



EESTI MAAÜLIKOOL

Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut
Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetool

Anete Aunbaum

**MAHLADE TOOTMISEL KASUTATAVAD
IMMOBILISEERITUD HÜDROLÜÜTILISED ENSÜÜMID
IMMOBILIZED HYDROLYTIC ENZYMES USED IN JUICE
PRODUCTION**

Magistritöö

Toiduainete tehnoloogia õppekava

Juhendajad: Toonika Rinke, *PhD*

Anna Pisponen, *PhD*

Tartu 2024

| | | | |
|---|---------------|-----------------------------------|-----------|
| Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014 | | Magistritöö lühikokkuvõte | |
| Autor: Anete Aunbaum | | Õppekava: Toiduainete tehnoloogia | |
| Pealkiri: Mahlade tootmisel kasutatavad immobiliseeritud hüdrolüütilised ensüümid | | | |
| Lehekülgi: 53 | Jooniseid: 21 | Tabeleid: 5 | Lisaid: 0 |
| Osakond / Õppetool: Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetool ETIS teadusvaldkond ja CERC S-i kood: 1.7. Toiduteadused, Toiduainete ja jookide tehnoloogia T430 Juhendaja(d): Toonika Rincken <i>PhD</i> , Anna Pisonen <i>PhD</i> Kaitsmiskoht ja aasta: Tartu 2024 | | | |
| <p>Toiduainetööstuses kasutatakse pektinolüütilisi ja tsellulaaseid ensüümpreparaate, mis lisatakse mahla valmistamisel purustatud marjamassile, et vähendada peamiselt mahla viskoossust ja hägusust. Käesolevas töös immobiliseeriti nailon 6/6-kandjale nii pektinaasi kui ka tsellulaasi ensüüme ning hinnati kasutatud ensüümelementide aktiivsust, stabiilsust ja tööiga mustsõstramahlas.</p> <p>Ensüümelementide valmistamiseks immobiliseeriti ensüümid raamile keritud 8 m pikkustele nailon 6/6-kihtidele kasutades dimetüülsulfaati ja glutaaraldehüüdi. Immobiliseeritud ensüümide katalüütilise aktiivsuse määramine viidi läbi viskosimeetrilise meetodi abil, kuna võrreldes spektrofotomeetrilise meetodiga oli see lihtsam, täpsem, kiirem ja parema korratavusega. Nelja pektinaasipreparaadi seast valiti immobiliseerimiseks Pectinex Ultra Mash, kuna selle pektinolüütiline aktiivsus oli kõige suurem.</p> <p>Ensüümelementide keskmine pektinolüütiline aktiivsus oli esimesel mõõtmiskorral $0,18 \pm 0,001$ U ning kümnenadal kasutuskorral oli säilinud 27% esialgsest aktiivsusest. Ilma kasutamata püsis pektinolüütiline aktiivsus kuu aja vältel stabiilsena nii toatemperatuuril kui ka $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures naatriumatsetaapuhvril. Tsellulaasne aktiivsus oli algselt $0,63 \pm 0,002$ U ning 46.päeval oli säilinud 37% esialgsest aktiivsusest. Mustsõstramahlas säilis pektinolüütilisest aktiivsusest 5 kuu möödudes 55%, tsellulaasest aktiivsusest säilis peale nelja kasutuskorda 44% esialgsest. Ehkki ensüümelementide pektinolüütiline kui ka tsellulaasne aktiivsus mustsõstramahlas aja jooksul vähenes, on saadud tulemused heaks eelduseks immobiliseeritud ensüümide kasutamiseks.</p> | | | |
| Märksõnad: ensüümi immobiliseerimine, tsellulaasne aktiivsus, pektinolüütiline aktiivsus, nailon 6/6-kandja, stabiilsus | | | |

| | | | |
|---|-------------|------------------------------------|---------------|
| Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014 | | Abstract of Master's Thesis | |
| Author: Anete Aunbaum | | Curriculum: Food Technology | |
| Title: Immobilized hydrolytic enzymes used in juice production | | | |
| Pages: 53 | Figures: 21 | Tables: 5 | Appendixes: 0 |
| Department / Chair: Chair of Food Science and Technology Field of research and (CERC S) code: 1.7. Food Sciences, Food and drink technology T430 Supervisors: Toonika Rinke <i>PhD</i> , Anna Pisponen <i>PhD</i> Place and date: Tartu 2024 | | | |
| <p>In the food production, pectinolytic and cellulolytic enzyme preparations are used. These are added to the berry mash during juice preparation, primarily to reduce the viscosity and turbidity of the juice. In this present study, both pectinase and cellulase enzymes were immobilized on nylon 6/6 carriers and the activity, stability and reusability of the used enzyme elements were evaluated in blackcurrant juice.</p> <p>To prepare enzyme elements, enzymes were immobilized on the 8 m long nylon 6/6 thread carriers using dimethyl sulfate and glutaraldehyde. The catalytic activity of the immobilized enzymes was determined viscosimetrically because it was simpler, more accurate, faster and with better repeatability compared to the spectrophotometric method. Among the four pectinase preparations, Pectinex Ultra Mash was chosen for immobilization due to its highest pectinolytic activity.</p> <p>The average pectinolytic activity of the enzyme elements was 0.18 ± 0.001 U at the first measurement, and 27% of the initial activity was retained after the tenth use. Without use, the pectinolytic activity remained stable for one month both at room temperature and at 4 °C in sodium acetate buffer. The initial cellulolytic activity was 0.63 ± 0.002 U, and 37% of the initial activity was retained on the 46th day. In blackcurrant juice, 55% of the pectinolytic activity was retained after 5 months, and 44% of the initial cellulolytic activity was retained after four uses. Although both the pectinolytic and cellulolytic activity of enzyme elements in blackcurrant juice decreased over time, the obtained results present a promising prospect for the use of immobilized enzymes.</p> | | | |
| Keywords: enzyme immobilization, cellulolytic activity, pectinolytic activity, nylon 6/6 carrier, stability | | | |

SISUKORD

| | |
|--|----|
| LÜHENDID..... | 5 |
| SISSEJUHATUS | 6 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 7 |
| 1.1. Marjades leiduvad polüsahhariidid | 7 |
| 1.1.1. Pektiin | 8 |
| 1.1.2. Tselluloos..... | 10 |
| 1.2. Struktuursete polüsahhariidide hüdrolüüsimiseks vajalikud ensüümid | 11 |
| 1.2.1. Pektinaasid | 11 |
| 1.2.2. Tsellulaasid | 13 |
| 1.3. Tööstuses kasutatavad ensüümpreparaadid marjamahla tootmiseks..... | 14 |
| 1.3.1. Pektinaaside tootmiseks kasutatavad allikad | 15 |
| 1.3.2. Tsellulaaside tootmiseks kasutatavad allikad | 16 |
| 1.3.3. Kommertsiaalsed ensüümpreparaadid marjade töötlemiseks | 17 |
| 1.4. Ensümeerimise mõju mahla füüsikalise-keemilistele omadustele mustsõstramahla näitel | 19 |
| 2. EKSPERIMENTAALNE OSA | 22 |
| 2.1. Materjal ja meetodika..... | 22 |
| 2.1.1. Töös kasutatud materjalid | 22 |
| 2.1.2. Kasutatud aparatuur | 23 |
| 2.1.3. Lahuste valmistamine | 23 |
| 2.1.4. Ensüümide aktiivsuse määramine..... | 24 |
| 2.1.4.1. Tsellulaasse aktiivsuse määramine 3,5-dinitrosalitsüülhappe (DNS) abil spektrofotomeetriliselt..... | 24 |
| 2.1.4.2. Tsellulaasse aktiivsuse määramine viskosimeetriliselt..... | 24 |
| 2.1.4.3. Pektinolüütilise aktiivsuse määramine viskosimeetriliselt | 24 |
| 2.1.5. Ensüümi immobiliseerimine nailon 6,6-kandjale | 25 |
| 2.1.6. Ensüümelementide pektinolüütilise ja tsellulaasse aktiivsuse mõõtmine..... | 26 |
| 2.1.7. Tulemuste statistiline analüüs | 26 |
| 3. TULEMUSED JA ARUTELU | 27 |
| 3.1. Lahustunud ensüümide aktiivsuse määramine | 27 |
| 3.1.1. Tsellulaasse aktiivsuse määramine | 27 |
| 3.1.1.1. Tsellulaasse aktiivsuse määramine spektrofotomeetrilisel DNS meetodil..... | 27 |
| 3.1.1.2. Tsellulaasse aktiivsuse viskosimeetriline määramine | 29 |
| 3.1.2. Pektinolüütilise aktiivsuse määramine..... | 30 |
| 3.1.2.1. Pektinolüütilise aktiivsuse viskosimeetriline määramine..... | 30 |
| 3.2. Ensüümelementide aktiivsuse mõõtmine | 32 |
| 3.2.1. Ensüümelementide aktiivsuse sõltuvus niidi pikkusest | 32 |
| 3.2.2. Ensüümelementide stabiilsus | 33 |
| 3.2.3. Pektinolüütilise ensüümelementide aktiivsuse stabiilsus..... | 35 |
| 3.2.3.1. Ensüümelementide pektinolüütilise aktiivsuse sõltuvus kasutuskorrast | 35 |
| 3.2.3.2. Ensüümelementide pektinolüütilise aktiivsuse stabiilsus selle passiivsel säilitamisel...36 | |
| 3.2.4. Tsellulaasse ensüümelementide aktiivsuse stabiilsus | 38 |
| 3.2.4.1. Ensüümelementide tsellulaasse aktiivsuse sõltuvus kasutuskorrast..... | 38 |
| 3.2.4.2. Ensüümelementide tsellulaasse aktiivsuse stabiilsus säilitamisel | 39 |
| 3.2.5. Ensüümelementide kasutamise testimine mustsõstramahlas | 40 |
| 3.2.5.1. Pektinolüütilise ensüümelementide kasutamine..... | 40 |
| 3.2.5.2. Ensüümelementide tsellulaasne aktiivsus mustsõstramahlas | 42 |
| KOKKUVÕTE | 44 |
| KASUTATUD KIRJANDUS..... | 46 |

LÜHENDID

BG – β -glükosidaas

CMC – karboksümetüülselluloos

DNS – 3,5-dinitrosalitsüülhape

HG – homogalakturonaan

EG – endo- β -(1,4)-glükanaas

GalA – α -1,4-D-galakturoonhape

RG I – ramnogalakturonaan I

RG II – ramnogalakturonaan II

PAE – pektiinatsetüülesteraa

PG – polügalakturonaas

PGA – polügalakturoonhape

PL – pektiinlääas

PME – pektiinmetüülesteraa

sp – liik (i. k *species*)

TBH – ekso- β -(1,4)-tsellobiohüdrolaas

TFF – tahke faasi fermentatsioon (i.k SSF – *solid state fermentation*)

VFF – vedela faasi fermentatsioon (i.k SMF – *submerged fermentation*)

SISSEJUHATUS

Toidutööstuses kasutatakse marjade töötlemisel purustatud marjamassi ensümaatilist töötlemist. See vähendab mahla viskoossust, kiirendades oluliselt mahlatootmise protsessi ja suurendades mahla saagist ning muudab kokkuvõttes mahlapressimise efektiivsemaks.

Mahlade valmistamisel kasutatakse erinevaid ensüüme sisaldavaid ensüümpreparaate, mis tavaliselt lisatakse purustatud marjamassile lahustunud kujul. Lahustunud ensüüme ei ole võimalik mahlast eraldada ning nende inaktiveerimiseks saadud mahla tavaliselt kuumutatakse.

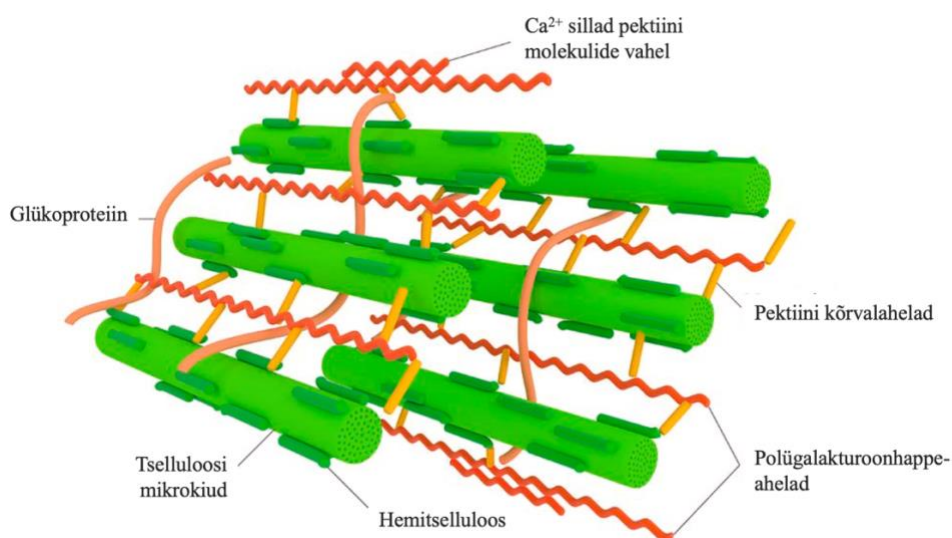
Ensüümide korduvaks kasutamiseks, mis ühtlasi vähendab ensümeerimise hinda, ning ensüüme mittesisaldava lõpptoodangu saamiseks võib lahustunud ensüümide asemel kasutada ka immobiliseeritud ensüüme. Immobiliseeritud ensüümid on defineeritud kui biokatalüsaatorid, mis on lokaliseeritud kindlasse ruumi osasse (näiteks seotud mittelahustuvale kandjale või moodustatud suuremad ristseotud ensüümiagregaadid) ning millel on säilinud nende katalüütiline aktiivsus. Immobiliseeritud ensüümide eeliseks on võimalus nende korduvkasutamiseks, samuti rakendamiseks läbivoolulistes süsteemides. Immobiliseeritud ensüümide kasutamine võimaldab ensümeerimisprotsesside kontrollitavat läbiviimist, kuna ensüümi on võimalik marjamassist eraldada ning sellega ensümeerimisprotsess vajalikul ajahetkel lõpetada.

Magistritöö eesmärk oli uurida mustsõstramahla ensümaatilisel töötlemisel kasutatavate pektinaasi- ja tsellulaasipreparaatide immobiliseerimise võimalusi nailon 6,6-kandjale ning iseloomustada saadud ensüümelementide aktiivsust, stabiilsust ja tööiga. Lähtudes töö eesmärgist püstitati hüpotees, et lahustumatul kandjal immobiliseeritud hüdrofüütiliste ensüümide kasutamine võimaldab nende korduvkasutamist ning ensümeerimisprotsesside kontrollitavat läbiviimist.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Marjades leiduvad polüsahhariidid

Taimerakke ümbritseb primaarne ja sekundaarne rakukest, mis annavad rakule kindla kuju ja tugevuse. Taime rakukestal on kompleksne makromolekulaarne struktuur.[1] Marjarakkude primaarne kest, mis tekib raku esialgse kasvu ja laienemise ajal, koosneb põhiliselt kolmest polüsahhariidist: tselluloosist, hemitselluloosist ja pektiinist, kuid võib sisaldada ka struktuurseid valke (Joonis 1) [2]. Sekundaarne rakukest, mis moodustub taimeraku kasvu vähenemisel, koosneb tselluloosist, hemitselluloosist ja ligniinist [3]. Primaarses rakukestas ligniini ei leidu ning sekundaarses rakukestas jääb pektiinainete hulk märgatavalt väiksemaks.[4]



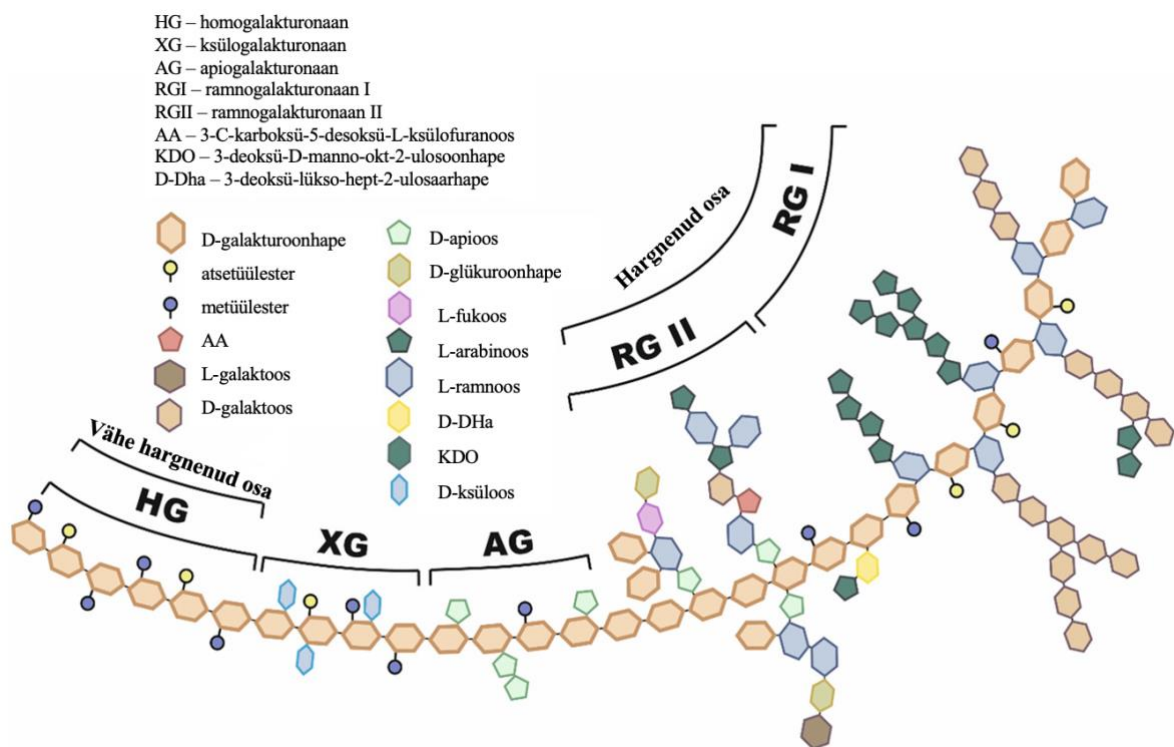
Joonis 1. Primaarne rakukest, mis koosneb tselluloosi mikrokiududest (heleroheline), hemitselluloosist (tumeroheline), glükoproteiinist (oranž), ja pektiinimolekulidest, mida seovad kaltsiumioonsillad.[5]

Primaarses rakukestas on tselluloosi mikrokiud ristseotud glükoproteiinide, pektiini ja hemitselluloosi molekulidega. Primaarses rakukestas on hüdrofiilne keskkond. See sisaldab üle

70% vett ja selles on lahustuvad valgud (sh ensüümid), anorgaanilised katioonid ja anioonid (H^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}), lahustuvad oligosahhariidid jms.[4] Kaltsiumioonid moodustavad ristsidemeid pektiinimolekulide vahele [6]. Sekundaarse rakukesta moodustumisel vesifaasi hulk väheneb, kuna rakku tekib ligniini ja rohkem tselluloosi. Purustatud mustsõstramass sisaldab kuivaines 12,0% tselluloosi, 25,3% hemitselluloosi, 2,7% pektiini ja 59,3% ligniini [7]. Polüsahhariidide maatriks muudab marjamahla viskoosseks, mille tõttu on mahla efektiivsemaks tootmiseks ja mahla selitamiseks vajalik polüsahhariidide hüdroliis erinevate ensüümidega [8].

