što se može objasniti prirodnom degradacijom enzima u biljnom tkivu (Tijskens i sur., 1997).

U tablici 15. također je prikazan utjecaj skladištenja na aktivnost PG u tretiranim, odnosno netretiranom uzorku, ali preračunat na suhu tvar. Aktivnost PG izražena je u µg/g suhe tvari.

*Tablica 15.* Aktivnost poligalakturonaze ( izražena u µg/g suhe tvari) u uzorcima mrkve tijekom skladištenja

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **TRETMAN** | | **SKLADIŠTENJE**  **(tjedni)** | **AKTIVNOST PG** |
| **(μg/g suhe tvari)** |
| **0** | | **0** | 2,342 |
| **1** | 3,981 |
| **2** | 1,451 |
| **3** | 1,301 |
| **4** | 1,364 |
| **120 bar** | **22 °C/**  **15 min** | **0** | 6,007 |
| **1** | 2,641 |
| **2** | 2,009 |
| **40 °C/**  **15 min** | **0** | 0 |
| **1** | 3,769 |
| **2** | 1,723 |
| **3** | 1,519 |
| **4** | 1,972 |

Odnosi između aktivnosti PG prikazani na ovaj način se podudaraju s odnosima između enzimske aktivnosti, ovisno o procesnim parametrima HPCD tretmana i periodu skladištenja, izražene u µg/mL. I u ovom slučaju vidljivo je kako u netretiranoj mrkvi i onoj tretiranoj HPCD tretmanom pri 40 °C/15 min, nakon prvog tjedna dolazi do porasta aktivnosti PG, no nakon toga njena aktivnost ponovno pada, dok je kod mrkve tretirane pri 22 °C/15 min, već nakon prvog tjedna skladištenja primijećen značajan pad enzimske aktivnosti.

Rezidualna aktivnost PG u skladištenoj netretiranoj i skladištenoj tretiranoj mrkvi prikazana je na slici 12.

*Slika 12.* Rezidualna aktivnost (RA) PG u tretiranoj mrkvi nakon skladištenja pri 4°C

Iz slike 12. vidljivo je kako je rezidualna aktivnost nakon prvog tjedna skladištenja, u netretiranoj mrkvi i mrkvi tretiranoj HPCD tretmanima pri 40 °C/15 min, bila iznad 100 %, dok u mrkvi tretiranoj pri 22 °C RA iznosi oko 100 %.

Nakon 2 tjedna, pa sve do kraja skladištenja, RA skladištenog, netretiranog uzorka i uzorka tretiranog pri 40 °C/15 min, bila je manja od 100 % (između 57.07 i 51.19 % u netretiranom uzorku te između 77.53 i 59.73 % u uzorku tretiranom na 40 °C kroz 15 min).

Rezidualna aktivnost skladištenog uzorka tretiranog HPCD tretmanom pri 22 °C/15 min, nakon 2 tjedna iznosila je 79 %.

Vrlo je važno napomenuti kako je nakon 4 tjedna skladištenja došlo do kvarenja mrkve tretirane pri 40 °C/15 min. Naime, na površini je uočena bijela sluz neugodnog mirisa, što upućuje da takva mrkva nije za konzumaciju. Za razliku od tretirane, netretirana mrkva je kroz čitav period skladištenja zadržala prihvatljiva senzorska svojstva. Naime, boja, miris i tekstura netretirane mrkve, ostali su nepromijenjeni tijekom cijelog perioda skladištenja. Iz ovog se može zaključiti kako je u budućim istraživanjima potrebno dodatno istražiti ovu problematiku i sukladno s time podesiti određene procesne parametre HPCD tretmana, kako bi se što dulje očuvala kvaliteta mrkve.

Može se uočiti kako je RA skladištenih uzoraka netretirane mrkve i one tretirane HPCD tretmanom pri temperaturnom režimu 40 °C/15 min vrlo slična prema čemu možemo zaključiti da PG nije odgovorna za kvarenje mrkve.

Prethodno navedeni rezultati se slažu s literaturnim navodima (Anthon i Barrett., 2002) koji navode kako fiziološka uloga PG u tkivu korjenastog povrća poput mrkve, još uvijek nije sasvim poznata i istražena, a u ovom radu je određivana zbog njene poznate termostabilnosti, pa se može uzeti kao kontrolni parametar u ispitivanju ukupne enzimske aktivnosti u biljnom tkivu.

## 4.3. Određivanje aktivnosti pektin metilesteraze

Aktivnost PME u uzorcima mrkve tretirane HPCD tretmanom, pri tlaku od 120 bar i različitim temperaturnim režimima prikazana je u tablici 16.

*Tablica 16*. Aktivnost PME u uzorcima mrkve

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **TRETMAN** | | | **AKTIVNOST PME** | |
| **(U/mL)** | **(U/g s.tv.)** |
| **0** | | | 0,045 | 0,068 |
| **120 bar** | **22 °C** | **5 min** | 0,045 | 0,068 |
| **10 min** | 0,059 | 0,088 |
| **15 min** | 0,032 | 0,048 |
| **30 min** | 0,021 | 0,032 |
| **45 min** | 0,016 | 0,024 |
| **40 °C** | **5 min** | 0,013 | 0,020 |
| **10 min** | 0,011 | 0,016 |
| **15 min** | 0,005 | 0,008 |
| **30 min** | 0,000 | 0,000 |
| **45 min** | 0,000 | 0,000 |

U tablici 16. je prikazana aktivnost PME izražena u jedinicama aktivnosti PME po mL te preračunata na topljivu suhu tvar mrkve.

