

Potravinárske využitie proteolytických enzýmov

MARTINA HRČKOVÁ - ERNEST ŠTURDÍK - JAROSLAV ZEMANOVIČ

SÚHRN. Článok je venovaný najdôležitejším aplikačným oblastiam proteolytických enzýmov v potravinárskom priemysle. Proteolytické enzýmy (peptidázy) katalyzujú hydrolýzu peptidových väzieb v proteínoch významne ovplyvňujú nutričné a senzorické vlastnosti, textúru a iné vlastnosti potravinárskych surovín, medziproduktov i konečných výrobkov. Hlavná pozornosť je venovaná využitiu živočíšnych, rastlinných a mikrobiálnych proteolytických enzýmov v mliekarstve, mlynárskom a pekárskom priemysle, pri výrobe piva, sójových hydrolyzátov a v mäsiarstve.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: proteolytické enzýmy; peptidázy; hydrolýza proteínov; aplikácia

Proteolytické enzýmy sú prítomné prakticky vo všetkých živých bunkách a navyše sú vylučované aj do vonkajšieho prostredia, resp. do tráviaceho systému vyšších organizmov. Všeobecne sú známe ich rôzne regulačné funkcie v intermediálnom metabolizme (limitovaná proteolýza, účasť pri zrážaní krvi, aktivácia tráviacich enzýmov, aktivity pri rôznych obranných mechanizmoch, atď). Okrem toho sú známe aj ich rozsiahle praktické aplikácie vo forme enzýmových preparátov v priemyselnej praxi (biodegenty, výroba syrov, spracovanie kože, výroba hydrolyzátov proteínov, stabilizácia piva a i.), v medicíne a farmácii (preparáty zlepšujúce trávenie, čistenie kontaktných šošoviek), v kozmetike (keratolytické zmäččujúce prípravky, pletové peelingové masky) a v bežnej laboratórnej praxi. Proteolytické enzýmy (peptidázy) katalyzujú hydrolýzu peptidových väzieb v proteínoch. Množstvo peptidových väzieb, ktoré môže peptidáza štiepiť je závislé od toho, z ktorých aminokyselín sa proteín skladá a ktoré sú navzájom priľahlé [1].

Ing. Martina HRČKOVÁ, Ing. Jaroslav ZEMANOVIČ, PhD., Katedra potravinárskej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Doc. Ing. Ernest ŠTURDÍK, PhD., Katedra biochemickej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Korešpondujúci autor: Ing. Martina HRČKOVÁ, e-mail: mhrckova@hotmail.com

Aplikácia peptidáz v potravinárskom priemysle

V súčasnosti rastie dopyt po potravinách a potravinových prísadách obsahujúcich modifikované proteíny s upravenými funkčnými vlastnosťami. Príslušné aditíva nachádzajú uplatnenie v rôznych potravinárskych aplikáciách, najmä pri zlepšení rozpustnosti, šľahateľnosti, tvorby gélu a penivosti. Peptidázy modifikujú proteíny štiepením peptidových väzieb medzi určitými dvojicami aminokyselín. Opatrnou enzýmovou modifikáciou proteínov je možné napríklad znížiť, resp. odstrániť, ich alergénny účinok v potravinách určených pre dojčatá, ako aj v špeciálnych diétnych doplnkoch. Pomocou peptidáz je možné získať hydrolyzáty s výbornou nutričnou hodnotou

TAB. 1. Hlavné charakteristiky priemyselných peptidáz [2].
TAB. 1. Main characteristics of industrial peptidases [2].

Enzým ¹	Typ ²	pH	Špecifita ³	Všeobecné aplikačné znaky ⁴
Živočíšne ⁵				
Renín	aspartátový	3-6	Glu-Ala	koagulant mlieka
Chymozín	aspartátový		Leu-Val	veľmi špecifický
Chymotrypsín	serínový	8-9	Phe, Tyr Trp-COOH	odstránenie alergénosti
Pankreatín	zmiešaný	7-9	široká	všeobecná hydrolýza
Pepsín	aspartátový	1-4	Leu-Val Phe-Tyr	syry, kazeináty všeobecná hydrolýza
Trypsín	serínový	7-9	Lys-Ala Arg-Gly	všeobecná hydrolýza použitie v kožiarstve a medicíne
Bakteriálne: neutrálne ⁶				
<i>Bacillus subtilis</i>	metalo	6-8	široká	všeobecná hydrolýza pivárstvo, syry želatína
	serínový	6-10	široká	
<i>Bacillus licheniformis</i>	serínový	6-10	široká	ako u <i>Bacillus subtilis</i>
Bakteriálne: alkalické ⁷				
<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	metalo	7-9	Ileu-Phe Leu-Val	všeobecná hydrolýza tepelná stabilita
<i>Bacillus</i> spp.	serínový	7-12	široká	kožiarstvo, detergenty
Plesňové: kyslo-neutrálne ⁸				
<i>Aspergillus niger</i>	aspartátový a zmiešaný	2-5	v čistom stave ako pepsín, v nečistom stave široká His-Leu Phe-Phe	syry
	niektoré druhy karboxylové			všeobecná hydrolýza odstránenie horkosti