1.1.1. Pektiin

Pektiin on heteropolüsahhariid (Joonis 2), mida leidub rohkelt taime primaarses rakukestas ja rakuvaheaines [9]. Pekiini molekuli struktuur ja koostis sõltub oluliselt selle päritolust [10].



Joonis 2. Pekiini molekuli põhiahel koosneb α -1,4-D-galakutroonhappe (Gala) monomeeridest, lineaarsest vähe hargnenud osast ja hargnenud osast. Vähe hargnenud osa sisaldab homogalakturonaani (HG), ksülogalakturonaani ja apiogalakturonaani ahelaid,

hargnenud osa sisaldab kompleksseid ramnogalakturonaan I (RG I) ja ramnogalakturonaan II (RG II) struktuure.[9]

Pektiini primaarne struktuur koosneb kovalentselt seotud galakturoonhappe ja ramnoosi korduvatest monomeeridest. Pektiini sekundaarne spiraalne struktuur moodustub korduvate polümeeride α -1,4 ja α -1,2 vahelistest glükosiidsidemetest.[11] Kõrgemate tasemete struktuurid moodustuvad ioonsete, hüdrofoobsete või hüdrofiilsete ahelatevaheliste interaktsioonide tõttu, mille tulemuseks on kolmemõõtmelised struktuurid nagu geelid, kompleksid ja viskoossed lahused.[9]

Taimedes on kolm põhilist pektiini struktuuriühikut: homogalakturonaan (HG), ramnogalakturonaan I (RG I) ja ramnogalakturonaan II (RG II). Pektiinideks loetakse ka ksülogalakturonaani ja apiogalakturonaani, kuna nende põhiahelaks on samuti HG. Peamine pektiini polümeeriahela monomeer on α -1,4-D-galakturoonhappe (GalA). HG sisaldab GalA ühikuid, milles mõned karboksüülrühmad on metüleeritud või atsetüleeritud.[12] RG I sisaldab korduvad GalA ja α -1,2-L-ramnoosi monomeere. RG II koosneb GalA monomeeridest, kuid selle põhiahel on väga hargnenud, kuna selle teise ja kolmanda süsinikuga on seotud palju kõrvalahelaid. Kõrvalahelad võivad sisaldada arabinoosi, apioosi, fukoosi, galaktoosi, ramnoosi, GalA ja ksüloosi.[9]

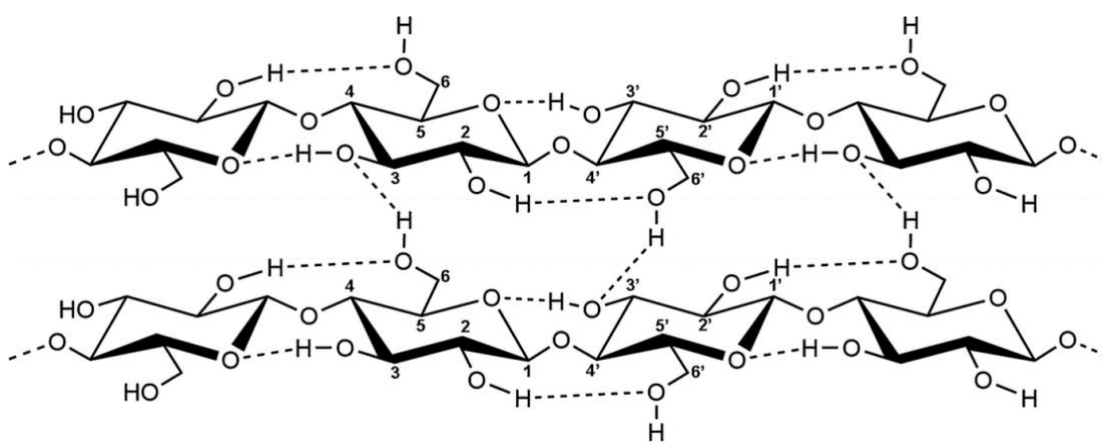
Pektiinained on jaotatud nelja klassi: protopektiin, polügalakturoonhappe (PGA), metüleeritud polügalakturoonhappe ja pektiin [13]. Protopektiin on vees lahustumatu ja selle hüdrolüüsisaadused on pektiin või PGA. Viimane on vees lahustuv pektiinaine, mis sisaldab kuni 100 GalA monomeeri. Metüleeritud PGA sisaldab kuni 75% ulatuses metüleeritud galakturonaatmonomeere ning kuna see sisaldab tavapäraselt 100-200 GalA monomeeri, on selle molekulmass üldjuhul suurem PGA-st.[14] Olenevalt sellest, kui palju karboksüülrühmadest on esterdatud, jaotatakse pektiinid madala- ja kõrge esterduastmega pektiinideks. Kui rohkem kui 50% karboksüülrühmadest on esterdatud, siis on tegemist kõrge esterduastmega pektiinidega, kui aga alla 50% karboksüülrühmadest on esterdatud, siis madala esterduastmega pektiinidega. Esterduastmest sõltuvad ka pektiinide geelistumisomadused.[15]

Lisaks pektiinile on mahlade kõrge viskoossuse põhjustamisel oluline roll ka tselluloosil, mis esineb looduses mõnel juhul peaaegu puhtal kujul, kuid enamikul juhtudel on tselluloosi kiud

seotud teiste struktuursete biopolümeeride, peamiselt hemitselluloosi ja ligniini matriksisse.[16]

1.1.2. Tselluloos

Tselluloos on peamine struktuurikomponent ja kõige stabiilsem polüsahhariid võrreldes teiste rakukesta komponentidega. Tselluloos sisaldab paralleelseid hargnemata β -D-glükopüraanoosi monomeere, mis on omavahel seotud β -1,4-glükosiidsidemete kaudu (Joonis 3).[4]



Joonis 3. Tselluloosi struktuur. Tselluloosi molekulid koosnevad β -1,4-glükosiidsidemetega seotud β -D-glükopüraanoosi monomeeridest.[17]

Üks β -D-glükopüraanoosi monomeer sisaldab kolme hüdroksüülrühma, mis moodustavad tugevaid molekulisiseseid ja -vahelisi vesiniksidemed. Selle tõttu on tselluloos kristallilise struktuuriga, supermolekulaarne ja vees lahustumatu.[18] Need kohad, kus vesinikside on katkenud, on amorfseid piirkonnad. Tselluloosi ahela ühes otsas on redutseeriv ja teises mitte-redutseeriv rühm.[19]

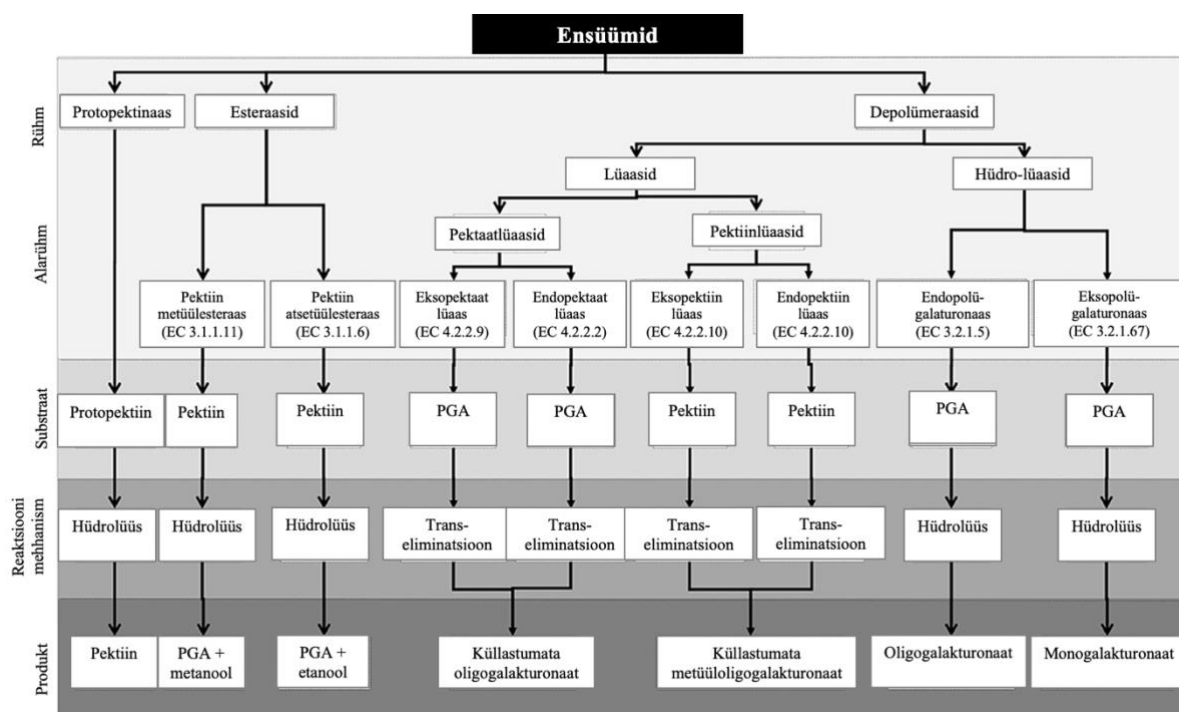
Enamik loomi, sealhulgas inimesed, ei ole võimelised tselluloosi seedima, kuna nad ei sünteesi tsellulaase. Seetõttu ei suuda nad ära kasutada kogu taimses materjalis sisalduvat energiat.[16]

1.2. Struktuursete polüsahhariidide hüdrolüüsimiseks vajalikud ensüümid

Mahlades leiduvate struktuursete polüsahhariidide hüdrolüüsimiseks kasutatakse tööstuses tänapäeval tavaliselt ensümaatilist töötlemist, mis võimaldab võrreldes mehhaanilise või termilise töötusega suurendada mahlade saagist ning kiirendada tootmisprotsessi. Ühtlasi võimaldab ensüümide kasutamine saada selgema ja visuaalselt atraktiivsemaid lõpptooteid.[16]

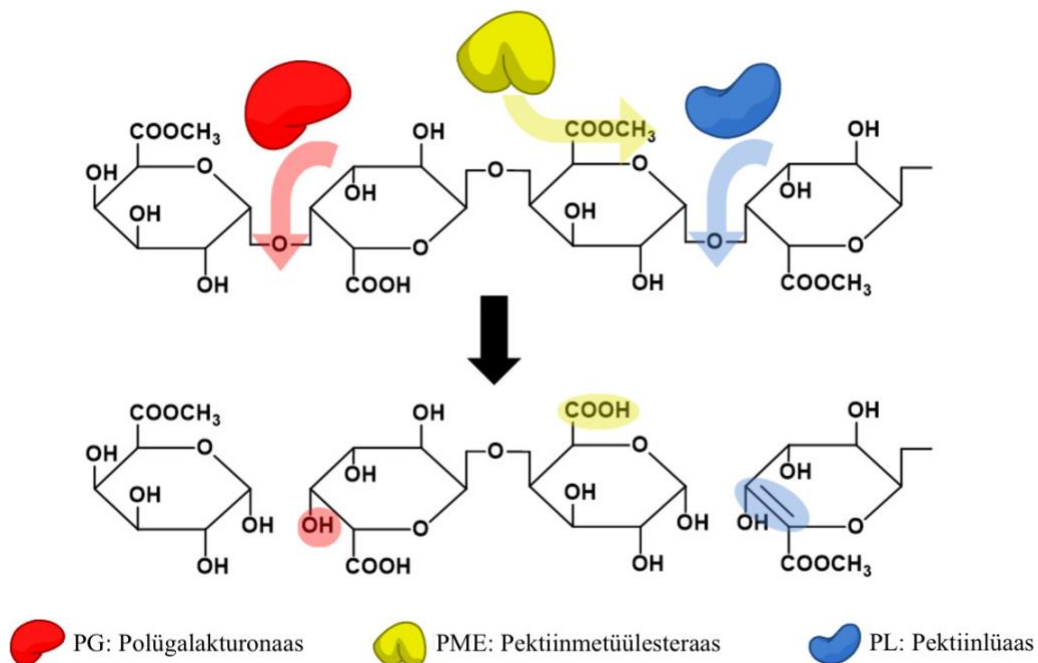
1.2.1. Pektinaasid

Pektinaasid on pektiini lagundavad pektinolüütilised ensüümid, mida kasutatakse tööstuses mahlade valmistamisel ja töötlemisel nende viskoossuse, läbipaistvuse ja filtreeritavuse parandamiseks [20]. Erinevaid pektinolüütilisi ensüüme on üle kümne ja need jaotatakse nende toimemehhanismi ja substraadi põhjal kolme suuremasse rühma: protopektinaasid, esteraasid ja depolümeraasid (Joonis 4).



Joonis 4. Pektinolüütilised ensüümid, nende spetsiifilised substraadid ja lõpp-produktid.[21]

Protopektinaasid katalüüsivad vees lahustumatu protopektiini hüdrolüüsi, mille tulemusena saadakse lahustuv pektiin. Estersidemete hüdrolüüsi katalüüsivad esteraasid jaotatakse pektiinmetüülesterasiks (PME, EC 3.1.1.11) ja pektiinatsetüülesterasiks (PAE, EC 3.1.1.6). Nende ensüümide toimel vabaneb vastav alkohol ja tekib PGA (Joonis 5) [21]. Hüdrolüüsi käigus tekivad pektiinis negatiivselt laetud piirkonnad, mis on võimelised seonduma Ca^{2+} iooniga ja moodustavad kaltsiumpektaatgeelid, mis sadestuvad ja selitavad mahla [22]. PME aktiivsus on suurim pH väärtuste vahemikus 4,0-7,5, kuna selles vahemikus toimub karboksüülrühma ioniseerimine ja prootoni eraldumine. PME toime mõjutab ka pektiini sisaldava lahuse viskoossust. Ca^{2+} ionide olemasolul toimub Ca^{2+} ionide ristsidestumine PGA ahelatega, mille tõttu lahuse viskoossus suureneb.[16]



Joonis 5. Pektiniahelate hüdrolüüsi ensüümide toimel: PG (punane), PME (kollane), PL (sinine). PG ja PL hüdrolüüsivad α -(1,4)-glükosiidsidemeid ja PME metüülestersidemeid.[16]

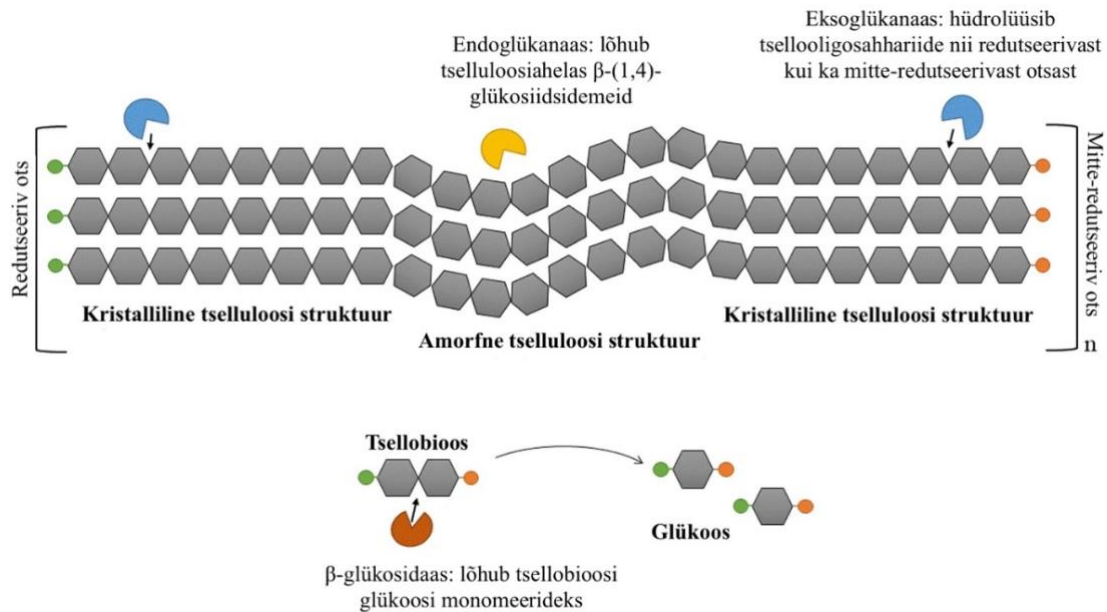
Pekiini depolümeraasid jaotatakse lüaasideks ja polügalakturonaasideks (PG). PG-d katalüüsivad D-PGA α -(1,4)-glükosiidsideme hüdrolüüsi (Joonis 5). PG-d on kahte tüüpi vastavalt nende toimemehhanismile: eksopolügalakturonaas (EC 3.2.1.67) ja endopolügalakturonaas (EC 3.2.1.1.5).[21] Ekso-PG toimib polümeeriahela terminaalsele osale, mille tulemusel eraldub suhkrumonomeer ja väheneb järk-järgult ahela pikkus. Endo-PG seondub juhuslikult polümeeriahela keskele ja nii toimub kiirem ahela lühenemine.[16] PG-de

katalüütilist aktiivsust saab määrata kahe erineva meetodi abil: (a) redutseerivate rühmade arvu suurenemise järgi, ja (b) substraadilahuse viskoossuse vähenemise alusel [23].

