

# Enzymatické procesy v lyofilizovaných potravinách★

I. STEIN, F. KLEMPOVÁ, I. GRAJCIAR

V poslednej dobe sa venuje zvýšená pozornosť konzervovaniu potravín sublimačným sušením, lyofilizáciou.

Lyofilizácia je proces, ktorý sa v podstate skladá z dvoch základných operácií: zo zmrazenia tekutého obsahu bunky a z odstránenia zmrazenej vody.

Zmrazenie hlboko zasahuje do stavu panujúceho v tekutom, polotekutom a rôsolovitom obsahu bunky, do protoplazmy, kde prebiehajú biochemické zmeny, ktorých ovplyvnenie (usmernenie) je cieľom konzervárenského priemyslu.

Prostredie, v ktorom sa tieto deje odohrávajú, je prostredie vodné. V týchto procesoch je hlavným činiteľom voda, pričom nie je ľahostajné v akom skupenstve sa nachádza. V kvapalnej fáze vody, resp. v bunečnej šťave, sú rozpustené alebo dispergované všetky efekторы biochemických a biologických pochodov bunky, teda aj enzýmy.

Z cca 700 dnes známych enzýmov, ktoré všetky majú význačnú úlohu v životných pochodoch bunky, sú z hľadiska konzervárenského priemyslu dôležité prakticky len hydrolázy, transferázy a oxidoreduktázy.

Hydrolázy sú skupinou enzýmov, ktoré katalyzujú hydrolytické reakcie, pri ktorých najdôležitejšiu úlohu hrá voda, resp. molekula vody. Ich pôsobenie pozostáva z urýchlenia (aktivovania) účinku vody a to tým, že rozkladajú molekuly substrátu a ich časť prenášajú na -OH skupinu vody. Preto aj transferázy sa považujú v podstate za hydrolázy. Oxidoreduktázy transferujú vodíkový atom, resp. elektrónové dvojice.

Predpokladom katalytického pôsobenia enzýmov, podľa dnešných názorov, je pohyblivosť molekúl enzýmov a pohyblivosť molekúl látok, ktorých rozklad urýchľujú — substrátov. Keď medzi molekulou enzýmu a substrátom dôjde k reakcii, vytvorí sa labilná zlúčenina enzým — substrát, ktorá sa rozkladá na výsledný produkt za súčasného uvoľnenia molekuly enzýmu, ktorý sa opäť zapojí do reakčného cyklu. Keď nedôjde k vzniku zlúčeniny enzým — substrát, nedochádza k enzymatickej katalýze, teda enzým nepôsobí.

Pohyblivosť a reakcia molekúl enzýmu a substrátu sú možné len v prostredí tekutom, polotekutom, prípadne rôsolovitom. Postupnou zmenou tekutého

\* Prednesené na konferencii ÚV Čs. VTS, Praha, 26. nov. 1964.

skupenstva na skupenstvo tuhé spomali sa pohyb molekúl enzýmu a substrátu, spomali sa priebeh enzymatických reakcií, až sa prakticky úplne zastaví.

Prvou fázou lyofilizačného procesu je zníženie teploty objektu, pričom postupne dochádza k vymrazeniu tekutého bunečného obsahu.

Medzi teplotou zmrazenia a medzi obsahom vody prítomnej v tekutej forme je úzka súvislosť. Tak vieme, že pri teplote  $-1,5^{\circ}$  až  $-2,0^{\circ}$  °C z celkového obsahu vody je 30 % v skupenstve pevnom, pri teplote  $-5^{\circ}$  °C je približne 70 % a pri teplote  $-25$  až  $-30^{\circ}$  °C asi 90–91 % vody premenenej do skupenstva pevného.

Najvýznačnejšou vlastnosťou enzýmov je ich citlivosť, labilita voči vonkajším zásahom ako napr. zmena pH, zmena teploty, pôsobenie cudzích zlúčenín, zmena koncentrácie prostredia, hlavne zmena obsahu vody v prostredí, v ktorom pôsobia.

Vonkajším výrazom týchto vplyvov je inhibícia, t. j. spomalenie priebehu reakcií, ktoré katalyzujú, až do prakticky úplného zastavenia priebehu.

#### Vplyv koncentrácie prostredia na aktivitu enzýmov

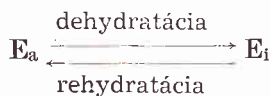
Znížením obsahu kvapalnej vody, menia sa postupne enzýmy aktívne na enzýmy inaktívne.



