

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Keemia instituut

Lennar Laasik

**Ensümaatilise aktiivsuse määramine seedimist toetavates
toidulisandites**

Bakalaureusetöö (6 EAP)
Füüsika, keemia ja materjaliteadus

Juhendaja: Toonika Rinke, PhD

Tartu 2019

Sisukord

Kasutatud lühendite nimekiri.....	3
Sissejuhatus	4
1. Kirjanduse ülevaade	5
1.1 Toidulisandid	5
1.2 Seedeensüümid.....	5
1.2.1 Amülaasid.....	6
1.2.2 Proteaasid.....	10
1.2.3 Lipaasid	11
1.2.4 Seedeensüümide aktiivsuse iseloomustamiseks kasutatavad ühikud	11
1.3 Meetodid seedeensüümide aktiivsuste määramiseks	14
2. Eksperimentaalne osa	15
2.1 Kasutatud reaktiivid	15
2.2 Kasutatud aparatuur	16
2.3 Analüüsitud toidulisandite preparaadid	16
2.4 Valgusisalduse määramine	17
2.5 Seedeensüümide aktiivsuste määramine	17
2.5.1 Aktiivsuse määramine hapnikuanduri abil.....	17
2.5.2 Jodomeetriline test	18
2.5.3 Spektrofotomeetriline ensüümide aktiivsuse määramine	19
2.5.4 Jodomeetriline tiitrimine	20
2.5.5 Viskoossuse mõõtmine	21
3. Tulemused ja arutelu	22
3.1 Valgusisalduse määramine	22
3.2 Kalibreerimisgraafikud erinevate reaktsiooniproduktide määramiseks.....	24
3.3 Ensümaatilise aktiivsuse määramine.....	28
3.3.1 Digest Basic	28
3.3.2 Digest Gold	29
3.3.3 Digest Spectrum	31
3.3.4 Digest + Live Bacteria	32
3.3.5 Digest Kids.....	33
3.6 Tulemuste koondtabel.....	34
Kokkuvõte.....	36
Kasutatud kirjandus.....	38
Summary.....	43
Lisa 1. Toidulisandi Digest Basic infoleht.....	45
Lisa 2. Toidulisandi Digest Gold infoleht	47
Lisa 3. Toidulisandi Digest Spectrum infoleht	48
Lisa 4. Toidulisandi Digest + Live Bacteria infoleht.....	49
Lisa 5. Toidulisandi Digest Kids infoleht.....	50

Kasutatud lühendite nimekiri

- AGU – Glucoamylase Unit – glükoamülaasi ühik
- ALU – Acidic Lactase Unit – happelise laktaasi ühik
- BGU – β -Glucanase Unit – β -glukanaasi ühik
- BSA – Bovine serum albumin – veise seerumi albumiin
- CU – Cellulase Unit – tsellulaasi ühik
- DP^o – Diastatic Power - diastaatiline võimsus
- DU – Dextrine Unit – dekstriini ühik
- EC – Enzyme Commission – ensüümide nomenklatuur
- Endo-PGU – Endo Polygalacturonidase Unit – endo polügalaturonidaasi ühik
- FCC – Food Chemicals Codex
- FCCFIP – Food Chemical Codex Papain Unit - Food Chemicals Codex-i papaini ühik
- GalU – α -galactosidase Unit – α – galaktosidaasi ühik
- HCU – Hemicellulase Unit – hemitsellulaasi ühik
- HUT – Hemoglobin Unit Tyrosine base – hemoglobiini ühik türosiini baasil
- LBG – Locust bean gum from Ceratonia siliqua seeds - jaanikaunapuujuhu
- rpm – Pööret minutis
- SDS – Naatriumdodetsüülsulfaat
- SU – Sumner Unit – sumneri ühik
- XU – Xylanase unit – ksülanaasi ühik

Sissejuhatus

Inimeste toitumisharjumused muutuvad pidevalt ning üha enam tarbitakse töödeldud või ka ühekülgselt tasakaalustamata toitu. On levimas kartus, et toidust ei saada piisavalt kõiki vajalikke toitaineid. See on põhjustanud suurenenud huvi toidulisandite, sealhulgas seedimist toetavate toidulisandite vastu.

Toidulisandid ei ole ravimid ja neid defineeritakse toiduainetena, seega ei ole nende müümiseks luba vaja ja tootja vastutab ise toote kvaliteedi eest. Toote etiketil või infolehel peab olema selgelt toodud info selles leiduvate erinevate ainete kohta. Kuna toidulisandites on tegemist bioloogiliselt aktiivsete ainetega, siis nende aktiivsus võib aja jooksul muutuda. Seoses sellega ongi toidulisandite tarnijatel tekkinud küsimus müüdavate toidulisandite preparaatide vastavusest toodete infolehtedel toodule. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oligi määrata ühe tuntuma toidulisandite tootja Enzymedica poolt toodetavates preparaatides olevate seedeensüümide aktiivsused ja kontrollida nende vastavust infolehes toodule erinevate ensüümide korral. Ensüümide aktiivsuste määramiseks kasutati mitmeid erinevaid meetodeid, sealhulgas biosensorite töögrupi poolt välja pakutud oksidoreduktaaside aktiivsuse määramist hapnikuanduri abil.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Toidulisandid

Toidulisandid on kontsentreeritud toitainete allikad, mis aitavad parandada toitumisalaseid puuduseid, et tagada piisav toitainete tarbimine või ka toetada spetsiifilisi füsioloogilisi funktsioone. Toidulisandid ei ole ravimid ning seetõttu ei kasutata neid haiguste ravimiseks või ennetamiseks. Euroopa Liidus defineeritakse toidulisandeid toiduainetena. Direktiividega on määratletud ka allikad, millest on lubatud vitamiine, mineraale ning teisi toidulisandeid toota [1,2].

Ekstratsellulaarseid ehk rakuväliseid ensüüme toodavad paljud kerahallikute (*Aspergillus*) liigid ning seetõttu kasutatakse neid laialdaselt biotehnoloogilistes protsessides. Kuna *Aspergillus*'ed suudavad lagundada erinevaid biopolümeere nagu tärklis, tselluloos, pektiin ja mitmesugused valgud, saab neid kultiveerida taastuvatel allikatel, näiteks taimede biomassil. Tööstusliku tootmise käigus on võimalik *Aspergillus*'te valguproduktioon viia isegi üle 20 g/l. Kerahallikute abil toodetakse mitmeid tööstustes kasutatavaid ensüüme, nagu amülaasid, katalaas, tsellulaas, pektinaas, lipaas, proteaasid ning ksülanaas. Kõik eelnevalt nimetatud ensüümid on olemas ka Digest seeria preparaates [3].

Toidulisandeid jagatakse erinevatesse gruppidesse lähtudes nendes leiduvatest bioloogilist toimet omavatest ainetest. Üheks toidulisandite alamliigiks on seedimist toetavad toidulisandid, mis sisaldavad erinevaid seedeensüüme. Seedeensüümid aitavad lagundada toidu komponente väiksemateks osadeks, mis saaksid kehas imenduda. Seedeensüümid kuuluvad kõik hüdrolaaside klassi, mis katalüüsivad hüdrolyüsi reaktsioone [4]. Seedimist toetavate toidulisandite seast on turult võimalik leida Enzymedica OÜ poolt turustatavad Enzymedica preparaadid, mis on toodetud USA-s Florida osariigis [5].

1.2 Seedeensüümid

Seedeensüüme jagatakse nelja põhilisse klassi tulenevalt nende poolt lõhustatavatest ühenditest [6]:

1. Proteaasid – Proteaasid ehk peptidaasid lõhustavad proteiine väiksemateks peptiidideks ning aminohapeteks.
2. Amülaasid – Amülaasid lõhustavad suuremaid karbohidraate – tärklis, pektiin – lihtsuhkruteks – glükoos, fruktoos jt.
3. Lipaasid – Lipaasid lõhustavad rasvu vabadeks rasvhapeteks ning glütserooli molekulideks.
4. Nukleaasid – Nukleaasid lõhustavad nukleiinhappeid nukleotiidideks.

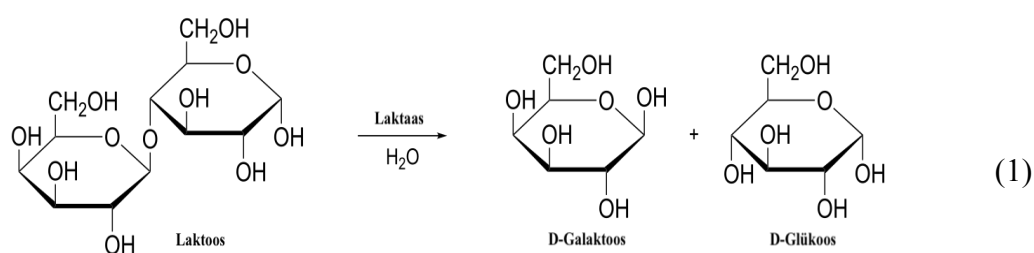
Lähtudes toodud jaotusest on järgnevalt täpsemalt iseloomustatud eelpooltoodud jaotuse esimesse kolme rühma kuuluvaid olulisemaid seedeensüüme, mis sisalduvad ka Digest seeria toidulisandites.

1.2.1 Amülaasid

Amülaasid lõhustavad suuremaid karbohidraate nagu tärklis, pektiin, ksülaan jt. väiksemateks lihtsuhkruteks (glükoos, fruktoos, galaktoos jt). Kõik amülaasid kuuluvad hüdrolaaside klassi (EC 3) ning kuuluvad ka glükosidaaside alamklassi (EC 3.2.1), mis hüdrolyüsivad O- ja S- glükosüüle [4].

Laktaas

Laktaas ehk β -galaktosidaas (EC 3.2.1.23) katalüüsib β -1-4 glükosiidsideme lõhustamist, sealhulgas ka laktoosi hüdrolyüsi, mille tulemusena laktoos hüdrolyüsib D-glükoosiks ja D-galaktoosiks [7].



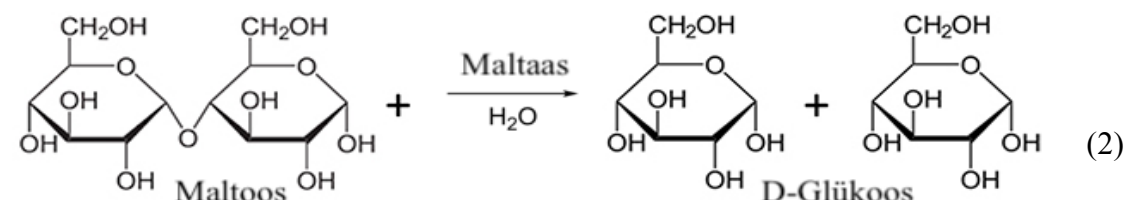
Laktoosi nimetatakse ka piimasuhkruks, kuna seda leidub suures koguses piimas. Lehmapiim sisaldab 4,5-5% laktoosi, inimese rinnapiimas on laktoosi sisaldus veelgi suurem, kuni 7% [8]. Laktoosi hüdrolyüsiks on vajalik laktaasi olemasolu, sest laktoos on disahhariid β -1-4 glükosiidsidemega, mille lagundamisega keha ilma laktaasita hakkama ei saa. Paljudel inimestel kujuneb elu jooksul laktaasi puudulikkus (laktoosi talumatus) ning nad ei saa värskest piimast tehtud tooteid tarbida. Arvatakse,

et laktoositalumatus esineb kuni 65% täiskasvanud inimestel, kusjuures põhjamaades kuni 10%-l ning Aasias ja Aafrikas kuni 95%-l [8–10].

Laktaasi leidub looduslikult nii taimsetes kui loomsetes kudedes, samuti paljudes mikroorganismides: erinevates kerahallikutes (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus carbonarius*), soolekepiketes (*Escherichia coli*) ning laktobatsillides (*Lactobacillus*) [11].

Maltaas

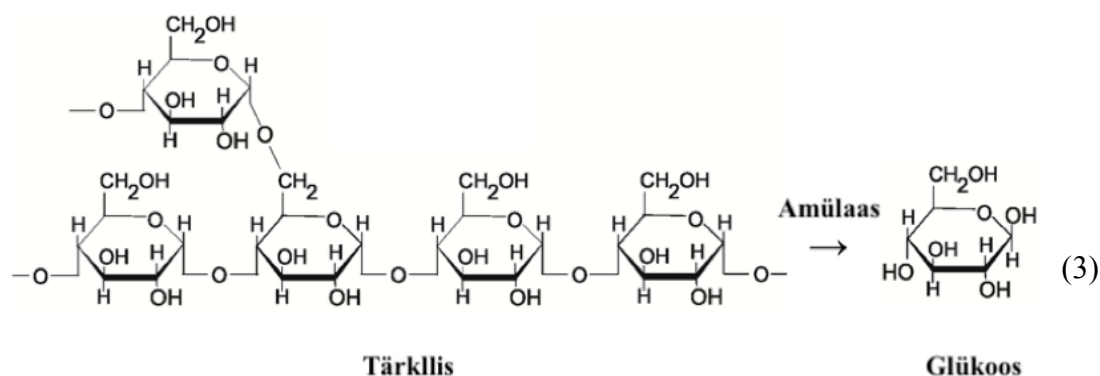
Maltaas ehk α -glükosidaas (EC 3.2.1.20) katalüüsib α -1-4 glükosiidsideme lõhustamist, sealhulgas ka maltoosi ehk linnasesuhkru hüdrolüüsi. Reaktsiooni tagajärjel vabaneb α -D-glükoos [12].



Maltaasi leidub laialdaselt nii taimedes, loomades kui ka inimestes (peensooles, maksas, veres jm.). Samuti erinevates bakterites (*Aspergillus niger*, *Bacillus licheniformis*, *Penicillium brevicompactum*, *Saccharomyces cerevisiae* jt.) [13].

