Primjena industrijskih enzima u proizvodnji hrane

Trbojević, Radovan

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:624376

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Radovan Trbojević

Primjena industrijskih enzima u proizvodnji hrane

završni rad

Osijek, 2014.

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Završni rad

Primjena industrijskih enzima u proizvodnji hrane

Nastavni predmet

Osnove biotehnologije

Predmetni nastavnici: izv. prof. dr. sc. Vinko Krstanović

doc. dr. sc. Natalija Velić

Student: **Radovan Trbojević** **(MB: 3189/09)**

Mentor: doc. dr. sc. Natalija Velić

Predano (datum): 24. rujna 2014.

Pregledano (datum): 06. listopada 2014.

Ocjena: **Potpis mentora:**

Primjena industrijskih enzima u proizvodnji hrane

Sažetak

Enzimi su proteini velike molekularne mase koje proizvode svi živi organizmi. Oni selektivno ubrzavaju kemijske reakcije koje su dio životnog ciklusa kao što je probava, disanje, metabolizam i proizvodnja tkiva. Enzimi djeluju u manje ili više blagim uvjetima, što ih čini idealnim katalizatorima za primjenu u procesima proizvodnje hrane. Posebnu skupinu enzima čine industrijski enzimi, koji su posebno prilagođeni za uporabu u industriji. Njihova funkcija u industriji ovisi o kontekstu u kojemu se koriste, primjerice mogu se koristiti kao specifični katalizatori, kao pospješitelji metaboličkih reakcija, itd. Primarna svrha korištenja industrijskih enzima je unaprjeđenje određenih pozitivnih svojstava proizvoda, koja se smatraju poželjnima, uz istovremeno otklanjanje nepoželjnih i odbojnih svojstava proizvoda. Trenutno se koriste u djelatnostima poput tekstilne industrije, lake industrije i prehrambene industrije. Industrijski enzimi su najčešće mikrobnog podrijetla, iako se ponekad koriste enzimi biljnog ili životinjskog podrijetla. Najznačajnije skupine enzima u industrijskoj primjeni danas su: amilaze, pektinaze, proteaze, celulaze, invertaze i lipaze.

Ključne riječi: enzim, industrijski enzimi, prehrambena industrija

Industrial Enzymes in Food Production

Summary

Enzymes are large biological molecules that are produced by all living organisms. They speed up chemical reactions selectively as part of essential life processes such as digestion, respiration, metabolism and tissue maintaince. The enzymes work under mild conditions making them ideal catalysts to use in food technology. Special group of enzymes are industrial enzymes that are specifically designed for application in the industry. Their function depends mainly on the context in which they are used, for example they can be used in the function of a specific catalyst, or as an accelerator of the metabolic reactions. Their primary role is the strengthening of certain positive properties of products, properties which are wanted, and at the same time, removal of unwanted and bad properties. They are currently used in several industrial fields, most importantly in: textile industry, food industry and light industry. The most frequent origin of enzymes is microbial, even though plant and animal enzymes are sometimes used. Currently, as of today, the most used and therefore most dominant types of industrial enzymes in application are the following six groups: amylases, pectinases, proteinases, cellulases, invertases and lypases.

Key words: enzyme, industrial enzymes, food industry

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Enzimi 2

3. Industrijski enzimi 5

3.1. Podrijetlo i proizvodnja industrijskih enzima 6

3.2. Prednosti i nedostaci primjene enzimskih pripravaka 9

3.3. Čuvanje i sigurnost enzimskih pripravaka 9

4. Primjena industrijskih enzima u prehrambenoj industriji 11

4.1 Pekarstvo 12

4.2 Proizvodnja konditorskih proizvoda 12

4.3 Proizvodnja vina i piva 13

4.4 Proizvodnja sokova 14

4.5 Enzimi u proizvodnji pirea, juha i prahova 15

4.6 Enzimi u mesnoj i mliječnoj industriji 15

5. Zaključak 17

6. Literatura 18

1. Uvod

U posljednja dva desetljeća, rijetko koji proizvod je imao tako široku uporabu od strane različitih industrija kao industrijski enzimi. Zahvaljujući enzimima, biotehnološki postupci proizvodnje postali su svakodnevica u različitim djelatnostima. U početku su se uglavnom koristili enzimi biljnog i životinjskog podrijetla, dok se danas većinom koriste enzimi mikrobnog podrijetla. Učinci industrijskih enzimskih pripravaka su mnogobrojni, a zajednička im je karakteristika da dovode do poboljšanja poželjnih svojstva proizvoda. Određene grane prehrambene industrije u potpunosti ovise o enzimima te bi se kakvoća mnogih proizvoda znatno pogoršala bez upotrebe enzimskih pripravaka. Zbog nezamjenjivosti enzima u proizvodnim procesima prehrambene industrije, kontinuirano se provode istraživanja s ciljem daljnjeg unaprjeđenja proizvodnje industrijskih enzima.