Pektiinlääsid (PL) on depolümeraasid, mis lagundavad pektiini glükosiidsidemed neljanda süsinikuaatomi juures eemaldades samal ajal vesiniku viiendast süsinikuaatomist ja tekitades D 4:5 küllastumata saaduseid (Joonis 5).[21] PL-d jaotatakse kahte suuremasse rühma: polügalakturonaat lüaas (pektaatlüaas) ja polümetüülgalakturonaat lüaas (pektiinlüaas). Need on veel omakorda liigitatud toimemehhanismi ja substraadi alusel viide väiksemasse alarühma: endopolügalakturonaat lüaas (EC 4.2.2.2), eksopolügalakturonaat lüaas, (EC 4.2.2.9), endopolümetüülgalakturonaat lüaas (EC 4.2.2.10), eksopolümetüülgalakturonaat lüaas (EC 4.2.2.10) ja oligo-D-galaktosiduronaat lüaas (EC 4.2.2.6). Endopolügalakturonaat lüaas lagundab keemilisi sidemeid juhuslikult ahela keskelt, samas kui eksopolügalakturonaat lüaas seondub mitte-redutseerivasse otsa. Sarnaselt töötavad ka polümetüülgalakturonaat lüaasid, endopolümetüülgalakturonaat lüaas lõikab juhuslikult α -1,4-glükosiid sidemeid ja tekitavad küllastumata metüüloligogalakturonaadid. Eksopolümetüülgalakturonaat lüaasid transelimineerivad sidemeid ja tekitavad küllastumata metüülmonogalakturonaadid. Oligo-D-galaktosiduronaat lüaas transelimineerib terminaalistes küllastumata digalakturonaati monogalakturonaadiks.[24] Pektaatlüaasid vajavad erinevalt PG-dest aktiivsuse tõstmiseks Ca^{2+} iooni olemasolu. Etüleendiamiintetraädikhape on tüüpiline inhibiitor pektaatlüaasidele, Ca^{2+} iooniga seondumise tõttu [25]. PL-de aktiivsust võivad inhibeerida ka Pb^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} ja Hg^{2+} katioonid [26].

1.2.2. Tsellulaasid

Tsellulaasid on ensüümid, mis katalüüsivad tselluloosi hüdrolyüsi, kusjuures hüdrolyüsi lõpp-produkt on β -D-glükoos. Tsellulaasidena tuntakse peamiselt kolme ensüümi: endo- β -(1,4)-glükanaas (EG; EC 3.2.1.4), ekso- β -(1,4)-tsellobiohüdrolaas (TBH; EC 3.2.1.91) ja β -glükosidaas (BG; EC 3.2.1.21).[27] EG ja TBH hüdrolyüsivad tselluloosi tsellooligosahhariidideks (Joonis 6). EG katalüüsib peamiselt glükosiidsidemete hüdrolyüsi tselluloosi kristallilises alas ja TBH amorfses alas [28]. BG hüdrolyüsib tekkinud oligosahhariidide, peamiselt tsellobioosi, glükoosiks.[29]



Joonis 6. Tselluloosi lagundamine glükooiks koosneb mitmest etapist. Endo- β -(1,4)-glükanaas ja tsellobiohüdrolaas hüdrolüüsivad tselluloosi tsellooligosahhariidideks (tsellobioos). β -glükosidaas hüdrolüüsib tsellobioosi glükooiks.[29]

EG (eraldatud *Myceliophthora thermophila*-st) jaoks on optimaalne töötemperatuuri vahemik 35-50 °C ja pH vahemik 3,5-7,5. BG (eraldatud *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4) jaoks optimaalne töötemperatuuri vahemik on 35-55 °C ja pH vahemik 3,5-7,0.[30] TBH-le (eraldatud *Chaetomium thermophilum*-st) on optimaalne töötemperatuuri vahemik 40-90 °C (optimaalseim 70 °C) ja sobivaim pH 5,0 [31].

1.3. Tööstuses kasutatavad ensüümpreparaadid marjamahla tootmiseks

Lähtuvalt puhaste ensüümpreparaatide kõrgest hinnast kasutatakse tööstuses mitmesuguseid ensüümide segusid, mis saadakse erinevate mikroorganismide kasvatamisel erinevatel substraatidel.

1.3.1. Pektinaaside tootmiseks kasutatavad allikad

Tööstuslike pektinaaside preparaatidest on ligikaudu 50% pärit seentest, 35% bakteritest ja 15% taimsetest allikatest. Erinevatest algallikatest pärinevad erinevat tüüpi pektinolüütilistel ensüümidel on varieeruvad toimemehhanismid ja biokeemilised omadused.[32] Pektinaaside eraldamine ja tööstuslik tootmine nõuab suuremahulisi fermentatsiooniprotsesse. Tööstuslike pektinolüütilisi ensüüme toodetakse sõltuvalt allikast vedela faasi (VFF) või tahke faasi fermentatsiooni (TFF) teel.[21] Traditsiooniliselt on tööstuslike ensüüme toodetud VFF meetodit, kuna see on tehnoloogiliselt lihtsam ja võimaldab paremat kontrolli keskkonnategurite (pH, temperatuur) üle, ehkki TFF-l on võrreldes VFF-ga suurem saagikus ja väiksem heitvee teke. Hallituseentest pektinaaside tootmiseks kasutatakse enamasti TFF-i meetodit, kuna seened suudavad kasvada tahketel materjalidel madala vee sisalduse juures.[33]

Pektinaaside tootmisel on kõige olulisem mikroorganismide valik. Hallituseened (*Aspergillus* ja *Penicillium*) on kõige sobilikumad mikroorganismid pektinaaside tootmiseks [34], sest nende kasutamisel on kasvukeskkond sarnane nende loodusliku elupaigaga, mistõttu suudavad hallituseened fermentatsiooni käigus ensüüme ja muid metaboliite sünteesida märkimisväärses koguses. Samuti saab pektinaase toota pärmseente perekondadest *Saccharomyces*, *Cryptococcus* ja liikidest *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula dairenensis* ning *Wickerhanomyces anomalus* [35]. Pektinaaside tootmiseks sobivad ka erinevad bakteriperekonnad (*Bacillus*, *Erwinia*, *Enterobacter*).[34] Erinevate pektinolüütiliste ensüümide tootmiseks kasutatavad mikroorganismid ja fermentatsioonimeetodid on kokkuvõtlikult esitatud Tabel 1.

Tabel 1. Erinevate pektinaaside tootmiseks kasutatavad mikroorganismid ja enamkasutatavad fermentatsiooni protsessid

| Ensüüm | Mikroorganism | Fermentatsiooni meetod | Viide |
|----------------|-------------------------------------|------------------------|-------|
| Protopektinaas | <i>Aspergillus terreus</i> | VFF | [36] |
| | <i>Aspergillus awamori</i> IFO 4033 | TFF | [37] |
| PME | <i>Aspergillus niger</i> | TFF | [38] |
| | <i>Aspergillus tubingensis</i> | TFF | [39] |
| | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | VFF | [40] |
| PG | <i>Bacillus</i> sp | TFF | [41] |
| | <i>Saccharomyces</i> sp | VFF | [42] |
| | <i>Erwinia</i> sp | VFF | [43] |

| | | | |
|----|--------------------------------|-----|------|
| PL | <i>Saccharomyces</i> sp | VFF | [42] |
| | <i>Aspergillus oryzae</i> | TFF | [44] |
| | <i>Penicillium chrysogenum</i> | VFF | [42] |

Oluline osa pektinaaside tootmises on kasutatava söötme valik. Söötmel võivad olla nii täpselt määratud keemilise koostisega ühekomponentsed (lihtsad) kui ka erinevaid mineraale ja orgaanilisi ühendeid sisaldavad kompleksed põllumajanduslike tootmisjääkide segud, mille täpsem koostis pole avalikult teada. Pärm, linnase, veiseliha ja peptooni (taimse ja loomse päritoluga) ekstraktid on lihtsad, kuid kallid substraadid ensüümide tootmiseks. Selle tõttu on suuremahulises tootmises põllumajandusjääkide (teraviljad, puuviljad) kasutamine substraadidena majanduslikult otstarbekam valik.[45] Maailmas tekib aastas hinnanguliselt ligi 1 miljard tonni põllumajandusjätmeid [46]. Need on ökonoomsed ja tõhusad substraadid, mis pakuvad organismide kasvuks vajalikke süsinik- ja lämmastikallikaid.[45] Pektinaaside tootmiseks on kasutatud nisukliisid, riisikesti, riisikliisid, papaia koori, mango koori, banaani koori, viinamarja pressimisjääki, suhkrupeedi, tubakatootmise jääke ja sarapuupähkli koori [35, 45].

1.3.2. Tsellulaaside tootmiseks kasutatavad allikad

Tsellulaaside tootmine põhineb samuti suures osas seente ja bakterite kasutamisel VFF või TFF teel. Tööstuslikuks ensüümide tootmiseks eelistatakse hallitusseeni, kuna need toodavad rohkem ensüüme kui pärmseened ja bakterid. Kõige rohkem uuritud ja tööstuses kasutatav tsellulaasi tootev seen on *Trichoderma reesei*, kuid kasutatakse ka *Humicola*, *Penicillium* ja *Aspergillus* perekondi, kusjuures peaaegu kõik seened *Aspergillus*'e perekonnast sünteesivad tsellulaase. [47].

Mõned bioprotsessid vajavad ka ensüüme, mis on võimelised toimima ekstreemsetes tingimustes, nagu näiteks äärmuslikud temperatuurid, soolsus, lai pH-vahemik ja raskemetallide olemasolu [48]. Sellised omadused saadaolevatel kaubanduslikel ensüümidel üldiselt puuduvad, mistõttu on tsellulaaside tootmiseks hakatud rohkem kasutama baktereid. Bakteritel on võrreldes seentega suurem kasvukiirus, kõrgem ellujäämisvõime stressirohketes tingimustes ning metaboliitide mõju on neile väiksem.[49] Tsellulaase tootvad bakterite perekonnad on näiteks *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Ruminococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* ja

Streptomyces [47]. Tsellulaasi toodavad ka tselluloosi lagundavad anaeroobid *C. thermocellum*, *C. cellulolyticum* ja *C. cellulovorans* [50]. EG-sid toodavad ka anaeroobsed *Bacillus*'e tüved *B. agaradhaerens* JAM-KU023, *B. subtilis* DR ja *B. pumilus* EB3 [51] ning mõned mesofiilsed bakterid nagu *Cellvibrio fulvus*, *Erwinia carotovora* ja *Paenibacillus campinasensis* [52]. Samuti toodavad tsellulaase tsüanobakterid *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Nostoc* ja pärmseen *Cryptococcus* sp. [53]. Tabel 2 on kokkuvõtlikult toodud erinevate tsellulaasi ensüümide tootmiseks kasutatavad mikroorganismid.

Tabel 2. Erinevate tsellulaaside jaoks kasutatavad mikroorganismid

| Ensüüm | Mikroorganism | Viide |
|---------------------|---------------------------------|-------|
| Bakter | | |
| EG | <i>Clostridium thermocellum</i> | [54] |
| TBH | <i>Clostridium stercorarium</i> | [55] |
| BG | <i>Lactobacillus plantarum</i> | [56] |
| Hallitusseen | | |
| EG | <i>Aspergillus niger</i> | [57] |
| TBH | <i>Cladosporium</i> sp | [58] |
| BG | <i>Aspergillus oryzae</i> | [59] |

Tsellulaaside tootmiseks saab ka kasutada põllumajandus- ja toidutööstuse jääke: pähklikoored, paber, erinevate teraviljade (rukis, kaer, nisu jne) õled, bambus. Kõik need jäägid on lignotselluloosne biomass, mis sisaldab tselluloosi, hemitselluloosi ja ligniini. Mikroorganismid saavad neid lagundada ning kasutada süsiniku- ja energiaallikana.[47]

1.3.3. Kommertsiaalsed ensüümpreparaadid marjade töötlemiseks

Suurimad toidu ensüümpreparaatide tootjad on AB Enzymes (Saksamaa), Novozymes (Taani), DSM (Holland), DuPont (USA) ja Biocatalysts (Inglismaa) [60]. Mahlade töötlemiseks kasutatavad ensüümpreparaadid on tavaliselt efektiivsed 40-50 °C juures, kuid sama tulemuse võib saada ka madalama temperatuuri ja pikema aja jooksul. Tabel 3 on toodud tootja poolt soovitatud kogused ja nende kasutamise optimaalsed tingimused Eestis enamlevinud ensüümpreparaatide jaoks. Kuna ensüümpreparaadid on mitmete ensüümide segud, siis nende aktiivsus oleneb konkreetset hüdrolüüsitavast materjalist ning seetõttu on selle kohta raske

infot leida. Kommertsiaalsete preparaatide puhul kasutatakse tootjainfos iga ensüümi puhul parimate tingimuste jaoks defineeritud ühikuid.

Tabel 3. Ülevaatic informatsioon marjade töötlemiseks kasutatavate ensüümpreparaatide kohta

| Ensüüm-preparaat | Tootja | Iseloomustus | Kogus [ml/t] | Tingimused | Aktiivsus | Viide |
|---------------------|---------------|---|---|-----------------|-----------------|-------|
| Panzym Univers | Eaton | Pektinaas purustatud marjamassi ensümeerimiseks ja saadud mahlast pektiini eemaldamiseks | 50-160 | 1-2 h 45-55 °C | 11 000 PECTU/ml | [61] |
| Pectinase 62L | Biocatal ysts | Kõrge PG-i ja PL-i suhtega segu pektiinide lagundamiseks, et parandada puuvilja-mahla saaki | 100-200 | 1-2 h 10-55 °C | 2200 U/g | [62] |
| Pectinase 831L | Biocatal ysts | Mahla saagikuse parandamiseks, maitse säilitamiseks ja mahla selitamiseks. Stabiilne ka madala pH juures. Saab kasutada nii purustamise ajal kui ka mahla selitamiseks. | Purustamisel 200-300 ml/t ja selitamisel 10-20 ml/t | 8-16 h 40-50 °C | 600 U/g | [63] |
| Pectinex BE XXL | Novozymes | Purustatud marjamassi viskoossuse vähendamiseks. Tahke ja vedela faasi eraldamine ja kõrge mahla saagikus. | 50-200 | | 13 600 PECTU/g | [64] |
| Celluclast 1.5L | Novozymes | Lagundab tselluloosi glükoosiks, tsellobioosiks ja suuremateks glükoosi polümeerideks | 100-200 | 20 min, 40 °C | 700 EGU/g | [65] |
| Pectinex Ultra SP-L | Novozymes | Selle kasutamine annab suurema mahla saagikuse ja parema ekstraktsiooni. Vähendab viskoossust. | 200-400 | 15-55 °C | ≥3800 U/ml | [66] |

| | | | | | | |
|-------------------------|------------|--|---------|------------------------|--------------|------|
| Pectinex Ultra Mash | Novozymes | Kasutatakse marjade purustamisel. Selle kasutamine annab suurema mahla saagikuse. Töötab hästi madala pH ja temperatuuri juures. | 50-130 | 15-55 °C | 9500 PECTU/g | [67] |
| Pectinex Ultra Tropical | Novozymes | Lagundab hästi kiulist taimset materjali. Selle kasutamine annab suurema troopilise mahla saagikuse. | 100-200 | | 5000 PECTU/g | [68] |
| ENDOZ YM Pectofruit XM | AEB | Sisaldab PL-i, tsellulaasi ja happelist proteaasi. Purustatud marjamassist kõrge saagikusega mahla saamiseks ja viskoossuse vähendamiseks. | 20-40 | 30 min, 45-50 °C | | [69] |
| Rohapect PTE 100 | AB Enzymes | PL ensüüm, mis vähendab viskoossust ja hoiab saadud mahla hägusust stabiilsena. | | 30-60 min 45-50 °C | | [70] |
| Rohament CL | AB Enzymes | Tsellulaasi ensüüm mittetähtsate polüsahhariidide hüdolüüsamiseks. Parandab mahlasaaki ja saadud mahla hägususe stabiilsust. | | 30-60 min, 45-50 °C | | [70] |

Märkused:

1. Lühend „PECTU“ (Pectin Transeliminase Units) on defineeritud kui ensüümi hulk, mis toodab minutis 1 µmol küllastumata 4,5-polügalakturonide [71].
2. Lühend „EGU“ (endo-Glucanase Units) on defineeritud kui ensüümi hulk, mis toodab minutis 1 µmol lihtsuhkruid [72].