Amülaas

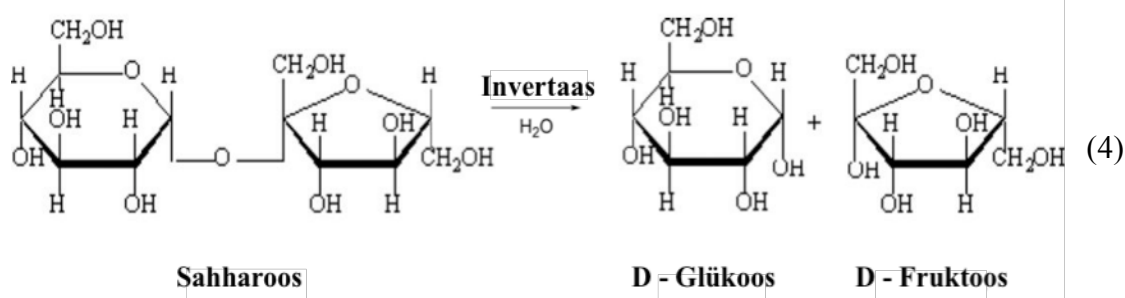
α -amülaas (EC 3.2.1.1) hüdrolüüsib α -1,4-glükosiidsidemeid tärklises, glükogeenis ja teistes sarnastes polüsahariidides [14].



Seda leidub taimedes, loomades (sh inimese süljes ning pankreaseenõres) ja mikroorganismides. α -amülaasi tootmiseks kasutatakse põhiliselt mikroorganisme, sest nende kasv ja paljunemine on võrreldes taimede- ja loomadega kiirem [14].

Invertaas

Invertaas ehk β -fruktofuranosidaas (EC 3.2.1.26) katalüüsib sahharoosi hüdrolüüsi, mille tulemusel laguneb sahharoos glükoosiks ning fruktoosiks [15].



Looduses esineb invertaasi nii taimedes, loomades kui inimestes(süljes). Mesilased kasutavad invertaasi nektarist mee tootmiseks. Tööstuslikult saadakse invertaasi põhiliselt pärmseentest. Seda kasutatakse peamiselt maiustuste ning siirupite valmistamiseks, kuna tekkinud fruktoos on sahharoosist magusam [15–17].

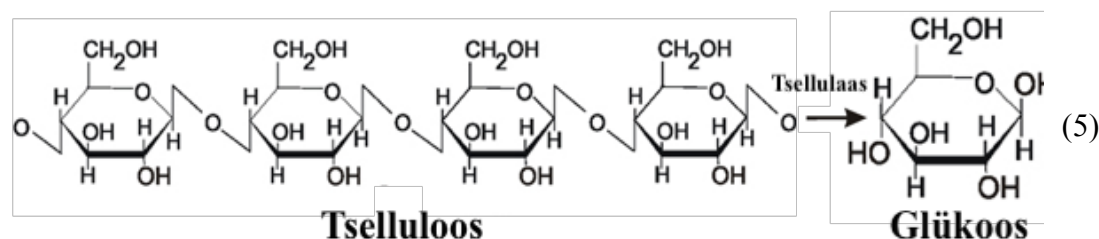
Glükoamülaas

Glükoamülaas ehk glükaan - α -1,4-glükosidaas (3.2.1.3) katalüüsib α -1,4-glükosiidsideme hüdrolüüsi tärglisse mitteredutseeruvatest otstest, mille tulemusena tekib glükoos [18].

Glükoamülaasi kasutatakse laialdaselt toidutööstuses glükoosisiirupi tootmiseks ning samuti käärimisprotsessides õlu ning etanooli tootmisel. Glükoamülaasi leidub paljudes mikroorganismides, tööstuslikult on tähtsaimad *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* ning *Rhizopus oryzae* [18].

Tsellulaas

Tsellulaas (EC 3.2.1.4) katalüüsib β -1-4 glükosiidsideme hüdrolüüsi tselluloosis [19].



Tsellulaasi leidub nii seentes, bakterites, taimedes kui ka loomades. Tsellulaasi toodavad mitmed mikroorganismid (bakterid *Clostridium*, *Cellulomonas*; seened *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*). Enim kasutatakse tsellulaasi tootmiseks *Aspergillus niger* mikroorganisme [19].

Hemitsellulaas

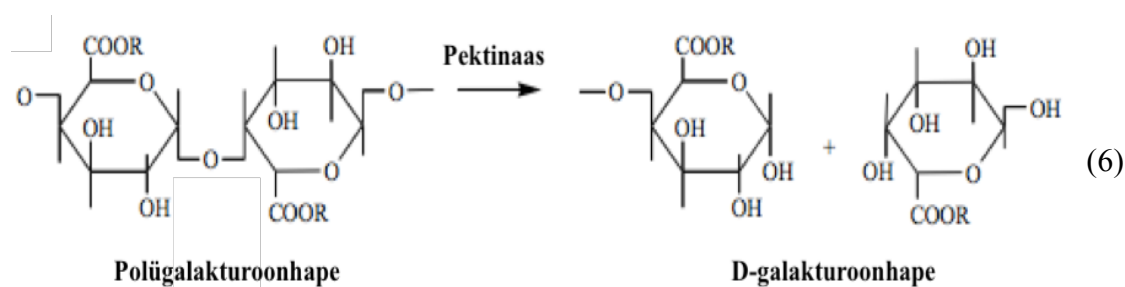
Hemitsellulaasi ei kategoriseerita ensüümide klassifikatsioonis kui eraldiseisvat ensüümi, mistõttu puudub tal ka EC klassifikatsiooninumber. Teaduskirjanduses on toodud, et hemitselluloos on erinevate ensüümide segu, mis katalüüsib erinevatest suhkrutest koosneva hemitselluloosi lagunemist. Hemitselluloosi hulka kuuluvad glükaanid, galaktaanid, ksülaanid, mannaanid ning pentosaanid. Näiteks paljud kiudaineterikkad hommikuhelbed sisaldavad suures koguses hemitselluloose (2–12%). Hemitsellulaasi on vaja, et need kiudaineterikkad komponendid lagundada. Kuna aga inimesed ise hemitsellulaasi ei sünteesi, siis on meile vajalikud mikroorganismid meie seedetraktis, mis sünteesivad hemitsellulaasi meie eest [20,21].

Pektinaas

Pektinaaside all mõistetakse ensüümide rühma, mis lagundavad taimede rakkude seintes leiduvaid pektiinseid aineid. Pektiinseid aineid on polüsahhariidid, mis koosnevad α -1-4-glükosiidsidemega seotud D – galakturoonhappe jääkidest. D – galakturoonhappe on oksüdeeritud vorm D – galaktoosist. Pektiinseid aineid jagatakse kahte gruppi:

- pektiinhape – galakturoonhappe polümeer;
- pektiin – galakturoonhappe polümeer, milles karboksüülrühmad on muudetud metüül-estriteks [22].

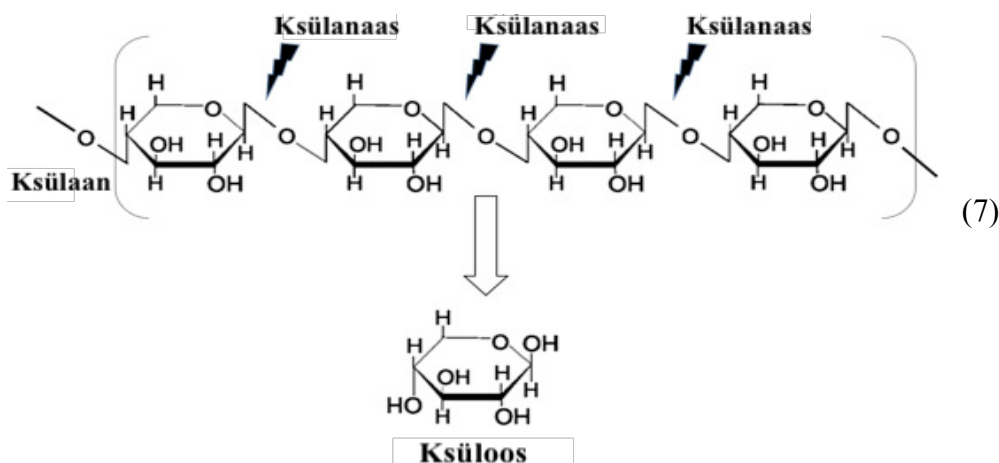
Pektinaas (EC 3.2.1.15) katalüüsib pektiinhappes α -1-4 glükosiidsideme hüdrolüüsi [23].



Pektinaasi leidub paljudes puu - ja köögiviljades. Samuti toodavad pektinaasi mitmed mikroorganismid (*Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* jt.) [23].

Ksülanaas

Ksülanaas ehk endo-1,4- β -ksülanaas (EC 3.2.1.8) katalüüsib β -1,4-glükosiidsideme hüdrolüüsi põhiliselt taime rakkude koostises oleva polümeeri ksülaani lagundamist monomeerideks [24,25].



Ksülanaasi leidub paljudes seentes ja bakterites, pärmis ning putukates. Põhiline tööstuslik ksülanaasi tootmisallikas on *filamentus fungi* ehk hallitus. Tööstuslikult kasutatakse ksülanaasi loomasööda lisandina, leiva tootmises ning loodusliku magustaja – ksülitooli – tootmises [25].

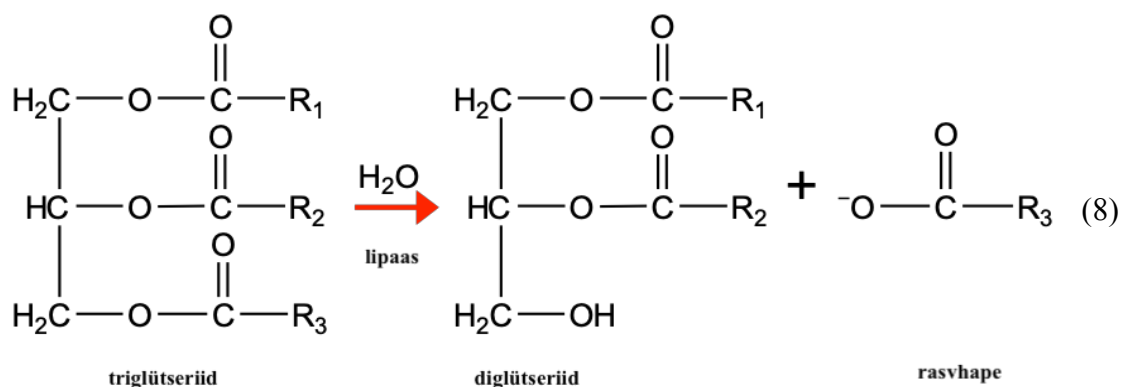
1.2.2 Proteaasid

Proteaasid ehk peptidaasid on hüdrolaasid, mis katalüüsivad peptiidsidemete lagunemist ja kuuluvad alamklassi EC 3.4 [4]. Proteaaside poolt katalüüsitava hüdrolüüsi tulemusena moodustuvad vabad aminohapped või ka erineva pikkusega peptiidid. Ükski proteaas ei hüdrolüüsi kõiki peptiidsidemeid, vaid iga proteaas on spetsiifiline peptiidiahela kindlas positsioonis olevatele peptiidsidemetele. Kokku on avastatud sadu erinevaid proteaase, mis jagatakse seitsmesse suuremasse gruppi [26].

Lisaks valkude lõhustamisele on proteaasidel oluline roll embrüonaalses arengus, rakutsükli regulatsioonis, luude moodustumisel, haavade paranemisel ja mujal [27].

1.2.3 Lipaasid

Lipaasid kuuluvad alamklassi EC 3.1. ning katalüüsivad triglütseriidide hüdrolüüsi. Üheks tavalisemaks lipaasiks on triatsüülglütserool lipaas (EC 3.1.1.3) [28].



Lipaase leidub mitmetes mikroorganismides (*Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*), taimedes ning ka loomades ja inimestes[28].

1.2.4 Seedeensüümide aktiivsuse iseloomustamiseks kasutatavad ühikud

Ensüümide katalüütilised omadused sõltuvad oluliselt valgumolekuli sekundaarsest, tertsiaarsest ning kvaternaarsest struktuurist. Ensüümide katalüütilisi omadusi iseloomustab ensüümi aktiivsus, mida tähistatakse tavaliselt kui U (vahetevahel ka kui EU – enzyme unit). 1 U on defineeritud kui ensüümi hulk, mis katalüüsib 1 mikromooli substraadiga toimuva reaktsiooni toimumist 1 minuti jooksul, tavaliselt 25°C juures ning pH väärtusel, mis tagab konkreetse ensüümi maksimaalse aktiivsuse [29].

Erinevad toidulisandite tootjad kasutavad seedeensüümide aktiivsuste iseloomustamiseks samas väga erinevaid ühikuid, mille võrdlemine on suhteliselt aeganõudev ning keeruline, kuna ensüümide puhul ei iseloomustata nende sisaldust kaalu põhjal, vaid ensümaatilise aktiivsusega. Selleks kasutatakse standardina Food Chemicals Codexi (FCC) aktiivsuse ühikuid. FCC on rahvusvaheliselt tunnustatud toiduainete puhtuse ning standardite kogum [30,31].