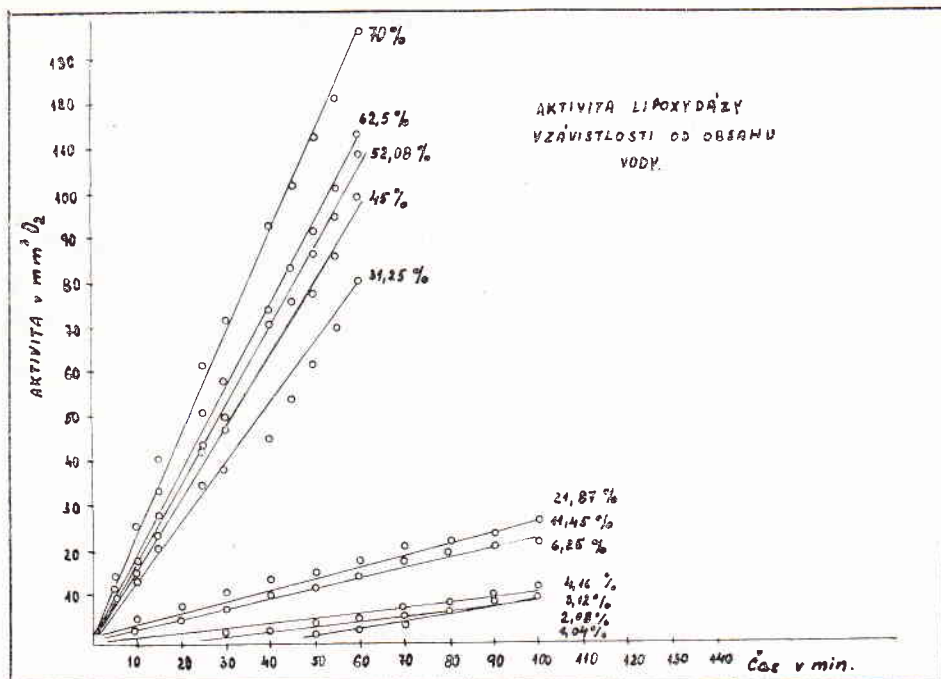
Čím menší je tekutý obsah bunky, tým väčšie množstvo enzýmov prechádza z aktívneho stavu do inaktívnej, inhibovanej, neúčinnnej formy, tým pomalšie prebiehajú nimi katalyzované reakcie a tým dlhšie možno chrániť potraviny pred skazou. A opačne, čím tekutejší je obsah bunky – až po určitú hranicu – tým viac inhibovaných enzýmov prechádza do aktívneho stavu, tým rýchlejšie pôsobia a tým rýchlejšie sa potraviny kazia. Rehydratáciou dochádza teda k zmene vyššie uvedenej reakcie,



Konzervovanie lyofilizáciou možno teda z hľadiska enzymologického vyjadriť vzťahom



Vplyv obsahu vody reakčného prostredia na aktivitu enzýmu znázorňuje obraz, reproduktujúci funkciu lipoxidázy lyofilizovaného hrachu v závislosti od obsahu vody za inak konštantných podmienok (pH, teplota).



Obr. 1

Zmenou obsahu vody dochádza síce k zmene aktivity, ale mechanizmus pôsobenia, ako z priebehu kriviek vyplýva, ostáva nezmenený.

Možno teda konštatovať, že lyofilizáciou sa natívne enzýmy konzervovaného produktu inhibujú, ale zloženie molekuly enzýmu, súdiac podľa mechanizmu pôsobenia, sa nemení.

Konzervovanie lyofilizáciou spočíva teda v inhibícii priebehu biochemických procesov, katalyzovaných natívnymi enzýmami.

Dehydratáciou pod určitý stupeň vlhkosti stávajú sa potraviny odolné tiež voči pôsobeniu mikroorganizmov na nich vegetujúcich.

Napriek tomu pri dlhšom skladovaní dochádza k zmenám kvality v lyofilizovaných výrobkoch.

Sú to zmeny, ktoré sú zapríčinené činnosťou natívnych enzýmov, ktoré sa v dôsledku určitej zvyškovej vlhkosti preparátu nepodarilo úplne inhibovať a zmeny neenzymatického pôvodu, ktoré môžu byť zapríčinené reakciami medzi redukujúcimi cukrami a oxidatívnymi reakciami bielkovín príp. lipidov.

