

Mikrohullámú kezelések hatásának vizsgálata pektin enzimes lebontása során

Polgár Anikó – Beszédes Sándor – Szabó Gábor – Hodúr Cecilia

Összefoglalás

A mikrohullámú sugárzás alkalmazási körének bővülésével a kezdeti távközlési feladatok mellett manapság elsősorban a gyors felmelegítő képességét kihasználva, analitikai vizsgálatok előkészítő műveleteként, csíraszegényítésre és gyors szárítási eljárásokban hasznosítják. A gyors hőkeltési tulajdonságán kívül fellelhetőek tudományos közlemények, amelyek az ún. nem-termikus hatásokkal kapcsolatosak. Munkánk során megvizsgáltuk az alacsony intenzitású mikrohullámú sugárzásnak a gyümölcsök préselése, a gyümölcslevek tükrösítése és a kíméletes membrános besűrítésének előkezeléseiben használatos pektináz enzimre gyakorolt hatását. A vizsgálatainkat pektin modell oldatokban végeztük, a pektináz enzim aktivitásának változását a pektinből keletkező galakturonsav egységek spektrofotometriás mérésével jellemeztük. A mérési eredményeink alapján a mikrohullámú energiaközlés a pektin termikus hidrolízisén túl a pektináz enzim aktivitására is pozitív hatással volt. Vizsgálataink szerint az enzim és szubsztrát együttes besugárzása esetében tapasztaltuk a legnagyobb mértékű pektinbomlást. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a mikrohullámú energiaközlésen alapuló előkezelésekkel a pektin enzimes hidrolízisének határfoka is javítható.

Bevezetés

A mikrohullámú sugárzást az utóbbi évtizedekben egyre szélesebb körben hasznosítják. A távközlési rendszerekben a hullámterjedési és visszaverődési tulajdonságok vizsgálatán és modellezésén kívül a mikrohullámú sugárzásnak elsősorban a hőkeltési sajátosságai képezik a kutatások tárgyát. A mikrohullámú sugárzás hőkeltése az elmozdulásra képes ionokat tartalmazó rendszerekben elsősorban az ionos vezetés jelenségére vezethető vissza, a dipólus-momentummal rendelkező vegyületek esetében pedig, a nagyfrekvenciás elektromágneses térben történő forgás generálta súrlódási hő a felmelegedés alapja.

A hagyományos hőközlési eljárások hatékonyságát jellemző paraméterektől eltérően, a mikrohullámú melegítés hatásfokát folyadékfázisú műveletek esetében elsősorban a molekulák polarizálhatóságát jellemző dielektromos tényező, és a sugárzásnak az anyagban való elnyelődését és hőenergiává való transzformációját jellemző dielektromos veszteségi

tényező határozza meg (László és mtsai, 2005). A mikrohullámú energiaközlés előnyei között legtöbbször a hagyományos hőkezelési eljárásokhoz képest egyenletesebb felmelegedést (a penetrációs mélységen belül), a volumetrikus felmelegítő képességet, a nagy energiasűrűséget és az ezeknek köszönhető igen rövid műveleti időt említik (Szabó, 1991).

Fellelhetőek azonban a szakirodalomban olyan közlemények, amelyek a mikrohullámú sugárzás nem-termikus hatásainak vizsgálatával foglalkoznak. Az elektromágneses terek nem-termikus hatásait először a humán-egészségügyi kockázatok felmérése céljából kezdték el vizsgálni. Az évtizedekre visszanyúló vizsgálatok alátámasztották, hogy az elektromágneses tér – és ezen belül annak mikrohullámú tartománya – a sejtekben stressz választ idéz elő, a daganatképződést fokozza, illetve az elválasztást is befolyásolja (Daniells et al., 1998).