Eelpoolkirjeldatud olulisemate seedeensüümide enamkasutatavate aktiivsuseühikute kirjeldus ja võrdlus IUPAC-i ühikuga on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Seedeensüümide aktiivsuste iseloomustamiseks kasutatavad ühikud

	Ensüüm	Aktiivsuse ühik	Aktiivsuse ühiku definitsioon	Aktiivsuse ühiku seos rahvusvahelise ühikuga	Viide
1.	Laktaas	ALU(Happeli se laktaasi ühik, acidic lactase unit)	1 ALU on ensüümi hulk, mille toimetel o-nitrofenüül- β -D-galaktopüranosiidi hüdrolyüsil tekib ühe minuti jooksul 1 mikromool o-nitrofenooli	1U = 1ALU	[32]
2.	Maltaas	DP ^o (Diastatic Power)	1 DP ^o (Diastatic Power) on maltaasi hulk, mille katalüütilise aktiivsuse tulemusel tekib 1 mikromooli maltoosi hüdrolyüsil ühe minuti jooksul 2 mikromooli α -D-glükoosi	1U = 1 DP ^o	[32]
3.	Invertaas	SU(Sumner Unit)	1 SU on ensüümi hulk, mis hüdrolyüsib 1mg sahharoosi fruktoosiks ning glükoosiks 5 minuti jooksul	1U \approx 1.67S U	[32,33]
4.	Amülaas	DU(Dextrine Unit)	1 DU (dextrine unit) on ensüümi hulk, mis hüdrolyüsib dekstriinideks 1g lahustuvat tärklist 1 tunni jooksul (ehk 16,7 mg/min) 30 °C juures	1U =1 DU	[32]
5.	Glüko-amülaas	AGU(Amylo glucosidase Unit)	1 AGU on ensüümi hulk, mis vabastab 0,1 μ mol/min p-nitrofenooli p-nitrofenüül- α -D-glükopüranosiidi (PNPG) lahusest, pH=4,3 ning 50°C	1U=10AG U	[32]
6.	Tsellulaas	CU(cellulase Unit)	1 CU on defineeritud kui aktiivsuse hulk, mis põhjustab suhtelise viskoossuse muutuse 5 minuti jooksul	1U \approx 0,2CU	[32]

			karboksümetüül tselluloosi substraadil, pH = 4,5 ning 40°C		
7.	Hemi- tsellulaas	HCU(Hemi - cellulose Unit)	1 HCU on defineeritud kui aktiivsus, mis põhjustab suhtelise viskoossuse muutuse 5 minuti jooksul jaanileivapuu substraadist, pH = 4,5 ja 40°C	1U≈0,2HC U	[32]
8.	α-galaktosidaas	GalU(α- galactosidase activity unit).	1 GalU on ensüümi hulk, mis vabastab p- nitrofenooli kiirusega 1 µmol/min, pH 5.5 ja 37°C	1U = 1GalU	[32]
9.	Pektinaas	PGU(β- Glucanase Units)	1 PGU on ensüümi hulk, mis toodab lihtsuhkruid ekvivalentselt 1 µmoli naatrium tiosulfaadiga 30 minuti jooksul, ph =4.0 ning 40°	1U=30PG U	[32]
10.	Ksülanaas	XU(Xylanase Unit)	1 XU on ensüümi hulk, mis vabastab 1µmoli ksüloosi minutis, pH 5.3 ning 50°C	1 U = 1xU	[32]
11.	Proteaaas	HUT (Hemoglobin Unit Tyrosine base)	1 HUT ensüümi hulk, mis katalüüsib hemoglobiinist 1 minuti (pH 4,7 ning 40°C) jooksul sellise hulga hüdrolüsaadi teket, mille neelduvus 275 nm juures on võrdne 0.006N soolhappes oleva 1,10 µg/mL türosiini neelduvusega	1U=10HU T	[32]
12.	Lipaas	1 FCCFIP (Food Chemical Codex Papain Unit)	1 FCCFIP on ensüümi hulk, mis vabastab ekvivalentselt 1µmoli rasvhapet minutis substraatemulsioonist, pH = 7.00 ning 37°C	1U=1FCC - FIP	[32]

Enzymedica toodete tootelehtedel kasutatakse ensüümide iseloomustamiseks ka mõistet “Thera segu”. “Thera tehnoloogia” on Enzymedica poolt välja töötatud protsess, kus kombineeritakse erinevat päritolu ensüüme, et tagada ensüümide toime kogu seedetraktis. Ensüümid töötavad efektiivselt kindlates pH vahemikes. “Thera

seguga” luuakse olukord, kus ensüümid toimivad nii mao ülaosa happelises keskkonnas (pH = 1–3.5), mao alaosa aluselises keskkonnas (pH = 8–8.5) kui ka peensoole neutraalses keskkonnas (pH = 7–8) [34,35].

1.3 Meetodid seedeensüümide aktiivsuste määramiseks

Seedeensüümide aktiivsuste määramiseks on kasutusel mitmeid erinevaid meetodeid, nagu spektrofotomeetiline meetod, mille korral kasutatakse ensüümi aktiivsuse mõõtmiseks looduslikele substraatidele sarnaseid ühendeid, mille hüdrolyüsil tekib spektrofotomeetriselt detekteeritav produkt; aktiivsuse määramine protsessi käigus kuluva hapniku hulga alusel; viskoossuse mõõtmine, kus lahuse viskoossus väheneb substraadi hüdrolyüsi tõttu [36]. Olulisemate seedeensüümide aktiivsuste määramiseks kasutatavad meetodid on kokkuvõtlikult toodud tabelis 2.

Tabel 2. Valik olulisemate seedeensüümide määramiseks kasutatavad meetodid

Meetod	Ensüümid	Viide
Määramine hapnikuanduriga	Laktaas, Maltaas, Invertaas, Glüko-amülaas, Tsellulaas	[7]
Spektrofotomeetria	Laktaas, amülaas, tsellulaas, ksülanaas, proteaas, lipaas, glüko-amülaas, α -galaktosidaas	[7,37–39]
Viskosimeetria	Tsellulaas, hemitsellulaas	[36]
Jodomeetiline tiitrimine	Pektinaas	[40]

Lisaks toodud meetoditele, kasutatakse ensüümide aktiivsuste määramiseks praktikas ka erinevaid kolorimeetrisi ja fluorimeetrisi testkomplekte, mis tänu oma suuremale tundlikkusele võimaldavad määrata ka suhteliselt madalaid aktiivsusi [41–43]. Testkomplektid on ensüümpõhised ning on soetatavad koos vajalike reagentide ja protokollidega. Komplektid on enamasti 50 – 100 proovi määramiseks ning seega sobivad pigem kasutamiseks rutiinanalüüsides tegelevale laboratooriumile [41,42].

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Kasutatud reaktiivid

1. Veise seerumi albumiin (BSA), Lot No K00110-1082, PAA
2. Folin & Ciocalteu fenool reagent, Lot NoBCBV7931, Sigma-Aldrich
3. Kaalium naatrium tartraat ($C_4H_4O_6NaK$), Реахим, ч
4. Naatriumdotetsüülsulfaat(SDS)($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$),Sigma-Aldrich, $\geq 98.5\%$
5. Vask(II)sulfaat pentahüdraat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Реахим, ч
6. Naatriumdivesinikfosfaat - dihüdraat ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), AppliChem, $\geq 99\%$
7. Dinaatriumvesinikfosfaat (Na_2HPO_4), AppliChem, $\geq 99\%$
8. Naatriumhüdrosiid (NaOH), AppliChem, $\geq 99\%$
9. Laktoosmonohüdraat ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$), AppliChem, $\geq 99,9\%$
10. β -galaktosidaas, *Aspergillus oryzae*, 8,4 U/mg, Lot No 058K1284, Sigma-Aldrich
11. Glükoosi oksüdaas, *Aspergillus niger*, 17300 U/mg, Lot No 079K7450V, Sigma-Aldrich
12. Ökoloogiline tärklis, Finnamyl OY
13. Jood (I_2), Реахим ч
14. Kaaliumjodiid (KI), Реахим, хч
15. Etaanhape (CH_3COOH), Реахим, ч
16. Kaseiin , Alfa Aesar
17. Trikloroatsetaat happe anhüdriid($(Cl_3CCO)_2O$)
18. Naatriumkarbonaat (Na_2CO_3), AppliChem, $\geq 99,5\%$
19. Naatriumatsetaat (CH_3COONa), AppliChem, $\geq 99\%$
20. Kaltsiumkloriid ($CaCl_2$), Hopkin & Williams, $\geq 85\%$
21. L-Türosiin($C_9H_{11}NO_3$)
22. Õunapektiin, Naturawerk
23. Väävelhape 95-97%, (H_2SO_4), Sigma-Aldrich, Lot. STBG 9176
24. Naatriumtiosulfaat ($Na_2S_2O_3$), Fischer Scientific for analysis
25. Naatriumsulfaat (Na_2SO_4), Реахим, хч
26. Ksülaan($(C_5H_8O_4)_n$), Carl Roth, $\geq 99,9\%$
27. Kaaliumarsenaat (K_3AsO_4), EW Tartu Ülikooli Rohuteaduse Instituut

28. Molübdeenhape ammonium sool tetrahüdraat $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$, r.g.a
29. Karboksümetüütselluloos naatrium sool, Sigma-Aldrich,
30. Naatriumvesinikkarbonaat (NaHCO_3), Реахим, хч
31. D – Ksüloos ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$), Sigma-Aldrich, $\geq 99,9\%$
32. Locust bean gum from Ceratonia siliqua seeds (LBG) (Jaanikaunapuujuhu), Sigma-Aldrich
33. Tris(hüdrosümetüül)aminometaan ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), BioTop, ülipuhas
34. Vesinikkloriidhape, 35% (HCl) , Labochema
35. 4-nitro-bensoehappe fenüülester ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_4$), sünteesitud Mare Piirsalu poolt (st 126°C), TÜ analüütilise keemia õppetoolist
36. Etüül – 4 – nitrobensoaat ($\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_4$), TÜ analüütilise keemia õppetoolist
37. Metanool (CH_3OH), BioTop, analüüsipuhas
38. 4 – nitro – fenool ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$), TÜ analüütilise keemia õppetoolist, Реахим, хч

2.2 Kasutatud aparatuur

1. pH-meeter SevenEasy (Mettler Toledo), täpsus $\pm 0,02$ pH ühikut
2. Magnetsegaja MS 3000 (Biosan)
3. Amperomeetiline Clark-tüüpi hapnikuandur Helox 10, membraani paksus $15 \mu\text{m}$, katodi pindala $6,08 \text{ cm}^2$ (Elke Sensor, Tallinn)
4. Spektrofotomeeter UV-1800 (Shimadzu)
5. Termovann Sky Line TW2.03 (Elmi)
6. Analüütiline kaal PB 602-S/FACT (Mettler Toledo), täpsus $\pm 0,01$ g
7. Analüütiline kaal XS105 Dualrange (Mettler Toledo), täpsus $\pm 0,01$ mg

2.3 Analüüsitud toidulisandite preparaadid

Käesolevas töös analüüsiti Enzymedica OÜ – lt saadud viit erinevat erinevatele sihtrühmadele mõeldud preparaati, kusjuures kahe preparaadi puhul viidi mõõtmised läbi kahes erineval ajal toodetud preparaadi partiis:

1. Digest Basic – LOT DB0617; MFG071517, säilivusaeg kuni 06/2019
LOT DB1217; MFG010918, säilivusaeg kuni 12/2019
2. Digest Gold – LOT DG0818; MFG101716, säilivusaeg kuni 08/2018

- LOT DG0118; MFG021318, säilivusaeg kuni 01/2020
3. Digest Spectrum – LOT DS0118; MFG021518, säilivusaeg kuni 01/2020
 4. Digest+Live Bacteria –LOT DIB0218; MFG032218, säilivusaeg kuni 08/2019
 5. Digest Kids – LOT KDC0217; MFG040417,säilivusaeg kuni 02/2019

Kõik lahused valmistati Milli-Q vett kasutades (25 °C juures eritakistus 18,2 MΩ·cm) Preparaatide lahuste valmistamiseks lahustati ühe kapsli sisu 2-5 ml puhvril ja kasutati analüüsideks maksimaalselt 10 päeva jooksul. Lahuseid hoiti külmkapis 4 °C juures. Kapslite sisu kaalumiseks kasutati analüütilisi kaale täpsusega ± 0,01 mg.

2.4 Valgusisalduse määramine

Kõikides preparaates määriti üldine valgusisaldus spektrofotomeetriselt kasutades Lowry meetodit [44,45]. Esmalt tehti 2 komponendiline lahus :

- *Lahus A* (aluseline lahus, mis tagab valkude lahustamise): 0,1 M NaOH, 2% Na₂CO₃, 0,5% naatriumtartraati ja 0,5% SDS vesilahus
- *Lahus B* (vaske sisaldav reagent): 1 g CuSO₄ * 5 H₂O 100 ml vees

Valgu määramiseks segati lahused A ja B vahekorras 100:1 ja lisati 2,5 ml saadud segu 500 µl-le valku sisaldavale lahusele. Pärast hoolikat segamist inkubeeriti segu toatemperatuuril 10 min. Seejärel lisati 250 µl Folin-Ciocalteu reagenti (lahjendatud veega 1:1) [46] ning inkubeeriti segu 30 min toatemperatuuril. Seejärel pipeteeriti 200 µl proovi plaadile, mõõdeti valguse neeldumine 590 nm juures ning koostati kalibreerimisgraafik valgu sisalduse määramiseks. Standardvalguna kasutati veise seerumi albumiini (BSA). Kõikide kontsentratsioonide juures tehti vähemalt 2 kordumõõtmist.

2.5 Seedeensüümide aktiivsuste määramine

2.5.1 Aktiivsuse määramine hapnikuanduri abil

Laktaasi, maltaasi, invertaasi ning glükoamülaasi aktiivsuste määramiseks kasutati varem laktaasi aktiivsuse mõõtmiseks jaoks väljatöötatud ja optimeeritud meetodit, kus lahuses mõõdetakse hapniku vähenemist ensüümi poolt katalüüsitava reaktsiooni käigus hapnikuanduri abil ning hapniku kontsentratsiooni vähenemise

alusel leitakse erinevate suhkrute katalüütilisel hüdroolüüsil tekkinud glükoosi sisaldus lahuses [7]. Selle meetodi kasutamist laiendati lisaks laktaasile ka maltaasi, invertaasi ning glükoamülaasi aktiivsuste määramistele.

Kindlat kogust toidulisandi preparaati sisaldav lahus lisati määratava ensüümi substraadile (0,1 M fosfaatpuhveris, pH=6,50) arvestusega, et substraadi lõppkontsentratsioon saadud lahuses oli 0,14 M. Hüdroolüüs viidi pideva segamise juures kinnises mõõterakus (V=35 ml) läbi temperatuuril 37 °C, kusjuures kõik mõõtelahused olid eelnevalt küllastatud õhuhapnikuga (suruõhku kasutades 50 minuti jooksul 37 °C juures). Enne hüdroolüüsi alustamist asetati mõõterakku Clarki-tüüpi hapnikuandur, mille väljundvoolul lasti reaktsioonikeskkonnas stabiliseeruda. 8 min pärast reaktsiooni algust süstiti mõõterakku 100 µl glükoosi oksüdaasi (lõppkontsentratsiooniga 1 IU/ml), mis katalüüsis hüdroolüüsil tekkinud glükoosi oksüdeerumist lahustunud hapniku toimet. Glükoosi oksüdaasi süstimise hetkel alustati hapnikuanduri väljundvoolu registreerimist intervalliga 0,5 sekundit.

