

# Stosowanie preparatów enzymatycznych w wybranych gałęziach przemysłu spożywczego

Krzysztof Żyła

Maciej Kujawski

Katedra Biotechnologii Żywności

Akademia Rolnicza

Kraków

## 1. Przetwórstwo owoców i warzyw

Technologia sokownicza składa się z obróbki miazgi oraz obróbki soku i na obydwu etapach stosowanie enzymów przynosi wielorakie korzyści. Stosowanie enzymów podczas obróbki miazgi zwiększa wydajność tłoczenia, podnosi jakość soku, pozwala na zmniejszanie zużycia energii oraz zredukowanie o ponad połowę ilości odpadów poprodukcyjnych (wytlóków). Enzymy dodaje się by zredukować lepkość, polepszyć klarowanie, co poprawia parametry filtracji i umożliwia otrzymywanie klarownych i stabilnych koncentratów. W istocie bez użycia enzymów nie można produkować klarownych, skoncentrowanych soków. W sokownictwie wykorzystuje się enzymy rozkładające ściany komórkowe w tym głównie enzymy pektynolityczne, amyloolityczne, celulazy oraz ksylanazy i glukanazy. Zróżnicowana i skomplikowana budowa ściany komórkowej różnych owoców i warzyw decyduje o konieczności stosowania preparatów nieoczyszczonych, zawierających wiele aktywności czasem nawet nie rozpoznanych. O ile stosowanie enzymów pektynolitycznych w sokownictwie datuje się od lat trzydziestych (1), to dopiero w ostatniej dekadzie opisano enzymy rozkładające ramnogalakty (2,3). W charakterze producenta enzymów macerujących najczęściej wykorzystywany jest *Aspergillus niger*, który syntetyzuje oprócz pektynaz także hemicelulazy, celulazy i proteazy. W grupie aktywności pektynolitycznych wyróżnia się aktywności depolimerazowe i esterażowe. Liaza pektynianowa (EC 4.2.2.10) jest enzymem typu endo z powinowactwem do długich, wysokozmetylowanych łańcuchów pektyny i optimum pH 4-5, hydrolizującym wiązania pomiędzy zmetylowanymi resztami galakturonowymi (4). Poligalakturonaza występuje w formach endo (EC 3.2.1.15) i egzo (EC 3.2.1.67) hydrolizując pektyny o stopniu zmetylowania niższym niż 60%, co jest związane z koniecznością poprzedzenia jej akcji katalitycznej demetylacją substratu przez metyloesterazę pektynianową. Endopoligalakturo-



naza gwałtownie obniża lepkość, natomiast forma egzo uwalnia krótkie fragmenty łańcucha od jego nieredukującego końca i nie wpływa znacząco na lepkość. *Aspergillus niger* syntetyzuje obie formy enzymu, przy czym hodowla powierzchniowa, jak się wydaje, jest korzystniejsza od wgłębnej (5,6). Do aktywności depolimerazowych zalicza się także endoarabanazę (EC 3.2.1.99) i egzoarabanazę (EC 3.2.1.55). Enzymy te występują w trzech formach: endoarabanazy (alfa-1,5), egzo A (alfa 1,2; alfa 1,3) i egzo B (alfa 1,3; alfa 1,5). Uważa się, że wysokie aktywności endo i egzo B powodują szybką hydrolizę arabanów i zapobiegają zmętnieniom w koncentratkach soków z jabłek i gruszek. Do aktywności esterazowych oprócz metyloesterazy pektynianowej (EC 3.1.1.11) zalicza się także acetyloesterazę pektynianową (EC 3.1.1.6). Aktywność ta może być niepożądana podczas odzyskiwania aromatów w technologii zagęszczonych soków owocowych (7). Handlowe preparaty pektynaz oferuje większość obecnych na rynku firm enzymatycznych m.in. Gist-Brocades, Novo Nordisk, Solvay Enzymes GmbH, Röhm, Amano, Sankyo, a w Polsce Pektowin Jasło. Przy produkcji soków jabłkowych wydajność tłoczenia można zwiększyć o 5-10% dodając enzym do miazgi, zazwyczaj w dawce 50-200 g/t, natomiast upłynnienie enzymatyczne wycieków przy dwuetapowym systemie tłoczenia AFP (ang. *Advanced Fruit Processing*) powoduje zwiększenie wydajności o kolejne 5-7% (8,9). Podczas obróbki soku, zwłaszcza jabłkowego, stosuje się preparaty bogate w aktywności liazy pektynianowej, poligalakturonazy i metylesterazy pektynianowej. Istotnym parametrem jest stosunek aktywności demetylującej do poligalakturonazowej, zbyt niski spowalnia efekt klarowania, zbyt wysoki powoduje wytrącanie osadów pektynianu wapnia. W procesach tzw. pełnego upłynnienia owoców, który pozwala otrzymywać sok z wydajnością 93-95% zarówno ze świeżych jak i z przechowywanych owoców, stosuje się wyższe dawki enzymów (do 700 g/t), a także dodaje enzymy celulolityczne i endoglukanazy syntetyzowane przez *Aspergillus niger* lub *Trichoderma* sp. (7,10,11). Podczas produkcji soków naturalnie mętnych oprócz aktywności pektynolitycznych istotna jest także aktywność proteolityczna (12). Firma Novo Nordisk oferuje preparat Peelzyme ułatwiający mechaniczne obieranie skórki owoców cytrusowych (13).