Enzým ¹	Typ ²	pH	Špecifita ³	Všeobecné aplikačné znaky ⁴
<i>Endothia parasitica</i>	aspartátový	3-6	ako renín	koagulácia mlieka
<i>Mucor</i> spp.	aspartátový	3-6	ako renín	koagulácia mlieka
<i>Penicillium</i> spp.	zmiešaný niektoré druhy karboxylové	2-5	široká Gly-Phe	všeobecná hydrolýza odstránenie horkosti
<i>Rhizopus</i> spp.	aspartátový	3-5	ako pepsín	všeobecná hydrolýza
<i>Tametes sanguinea</i>	aspartátový niektoré druhy karboxylové	2-4	veľmi široká	všeobecná hydrolýza
Plesňové: neutrálno-alkalické ⁹				
<i>Aspergillus oryzae</i>	aspartátový metalo karboxylový serínový	4-8	veľmi špecifická Leu-Tyr Phe-Tyr	všeobecná hydrolýza odstránenie horkosti
<i>Streptomyces griseus</i>	zmiešaný amino a kar- boxylový	7-9	veľmi špecifická	obmedzené použitie výskum analytika
Rastlinné ¹⁰				
ficín (figový latex)	cysteínový	5-8	Phe-Tyr	nepotravinárske aplikácie
papaín (plod <i>Papaya</i>)	cysteínový a zmiešaný	5-9	veľmi špecifická Asn-Gln Glu-Ala Leu-Val Phe-Tyr	všeobecná hydrolýza tepelná stabilita tvorba žiadúcej arómy
bromelaín (kmeň a plody ananásovníka)	cysteínový	5-8	Lys-Arg Tyr-Phe	všeobecná hydrolýza veľmi podobné papaínu, ale menej tepelne stabilný

1 - enzyme, 2 - type, 3 - specificity, 4 - overall application features, 5 - animal, 6 - bacterial: neutral, 7 - bacterial: alkaline, 8 - fungal: acid-neutral, 9 - fungal: neutral-alkaline, 10 - plant.

a s príjemnou chuťou. V potravinárskej technológii sa využívajú peptidázy rastlinného, živočíšneho a mikrobiálneho pôvodu, ktoré sú uvedené tab. 1 [2].

Mliekarský priemysel

Mnohé vlastnosti mliečnych výrobkov, akými sú zmrzlina, syry, fermentované mlieka a nápoje, kondenzované a sušené mlieka, závisia od vlastností prítomných proteínov. Hydrolýzou mliečnych proteínov je možné zlepšiť napr. ich reologické vlastnosti. Kontrolovanou parciálnou proteolýzou ešte pred inokuláciou mlieka určeného na výrobu jogurtu je možné dosiahnuť rýchlejší nárast mikroorganizmov zo štartovacích kultúr a tým ovplyvniť vlastnosti finálneho produktu. Použitím takto modifikovaného mlieka v prítomnosti neutrálnej peptidázy Neutrase (Novo Nordisk), pri dosiahnu-

tom stupni hydrolyzy 4 alebo 5 %, sa získa jogurt s pevnejšou a hladšou konzistenciou, pričom nedochádza k oddeľovaniu srvátky. V prípade použitia enzýmu trypsín je jogurt jemnejší, textúra hladšia, ale oddeľuje sa srvátka. V prvom prípade modifikovania mlieka sa zlepšujú aj chuťové vlastnosti jogurtu. Platí to tiež pre z tohto mlieka vyrobené syry typu Eidam a Čedar [3]. Na modifikáciu mlieka a srvátkových proteínov, napr. na zvýšenie ich rozpustnosti, je možné použiť bakteriálnu alkalickú peptidázu s nasledovnými optimálnymi aplikačnými podmienkami: pH 8,5–9,0, teplota 50–60 °C [4].

Pôvodne sa pri výrobe syra na zrážanie mlieka pridával extrakt získaný z telacieho žalúdka obsahujúci enzým renín. V syrárstve sa často používal aj pepsín alebo zmes renínu a pepsínu. V dnešnej dobe sa na zrážanie mlieka využívajú mikrobiálne enzýmy produkované mikroorganizmami *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* a najmä *Mucor miehei*. Enzýmy produkované dvoma poslednými mikroorganizmami sú vhodné na výrobu dlhozrejúcich syrov [5]. Fromase TL (Gist-brocades) je termolabilný enzým extrahovaný zo špeciálne kultivovaného kmeňa druhu *Mucor miehei*. Počas výroby syra je inaktivovaný už pri bežných ohrevoch srvátky, t. j. po pasterizácii srvátky za obvyklých podmienok nebola zistená žiadna zvyšková aktivita. Jeho globálna kompozícia aminokyselín je podobná živočíšnemu enzýmu. Je stabilný v oblasti pH 3,0–6,5 a jeho špecifickosť vo vzťahu k inzulínovému reťazcu B je podobná živočíšnemu syridlu [6]. S využitím techník rekombinatnej DNA je možné pripraviť mikroorganizmy schopné produkovať enzýmy autentické s telacím renínom. Na tieto účely sa ako hostiteľské bunky použili *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Saccharomyces cerevisiae* [5].