PME aktivnost izmjerena u netretiranom uzorku je bila 0,045 U/mL, jednako kao i u tretiranom uzorku na 22 °C kroz 5 minuta. U uzorku tretiranom na 22 °C kroz 10 minuta PME aktivnost se povećala i bila je najviša od svih uzoraka. U uzorcima tretiranima pri 22 °C ali kroz duži vremenski period, 15, 30, 45 minuta, aktivnost se očito smanjivala.

Prema rezultatima iz tablice 16., tretman pri 40 °C je drugačije utjecao na aktivnost PME u tretiranim uzorcima. Vrijednost aktivnosti PME u uzorku tretiranom samo 5 minuta na 40 °C je više od tri puta smanjena u odnosu na netretirani, kontrolni uzorak. Što je duže vrijeme tretiranja to se aktivnost više smanjuje. Nakon 30 minuta tretmana na 40 °C nije zabilježena aktivnost PME. Prema tome, tretman na 40 °C kroz 30 i 45 minuta uzrokuje potpunu inaktivaciju PME.

U svrhu istraživanja učinkovitosti procesa, aktivnost pojedinog enzima se izražava i prikazuje kao postotak rezidualne aktivnosti (RA) (Velazquez, 2011.).

Rezidualna aktivnost predstavlja omjer enzimske aktivnosti u uzorcima nakon HPCD tretmana i početne enzimske aktivnosti u netretiranim uzorcima.

Rezidualna aktivnost PME u uzorcima tretiranima HPCD-om sa 120 bara te temperaturom od 22 °C i 40 °C prikazana je na slici

*Slika 13*. Rezidualna aktivnost (RA) PME u mrkvi nakon HPCD tretmana

Iz prikaza rezidualne aktivnosti (slika 13.) vidi se nagli porast aktivnosti PME od 129,41% u uzorku tretiranom na 22°C kroz 10 minuta u odnosu na ne tretiranu mrkvu. Daljnjim tretiranjem kroz 15, 30 i 45 minuta uočen je pad aktivnosti. Najmanja rezidualna aktivnost postignuta u uzorcima tretiranima HPCD-om na 22°C je 35,29%.

Slično tome, Bi i dr. (2011) su istraživali utjecaj HPCD tretmana pri tlaku od 5 MPa i 20°C kroz 2, 3, 5, 12 i 15 minuta te je također uočeno povećanje a zatim smanjenje aktivnosti PME ovisno o trajanju samog tretmana te je u njihovom istraživanju minimalna aktivnost iznosila 52,8 % kod 5 MPa, 20°C kroz 15 minuta.

Takvo ponašanje enzima je dokazano i u istraživanju Niu i dr. (2010) kojima se pri tlaku od 20 MPa, 25°C i kroz 20 minuta tretmana aktivnost naglo počne smanjivati a najmanja postignuta rezidualna aktivnost je bila 47,2%.

Zenghui Xu i sur. (2011) su u svom radu iznijeli pretpostavku da takvo ponašanje PME leži u pojavi fragmentacije stanične stjenke koja nastaje kao rezultat djelovanja HPCD tretmana. Fragmentacija ide u prilog PME jer joj je time povećana dostupnost pektinu te je kao rezultat vidljivo naglo povećanje PME aktivnosti.

S druge strane, u uzorcima tretiranima na 40°C rezidualna aktivnost je jako mala. U odnosu na kontrolni uzorak vrijednosti preostale aktivnosti su do 4 puta manje. Najviša rezidualna aktivnost je zapažena u uzorku tretiranom na 40°C kroz 5 min te iznosi svega 29,41%. U uzorcima tretiranima na 40°C kroz 30 i 45 minuta nije utvrđena rezidualna aktivnost.

Uglavnom, iz priloženog može se zaključit da se preostala aktivnost PME linearno smanjuje kroz vrijeme od 0-60 minuta.

Xu i dr. (2011) su tretirali sok od jabuke sa 22 MPa i kad je temperatura povećana na 60°C PME aktivnost je lagana padala. Minimalna preostala aktivnost je iznosila 14,5%.

Također, Niu i sur., (2010) su utvrdili minimalnu preostalu aktivnost PME u kriškama jabuke tretiranima sa 20 MPa, na 65°C te kroz 20 minuta.

Zenghui Xu i sur.(2011) su pri vrijednostima tlaka od 22 MPa, temperaturi 60°C i kroz 10 minuta trajanja tretmana utvrdili smanjenje aktivnosti za 58,3%.

Također, Zhi i dr. (2008) su utvrdili da se inaktivacija PME povećava sa povećanjem temperature od 35°C do 55°C. U svom istraživanju, maksimalnu redukciju aktivnosti od čak 94,57% su postigli kod tlaka od 30 MPa, 60°C kroz 60 minuta tretiranja.

Time se može zaključiti da se aktivnost PME linearno smanjuje povećanjem vremena trajanja HPCD tretmana i temperature neovisno o primijenjenom tlaku.

## 4.4. Određivanje aktivnosti pektin metilesteraze tijekom skladištenja

Netretirani uzorci mrkve i oni tretirani pri 40 °C, skladišteni su na 4 °C kroz 4 tjedna, dok su uzorci tretirani HPCD tretmanom pri 22 °C, skladišteni kroz vremenski period od 2 tjedna. Utjecaj skladištenja na aktivnost PME (izražena u U/mL) prikazana je na slikama 14. a, b, c.