Iga eksperimentaalne kõver koosnes vähemalt 1000 punktist. Andmed normaliseeriti ning normaliseeritud väljundvoolu väärtuse I_t/I_0 abil arvutati signaali normaliseeritud muutus kui $1-I_t/I_0$. Reaktsioonis kulunud hapniku hulk leiti hapnikuanduri signaali muudu alusel 480 sekundil glükoosi oksüdaasi lisamisest ning selle alusel leiti reaktsiooniseigus olev glükoosi hulk[7].

Eelpoolnimetatud ensüümide aktiivsuste määramiseks kasutati toidulisandite proove, kus eeldatav ensüümi hulk lahuses oli 3.5 U. Laktaasi, maltaasi ning invertaasi substraatidena kasutati vastavalt laktoosi, maltoosi ning sahharoosi. Glükoamülaasi määramiseks kasutati proove, kus eeldatav ensüümi hulk lahuses oli 1U ning substraadiks oli 0,1% tärklise lahus (0,1 M fosfaatpuhveris, pH=6,50).

2.5.2 Jodomeetriline test

Jodomeetrilist testi kasutati amülaasi aktiivsuse määramiseks. See test põhineb tärklise peamise koostisosa amüloosi ja joodi vahelisel reaktsioonil moodustuva tumesinise kompleksi moodustumisel ja selle spektrofotomeetrilisel määramisel [37].

Ensüümi aktiivsuse määramiseks segati 1ml ensüümi sisaldavat lahust (1 kapsel proovi eelnevalt lahustatud 2 ml-s 0,1 M fosfaatpuhvril pH 7,0), 1ml 2%-list tärklise lahust ja 1ml 0,1M fosfaatpuhverlahust (pH 7,0). Kontrollseguisse lisati 1ml 2%-list tärklise lahust ja 2ml puhverlahust. Seejärel inkubeeriti reaktsioonisegusid 60 minutit 60 °C juures ning ensümaatilise reaktsioon lõpetamiseks lisati 2,5ml 0,1M etaanhapet. Segudele lisati 5,5 ml joodi reagenti (0,2% jood ja 2% KI) ning inkubeeriti 10 min. toatemperatuuril. Seejärel mõõdeti segu neelduvust 580 nm juures ning arvutati ensüümi poolt hüdrolyüsitud tärklise hulk [39]. Amülaasi aktiivsus määrati ka preparaadi 50 ning 250 kordse lahjenduse juures. Mõõtmiseks kasutati kvartsküvette. Kõikidele mõõtmistele viidi läbi 3 kordusmõõtmist.

Lahuses oleva tärklise määramiseks tärklis-jood kompleksi neelduvuse alusel (0,1M fosfaatpuhvril pH 7,0 ja toatemperatuuril) lainepikkusel 580nm koostati kalibreerimisgraafik. Arvutusteks kasutati preparaadi 250 kordsel lahjendusel saadud tulemusi.

2.5.3 Spektrofotomeetiline ensüümide aktiivsuse määramine

Spektrofotomeetria kasutati mittespetsiifilisteks proteaasi aktiivsuse määramiseks. Substraadina kasutati kaseiini, kuna ei ole täpselt teada, milliste proteaasidega on tegemist. Kaseiini lagundamisel tekkivad vabad aminohapped (sh. türosiin) määrati Folin'i reagenti abil: see moodustab vaba türosiiniga spektrofotomeetriselt määratava sinise kompleksi [47].

Ensüümi aktiivsuse määramiseks võeti 5 ml 0,65%-list kaseiini lahust 50 mM fosfaat puhvril (pH = 7,50) temperatuuriga 37 °C, millele lisati 0.5 – 1 ml proovi (1 kapsel preparaati eelnevalt lahustatud 15 ml 10 mM Na-atsetaat puhvril (5 mM kaltsium kloriid, pH = 7,50)), segati ning segu inkubeeriti 10 min 37 °C juures. Seejärel lisati 5 ml 110 mM trikloroäädikhapet. Saadud segule lisati ensüümi lahust arvestusega, et ensüümi lahust oleks igas mõõtenõus 1 ml ning inkubeeriti 30 min 37 °C juures. Seejärel mõõtelahused tsentrifugeeriti 10 min 1000 rpm juures. Lahus eraldati sademest ja 2 ml lahusele lisati 5 ml 0,5 M karbonaatpuhvril ja 1 ml 0,5 M Folini reagenti ning inkubeeriti segades 30 min 37 °C juures. Neelduvus mõõdeti 1 ml suurustes proovides 660 nm juures. Kalibreerimislahused tehti puhta türosiiniga

[47]. Kalibreerimisgraafiku abil leiti reaktsiooni käigus vabanenud türosiini hulk ning selle abil leiti seedeensüümide aktiivsused.

Spektrofotomeetria kasutati ka ksülanaasi aktiivsuse määramiseks, kus määratakse reaktsiooni käigus ksülaani lagunemisel tekkivat ksüloosi[48]. Selleks võeti 1.90 ml 1% ksülaani lahust (50 mM naatriumatsetaat puvris, pH 4.5, $t^{\circ}= 30^{\circ}\text{C}$) ning lisati 0,1 ml proovi sisaldavat lahust (1 kapsel lahustatuna 0.05% BSA lahuses nii, et eeldatav ensüümi kontsentratsioon 10U/ml). Lahused segati ning inkubeeriti 30°C juures 10 minutit. Lisati 2 ml vaske sisaldavat reagenti (16 mM CuSO_4 , 1.3 M Na_2SO_4 , 226 mM Na_2CO_3 , 190 mM NaHCO_3 ning 43 mM $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ lahust). Proov inkubeeriti 10 minutit keevas vees ning seejärel jahutati toatemperatuurini. Lisati 2 ml arseen-molübdeen reagenti (40 mM molübdeenhape, 19 mM arseenhape ning 756 mM väävelhape lahust), segati ning tsentrifugeeriti 5 min 5000 rpm juures. Supernatandi neelduvus mõõdeti 540 nm juures. Kalibreerimisgraafiku koostamiseks valmistati ksüloosi standardlahused kontsentratsioonidega 0,02 – 0,2 mg/ml. Kalibreerimisgraafiku abil leiti reaktsiooni käigus vabanenud ksüloosi hulk ning selle abil seedeensüümide aktiivsused.

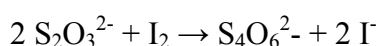
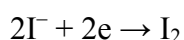
Spektrofotomeetria kasutati ka lipaasi aktiivsuse määramiseks, kus määrati reaktsiooni käigus p-nitrofenüülestri hüdrolüüsil tekkivat p-nitrofenooli. Selleks võeti 2 ml substraadi lahust (0,5 mM 4-nitro-bensoehappe fenüülestri lahust metanoolis, 0,1% Triton X-100, 50 mM tris-HCl puvris, pH = 8,00), lisati 100 μl proovi sisaldavat lahust (1 kapsel lahustatuna 50 mM tris-HCl puvris, pH = 8,00 nii, et eeldatav ensüümi kontsentratsioon on 100 U/ml) ning inkubeeriti 37°C juures üks tund. Neelduvus mõõdeti 1 ml suurustes proovides 405 nm juures [49]. Kalibreerimisgraafiku koostamiseks valmistati 4 - nitrofenooli standardlahusega kontsentratsioonidega 0 – 0,55 mg/ml. Kalibreerimisgraafiku abil leiti reaktsiooni käigus vabanenud p - nitrofenooli hulk ning selle abil seedeensüümide aktiivsused.

2.5.4 Jodomeetriline tiitrimine

Jodomeetrilist redokstiitrimist, kus jood, orgaanilise ühendiga reageerides, käitub redutseerijana [50], kasutati pektinaasi aktiivsuse määramiseks. Selleks võeti 4,90 ml 0,5% polügalakturoonhappe lahust (Milli-Q vees, pH = 4,00), lisati 0,1ml proovi (1 kapsel lahustatuna Milli-Q vees nii, et eeldatav ensüümi kontsentratsioon oli 100U/ml) ning inkubeeriti seda 25°C juures 5 minutit. Seejärel lisati 5ml 0,1M

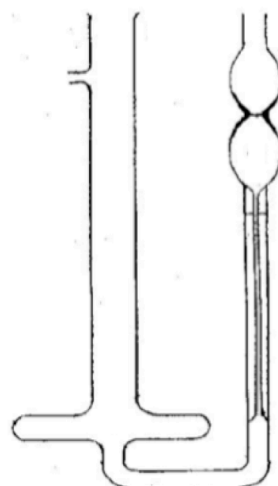
joodilahust ning 1ml 1M Na₂CO₃ lahust. Lahust segati ning inkubeeriti pimedas 20 minutit. Seejärel lisati segule 2ml 1M H₂SO₄ lahust. Saadud segu tiitriti 0,15M Na₂S₂O₃ lahusega helekollase värvuse saamiseni, lisati lahusele indikaatorina 2-3 tilka 1% tärklise lahust ning tiitriti edasi Na₂S₂O₃ – ga värvuse kadumiseni. Määrati titrandi (Na₂S₂O₃) kulu [40].

Määramise käigus toimusid järgmised reaktsioonid:



2.5.5 Viskoossuse mõõtmine

Tsellulaasi määramiseks valmistati tselluloosilahused 25 ml mõõtkolbidesse kontsentratsioonidega 0,1% , 0,15% 0,25%, 0,5%. Uuritavateks lahusteks oli 0,5% tselluloosilahus, millele lisati 1ml proovi(1 kapsel lahustatuna Milli-Q vees nii, et eeldatav ensüümi kontsentratsioon oli 100CU-d) . Tselluloosi hüdroolüüsi lõpetamiseks lisati lahusele 5 min möödudes 1ml 1M H₂SO₄ lahust. Seejärel mõõdeti lahuse viskoossust klaasist kapillaarviskosimeetri abil (joonis 1) [36]. Kõikidele mõõtmistele tehti 3 korduskatset.



Joonis 1. Kapillaarviskosimeeter

Metoodikat kasutati ka hemitsellulaasi aktiivsuse määramiseks, kus substraadiks oli LBG, mis on hemitsellulaasi määramise standardaineks [32].

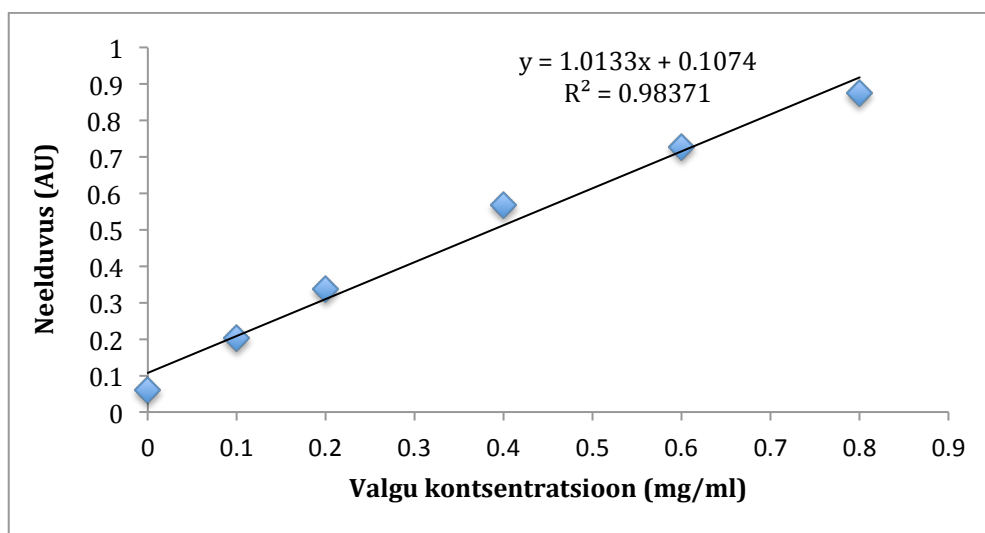
Ensüümide aktiivsuste arvutamisel lähtuti eksperimentaalselt määratud produkti kogusest ning tabelis 1 toodud FCC süsteemis defineeritud ensüümide aktiivsusest. Koostatud kalibreerimisgraafikutel toodud andmete alusel leiti ka reaktsiooniproduktide määramispiirid. Määramispiirid leiti liites keskmisele tulemusele kolmekordne standardhälve.

3. Tulemused ja arutelu

Kõikides uuritud preparaatides määrati üldvalgu sisaldus ja toodete infolehtedel toodud erinevate seedeensüümide aktiivsused ning võrreldi viimaseid nende ensüümide eeldatavate aktiivsustega.

3.1 Valgusisalduse määramine

Valgusisalduse määramiseks uuritud preparaatides Lowry meetodiga koostati esmalt kalibreerimisgraafik, mis oli lineaarne kontsentratsioonide vahemikus 0,1 kuni 0,8 mg/ml (joonis 2), kusjuures standardvalguna kasutati veise seerumi albumiini(BSA).



Joonis 2. Kalibreerimisgraafik valgusisalduse määramiseks.

Valgu sisaldused uuritud preparaatides on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Valgu sisaldused uuritud preparaatides

Toode	Kapsli kaalutis (mg)	Määratud valgu mass 1 kapslis (mg)	Valgusisaldus (%)
Digest Basic (17 – 23 kuud)	254,52	106,5 ± 3,7	42±1,4
Digest Basic (11 – 17 kuud)	247,27	116,3 ± 2,7	47±1,1

Digest Gold (28 - 34 kuud)	480,85	322,8 ± 7,9	67±1,6
Digest Gold (10 - 16 kuud)	480,09	317,8 ± 11,3	66±2,4
Digest Spectrum	508,02	173,1 ± 11,9	34±2,3
Digest + Live Bacteria	250,26	185,8 ± 9,3	74±3,7
Digest Kids	629,91	116,6 ± 3,7	19±0,6

Nagu näha tabelist 3, oli toodete valgusisaldus väga erinev ning jäi vahemikku 19 – 74%. Seega võib eeldada, et erinevatel preparaatidel on lisaks bakterikultuurile lisatud ka muid aineid. Suurim oli valgusisaldus tootel Digest + Live Bacteria ning väikseim tootel Digest Kids. Digest Kidsi madal valgusisaldus võib tulla sellest, et erinevalt teistest toodetest, mis on lahustuva kapsli kujul, on Digest Kids imemistablettidena, millele on lisatud ka värvi – ja maitseaineid.