## Vplyv blanširovania na aktivitu enzýmov

Z praxe je známe, že lyofilizované neblanširované produkty pri skladovaní rýchlejšie podliehajú skaze ako tie, ktoré sa pred lyofilizáciou blanširujú. (1)

Blanširovanie možno považovať za fyzikálny proces, pri ktorom — okrem iného — dochádza k porušeniu intracelulárneho stavu bunky teplom. Následkom ohriatia bunecného obsahu na teplotu prevyšujúcu biokinetické optimum, dochádza pravdepodobne k reverzibilnej a čiastočne irreverzibilnej denaturácii bielkovín a v súvislosti s tým, tiež k reverzibilnej a irreverzibilnej inhibícii natívnych enzýmov.

Vplyv blanširovania na aktivitu niektorých natívnych enzýmov lyofilizovaného zeleného hrášku znázorňuje tabuľka 1.

Tabuľka 1.

enzým	pôvodná aktivita v %	Doba blanširovania (sekundy)				
		30	60	120	180	240
		zvyšná aktivita v % pôvodnej aktivity				
lakkáza	100	47,6	47,5	45,6	41,0	38,0
lipáza	100	42,8	28,5	14,3	13,0	10,7
lipoxidáza	100	29,2	22,6	15,9	10,8	7,5
askorbáza	100	5,0	4,4	3,5	1,3	0,6
fenoláza	100	7,9	6,0	5,0	2,0	1,8
peroxidáza	100	55,8	11,6	6,9	0,6	—
kataláza	100	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3
tyrozináza	100	—	0,4	—	—	—
krezoláza	100	16,7	16,8	7,7	4,2	—

Pri lyofilizácii dochádza v zelenom hrášku k relatívne veľkému 2—5 i viacnásobnému koncentrovaniu inhibovaných i neinhibovaných enzýmov.

Tabuľka 2.

Aktivita enzýmov lyofilizovaného hrášku neblanširovaného a blanširovaného

	lak- káza	kre- zoláza	tyro- zináza	kata- láza	krezo- láza	lipo- xidáza	askor- báza	lipáza	pero- xidáza
	k $\phi$ na 100 mg sušiny							ml n/10 KOH/ 100 mg	ml n/10 KMnO <sub>4</sub> / /g
neblan- širovaný	0,563	0,454	0,287	19,970	0,652	0,847	3,530	0,7	4,3
blanši- rovaný 30 sek.	0,268	0,076	—	1,086	0,050	0,178	0,156	0,3	2,4

Veľké kvantum aktívnych enzýmov v neblanširovanom hrášku pôsobí po dobu skladovania väčšou rýchlosťou ako po blanširovaní zostávajúce menšie množstvo aktívnych fermentov. Viac aktívnych enzýmov spôsobuje rýchlejšie nahromadenie kvalitu ovplyvňujúcich reakčných produktov a tým spôsobuje zhoršenie kvality skladovaného materiálu.

Blanširovaním nedochádza k rovnomernému inhibovaniu natívnych enzýmov. Sú enzýmy, ktoré sa úplne inaktivujú už po 30 sekundách blanširovania [krezoláza, tyrozináza, peroxidáza] a také, ktoré sa len mierne inhibujú (fenoláza, kataláza, askorbáza). Zdá sa že najodolnejšie voči blanširovaniu sú práve tie fermenty, ktoré sú najviac zodpovedné za objavenie sa pachuti (lipáza, lipoxidáza a lakkáza).

Z fyzikálnych faktorov, ktoré môžu význačnou mierou ovplyvniť rýchlosť priebehu biochemických zmien, zapríčiňujúcich zníženie kvality lyofilizovaného produktu pri dlhšom skladovaní, sú vlhkosť, teplota prostredia a vzdušný kyslík.

Hoci reakčný mechanizmus pôsobenia kyslíka nie je dostatočne známy, možno jeho vplyv pri skladovaní vhodným spôsobom do istej miery obmedziť a správne volenou vlhkosťou lyofilizovaného preparátu redukovať na najnižšiu možnú mieru.

Podobne možno regulovať aj vplyv teploty na biochemické pochody pri dlhšom skladovaní tým, že hotový výrobok prechováame pri teplote, o ktorej je známe, že spomaľuje pochod kazenia.

Inak je to u vlhkosti. Vplyv vlhkosti na priebeh biochemických zmien je nejednotný. Neenzymatické biochemické zmeny prebiehajú optimálne len pri určitých vlhkostiach. Prekročením optimálnej vlhkosti sa ich priebeh spomaľí alebo úplne zastaví.