1.4. Ensümeerimise mõju mahla füüsikalise-keemilistele omadustele mustsõstramahla näitel

Ensümeerimine mõjutab mahlade polüsahhariidide sisaldust, viskoossust, polüfenoolsete ühendite sisaldust, antotsüaniinide sisaldust ja hägusust. Tulemused ja mahla omadused sõltuvad palju kasutatud sordist, ensüümitüübist, inkubeerimisajast- ja temperatuurist ning pH-st.

Mahlade suhkrusisaldust iseloomustatakse °Brix väärtuse abil. °Brix väärtus võrdub ühe grammi sahharoosiga 100 grammis vesilahuses. Ensümaatiline ekstraktsioon tõstab mahlas °Brix väärtust, kuna polüsahhariidide hüdrolüüsil vabaneb erinevaid suhkruid.[16] Kui tavapäraselt on mustsõstramahla °Brix väärtus vahemikus 14,3-16,0, siis PME ja PG (2:1) ensüümidega töötlemisel 120 minutit 50 °C juures on saadud °Brix väärtuseks 18-19.[73] Panzym Univers ensüümpreparaadiga töötlemisel (0,16 ml/kg) varieerusid °Brix väärtused 16,0-16,7. °Brix väärtus sõltub ka taimesordist.[74]

Viskoossus iseloomustab vedeliku voolamisvõimet. Mahla töötlemisel ensüümidega sõltub vedeliku viskoossus ensüümide kontsentratsioonist ja inkubatsiooniajast.[16] Mahlade viskoossus sõltub ka taimesordist, nt erinevatest mustsõstrasortidest valmistatud mahlade viskoossus varieerus vahemikus 1,28 kuni 273,83 mPa·S vahel [75]. Mustsõstramahla, mille esialgne keskmine viskoossus oli 126 mPa·S, töötlemisel Pectinex Ultra Color ensüümiga 60 minutit saadi mustsõstramahla keskmiseks viskoossuseks 3,134 mPa·S [76].

Polüfenoolide sisaldus mustsõstramahlas sõltub samuti mahla töötlemisel kasutatud ensüümide kogusest, inkubatsiooniajast- ja temperatuurist. Mida suurem on ensüümide kogus, inkubatsiooniaeg- ja temperatuur, seda suurem on ka polüfenoolide üldsisaldus mustsõstramahlas. Mustsõstramahla, mille polüfenoolide sisaldus on 6100 mg/l, töötlemisel kümne erineva ensüümiga (0,18%, 30 min, 60 °C) varieerub kogu polüfenoolide sisaldus 6270 kuni 6760 mg/l vahel.[77] Ensüümpreparaatide Macer8 ja Pectinex Ultra SP-L kasutamisel leiti, et 50 °C juures oli lahustuvate polüfenoolide sisaldus suurem kui 30 °C juures, kuid inkubatsiooniaja pikendamine ei mõjunud polüfenoolide sisaldusele. Ensüümide kontsentratsiooni muutmisel 0-0,1% (1 h ja 50 °C juures) saadi kõige paremad tulemused ensüümi ja substraadi 0,1% suhte juures. Macer8 ja Pectinex Ultra SP-L töötlemisel saadi mahla fenoolide sisalduseks 6532 ja 6460 mg/l. Väiksemad tulemused aga Rapidase BE Super ja Grindamyli kasutamisel, 6167 ja 5931 mg/l.[78]

Antotsüaniinid on bioaktiivsed fenoolsed ühendid, millel on antioksidatiivsed omadused. Need on looduslikud taimepigmentid, mis aitavad taime kaitsta ultraviolettkiirguse ja patogeenide eest. Neid leidub puuviljakoore sees ja puuviljade töötlemisel satuvad need mahla.[79] Antotsüaniinide sisaldus suureneb koos ensüümi kontsentratsiooni ja inkubatsioonitemperatuuri tõstmisega, kuid inkubatsiooniaja mõju sõltub ensüümist. Liiga pikk inkubatsiooniaeg võib antotsüaniinide sisaldusele negatiivselt mõjuda.[77] Peale mahla

töötlemist toimub kõige suurem antotsüaniinide kadu säilitamisel [80]. Ensüümidega töötlemata mustsõstramahas on antotsüaniinide sisaldus väiksem (140 mg/100 ml), kui ensüümidega töödeldud mahlas (230 mg/100 ml) [81]. Mustsõstramahla, mille antotsüaniinide sisaldus on 2120 mg/l, töötlemisel 10 erineva ensüümiga (0,18%, 30 min, 60 °C) varieerus antotsüaniinide sisaldus 2880-3170 mg/l vahel.[77] Pectinex BE Colouri kasutamisel on leitud, et inkubatsiooniaja pikendamise (1-4 h), toimub antotsüaniinide vähenemine mahlas 23,8-17,3%. Pectinex BE XXL-i kasutamisel oli antotsüaniinide kadu 1-4 h töötlemise järel 21-14,8%. [73]

Hägusust põhjustavad mahlas mittelahustuvad osakesed, nt pektiin, tselluloos, hemitselluloos, tärklis, valgu, ligniin jms [79]. Hägusust mõõdetakse nefelomeetriliselt turbidimeetriga ning hägususe ühik on NTU (nefelomeetriline häguduse ühik)[73]. Mustsõstramahla hägusus on 999,99 NTU [76]. Ensüümide koguse suurendamine (100-400 g/t) ja inkubatsiooniaja pikendamine (1-4 h) kiirendab pektiinide lagundamist, mille tõttu väheneb ka mahla hägusus ja selle stabiilsus. Ensüümpreparaatide Pectinex BE Colouri ja Pectinex BE XXL-i kasutamisel langes hägusus ensüümi sisalduse suurendamisega 68-33 NTU ja 115-50 NTU peale (2 h ja 50 °C juures). Võrdluseks kasutati ka ensüümpreparaati, Rohapect PTE-st ja Rohament PL-st (2:1), mis sisaldas rohkem kõrgema aktiivsusega PL-i ja väiksema aktiivsusega PME-i, mille tulemusena tekkisid hägusust põhjustavad esterdatud pektiinifragmendid. Selle ensüümpreparaadi kasutamisel langes mahla hägusus ensüümikontsentratsiooni tõstmisel 273-265 NTU peale.[73] Kokkuvõtlikult on ensümeerimise mõju mustsõstramahla füüsikalise-keemilistele omadustele toodud Tabel 4.

Tabel 4. Ensümeerimise mõjust mustsõstramahla füüsikalise-keemilistele omadustele

| Füüsikalise-keemiline omadus | Mõõtühik | Mustsõstramahl | Ensüümtöödeldud mustsõstramahl |
|------------------------------|----------|----------------|--------------------------------|
| Suhkrute sisaldus | °Brix | 14,3-16,0 | 18-19 |
| Viskoossus | mPa·S | 126 | 3 |
| Polüfenoolide sisaldus | mg/l | 6100 | 6270-6760 |
| Antotsüaniinide sisaldus | mg/l | 2120 | 2880-3170 |
| Hägusus | NTU | 999,99 | 33-273 |

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Materjal ja metoodika

2.1.1. Töös kasutatud materjalid

1. 3,5-dinitrosalitsüülhape (DNS), Acros Organics, 98,0%
2. Dimetüülsulfaat, Sigma-Aldrich, 99,5%
3. Divesinikfosfaat dihidraat, Sigma-Aldrich, 98,0%
4. Glutaaraldehüüd, Sigma-Aldrich, 25,0%
5. Karboksümetüülselluloos (CMC), Sigma-Aldrich
6. Metanool, Sigma-Aldrich, 99,9%
7. Naatriumatsetaat trihidraat, BioChemica, 99,0%
8. Naatriumdivesinikfosfaat dihidraat, BioChemica, 99,0%
9. Naatriumkaaliumtartraat, Reaxhim, x.ч.
10. Naatriumhüdroksiid, Chemapol, 98,0%
11. Vesinikkloriidhape, Sigma-Aldrich, 37,0%
12. Äädikhape, BioChemica, 99,7%
13. Õunapektiin, Sigma-Aldrich
14. Celluclast, Novozymes, CCN03200, 700 U/ml
15. Tsellulaas (*A.Niger*), Sigma-Aldrich, SLCB5735, 1 U/mg
16. Pectinex BE XXL, Novozymes, SFN10001
17. Pectinex Ultra Mash, Novozymes, SON30035
18. Pectinex Ultra Tropical, Novozymes, KJN07517
19. Pectinase from *Aspergillus aculeatus*, Sigma-Aldrich, SLCC1291, 3800 U/ml
20. Purustatud mustsõstrad (sort „Ruben“) Eesti Maaülikooli Põllumajandus- ja keskkonnainstituudi Polli Aiandusuuringute Keskusest

2.1.2. Kasutatud aparatuur

1. Analüütiline kaal Mettler Toledo Classic Plus PB602-S FACT, täpsusklass 0,01 g
2. Ostwaldi U-tuubi viskosimeeter diameetriga 1,0 mm
3. Spektrofotomeeter Specord 250 plus AnalytikJena UV-Vis
4. Segaja VWR VV3
5. pH-meeter Mettler Toledo SevenEasy ($\pm 0,01$ pH ühikut)
6. Magnetsegaja SCHOTT Instruments GmbH
7. Vesivann Memmert WB

2.1.3. Lahuste valmistamine

1% CMC lahuse valmistamiseks niisutati vajalik kogus CMC esmalt 96% etanooliga ning seejärel lisati naatriumatsetaatpuhver (0,2 M, pH 4,8).

1% DNS lahuse valmistamiseks lisati 75 ml destilleeritud veele 1,6 g NaOH ja 1 g DNS-i. Kui DNS oli lahustunud, siis lisati 3 g naatriumkaaliumtartraati [82].

0,6% pektiinilahuse valmistamiseks lisati 0,6 g õunapektiini 100 ml naatriumatsetaatpuhvrisse (0,2 M, pH 4,8). Lahust segati ja kuumutati kuni pektiini lahustumiseni.

Tsellulaasi lahus (100 U/ml) valmistati *A.Niger* tsellulaasist (1 U/mg) naatriumatsetaatpuhvrisse (0,2 M, pH 4,8).

Ensüümpreparaatide Pectinex BE XXL, Pectinex Ultra Mash, Pectinex Ultra Tropical ja Pectinase from *Aspergillus aculeatus* lahused valmistati naatriumatsetaatpuhvrisse (0,2 M, pH 4,8) kontsentratsiooniga 2 µl/ml.

Pektinaasi lahuse valmistamiseks tehti Pectinex Ultra Mash ensüümist 20x lahjendus naatriumatsetaatpuhvrisse (0,2 M, pH 4,8)

Kõikide lahuste tegemisel kasutati MilliQ vett.

2.1.4. Ensüümide aktiivsuse määramine

2.1.4.1. Tsellulaase aktiivsuse määramine 3,5-dinitrosalitsüülhappe (DNS) abil spektrofotomeetriliselt

DNS meetod on laialdaselt kasutatav meetod tselluloosi hüdrolüüsil tekkivate redutseerivate suhkrute kvantifitseerimiseks, mis põhineb 3,5-dinitrosalitsüülhappe redutseerimisel 3-amino-5-nitrosalitsüülhappeks, mille käigus lahus muutub kollasest telliskivipunaseks [83].

Tsellulaasi aktiivsuse mõõtmiseks spektrofotomeetrilisel DNS meetodil valmistati kuus tsellulaasi standardlahust aktiivsusega 6; 10; 15; 25; 40; 60 U/ml, uuritava Celluclasti proovi eeldatav aktiivsus oli 10 U/ml. 100 µl ensüümi standardlahust või Celluclasti proovi lisati 4,9 mL 1% CMC lahusele ning inkubeeriti 60 minutit toatemperatuuril. 1 ml inkubeeritud lahust lisati 3 ml 1% DNS lahusele ja inkubeeriti 10 minutit 95 °C juures. Lahused jahutati toatemperatuurini ja mõõdeti 3 korduses neelduvus lainepikkusel 540 nm UV-Vis spektrofotomeetri abil.

2.1.4.2. Tsellulaase aktiivsuse määramine viskosimeetriliselt

Tsellulaase aktiivsuse viskosimeetriliseks mõõtmiseks valmistati seitse tsellulaasi standardlahust aktiivsusega 5; 15; 30; 50; 75; 83; 91,6 U/ml, Celluclasti proov valmistati lähtudes tootja informatsioonist eeldatava aktiivsusega 1 µg/ml. 200 µL ensüümi standardlahust või Celluclasti proovi lisati 10 ml 1% CMC lahusele ning inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Seejärel mõõdeti lahuse kinemaatiline viskoossus Ostwaldi viskosimeetriga. Kõikide lahuste viskoossust mõõdeti vähemalt 3 korda, lähtudes sellest, et vedelike vooluajad ei erineks rohkem kui 2 sekundit.

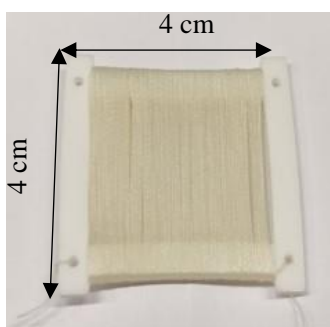
2.1.4.3. Pektinolüütilise aktiivsuse määramine viskosimeetriliselt

100 µl uuritavat pektinaasi lahust lisati 4,9 ml 0,6% pektiinilahusesse ja inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Seejärel mõõdeti lahuse viskoossus Ostwaldi viskosimeetri abil. Kõikide

lahuste viskoossust mõõdeti vähemalt 3 korda, lähtudes sellest, et vedelike vooluajad ei erineks rohkem kui 2 sekundit.

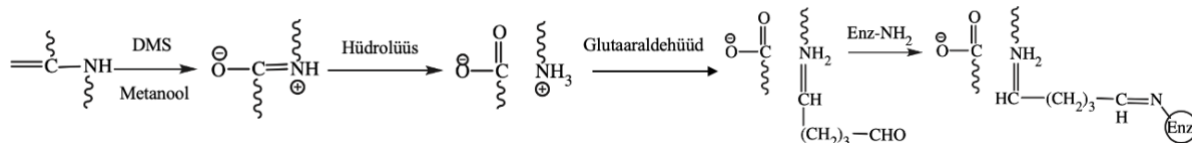
2.1.5. Ensüümi immobiliseerimine nailon 6,6-kandjale

Nailonniit lõigati 8 m pikkusteks osadeks, mis keriti teflonist hoidjatele suurusega 4x4x0,3 cm (Joonis 7).



Joonis 7. Teflonist hoidjale keritud nailonniit, mis moodustab ensüümelemendi.

Kandjad aktiveeriti dimetüülsulfaadis 60 °C juures, 2 minutit. Seejärel pesti kandjaid 2 korda jääkülma metanooliga ja 3 korda jääkülma 0,1 M fosfaatpuhvriga pH 7,0. Kandjaid inkubeeriti glutaaraldehüüdi lahuses (12,5% 0,1 M fosfaatpuhvris pH 7,0) 60 minutit toatemperatuuril ning pesti 2 korda fosfaatpuhvriga. Kandjaid inkubeeriti ensüümilahuses (20x lahjendus 0,2 M naatriumatsetaatpuhvris pH 4,8) 24 h 4 °C juures ja pesti 6x ~30 ml 0,2 M naatriumatsetaatpuhvriga (pH 4,8). Immobiliseerimine toimus järgneva skeemi alusel (Joonis 8).



Joonis 8. Ensüümi immobiliseerimine nailon 6,6-kandjale dimetüülsulfaadi (DMS) ja glutaaraldehüüdiga [84].

Immobiliseeritud ensüümiga kandjaid säilitati samas puhvris 4 °C juures. Teflonist hoidjale keritud nailonniiti, kuhu immobiliseeriti peale ensüüm, nimetatakse käesolevas töös edaspidi ensüümelementideks.

2.1.6. Ensüümelementide pektiinlühendilise ja tsellulaase aktiivsuse mõõtmine

Ensüümelementide katalüütilist aktiivsust mõõdeti sarnaselt vastavate lahustunud ensüümide aktiivsusega viskosimeetriselt. Immobiliseeritud pektiinaasi korral inkubeeriti seda 20 ml 0,6% pektiinilahuses 30 minutit 40 °C juures (vesivannis). Immobiliseeritud tsellulaasi korral inkubeeriti ensüümelementi 20 ml 1% CMC lahuses 30 minutit 40 °C juures (vesivannis). Seejärel mõõdeti lahuste viskoossused Ostwaldi viskosimeetriga. Kõiki katseid korrati 3 korda ning iga lahuse viskoossust mõõdeti vähemalt 3 korda, lähtudes sellest, et vedelike vooluajad ei erineks rohkem kui 2 sekundit.