Digest Basicu preparaatides oli valgu üldine keskmine sisaldus, mis iseloomustab võimalikku ensüümide sisaldust vanemas ja uuemas preparaadis vastavalt 42 ja 47 %. Võrreldes teiste analüüsitud preparaatidega on valgu sisaldus Digest Basic preparaadis madalam kui Digest Gold ning Spectrum toodetel, kuid kõrgem kui Digest+Live Bacteria ning Digest Kids toodetel.

Digest Gold preparaatides oli valgu üldine sisaldus vanemas ja uuemas preparaadis vastavalt 67 ja 66 %, seega võib öelda, et selle varieerivus eri partiides oli väike ja säilitamisel oluliselt ei muutunud. Võrreldes teiste analüüsitud preparaatidega on valgu sisaldus kõrge. Ainult Digest+Live Bacteria valgusisaldus on suurem kui Gold seeria toodetel.

Digest Spectrum preparaatides oli valgu üldine sisaldus preparaadis 34 %. Võrreldes teiste analüüsitud preparaatidega on valgu sisaldus suhteliselt madal.

Digest + Live Bacteria preparaatides oli valgu üldine sisaldus preparaadis 74%. Võrreldes teiste analüüsitud preparaatidega on valgu sisaldus kõige kõrgem.

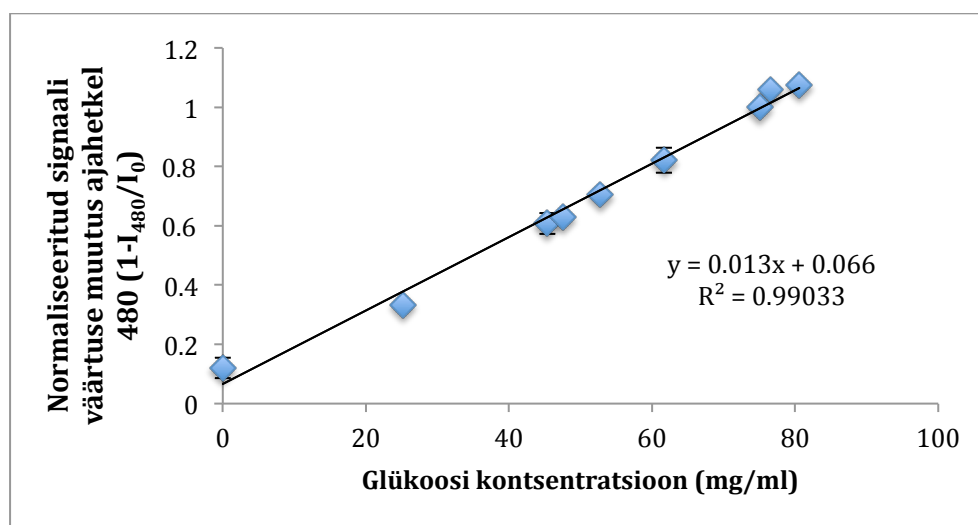
Kõige madalam oli valgusisaldus Digest Kids imemistablettides, kus see oli ainult 19%.

Valgu analüüsil saadud valgu üldkoguse tulemused on hästi kooskõlas ka toodete infolehtedel oleva ensüümide koguaktiivsusega, st mida suurem on preparaadi valgusisaldus, seda kõrgem on potentsiaalselt ka seedeensüümide summaarne aktiivsus.

3.2 Kalibreerimisgraafikud erinevate reaktsiooniproductide määramiseks

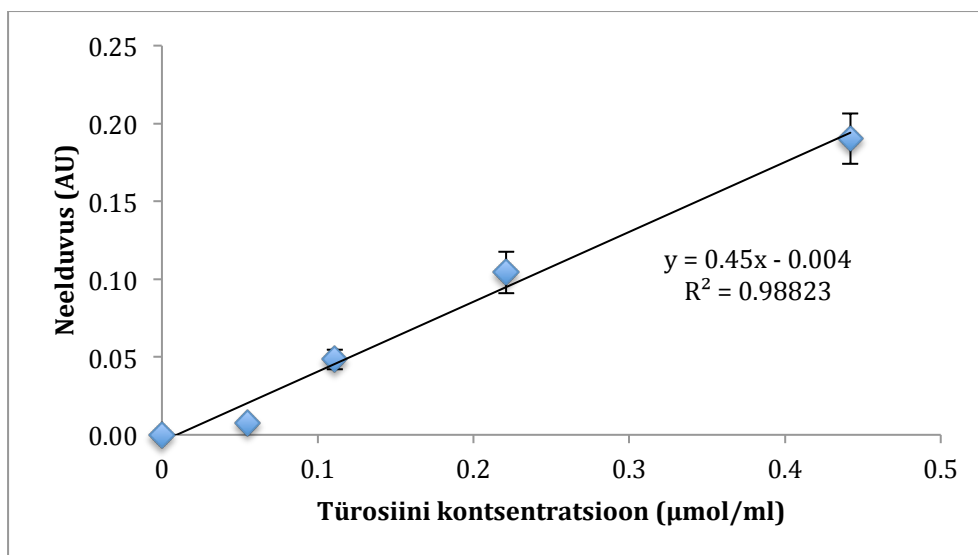
Erinevate ensüümide aktiivsuste määramiseks koostati reaktsiooni productide jaoks kalibreerimisgraafikud, mille tõusud on toodud joonistel 3 – 8.

Hapniku mõõtmist kasutati glükoosi kontsentratsiooni määramiseks laktaasi, maltaasi, invertaasi ning glükoamülaasi aktiivsuste määramisel.

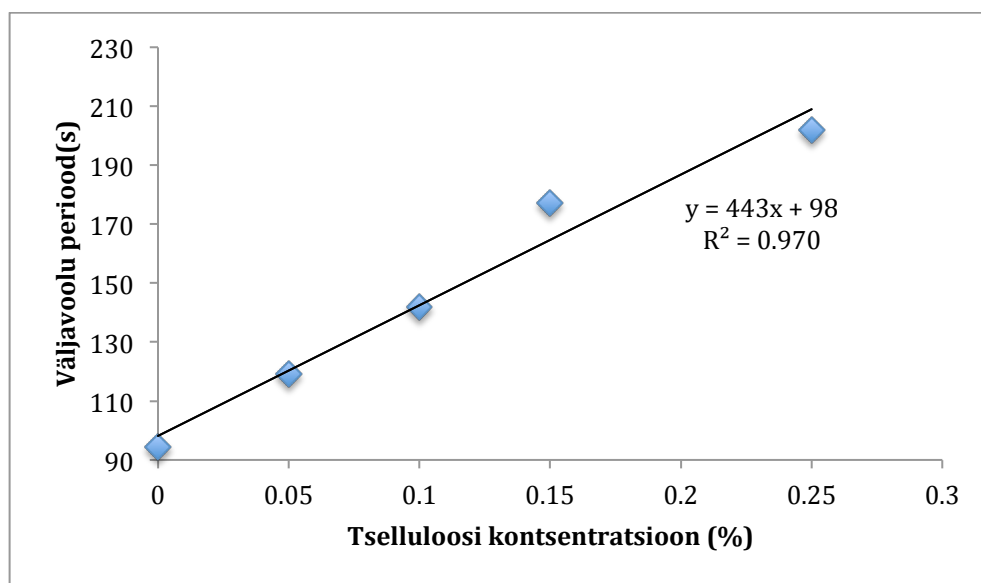


Joonis 3. Kalibreerimisgraafik glükoosi kontsentratsiooni määramiseks. Joonisel 4 toodud graafik oli lineaarne glükoosi kontsentratsioonidel 0 – 80,5 mg/ml. Türosiini spektrofotomeetrist määramist kasutati proteaasi aktiivsuse määramiseks. Kalibreerimisgraafiku alusel leitud glükoosi määramispiir oli 0,49 μ mol/ml.

Joonisel 3 toodud kalibreerimisgraafiku alusel leitud glükoosi määramispiir oli 44 mg/ml.

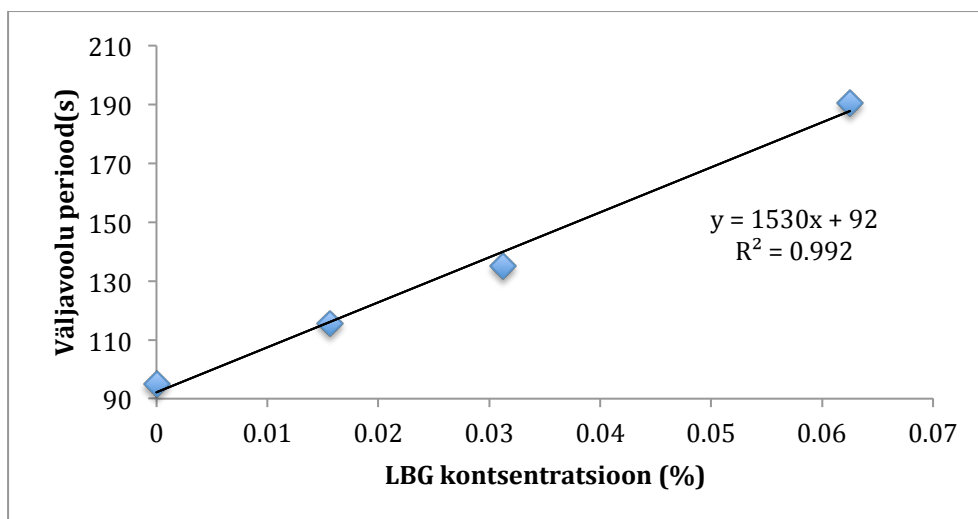


Joonis 4. Kalibreerimisgraafik türosiini kontsentratsiooni määramiseks. Joonisel 4 toodud graafik oli lineaarne türosiini kontsentratsioonidel 0 – 0,442 µmol. Türosiini spektrofotomeetrist määramist kasutati proteaasi aktiivsuse määramiseks. Kalibreerimisgraafiku alusel leitud türosiini määramispiir oli 0,49 µmol/ml.



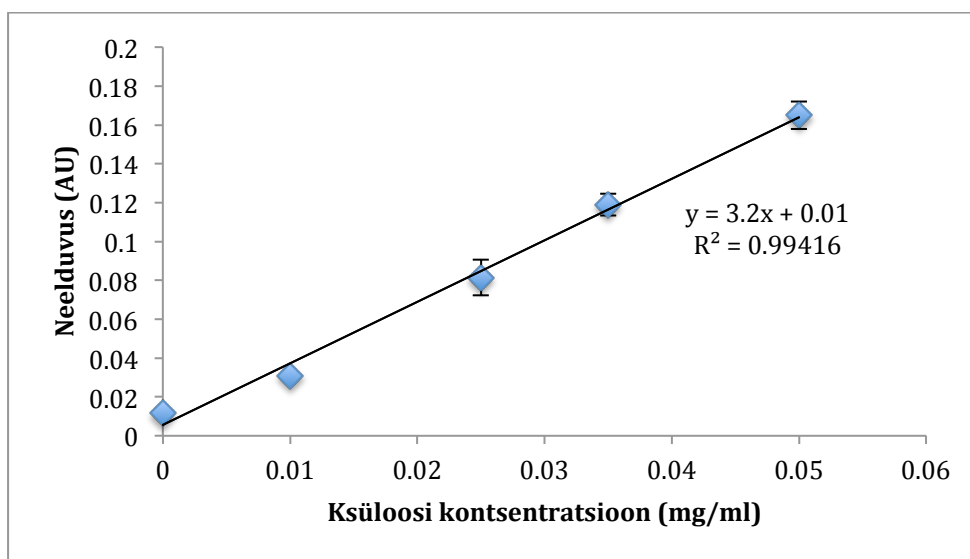
Joonis 5. Kalibreerimisgraafik tselluloosi kontsentratsiooni määramiseks. Tselluloosilahuse viskoossuse vähenemise mõõtmist kasutati tsellulaasi määramiseks. Kalibreerimisgraafik oli lineaarne tselluloosi kontsentratsioonidel 0 – 0,25%.

Joonisel 5 toodud kalibreerimisgraafiku alusel leitud tselluloosi määramispiir oli 0,14%.



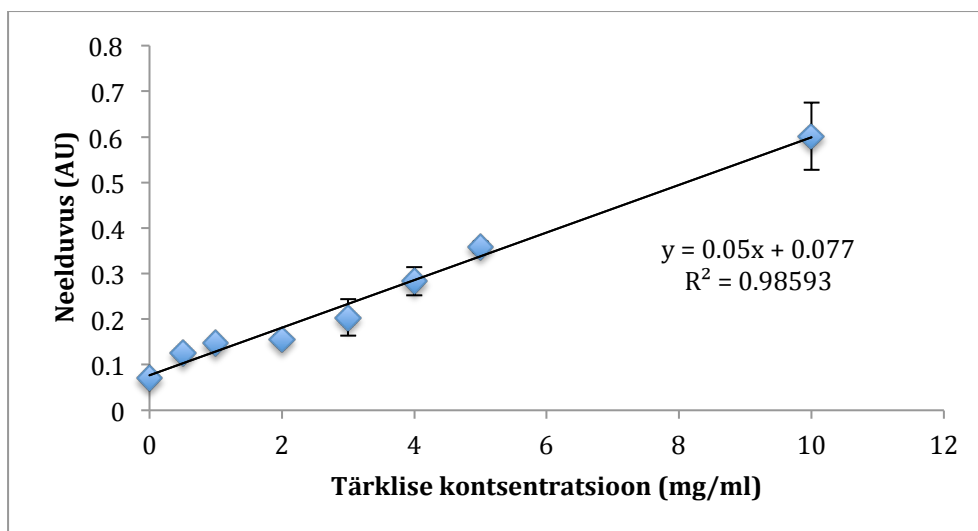
Joonis 6. Hemisellulaasi aktiivsuste määramise kalibreerimisgraafik. LBG viskoossuse vähenemise mõõtmist kasutati kasutati hemisellulaasi määramiseks. Kalibreerimisgraafik oli lineaarne LBG kontsentratsioonidel 0 – 0,0625%.