*Slika 14.* Aktivnost PME (U/mL) tijekom skladištenja:

a)netretirana mrkva; b) HPCD, 22 °C/15 min; c) HPCD, 40 °C/15 min

Za vrijeme životnog ciklusa voća i povrća, odvija se niz kompleksnih, međusobno ovisnih fizioloških procesa koji nastaju kao posljedica brojnih biokemijskih reakcija u biljnom tkivu. To su procesi sa visokom kataboličkom i anaboličkom aktivnošću koje direktno povećavaju funkcije enzimskih sistema, izazivajući sintezu novih (Eagerman i dr., 1976; Marquis i sur., 1994).

Unutarstanična pektin metilesteraza je uključena u metabolizam stanične stijenke te ima važnu ulogu u fiziološkim procesima koji su povezani sa vegetativnim i reproduktivnim razvojem biljke (Wolf i sur., 2009; Pelloux i sur., 2007)

Sukladno tome, kao što se vidi na slici 14.a u netretiranoj mrkvi kroz period skladištenja od 14 dana na 4°C vidljiv je nagli rast aktivnosti PME. Tome su mogli pridonijeti prirodni procesi unutar biljnog tkiva specifični za svaku pojedinu sortu mrkve (Vigyazo, 1981).

Generalno, tijekom skladištenja od 1, 2, 3 i 4 tjedana PME se drugačije ponašala u netretiranim uzorcima u odnosu na one tretirane na 22°C kroz 15 minuta, s jedne strane i one tretirane na 40°C kroz 15 minuta s druge strane.

Slika 14.b prikazuje utjecaj skladištenja na 4 °C kroz 2 tjedna, na aktivnost pektin metilesteraze u mrkvi tretiranoj HPCD tretmanom na 22 °C kroz 15 min.

Iz prikaza rezultata uočljivo je prvo lagano opadanje aktivnosti PME nakon čega je uslijedio značajan porast iste.

Uočen padajući efekt se pripisuje modifikacijama strukture pektina djelovanjem HPCD tretmana, čineći supstrat manje dostupan PME čime se smanjuje njezina aktivnost (Lacroix idr., 2005).

U svrhu objašnjenja takvog efekta u stanici, postoji niz istraživanja koji se bavi problematikom mehanizma postepenog opadanja aktivnosti PME u stanici.

Djelovanjem HPCD tretmana pri 5 MPa, 20°C te 15 minuta, membranska propusnost se povećava za 5.7 puta te tim stresnim uvjetima za tkivo dolazi do povećanja antioksidacijskih enzima.

Mazorra i sur. (2002) su istraživanjem djelovanja abiotičkog stresa na stanicu utvrdili visoku koncentraciju antioksidacijskih enzima pri izloženosti stanice stresnoj okolini. Time se smatra da isti imaju veliki utjecaj u stjecanju otpornosti biljnog tkiva na stres i da postoji moguća povezanost njihove nagle aktivacije prilikom djelovanja HPCD tretmana i oporavka stanične membrane čime kao posljedica padne dostupnost PME pektinu (Bi i sur., 2011).

Ponovni porast aktivnosti PME nakon dva tjedna skladištenja na 4°C može se pripisat činjenici da postoje tri različita oblika enzima koji se različito ponašaju te mogu naknadno dovesti do rasta aktivnosti. U prilog tome, jednim istraživanjem, u narančinom soku su dokazana tri izooblika PME. Dva koja su termolabilna i čine 90% ukupne aktivnosti te jedan termostabilan čineći 5-10% ukupne aktivnosti (Versteeg i dr., 1980).

Također, suvisno nekoliko autora (Do Amaral i dr., 2005; Sampedro i dr., 2009), Velazquez-Estrada i sur., (2011) su u svojim studijima utvrdili da je nakon tretmana na 90°C za preostalu aktivnost od 4-5% upravo odgovoran termostabilan oblik.

Na slici 14 c. su prikazani rezultati PME aktivnosti mrkve tretirane HPCD tretmanom pri temperaturnom režimu od 40 °C kroz 15 minuta.

Kod ovih uzoraka se pokazala velika učinkovitost HPCD tretmana na inaktivaciju PME s obzirom da se vrlo neznatna aktivnost, postignuta nakon primjene HPCD tretmana pri 40 °C kroz 15 minuta, nastavila postepeno smanjivati te nakon trećeg tjedna nije zabilježena ni najmanja aktivnost.

U tablici 17. također je prikazan utjecaj skladištenja na aktivnost PME u tretiranim, odnosno netretiranom uzorku, ali preračunat na suhu tvar. Aktivnost PME izražena je u U/g suhe tvari.

*Tablica 17.* Aktivnost PME ( izražena u U/g suhe tvari) u uzorcima mrkve tijekom skladištenja

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **TRETMAN** | | **SKLADIŠTENJE**  **(tjedni)** | **AKTIVNOST PME** |
| **(U/g suhe tvari)** |
| **0** | | **0** | 0,068 |
| **1** | 0,064 |
| **2** | 0,072 |
| **3** | 0,064 |
| **4** | 0,064 |
| **120 bar** | **22 °C/**  **15 min** | **0** | 0,048 |
| **1** | 0,036 |
| **2** | 0,048 |
| **40 °C/**  **15 min** | **0** | 0,008 |
| **1** | 0,008 |
| **2** | 0,004 |
| **3** | 0,000 |
| **4** | 0,000 |

Aktivnost PME preračunate na gram suhe tvari mrkve (tablica 17.) prati trend ponašanja mrkve kao i kod enzimske aktivnosti (slika 14).