#### Sorpčné izotermy a ich súvislosť s aktivitou natívnych enzýmov

Medzi aktivitou enzýmov a obsahom vody v lyofilizovaných produktoch je veľmi úzka súvislosť. Lyofilizované výrobky, ako všetky dehydratované látky, sú na vzduchu silne hyroskopické. Je to dôsledok snahy vyrovnáť parciálny tlak vodnej pary panujúci v nich s vlhkosťou okolia.

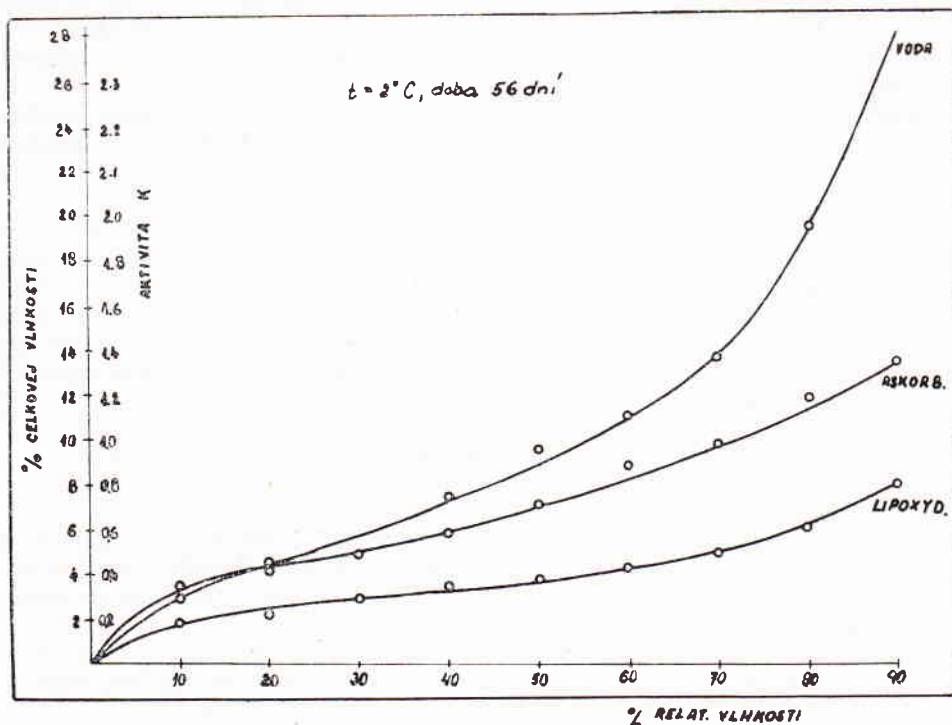
Vzťah medzi obsahom vody v látke a obsahom vody v okolitej atmosfére, t. j. relatívnou vlhkosťou ( $v\%$ ) znázornený graficky dáva krivku, sorpčnú izotermu [pri konštantnej teplote]. Tvar týchto kriviek je často podobný písmenu S. Sorpčné izotermy jednotlivých vysušených výrobkov považujú sa za cenné kritérium pre stanovenie optimálneho obsahu vody, na ktorý sa má produkt dehydrovať, aby sa mohol dlho a bez ujmy na kvalite skladovať. (2)

Zistiť optimálnu vlhkosť skladovania je preto dôležité, lebo pri nižšom obsahu vody býva vzdušný kyslík agresívny a dochádza k zmene kvality následkom oxidačných pochodov. Pri vyššej ako optimálnej vlhkosti intenzita oxidačných pochodov sa síce zníži, naproti tomu sa však zvyšuje intenzita Maillardových reakcií. Preto stanovenie optima vlhkosti, na ktoré má byť určitý výrobok vysušený, v našom prípade, lyofilizáciou, je z hľadiska skladovateľnosti veľmi dôležité.

Podľa nášho názoru možno sorpčné izotermy, ako prostriedok zistenia pod-

mienok skladovania výrobkov s inhibovaným enzymatickým obsahom, považovať za sekundárnych ukazovateľov zmien, ktoré nastávajú následkom zmeny celkovej vlhkosti výrobku. Primárnymi ukazovateľmi zmien sú aktivity natívnych enzýmov, ktoré sa počas skladovania reaktivovali hlavne vplyvom vlhkosti.

Keďže sme medzi sorpčnými izotermami a aktivitou enzýmov predpokladali úzku súvislosť, stanovili sme v blanširovanom lyofilizovanom hrášku a špenáte sorpčnú termu enzýmov lipoxidázy a oxigenázy kyseliny askorbovej. Náš predpoklad sa ukázal byť správny. Medzi tvarom kriviek znázorňujúcich priebeh sorpčnej izotermy a priebeh aktivity inhibovaných enzýmov je analógia.