2. Enzimi

Enzimi su biokatalizatori koji imaju ključnu ulogu u svim biokemijskim reakcijama koje se događaju u kompleksnim živim sustavima. Nastaju unutar živih stanica, pri čemu razlikujemo unutarstanične i vanstanične enzime. Unutarstanični, kako im ime govori, nalaze se unutar stanice u citoplazmi ili vezani za staničnu stijenku. Vanstanične enzime stanica nakon sinteze izlučuje u okolni vanstanični prostor. Važna osobina svih enzima njihova su katalitička moć i specifičnost. Brzine reakcija kataliziranih enzimima su izrazito velike, obično 10^6-10^{12} puta veće nego nekatalizirane reakcije. Enzimi su visokospecifični i po reakciji koju kataliziraju i po izboru reaktanata koji se zovu supstrati. Enzim obično katalizira samo jednu kemijsku reakciju ili skup vrlo srodnih reakcija. Specifičnost za supstrat najčešće je visoka, a katkada i potpuna (Stryer, 1991.).

Godine 1913. Leonor Michaelis i Maud Menten predložili su jednostavan model za odvijanje enzimske reakcije. Prema tom modelu enzim E spaja se sa supstratom **S** i nastaje kompleks ES koji može disocirati u E i S ili se može prevesti u E i produkt P. Ovisnost brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata iskazana je Michaelis-Menten jednadžbom:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

gdje je *v* brzina reakcije, V_{max} maksimalna brzina reakcije koja se može postići pri određenoj koncentracije enzima, K_m Michaelisova konstanta koja je jednaka koncentraciji supstrata kod koje je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine ($V_{max}/2$), a [S] koncentracija supstrata. Ovaj najjednostavniji model opisuje brzinu katalize velikog broja jednostavnih enzimskih reakcija koje uključuju samo jedan supstrat (*single-substrate*), uz uvjet ustaljenog stanja (*steady state*) i za neimobilizirane enzime (enzime u otopinama). Razvijeni su i brojni drugi modeli koji uzimaju u obzir imobilizacijska ograničenja, reakcije u koje su uključena dva supstrata (*bi-bi* reakcije), alosteričke enzime, kao i modeli koji opisuju kinetiku inhibiranog enzima. Selektivnost enzima kao katalizatora temelji se na odnosu enzima i supstrata, koji se često opisuje mehanizmom ključ-brava.

Prema tipu reakcije koje kataliziraju enzimi se mogu podijeliti u šest skupina:

- ***oksidoreduktaze*** kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije u bioprocesima
- ***transferaze*** kataliziraju reakcije u kojima dolazi do premještanja različitih grupa s jedne molekule na drugu
- ***hidrolaze*** su najveća skupina, kataliziraju reakcije hidrolize
- ***liaze*** kataliziraju reakcije u kojima se supstrat raspada na dvije komponente i reakcije eliminacije uz stvaranje dvostruke veze ili adicije na dvostruku vezu.
- ***izomeraze*** kataliziraju reakcije izomerizacije kao što su C=C veze, cis-trans izomerizacija i racemizacija
- ***ligaze*** kataliziraju reakcije nastajanja novih spojeva uz pomoć energije oslobođene razgradnjom neke treće komponente

Većina industrijskih enzima koji su danas u primjeni ubrajaju se u skupinu hidrolaza, posebice u prehrambenoj industriji (Kirk i sur., 2002.).