Također je jasno vidljivo da je aktivnost netretirane mrkve, kroz period skladištenja od 4 tjedana na 4 °C, približno iste vrijednosti te nije uočen značajan pad aktivnosti, za razliku od tretirane mrkve na 22 °C/15 min kod koje su vrijednosti aktivnosti dvostruko manje s jedne strane te tretirane mrkve na 40 °C/15 min kod koje je aktivnost u prva dva tjedna vrlo slaba te je nakon trećeg tjedna potpuno odsutna.

Rezidualna aktivnost PME u skladištenoj netretiranoj i skladištenoj tretiranoj mrkvi , te odnos između njih, prikazana je na slici 15.

*Slika 15.* Rezidualna aktivnost (RA) PME u tretiranoj mrkvi nakon skladištenja pri 4°C

Iz prikaza rezidualne aktivnosti PME (slika 15.) vidi se da tijekom skladištenja vrijednosti netretirane mrkve te tretirane na 22 °/15 minuta isprva lagano opada a zatim raste.

Pri tome je minimalna rezidualna aktivnost netretirane mrkve 95,56% za razliku od tretirane na 22 °C/15 min kod koje je 53,33%. Čime se konstatira da je u ovoj studiji primjena HPCD tretmana u uvjetima od 12 MPa, 22 °C te kroz 15 minuta tretiranja uspjela smanjiti aktivnost PME za otprilike 50%.

S druge strane, uzorci tretirani sa 12 MPa, 40 °C kroz 15 minuta pokazuju od samog početka zanemarive vrijednosti rezidualne aktivnosti pri čemu najviša preostala aktivnost iznosi 11,11% a već nakon 3. tjedna se primjenom HPCD tretmana rezidualna aktivnost smanjila za 100%.

S obzirom da je za 90% PME aktivnosti u biljnom tkivu odgovoran termolabilan oblik čime se vrlo lako enzimska aktivnost inaktivira na nižim temperaturama primijenjeni parametri HPCD tretmana su se pokazali vrlo učinkoviti u deaktivaciji PME.

# 5. ZAKLJUČCI

1. HPCD tretman na 22 °C, bez obzira na vrijeme tretiranja, nije rezultirao inaktivacijom PG ni PME, no kod PM je postignuto smanjenje aktivnosti u odnosu na netretiranu mrkvu, dok je kod PG došlo do porasta aktivnosti.
2. Potpuna inaktivacija PG postignuta je tretmanom pri 40 °C/10 minuta, dok je PME inaktivirana pri 40 °C/30 minuta.
3. Pri skladištenju netretirane mrkve i mrkve tretirane pri 40 °C/15 minuta primijećeno je povećanje aktivnosti PG tijekom rane faze skladištenja te smanjenje aktivnosti tijekom kasne faze skladištenja, dok je u mrkvi tretiranoj na 22 °C/15 min tijekom skladištenja došlo do pada njezine aktivnosti.
4. Prilikom skladištenja netretirane mrkve i mrkve tretirane pri 22 °C/15 min došlo je do postepenog pada nakon čega je uslijedio porast aktivnosti PME. U mrkvi tretiranoj pri 40 °C/15 minuta nakon trećeg tjedna skladištenja došlo je do potpune inaktivacije enzima.
5. Obzirom na sve dobivene rezultate može se zaključiti da bi bilo potrebno nastaviti s ovim istraživanjem i to, čini se, pri temperaturi 40 °C kako bi se utvrdilo odgovarajuće vrijeme tretiranja koje bi osiguralo kvalitetan proizvod i nakon skladištenja.

# 6. LITERATURA

* Ackerley, J., Corredig, M., Wicker, L. (2002) Clarification of Citrus Juice is Influenced by Specific Activity of Thermolabile Pectinmethylesterase and Inactive PME-Pectin Complexes. *J. Food Sci.* **67**, 2529–2533.
* Alasalvar, C., Al-Farsi, M., Quantick, P.C., Shahidi, F., Wiktorowicz, R. (2005) Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-toeat shredded orange and purple carrots. *Food Chem.* **89**, 69-76.
* Amanatidou, A., Slump, R. A., Gorris, L. M., Smid, E. J. (2000) High oxygen and high carbon dioxide modified atmospheres for shelf-life extension of minimally

and enzyme inactivation, and effects on food quality. *J. Food Sci.* **71**, 1-11.