## 2. Winiarstwo

Podczas produkcji wina enzymy rozluźniające tkanki roślinne zwiększają wydajność tłoczenia, zwiększają ekstrakcję związków barwnych i aromatów z tkanki, przyspieszają i polepszają klarowanie moszczu, powodują szybszą i spokojną fermentację, zmniejszając pienienie, ułatwiają filtrację, oraz przyspieszają dojrzewanie wina. Ze względu na stosunkowo niski stopień metylacji pektyn winogronowych stosunek aktywności poligalakturonazowej do aktywności liazy pektynianowej jest wyższy w preparatach pektynolitycznych przeznaczonych dla winiarstwa w stosunku do enzymów stosowanych w sokownictwie. Większość firm oferuje specjalne preparaty dla winiarstwa np. Rapidase Vino, Rapidase CB, AR (Gist-Brocades), Vinozym, Ultrazym (Novo



Nordisk), czy Rohapect VR (Röhm). Przy produkcji wina czerwonego zalecana dawka preparatu jest zazwyczaj wyższa (do 40 g/t) niż w przypadku win białych. W preparatach stosowanych podczas produkcji win czerwonych (np. Rapidase Ex Colour, Rohapect VR) występuje zazwyczaj znacząca aktywność kwaśnych proteaz, które przyspieszają uwolnienie antocyjanianów z tkanki. Pektynazy stosuje się także w procesie termowinifikacji, tj. ogrzewania rozdrobnionych owoców w 70°C przez kilka minut. Enzymy dodawane albo przed ogrzewaniem, lub po schłodzeniu miazgi do 45°C, zwiększają wydajność tłoczenia o około 20%. W celu ułatwienia filtrowania wina otrzymanego z owoców porażonych pleśnią *Botrytis cinerea*, która wydziela glukan typu  $\beta$ -1,3;  $\beta$ -1,6, proponowane są preparaty glukanaz z *Aspergillus niger*, np. Suprazym F firmy Gist-Brocades lub z *Trichoderma harzianum* (14) np. Glucanex firmy Novo Nordisk. Oddzielnym problemem przemysłu winiarskiego i owocowo-warzywnego jest zapobieganie procesom utleniania związków polifenolowych w sokach i winach przez endogenną oksydazę polifenolową (tyrozynazę) owoców, oraz przez oksydazę polifenolową syntetyzowaną przez *Botrytis cinerea* (lakkazę). Aktywności te powodujące mętnienie i brązowienie win i soków są niszczone termicznie lub inaktywowane dwutlenkiem siarki. Procesy oksydacyjne można przyspieszyć (15), a kompleksy polifenolowe usunąć przez ultrafiltrację, lub stosując wirówki dękantacyjne (16).

Preparaty enzymów rozluźniających tkanki roślinne znalazły również zastosowanie przy **produkcji kiszonek** (17), w **procesach ekstrakcji barwników i związków zapachowych** (18,19), w **technologii kawy rozpuszczalnej** (20), w **przetwórstwie soi** (21), w **przemysle olejarskim** (22), oraz w piekarstwie, browarnictwie i w przemyśle paszowym.

### 3. Piekarstwo

W technologii piekarskiej stosowane są głównie preparaty enzymów amylolitycznych i proteolitycznych, gdyż głównymi substancjami decydującymi o właściwościach wypiekowych mąki są białka glutenu i skrobia. Poziom aktywności amylolitycznej mąki decyduje o stopniu hydrolizy skrobi w czasie produkcji pieczywa i ma bezpośredni związek z objętością chleba, kolorem skórki, strukturą miększu i podatnością pieczywa na czerstwienie. W technologii ciast biszkoptowych i krakersów, gdzie pożądanym jest tzw. słaby gluten, dodatek enzymów proteolitycznych obniża lepkość ciasta, ułatwia jego mieszenie co daje wymierne oszczędności energii. O aktywności amylolitycznej mąki decyduje łączna aktywność  $\alpha$ - i  $\beta$ -amylazy. Ziarna zbóż zawierają aktywność  $\beta$ -amylazy na poziomie niezależnym od stopnia dojrzałości zarodka, natomiast aktywność  $\alpha$ -amylazy w ziarnie rośnie 1300 – 5000-krotnie w czasie kiełkowania. Łączna aktywność amylolityczna mąki jest uzależniona w znacznym stopniu od klimatu i warunków pogodowych sezonu wegetacyjnego. Zarówno zbyt wysoka jak i zbyt niska aktywność amylolityczna mąki ma negatywne konsekwencje w technologii piekarskiej. Zbyt niską aktywność  $\alpha$ -amylazy w mące można uzupełnić dodatkiem słodu lub grzybowej  $\alpha$ -amy-



lasy z *Aspergillus oryzae*. Preparat tego enzymu w przeciwieństwie do słoðu charakteryzuje jasny kolor, niska aktywność proteolityczna (nie osłabia glutenu) i pełna inaktywacja w temperaturach powyżej 60°C. Zbyt daleko posunięta dekstrynizacja skrobi pogarsza strukturę mięszu, powoduje przebarwienia i kleistość skórki (23). Preparaty handlowe  $\alpha$ -amylazy grzybowej Fungamyl (Novo Nordisk), Amylase P (Gist-Brocades), Depol 243 (Biocatalysts Ltd), Fungal Amylase (Solvay Enzymes GmbH) są zazwyczaj składnikami „polepszaczy” piekarskich.