A hagyományos hőkezelés sterilizáló hatását a mikrohullámú módszerhez hasonlítva is találhatunk utalást a nem-termikus hatásokra vonatkozóan, általában az azonos hőmérsékleten végzett kezeléseket esetében a mikrohullámú sugárzás alkalmazásánál nagyobb mértékű csíraszám pusztulást, vagy a szükséges hőkezelési idő lerövidülését tapasztalták. A mikrohullámú kezelések esetében azonban a frekvencia és maga a hullámvezetési tulajdonságok is befolyásolták a hatékonyságot. In vitro kísérletekkel az alacsony energiájú mikrohullámú kezelések során a kontrollpopulációhoz képest nagyobb mértékű növekedést tapasztaltak algák, élesztők és egyes baktériumok tenyésztése esetében, illetve a kezeléseket követően egyes gombák enzimtermelő képessége is növekedett (Banik et al., 2003).

Már az 1980-as évek elejétől kezdődően találhatunk szakirodalmi közleményeket a mikrohullám nem-termikus hatásainak vizsgálatára vonatkozóan, amelyek többek között a sejtek osztódásában és transzportfolyamataiban szerepet játszó protein-kináz enzim mikrohullámú kezelést követő biológiai funkcióinak megváltozását a fehérjeszerkezet megváltozásával hozzák összefüggésbe (Byus et al., 1984; Laurence et al., 2000). Illetve a fagyponthoz alatti minták mikrohullámú kezelését követő enzimaktivitás növekedéséről számolnak be (Parker et al., 1996). Mivel több szerző is a hagyományos hőközlési eljárásoktól eltérő viselkedést és reakció utakat figyelt meg például szerves vegyületek szintézisének, vagy az azonos körülmények

között végzett csíraszegényítő és sterilizációs kísérleteknél, legtöbbször a makromolekulák szerkezeti változásaival magyarázzák az eredményeket. A hagyományos mikrohullámú energiaközléses műveleteknél a termikus és nem-termikus hatások párhuzamosan jelentkeznek, azonban nagy energiamennyiség besugárzásánál a termikus hatások erősen dominálnak. Az alacsony teljesítménnyel végzett kezelések esetében, a minta tömegét, illetve térfogatát és a kezelési időt megfelelően megválasztva, felmelegedést nem, vagy csak kis mértékben tapasztalunk, ezért ilyen kísérleti körülmények között a nem-termikus reakciók következtében lezajló folyamatokról is képet kaphatunk.

Az enzimek térszerkezete az általuk katalizált folyamatok lefolyására és sebességére jelentős hatással van, ezért a mikrohullámú technika nem-termikus hatásainak igazolására és mérésére az enzim lebontási folyamatok vizsgálata megfelelő indirekt módszernek tekinthető. Az enzimek, mint biokatalizátorok, csak egy meghatározott pH- és hőmérséklet tartományban működnek, tehát a mikrohullámú energiaközlés hatására létrejövő felmelegedés egy bizonyos besugárzási idő után inaktíválja őket, ezt használja ki az élelmiszeripar is az előfőzési, csíraszegényítési és sterilizációs eljárásokban. Találhatóak azonban olyan szakirodalmi utalások is, amelyek az enzimek kis teljesítményű mikrohullámú besugárzása esetében pozitív hatásokról számolnak be. Például a mikrohullámmal előkezelt celluláz enzim esetében Neményi és mtsai. (2008) kb. 20%-os aktivitás növekedést mértek. A biológiai folyamatokban reakcióközegként használt víz elektromágneses térben történő besugárzásakor kimutatták továbbá, hogy a dipólusos közeg a kezelés alatt megváltozott szerkezetét a térerősség megszűnése után is megőrzi, és az abban a későbbiekben végbemenő biológiai folyamatokra is hatással van (Rai et al., 1997). A hagyományos hőkezelés és a mikrohullámú kezelések összehasonlíthatóságát tekintve azonban meg kell jegyezni, hogy a mikrohullámú térben történő hőmérséklet mérés problémája, a hagyományostól eltérő hőkeltési- és terjedési tulajdonságok miatt az érzékelők megfelelő elhelyezése, illetve a hagyományos hőkezeléssel azonos hőmérséklet felfutás biztosításának problémája miatt az eredményeket több szerző is megkérdőjelezi.