Joonisel 6 toodud kalibreerimisgraafiku alusel leitud LBG määramispiir oli 0,07%.



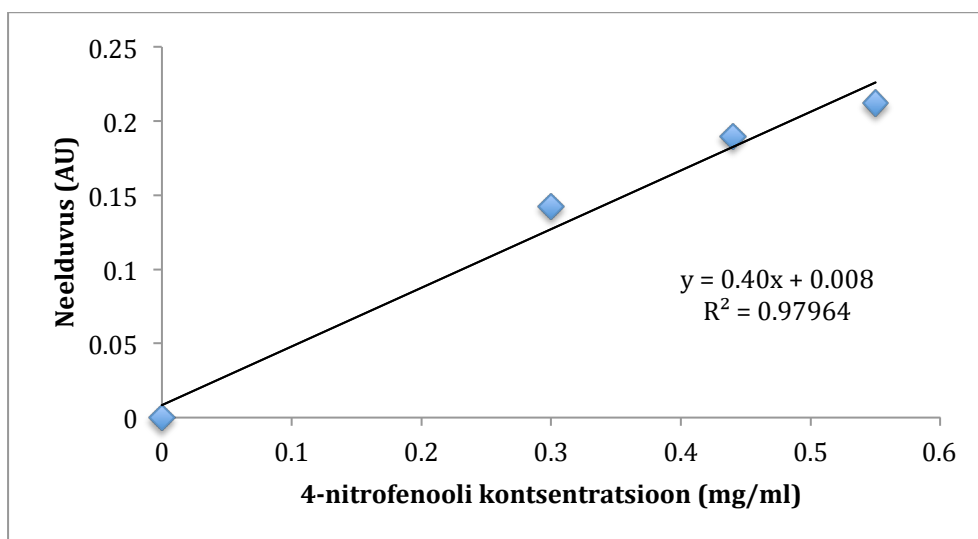
Joonis 7. Kalibreerimisgraafik ksüloosi kontsentratsiooni määramiseks. Ksüloosi spektrofotomeetrist määramist kasutati ksülanaasi aktiivsuse määramiseks. Kalibreerimisgraafik oli lineaarne vahemikus 0 – 0,05 mg/ml.

Joonisel 7 toodud kalibreerimisgraafiku alusel leitud ksüloosi määramispiir oli 0,03 mg/ml.



Joonis 8. Kalibreerimisgraafik tärklise kontsentratsiooni määramiseks. Tärklise spektrofotomeetrilist määramist kasutati amülaasi määramiseks. Kalibreerimisgraafik oli lineaarne tärklise kontsentratsioonidel 0 – 10 mg/ml.

Joonisel 8 toodud kalibreerimisgraafiku alusel leitud tärklise määramispiir oli 5,6 mg/ml.



Joonis 9. Kalibreerimisgraafik 4 - nitrofenooli kontsentratsiooni määramiseks. 4 - nitrofenooli spektrofotomeetrilist määramist kasutati amülaasi määramiseks. Kalibreerimisgraafik oli lineaarne 4 - nitrofenooli kontsentratsioonidel 0 – 10 mg/ml.

Joonisel 9 toodud kalibreerimisgraafiku alusel leitud 4-nitrofenooli määramispiir oli 0,12 mg/ml.

Kõiki saadud kalibreerimisgraafikuid kasutati lineaarses piirkonnas.

3.3 Ensümaatilise aktiivsuse määramine

Kõik ensüümide aktiivsuste mõõtmisel saadud tulemused on toodud ja analüüsitud preparaatide põhiselt.

3.3.1 Digest Basic

Digest Basic on toidulisand, mis on mõeldud tavatarbijale, kes soovib toetada oma seedimist [51]. Selle toote korral viidi analüüs läbi kahe erineval ajal toodetud partii preparaatides, mida oli hoiustatud toatemperatuuril sarnaselt hoiustamisele edasimüüja laos ning võrreldi ka ensümaatilise aktiivsuse muutumist toote säilitamisel. Toote infolehel on selle säilivusajaks märgitud 24 kuud.

Seedeensüümide aktiivsused toidulisandi Digest Basic erinevates partiides on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Seedeensüümide aktiivsused toidulisandis Digest Basic.

Ensüüm	Aktiivsuse ühik	Infolehel märgitud aktiivsus	Määratud 17 – 23 kuud pärast preparaadi tootmist	%	Määratud 11 – 17 kuud pärast preparaadi tootmist	%
Laktaas	ALU	300	211 ± 1	70 ± 0	322 ± 3	107 ± 1
Maltaas	DP°	100	86 ± 1	86 ± 1	86 ± 2	86 ± 2
Invertaas	SU	270	202 ± 9	75 ± 3	234 ± 5	87 ± 2
Glükoamülaas	AGU	10	8 ± 0	80 ± 0	8 ± 0	80 ± 0
Amülaas	DU	8 440	8064±232	96 ± 3	8542 ± 443	101 ± 5
Proteaas	HUT	20 000	6 600 ± 175	33 ± 0	7 200 ± 275	36 ± 0
Pektinaas	(Endo-PGU)	25	11 ± 2	44 ± 8	22 ± 1	88 ± 4
Tsellulaas	CU	500	649 ± 0	130 ± 0	665 ± 0	133 ± 0
Ksülanaas	XU	100	53 ± 1	53 ± 1	66 ± 2	66 ± 2
Lipaas	FIP	450	167 ± 2	37 ± 0	169 ± 1	38 ± 0

Nagu tabelist 3 näha, on preparaatide vastavus infolehele erinevate ensüümide korral erinev ning varieerub vahemikus 33 – 133 %. Võrreldes oodatavaga oli kõige madalam proteaasi aktiivsus, mis võib tuleneda sellest, et analüüsi käigus määrati proteaasne aktiivsus ainult kaseiini suhtes, kuna toote infolehel ei ole ensüümide nimetusi täpsustatud. Samas erinevate proteaaside substraatideks võivad olla ka hemoglobiin (pepsiin, EC 3.4.23.1) [52] või L-arginiin (trüpsiin, EC 3.4.21.4) [53]. Samuti oli madal ka lipaasi tulemus – alla 40%. Kõige suurem oli infolehega võrreldes tsellulaasi aktiivsus – 133%. Küllaltki hästi olid infolehega vastavuses glükoamülaas (80%) maltaas (86%), invertaas (87%) ning pektinaas (88%). Amülaasi ning laktaasi puhul leiti vastavus üle 100% - amülaas 101% ning laktaas 107%.

Võrreldes erinevate ensüümide aktiivsusi erineva vanusega preparaatides selgus, et õige rohkem vähenes ajas pektinaasi aktiivsus (7 ühikut/kuus), samas kui maltaasi aktiivsus praktiliselt ei muutunud. Vähenenud on ka laktaasi, invertaasi ning ksülanaasi aktiivsused. Proteaasi aktiivsus on muutunud ajas vähe ning glükoamülaasi puhul on aktiivsus jäänud samale tasemele. Ka teiste seedeensüümide puhul märgatavat aktiivsuse vähenemist ei leitud. Võrreldes saadud tulemusi erineva vanusega preparaatides, võib hinnanguliselt öelda, et ensüümide aktiivsuste muutused preparaadi säilitamisel olid väheolulised. Saadud tulemused on hästi kooskõlas ka üldvalgu mõõtmise tulemustega, mille alusel selgus, et ka valgu sisaldus Digest Basic preparaadi seismisel oluliselt ei vähenenud (vähenemine oli 5%)

3.3.2 Digest Gold

Digest Gold on toidulisand, mis on mõeldud inimestele, kellel esineb erinevaid terviseprobleeme (mitte ilmtingimata seedimisalaseid) [54]. Toote Digest Gold korral viidi analüüs läbi samuti kahe erineva partii preparaatides, mille tootmisest oli analüüsi tegemise ajaks möödunud 28 - 34 ja 10 - 16 kuud ja mida oli hoiustatud toatemperatuuril sarnaselt hoiustamisele edasimüüja laos, et hinnata ka ensümaatilise aktiivsuse muutumist toote säilitamisel. Toote säilivusaeg on 24 kuud. Seega oli Digest Gold varasem partii juba analüüsides alguseks oma säilivusaja ületanud.

Seedeensüümide aktiivsused toidulisandi Digest Gold erinevates partiides on toodud tabelis 5.

Tabel 5. Seedeensüümide aktiivsused toidulisandis Digest Gold.

Ensüüm	Aktiivsuse ühik	Infolehel märgitud aktiivsus	Määratud 28 - 34 kuu pärast preparaadi tootmist	%	Määratud 10 - 16 kuu pärast preparaadi tootmist	%
Laktaas	ALU	900	302 ± 15	34 ± 2	740 ± 7	82 ± 1
Maltaas	DP ^o	200	120 ± 6	60 ± 3	162 ± 3	81 ± 2
Invertaas	SU	240	183 ± 3	76 ± 1	197 ± 3	82 ± 1
Glükoamülaas	AGU	50	36 ± 1	72 ± 2	41 ± 0	82 ± 0
Amülaas	DU	23 000	800 ± 80	3 ± 0	1480 ± 554	6 ± 2
Proteaas	HUT	80 000	10500 ± 75	13 ± 0	12000 ± 50	15 ± 0
Pektinaas	(Endo-PGU)	45	7 ± 1	16 ± 2	16 ± 1	36 ± 2
Tsellulaas	CU	3 000	3292 ± 0	110 ± 0	3595 ± 0	120 ± 0
Hemitsellulaas	HCU	30	35 ± 0	117 ± 0	35 ± 0	117 ± 0
Ksülanaas	XU	550	275 ± 8	50 ± 1	335 ± 12	61 ± 2
Lipaas	FIP	4 000	2087 ± 21	52 ± 1	2581 ± 21	65 ± 1

Nagu tabelist 5 näha, on preparaatide vastavus infolehele erinevate ensüümide osas erinev ning varieerub vahemikus 3 – 120 %. Võrreldes oodatavaga oli kõige madalam amülaasi aktiivsus, samas kui preparaadi Digest Basic korral vastas see toote infolehel toodule. Samuti on Digest Gold-is madal ka proteaasi aktiivsus. Mõlema ensüümi puhul on infolehel toodud ka Thera segu kasutamine. Erinevalt Basic seeria toodetest on Goldi puhul madal ka pektinaasi aktiivsus. Suurimad olid võrreldes infolehega tsellulaasi ning hemitsellulaasi – aktiivsused – 120 ning 117%.

Võrreldes erinevate ensüümide aktiivsusi erineva vanusega preparaatides selgus, et õige rohkem vähenes ajas laktaasi aktiivsus (8 ühikut/kuus). Samas kui invertaasi aktiivsus praktiliselt ei muutunud. Vähenesid on ka maltaasi, ksülanaasi ning pektinaasi aktiivsused – ligikaudu 20% - ja glükoamülaasi aktiivsus 10% võrra.

Teiste ensüümide aktiivsus oli ajas muutunud vähe. Seega võib öelda, et säilivusaja ületades hakkab enamiku ensüümide aktiivsus vähenema.

3.3.3 Digest Spectrum

Digest Spectrum toidulisand on mõeldud inimestele, kellel esineb toidutundlikkust või sellest tulenevaid tervisemuresid, samas sobib Digest Spectrum ka seedimise toetamiseks neile, kelle jaoks pole Digest Basicu toote toime piisav [55]. Toote Digest Spectrum korral viidi analüüs läbi ühe partii preparaates, mille tootmisest oli analüüsi tegemise ajaks möödunud 10-16 kuud ja mida oli hoiustatud toatemperatuuril sarnaselt hoiustamisele edasimüüja laos. Toote säilivusaeg on 24 kuud.

Seedeensüümide aktiivsused toidulisandis Digest Spectrum on toodud tabelis 6. Kuna toote infolehel on seedeensüümide aktiivsused toodud 2 kapsli kohta, siis alljärgnevas tabelis on need aktiivsused toodud 1 kapsli kohta, ehk jagatud kahega.

Tabel 6. Seedeensüümide aktiivsused toidulisandis Digest Spectrum.

Ensüüm	Aktiivsuse ühik	Infolehel märgitud aktiivsus	Määratud 10-16 kuu pärast preparaadi tootmist	%
Laktaas	ALU	1000	1265 ± 12	127 ± 1
Maltaas	DP°	100	89 ± 2	89 ± 2
Invertaas	SU	75	67 ± 1	89 ± 1
Glükoamülaas	AGU	20	33 ± 0	165 ± 0
Amülaas	DU	7000	7544 ± 83	108 ± 1
Proteaas	HUT	49 000	11200 ± 350	23 ± 1
Pektinaas	(Endo-PGU)	25	28 ± 1	112 ± 4
Tsellulaas	CU	200	294 ± 0	147 ± 0
Hemitsellulaas	HCU	25	47 ± 0	188 ± 0
Ksülanaas	XU	10 000	7506 ± 238	75 ± 2
Lipaas	FIP	458	120 ± 4	26 ± 1

Nagu tabelist 6 selgub, varieerub preparaadi vastavus infolehel toodud erinevate ensüümide aktiivsustele ja on vahemikus 23 – 127 %. Sarnaselt eelmistele toodetele, on ka Digest Spectrumi puhul madal proteaasi aktiivsus, mis nagu eelnevalt juba mainitud, võib tuleneda ainult ühe standardsubstraadi valimisest. Seevastu on maltaasi ning invertaasi vastavused infolehes toodutele head – 89 %. Ka amülaasi ning hemitsellulaasi puhul on vastavus infolehega hea – neid oli vastavalt 108 ning 104%. Laktaasi, glükoamülaasi, tsellulaasi, hemitsellulaasi ning pektinaasi ensümaatilised aktiivsused ületasid infolehel toodud andmed oluliselt ning hemitsellulaas oli kuni 88% märgitust rohkem. Seega võib öelda, et ensüümide aktiivsused tootes Digest Spectrum on oma säilivusaja keskel heas vastavuses infolehega või isegi üle eeldatava.