Mikrobiálne peptidázy majú v syrárstve široké použitie aj v procese zrenia syrov. Väčšinou ich produkujú pridané mikroorganizmy. Zrenie syra zahŕňa zmeny v jeho chemických a fyzikálnych vlastnostiach. Ako prvý sa pri zrení hydrolyzuje α -kazeín pôsobením chymozínu alebo pôvodných mliečnych peptidáz. Potom sa renínom hydrolyzuje β -kazeín na peptidy alebo mliečnou alkalickou peptidázou plazmínom na γ -kazeín. S výnimkou plesňových syrov, napr. Camembert, kde plesne spôsobujú hydrolyzu β -kazeínu na povrchu syra, veľké množstvo β -kazeínu zostáva nedotknuté do konca zrenia. Primárna fáza proteolýzy v procese zrenia syrov teda zahŕňa hydrolyzu proteínov na polypeptidy, sekundárna potom degradáciu polypeptidov na nižšie peptidy a aminokyseliny pôsobením peptidáz mikroorganizmov rastúcich v syre. Stupeň hydrolyzy závisí od typu syra. Proteíny v mäkkých syroch sú proteolyzované na nízkomolekulové peptidy a aminokyseliny, zatiaľ čo v tvrdých syroch je rozpustných len asi 30 % proteínov. Zrenie je dlhotrvajúci proces a je možné ho urýchliť použitím niektorých

peptidáz, napr. komerčne vyrábanou Neutrase (Novo Nordisk), HT-proteolytic® (Miles Laboratories Inc.) alebo kyslou peptidázou z *Aspergillus oryzae*. Pri výrobe syrov zrejúcich pod mazom sa využívajú extracelulárne aminopeptidázy z *Brevibacterium linens* [7].

Komplex aminopeptidáz získaný z mliečnej štartovacej kultúry kmeňa *Lactococcus lactis* je známy pod obchodným názvom Accelase™ (IBT). Prítomné aminopeptidázy hrajú dôležitú úlohu pri zrení, najmä pri vytváraní chuťových prekursorov budúceho syra bez vzniku horkej chuti. Ich použitie je žiaduce najmä pri výrobe nízkotučných syrov, u ktorých zabezpečujú chuťnosť vysokotučných syrov. Accelase™ DB (IBT) obsahuje vyselektované peptidázy odstraňujúce horké peptidy už vo fáze ich vzniku. Pridáva sa do mlieka určeného na syrenie ešte pred prídavkom zrážadla, a tak sa už počas zrážania zadržiava až 90 % aktívnych zložiek, ktoré sa podieľajú na tvorbe chuťových látok syra [2]. Problematiku horkej chuti rieši aplikácia novovyvinutej kultúry s vysokou aminopeptidázovou aktivitou FlavoGARD LC104 (Rhodia Food UK LTD), ktorá okrem odstránenia horkosti dodáva syru viac intenzívnu chuť, hladšiu a krémovejšiu konzistenciu [8].

Použitie ďalších širokospektrálnych endopeptidáz, ako sú napr. papaín, bromelaín a trypsín našlo uplatnenie najmä pri modifikovaní penivosti srvátkových proteínov, a to zlepšením penivosti a stability peny [2].

Pekársky priemysel

Komerčné preparáty, ktoré sa používajú v pekárskom priemysle, sú obyčajne zmesi karboxy- a aminopeptidáz alebo endo- a exopeptidáz. Využívajú sa na úpravu vlastností pšeničného gluténu v závislosti od požadovaných vlastností konečného výrobku. Bakteriálne endopeptidázy sa využívajú predovšetkým na úpravu vlastností gluténu pšeničnej múky určenej na výrobu sušienok, alebo oblátok, kde je potrebná nízka viskozita cesta. Na druhej strane pri výrobe chleba, kde je žiaduca chrumkavosť a pekná farba kôrky, ako aj celková chuťnosť, nie je hydrolýza pšeničného gluténu potrebná až do takej veľkej miery. V tomto prípade je užitočnejší kontrolovaný prídavok fungálnych endopeptidáz, napríklad Promod 357 a Promod 388 (Biocatalysts) [2].

Proteolytické enzýmy modifikujú vlastnosti proteínov raži bez porušenia štruktúry finálneho chleba. Pri výrobe sušienok sa používajú proteolytické enzýmy namiesto hydroxysiričitanu sodného, ktorý oxidačne deštruuje vitamín B₁ [4, 9]. Na tieto účely sa využívajú najmä bakteriálne neutrálne endopeptidázy, napr. Neutrase® (Novo Nordisk) [4]. Na zlepšenie symetrie bochníka, zlepšenie pórovitosti a textúry a na získanie ľahšej striedky sa používajú fungálne proteolytické prípravky, obsahujúce exo- aj endopeptidázy.

Pri výrobe chleba urýchľuje peptidáza Milenzyme Fungal Protease z *Aspergillus oryzae* (Miles Laboratories Inc.) hydrolýzu gluténových domén obsahujúcich vnútorné disulfidické väzby, čím sa znižuje tvrdosť múky, a zvyšuje sa rozťažnosť cesta. Kráti sa tým čas potrebný na miešanie. Zároveň sa zvyšuje objem bochníka a chlieb má hladšiu textúru [7]. Pomocou tejto peptidázy je možné miernou hydrolýzou (stupeň hydrolýzy 14 %) dosiahnuť lepšiu rozpustnosť pšeničného proteínu v širšom rozsahu pH hodnôt, a tým zlepšiť jeho stráviteľnosť [10]. HT-proteolytic® je peptidáza z *Bacillus subtilis* (Miles Laboratories Inc.), ktorá sa používa na úpravu múky s vysokým obsahom proteínov v sušienkach, sladkom pečive, pizze a iných špecialitách pekárskoho priemyslu (zjemňuje cesto, zlepšuje jeho rozťažnosť a redukuje elasticnosť). Milenzyme Bromelain (Miles Laboratories Inc.) je proteolytický enzým izolovaný z ananášov, ktorý sa aplikuje pri hydrolýze väčšiny rozpustných proteínov, napr. pri výrobe oblátok a palacínok [7].