* Anonymus 1 (2010), Pektolitički enzimi, <<http://www.tehnologijahrane.com>> Pristupljeno 19. travnja 2012.
* Anonymus 2 (2011), Presjek mrkve, <<http://www.superstock.com>> Pristupljeno 30. travnja 2012.
* Anonymus 3 (2012), Cvat mrkve, <<http://www.macroevolution.net>> Pristupljeno 30. travnja 2012.
* Anthon, G.E., Barrett, D.M. (2002) Determination of Reducing Sugars with 3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazone. *Anal.biochem.* **305,** 287–289.
* Arreola, A.G., Balaban, M.O., Marshall, M.R., Peplow, A.J., Wei, C.I., Cornell, J.A. (1991) Supercritical CO2 effects on some quality attributes of single strength orange juice. *J. Food Sci.* **56**, 1030-1033.
* Baker, R. A., Bruemmer, J. H. (1972) Pectinase stabiliza- tion in orange juice cloud. *J. Agric. Food Chem.* **20**, 1169-1173.
* Baker, R. A., Cameron, R. G. (1999) Clouds of citrus juices and juice drinks. *Food Technol.* **53**, 64-69.
* Ballestra, P., Dasilva, A.A., Cuq, J.L. (1996) Inactivation of Escherichia coli by carbon dioxide under pressure. *J. Food Sci.* **61**, 829-836.
* Balogh, T., Smout, C., Ly Nguyen, B., Van Loey, A., Hendrickx, M. E. (2004) Thermal and high-pressure inactivation of carrot pectinmethylesterase (PME): from model system to real foods. *Innov. Food Sci. Emerg.* *Technol.* **5**, 429-436.
* Brummell, D. A., Harpster, M. H. (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol*. **47**, 311-340.
* Cameron, R. G., Baker, R. A., Grohmann, K. (1998) Multiple forms of pectinmethylesterase fromcitrus peel and their effects on juice cloud stability. *J. Food Sci.* **63**, 253-256.
* Chen, J.L., Zhang, J., Song, L.J., Jiang, Y., Wu, J.H., Hu, X.S. (2010) Changes in microorganism, enzyme, aroma of hami melon (Cucumis melo L.) juice treated with dense phase carbon dioxide and stored at 4 °C. *Innov. Food Sci. Emerg.* **11**, 623-629.
* Coenen, G. J., Bakx, E. J., Verhoef, R. P., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. (2007) Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydr. Polym*. **70**, 224-235.
* Corredig, M., Wicker, L. (2002) Juice clarification by thermostable fractions of marsh grapefruit pectinmethylesterase. *J. Food Sci.* **67**, 1668-1671.
* Corwin, H., Shellhammer, T. H. (2002) Combined carbon dioxide and high pressure inactivation of pectin methylesterase, polyphenol oxidase, Lactobacillus plantarum and Escherichia coli. *J. Food Sci.* **67**, 697–701.
* Damar, S., Balaban, M.O. (2006) Review of dense phase CO2 technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. *J. Food Sci.* **71**, 1-11.
* Di Matteo, A., Giovane, A., Raiola, A., Camardella, L., Bonivento, D., De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D. Tsernoglou, D. (2005) Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. *Plant Cell* **17**, 849-858.
* Do Amaral, S. H., De Assis, S. A., De Faria Oliveira, O. M. M. (2005) Partial purification and characterization of pectin methylesterase from orange (citrus sinensis) CV.pera-rio. *J. Food Biochem.* **29**, 367-380.
* Dorokhov, Y. L., Frolova, O. Y., Skurat, E. V., Ivanov, P. A., Gasanova, T. V., Sheveleva, A. A., Ravin, N. V., Makinen, K. M., Klimyuk, V. I., Skryabin, K. G., Gleba, Y. Y., Atabekov, J. G. (2006) A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: The enhancer of RNA silencing. *FEBS Lett*. **580**, 3872-3878.
* Draye, M., Van Cutsem, P. J. (2008) Pectin methylesterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening. *Plant Physiol.* **165**, 1152–1160.
* Duvetter, T., Sila, D. N., Van Buggenhout, S., Jolie, R., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2009) Pectins in Processed Fruit and Vegetables: Part I—Stability and Catalytic Activity of Pectinases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **8**, 75-85.
* Emmambux, N. M., Minnaar, A. (2003) The effect of edible coatings and polymericpackaging films on the quality of minimally processed carrots*.**J. Sci. Food Agr.* **83**, 1065–1071.
* Gainvors, A., Frezier, V., Lemaresquier, H., Lequart, C., Aigle, M., Belarbi, A. (1994) Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast* **10**, 1311-1319.
* Gasanova, T. V., Skurat, E. V., Frolova, O. Y., Semashko, M. A., Dorokhov, Y. L. (2008) Pectin methylesterase as a factor of plant transcriptome stability. *Mol. Biol*. **42**, 421-429.
* Gebczynski, P. (2006) Content of selected antioxidative compounds in raw carrot and in frozen product prepared for consumption. EJPAU **9** (3).