Obraz 2

Podobne ako sorpčnú izotermu možno aj termu enzýmov rozdeliť na tri časti: na časť konvekčne zakrivenú, na časť konkávnú a na časť priamkovú, ležiacu medzi nimi.

Časť konvekčná naznačuje, že adsorpcia vody v tomto rozsahu relatívnej vlhkosti sa uskutočňuje tak, že molekuly vody vytvárajú na preparáte monomolekulárny film. Voda je silne adsorbovaná na povrchu a zrejme nevytvára podmienky pre reaktiváciu enzýmov.

V časti priamkovej sa voda nanáša na preparát vo viacerých na seba uložených vrstvách multimolekulárne.

V časti konkávnej prebieha adsorpcia na základe kapilárnej kondenzácie. Takto adsorbovaná voda vytvára podmienky pre rehydratáciu a reaktiváciu enzýmov.

Vlhkosti ležiace až po konkávnú časť krivky možno považovať za ešte únosné pre skladovanie, pretože nevytvárajú podmienky na reaktiváciu enzýmov.

Brunaer, Emmett a Teller (3) vypracovali podľa nich pomenované pravidlo (BET), pomocou ktorého možno vypočítať priebeh adsorpcie vody na suchý preparát v závislosti od relatívnej vlhkosti skladovacieho prostredia až po relatívnu vlhkosť 50 %. Pravidlo sa vzťahuje na anorganické látky. Pokúšame sa ho aplikovať na biologický materiál obsahujúci enzýmy a nájsť vhodný matematický výraz pre výpočet enzymatickej termy v závislosti od relatívnej vlhkosti, ktorý by dovolil určiť optimálnu vlhkosť, na ktorú má byť lyofilizovaný výrobok vysušený a skladovaný.

Celková aktivita zostávajúcich neinhibovaných enzýmov pri stabilnej nízkej vlhkosti a konštantnej teplote sa po dobu 60–100 dní prakticky nemení. Denný prírastok na aktivite je relatívne malý.

### S ú h r n

Sublimačným sušením znižuje sa aktivita natívnych enzýmov potravín konverziou aktívnych enzýmov na enzýmy inaktívne. Inhibícia enzýmov je zapríčinená zmenou zloženia prostredia, v ktorom enzýmy pôsobia, pričom môže dôjsť aj k čiastočnému porušeniu aktívnej molekuly enzýmu. Rehydratáciou sa enzýmy reaktivujú.

Senzibilita natívnych enzýmov proti zmene zloženia prostredia je dôležitým činiteľom pre dlhodobé zachovanie kvality lyofilizáciou konzervovaných výrobkov.

### L i t e r a t ú r a

1. Fr. Klempová, I. Stein, Bulletin Výskumného ústavu pre konzerváciu potravín 2, 116, 1964.
2. L. Acker, Adv. Food Res. 11, 263, 1962.
3. Brunauer S., Emmett P. H., Teller E., I. Am. Chem. Soc. 60, 309, 1938.

## Энзиматические процессы в лиофилизированных продуктах

### Р е з ю м е

Во время сублимативной сушки понижается активность натуральных энзимов в пищевых продуктах, вследствие превращения активных энзимов в энзимы неактивные. Замедление энзимов вызвано изменением состава среды в которой энзимы действуют, причем может наступить частичное нарушение активной молекулы энзима. Регидратацией энзимы реактивируются.

Сенсибилизация натуральных энзимов против изменений состава среды, является важным фактором для длительного сохранения качества лиофилизированных продуктов.



# Enzymatische Prozesse in gefriergetrockneten Lebensmitteln

## Zusammenfassung

Durch die Gefriertrocknung verringert sich die Aktivität der nativen Enzyme von Lebensmitteln durch Konversion der aktiven Enzyme in inaktive Enzyme. Die Enzyminhibition ist durch die Veränderung der Zusammensetzung des Milieus, in dem die Enzyme wirken verursacht, wobei es zu einer teilweisen Beschädigung der aktiven Enzymmoleküle kommen kann. Die Enzyme reaktivieren sich durch Rehydrierung.

Die Sensibilität der nativen Enzyme gegenüber der Veränderung der Zusammensetzung vom Milieu ist ein wichtiger Faktor für eine langjährige Qualitätserhaltung der Erzeugnisse, die mittels Gefriertrocknung aufbewahrt werden.