Výroba piva

Potrebný obsah rozpustných dusíkatých zlúčenín v pivovarskej sladine je možné zvýšiť činnosťou peptidáz prítomných v slade, resp. pridávaním najmä neutrálnych bakteriálnych peptidáz [2, 7]. V nesladovom obilí sa musí chýbajúca proteolytická aktivita nahradiť exogénnymi peptidázami. Použité proteolytické enzýmy musia byť stabilné pri 55–60 °C, musia mať optimum aktivity pri pH v rozmedzí 6–7, žiadaná je rezistencia voči prírodným peptidázovým inhibítorm a aktivita pri veľmi nízkych koncentráciách proteínov. Najčastejšie sa používa papaín, pretože sa neinaktivuje pasterizáciou piva a nemá negatívny vplyv na senzorické vlastnosti produktu [7]. Papaín predstavuje zmes cysteínových endopeptidáz (papaín, chymopapaín, karikaín). Ich izoelektrické body sa pohybujú v alkalickej oblasti, a to 8,75 pre papaín a do 11,5 pre karikaín. Papaín *sensu stricto*, chymopapaín a karikaín prednostne katalyzujú štiepenie väzieb na -COOH konci zásaditých aminokyselín (lyzín, arginín) [2]. Okrem zvýšenia výťažku mladiny a obsahu dusíka v nej, peptidázy odstraňujú chladový zákal piva, ktorý vzniká počas finalizácie vytvorením komplexov proteínov s tanínom [11]. Pomáhajú tiež pri tvorbe arómy a plnosti chuti, pri filtrácii a čírení [7]. Na tieto účely sa pri výrobe piva aplikujú preparáty Neutrase 0.5L (Novo Nordisk) alebo zmes bakteriálnych peptidáz Alphasase AP (ABM, Rhone-Poulenc) [2].

Mäsový priemysel

Proteolytické enzýmy zohrávajú dôležitú úlohu v tenderizácii mäsa. Tenderizácia mäsa prebieha pôsobením endogénnych peptidáz, hlavne lyzozomálneho katepsínu a neutrálnej metalopeptidázy [2]. Prates a kol. [12] potvr-

dili fakt, že endogénne cysteínové peptidázy (kalpaíny a katepsíny B, L a H) majú priaznivý vplyv na tenderizáciu králičieho mäsa, pri ktorom sa počas 9 dní pri 4 °C pozorovala tvorba 30 kDa fragmentov a zoslabnutie štruktúry myofibrilárnych tkanív. Okrem endogénnych peptidáz je možné použiť aj exogénne peptidázy ako sú ficín, bromelaín, papaín, fungálne peptidázy alebo aktidín. Pri výrobe fermentovaných mäsových výrobkov sa prídavok exogénnej peptidázy z *Aspergillus oryzae* (Solvay) k štartovacej kultúre (*Lactobacillus plantarum* + *Staphylococcus carnosus*) prejavil v zlepšení chuti, najmä vo zvýšení slanosti a korenitosti [13]. Proteolytické enzýmy použité na tenderizáciu mäsa by mali byť aktívne pri pH 4–5 a nízkej teplote, pričom ich inaktivácia má prebehnúť pri teplote asi 50 °C. Pre povrchovú tenderizáciu sa využíva najmä aplikácia 2%-ného papaínu alebo 5%-nej mikrobiálnej peptidázy z *Bacillus subtilis* alebo *Aspergillus oryzae*. Malé zvyšky mäsa, ktoré pri bežnom spracovaní ostávajú na hlave alebo na kostiach zvierat, je možné pre použitie v potravinárskych produktoch získať rozpustením pomocou proteolýzy. Získané produkty je možné použiť na obohatenie arómy a chuti polievok a mäsových konzerv. Pre toto použitie sa najvhodnejšou ukázala byť Alcalase firmy Novo Nordisk z *Bacillus licheniformis* [7]. Bunky *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas marinoglutinosa* a *Acromonas hydrophila* imobilizované pomocou alginátu vápenatého sa osvedčili pri rozpušťaní mäsa rýb [14].

TAB. 2. Proteolytické enzýmy používané na urýchlenie zrenia fermentovaných mäsových výrobkov [13].

TAB. 2. Proteolytic enzymes used to accelerate the ripening of fermented meat products [13].