Białko, jest najistotniejszym składnikiem funkcjonalnym mąki. W czasie miesienia powstały gluten ulega uwodnieniu tworząc specjalną strukturę przestrzenną stabilizowaną mostkami dwusiarczkowymi. Ta struktura decyduje o unikatowych właściwościach reologicznych ciasta. Technologia piekarska ma wiele modyfikacji: jednofazowa, dwufazowa, okresowa i ciągła. Charakteryzuje ją bogactwo asortymentów od pieczywa ciemnego poprzez pieczywo jasne, bułki, bagietki, krakersy i biszkopyt o zróżnicowanych wymaganiach odnośnie do ilości i jakości glutenu. Proteazy grzybowe z *Aspergillus oryzae* wykazujące aktywności zarówno endo- jak i egzoproteinazowe mogą dostarczać aminokwasów, które intensyfikują wzrost populacji drożdży podczas fermentacji, oraz intensyfikują barwę skórki będąc substratem reakcji Maillarda. Dawka preparatu będzie decydować o stopniu rozluźnienia glutenu. Podczas produkcji krakersów stosować można proteazy bakteryjne z *Bacillus subtilis*, które są wysokospecyficznymi endopeptydazami hydrolizującymi wiązania wewnątrz cząsteczki glutenu, powodują spadek lepkości ciasta i większą jego podatność na obróbkę mechaniczną, mniejsze wiązanie wody i krótszy czas wypieku. W technologiach ciągłego, szybkiego wypieku stosuje się związki utleniające (bromian potasu, kwas askorbinowy), oraz redukujące (chlorowodorek cysteiny, siarczyny) mostki dwusiarczkowe glutenu co prowadzi do modyfikacji jego właściwości funkcjonalnych. W technologiach tych stosuje się także dodatek  $\alpha$ -amylazy grzybowej (24). Ustawodawstwo niektórych krajów, oraz ogólne preferencje konsumentów decydują o konieczności eliminowania nienaturalnych dodatków w technologii piekarskiej. Jako zamienniki bromianu potasu proponuje się preparaty oksydazy sulfhydrylowej i glukozowej (25), preparaty hemicelulazy lub celulazy oraz oksydazy glukozowej i sulfhydrylowej (26), oraz amylazy, hemicelulazy, oksydoreduktazy, proteazy i L-cysteinę (27). Do produkcji ciasta krakersowego proponuje się dodatek pentozanaz (28,29), oraz celulaz i hemicelulaz (26). Pentozanazy polepszają także objętość i jakość pieczywa (30). W celu poprawienia właściwości funkcjonalnych ciasta oraz przedłużenia okresu świeżości pieczywa proponuje się dodatki  $\alpha$ -amylazy, glukooamylazy i lipazy (31), laktazy i serwatki (32), oraz ksylanazy (33). Technikami rekombinowanego DNA uzyskano drożdże zawierające gen glukooamylazy, które mogą być wykorzystywane w piekarstwie (34).



#### 4. Piwowarstwo

Podczas zacierania z udziałem surowców niesłodowanych, stosować można  $\alpha$ -amylazy bakteryjne,  $\beta$ -glukanazy oraz proteinyazy. Przy produkcji piwa wysokoodfermentowanego celowe jest dodatek do fermentującej brzeczki gluukoamylazy lub  $\beta$ -amylazy i pullulanazy, natomiast dekarboksylaza  $\alpha$ -acetomleczanu umożliwi przyspieszenie dojrzewania piwa. Enzymy proteolityczne,  $\alpha$ -amylaza oraz  $\beta$ -glukanaza stosowane są do stabilizacji koloidalnej piwa i ułatwienia filtracji, natomiast dodatek oksydazy glukozy do piwa butelkowanego zapobiega zmianom oksydacyjnym w gotowym produkcie (35,36). W klasycznej technologii piwowarskiej sód jęczmienny jest głównym surowcem skrobiowym, a także materiałem wnoszącym wiele aktywności enzymatycznych jak:  $\alpha$ - i  $\beta$ -amylazy, dekstrynaza graniczna, solubilaza  $\beta$ -glukanu,  $\beta$ -glukanaza, endopeptydazy, niezbędnych w procesie zacierania. Ograniczona stabilność enzymów słodowych w wyższych temperaturach pozwala kontrolować stopień rozkładu skrobi, białka i  $\beta$ -glukanu w tym procesie. Główną reakcją enzymatyczną procesu zacierania jest hydroliza skrobi, która zachodzi w temperaturach od 60°C, tj. po przekroczeniu temperatury kleikowania skrobi jęczmiennej. Podczas izotermicznego zacierania w 63 – 65°C amylazy słodowe są stabilizowane jonami wapnia, wysokim stężeniem substratu, oraz optymalnym pH (5 – 6),  $\beta$ -glukanazy wykazują niewielką aktywność resztkową, zaś proteinyazy są inaktywowane. Zaawansowana proteoliza występuje natomiast w metodach dekokcyjnej i infuzyjnej podczas tzw. przerw białkowych (20 min do 2,5 h w temp. 45 – 53°C), które poprzedzają przerwę cukrową (30-90 min w 65 – 66°C). Surowce niesłodowane (głównie kukurydza i ryż) mogą stanowić od 10 do 50% zasypu warzelnego (z wyjątkiem Niemiec, gdzie prawo zabrania ich stosowania). Teoretycznie można sporządzić w pełni wartościową brzeczkę piwną nie stosując siodu, lecz bakteryjne i pleśniowe preparaty enzymatyczne. Dostępne są preparaty  $\alpha$ -amylazy bakteryjnej (BAN 120L, Novo Nordisk; Brewers Amyliq, Gist Brocades; Alfa amylase, Solvay),  $\beta$ -glukanazy bakteryjnej (Cereflo, Novo Nordisk; Filtrase, Gist Brocades),  $\beta$ -glukanazy grzybowej (Beta-glucanase 150L, ABM; Glucanase XL, Biocatalysts Ltd), czy bakteryjnej proteinyazy neutralnej (Neutrase, Novo Nordisk), oraz mieszaniny tych aktywności (Brewers flow, Gist Brocades; Ceremix, Novo Nordisk). W produkcji piwa nisko- oraz bezalkoholowego zacieranie przeprowadza się w temperaturze 72 – 75°C, która inaktywuje  $\beta$ -amylazę słodową, zaś dodatek termostabilnej  $\alpha$ -amylazy bakteryjnej oraz  $\beta$ -glukanazy zapewnia odpowiedni ekstrakt przy niskim stężeniu cukrów fermentujących w brzeczce (37). Aby otrzymać brzeczkę o podwyższonej zawartości cukrów fermentujących celowe jest stosowanie pullulanazy (38) lub gluukoamylazy (39,40) hydrolizujących wiązania  $\alpha$ -1,6 w amylopektynie. Niedawno gen gluukoamylazy z *Aspergillus niger* wbudowano do genomu drożdży piwowarskich (41), zaś izolacja genu  $\beta$ -amylazy jęczmiennej (42) ułatwi selekcję odmian o zróżnicowanej aktywności tego enzymu. W procesie fermentacji drożdże syntetyzują diacetyl, który powstaje podczas spontanicznej dekarboksylacji  $\alpha$ -acetomleczanu, prekursora waliny. Diacetyl nadaje niedojrzałemu piwu