* Goncalves, E. M., Pinherio, J., Abren, M., Brandao, T. R. R., Silva, C.L.M. (2010) Carrot (Daucus carota L.) peroxidase inactivation, phenolic content and physical changes kinetics due to blanching. *J. Food Eng.* **35**, 111-126.
* Hendricks, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., Weemes, C. (1998) Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends Food Sci. Technol.* **9***,* 197-203.
* Howard, L. R., Griffin, L. E., Lee, Y. (1994) Steam treatment of minimally processed carrot sticks to control surface discoloration. *J. Food Sci.* **59**, 356–358.
* Jenkins, J., Mayans, O., Smith, D., Worboys, K., Pickersgill, R. W. J. (2001) Three-dimensional structure of Erwinia chrysanthemi pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. *Mol. Biol.* **305**, 951–960.
* Johansson, K., El-Ahmad, M., Friemanna, R., Jornvall, H., Markovic, O., Eklund, H. (2002) Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Lett.* **514**, 243-249.
* Katsaros, G. I., Tsevdou, M., Panagiotou, T., Taoukis, P. S. (2010) Kinetic study of high pressure microbial and enzyme inactivation and selection of pasteurisation conditions for Valencia orange juice. *Int. J. Food Sci. Tech.* **45**, 1119-1129.
* Khan NA, Khalil JK, Khan I. (1975) Changes in the carotene content of carrots. *J. Sci. Res.* **27**, 112-114.
* Kincal, D., Hill, W. S., Balaban, M., Portier, K. M., Sims, C. A., Wei, C. I. (2006) A continuous high-pressure carbon dioxide system for cloud and quality retention in orange juice. *J. Food Sci.* **71**, 338–344.
* Klavons, J. A., Bennett, R. D., Vannier, S. H. (1994) Physical/chemical nature of pectin associated with commercial orange juice cloud. *J. Food Sci.* **59**, 399-401.
* Konno, H., Katoh, K., Yamasaki, Y. (1981) Studies on the pectic depolymerases. I. Exopolygalacturonase from root tissues and cell suspension cultures of carrots. *Plant Cell Physiol.* **22**, 899-909.
* Kreutzmann, S., Christensen, L.P., Edelenbos, M. (2008) Investigation of bitterness in carrots (Daucus carota L.) based on quantitative chemical and sensory analyses. *LWT-Food Sci. Technol* **41**, 193–205.
* Krichevsky, A., Kozlovsky, S. V., Tian, G. W., Chen, M. H., Zaltsman, A., Citovsky, V. (2007) How pollen tubes grow. *Dev. Biol.* **303**, 405-420.
* Lacroix, N., Fliss, I., Makhlouf, J. (2005) Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. *Food res. Int.* **38**, 569-576.
* Lee CY, Bourne MC, Van Buren JP. (1979) Effect of blanching treatments on the firmness of carrots. *J. Food Sci.* **44**, 615-619.
* Leja, M., Stodolak, B., Mareczek, A., Rozek, S., Wojciechowska, R. (1997) Effect of post-harvest storage on metabolism of phenol compounds in carrot root slices. Folia Horticulturae **9**, 59-69.
* Lešić, R., Borošić, J., Buturac, I., Herak-Ćustić, M., Poljak, M., Romić, D. (2004) *Povrćarstvo*, Zrinski, Čakovec, str. 496-510.
* Liao, H. M., Hu, X. S., Chen, F., Wu, J. H., Liao, X. J. (2007) Inactivation of Escherichia coli inoculated into cloudy apple juice exposed to high pressure carbon dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* **118**, 126–131.
* Liao, H.M., Zhang, L.Y., Hu, X.S., Liao, X.J. (2010) Effect of high pressure CO2 and mild heat processing on natural microorganisms in apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* **137**, 81-87.
* Liu, X., Gao, Y.X., Peng, X.T., Yang, B., Xu, H.G., Zhao, J. (2008) Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet extract with high pressure carbon dioxide. *Innov. Food Sci. Emerg.* **9**, 24-31.
* Ly-Nguyen, B., Van Loey, A. M., Smout, C., Ozcan, S. E., Fachin, D., Verlent, I., Truong, S. V., Duvetter, T., Hendrickx, M. E. (2003) Mild-Heat and High-Pressure Inactivation of Carrot Pectin Methylesterase: A Kinetic Study . *J. Food Sci.* **68**, 1377-1383.
* Ma, R., Reese, J. C., Black, W. C., Bramelcox, P. J. (1990) Detection of pectinesterase and polygalacturonase from salivary secretions of living greenbugs, Schizaphis graminum (Homoptera: Aphididae). *Insect Physiol*. **36**, 507-512.
* Markovic, O., Jornvall, H. (1992) Disulfide bridges in tomato pectinesterase: variation from pectinesterases of other species: conservation of possible active site segments. *Protein Sci.* **1**, 1288-1292.
* Marx, M., Stuparic, M., Schieber, A., Carle, R. (2003) Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of b-carotene in carrot juices and carotene-containing