Munkánk során a mikrohullámú sugárzásnak az enzim lebontási folyamatokra gyakorolt hatásával foglalkoztunk, méréseinkhez – az eddig még nem vizsgált – pektináz enzimet választva. A pektin, mint a növényi sejtfal egyik összetevője, annak strukturális integritását biztosítja. A pektint, mint adalékanyagot az élelmiszeripar állományjavító adalékanyagként használja E 440 (a)-pektin, illetve E 440 (b)-amidált pektin formában. Előállításuk pektin esetében általában citrusfélék és alma vizes extrakciójával, majd metanol,

etanol és izopropanolos kicsapásával; amidált-pektin esetében az extrakciót követő lúgos körülmények közötti ammóniás kezeléssel, és az előzőhöz hasonló kicsapással történik. A pektin élettanilag kedvező hatású, a többi ételmi rosttal együtt a bél mobilitást növeli, a vérnyomást csökkenti és segíti a kedvező béltartalom konzisztencia kialakítását. A pektin másrészt egyes élelmiszeripari feldolgozási folyamatok határfokát, amilyen például a gyümölcsök préselése vagy a gyümölcslevek szűrése és membránszeparációja, nagymértékben rontja, ezért ezen folyamatok meggyorsítása és hatékonyságának növelése céljából előkészítő műveletként enzim pektinbontást végeznek a sejtfalak átjárhatóságának növelése, illetve a levek viszkozitásának és a gélképződés csökkentése céljából. Az élelmiszeriparban a savas pH-tartományban működő (pH 3-6) *Aspergillus niger* vagy *Aspergillus aculeatus* által termelt enzimkomplexet alkalmazzák, amelyek alkalmasak láncközi glikozidos kötés hasítására és láncevégi metil-észter csoport lehasítására is, alkalmazhatósági hőmérséklet tartományuk 50 °C alatti.

A kutatási munkánk első fázisában a célunk a különböző teljesítmény szintű, alacsony intenzitású mikrohullámú sugárzásnak kitett pektináz enzim pektin modell oldatban történő hidrolízisének vizsgálata volt.

Anyagok és módszerek

A kísérleteinkhez por alakú pektint (Pectin A f.d. Biochemie) és SIGMA P2611 (>9500 U/mL) típusú vizes bázisú pektináz enzimet használtunk. A mikrohullámú kezeléseket egy változtatható teljesítményű 2,45 GHz frekvenciájú folyamatosan sugározó magnetronnal felszerelt, monomódusú üregrezonátorral rendelkező kezelő-berendezésben végeztük. A hőmérsékletet egy, a mikrohullámú térben is használható paraffinkeverék-töltetű hőmérővel (Lombik Kft.) mértük. Az enzim folyamat során a hőmérsékletet Rai és munkatársai (1994) pektináz enzimmel végzett gyümölcslé előkezelés eredményei alapján 40 °C-nak választottuk.

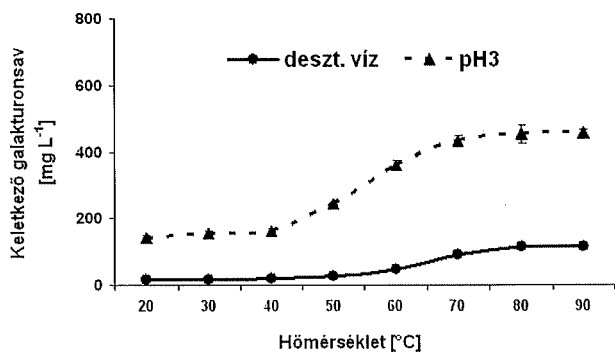
A pektin hidrolízise során keletkező galakturonsav meghatározást m-hidroxibifenil reagenssel, spektrofotometriás módszerrel végeztük, a szakirodalomban közölt Blumenkrantz és Asboe-Hansen módosított módszere alapján (Ibarz et al., 2006).