charakterystyczne nieprzyjemne właściwości sensoryczne. W bardzo powolnym procesie związek ten jest przekształcany przez reduktazy drożdżowe do acetoiny. Firma Novo Nordisk oferuje preparat dekarboksylazy  $\alpha$ -acetomleczanu pod nazwą Maturex, który znacząco przyspiesza proces dojrzewania piwa. Alternatywnie stosować można drożdże zmutowane (43) lub transgeniczne (44), które nie syntetyzują diacetylu. Główną frakcją nieskrobiowych polisacharydów jęczmienia stanowią  $\beta$ -glukan oraz pentozany, które są ekstrahowane w procesie zacierania, powodując wzrost lepkości i obniżając wydajność filtracji brzezki i piwa.  $\beta$ -glukanazy na przykład z *Trichoderma* ułatwiają filtrację brzezki i piwa, zwłaszcza gdy do produkcji używa się jęczmienia niesłodowanego (45), zaś ksylanazy mogą być przydatne, gdy stosuje się mąkę pszenną (46). O braku stabilności koloidalnej piwa decydują głównie kompleksy białkowo-taninowe, stąd dodatek enzymów proteolitycznych podczas leżakowania, lub przed filtracją końcową, zapobiega wypadaniu osadów białkowych (47-49). Preparaty rozpuszczalnej lub unieruchomionej oksydazy glukozowej stosuje się w celu obniżenia stężenia tlenu rozpuszczonego w piwie, lub usunięcia tlenu z przestrzeni powietrznej nad cieczą w butelkach i puszkach (50).

## 5. Przemysł skrobiowy i gorzelnictwo

Najwięcej preparatów enzymatycznych stosuje się w przetwórstwie skrobi (około 15% ogólnej wartości sprzedaży preparatów enzymatycznych), w tym głównie w przemyśle syropiarskim oraz w gorzelniach rolniczych (51). Początkowe etapy nowoczesnych technologii stosowanych w tych gałęziach przemysłu są podobne i zawierają mielenie (suche lub mokre) ziarna zbóż, oddzielenie frakcji skrobi, a potem jej enzymatyczne upłynnianie i scukrzanie. W procesie mokrego mielenia ziarna, a zwłaszcza kukurydzy i pszenicy, dodatek celulazy poprawia stopień wydobycia skrobi z ziarna (52), natomiast dodatek fitazy pozwala uzyskać bezfitynianowe namoki zbożowe (53). Wraz z dostępnością  $\alpha$ -amylaz bakteryjnych, zwłaszcza termostabilnych (54) i hipertermostabilnych (55) upłynnianie skrobi realizowane pierwotnie w systemie kwasowym (pH 1,5-2,0; 140 - 150°C; 8 - 10 min), zostało zastąpione systemami kwasowo-enzymatycznymi oraz enzymatycznymi. Najczęściej stosowane jednoetapowe upłynnianie polega na ogrzewaniu zawiesiny skrobi (30 - 45% sm; pH 5,8 - 6,2) z dodatkiem termostabilnej  $\alpha$ -amylazy i 75 - 100 ppm jonów wapniowych, strumieniem pary w 105 - 107°C, przez 5-8 min, nagłe schłodzenie do 95°C, powtórny dodatek enzymu i dekstrynizację. Rynek preparatów enzymatycznych oferuje termostabilne  $\alpha$ -amylazy syntetyzowane przez *Bacillus licheniformis* (preparaty: Thermamyl, Novo Nordisk; Optitherm, Solvay Enzymes GmbH) oraz przez *Bacillus stearothermophilus* (56; preparaty: G-Zyme G995, Enzyme Bio System Inc.; Nervanase HT, Rhone-Poulenc; Enzeco, Enzyme Development Corporation). Carroll i wsp. (57) twierdzą, że najlepsze efekty upłynniania osiągnąć można stosując oba typy preparatów w odpowiedniej proporcji.  $\alpha$ -amylazy w znaczącym stopniu przeprowadzają