methylesterase induced by dense phase carbon dioxide. *J. Agr. Food Chem.* **56**, 5394-5400.

* Micheli, F. (2001) Pectin methlyesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* **6**, 414-419.
* Mohnen, D. (2008) Pectin Structure and Synthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2008, **11**, 266-277.
* Naczk, M., Shahidi, F. (2003) Phenolic compounds in plant foods: chemistry and health benefits. *Nutraceuticals and Food* **8**, 200-218.
* Nakagawa, T., Miyaji, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, N., Tomizuka, N. (2000) A Methylotrophic Pathway Participates in Pectin Utilization by Candida boidinii. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4253-4257.
* Park, S.J., Lee, J.I., Park, J. (2002) Effects of combined process of high pressure CO2 and high hydrostatic pressure on the quality of carrot juice. *J. Food Sci.* **67**, 1827-1834.
* Pelloux, J., Rusterucci, C., Mellerowicz, E. J. (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* **12**, 267-277.
* Plaza, L., Duvetter, T., Monfort, S., Clynen, E., Schoofs, L., Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E. (2007) Purification and thermal and high-pressure inactivation of pectinmethylesterase isoenzymes from tomatoes (Lycopersicon esculentum): a novel pressure labile isoenzyme. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9259-9265.
* Plaza, L., Duvetter, T., Van der Plancken, I., Meersman, F., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2008) Influence of environmental conditions on thermal stability of recombinant Aspergillus aculeatus pectinmethylesterase. *Food Chem.* **111**, 912-920.
* Quentin, M., Jauneau, A., Morvan, O., Mareck, A., Gaffe, J., Morvan (1997) Immunolocalization of pectin methylesterases in the hypocotyl tissues of flax. *C. Plant Physiol. Biochem.* **35**, 475-482.
* Richard, L., Qin, L. X., Gadal, P., Goldberg, R. (1994) Molecular cloning and characterization of a putative pectin methyles- terase cDNA in Arabidopsis thaliana L. *FEBS Lett*. **355**, 135-139.
* Ridley, B. L., O’Neill, M. A., Mohnen, D. A. (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling *Phytochemistry* **57**, 929-967.
* Robertson, J. A., Meredith, F. I., Horvart, R. J., & Senter, S. D. (1990) Effect of cold storage and maturity on the physical and chemical characteristics and volatile constituents of peaches (cv. Redthaven). *J. Agr. Food Chem*. **38**, 620–624.
* Rojas, N.L.,Qrtiz, G.E., Chesini, M., Baruque D.J., Cavalitto S.F*.* (2011) *A. kawachii* Polygalacturonase Cloned in *S. cerevisiae. Food Technol. Biotechnol.* **49,** 316-321.
* Sanchez, M. C., Valencia, C., Gallegos, C., Ciruelos, A., Latorre, A. (2002) Influence of processing on the rheological properties of tomato paste. *J. Sci. Food Agr.* **82**, 990-997.
* Schobinger, U. (2001) [*Frucht- und Gemüsesäfte*](http://www.amazon.de/Frische-Frucht-Gem%C3%BCses%C3%A4fte-Vitalstoffreiche-Gesundheit/dp/3442136946)*,* Berlin: Ulmer.
* Schuster, B. E., Lee, K. (2006) Nitrate and nitrite methods of analysis and levels in raw carrots, processed carrots and in selected vegetables and grain products. *J. Food Sci.* **52**, 1632 – 1636.
* Senti FR, Rizek RL. (1975) Nutrient levels in horticultural crops. *Hort. Sci.* **10**, 243-256.
* Siedlecka, A., Wiklund, S., Peronne, M. A., Micheli, F., Lesniewska, J., Sethson, I., Edlund, U., Richard, L., Sundberg, B., Mellerowicz, E. J. (2008) Pectin methyl esterase inhibits intrusive and symplastic cell growth in developing wood of Populus trees. *Plant Physiol.* **146**, 554-565.
* Sila, D. N., Van Buggenhout, S., Duvetter, T., Fraeye, I., De Roeck, A., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2009) Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part II—Structure-Function Relationships. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **8**, 86-104.
* Stratilova, E., Markovic, O., Dzurova, M., Malovikova, A., Capek, P., Omelkova, J. (1998) The pectolytic enzymes of carrots. *Biologia*. **53**, 731–738.
* Tian, G. W., Chen, M. H., Zaltsman, A., Citovsky, V. (2006) Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Dev. Biol.* **294**, 83-91.
* Tijskens, L. M. M., Rodis, P. S., Hertog, M. L. A. T. M, Kalantzi, U., Dijk, C. (1998) Kinetics of polygalacturonase activity and firmness of peaches during storage. *J. Food Eng.* **35**, 111-126.
* Torres, E.F., Volke-Sepúlveda, T., Viniegra-González, G. (2006) Hydrolytic Depolymerising Pectinases. *Food Technol. Biotechnol.* **44**, 221–227.
* Trajković, J., Baras, J., Mirić, M., Šilter, S. (1983) *Analize životnih namirnica*, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
* Truong, T. T., Boff, J. M., Min, D. B., & Shellhammer, T. H. (2002). Effects of carbon dioxide in high-pressure processing on pectinmethylesterase in single-strength orange juice. *J. Food Sci.* **67**, 3058–3062.
* Van Loey, A., Verachtert, B., Hendrickx, M. (2002) Effect of high electric field pulses on enzymes. *Trends Food Sci. Technol.* **12**, 94-102.
* Velázquez-Estrada, R. M., Hernandez-Herrero,M.M., López-Pedemonte, T., Guamis-López, B., Roig-Sagués, A. X. (2008) Inactivation of Salmonella enterica Serovar Senftenberg 775W in Liquid Whole Egg by Ultrahigh Pressure Homogenization. *J. Food Protect.***71**, 2283-2288.
* Versteeg, C., Rombouts, F. M., Spaansen, C. H., Pilnik, W. (1980) Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. *J. Food Sci.* **45**, 969–971.
* Voragen, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., Schols, H. A. (2009)Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I *Struct. Chem.* **20**, 263-275.
* Welti-Chanes, J., Ochoa-Velasco, C. E., Guerrero-Beltrán, J.Á. (2009) High-pressure homogenization of orange juice to inactivate pectinmethylesterase. *Innov. Food Sci. Emerg.* **10**, 457-462.
* Willats, W. G. T., Knox, P., Mikkelsen, J. D. (2006) Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 97-104.
* Willats, W. G. T., McCartney, L., Mackie, W., Knox, J. P. (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* **47**, 9-27.
* Wolf, S., Mouille, G. Pelloux, G. J. (2009) Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol. Plant*, **2**, 851–860.
* Z. Herceg (2009) *Procesi konzerviranja hrane - novi postupci,* Tehnička knjiga, Zagreb.
* Zhang, D., Hamauzu, Y. (2004) Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (Daucus carota L.). *J. Food Agric. Environ*. **2**, 95-100.
* Zhang, J., Davis, T.A., Matthews, M.A., Drews, M.J., LaBerge, M., An, Y.H. (2006) Sterilization using high pressure carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluid.* **38**, 354-372.
* Zhang, Q., Tan, S., McKay, A., Yan, G. (2005) Carrot browning on simulated market shelf and during cold storage. *J. Sci. Food Agr.* **85**, 16-20.
* Zheng, X., Jing, G., Liu, Y., Jiang, T., Jiang, Y., Li, J. (2012) Expression of expanish gene, MiExpA1, and activity of galactosidase and polygalacturonase in mango fruit as affected by oxalic acid during storage at room temperature. *Food Chem.* **132**, 849-854.
* Zhi, X., Zhang, Y., Hu, X.S., Wu, J.H., Liao, X.J. (2008) Inactivation of apple pectin methylesterase induced by dense phase carbon dioxide. *J. Agr. Food Chem.* **56**, 5394-5400.
* Zhou, L.Y., Zhang, Y., Hu, X.S., Liao, X.J., He, J. (2009) Comparison of the inactivation kinetics of pectin methylesterases from carrot and peach by high-pressure carbon dioxide. *Food Chem.* **115**, 449-455.
* Zukowska, E., Czeladzka. B., Zabaglo, A. (1997) Differences in macroelements and nitratescontent in roots of some carrot genotypes. *I. AppI. Genet*. **32A**, 153-159.