Enzým ¹	Typ ²	Zdroj ³
NCDO151 proteinase	serínová peptidáza	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> NCDO151
Pronase E	zmes endopeptidáz, amino- a karboxypeptidáz	<i>Streptomyces griseus</i>
Aspartyl-proteinase	kyslá endopeptidáza	<i>Aspergillus oryzae</i>
Papain	tiol-endopeptidáza	<i>Carica papaya</i>
Alcalase®	serínová endopeptidáza	<i>Bacillus licheniformis</i>
Bromelain	endopeptidáza	<i>Ananas comosus</i>
Neutrase®	metaloendopeptidáza	<i>Bacillus subtilis</i>
Fungal Protease® (Protease P)	zmes kyslých, neutrálnych a alkalických peptidáz	<i>Aspergillus oryzae</i>
Flavourzyme®	zmes peptidáz s exo- aj endopeptidázovou aktivitou	<i>Aspergillus oryzae</i>

1 - enzyme, 2 - type, 3 - source.

Počas výroby fermentovaných mäsových výrobkov sa v súčasnosti používa mnoho proteolytických enzýmov s cieľom urýchliť proces zrenia (tab. 2).

Použitím peptidázy *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151 sa po dvoch týždňoch zrenia dosiahla intenzívna a vyzretá chuť, kyslosť a vhodná tvrdosť výrobkov. Čas zrenia sa skrátil až o 30–50% [13]. Melendo a kol. [15] použili na zlepšenie textúry chorizo (španielsky druh klobás) komerčnú peptidázu bromelaín. Zistili, že enzým má veľmi dobrý tenderizačný účinok na mäsové výrobky, najmä v prvých 48 hodinách inkubácie enzýmu v mäsovej zmesi. Zapelena a kol. [16] študovali vplyv prídavku metalopeptidázy z *Bacillus subtilis* (Neutrase, Novo Nordisk) do štartovacej kultúry. V dôsledku endopeptidázovej aktivity enzýmu sa okrem nárastu obsahu aminokyselín a α -amino dusíka peptidov zlepšili senzorické vlastnosti finálneho výrobku.

Výroba sójových hydrolyzátov

Úpravou sójovej múky alebo izolovaných sójových proteínov proteolytickými enzýmami sa produkujú prípravky s modifikovanými funkčnými vlastnosťami, ako je vyššia rozpustnosť, stabilita peny a emulgačná kapacita. Hydrolyzáty sójových proteínov sa pridávajú do potravín s nízkym pH, akými sú napr. nápoje. Proteolýzou získané rozpustné produkty nespôsobujú pri aplikácii u vyrábaných potravín problémy s tvorbou gélov, zákalom a cudzou arómou. Najväčšou komplikáciou spojenou s hydrolyzátmi sójových proteínov je vznik horkých peptidov. Stupeň horkosti hydrolyzátu závisí od stupňa hydrolýzy a druhu použitej peptidázy. Na výrobu sójového mlieka zo sójových bôbov sa využíva neutrálna peptidáza Neutrase (Novo Nordisk) z *Bacillus amyloliquefaciens*, ktorá výrazne zvyšuje obsah rozpustných proteínov [17, 18].

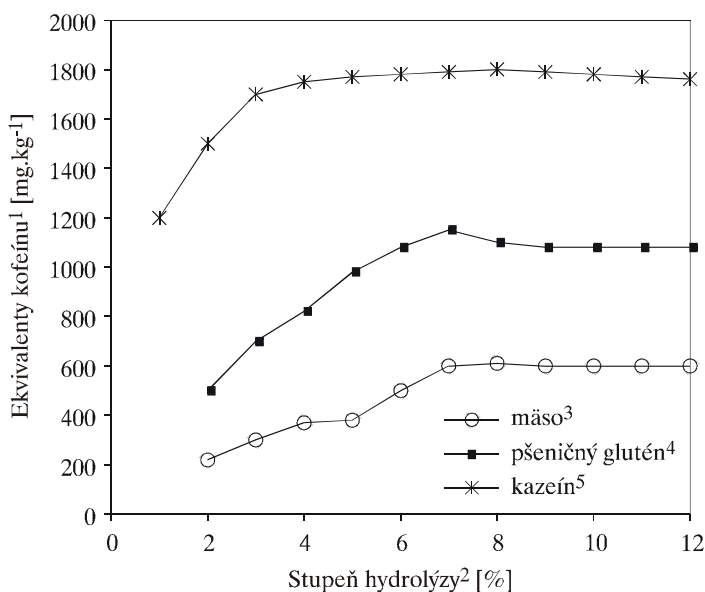
Inkubovaním sójových semien s peptidázou z *Bacillus* sp. pri 37 °C počas 20 hodín, čo sú rovnaké podmienky ako pri fermentácii sójového výrobku Natto s *Bacillus natto*, sa získal výrobok s textúrou podobnou tomuto výrobku. Hoci sa nedosiahla rovnaká úroveň chuti ani vône, výsledné hydrolyzáty, ktoré pozostávali z peptidov s molekulovou hmotnosťou menšou ako 10000, nevykazovali žiadnu imunoaktivitu. V prípade sójového syra Tofu sa po 150-hodinovej inkubácii pri 4 °C s peptidázou z *Aspergillus soyae* dosiahlo takmer úplné odstránenie aktivity alergénov oproti monoklonálnej protilátke špecifickej ku Gly m Bd 30K. Podobne aktívny je aj enzýmový preparát Proleather FG-F (Amano Pharmaceutical Co.), ktorý selektívne katalyzuje hydrolýzu sójového alergénu Gly m Bd 30K, ako aj β -konglycinínu [19].