Eredmények és értékelésük

Kísérleteink során először a semleges és a savas (pH 3) kémhatású modell oldatban lévő pektin különböző hőmérsékletre való felmelegítésének hatására történő

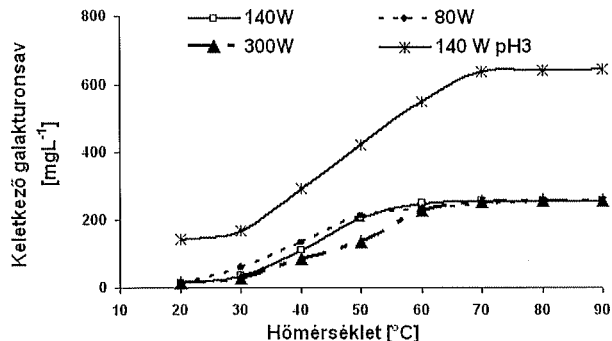
bomlását, továbbá a mikrohullámú sugárzás okozta termikus pektinbomlás mértékét határoztuk meg. A mérések során minden esetben 1 gL^{-1} koncentrációjú 1000 cm^3 térfogatú, a melegítés előtt 10 percig kevertetett pektin modell oldatot használtunk. A modell oldat készítéséhez használt pektin is tartalmazott kismennyiségű szabad galakturonsavat, a desztillált vízzel végzett hőkezelés nélküli minta galakturonsav tartalmát mérve kb. 1,5%-ban. Az enzimekezeléseket megelőző pektin hidrolízis mennyiségi meghatározását a mikrohullámú sugárzás hatására az enzimes hidrolízis ütemében bekövetkező változásoknak a termikus hatásoktól való elkülönítése céljából végeztük.

Mind a desztillált vizes, mind a savas kémhatású oldatban a megnövelt hőmérséklet növeli a hidrolízis során keletkező galakturonsav mennyiségét, azonban a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ -ot meghaladó hőmérsékletű hőkezelés egyik esetben sem okoz további szignifikáns változást (**1. ábra**). A $20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, pH 3 kémhatású oldatban a 20 perces kevertetés után az oldat 142 mgL^{-1} koncentrációban tartalmazott galakturonsavat. Eredményeink alapján tehát megállapítható, hogy a pektinbontás szempontjából a savas kémhatás hatása fokozottabb, mint a hőmérséklet növelése, mert a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra melegített minták esetében sem volt tapasztalható akkora mértékű pektinbomlás, mint a hőkezelés nélküli savas kémhatású, kevertetett oldatban.



1. ábra: A pektin termikus hidrolízise hagyományos hőkezelés esetében

A mikrohullámú besugárzás (MW) esetében három különböző besugárzási intenzitással (80, 140 illetve 300 W) végeztünk kezeléseket. Az azonos hőmérsékletű hagyományos hőkezelést kapott oldatokban keletkezett galakturonsav mennyiségéhez viszonyítva, a mikrohullámú módszer esetében nagyobb mértékű bomlást tapasztaltunk. A $70 \text{ }^\circ\text{C}$ -os kezelési hőmérsékleten, illetve azt meghaladóan a mikrohullámú módszer esetében a keletkezett galakturonsav mennyisége a hagyományos kezelést kapott mintához képest kétszeresére – 115 mgL^{-1} -ről kb. 250 mgL^{-1} -re – növekedett (**2. ábra**).