# **Određivanje aktivnosti pektolitičkih enzima u mrkvi tretiranoj**

# **visokim tlakom uz prisutstvo ugljikova dioksida**

# *Korina Herceg*

# *Sanela Kićanović*

# **SAŽETAK**

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti aktivnost pektolitičkih enzima, poligalakturonaze (PG) i pektin metilesteraze (PME), u mrkvi tretiranoj visokim tlakom uz prisustvo CO2 (HPCD tretman), pri razičitoj temperaturi i vremenu obrade, prije i nakon skladištenja pri 4 °C. Uzorci su tretirani pri 120 bara, pri 22 i 40 °C, 5 – 45 minuta, a skladišteni su 2 tjedna oni koji su tretirani pri 22 °C/15 min, te 4 tjedna oni koji su tretirani pri 40 °C/15 min. Paralelno s tim određena je i aktivnost PG i PME u netretiranoj mrkvi i tijekom skladištenja 4 tjedna. Analize su provedene nakon svakog tjedna skladištenja. Enzimska aktivnost PG, izražena u µg/mL, određena je spektrofotometrijski, dok je aktivnost PME, izražena u U/mL, određena titrimetrijski. Također su izračunate rezidualne aktivnosti u odnosu na netretiranu mrkvu prije skladištenja. Niti jedna metoda za određivanje PG i PME nađena u literaturi nije u potpunosti bila primjenjiva za ovo istraživanje, stoga je obje metode prethodno trebalo prilagoditi.

HPCD tretman na 22°C, bez obzira na vrijeme tretiranja, nije rezultirao inaktivacijom PG ni PME, ali kod PME je postignuto smanjenje aktivnosti u odnosu na netretiranu mrkvu, dok je kod PG došlo do porasta aktivnosti. Potpuna inaktivacija PG postignuta je tretmanom pri 40 °C/10 min dok je PME inaktivirana pri 40 °C/30 min. Pri skladištenju netretirane mrkve i mrkve tretirane pri 40 °C/15 min primijećeno je povećanje aktivnosti PG tijekom rane faze skladištenja te smanjenje aktivnosti tijekom kasnije faze skladištenja, dok je u mrkvi tretiranoj na 22 °C/15 min tijekom skladištenja došlo do pada enzimske aktivnosti PG. Prilikom skladištenja netretirane mrkve i mrkve tretirane pri 22 °C/15 min došlo je do postepenog pada te porasta aktivnosti PME tijekom 2 tjedna skladištenja. Skladištenjem netertirane mrkve iduća 2 tjedna, aktivnost PME se smanjuje, iako je viša od bilo koje vrijednosti određene za skladištenu mrkvu nakon tretmana pri 40 °C/15 min u kojoj je nakon određenog vremena došlo do potpune inaktivacije enzima. Obzirom na sve dobivene rezultate može se zaključiti da bi bilo potrebno nastaviti s ovim istraživanjem i to čini se pri temperaturi 40 °C kako bi se utvrdilo odgovarajuće vrijeme tretiranja koje bi osiguralo kvalitetan proizvod i nakon skladištenja.

**Ključne riječi:** mrkva, poligalakturonaza, pektin metilesteraza, HPCD tretman

# 

# **Activity determination of pectolytic enzymes in carrots treated by high pressure carbon dioxide**

# *Korina Herceg*

# *Sanela Kićanović*

# **SUMMARY**

Primary goal of this research was to determine activity of pectolytic enzymes PG and PME in high pressure treated carrot (HPCD) during different storage time and temperature before and after storage at 4 °C. Samples were treated with pressure of 120 bars at temperatures of 22 °C and 40 °C in periods from 5 to 45 minutes. Samples treated at 22 °C/15 min were stored for 2 weeks and samples treated at 40 °C/15 min were stored for 4 weeks. Additionally, PG and PME activities were determined in untreated carrot before and after 4 weeks of storage. All analyses were conducted after every week of storage (1, 2, 3 and 4). PG activity was determined spectrophotometrically and expressed in µg/mL while PME activity was determined titrimetrically and was expressed in U/mL. Residual enzyme activity was also calculated and compared with values in untreated carrots before storage. Methods for determination of PG and PME activity were not completely adoptable from literature in reported way; thus both methods needed modification before use in analysis.

With no effect of storage time, HPCD treatment at 22 °C did not resulted in inactivation of PG or PME enzymes. However, PME showed lower enzyme activity when compared with untreated carrot, while PG showed even increased activity. Complete inactivation of PG was achieved by treatment of 40 °C/10 min while PME was inactivated at treatment of 40 °C/30 min. There was evident increase of activity of PG noticed during early stages of storage in untreated carrot and carrot treated at 40 °C/15 min while treatment at 22 °C/15 min showed decrease of PG activity. Slightly decrease of PME activity was observed during storage time in untreated carrots as well as in carrots treated at 22 °C/15 min. During next two weeks of storage, activity of PME in untreated carrot decreased, although it still remained higher compared to carrots treated at 40 °C, in which completely inactivation of enzyme was detected by storage time duration.

Consequently, it can be observed that further investigations are needed with treatments at 40 °C for determination of optimal treatment time in order to obtain high nutritional quality product, also suitable for storage.

**Key words:** carrot, polygalacturonase, pectin methylesterase, HPCD treatment