także hydrolizę niektórych rodzajów natywnej, nieskleikowanej skrobi (58,59). Sugeruje się również, że poprzez modyfikacje genetyczne  $\alpha$ -amylazy (60), lub dodatek antyoksydantów (61) można znacząco obniżyć pH upłynniania, oraz że dodatek fitazy zwiększa termostabilność  $\alpha$ -amylazy (62). Obniżenie pH do 4,2 – 4,5 jest konieczne podczas scukrzania glukoamylazą z *Aspergillus niger* upłynnionej skrobi do glukozy. Proces prowadzi się przy dawce glukoamylazy od 0,5 do 1,1 l/t suchej masy skrobi, w 60°C, w reaktorach z mieszadłem przez 48-96 godzin, zazwyczaj do uzyskania stopnia scukrzania (DE) 94-96. W niektórych modyfikacjach technologii można uzyskać DE powyżej 98 (63). Oprócz klasycznych glukoamylaz z *Aspergillus niger* (preparaty: Optidex, Solvay Enzyme GmbH; Amigase, Gist-Brocades) stosowane są, zwłaszcza na Dalekim Wschodzie, glukoamylazy z *Rhizopus* (preparaty: Gluczyme, Amano; Glucozyme, Nagase) dla których optymalna temperatura reakcji wynosi 50°C, oraz pH 4,5 – 5,0. Glukoamylaza hydrolizuje wiązania  $\alpha$ -1,6 amylopektyny znacznie wolniej niż wiązania  $\alpha$ -1,4, dlatego proces scukrzania można przyspieszyć dodając enzymu degradującego rozgałęzienia w amylopektynie (64). Dostępne są preparaty pullulanazy Pulluzyme, Rhone-Poulenc lub Promozyme, Novo Nordisk. Niektóre firmy oferują gotowe mieszaniny glukoamylazy i pullulanazy (preparaty: Ambazyme P20, Rhone-Poulenc; Dextrozyme, Novo Nordisk). Aktywność lizofosfolipazy obniża lepkość i ułatwia filtrację syropu skrobi pszennej (65), natomiast fosfataza kwaśna przyspiesza scukrzanie skrobi ziemniaczanej (66). W procesie otrzymywania syropów maltozowych (42% maltozy) i wysokomaltozowych (do 60% maltozy) maltodekstryny scukrza się zazwyczaj maltogenną  $\alpha$ -amylazą z *Aspergillus oryzae* lub  $\beta$ -amylazą słodową. Syropy wysokiej konwersji zawierające głównie glukozę (około 30%) i maltozę (około 43%) otrzymuje się prowadząc scukrzanie w obecności glukoamylazy i  $\alpha$ -amylazy pleśniowej (67,68).

W latach siedemdziesiątych skomercjalizowano proces enzymatycznej izomeryzacji glukozy do fruktozy z udziałem bakteryjnej izomeryazy glukozowej (69). Proces ten stał się z czasem klasycznym przykładem wykorzystania enzymu unieruchomionego w reaktorze kolumnowym. Odpowiednio oczyszczony i zateżony syrop glukozowy podlega korekcji pH do 8,0 – 8,2, dodawane są jony magnezu lub kobaltu, substrat jest stabilizowany dwutlenkiem siarki i pompowany na kolumnę z unieruchomioną izomerazą glukozową. Produkt reakcji tzw. syrop wysokofruktozowy (HFS) zawiera od 42 do 45% fruktozy (70). Podejmowano i podejmowane są nadal próby unieruchamiania  $\alpha$ -amylazy (71), glukoamylazy (72,73), łącznego unieruchomienia glukoamylazy, pullulanazy i izomeryazy glukozowej (74), lecz niska wydajność i mała stabilność biokatalizatorów uniemożliwiają przemysłową konwersję skrobi w systemie ciągłym (75). W gorzelnictwie rolniczym skrobia odmiennego pochodzenia, w różnym stopniu scukrzona, jest fermentowana przez drożdże do etanolu. Na szczególną uwagę zasługują technologie ciągłe równoczesnego scukrzania i odfermentowania (76), zwłaszcza skrobi natywnej (77), oraz technologie wykorzystujące unieruchomione drożdże (78). Obserwuje się także dynamiczny rozwój technologii scukrzania wielocukrów roślinnych innych niż skrobia (celuloza, ligniny, inulina) z równoczesną fermentacją etanolową



wytworzonych cukrów (79-82). Interesujące, jak się wydaje, są pomysły produkcji trehalozy ze skrobi (83), syropów maltoheksaazowych (84), nadprodukcji glukoamylazy przez *Trichoderma* (85), oraz wytwarzania etanolu ze słomy ryżowej (86).

## 6. Mleczarstwo

W mleczarstwie preparaty enzymatyczne stosuje się od 1874 r. gdy duńska firma Christian Hansen A/S wprowadziła na rynek preparat podpuszczki cielejącej — proteiny ścinającej skrzep kazeinowy w technologii serów dojrzewających. Obecnie, oprócz proteinaz koagulujących, które wpływają również na cechy sensoryczne i teksturę serów, stosuje się lipazy wzbogacające aromat serów dojrzewających,  $\beta$ -galaktozydazę do hydrolizy laktozy serwatki i mleka, lizozym do hamowania fermentacji masłowej, oraz katalazę w procesie enzymatycznej pasteryzacji mleka. Oprócz podpuszczki (chymozyny) zwierzęcej na rynku oferuje się koagulanty mikrobiologiczne syntetyzowane przez *Mucor* sp. oraz preparaty syntetyzowane przez transgeniczne bakterie zawierające gen chymozyny (87,88). W Portugalii stosuje się podpuszczki roślinne ekstrahowane z kwiatów *Cynara cardunculus* (89). W preparatach podpuszczki, wysoce specyficznej aktywności chymozyny towarzyszą aktywności proteinaz niespecyficznych (np. pepsyna), które wpływają negatywnie na wydajność koagulacji i sprzyjają wytwarzaniu gorzkich peptydów w czasie dojrzewania sera (90,91). Chymozynę można oczyścić z innych proteinaz metodą chromatografii jonowymiennej (92). Aktywności esterazowe, które mogą być źródłem niepożądanych zapachów podczas dojrzewania sera można usunąć z preparatu podpuszczki mikrobiologicznej przez zakwaszenie do pH 2 i ogrzewanie w 50°C (93). Poprzez mutację szczepu *Mucor pusillus* obniżono zbyt wysoką termostabilność chymozyny syntetyzowanej przez ten organizm (94). Kuraishi i wsp. (95) twierdzą natomiast, że dodatek aktywności transglutaminazy podnosi wydajność ścinania skrzepu podpuszczką. W złożonych i długotrwałych procesach dojrzewania serów udział biorą zarówno chymozyna (96), bakterie fermentacji mlekowej (97), jak też lipazy różnego pochodzenia (98). Dodatek preparatu lipazy pozwala na pewne skrócenie procesu dojrzewania, oraz wpływa dodatnio na cechy sensoryczne produktu. Stosuje się zarówno pregastryczne lipazy zwierzęce (99) jak i enzymy mikrobiologiczne (100). W procesie otrzymywania naturalnych substancji zapachowych stosowanych w serowarstwie wykorzystywane są także proteazy (101). Stosowanie lizozymu umożliwia kontrolę fermentacji masłowej w technologii serów Edam i Gouda (102), produkcję substancji immunostymulujących z żywych komórek *Lactobacillus bulgaricus* (103), oraz zwiększenie wydajności ściania skrzepów kazeinowych podpuszczką (104).