2. ábra: A pektin hidrolízise mikrohullámú kezelés esetén

A mikrohullámú kezeléseknél a hagyományos kezelésekhöz viszonyított erőteljesebb hatása egyrészt a nagyobb energiasűrűségnek, illetve feltételezhetőleg a nem-termikus hatásoknak tulajdonítható. A savas közegben végzett mikrohullámú kezelés alkalmazásával a pektin bomlása fokozódott, akár 600 mgL^{-1} -t meghaladó galakturonsav koncentráció is elérhető volt.

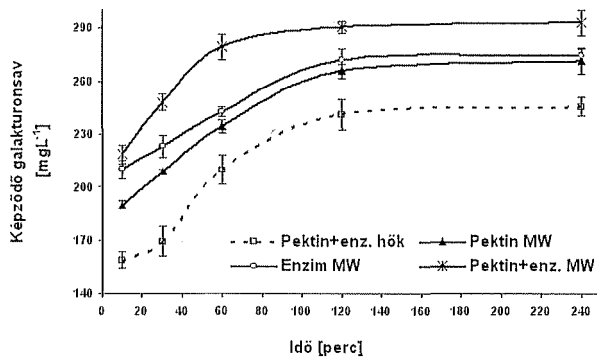
A mikrohullámú kezeléseknél hatékonyságának vizsgálatához a következő kezelési beállításokat választottuk:

- ▶ pektint és pektináz enzimet tartalmazó oldat homogenizálása, hűntartás $40 \text{ }^\circ\text{C}$ -on
- ▶ a homogenizált pektinoldatot mikrohullámmal $40 \text{ }^\circ\text{C}$ -ig melegítése, enzimadagolás majd hűntartás hagyományos hőközléssel
- ▶ az enzimet is tartalmazó oldat mikrohullámú felmelegítése ($40 \text{ }^\circ\text{C}$), szubsztrátadagolás, hűntartás hagyományos hőközléssel
- ▶ az enzimet és a pektint egyaránt tartalmazó oldat mikrohullámú felmelegítése, hűntartás hagyományos hőközléssel.

A mérések során a modelloldat pektinkoncentrációja 1000 mgL^{-1} , a pektináz adagolási koncentrációja $100 \mu\text{L}\cdot\text{dm}^{-3}$.

A pektinoldat 80 W teljesítménnyel végzett mikrohullámú előkezelése, illetve az enzim vizes oldatának mikrohullámú kezelése esetében nagymértékű különbség csak a hidrolízis első órájában volt, a mikrohullámmal besugárzott enzimet a pektint gyorsabban tudta lebontani. A pektint a pektináz enzimmel együtt kezelve az enzimes hidrolízis kezdeti sebessége fokozódott, illetve a mikrohullámmal nem kezelt mintához képest kb. 19%-os növekményt értünk el az összesen keletkező galakturonsav mennyiségét tekintve (**3. ábra**).

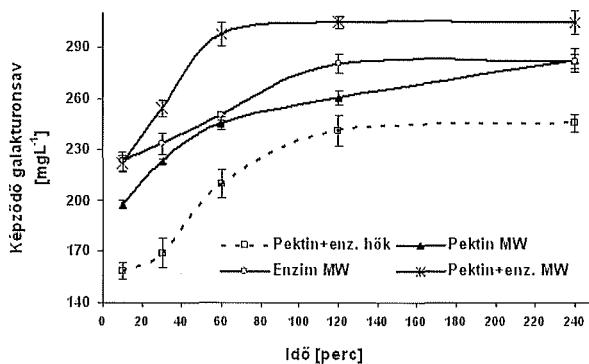
A mérési eredmények alapján az enzimet mikrohullámú besugárzása kb. 11%-os, a csak pektint tartalmazó oldat mikrohullámú kezelése kb. 10%-os, a szubsztrát-enzim rendszer besugárzása pedig kb.



3. ábra: A 80 W teljesítményű mikrohullámú sugárzás hatása az enzimes lebontás folyamatára

20%-os növekedést okozott a képződő galakturonsav koncentrációjában, tehát a pektináz enzim mikrohullámmal való aktivitás növelése a szubsztráttal együtt történő besugárzás esetében volt a legsikeresebb.