Hydrolýzou sójovej odtučnenej múky v prítomnosti peptidázy Flavourzyme™ (Novo Nordisk) pri pH 6 a teplote 99 °C počas 1,5 h v prítomnosti

$5 \cdot 10^{-4}$ mol ribózy a $5 \cdot 10^{-4}$ mol cysteínu sa získali hydrolyzáty s chuťou a vôňou pripomínajúcou mäso. Tieto sa potom môžu použiť pri produkcii iných potravín a predstavujú alternatívu výroby príchuťí a esencií z rastlinných proteínov kyslou hydrolyzou [20]. Na tieto účely je možné použiť aj preparáty Promod 278, Promod 279 a Promod 280 (Biocatalysts), ktorých kaskádovitým a následným pôsobením sa získajú hydrolyzáty rastlinných proteínov bez horkej chuti [2].

Odstraňovanie horkej chuti

Použitie niektorých hydrolyzátov proteínov limituje ich horká chuť, ktorá je dôsledkom činnosti použitých peptidáz a podmienok počas hydrolyzy. Tzv. horké peptidy, prítomné v hydrolyzátoch, sú obvyčajne tvorené 3–15 aminokyselinami hydrofóbného charakteru. Skoro všetky peptidy, ktoré obsahujú aminokyseliny ako leucín, izoleucín, tyrozín, prolín, valín, fenylala-



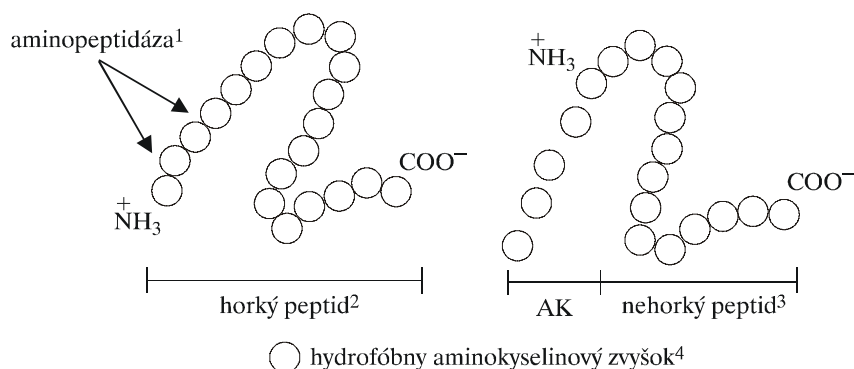
OBR. 1. Závislosť intenzity horkej chuti od proteínového substrátu a stupňa hydrolyzy [2]. Hydrolyzáty sa získali použitím neutrálnej peptidázy z *Bacillus subtilis* aplikovanej v 1%-nej koncentrácii suspenzie.

FIG. 1. Dependence of the bitterness intensity on the protein substrate and the degree of hydrolysis [2]. Hydrolysates were prepared using *Bacillus subtilis* neutral peptidase applied in a suspension concentration of 1%.

1 - caffeine equivalents, 2 - degree of hydrolysis, 3 - meat, 4 - wheat gluten, 5 - casein.

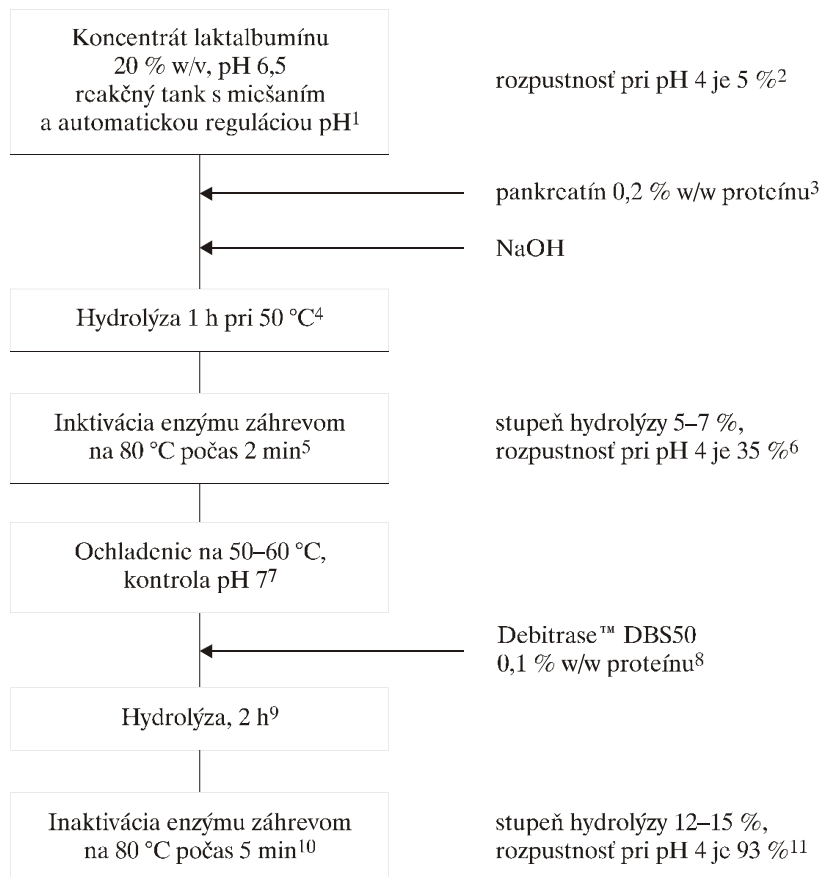
nín a tryptofán sú horké a intenzita horkej chuti je úmerná počtu hydrofóbných aminokyselín a dĺžke peptidu. Horké peptidy sa extrahovali z kazeínu, syrov, mäsa, sóje a iných proteínových zdrojov. Správnym výberom peptidázy je možné dosiahnuť štiepenie proteínov v mieste hydrofóbných aminokyselín (napr. neutrálna peptidáza *Bacillus subtilis* štiepi väzby His–Leu, Ala–Phe, Gly–Phe) alebo v polárnejších miestach polypeptidového reťazca (napr. bromelaín štiepi väzby, kde sú prítomné aminokyseliny Lys a Arg). Vznik horkých peptidov do istej miery závisí od stupňa hydrolyzy. Ich tvorba rastie s rastúcim stupňom hydrolyzy a časom dochádza k ustáleniu a vytvoreniu plató (obr. 1). Vzniknuté peptidy, a tým aj intenzita horkej chuti, budú vždy iné v závislosti od zvolenej endopeptidázy použitej v primárnej hydrolyze proteínu. Napr. hydrolyzáty vzniknuté pôsobením rastlinných sulfhydrolýznych peptidáz (papaín, bromelaín, ficín) budú menej horké ako hydrolyzáty vzniknuté za katalýzy neutrálnych alebo alkalických peptidáz z *Bacillus subtilis*. Preto pre efektívne naplánovanie odstránenia horkých peptidov v hydrolyzátoch je potrebné detailne poznať charakter a podmienky primárnej hydrolyzy proteínu.