Enzymatyczna hydroliza laktozy w serwatce lub mleku jest procesem realizowanym od lat siedemdziesiątych, albo w reaktorach z mieszadłem, albo w systemie ciągłym z wykorzystaniem unieruchomionej  $\beta$ -galaktozydazy (105,106). W produkcji syropów serwatkowych najczęściej stosowany jest



enzym z *Aspergillus* sp. ze względu na dogodnie optimum pH. Syropy serwatkowe mają liczne zastosowania w piekarstwie, ciastkarstwie i przy produkcji napojów bezalkoholowych. Znane są również technologie otrzymywania kwasu mlekowego (107), hydrolizatów białkowych (108), oraz syropów fruktozowych z serwatki (109). Przypuszczać należy, że dokonana ostatnio synteza cDNA  $\beta$ -galaktozydazy z *Aspergillus niger* (110) przyczyni się do dalszego postępu w wykorzystaniu tego enzymu. Czynnione są próby modyfikacji genomu ssaków tak by ich mleko zawierało pożądane związki biologicznie czynne (111,112).

W obecnej dekadzie najbardziej dynamiczny rozwój enzymologii występuje bez wątpienia w **przemśle paszowym**. W żywieniu zwierząt monogastrycznych stosowane są z powodzeniem kolejne generacje fitazy, ksylanazy oraz  $\beta$ -glukanazy. Złożone zagadnienia hydrolizy fitynianów oraz nieskrobiowych niestrawnych polisacharydów w przewodzie pokarmowym ptaków będą przedmiotem odrębnego opracowania z uwagi na mnogość literatury dotyczącej tych zagadnień. Wspomnieć także należy o innych pracach przeglądowych, w których opisane są poruszane w artykule zagadnienia (113-116).

## Literatura

1. Kertesz Z., (1930), US Patent Nr 1932833.
2. Schols H., Geraeds C., van-Leeuwen M., Kormelik F., Voragen A., (1990), Carbohydr. Res., 206, 105.
3. Musters W., Stam H., Suykerbuyk M., Visser J., Verbakel J., (1997), US Patent Nr 5591620.
4. Harmsen J. A., Kusters-van Somere M. A., Visser J., (1990), Curr. Genet., 18, 161.
5. Acuna-Arguelles M. E., Gutierrez-Rojas M., Viniegra-Gonzales G., Favela-Tores E., (1995), Appl. Microbiol. Biotechnol., 43, (5) 808.
6. Maldonado M. C., Strasser de Saad A. M., (1998), J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 20, 34.
7. Strobel R. G. H., Pultinas E. P., Vatter M. L., (1990), US Patent Nr 4971811.
8. Dorreich K. A., (1984), US Patent Nr 4483875.
9. Grassin C., (1992), Flüssiges Obst., 59, 7, 418.
10. Posorske L. H., (1983), US Patent Nr 4371552.
11. Wu W., (1998), US Patent Nr 5738887.
12. Wobben H. J., Tan H. B., (1983), US Patent Nr 4388330.
13. Baker R. A., Grohmann K., (1995), Fruit Process., 10, 332.
14. Villettaz J. C., (1984), US Patent Nr 4439455.
15. Perletti F., Collareda E., Collareda B., (1992), US Patent Nr 5112627.
16. Beveridge T., (1997), Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 37, (5), 449.
17. Evans C. T., Mann S. P., Charley R. C., Parfitt D., (1995), US Patent Nr 5432074.
18. Holst L. T., Bownds C., Craven R., Sauvageat J. L., (1995), US Patent Nr 5435809.
19. Belin J. M., Dumont B., Ropert F., (1998), US Patent Nr 5705372.
20. Nicolas P., Raetz E., Raymond S., Sauvageat J. C., (1998), US Patent Nr 5714183.
21. Uhlig H., (1972), US Patent Nr 3640723.
22. Dominguez H., Nuñez M. J., Lema J. M., (1994), Food Chem., 49, 271.
23. Gams T. C., (1976), Getreide Mehl und Brot, 30, 113.
24. de Stefanis V. A., Erickson R. W., Ranum P. M., (1987), US Patent Nr 4642237.
25. Vaisanen S., Haarasilta S., Scott D., (1996), US Patent Nr 5547690.