A szubsztrát és a pektináz enzim együttes mikrohullámú besugárzása esetén az enzim fehérjeszerkezetében feltételezhetően beálló polaritás átrendeződések aktivitásra gyakorolt előnyös hatása és a pektinmolekula szerkezeti változásai párhuzamosan mennek végbe, és ennek megfelelően az enzimes lebonthatóság növekedése ebben az esetben fokozottabb.



4. ábra: A 140 W teljesítményű mikrohullámú sugárzás enzimes lebontásra gyakorolt hatása

A nagyobb besugárzási intenzitású (140 W) mikrohullámú kezelést követő galakturonsav koncentráció változások tendenciája az előző mérési sorozat esetében ismertekkel megegyezett. A kisebb intenzitású mikrohullámú kezelés esetében leginkább hatékony enzim és szubsztrát együttes besugárzása adta a 140 W-os kezelések esetében is a legjobb eredményeket, a maximálisan elérhető galakturonsav koncentráció kb. 5%-al növekedett a 80 W-os kezelésekhez képest, és a telítési érték is korábban – kb. a 60. percen – mutatkozott (4. ábra).

Következtetések

Munkánk során a mikrohullámú energiaközlésnek a pektin enzimes lebontására gyakorolt hatását vizs-

gáltuk. Mérésekkel meghatároztuk a hagyományos hőközlés és a mikrohullámú energiaközlés hatására végbemenő pektinbomlást, majd az enzimes hidrolízishez használt pektináz enzimet, a szubsztrátot és az enzim-szubsztrát rendszert kezeltük alacsony teljesítményű mikrohullámú sugárzással. Az eredményeink azt mutatták, hogy a mikrohullámú energiaközlés a termikus hatásnak köszönhető pektinbomlason túl az enzimes lebontási folyamat hatékonyságát is növeli. A legjobb hatásfokú enzim-szubsztrát rendszer együttes kezeléskor a pektináz által lebontott anyag mennyisége a besugárzási intenzitástól függően kb. 20-25%-al növekedett.

Eddigi eredményeink alapján a mikrohullámú sugárzás jól alkalmazható a pektináz enzim hatékonyságának növelésére, azonban további vizsgálatok szükségesek a mikrohullámú módszer alkalmazhatóságának vizsgálatára valós pektintartalmú oldatok (pl. gyümölcslevek) esetében.

Irodalomjegyzék

Banik S., Bandyopadhyay S & Ganguly S. (2003): Bioeffects of microwave – a brief review. *Bioresource Technology*, 87, 155-159.

Byus, C.V., Lundak, R.L., Fletcher, R.M. & Adey, W.R. (1984): Alterations in protein kinase activity following exposure of cultured human lymphocytes to modulated microwave fields. *Bioelectromagnetics*, 5, 341-351.

Daniells, C., Duce, I., Thomas, D., Sewell, P., Tattersall, J. & De Pomerai, D. (1998): Transgenic nematodes as biomonitors of microwave-induced stress. *Mutation Research*, 399, 55-64.

Ibarz, A., Pagán, A., Tribaldo, F. & Pagán, J. (2006): Improvement in the measurement of spectrophotometric data in the m-hydroxydiphenyl pectin determination methods. *Food Control*, 17, 890-893.

Laurence, J.A., French, P.W., Lindner, R.A. & McKenzie, D.R. (2000): Biological effects of Electromagnetic Fields-Mechanisms for the Effects of Pulsed Microwave Radiation on Protein Conformation. *Journal of Theoretical Biology*, 206, 291-298.

László, Zs., Simon, E., Hodúr, C. és Fenyvessy, J. (2005): A mikrohullámú technika alkalmazásának újabb lehetőségei az élelmiszer- és környezetiparban. *Debreceni Egyetem Agrártudományi Közlemények*, 18, 29-34.