Na odstránenie horkej chuti proteínových hydrolyzátoch (obr. 2) sú komerčne dostupné preparáty aminopeptidáz a karboxypeptidáz. Debitrase® LL



OBR. 2. Odstránenie horkej chuti proteínov pomocou aminopeptidázy [2]. Aminopeptidázy odštiepujú jednotlivé aminokyseliny alebo páry aminokyselín z amino konca peptidových reťazcov. Odštiepením hydrofóbných aminokyselín sa odstráni horká chuť hydrolyzátoch. AK - aminokyseliny.

FIG. 2. Protein debittering effect of an aminopeptidase [2]. Aminopeptidases remove single or pairs of amino acids from the amino terminus of peptide chains. Removal of the hydrophobic amino acids renders the hydrolysate non-bitter. AK - amino acids. 1 - aminopeptidase, 2 - bitter peptide, 3 - non-bitter peptide, 4 - hydrophobic amino acid residue.



OBR. 3. Príprava rozpustných hydrolyzátov laktalbumínu bez horkej chuti [2].

FIG. 3. Production of a non-bitter soluble lactalbumin hydrolysate [2].

1 - lactalbumin concentrate 20 % w/v, pH 6.5, stirred reaction tank with automatic pH adjustment, 2 - solubility at pH 4 is 5 %, 3 - pancreatin 0.2 % w/w protein, 4 - hydrolysis for 1 h at 50 °C, 5 - enzyme inactivation, heat to 80 °C for 2 min, 6 - degree of hydrolysis 5–7 %, solubility at pH 4 is 35 %, 7 - cool to 50–60 °C, check pH 7.0, 8 - Debitrase™ DBS50, 0.1 % w/w protein, 9 - hydrolysis for 2 h, 10 - enzyme inactivation at 80 °C for 5 min, 11 - degree of hydrolysis 12–15 %, solubility at pH 4 is 93 %.

a Debitrase® DBP20 (Imperial Biotechnology) sú aminopeptidázy produkované baktériami mliečneho kysnutia, napr. *Lactococcus lactis*. Tieto zmesi peptidáz sú vysokošpecifické na štiepenie väzieb hydrofóbnymi aminokyselinami a prolínom. Sú účinnejšie ako zmesi leucínových aminopetidáz produkovaných *Aspergillus oryzae* známych pod obchodnými názvami Debitrase® DBS50 (Imperial Biotechnology), Flavorpro™ 192 (Biocatalyst)

a Corolase™ 7093 (Röhm Tech). Z karboxypeptidáz sa používajú plesňové peptidázy produkované *Aspergillus oryzae*, sulfhydrylové rastlinné peptidázy (bromelaín) a živočíšny pankreatín. Na úplné odstránenie horkej chuti sa požaduje použitie kombinácie karboxypeptidáz spolu s aminopeptidázami. Príkladom je hydrolýza laktalbumínu, ktorej konečným produktom je dobre rozpustný materiál bez horkej chuti, používaný do nutričných prípravkov, nápojov pre športovcov (kulturistov) i starších ľudí a do diétnych nápojov určených na redukciiu hmotnosti (obr. 3) [2].

Záver

Proteolytické enzýmy majú svoje praktické uplatnenie v rôznych oblastiach potravinárskeho priemyslu. Ich substrátom sú proteíny, ktoré predstavujú veľmi dôležitú súčasť potravy človeka. Svojím zložením, hlavne obsahom esenciálnych aminokyselín, prispievajú k výživovej hodnote potravín. Obsah aminokyselín je dôležitý aj z hľadiska funkčných vlastností proteínov, ktoré ovplyvňujú parametre potravy. Z praktického hľadiska je veľmi dôležité poznať podmienky, za ktorých má konkrétny proteolytický enzým pôsobiť, ako aj parametre daného enzýmu, ktoré budú plne vyhovovať konkrétnej technológii.