3.3.4 Digest + Live Bacteria

Digest + Live Bacteria on toidulisand, mis on mõeldud eelkõige inimestele, kes on juba eelnevalt seedeensüüme tarbinud (nt toodet Digest Basic), sest tegemist on üsna kõrgete seedeensüümide kontsentratsioonidega (võrreldes tootega Digest Basic on 1 kapsli seedeensüümide aktiivsused keskmiselt poole suuremad). Lisaks annustatakse iga toidukorraga piimhappebaktereid (*Lactobacillus*) ehk keskmiselt kolm korda päevas (võrreldes spetsiaaltoodetega, kus annustamine toimub ainult kuni 2 korda ööpäevas) [56]. Toote Digest + Live Bacteria korral viidi analüüs läbi ühe partii preparaatides, mille tootmisest oli analüüsi tegemise ajaks möödunud 9 - 15 kuud ja mida oli hoiustatud toatemperatuuril sarnaselt hoiustamisele edasimüüja laos. Erinevalt teistest toodetest, mille säilivusaeg on 24 kuud, on Digest + Live Bacteria toote säilivusaeg 18 kuud.

Seedeensüümide aktiivsused toidulisandis Digest + Live Bacteria on toodud tabelis 7.

Tabel 7. Seedeensüümide aktiivsused toidulisandis Digest + Live Bacteria.

Ensüüm	Aktiivsuse ühik	Infolehel märgitud aktiivsus	Määratud 9 - 15 kuu pärast preparaadi tootmist	%
Laktaas	ALU	500	302 ± 6	60 ± 1
Maltaas	DP°	150	110 ± 2	73 ± 1
Invertaas	SU	120	88 ± 2	73 ± 2
Glükoamülaas	AGU	25	21 ± 2	84 ± 8
Amülaas	DU	12 000	10081 ± 242	84 ± 2
Proteaas	HUT	42 000	12000 ± 275	29 ± 1
Pektinaas	(Endo-PGU)	35	19 ± 1	70 ± 3
Tsellulaas	CU	1250	1622 ± 0	130 ± 0
Hemitsellulaas	HCU	15	42 ± 0	167 ± 0
Ksülanaas	XU	250	177 ± 2	71 ± 1
Lipaas	FIP	1500	494 ± 2	33 ± 0

Nagu tabelist 7 näha, on preparaatide vastavus infolehele erinevate ensüümide osas erinev ning varieerub vahemikus 29 – 167 %. Sarnaselt eelmistele toodetele, on ka Digest + Live Bacteria puhul madal proteaasi aktiivsus. Maltaasi, invertaasi, ksülanaasi ning pektinaasi aktiivsused jäävad 70% lähedale ning laktaasi aktiivsus on 60%. Tsellulaasi ning hemitsellulaasi aktiivsused aga ületasid infolehel toodud aktiivsused tunduvalt – vastavalt 130% ning 167%. Amülaasi ning glükoamülaasi puhul oli vastavused infolehele head – 84%.

3.3.5 Digest Kids

Digest Kids on lastele mõeldud toidulisand [57]. Toote Digest Kids korral viidi analüüs läbi ühe partii preparaatides, mille tootmisest oli analüüsi tegemise ajaks möödunud 21 – 27 kuud ja mida oli hoiustatud toatemperatuuril sarnaselt hoiustamisele edasimüüja laos ning võrreldi ka ensümaatilise aktiivsuse muutumist toote säilitamisel. Toote säilivusaeg on 24 kuud. Seega ületas toode viimaste analüüsides teostamise ajal oma säilivusaja.

Seedeensüümide aktiivsused toidulisandis Digest Kids on toodud tabelis 8.

Tabel 8. Seedeensüümide aktiivsused toidulisandis Digest Kids.

Ensüüm	Aktiivsuse ühik	Infolehel märgitud aktiivsus	Määratud 21 – 27 kuu pärast preparaadi tootmist	%
Laktaas	ALU	300	306 ± 2	102 ± 1
Maltaas	DP°	75	67 ± 2	90 ± 3
Invertaas	SU	100	72 ± 1	72 ± 1
Glükoamülaas	AGU	10	7 ± 0	70 ± 0
Amülaas	DU	7000	7152 ± 433	102 ± 6
Proteaas	HUT	15 000	500 ± 250	3 ± 2
Pektinaas	(Endo-PGU)	20	6 ± 1	30 ± 5
Tsellulaas	CU	250	332 ± 0	133 ± 0
Ksülanaas	XU	100	62 ± 2	62 ± 2
Lipaas	FIP	350	90 ± 2	26 ± 1

Nagu tabelist 8 näha, on preparaatide vastavus infolehele erinevate ensüümide osas erinev ning varieerub vahemikus 3 – 133 %. Sarnaselt eelmistele toodetele, on ka Digest Kids puhul madal proteaasi aktiivsus. Laktaasi, amülaasi ning maltaasi puhul on aktiivsused heas vastavuses infolehel tooduga – maltaas 90% ja laktaas ning amülaas koguni 102%. Invertaasi, glükoamülaasi ning ksülanaasi vastavused on juba väiksemad – 72%, 70% ja 62% - ning pektinaasi aktiivsus veel väiksem – kõigest 30%. Suhteliselt madalad aktiivsused võivad tuleneda ka sellest, et nende ensüümide määramise ajaks oli toode oma säilivusaja ületanud.

3.6 Tulemuste koondtabel

Tabelis 9 on kokkuvõtlikult toodud kõik suurused, mis määrati käesolevas töös erinevates toidulisandite preparaatides.

Tabel 9. Toote vastavus infolehel olevale informatsioonile

	Basic 17–23 kuud	Basic 11–17 kuud	Gold 28–34 kuud	Gold 10 –16 kuud	Bacteria 9 – 15 kuud	Spectrum 10 – 16 kuud	Kids 21 – 27 kuud
Kapsli mass(mg)	261.3± 4.8	260.6± 10.9	481.5± 14.1	483.6± 5.9	251.1± 3.9	516.5± 17.4	634.9± 5.1
Valgusisaldus (%)	42	47	67	66	74	34	19
Laktaas(%)	70	107	34	82	60	127	102
Maltaas(%)	86	86	60	81	73	89	90
Invertaas(%)	75	87	76	82	73	89	72
Glükoamülaas(%)	80	80	72	82	84	165	70
Amülaas(%)	96	101	3	6	84	108	102
Proteaas(%)	33	36	13	15	29	23	3
Pektinaas(%)	44	88	16	36	70	112	30
Tsellulaas(%)	130	133	110	120	130	147	133
Hemitsellulaas(%)	-	-	117	117	167	188	-
Ksülanaas(%)	53	66	50	61	71	75	62
Lipaas(%)	37	38	52	65	33	26	26

Kokkuvõte

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli määrata seedeensüümide aktiivsused ja kontrollida erinevate ensüümide korral nende sisalduse vastavust infolehes toodule Enzymedica OÜ poolt turustatavates Enzymedica toidulisandi preparaatides. Määrati viie erineva preparaadi aktiivsused, millest kahe puhul viidi määramine läbi kahe erineval ajal toodetud partii preparaatides.

Kõigepealt määrati üldine valgusisaldus preparaatides Lowry meetodiga. Preparaatide valgusisaldus jäi vahemikku 19 – 74%.

Kõikide preparaatide puhul oli näha, et proteaasi aktiivsus on, võrreldes infolehel tooduga, madal – kõigest 3 – 36%. See võib tuleneda sellest, et analüüsi käigus määrati proteaasne aktiivsus ainult kaseiini suhtes, kuna toote infolehel ei ole ensüümide nimetusi täpsustatud, vaid on kasutatud mõistet “Thera segu”. Kuna tegemist võiks olla erinevate proteaaside seguga, siis võiks proteaasse aktiivsuse määrata ka hemoglobiini ning L – arginiini suhtes.

Seevastu oli tsellulaasi aktiivsus ühtlaselt kõrge – 110 kuni 147%. Ka tsellulaasi puhul on märgitud infolehel, et kasutatud “Thera segu”, kuid ilmselt ei ole lahuse viskoossuse muutuse juures oluline, millist tsellulaasi kasutatud on. Seda näitavad ka hemitsellulaasi kõrged tulemused.

Preparaatidest on infolehele heas vastavuses preparaat Digest Spectrum. Samuti on heas vastavuses ka Digest Basic toode. Mõlema toote valgusisaldus on suhteliselt madal - alla 50%.

Seedeensüümide aktiivsuste vastavus infolehele on kõige madalam Digest Gold seeria toodetes. Digest Gold seeria toodete puhul on tegemist kõige kontsentreerituma tootega, ehk eeldatav ensüümide aktiivsus on nendes toodetes kõige suurem. Ning ka määramisega saavutati Digest Gold preparaatide puhul kõrgeimad aktiivsused, kuid siiski ei olnud need enamasti väga heas vastavuses infolehega. Samuti on selle seeria näol märgata aktiivsuste vähenemist aja jooksul.

Antud töö üheks oluliseks tulemuseks on ka uute määramismetoodikate, mis põhinevad suhkrute hüdrolyüsil tekkiva glükoosi määramisel hapnikuanduril

põhineva biosensoriga, kasutamine maltaasi, invertaasi ja glükoamülaasi aktiivsuste määramiseks.

Kasutatud kirjandus

- 1 Food supplements | European Food Safety Authority.
<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-supplements> viimati alla laetud 20.05.2019
- 2 European Commission. Food supplements.
https://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/supplements_en viimati alla laetud 20.05.2019
- 3 Bohager, T. Plant-Based vs. Animal-Sourced Enzymes. Everything You Need to Know about Enzymes (2009), lk 21–25.
- 4 Enzymedica, Inc.: Private Company Information - Bloomberg.
<https://www.bloomberg.com/research/stocks/private/snapshot.asp?privcapId=22121963> viimati alla laetud 26.05.2019
- 5 BRENDA - EC Explorer.
[https://www.brendaenzymes.org/ecexplorer.php?browser=1&f\[nodes\]=170&f\[action\]=open&f\[change\]=192](https://www.brendaenzymes.org/ecexplorer.php?browser=1&f[nodes]=170&f[action]=open&f[change]=192) viimati alla laetud 20.05.2019
- 6 Paper, W., View, T., Lehmann, C. Hydrolytic Enzymes : Amylases , Proteases , Lipases (2016) 0–4.
- 7 Printsman, G. Bensüülpenitsilliini mõju uurimine β -galaktosidaasi aktiivsusele (2015).
- 8 Järvelä, I., Torniainen, S., Kolho, K. L. Molecular genetics of human lactase deficiencies. Ann. Med. (2009).
- 9 Deng, Y., Misselwitz, B., Dai, N., Fox, M. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. Nutrients (2015) 7, 8020–8035.
- 10 Bayless, T. M., Brown, E., Paige, D. M. Lactase Non-persistence and Lactose Intolerance.
- 11 Saqib, S., Akram, A., Halim, S. A., Tassaduq, R. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. 3 Biotech (2017), Springer 7, 79.
- 12 Gurram, B. Maltase-Glucoamylase. Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis (2018), lk 182–203.
- 13 BRENDA - Information on EC 3.2.1.20 - alpha-glucosidase.
<https://www.brendaenzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.20&onlyTable=Reference> viimati alla laetud 25.05.2019

- 14 EC 3.2.1.1.
<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/2/1/1.html> viimati alla laetud 25.05.2019
- 15 Neumann, N. P., Lampen, J. O. Purification and properties of yeast invertase. *Biochemistry* (**1967**, veebruar).
- 16 Elizabeth LaBau. What Is Invertase and How Is It Used?
<https://www.thespruceeats.com/what-is-invertase-520344> viimati uuendatud 05.01.2019
- 17 Kulshrestha, S., Tyagi, P., Sindhi, V., Yadavilli, S. Invertase and its applications e A brief review. *JOPR J. Pharm. Res.* (**2013**) 7, 792–797.
- 18 Pavezzi, F. C., Gomes, E., Da Silva, R. Production and characterization of glucoamylase from fungus *Aspergillus awamori* expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using different carbon sources. *Brazilian J. Microbiol.* (**2008**) 39, 108–114.
- 19 Mojsov, K. D. *Aspergillus Enzymes for Food Industries* (**2016**).
- 20 Mukesh M., Andleeb Z., Manish. K. D., Mohd A. and Ram. S. Chapter 9 - *Penicillium Enzymes for the Food Industries. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (**2018**), lk 167–186.
- 21 Edward Group. *The Health Benefits of Hemicellulase* (**2015**).
<https://www.globalhealingcenter.com/natural-health/health-benefits-of-hemicellulase/#references> viimati uuendatud 05.10.2015
- 22 M. Yapo, B. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. *Carbohydr. Polym. - CARBOHYD POLYM* (**2011**).
- 23 K.D. Mojsov. Pectinase - an overview | *ScienceDirect Topics* (**2016**).
<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/pectinase> viimati alla laetud 26.05.2019
- 24 IUBMB Enzyme Nomenclature - EC 3.2.1.8.
<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/2/1/8.html> viimati alla laetud 26.05.2019
- 25 Jeffrey S. Tolan, C. P. Xylanase. *Biotechnol. Microb. Enzym.* (**2017**).
- 26 Oda, K. JB Review New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *J. Biochem.* (**2012**) 151, 13–25.