2.1.7. Tulemuste statistiline analüüs

Eksperimentaalsete tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati GraphPad Prism versiooni 5 tarkvara (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Iga eksperimendi tulemuste jaoks arvutati välja keskmised tulemused ja standardhälve. Tulemuste omavahelise erinevuse hindamiseks arvutati p-väärtus, mille jaoks kasutati Student t-testi. Statistiliselt oluliseks loeti p-väärtus, mis oli väiksem kui 0,05.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. Lahustunud ensüümide aktiivsuse määramine

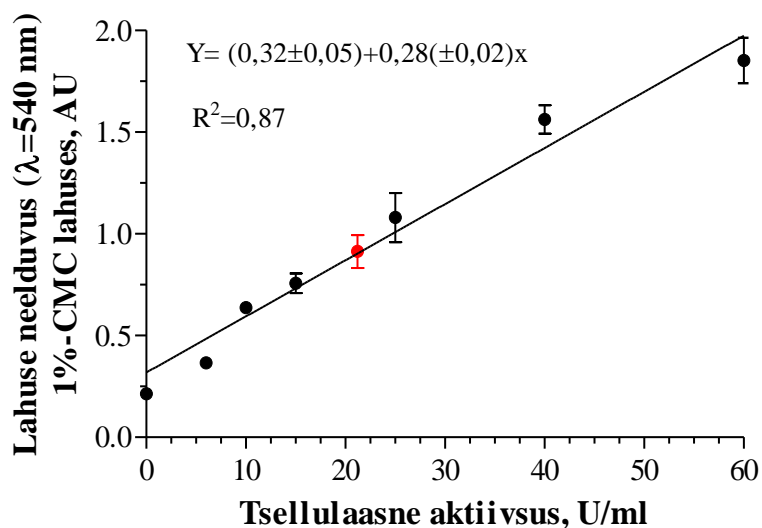
Ensüümide pektiinolüütilise ja tsellulaase aktiivsuse määramiseks erinevatel meetoditel koostati esmalt kalibreerimisgraafikud kasutades kindla kontsentratsiooniga lahustunud ensüüme. Need kalibreerimisgraafikud olid aluseks ka immobiliseeritud ensüümide aktiivsuse määramisele.

3.1.1. Tsellulaase aktiivsuse määramine

Tsellulaase aktiivsuse määramiseks kasutati nii viskosimeetrilist kui ka spektrofotomeetrilist meetodit.

3.1.1.1. Tsellulaase aktiivsuse määramine spektrofotomeetrilisel DNS meetodil

Tsellulaase aktiivsuse määramiseks kasutatakse põhiliselt spektrofotomeetrilist meetodit, ehkki analüüsi läbiviimise aeg on rohkem kui 1,5 tundi [85]. Ensüümi tsellulaase aktiivsuse määramiseks koostati kalibreerimisgraafik teljestikus ensüümi aktiivsus vs 1%-lise CMC lahuse neelduvus lainepikkusel 540 nm (Joonis 9).

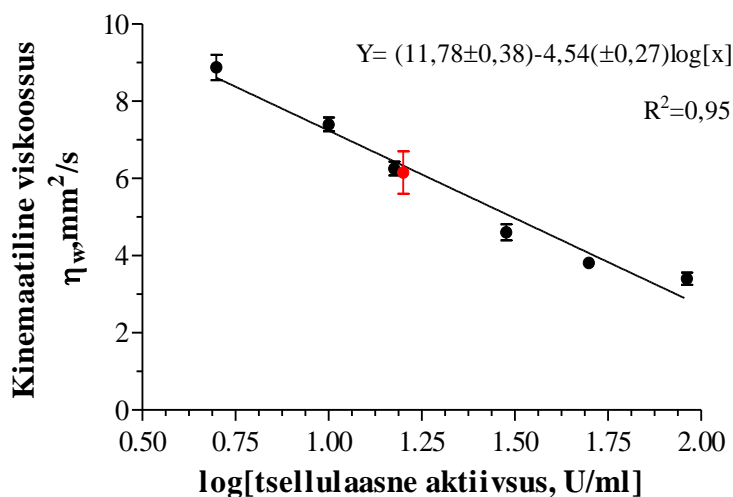


Joonis 9. Lahuse neelduvuse sõltuvus tsellulaasest aktiivsusest 1%-lise CMC lahuses lainepikkusel 540 nm. Kõik mõõtmised viidi läbi toatemperatuuril, atsetaatpuhvril (0,2 M, pH 4,8). Punasega on tähistatud Celluclasti preparaadi aktiivsuse mõõtmisel saadud tulemus. Kõik tulemused on esitatud kolme mõõtmise aritmeetilise keskmisena.

1%-lise CMC lahuse neelduvus suurenes lineaarselt vastavalt võrrandile $Y=(0,32\pm 0,05)+0,28(\pm 0,02)x$ ensüümi aktiivsuse suurenemisel vahemikus 0-60 U/ml. Celluclasti lahuse aktiivsuseks saadi $21,2\pm 2,97$ U/ml. Nagu näha toodud tulemustest, ei olnud tsellulaase aktiivsuse eksperimentaalne määramine spektrofotomeetrilisel meetodil väga täpne. Spektrofotomeetrilisel mõõtmisel eeldatakse lahuse paralleelmõõtmise tulemuste suurt kokkulangevust, kuid nende mõõtmiste puhul pidi lahuseid mõõtma rohkem kui kolm korda, et saada kolm kokkulangevat tulemust. See on tõenäoliselt tingitud sellest, et ensüümi ja substraadi inkubeerimisaeg on pikk ning lahuste aktiivsuste mõõtmise ajal töötab ensüüm kogu aeg edasi. Madalamate tsellulaase aktiivsusega lahuste korral (< 10 U/ml) esines märgatav kõrvalekalle lineaarsest tõusust ning halb kokkulangevus telglõiguga. Joonis 9 on telglõik, mis vastab ilma ensüümita 1%-le CMC lahusele, $0,21\pm 0,004$ AU, ehkki kalibreerimisgraafiku võrrandi järgi on Y_0 väärtuseks $0,32\pm 0,05$ AU. Selle põhjuseks võib olla lahuste liiga suur viskoossus, mis takistab reagentide segunemist, mistõttu see meetod ei sobi kasutamiseks madalamate ensüümi aktiivsuste korral.

3.1.1.2. Tsellulaasse aktiivsuse viskosimeetiline määramine

Tsellulaasse aktiivsuse määramiseks viskosimeetrisel meetodil koostati esmalt kalibreerimisgraafik teljestikus ensüümi aktiivsus vs lahuse kinemaatiline viskoossus η_w (Joonis 10).



Joonis 10. 1%-lise CMC lahuse kinemaatilise viskoossuse sõltuvus tsellulaasest aktiivsusest. Kõik mõõtmised viidi läbi toatemperatuuril, atsetaatpuhvril (0,2 M, pH 4,8). Punasega on tähistatud Celluclasti preparaadi aktiivsuse mõõtmise tulemus. Tulemused on esitatud kolme mõõtmise aritmeetilise keskmisena.

Poollogaritmilises skaalas vähenes substraadilahuse viskoossus ensüümi aktiivsuse suurenemisel lineaarselt vahemikus 0,7-2 U/ml vastavalt võrrandile $Y = (11,78 \pm 0,38) - 4,54(\pm 0,27)\log[x]$, kus x-ga on tähistatud tsellulaasne aktiivsus ($R^2 = 0,95$). Madalamatele ensüümi kontsentratsioonidel toimus leitud poollogaritmilise sõltuvuse kõrvalekalle eksperimentaalselt mõõdetud punktidest, mistõttu see kalibreerimisgraafik ei ole madalamatel tsellulaasi kontsentratsioonidel (kõrgema viskoossuga lahuste korral) kasutatav. Saadud kalibreerimisgraafik alusel määrati mahlade töötlemiseks kasutatud Celluclasti preparaadi aktiivsus, mis oli $15,96 \pm 6,34$ U/ml.

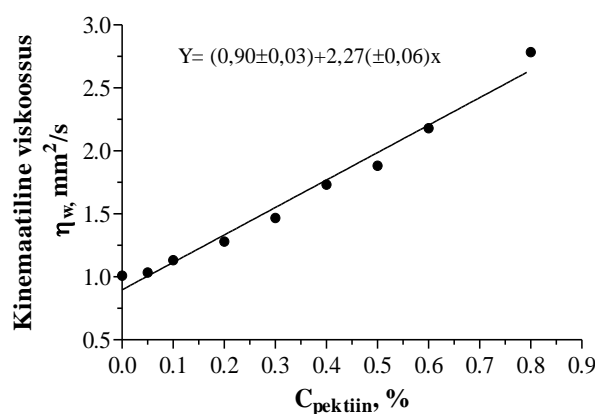
Tsellulaasse aktiivsuse eksperimentaalne määramine viskosimeetrisel meetodil oli suhteliselt täpne, nagu näha ka kalibreerimisgraafikul toodud hälvetest, mis jäid vahemikku 0,47-0,53 mm²/s. Viskosimeetiline määramine oli võrreldes spektrofotomeetrisel määramismeetodiga

suhteliselt lihtne ja kiire ning selle läbiviimiseks kulus sõltuvalt inkubeerimisajast ja mõõdetava lahuse viskoossusest kokku 15 minutit. See võimaldas vähendada lahuses oleva ensüümi järelmõju ning suurendada saadud tulemuste usaldusväärsust. Viskosimeetrilise meetodi korral oli tulemuste lineaarne seos oluliselt parem ($R^2=0,95$) kui spektrofotomeetrilise meetodi ($R^2=0,87$) korral. Spektrofotomeetrilise meetodi korral võib lineaarseks piirkonnaks pidada 10-40 U/ml, kuid viskosimeetrilise meetodi korral on lineaarne ala suurem 5-83 U/ml. Spektrofotomeetrilise meetodi kasutamiseks on vajalik ka UV-Vis spektrofotomeetri olemasolu ja oskused selle aparatuuri kasutamiseks. Viskosimeetrilise mõõtmise läbiviimiseks on vaja seadmetest vaid viskosimeetrit. Nendel põhjuste tõttu valiti viskosimeetriline meetod immobiliseeritud ensüümide aktiivsuse hindamiseks.

3.1.2. Pektinolüütilise aktiivsuse määramine

3.1.2.1. Pektinolüütilise aktiivsuse viskosimeetriline määramine

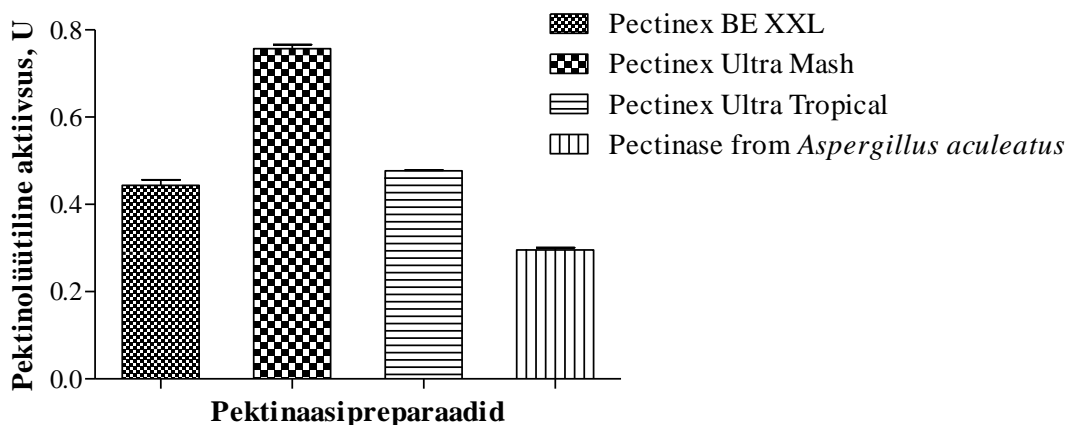
Erinevate pektinaasi preparaate aktiivsuste määramiseks viskosimeetrilisel meetodil koostati esmalt kalibreerimisgraafik teljestikus kinemaatiline viskoossus η_w vs C_{pektiin} (Joonis 11).



Joonis 11. Lahuse kinemaatilise viskoossuse η_w sõltuvus pektiini kontsentratsioonist vahemikus 0-0,8%. Kõik mõõtmised viidi läbi toatemperatuuril, atsetaatpuhvril (0,2 M, pH 4,8). Tulemused on esitatud kolme mõõtmise aritmeetilise keskmisena.

Pektiinilahuse kinemaatiline viskoossus η_w suurenes lineaarselt vahemikus pektiini kontsentratsiooni suurenemisel vahemikus 0-0,8% vastavalt võrrandile $Y=(0,9\pm 0,03)+2,27(\pm 0,06)x$. Saadud kalibreerimisgraafiku alusel valiti edasises tööks kasutamiseks pektiinilahuse kontsentratsioon 0,6%, kuna sellise kontsentratsiooni juures on lahuse kinemaatiline viskoossus piisav vajaliku mõõtetäpsuse saavutamiseks. Madalama $c_{\text{pektiin-i}}$ korral muutuks ensüümi aktiivsuse määramine vähem täpsemaks, kuna lahuste viskoossus oleks liiga madal ning kõrgema $c_{\text{pektiin-i}}$ korral muutuks mõõtmine liiga aeganõudvaks. Edaspidises tööks kasutati erinevate pektinaasi preparaate aktiivsuse määramiseks pektiini lahust kontsentratsiooniga 0,6%.

Pektinolüütilise aktiivsuse 1 ühik defineeriti kui lahuse viskoossuse vähenemine 50% 5 minuti jooksul, lähtudes ka varasemalt kirjanduses toodud pektinaasi aktiivsuse defineerimisest [86]. Viskosimeetriselt määrati ka erinevate pektinaasi preparaate Pectinex Ultra Mash, Pectinex Ultra Tropical, Pectinex BE XXL ja Pectinase from *Aspergillus aculeatus* pektinolüütiline aktiivsus (Joonis 12).



Joonis 12. Erinevate pektinaasipreparaate pektinolüütiline aktiivsus. 1 U on defineeritud kui viskoossuse vähenemine 50% 5 minuti jooksul. Kõik mõõtmised viidi läbi toatemperatuuril 0,6% pektiinilahuses. Tulemused on esitatud kolme mõõtmise aritmeetilise keskmisena.

Saadud tulemuste alusel valiti kõrgeima pektinolüütilise aktiivsusega preparaat immobiliseerimiseks kandjale.

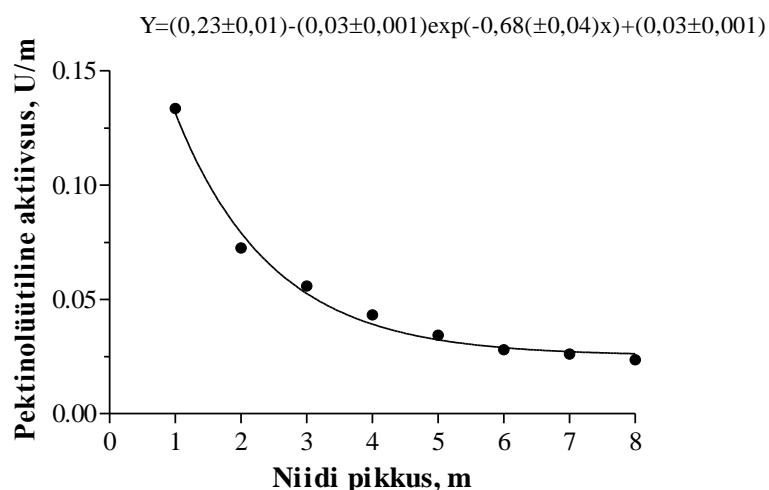
Pektinaasi preparaate on segud erinevatest ensüümidest ja sellest sõltub ka preparaate pektinolüütiline aktiivsus. Selgus, et pektinaasipreparaate ensümaatiline aktiivsus vähenes

reas Pectinex Ultra Mash, Pectinex Ultra Tropical, Pectinex BE XXL ja Pectinase from *Aspergillus aculeatus*. Kõige kõrgema pektinolüütilise aktiivsusega oli Pectinex Ultra Mash, mistõttu kasutati seda pektinolüütiliste ensüümelementide valmistamiseks.

3.2. Ensüümelementide aktiivsuse mõõtmine

3.2.1. Ensüümelemendi aktiivsuse sõltuvus niidi pikkusest

Ensüümelementide valmistamiseks optimeeriti esmalt selle valmistamiseks kasutatava niidi pikkust, sest alusele keerd keeru kõrvale keritud niidi korral tekib takistus lahuses oleva substraadi liikumisele immobiliseeritud ensüümiga niidi pinnale. Niidi pikkuse optimeerimine viidi läbi pektinolüütiliste ensüümelementidega ning niitude pikkusi varieeriti vahemikus 1-8 m. Kuna immobiliseeritud ensüümi koguaktiivsus ensüümelemendis oli küllaltki madal, siis suurendati pektinolüütilise aktiivsuse mõõtmiseks vajalikku inkubeerimise aega 0,6%-lises pektiini lahuses 6 korda, 30 minutini. 0,6% pektiinilahuse ruumala oli 20 ml. Nendel tingimustel saadi viskoossuse väärtused, mis olid koostatud kalibreerimisgraafikute lineaarse osas ja võimaldasid võrrelda ensüümelemendi ja lahustunud ensüümi aktiivsusi (Joonis 13).



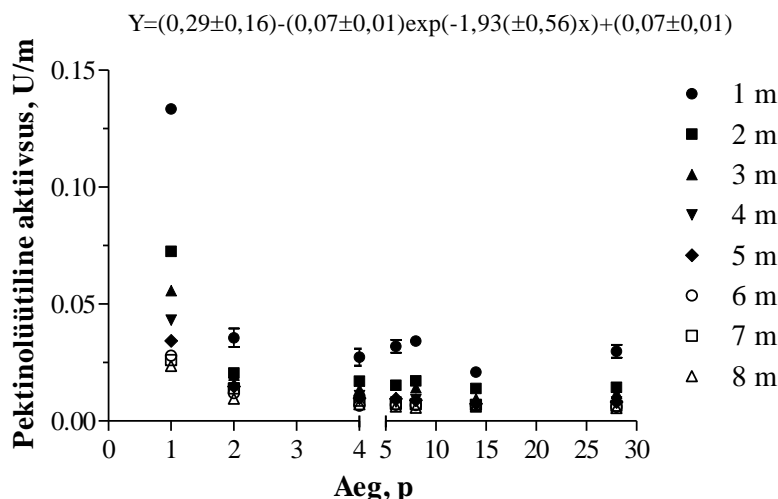
Joonis 13. Pektinolüütilise aktiivsuse sõltuvus ensüümelemendi niidi pikkusest vahemikus 1-8 m. Kõik mõõtmised viidi läbi 40 °C juures 0,6% pektiinilahuses. Tulemused on esitatud kolme mõõtmise aritmeetilise keskmisena.