Žiadané sú najmä peptidázy upravujúce funkčné vlastnosti proteínov vo vyrábaných produktoch (tvorba gélu, nutričná hodnota, vhodné senzorycké parametre, penivosť, atď.), odstraňujúce horkú chuť hydrolyzátov používaných v potravinárskych technológiách, ako aj peptidázy znižujúce, resp. odstraňujúce alergénosť proteínov v potravinách.

Literatúra

1. ADLER-NISSEN, J.: Enzymic hydrolysis of food proteins. London : Elsevier, 1986. 426 s.
2. GODFREY, T.: Industrial enzymology. 2. vyd. New York : Stockton Press, 1996. 600 s.
3. HEMANTHA KUMAR, H. R. - VINCENT MONTEIRO, P. - GAJANAN, S. B.: Effect of enzymatic modification on flavour and textural qualities of set yogurt. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81, 2000, s. 42-45.
4. Novo Nordisk, Bagsvaerd Denmark: Enzymes at work. 1983. 38 s.
5. FROST, G. M.: Application of enzymes in food. In: HUDSON, B. J. F.: Biochemistry of food proteins. London : Elsevier, 1992, s. 307-362.
6. Gist-brocades, Delft Holland: Fromase. 1994. 4 s.
7. LUKÁČOVÁ, V. - ZEMANOVIČ, J.: Enzymová hydrolýza proteínov pri výrobe potravín. Bulletin potravinárskeho výskumu, 37, 1998, č. 1, s. 19-31.

8. DEEPROSE, J.: Bugged and beautiful. *International Food Ingredients*, 2000, č. 6, s. 45-46.
9. TEKANEN, M. - SALMENKALLIO-MARTILA, M. - POUTANEN, K.: Baking with enzymes? What Makes it Happen? *The World of Ingredients*, 1998, č. 5/6, s. 38-41.
10. DRAGO, S. R. - GONZÁLEZ, R. J.: Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1, 2001, s. 269-273.
11. JAMES, J. - SIMPSON, B. K.: Application of enzymes in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 1996, s. 437-463.
12. PRATES, J. A. - RIBEIRO, A. M. - CORRREIA, A. A.: Role of cyseine endopeptidase (EC 3.4.22) in rabbit meat tenderisation and some related changes. *Meat Science*, 57, 2001, s. 283-290.
13. FERNÁNDEZ, M. - ORDÓNEZ, J. A. - BRUNA, J. M. - HERRANZ, B. - HOZ, L.: Accelerated ripening of dry fermented sausages. *Trends in Food and Technology*, 11, 2000, s. 201-209.
14. KARAM, J. - NICELL, J. A.: Potencial applications of enzymes in waste treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 69, 1997, s. 141-153.
15. MELENDO, J. A. - BELTRÁN, J. A. - JAIME, I. - SANCHO, R. - RONCALÉS, P.: Limited proteolysis of myofibrillar proteins by bromelain decrease toughness of coarse dry sausage. *Food Chemistry*, 57, 1996, s. 429-433.
16. ZAPELENA, M. J. - ZALACAIN, I. - PAZ DE PENA, M. - ASTIASARÁN, I. - BELLO, J.: Addition of a neutral proteinase from *Bacillus subtilis* (Neutrase) together with starter to a dry fermented sausage elaboration and its effect on the amino acid profiles and the flavour development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1997, s. 472-475.
17. JAMES, J. - SIMPSON, B. K.: Application of enzymes in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 1996, s. 437-463.
18. MARSMAN, G. J. P. - GRUPPEN, H. - MUL, A. J. - VORAGEN, A. G. J.: In vitro accessibility of untreated, toasted and extruded soybean meals for proteases and carbohydrases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1997, s. 4088-4095.
19. OGAWA, T. - SAMOTO, M. - TAKAHASHI, K.: Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 46, 2000, s. 271-279.
20. WU, Y. F. - BAEK, H. H. - GERARD, P. D. - CADWALLADER, K. R.: Development of a meat-like process flavoring from soybean-based enzyme-hydrolyzed vegetable protein (E-HVP). *Journal of Food Science*, 65, 2000, s. 1220-1227.

Do redakcie došlo 18.3.2002.

Application of proteolytic enzymes in food technology

HRČKOVÁ, M. - ŠTURDÍK, E. - ZEMANOVIČ, J.: *Bull. potrav. Výsk.*, 41, 2002, p. 85-97.

SUMMARY. The article deals with the most important fields of proteolytic enzymes application in food industry. Proteolytic enzymes (peptidases), catalyzing the hydrolysis of peptide bonds in proteins significantly improve nutritive, sensoric and texture properties of raw materials, intermediates as well as end products in food technology. The main attention is devoted to the application of animal, plant and microbial proteolytic enzymes in dairy, bakery and brewing industries, in the production of soya hydrolysates, and in the meat industry.

KEYWORDS: proteolytic enzymes; food peptidases; hydrolysis of proteins; application