26. Haarasilta S., Pullinen T., Tammersalo-Karsten I., Vaisanen S., Franti H., (1993), US Patent Nr 5176927.
27. Fok J. J., Hille J. D. R., van der Veen B., (1995), US Patent Nr 5451413.
28. Craig S. A. S., Mathewson P. R., Otterburn M. S., Slade L., Levine H., Deihl R. T., Beehler L. R., Verduin P., Magliacano A. M., (1991), US Patent Nr 5108764.
29. Slade L., Levine H., Craig S., Arciszewski H., (1994), US Patent Nr 5362502.
30. Krishnarau L., Hosney R. C., (1994), J. Food Sci., 59,1251.
31. Vidal F. D., Gerrity A. B., (1979), US Patent Nr 4160848.
32. Morrison B. W., (1985), US Patent Nr 4522832.
33. Schulein M., Halkier T., Heldt-Hansen H. P., Dalb O., Pedersen L. S., (1997), US Patent. Nr 5610048.
34. Yocum R. R., Daves R. S., Chen M. C., (1995), US Patent Nr 5422267.
35. Bamforth C. W., (1985), *Brewers Guardian*, 9.
36. Slaughter J. C., (1985), *Enzymes in the Brewing Industry*, in: *Alcoholic Beverages*, Eds. Birch G. G., Lindley M. G., Elsevier Applied Science Publishers, London, New York, 15.
37. Owades J. L., (1988), US Patent Nr 4765993.
38. Liene W. F., Chaudhary V. K., Chicoye E., Mizerak R. J., (1982), US Patent Nr 4355047.
39. Duncombe G. R., Line W. F., Chicoye E., (1984), US Patent Nr 4430348.
40. Plainer H., Sproessler B., Uhlig H., (1987), US Patent Nr 4684525.
41. Tang G., Zhong L., Yang K., Zheng Y., Cao X., (1996), *Chin. J. Biotechnol.*, 12, 263.
42. Yoshigi N., Okada Y., (1998), US Patent Nr 5726057.
43. Gjermassen C., Nilsson-Tillgren T., Petersen J. G., Kielland-Brandt M. C., Sigsgaard P., Holmberg S., (1988), *J. Basic Microbiol.*, 28,175.
44. Suihko M. L., Blomquist K., Pennttila M., Gisler R., Knowles J., (1990), *J. Biotechnol.*, 14, 285.
45. James A. E., Fare G., Sagar B. F., Lucas F., Mitchell I. D., (1975), US Patent Nr 3880742.
46. Ducroo P., (1988), US Patent Nr 4746517.
47. Horiuhi G., Yabuuchi S., Suzuki S., Amaha M., (1980), US Patent Nr 4181742.
48. Bilinski C., Choi H., Mussar K., (1991), US Patent Nr 5035902.
49. Etok C. A., Eka O. U., (1996), *J. Basic Microbiol.*, 36, 83.
50. Preels J. P., Maschelein C., Heilporn M., (1991), US Patent Nr 5010007.
51. Mittal G. S., (1992), *Food Biotechnology. Techniques and Applications*, Technomic Publishing Co Inc., Lancaster, USA.
52. Silver S. L., (1989), US Patent Nr 4795101.
53. Caransa A., Vaara T., Vaara M., Simell M., Lehmuussari A., (1988), US Patent Nr 4914029.
54. Tamuri M., Kanno M., Ishii Y., (1981), US Patent Nr 4284722.
55. Antranikian G., Koch R., Spreinat A., (1994), US Patent Nr 5370997.
56. Brum P. L., (1991), US Patent Nr 5010008.
57. Carrol J. O., Swanson T. R., Trackman P. C., (1990), US Patent Nr 4933279.
58. Leach H. W., Hebeda R. E., Holik D. J., (1978), US Patent Nr 4113509.
59. Dwiggin B. L., Pickens C. E., Niekamp C. W., (1986), US Patent Nr 4618579.
60. Barnett C. C., Mitchinson C., Requadt C. A., (1998), US Patent Nr 5824532.
61. Antrim R. L., Solheim L. P., (1994), US Patent Nr 5322778.
62. Antrim R. L., Mitchinson C., Solheim L. P., (1998), US Patent Nr 5756714.
63. McMullen W. H., Andino R., (1977), US Patent Nr 4017363.
64. Coleman R. D., McAlister M. P., (1986), US Patent Nr 4612287.
65. Konietzny-Janda G., Richter G., (1992), *Starch/Stärke*, 43, 308.
66. Żyła K., (1990), *Acta Biotechnol.*, 10, 445.
67. Dziedzic S. Z., Kearsley M. W., (1984), *Glucose syrups: Science and Technology*, Elsevier Applied Science Publishers, London, New York.
68. Guzman-Maldonado H., Paredes-Lopez O., (1995), *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35, 373.
69. Takasaki Y., Tanabe O., (1971), US Patent Nr 3616221.
70. Bhosale S. H., Rao M. B., Deshpande V. V., (1996), *Microbiol. Rev.*, 60, (2), 280.