Nagu näha Joonis 13 vähenes pektinoolüütiline aktiivsus eksponentsiaalselt niidipikkuse suurenemisel vahemikus 1-8 m vastavalt võrrandile $Y=(0,23\pm 0,01)-(0,03\pm 0,001)\exp(-0,68(\pm 0,04)x)+(0,03\pm 0,001)$. See on põhjustatud niidi pinnal asuva immobiliseeritud ensüümi eksponeeritusest ning takistusest substraadi transpordile. Uuritud pikkuse vahemikus oli niidi 1 m kohta arvatud eriaktiivsuste vähenemine 4 korda. Kuna ensüümi aktiivsus 1 m niidi kohta alates 5 m pikkuse niidi kasutamisest oluliselt ei muutunud, siis otsustati edasises töös kasutada 8 m pikkusi kandjaid, sest sel juhul oli ensüümelemendi koguaktiivsus kõige suurem ja ka ensüümelementide valmistamine oli piisavalt lihtne. Pikemate niitude kasutamise korral tekkis probleeme niidi kinnitamisega alusele. Alused niidi kinnitamiseks valiti nelinurkse kujuga põhjusel, et edaspidi oleks neid võimalik kasutada mahlatöötlemise läbivoolulistes süsteemides mitme kaupa erinevate komplektidena.

3.2.2. Ensüümelementide stabiilsus

Immobiliseeritud ensüümide stabiilsus on väga oluline nende kasutuselevõtmiseks, sest piisava stabiilsuse korral on võimalik ensüümelementide varu valmistamine nende pikaajaliseks kasutuselevõtmiseks. Töö raames uuriti eraldi ensüümelementide stabiilsust nende säilitamisel ilma pideva kasutamisetähtaajaga ning stabiilsust pideval kasutamisel. Saadud andmed võimaldasid hinnata ensüümaatilise aktiivsuse vähenemise põhjuseid – kas immobiliseeritud ensüüm inaktiveerus või oli tegemist mittekovalentselt seondunud ensüümi mahapesemisega niidi pinnalt.

Esmalt uuriti, kas erineva pikkusega immobiliseeritud pektinaasi niite sisaldavate ensüümelementide stabiilsus on ühesugune või erinev. Selleks kasutati samu elemente erinevatel päevadel ning saadud tulemuste alusel hinnati immobiliseeritud ensüümi mahapesemise ja inaktiveerumise osakaalu erineva pikkusega niitude kasutamisel. Iga ensüümelemendi aktiivsust mõõdeti kuu aja jooksul kokku seitse korda, päevadel 1, 2, 4, 6, 8, 14 ja 28. Erineva niidipikkusega ensüümelementide pektinoolüütiline aktiivsus vähenes eksponentsiaalselt iga kasutuskorraga vastavalt võrrandile $Y=(0,29\pm 0,16)-(0,07\pm 0,01)\exp(-1,93(\pm 0,56)x)+(0,07\pm 0,01)$ (Joonis 14).



Joonis 14. Erineva niidipikkusega ensüümelementide pektiinolüütilise aktiivsuse sõltuvus ajast. Kõik mõõtmised viidi läbi 40 °C juures 20 ml 0,6% pektiinilahuses. Ensüümelemendid seisid 4 °C juures atsetaatpuhvril (0,2 M, pH 4,8). Tulemused on esitatud kolme mõõtmise aritmeetilise keskmisena.

Nagu Joonis 14 toodud tulemusest on näha, et kuigi lühematel niitidel oli esimesel mõõtmisel palju suuremad aktiivsused kui pikematel, siis juba teisel mõõtmisel langes lühemate niitide aktiivsus rohkem kui pikematel niitidel. See viitab sellele, et lühemate niitide kasutamise korral jääb suhteliselt palju lahustunud ensüümi niidi keerdude vahele, samas kui pikemate niitide korral on lahustunud ensüümi sama niidi pikkuse juures niidiga seondunud oluliselt vähem. Selle põhjuseks on arvatavasti asjaolu, et niidi tihedama kerimise korral alusele on immobiliseerimise protsessi käigus takistatud ka ensüümmolekulide transport aktiveeritud niidi keerdude vahele. Ehkki ensüümi immobiliseerimise protsessis ja enne esimest aktiivsuse mõõtmist pestakse niite kuus korda atsetaatpuhvriga, mille eesmärk on puhastada ensüümelemendid vabalt seondunud ensüümist, ei ole see ilmselt piisav kogu mittekovalentselt seondunud ensüümi eemaldamiseks.

Erinevate pikkustega niitide aktiivsused stabiliseerusid juba 3. mõõtmiskorra järel ning päevadel 4 - 28 arvatud eriaktiivsused 1 m kohta (U/m) niitidele pikkustega 2-8 m statistiliselt ei erinenud. Samuti niitidel pikkusega 2-8 m oli kokkulangev inaktivatsioonikonstant - $1,93\pm 0,56$ 1/p, mis tähendab, et neil oli sarnane inaktiveerumise protsess. See andis veelkord kinnitust asjaolule, et kõige optimaalsem on kasutatud aluste korral kasutada niidipikkusi 8 m.

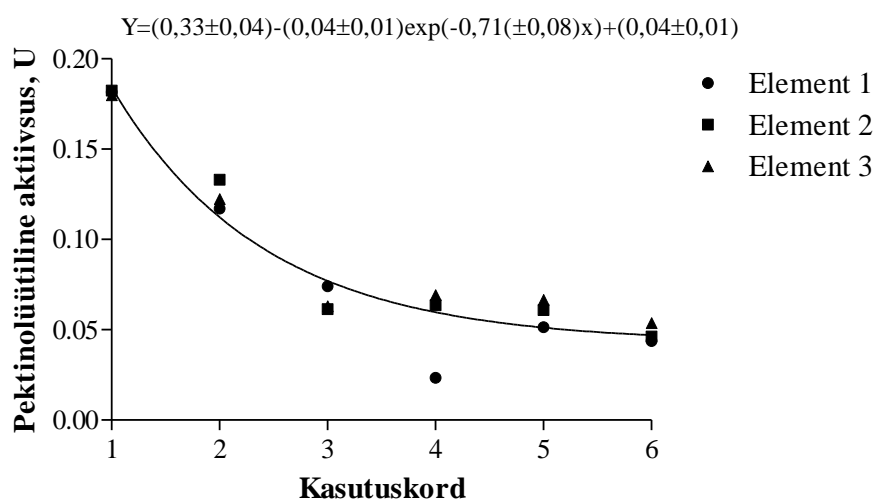
1 m pikkuse niidi suurem eriaktiivsus võrreldes pikemate niitidega tulenes ensüümi suuremast immobiliseerimise efektiivsusest (Joonis 13).

3.2.3. Pektinolüütilise ensüümelemendi aktiivsuse stabiilsus

Mahlatöötlemiseks kasutatavate ensüümelementide stabiilsuse iseloomustamiseks võrreldi nende aktiivsuse muutumist pideval kasutamisel ja säilitamisel 4 °C juures atsetaatpuhveris.

3.2.3.1. Ensüümelemendi pektinolüütilise aktiivsuse sõltuvus kasutuskorrast

Mittekovalentselt seondunud ensüümi koguse hindamiseks mõõdeti ensüümelemendi pektinolüütilist aktiivsust järjestikuselt kuus korda ühel päeval (Joonis 15).



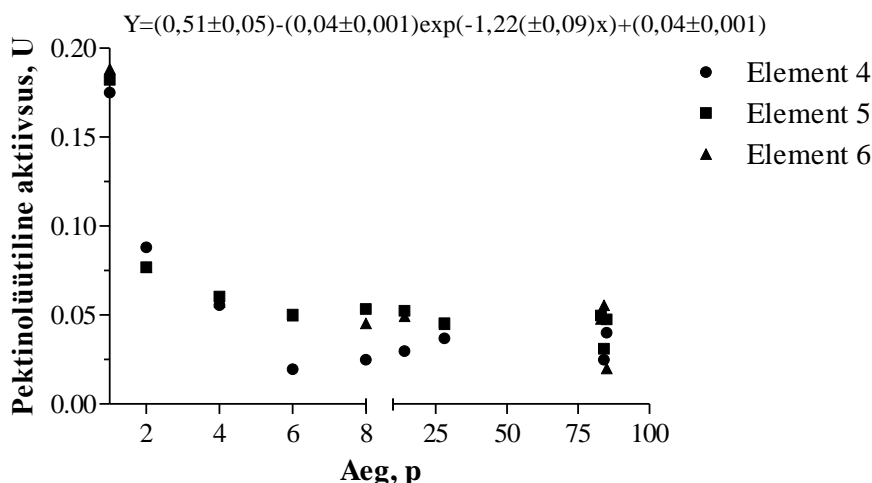
Joonis 15. 8 m ensüümelemendi pektinolüütilise aktiivsuse sõltuvus kasutuskorrast vahemikus 1-6. Kõik mõõtmised viidi läbi 40 °C juures 20 ml 0,6% pektiinilahuses. Tulemused on esitatud kolme mõõtmise aritmeetilise keskmisena.

Ühel päeval järjestikku läbiviidud 6 mõõtmise korral toimus pektinolüütilise aktiivsuse vähenemine eksponentsiaalselt iga kasutuskorraga. Saadud sõltuvus iseloomustas võrrand $Y=(0,33\pm0,04)-(0,04\pm0,01)\exp(-0,71(\pm0,08)x)+(0,04\pm0,01)$. Kui algselt oli keskmine aktiivsus $0,18\pm0,001$ U, siis alates kolmandast mõõtmisest jäi aktiivsus $0,05\pm0,01$ U juurde.

Seega võib öelda, et mittekovalentselt seondunud ensüüm eraldus esimese paari kasutuskorra jooksul ning edasiste mõõtmiste korral ensüümelemendi aktiivsus oli stabiilne, moodustades ligikaudu 27% elemendi algsest pektinolüütilisest aktiivsusest.

3.2.3.2. Ensüümelemendi pektinolüütilise aktiivsuse stabiilsus selle passiivsel säilitamisel

Ensüümelementides oleva immobiliseeritud pektinaasi inaktivatsiooni uurimiseks viidi ensüümelementidega läbi pikemaajalised katsed. Selleks valmistati kolm immobiliseeritud pektinaasiga kandjat ning nende aktiivsused mõõdeti päevadel 1, 2, 4, 6, 8, 14, 28, 83, 84 ja 85. Kokku tehti ühe niidiga 10 mõõtmist (Joonis 16).

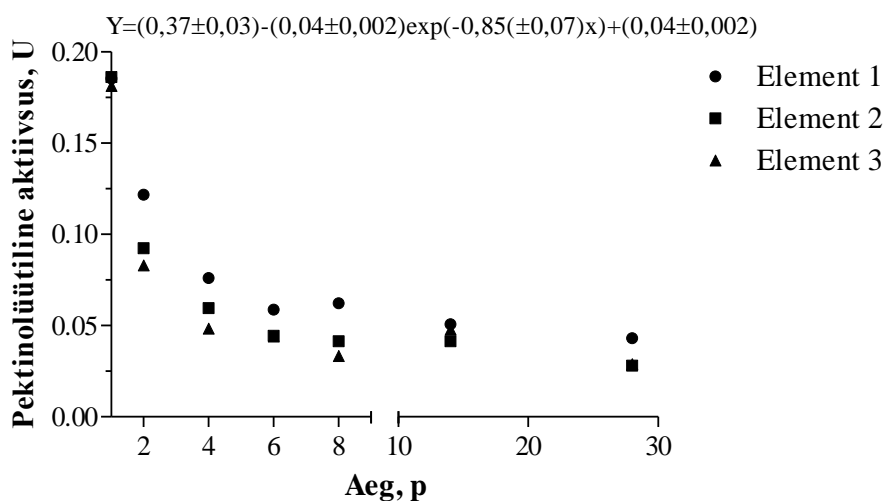


Joonis 16. Ensüümelemendi (8 m) pektinolüütilise aktiivsuse sõltuvus ajast vahemikus 1-85 päeva. Kõik mõõtmised viidi läbi 40 °C juures 20 ml 0,6% pektiinilahuses. Ensüümelemendid seisid 4 °C juures atsetaatpuhvrts (0,2 M, pH 4,8). Tulemused on esitatud kolme mõõtmise aritmeetilise keskmisena.

Pektinolüütilise aktiivsuse vähenemine toimus ajas eksponentsiaalselt ajavahemikus 1-85 päeva (10 kasutuskorda) vastavalt võrrandile $Y=(0,51±0,05)-(0,04±0,001)exp(-1,22(±0,09)x)+(0,04±0,001)$. Nende katsete tulemused olid väga positiivsed, kuna selgus, et ensüümelementide aktiivsus ei lange kui need vahepeal puhvrtsisse seisma jätta, see tähendab, et kovalentselt seotud ensüüm seismisel ei inaktiveeru. Peale viimast mõõtmist oli säilinud 27% aktiivsusest. Ensüümelementide aktiivsused langesid kokku ka järjestikku tehtud

mõõtmiste tulemustega. Mõlemal juhul jõudis kolmandal mõõtmisel ensüümelemendi aktiivsus platoole ja jäi püsima $0,05 \pm 0,01$ U juurde.

Uuriti ka temperatuuri mõju immobiliseeritud ensüümi stabiilsusele. Selleks viidi läbi mõõtmised ensüümelemendiga, mida säilitati atsetaatpuhvril toatemperatuuril (Joonis 17).



Joonis 17. Ensüümelemendi 8 m pektiinolüütilise aktiivsuse sõltuvus ajast vahemikus 1-28 päeva. Kõik mõõtmised viidi läbi 40 °C juures 20 ml 0,6% pektiinilahuses. Ensüümelemendid seisis toatemperatuuril atsetaatpuhvril. Tulemused on esitatud kolme mõõtmise aritmeetilise keskmisena.

Ka toatemperatuuril säilitatud ensüümelementide pektiinolüütilise aktiivsuse vähenemine toimus uuritud ajavahemikus eksponentsiaalselt, mida iseloomustas võrrand $Y=(0,37 \pm 0,03)-(0,04 \pm 0,002)\exp(-0,85(\pm 0,07)x)+(0,04 \pm 0,002)$.

Kuna toatemperatuuril on oht lahuste mikrobioloogiliseks saastumiseks suur, siis eeldati, et ensüümelementide aktiivsus väheneb oluliselt kiiremini kui säilitamisel 4 °C juures. Tulemusest selgus aga, et toatemperatuuril säilinud ensüümelementide pektiinolüütilised aktiivsused olid sarnased külmkapis säilitatud ensüümelementide omadega. Peale viimast mõõtmist oli säilinud 27% esialgsest aktiivsusest nagu ka 4 °C säilitustemperatuuri puhul. See on väga hea tulemus, kuna see näitab, et ensüümelemente võib säilitada vajadusel ka toatemperatuuril, mis on vähem kulukam.

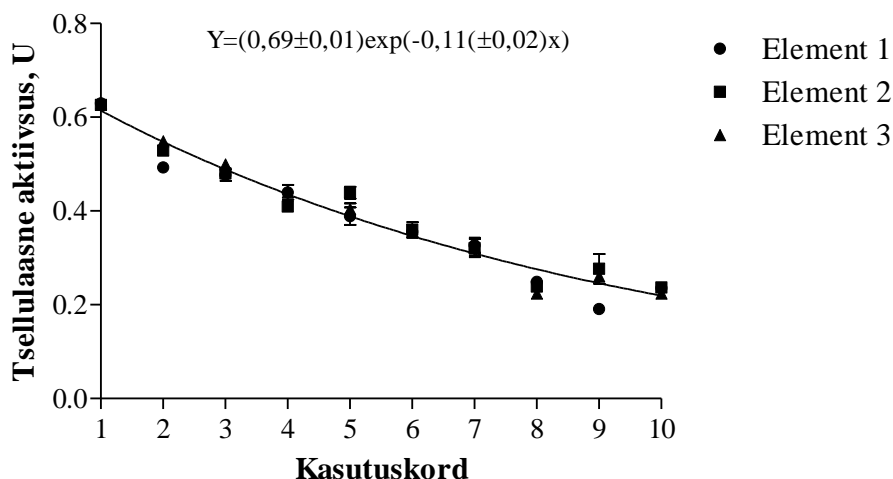
Pektinaasi immobiliseerimine kandjatele osutus väga edukaks. Saadud tulemuste põhjal võib väita, et pektinaasi sisaldavad ensüümelemendid on korduvkasutatavad ning neid võib säilitada nii toatemperatuuril kui ka 4 °C juures.

3.2.4. Tsellulaase ensüümelemendi aktiivsuse stabiilsus

Lisaks pektinolüütiliste ensüümelementide stabiilsusele uuriti ka immobiliseeritud tsellulaasi sisaldavate ensüümelementide stabiilsust.