Neményi, M., Lakatos, E., Kovacs, A. & Szerencsi, Á. (2008): The effect of microwave treatment on cellulase enzyme activity. Abstracts of EurAgEng-International Conference on Agricultural Engineering, 6 p., (CDROM of Proceedings)

Parker, M.C., Besson, T., Sylvain, L. & Legoy, M.D.

(1996): Microwave radiation can increase the rate of enzyme-catalyzed reactions in organic media. *Tetrahedron Letters*, 46, 8383-8386.

Rai, S. (1997): Causes and Mechanism(s) of NER Bioeffects. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 16(1), 59-67.

Rai, P., Majumdar, G.C., DasGupta, S. & De, S. (1994): Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 64, 397-403.

Szabó, G. (1991): A mikrohullámú technika alkalmazása az élelmiszeripari és biotechnológiai gyakorlatban. *Szeszipar*, 4, 124-127.

Examination of the effects of microwave irradiation on the enzymatical hydrolysis of pectin

A. Polgár– S. Beszédes – G. Szabó – C. Hodúr

Beside the telecommunication applications microwave (MW) radiation has long been examined in pasteurization and sterilization process and as an analytical method; and it is well applicable to drying

process based on the rapid heating capability. Beyond the thermal effects the so-called athermal effects are the focus area of the current MW research activity. The objective of our work was to examine the effect of the low intensity microwave irradiation on the enzymatic depectinization of a model solution. The enhanced degree of the enzymatic hydrolysis of pectin could be manifested in higher yield of squeezing and membrane concentration process of berries and fruit juices. Based on our preliminary results the MW treatment increases the rate of pectin hydrolysis through the higher activity of pectinase enzyme. The most efficient pectin degradation was obtained after the enzyme-substrate simultaneous MW irradiation. Our preliminary results indicate the low intensity MW pre-treatments suitable for intensification of pectinase activity.

Szerzők neve, beosztása és címe:

Polgár Anikó élelmiszermérnök (BSc) hallgató

Beszédes Sándor tanársegéd

Prof. Dr. Szabó Gábor egyetemi tanár

Prof. Dr. Hodúr Cecilia egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Kar

6725 Szeged, Moszkvai krt. 5-7.

E-mail: annyys@citromail.hu

HIRDESSEN

az ÉLELMISZER TUDOMÁNY TECHNOLÓGIA szakfolyóiratban!

A negyedévente megjelenő színvonalas cikkeket, összefoglalókat, szakmai híreket, projekt összefoglaló eredményeket tartalmazó periodika hívja és várja az élelmiszer-tudomány és technológia iránt elkötelezett hirdetőit, akik az élelmiszerbiztonság, -jog, -technológia, -forgalmazás, -kutatás-fejlesztés számos kérdését megvitató cikkek mellett ismeretet nyújtanak egyes termékeikről és szolgáltatásaikról.

A hirdetések díjtételei:

- ▶ A címlapon (180x180 mm), illetve a hátlapon (A4, 210x290 mm) történő hirdetés nettó ára 80.000 Ft
- ▶ Belső oldalon A4 (210x290 mm) méretben nettó 70.000 Ft
- ▶ Belső oldalon A5 (210x145 mm) méretben nettó 40.000 Ft
- ▶ Hirdetés és 1 oldalas bemutatkozás nettó 100.000 Ft
- ▶ Egy oldalas bemutatkozás nettó 50.000 Ft
- ▶ Két oldalas bemutatkozás nettó 80.000 Ft
- ▶ Projekt eredmények közzlése (disszemináció) oldalanként 20.000 Ft.

A hirdetések megrendelhetők a **MÉTE Kiadónál**, az **1117 Budapest, Dombóvári út 6-8.** címen, vagy a **06-1-214-6691** telefonszámon, a **06-1-214-6692** faxszámon, illetve **e-mailben a mail.mete@mtesz.hu.** címen.