- 27 Mazorra-Manzano, M. A., Ramírez-Suarez, J. C., Yada, R. Y. Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2018), Taylor & Francis 58, 2147–2163.
- 28 Rosales, E., Pazos, M., Ángeles Sanromán, M. Solid-State Fermentation for Food Applications. *Curr. Dev. Biotechnol. Bioeng.* (2018), Elsevier 319–355.
- 29 Labuda, J., Bowater, R. P., Fojta, M., Gauglitz, G., Glatz, Z., Hapala, I., Havliš, J., Kilar, F., Kilar, A., ... Hibbert, D. B. IUPAC Recommendations Terminology of bioanalytical methods (IUPAC Recommendations 2018). *Pure Appl. Chem.* (2018) 90, 1121–1198.
- 30 Food Chemicals Codex (FCC) | FCC | Online.
<https://www.foodchemicalscodex.org/> viimati uuendatud 01.03.2019
- 31 Enzyme Labels.
https://www.enzymeessentials.com/shop/enzyme_labels.html viimati alla laetud 25.05.2019
- 32 Deerland Enzymes, I. Enzyme Assay Units.
https://www.deerland.com/wp-content/uploads/2015/04/EnzymeAssayUnits_Deerland.pdf viimati alla laetud 28.05.2019
- 33 ASA Spezialenzyme GmbH. Technical enzymes Product information Invertase 200.000.
- 34 Enzymedica. Thera-blend - Enzymedica seedeensüümid.
<https://www.enzymedica.ee/et/p/thera-blend> viimati alla laetud 26.05.2019
- 35 Enzymedica. Benefit of Thera-Blend – Enzymedica.
<https://enzymedica.com/pages/benefit-of-thera-blend> viimati alla laetud 26.05.2019
- 36 Santamaría, A. Viscosimetry of Polymers and Polyelectrolytes. *Macromol. Chem. Phys.* (2005).
- 37 Nam Sun Wang. Starch Hydrolysis by Amylase.
<https://user.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab5.htm> viimati alla laetud 25.05.2019
- 38 Leksmono, C. S., Manzoni, C., Tomkins, J. E., Lucchesi, W., Cottrell, G., Lewis, P. A. Measuring Lactase Enzymatic Activity in the Teaching Lab. *J. Vis. Exp* (2018) 54377.
- 39 Sigma-Aldrich. Enzymatic Assay of α -Amylase (EC 3.2.1.1).

- <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-a-amylase.html> viimati alla laetud 25.05.2019
- 40 SigmaAldrich. Enzymatic Assay of PECTINASE. Time. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/p2401enz.pdf viimati alla laetud 17.05.2019
- 41 Sigma-Aldrich. Enzymatic Activity Assay Kits. <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/cell-biology-products.html?TablePage=112668420> viimati alla laetud 26.05.2019
- 42 Megazyme Inc. All Assay Kits. <https://secure.megazyme.com/assay-kits/all-assay-kits> viimati alla laetud 26.05.2019
- 43 Cellular and Biochemical Assay Kits. <https://www.abcam.com/kits/cellular-and-biochemical-assay-kits-faq#Sam> viimati alla laetud 26.05.2019
- 44 Redmile-Gordon, M. A., Armenise, E., White, R. P., Hirsch, P. R., Goulding, K. W. T. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biol. Biochem.* (2013), Elsevier 67, 166–173.
- 45 Bioseparation Technology Laboratory. Estimation of protein by Lowry's method. <http://www.srmuniv.ac.in/sites/default/files/files/BT-0413-BioseparationTechnologyLaboratory.pdf> viimati alla laetud 25.05.2019
- 46 Sigma-Aldrich. 47641 Folin-Ciocalteu's phenol reagent. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/47641dat.pdf> viimati alla laetud 25.05.2019
- 47 Cupp-Enyard, C. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *J. Vis. Exp.* (2008) 2–4.
- 48 Sigma-Aldrich. Enzymatic Assay of Xylanase. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/xylanase.pdf viimati alla laetud 26.05.2019
- 49 Ramnath, L., Sithole, B., Govinden, R. Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in

- the pulping industry. *Biotechnol. Reports* (2017), Elsevier 15, 114–124.
- 50 Iodometry. Titration with Sodium Thiosulfate 6–7.
- 51 Enzymedica OÜ. Digest Basic - Enzymedica seedeensüümid.
<https://www.enzymedica.ee/et/a/digest-basic> viimati alla laetud 20.05.2019
- 52 Sigma-Aldrich. Enzymatic Assay of Pepsin (3.4.23.1).
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-pepsin.html> viimati alla laetud 21.05.2019
- 53 Sigma-Aldrich. Procedure for Enzymatic Assay of Trypsin (EC 3.4.21.4).
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-trypsin.html> viimati alla laetud 21.05.2019
- 54 Enzymedica. Digest Gold.
<https://enzymedica.com/products/digest-gold-enzymes-digestive-enzyme> viimati alla laetud 20.05.2019
- 55 Enzymedica OÜ. Digest Spectrum.
<https://www.enzymedica.ee/et/a/digest-spectrum> viimati alla laetud 20.05.2019
- 56 Enzymedica OÜ. Digest+Live Bacteria.
<https://www.enzymedica.ee/et/a/digest-live-bacteria> viimati alla laetud 20.05.2019
- 57 Enzymedica. Digest Kids.
<https://enzymedica.com/products/kids-digest> viimati alla laetud 20.05.2019

Enzymatic activity assay of dietary supplements

Lennar Laasik

Summary

People's eating habits are constantly changing and we are increasingly consuming processed foods or one-sided diet. There is a widespread fear, that we do not get enough of all the necessary nutrients from our food anymore. This has led to increased interest in food supplements, including digestive supplements.

The purpose of the current work was to determine the activity of digestive enzymes in food supplements produced by Enzymedica and marketed by Enzymedica OÜ and to check their compliance with the information in the leaflet for various enzymes. The activities of five different supplements were determined, two of which were subjected to two batches of supplements.

Various methods were used to determine the activities of different digestive enzymes. Spectrometry was used to determine the activities of amylase, protease, xylanase and lipase. Viscosimetry was used to determine the activities of cellulase and hemicellulase. Iodometric titration was used to determine the activity of pectinase. Total level of protein was determined by using the Lowry protein assay method. One of the important outcomes of this work was the use of new detection techniques, based on the determination of glucose resulting from the hydrolysis of sugars with an oxygen sensor-based biosensor to determine maltase, invertase and glucoamylase activity.

First, the total level of protein was determined. The protein content of the supplements ranged from 19 to 74%.

Next, the activity of different digestive enzymes was determined. The activities of different digestive enzymes, resulting from the experimental studies, varied from 3-36% in proteases to 110-147% in cellulases.

From the studied supplements, Digest Spectrum and Digest Basic were in good accordance with the information brought in the leaflet. Both supplements total level of protein was relatively low – both being under 50%. With the lowest accordance to the information brought in the leaflet was the supplement Digest Gold.

which was the most concentrated supplement and with the highest expected digestive enzyme activities. The highest levels of activity were actually achieved with Digest Gold preparations, but as a rule these were not in very good accordance to the leaflet. Digest Gold supplements also show a decrease in activity over time.

Infoleht

Ensümaatilise aktiivsuse määramine seedimist toetavates toidulisandites

Antud töös uuriti Enzymedica poolt toodetavates seedimist soodustavates toidulisandites leiduvate seedeensüümide aktiivsusi ja hinnati nende vastavust toodete infolehtedele. Analüüside läbiviimiseks kasutati erinevaid laboratoorseid meetodeid. Töö tulemusena selgus, et kõik analüüsitud seedeensüümid omasid toidulisandis aktiivsusi, mis jäid vahemikku 3–188% võrreldes toodete infolehel olevate väärtustega. Parim kokku langevus saavutati preparaatidega Digest Basic ning Digest Spectrum.

Märksõnad:Analüüs, toidulisand, seedeensüümid, ensüümide aktiivsuste määramine.

Enzymatic activity assay of dietary supplements

In this study the digestive enzyme activities found in Enzymedica's digestive supplements were studied and their compliance with product information leaflets was evaluated. Various laboratory methods were used to perform the activity assays. As a result of the work, it was found that all analyzed digestive enzymes had activities in the diet supplement ranging from 3–188% compared to the values in the product leaflet. The best accordance with the information brought in the leaflet was achieved with supplements Digest Basic and Digest Spectrum.

Keywords: Analysis, food supplement, digestive enzymes, enzymatic activity assay.

Lisa 1. Toidulisandi Digest Basic infoleht

Sisaldus päevase annuse kohta	1 kapslis*	3 kapslis*
proteaas (<i>Thera -segu</i> TM)	20,000 HUT	60,000 HUT
amülaas (<i>Thera -segu</i> TM)	8,440 DU	25,320 DU
pektinaas	25 Endo-PGU	75 Endo-PGU
maltaas	100 DP°	300 DP°
tsellulaas (<i>Thera -segu</i> TM)	500 CU	1500 CU
glükoamülaas	10 AGU	30 AGU
alfa-galaktosidaas	50 GalU	150 GalU
laktaas	300 ALU	900 ALU
lipaas (<i>Thera -segu</i> TM)	450 FCCFIP	1350 FCCFIP
invertaas	270 SU	810 SU
ksülanaas	100 XU	300 XU

*Ensüümide aktiivsuse mõõtmiseks kasutatavad lühendid.

Lisa 2. Toidulisandi Digest Gold infoleht

Supplement Facts		
Serving Size: 1 Capsule		
Servings Per Container: 90		
Amount Per Serving		%DV
Amylase <i>Thera-blend™</i>	23,000 DU	**
Protease <i>Thera-blend™</i>	80,000 HUT	**
Glucoamylase	50 AGU	**
ATPro™	25 mg - 300 Million LCU	**
<i>(ATP, Magnesium citrate, Alpha Lipoic Acid, CoQ10)</i>		
Alpha Galactosidase	450 GalU	**
Cellulase <i>Thera-blend™</i>	3,000 CU	**
Lipase <i>Thera-blend™</i>	4,000 FCCFIP	**
Lactase	900 ALU	**
Beta Glucanase	25 BGU	**
Maltase	200 DP ^o	**
Xylanase	550 XU	**
Invertase	240 SU	**
Pectinase (w/ Phytase)	45 Endo-PGU	**
Hemicellulase	30 HCU	**
** Daily Value not established		

OTHER INGREDIENTS: 100% Vegetarian Capsule (cellulose, water)
CONTAINS NO egg, dairy, preservatives, salt, sucrose, soy, wheat, yeast, nuts, corn, gluten, casein, potato, rice, artificial colors or flavors.

Keep closed in dry place; avoid excessive heat.

Do not use if safety seal is broken or missing.
 Enzymedica does not use ingredients produced using biotechnology.

PLEASE KEEP OUT OF REACH OF CHILDREN



Lisa 3. Toidulisandi Digest Spectrum infoleht

Sisaldus päevase annuse kohta	2 kapslis*	6 kapslis*
DPP4	1400 DPPU	4200 DPPU
amülaas (<i>Thera-segu</i> TM)	14 000 DU	42 000 DU
ksülanaas	20 000 XU	60 000 XU
proteaas (<i>Thera-segu</i> TM)	98 000 HUT	294 000 HUT
alfa-galaktosidaas	600 GalU	1800 GalU
glükoamülaas	40 AGU	120 AGU
laktaas	2000 ALU	6000 ALU
lipaas (<i>Thera-segu</i> TM)	916 FCCFIP	2748 FCCFIP
maltaas	200 DP	600 DP
tsellulaas (<i>Thera-segu</i> TM)	400 CU	1200 CU
invertaas	150 SU	450 SU
pektinaas	50 Endo-PGU	150 Endo-PGU
hemitsellulaas	50 HCU	150 HCU

* Ensüümide aktiivsuse mõõtmiseks kasutatavad lühendid.

Lisa 4. Toidulisandi Digest + Live Bacteria infoleht

Sisaldus päevase annuse kohta	1 kapslis*	3 kapslis*
amülaas (<i>Thera-segu</i> TM)	12 000 DU	36 000 DU
proteaas (<i>Thera-segu</i> TM)	42 000 HUT	126 000 HUT
glükoamülaas	25 AGU	75 AGU
tsellulaas (<i>Thera-segu</i> TM)	1250 CU	3750 CU
lipaas (<i>Thera-segu</i> TM)	1500 FCCFIP	4500 FCCFIP
alfa-galaktosidaas	125 GalU	375 GalU
laktaas	500 ALU	1500 ALU
maltaas	150 DP	450 DP
ksülanaas	250 XU	750 XU
invertaas	120 SU	360 SU
pektinaas	35 Endo-PGU	105 Endo-PGU
hemitcellulaas	15 HCU	45 HCU
piimhappebakterite segu (<i>Lactobacillus acidophilus</i> DDS-1, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i>)	4.0 x 10 ⁸ CFU**	1.2 x 10 ⁹ CFU

* Ensüümide aktiivsuse mõõtmiseks kasutatavad lühendid.

** Kolooniaid moodustav ühik, piimhappebakterite mõõtmiseks kasutatav ühend.

Lisa 5. Toidulisandi Digest Kids infoleht

Supplement Facts		
Serving Size: 1 Tablet		
Servings Per Container:		
Amount Per Serving		%DV[†]
Total Carbohydrate	Less than 1 g	< 1%
Sugars	0 g	* *
Xylitol	0.5 g	* *
Amylase <i>Thera-blend™</i>	7,000 DU	* *
L-leucine	30 mg	* *
Protease <i>Thera-blend™</i>	15,000 HUT	* *
Glucoamylase	10 AGU	* *
Lactase	300 ALU	* *
Alpha Galactosidase	30 GalU	* *
Cellulase <i>Thera-blend™</i>	250 CU	* *
Lipase <i>Thera-blend™</i>	350 FIP	* *
Maltase	75 DP [°]	* *
Xylanase	100 XU	* *
Invertase	100 SU	* *
Pectinase	20 Endo-PGU	* *
[†] Percent Daily Values are based on a 2,000 calorie diet ²³ * * Daily Value not established		

Other Ingredients: organic tapioca dextrose, inulin, organic stevia, citric acid, beet juice, natural fruit punch flavor, organic rice concentrate, organic plant-based coating (organic tapioca maltodextrin, organic sunflower lecithin, organic palm oil, organic guar gum).

Contains No: egg, dairy, preservatives, salt, soy, wheat, yeast, nuts, corn, gluten, casein, potato, artificial colors or flavors

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Lennar Laasik,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Ensümaatilise aktiivsuse määramine seedimist toetavates toidulisandites

mille juhendaja on Toonika Rinke,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **29.05.2022** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Lennar Laasik
29.05.2019