3.2.4.1. Ensüümelemendi tsellulaase aktiivsuse sõltuvus kasutuskorrast

Ensüümelementide tsellulaasest aktiivsust mõõdeti samuti järjestikku ühe päeva jooksul, kokku 10 järjestikusel korral (Joonis 18). Tsellulaase aktiivsuse 1 ühik defineeriti kui lahuse viskoossuse vähenemine 50% 10 minuti jooksul.

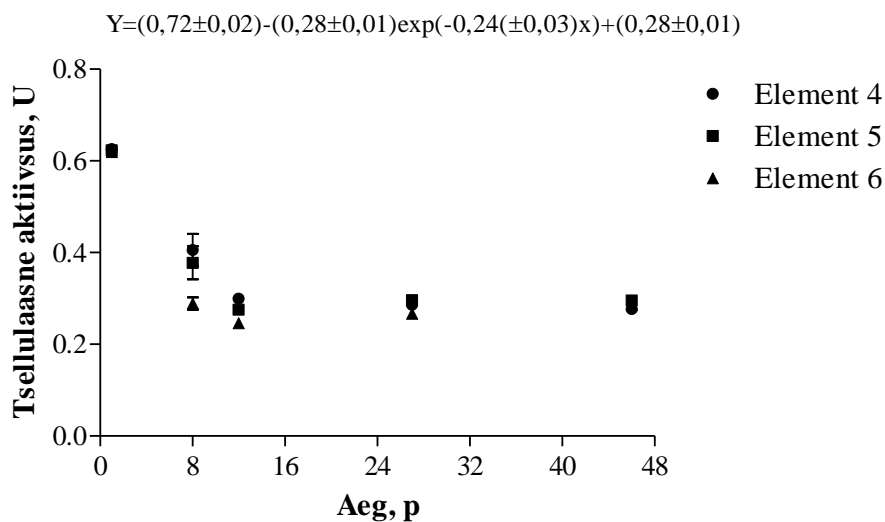


Joonis 18. 8 m ensüümelemendi tsellulaase aktiivsuse sõltuvus kasutuskorrast. 1 U on defineeritud kui viskoossuse vähenemine 50% 10 minuti jooksul. Kõik mõõtmised viidi läbi 40 °C juures 20 ml 1% CMC lahuses. Tulemused on esitatud kolme mõõtmise aritmeetilise keskmisena.

Ensüümelemendi tsellulaasse aktiivsuse vähenemine toimus samuti eksponentsiaalselt, kusjuures seda vähenemist iseloomustas võrrand $Y=(0,69\pm 0,01)\exp(-0,11(\pm 0,02)x)$. Kui algne ensüümelemendi tsellulaasne aktiivsus oli $0,63\pm 0,002$ U, siis nende ensüümelementide aktiivsus muutus stabiilseks alles kaheksandal mõõtmisel ning viimase mõõtmise lõpuks oli säilinud aktiivsus $0,23\pm 0,01$ U ehk 37% esialgsest aktiivsusest. Seega toimus erinevalt immobiliseeritud pektinaasidest ensümaatilise aktiivsuse vähenemine tulenevalt mittekovalentselt seondunud ensüümi mahapesemisest oluliselt suurema arvu mõõtettsükli jooksul.

3.2.4.2. Ensüümelemendi tsellulaasse aktiivsuse stabiilsus säilitamisel

Tsellulaasete ensüümelementide stabiilsust uuriti samuti nende pikemaajalise säilitamise jooksul. Selle katse läbiviimiseks mõõdeti ensüümelementide tsellulaasne aktiivsused päevadel 1, 8, 12, 27 ja 46 (Joonis 19).



Joonis 19. 8 m ensüümelemendi tsellulaasse aktiivsuse sõltuvus ajast vahemikus 1-46 päeva. Kõik mõõtmised viidi läbi 40 °C juures 20 ml 1% CMC lahuses. Ensüümelemendid seisid 4 °C juures atsetaatpuhvril (0,2 M, pH 4,8). Tulemused on esitatud kolme mõõtmise aritmeetilise keskmisena.

Ensüümelementide tsellulaasse aktiivsuse vähenemine toimus eksponentsiaalselt vastavalt võrrandile $Y=(0,72\pm 0,02)-(0,28\pm 0,01)\exp(-0,24(\pm 0,03)x)+(0,28\pm 0,01)$. Kui võrrelda saadud tulemusi ühe päeva jooksul järjestikuselt tehtud mõõtmistega, siis olid saadud tulemused erinevad. Esimese mõõtmise aktiivsus oli mõlemal sama, keskmiselt $0,63\pm 0,002$ U. Teise mõõtmise keskmine aktiivsus oli järjestikusel mõõtmisel $0,52\pm 0,03$ U, kuid kui ensüümelemendid jäeti vahepeal nädalaks seisma ja siis teisel aktiivsuse mõõtmisel oli tsellulaasne aktiivsus keskmiselt $0,36\pm 0,07$ U. Võib arvata, et kui ensüümelemendid seisid nädal aega atsetaatpuhvril, siis selle aja jooksul lahustus kandjalt mittekovalentselt seondunud ensüümi nii palju maha, et alles jäi vaid niitidele tugevalt seondunud ensüüm. Lõppaktiivsus oli sama nii järjestikuselt mõõdetud kandjatel kui ka nendel, mille aktiivsus mõõdeti alles 27 päeval. Seega kandjate aktiivsus tegelikult ei vähenenud. Viimase mõõtmise lõpuks oli säilinud 37% esialgsest aktiivsusest, mis oli sarnane järjestikustel mõõtmistel saadud lõppaktiivsusega. Seega võib kokkuvõtteks öelda, et nii immobiliseeritud pektinaasi kui tsellulaasi sisaldavate ensüümelementide puhul toimub esimeste töösüklike korral mittekovalentselt seotud ensüümi mahapesemine, kuid vastavalt alates 3. või 8. kasutuskorrast elementidest enam ensüümi ei eraldu ning nende kasutamisel on võimalik saada ensüümivabu produkte.

3.2.5. Ensüümelementide kasutamise testimine mustsõstramahlas

3.2.5.1. Pektinolüütilise ensüümelemendi kasutamine

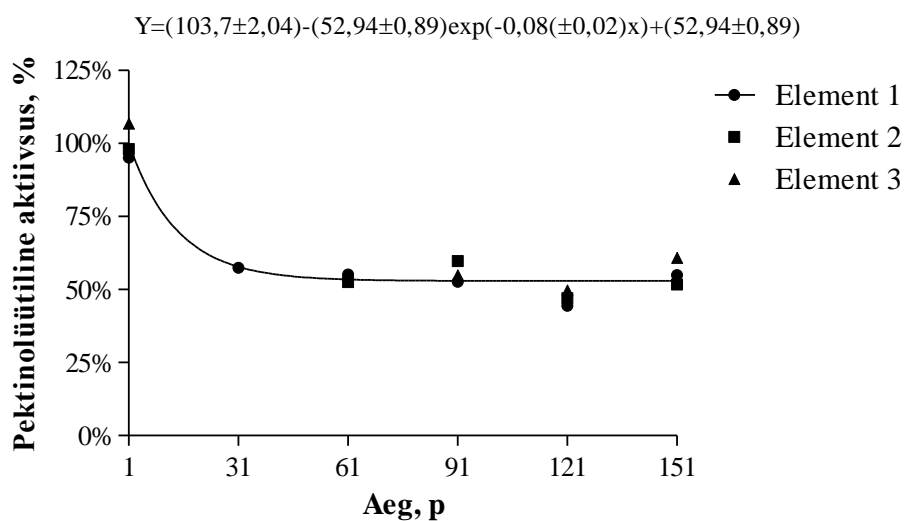
Ensüümelementide pektinolüütilist aktiivsust mõõdeti ka ilma eelneva ensümeerimiseta valmistatud mustsõstramahlas (sort „Ruben“). Mustsõstramahlast tehti 5x lahendus, et viskoossuse mõõtmine toimuks optimaalse aja jooksul samas mõõtevahemikus koostatud kalibreerimisgraafikutega. Kokku tehti katseid 3 ühesuguse ensüümelemendiga, mille pektinolüütiline aktiivsus mõõdeti esmalt peale immobiliseerimist esimesel päeval. Katsete vahel hoiti ensüümelemente $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures atsetaatpuhvril. Ensüümelemendi 1 teine aktiivsus mõõdeti kuu aja pärast, ensüümelemendi 2 teine aktiivsus kahe kuu ja ensüümelemendi 3 teine aktiivsus kolme kuu pärast (Tabel 5). Järgmised aktiivsused mõõdeti kõigil 30 päeva pärast. Teiseks mõõtmisekorra jäeti sellised ajavahed, et võrrelda, kas pektinolüütiline aktiivsus erineb, kui ensüümelement on puhvril seisnud vahepeal 31, 61 või 91 päeva.

Tabel 5. Kolme ensüümelemendi pektinolüütilise aktiivsuste mõõtmiste ajatabel

| Kasutuskord/ Ensüümelemendi nr | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------------------------|--------|---------|----------|----------|----------|----------|
| 1 | Päev 1 | Päev 31 | Päev 61 | Päev 91 | Päev 121 | Päev 151 |
| 2 | Päev 1 | Päev 61 | Päev 91 | Päev 121 | Päev 151 | - |
| 3 | Päev 1 | Päev 91 | Päev 121 | Päev 151 | - | - |

Märkus. Tähis „-“ märgib, et aktiivsuse mõõtmist ei tehtud

Kõikide ensüümelementide esmane näiv pektinolüütiline aktiivsus mustsõstramahlas oli ühesugune ehk $0,16 \pm 0,05$ U. Lähtudes Joonis 11 toodud kalibreerimisgraafikust võib hinnata mustsõstramahla keskmiseks pektiinisalduseks 2,89%. See väärtus langes hästi kokku tavapärase mustsõstramahla pektiinisaldusega, mis kirjanduse andmetel on 2,7% [7]. Pektinolüütilise ensüümelemendi näiva aktiivsuse muutumine selle korduval kasutamisel lahjendatud mustsõstramahlas on toodud Joonis 20.

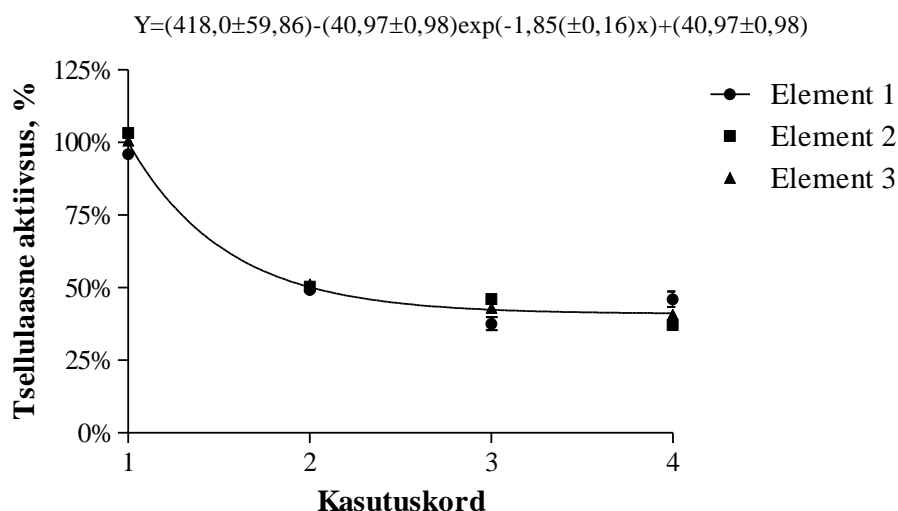


Joonis 20. 8 m ensüümelemendi pektinolüütilise aktiivsuse sõltuvus ajast vahemikus 1-151 päeva. Kõik mõõtmised viidi läbi 40 °C juures 20 ml 5x lahjendatud mustsõstramahlas. Ensüümelemendid seisid 4 °C juures atsetaathapetis (0,2 M, pH 4,8). Tulemused on esitatud kolme mõõtmise aritmeetilise keskmisena.

Ka mustsõstramahlas toimus esimestel kasutuskordadel ensüümelemendi näiva aktiivsuse suur vähenemine, mille põhjuseks on mittekovalentselt seondunud ensüümi mahapesemine. Vähenemist iseloomustas eksponentsiaalse kahanemise võrrand $Y=(103,7\pm 2,04)-(52,94\pm 0,89)\exp(-0,08(\pm 0,02)x)+(52,94\pm 0,89)$. Stabiilne pektinolüütiline aktiivsus saavutati tasemel 55% algsest, ning see ei muutunud ensüümelemendi edasisel kasutamisel 5 kuu jooksul. Ensüümelementide pektinolüütiline aktiivsuse tööiga ja stabiilsus mustsõstramahlas oli väga hea ning tõestas veelkord, et ensüümelementide pektinolüütiline aktiivsus püsib stabiilsena puhvris säilitamisel suurepäraselt.

3.2.5.2. Ensüümelemendi tsellulaasne aktiivsus mustsõstramahlas

Lahjendatud mustsõstramahlas testiti ka tsellulaasete ensüümelementide stabiilsust (Joonis 21).



Joonis 21. 8 m ensüümelemendi tsellulaasne aktiivsuse sõltuvus kasutuskorrast vahemikus 1-4. Kõik mõõtmised viidi läbi 40 °C juures 20 ml 5x lahjendatud mustsõstramahlas.

Tulemused on esitatud kolme mõõtmise aritmeetilise keskmisena.

Nagu eeldati, toimus mustsõstramahlas ensüümelementide tsellulaasne aktiivsuse vähenemine samuti eksponentsiaalselt (võrrand $Y=(418,0\pm 59,86)-(40,97\pm 0,98)\exp(-1,85(\pm 0,16)x)+(40,97\pm 0,98)$). Huvitav on märkida, et ensüümelemendi tsellulaasne aktiivsus

stabiliseerus juba kolmandal mõõtmisel, stabiliseerudes 44% tasemel algsest näivast aktiivsusest mustsõstramahlas. See tähendab, et mahlas toimus mittekovalentselt seondunud ensüümi mahapesemine oluliselt kiiremini kui puhverlahuses. See võib olla põhjustatud ka intensiivsemast pesemisest pärast ensüümelemendi kasutamist mahlas, kuid vajab edaspidi täpsemat uurimist et kindlustada ensüümi jääkide puudumine mahlas. Esialgsete tulemuste põhjal võib arvata, et ensüümelementide tsellulaasse aktiivsuse tööiga on mustsõstramahlas väga hea.

Nii pektiinolüütilise kui tsellulaasse ensüümelemendi kasutamisel mustsõstramahlas jäid nende ensümaatilised aktiivsused uuritud tööperioodi ja -tsükli korral stabiilseks, mis viitab sellele, et uurimiseks kasutatud mustsõstramahlas ei olnud inhibiitoreid, mis oleksid immobiliseerinud ensüümide aktiivsust vähendanud, ehkki kirjanduses on viiteid, et mustsõstras rikkalikult leiduv askorbiinhape (vitamiin C), mille sisaldus on vahemikus 161-284 mg/100 g kohta [87] ja tanniinid (polüfenoolid), mille sisaldus on vahemikus 3,24-7,76 g/100 g võivad neile ensüümidele omada inhibeerivat toimet [88]. Inhibeeriva toime puudumist võib seletada ka immobiliseerinud ensüümide suurema vastupidavusega võrreldes lahustunud ensüümidega [89].

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös immobiliseeriti pektinaase ja tsellulaase nailon 6/6-kandjatele ning hinnati erinevatel immobiliseeritud ensüümidel põhinevate ensüümelementide katalüütilist aktiivsust, stabiilsust ja tööiga.

Esmalt koostati kalibreerimisgraafikud ensüümide pektinolüütilise ja tsellulaase aktiivsuse määramiseks erinevate meetodikate abil. Ensüümelementide aktiivsuse hindamiseks otsustati kasutada viskosimeetrilist meetodit, kuna sellel olid täpsemad, kiiremad ja parema korratavusega tulemused kui spektrofotomeetrilise meetodi korral. Ensüümelemendi valmistamiseks optimeeriti ensüümide immobiliseerimiseks kasutatava niidi pikkust. Leiti, et kõige optimaalsem on 8 m pikkune niit, kuna see oli pikim niit, mille alusele kerimisega ei tekkinud probleeme ja selle eriaktiivsus oli 1 m kohta sama, mis lühematel niitidel. Nelja pektinaasipreparaadi seast valiti immobiliseerimiseks Pectinex Ultra Mash, kuna selle pektinolüütiline aktiivsus oli kõige suurem.

Ensüümelementide stabiilsuse iseloomustamiseks võrreldi nende aktiivsuse muutumist pideval kasutamisel ja säilitamisel 4 °C juures atsetaatpuhvril. Ensüümelementide keskmine esialgne pektinolüütiline aktiivsus oli $0,18 \pm 0,001$ U. Pideval kasutamisel stabiliseerus aktiivsus peale kolmandat mõõtmiskorda $0,05 \pm 0,01$ U juures ja edasiste mõõtmiste korral ensüümelemendi aktiivsus enam ei langenud (säilis 27% esialgsest aktiivsusest). 4 °C juures säilitamisel selgus, et ensüümelementide aktiivsus ei lange vahepeal ja 85. päeval oli säilinud 27% aktiivsusest, mis langes kokku ka pideva ensüümelemendi kasutamise tulemustega.

Uuriti ka temperatuuri mõju immobiliseeritud ensüümi stabiilsusele ning selgus, et nii toatemperatuuril kui ka 4 °C juures säilitatud ensüümelementide pektinolüütilised aktiivsused olid sarnased. Need tulemused olid väga positiivsed, kuna see näitas, et puhvril säilitamisel nii toatemperatuuril kui ka 4 °C juures kovalentselt seotud ensüüm ei inaktiveeru.