71. Kimura T., Ogata M., Noguchi M., Nakakuki T., Yoshida M., Miwa T., (1992), US Patent Nr 5130243.
72. Hebeda R. E., Holik D. J., Leach H. W., (1979), US Patent Nr 4132595.
73. Zanin G. M., de Moraes F. F., (1998), Appl. Biochem. Biotechnol., 383, 70-72.
74. Colilla W., Lloyd N. E., (1978), US Patent Nr 411750.
75. Shankar V., Nehete P. N., Kothari R. M., (1993), Ind. J. Biochem. Biophys., 30, 62.
76. Zinnamosca F., Berruti M., (1996), US Patent Nr 5545543.
77. Singh D., Dahiya J. S., Nigam P., (1995), J. Basic Microbiol., 35, 117.
78. Gaddy J. L., Sitton O. C., (1982), US Patent Nr 4355108.
79. Fournier R. L., Varanasi S., Byers J. P., (1993), US Patent Nr 524468.
80. Ohta K., Hamada S., Nakamura T., (1993), Appl. Environ. Microbiol., 59, 729.
81. Wood B. E., Aldrich H. C., Ingram L. O., (1997), Biotechnol. Prog., 13, 232.
82. Wu A., Lee Y. Y., (1998), Appl. Biochem. Biotechnol., 70-72, 479.
83. Nacada T., Chaen H., Sugimoto T., Miyake T., (1998), US Patent Nr 5714368.
84. Inglet G. E., (1993), US Patent Nr 5266467.
85. Torkkeli T., Joutsjoki V., Torkkeli H., Vainio A., Fagerstrom R., Aho S., Korhola M., Nevalainen H., (1997), US Patent Nr 5665585.
86. Chadha B. S., Kanwar S. S., Saini H. S., Garcha H. S., (1995), Acta Microbiol. Immunol. Hung., 42, 53.
87. Alford B. L., Mao J. I., Moir D. T., Taunton-Rigby A., Vovis G. F., (1996), US Patent Nr 5525484.
88. Venera D. D., Machalinski C., Zummaraga H., Biscoglio de Jimenez Bonino, M. J., (1997), Appl. Biochem. Biotechnol., 68, 207.
89. Heimgartner U., (1990), Phytochem., 29, 1405.
90. Habibi-Najafi M. B., Lee B. H., (1996), Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 36, (5), 397.
91. Krauze W., Partzsch M., Hassan Z. M., Haufe T., (1998), Nahrung, 42, (3-4), 162.
92. Heinsohn H. G., Lorch J. D., Hayenga K. J., Arnold R. D., (1992), US Patent Nr 5139943.
93. Beppu T., (1994), J. Biotechnol., 32, (1), 17.
94. Yamashita T., Higashi S., Higashi T., Machida H., Iwasaki S., Nishiyama N., Beppu T., (1994), US Patent Nr 5332668.
95. Kuraishi C., Sakamoto J., Soeda T., Kuiawasaki M., (1997), US Patent Nr 5681598.
96. Farkye N. Y., (1995), Adv. Exp. Med. Biol., 367, 195.
97. Steele J. L., (1995), Adv. Exp. Med. Biol., 367, 209.
98. Fox P. F., Wallace J. M., Morgan S., Lynch C. M., Niland E. J., Tobin J., (1996), Antonie van Leeuwenhoek, 70, (2-4), 271.
99. Barach J. T., Talbott L. L., (1987), US Patent Nr 4707364.
100. Arbige M. V., Neubeck C. E., (1988), US Patent Nr 4726954.
101. Kratzky Z., Vadehra D. V., (1992), US Patent Nr 5211972.
102. Wigley R. C., (1996), *Cheese and whey*, in: *Industrial Enzymology*, Eds. Godfrey T., West S., Stockton Press, New York.
103. Link H., Pahud J. J., (1993), US Patent Nr 5185321.
104. Giangiacomo R., Nigro F., Messina G., Cattaneo T. M., (1992), Food Addit. Contam., 9, (5), 427.
105. Ottofrickenstein H., Pleiner H., Sprossler B., Uhlig H., (1986), US Patent Nr 4622300.
106. Illanes A., Zuniga M. E., Ruiz. A., (1990), Arch. Biol. Med. Exp., 23, 159.
107. Tuchenhagen J., Roiner F., Grosserhode J., (1982), US Patent Nr 4364962.
108. Thibault P. A., (1989), US Patent Nr 4981704.
109. Chiu C. P., Kosikowski F. V., (1986), J. Dairy Sci., 69, 959.
110. Huang Y., Karatzas C. N., Lazaris-Karatzas A., Delaquis A., (1998), US Patent Nr 5821350.
111. Clark A. J., Lathe R., (1994), US Patent Nr 5322775.
112. Anonim, (1998), US Patent Nr 5780009.
113. Sawicka-Żukowska R., (1998), Przem. Spoż., 52, 3, 19.
114. Grajek W., Malepszy S., (1998), Przem. Spoż., 52, 2, 17.



115. Warchalewski J. R., (1997), *Materiały konferencji pt. Surowce uzupełniające i materiały pomocnicze stosowane w produkcji żywności*, Akademia Ekonomiczna, Wrocław, 37.
116. Jennylynd J., Simpson B. K., (1996), *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36, 5, 437.

## Application of enzymes in selected branches of food industry

### Summary

Food industry has taken advantage of enzymes as processing aids for more than fifty years. Enzymes, however, still offer an exciting potential for improvements in food processing. This review covers current trends in industrial applications of enzymes in selected branches of food technology. Applications of pectinases and other macerating enzymes in fruit and vegetable processing and in wine technology are discussed. Examples of successful enzymes applications are given in relation to baking and brewing. Also, details of enzymatic starch conversion are provided in the production of syrups and ethanol. Finally, applications of milk coagulating proteinases, lipases and lactase in the production of cheese and in whey processing are addressed. Based on the latest literature and patent data, the review also embraces novel enzyme applications in food industry.

### Key words:

food technology, enzyme applications, fruit juice, wine, baking, brewing, starch, ethanol, cheese, whey.

### Adres do korespondencji:

Krzysztof Żyła, Katedra Biotechnologii Żywności, Akademia Rolnicza, al. 29-Listopada 46, 31-425 Kraków, e-mail: rrzyla@kinga.cyf-kr.edu.pl