Lisaks pektinolüütiliste ensüümelementide stabiilsusele uuriti ka immobiliseeritud tsellulaasi sisaldavate ensüümelementide stabiilsust. Algselt oli ensüümelemendi tsellulaasne aktiivsus $0,63 \pm 0,002$ U ning viimase, kaheksanda mõõtmise lõpuks oli säilinud 37% esialgsest

aktiivsusest. Sarnane tulemus oli ka tsellulaasi ensüümelementide puhul, mida säilitati 46 päeva. Tsellulaasiga läbi viidud immobiliseerimised olid ka edukad, kuna ka nende aktiivsus ja stabiilsus nii pideval mõõtmisel kui ka säilitamisel olid väga head.

Ensüümelementide pektinolüütilist ja tsellulaasest aktiivsust mõõdeti ka mustsõstramahlas. Mustsõstramahlas säilis pektinolüütilisest aktiivsusest 5 kuu möödudes 55%, tsellulaasest aktiivsusest säilis peale nelja kasutuskorda 44% esialgselt.

Saadud tulemused näitavad nailon 6/6-kandjale immobiliseeritud pektinaaside ja tsellulaaside suurt potentsiaali nende tööstuslikuks kasutamiseks. Ensüümelementid säilitasid oma aktiivsuse peale paljusi töötsükleid ning säilisid stabiilsena mitmeid kuid.

Antud töö käigus tehtud katsete tulemusi saab kasutada ka edasistes immobiliseeritud ensüümide uuringutes. Immobiliseeritud ensüüme sisaldavaid ensüümelemente on võimalik kombineerida üksteise kõrvale erinevatesse ridadesse ja kasutada mitut ensüümelementi - nii pektinaasi kui ka tsellulaasi oma korraga, et mahla veel efektiivsemalt ensüümtöödelda. Samuti on võimalik kasutada ensüümelemente läbivoolulistes mahlasüsteemides, et mahla mugavamalt töödelda.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Caffall KH, Mohnen D (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344: 1879–1900.
2. de Souza WR, Mitchell RAC, Cesarino I (2023) Editorial: The plant cell wall: advances and current perspectives. *Front Plant Sci* 14: 1235749.
3. Loqué D, Scheller HV, Pauly M (2015) Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Current Opinion in Plant Biology* 25: 151–161.
4. Albersheim P, Darvill A, Roberts K (2010) *Plant Cell Walls*, Garland Science.
5. Cell Wall Microstructure #1 by Science Photo Library Science Photo Gallery. Available from: <https://sciencephotogallery.com/featured/1-cell-wall-microstructure-science-photo-library.html>.
6. Gawkowska D, Cybulska J, Zdunek A (2018) Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: A Review. *Polymers (Basel)* 10: 762.
7. Nawirska A, Kwaśniewska M (2005) Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chemistry* 91: 221–225.
8. Chandel V, Biswas D, Roy S (2022) Current Advancements in Pectin: Extraction, Properties and Multifunctional Applications. *Foods* 11: 2683.
9. Zdunek A, Pieczywek PM, Cybulska J (2021) The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20: 1101–1117.
10. Roman-Benn A, Contador CA, Li M-W (2023) Pectin: An overview of sources, extraction and applications in food products, biomedical, pharmaceutical and environmental issues. *Food Chemistry Advances* 2: 100192.
11. Freitas CMP, Coimbra JSR, Souza VGL (2021) Structure and Applications of Pectin in Food, Biomedical, and Pharmaceutical Industry: A Review. *Coatings* 11: 922.
12. Hilz H, Bakx EJ, Schols HA (2005) Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries—characterisation in berries, juice, and press cake. *Carbohydrate Polymers* 59: 477–488.
13. Bokov D, Sharipova RI, Potanina OG (2020) Polysaccharides of Crude Herbal Drugs as a Group of Biologically Active Compounds in the Field of Modern Pharmacognosy: Physicochemical Properties, Classification, Pharmacopoeial Analysis. *Systematic Reviews in Pharmacy* 11: 206–212.
14. Sista Kameshwar AK, Qin W (2018) Structural and functional properties of pectin and lignin–carbohydrate complexes de-esterases: a review. *Bioresources and Bioprocessing* 5: 43.

15. Lara-Espinoza C, Carvajal-Millán E, Baladrán-Quintana R (2018) Pectin and Pectin-Based Composite Materials: Beyond Food Texture. *Molecules* 23: 942.
16. Sharma HP, Patel H, Sugandha (2017) Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices— A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57: 1215–1227.
17. Chen Y-L, Zhang X, You T-T (2019) Deep eutectic solvents (DESs) for cellulose dissolution: a mini-review. *Cellulose* 26: 205–213.
18. Chavan RB, Rathi S, Jyothi VGSS (2019) Cellulose based polymers in development of amorphous solid dispersions. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 14: 248–264.
19. Quiroz Castañeda R, Folch-Mallol J (2013) Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars, *Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, 275.
20. Liew Abdullah AG, Sulaiman NM, Aroua MK (2007) Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering* 81: 65–71.
21. Satapathy S, Rout JR, Kerry RG (2020) Biochemical Prospects of Various Microbial Pectinase and Pectin: An Approachable Concept in Pharmaceutical Bioprocessing. *Frontiers in Nutrition* 7.
22. Baker RA, Bruemmer JH (1972) Pectinase stabilization of orange juice cloud. *J Agric Food Chem* 20: 1169–1173.
23. Rexová-Benková Ľ, Markovič O (1976) Pectic Enzymes, In: Tipson RS, Horton D (Eds.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Academic Press, 323–385.
24. Jayani RS, Saxena S, Gupta R (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* 40: 2931–2944.
25. Whitaker JR (1984) Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. *Enzyme and Microbial Technology* 6: 341–349.
26. Pedrolli DB, Carmona EC (2014) Purification and Characterization of a Unique Pectin Lyase from *Aspergillus giganteus* Able to Release Unsaturated Monogalacturonate during Pectin Degradation. *Enzyme Res* 2014: 353915.
27. Kumar V A, Kurup S, Snishamol C (2019) Role of Cellulases in Food, Feed, and Beverage Industries: Enzymes in Industrial Food Processing, *Green Bio-processes*, 323–343.
28. Szijártó N, Siika-aho M, Tenkanen M (2008) Hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose by heterologously produced cellulases of *Melanocarpus albomyces*. *Journal of Biotechnology* 136: 140–147.
29. Nero G, Kivirand K, Ben Othman S (2022) Amperometric method for the determination of cellulase activity and its optimization using response surface method. *Journal of Analytical Science and Technology* 13: 21.

30. de Cassia Pereira J, Paganini Marques N, Rodrigues A (2015) Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. *Journal of Applied Microbiology* 118: 928–939.
31. Han C, Li W, Hua C (2018) Enhancement of catalytic activity and thermostability of a thermostable cellobiohydrolase from *Chaetomium thermophilum* by site-directed mutagenesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 116: 691–697.
32. Jeilu O (2017) Pectinase: Substrate, Production and their Biotechnological Applications. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB)*.
33. Shah K, Sutaria D (2020) Microbial Cellulase: production, purification and application, *Microbiology and Biotechnology in Human Life*, JPS Scientific Publications, India, 50–75.
34. Samreen P, Mangipudi M, Grover S (2019) Production of Pectinases and Pectinolytic Enzymes: Microorganisms, Cultural Conditions and Substrates. *Advances in Biotechnology* 7.
35. Haile S, Ayele A (2022) Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications. *The Scientific World Journal* 2022.
36. Fan C, Liu Z, Yao L (2011) Medium optimization for protopectinase production by batch culture of. *African Journal of Biotechnology* 10: 17570–17578.
37. Hours R, Sakai T (1994) Protopectinase production in solid state culture of *Aspergillus awamori*. *Biotechnology Letters* 16: 721–726.
38. Joshi V, Parmar M, Rana N (2006) Pectin Esterase Production from Apple Pomace in Solid-State and Submerged Fermentations. *Food Technology and Biotechnology* 44.
39. Patidar MK, Nighojkar A, Nighojkar S (2016) Purification and Characterization of Pectin Methylsterase Produced in Solid State Fermentation by *Aspergillus tubingensis*. *Biotechnology Journal International* 1–10.
40. Bastos SC (2013) Pectinases from a New Strain of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) De Vries Isolated from Coffee Bean. *World Journal of Agricultural Sciences* 9: 167–172.
41. Soares MMCN, Da Silva R, Carmona EC (2001) Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 79–82.
42. Radoi F, Kishida M, Kawasaki H (2005) Endo-polygalacturonase in *Saccharomyces* wine yeasts: effect of carbon source on enzyme production. *FEMS Yeast Research* 5: 663–668.
43. Mitali R, Nilofer S, Nimisha P (2013) Optimization of physiological parameters for pectinase production from soil isolates and its applications in fruit juice clarification. *Journal of Environmental Research and Development* 7: 1539–1546.
44. Dange VU, Harke S (2018) Production and purification of Pectinase by fungal strain in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. *International Journal of Life Sciences Research* 6.

45. John J, Kaimal KKS, Smith ML (2020) Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 162: 1086–1099.
46. Karić N, Maia AS, Teodorović A (2022) Bio-waste valorisation: Agricultural wastes as biosorbents for removal of (in)organic pollutants in wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal Advances* 9: 100239.
47. Dasari P, Ramteke P, Kesri S (2019) Comparative Study of Cellulase Production Using Submerged and Solid-State Fermentation, *Approaches to Enhance Industrial Production of Fungal Cellulases*, 37–52.
48. Acharya S, Chaudhary A (2012) Optimization of Fermentation Conditions for Cellulases Production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus sp* MVS3 Isolated from Indian Hot Spring. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55: 497–503.
49. Saranraj P (2012) Effect of cellulolytic fungi on the degradation of cellulosic agricultural wastes. *International Journal of Applied Microbiology Science* 1.
50. Vazana Y, Morais S, Barak Y (2010) Interplay between *Clostridium thermocellum* Family 48 and Family 9 Cellulases in Cellulosomal versus Noncellulosomal States. *Appl Environ Microbiol* 76: 3236–3243.
51. Li W, Zhang W-W, Yang M-M (2008) Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol* 40: 195–201.
52. Ko C-H, Chen W-L, Tsai C-H (2007) *Paenibacillus campinasensis* BL11: a wood material-utilizing bacterial strain isolated from black liquor. *Bioresour Technol* 98: 2727–2733.
53. Pandey KD, Shukla SP, Shukla PN (2004) Cyanobacteria in Antarctica: ecology, physiology and cold adaptation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50: 575–584.
54. Romaniec MP, Fauth U, Kobayashi T (1992) Purification and characterization of a new endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *Biochem J* 283 (Pt 1): 69–73.
55. Creuzet N, Berenger J-F, Frixon C (1983) Characterization of exoglucanase and synergistic hydrolysis of cellulose in *Clostridium stercoarium*. *FEMS Microbiology Letters* 20: 347–350.
56. Rokni Y, Abouloifa H, Bellaouchi R (2021) Characterization of β -glucosidase of *Lactobacillus plantarum* FSO1 and *Candida pelliculosa* L18 isolated from traditional fermented green olive. *J Genet Eng Biotechnol* 19: 117.
57. Dixit M, Shukla P (2023) Multi-efficient endoglucanase from *Aspergillus niger* MPS25 and its potential applications in saccharification of wheat straw and waste paper deinking. *Chemosphere* 313: 137298.
58. Moharram AM, Zohri AA, Hesham AE (2021) Production of Cocktail Enzymes by Three *Cladosporium* Isolates and Bioconversion of Orange Peel Wastes into Valuable Enzymes. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 15: 2336–2346.

59. Langston J, Sheehy N, Xu F (2006) Substrate specificity of *Aspergillus oryzae* family 3 β -glucosidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1764: 972–978.
60. Top 7 Food Enzyme Companies (2021) Verified Market Research, 2021. Available from: <https://www.verifiedmarketresearch.com/blog/top-food-enzyme-companies/>.
61. Panzym Univers Eaton. Available from: <https://www.eaton.com/us/en-us/catalog/enzymes/panzym-univers.html>.
62. Pectinase 62L BioCatalysts. Available from: <https://biocatalysts.com/enzyme-products/pectinase-62l>.
63. Pectinase 831L BioCatalysts. Available from: <https://biocatalysts.com/enzyme-products/pectinase-831l>.
64. Pectinex® BE XXL Novozymes. Available from: <https://biosolutions.novozymes.com/en/juice-fruit-vegetables/products/berries-grapes/pectinex-be-xxl>.
65. Celluclast® 1.5 L Novozymes. Available from: <https://biosolutions.novozymes.com/en/juice-fruit-vegetables/products/vegetables/celluclast-1.5-l>.
66. Pectinex® Ultra SP-L Novozymes. Available from: <https://biosolutions.novozymes.com/en/juice-fruit-vegetables/products/vegetables/pectinex-ultra-sp-l>.
67. Pectinex® Ultra Mash Novozymes. Available from: <https://biosolutions.novozymes.com/en/juice-fruit-vegetables/products/apples-pears/pectinex-ultra-mash>.
68. Pectinex® Ultra Tropical Novozymes. Available from: <https://biosolutions.novozymes.com/en/juice-fruit-vegetables/products/tropical-fruits/pectinex-ultra-tropical>.
69. Endozym Pectofruit XM AEB. Available from: <https://www.aeb-group.com/en/endozym-pectofruit-xm-14611>.
70. Fruit and Vegetable Juice Manufacturing Enzymes, Rohapect, Rohavin AB Enzymes. Available from: <https://www.abenzymes.com/en/your-industry/fruits-vegetables-juices-and-wines/>.
71. Lambré C, Barat Baviera JM, Bolognesi C (2023) Safety evaluation of a food enzyme containing endo-polygalacturonase and pectin lyase activities from the non-genetically modified *Aspergillus tubingensis* strain NZYM-PE. *EFSA Journal* 21: e08151.
72. International Oenological CODEX Beta-glucanase activity (β 1-3, β 1-6).
73. Mieszczakowska-Fraç M, Markowski J, Zbrzeźniak M, et al. (2012) Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices. *LWT - Food Science and Technology* 49: 251–256.
74. Rätsep R, Bleive U, Kaldmäe H (2020) Impact of enzymatic treatment on the blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) polyphenols in juice and press-residue. *International Journal of Food Science and Agriculture* 4: 43–48.

75. Kowalski R, Gonzalez de Mejia E (2021) Phenolic composition, antioxidant capacity and physical characterization of ten blackcurrant (*Ribes nigrum*) cultivars, their juices, and the inhibition of type 2 diabetes and inflammation biochemical markers. *Food Chemistry* 359: 129889.
76. Bender C, Killermann KV (2017) Effect of mash enzyme and heat treatments on the cellular antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum*), raspberry (*Rubus idaeus*), and blueberry (*Vaccinium myrtillus*) juices. *CyTA - Journal of Food* 15: 277–283.
77. Landbo A-K, Meyer AS (2004) Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5: 503–513.
78. Bagger-Jørgensen R, Meyer AS (2004) Effects of different enzymatic pre-press maceration treatments on the release of phenols into blackcurrant juice. *Eur Food Res Technol* 219: 620–629.
79. Rajauria G, Tiwari BK (2017) *Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis*, Academic Press.
80. Laaksonen O, Mäkilä L, Jokinen M (2020) Impact of storage on sensory quality of blackcurrant juices prepared with or without enzymatic treatment at industrial scale. *Eur Food Res Technol* 246: 2611–2620.
81. Laaksonen OA, Mäkilä L, Sandell MA (2014) Chemical-Sensory Characteristics and Consumer Responses of Blackcurrant Juices Produced by Different Industrial Processes. *Food Bioprocess Technol* 7: 2877–2888.
82. Wood IP, Elliston A, Ryden P (2012) Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy* 44: 117–121.
83. Deshavath NN, Mukherjee G, Goud VV (2020) Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules* 156: 180–185.
84. Kivirand K, Rincken T (2009) Preparation and Characterization of Cadaverine Sensitive Nylon Threads. *Sensor Letters* 7: 580–585.
85. Gusakov AV, Kondratyeva EG, Sinitsyn AP (2011) Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. *International Journal of Analytical Chemistry* 2011: e283658.
86. Gusakov AV, Markov AV, Grishutin SG (2002) Viscometric method for assaying of total endodepolymerase activity of pectinases. *Biochemistry (Mosc)* 67: 676–682.
87. Nour V, Trandafir I, Ionica ME (2011) Ascorbic acid, anthocyanins, organic acids and mineral content of some black and red currant cultivars. *Fruits* 66: 353–362.
88. Mitek M, Drzazga B (1988) Interrelation between the effect of enzymatic clarification of apple juices and the amount and quality of polyphenols. I. Inhibition of pectinolytic enzymes by

polyphenols. Studies of model systems. *Department of Fermentation and Fruit and Vegetable Technology, Warsaw Agriculture University XIV.*

89. Homaei AA, Sariri R, Vianello F (2013) Enzyme immobilization: an update. *J Chem Biol* 6: 185–205.

Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks (tähtajaline piirang) ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Anete Aunbaum,

(sünnipäev 02/05/2000, 60005022714)

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö „Mahlade tootmisel kasutatavad immobiliseeritud hüdrolüütilised ensüümid“, mille juhendaja on Toonika Rinke ja Anna Pisponen,
 - 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
 - 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
 - 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks pärast tähtajalise piirangu lõppemistkuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor

_____ allkiri

Tartu, 29.05.2024

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

_____ (juhendaja nimi ja allkiri)

_____ (kuupäev)

_____ (juhendaja nimi ja allkiri)

_____ (kuupäev)