Najvažniji čimbenici koji utječu na aktivnost enzima su koncentracija supstrata, pH i temperatura. Enzimske reakcije obično se zbivaju pri relativno blagim uvjetima temperature i pH, dok pri ekstremnim uvjetima dolazi do denaturacije enzima zbog njegove proteinske prirode i do gubitka enzimske aktivnosti. U usporedbi s kemijskim katalizatorima, enzimi kao biokatalizatori pokazuju mnoge prednosti, osim već navedenog djelovanja pri blagim uvjetima. Enzimi su kompleksni, visoko aktivni, obnovljivi, stereospecifični, djeluju na velik broj supstrata pri blagim uvjetima u vodenim otopinama te su biorazgradljivi. Zahtijevaju mali utrošak energije u procesu uz malu razvijenu količinu topline. Međutim, mnogo su labilniji od kemijskih katalizatora te relativno lako podliježu toplinskoj ili drugoj inaktivaciji i denaturaciji (Matošić, 1991.).

Iako su enzimi vrlo djelotvorni, visoka cijena izolacije i pročišćavanja te smanjenje aktivnosti uslijed promjene reakcijskih uvjeta ili inhibicija supstratom/produktom, još uvijek ograničava njihovu upotrebu u različitim granama industrije. Zbog toga se vrlo često enzimi upotrebljavaju u imobiliziranom obliku. Imobilizacija je karakterizirana vezanjem biokatalizatora u određenom ograničenom prostoru s ciljem njegove duže, odnosno kontinuirane upotrebe, obično u obliku netopljivom u vodi. Cilj je ovog postupka stabiliziranje katalitičkog potencijala jednog ili više enzima u točno definiranom obliku optimalnom za tehnološku ili analitičku upotrebu. Osnovne prednosti imobiliziranih enzima (biokatalizatora) su visoka selektivnost, kontinuirano vođenje procesa, mogućnost zaustavljanja reakcije i uklanjanje biokatalizatora iz

reakcijske smjese, nema kontaminacije reakcijske smjese s biokatalizatorom te u mnogim slučajevima dolazi do stabilizacije enzima imobilizacijom. Nedostatak je gubitak dijela enzimske aktivnosti tijekom imobilizacijskog postupka. Industrijski procesi primjene imobiliziranih enzima uglavnom se odnose na provođenje relativno jednostavnih reakcija hidrolize ili izomerizacije s jednim enzimom. Poseban nedostatak za industrijsku primjenu je teško provođenje reakcija koje zahtijevaju regeneraciju kofaktora ili izvora energije. Biosintetske i stupnjevite reakcije se ne provode izoliranim enzimima već isključivo primjenom imobiliziranih cijelih stanica (Matošić, 1991).

3. Industrijski enzimi

Enzimi su svoju primjenu našli u tri temeljne grane: prehrambenoj industriji, lakoj industriji i poljoprivredi (Duvnjak, 1984a).

Moderni enzimi mogu se podijeliti u dvije skupine:

1. Komercijalni enzimski pripravci
2. Pročišćeni enzimski pripravci za upotrebu u farmaciju i znanosti (Marić, 2000.)

U prvoj skupini se uglavnom nalaze manje pročišćeni enzimski pripravci, koji su praškasti ili u tekućem obliku te se prodaju u velikim količinama (Duvnjak, 1984a.). Druga skupina enzima su uglavnom maksimalno pročišćeni i kristalizirani enzimi za znanstvenu upotrebu, koji se prodaju u malim količinama. U prehrambenoj industriji se uglavnom primjenjuju oni iz prve skupine. Enzimski pripravci mogu biti tekući, praškasti ili vezani za nosače. Najčešće se upotrebljavaju tekući enzimski pripravci s velikom koncentracijom enzima, jer su aktivniji, sigurniji i jeftiniji. Pokušava se izbjeći upotreba praškastih pripravaka zbog opasnosti od prašenja, otežanog rukovanja i općenito manje sigurnosti pri radu s njima (Marić, 2000.)

Najpoznatiji i najstariji enzimi iz skupine komercijalnih enzimskih pripravaka su kimozin koji je životinjskog podrijetla i dijastaza koja je biljnog podrijetla. Kimozin se dobivao ekstrakcijom iz želuca teladi, dok se dijastaza dobivala ekstrakcijom proklijala ječmenog zrna. Prvi se koristio za koagulaciju mlijeka kod sireva, a drugi kao smjesa amilolitičkih enzima za ošećerenje škroba (Marić, 2000.) U periodu od 1950. do 1960., na tržište enzima se sve više probijaju enzimi mikrobnog podrijetla, jer su jeftiniji, isplativiji i veće čistoće (Kirk i sur., 2002.). Proizvodnja komercijalnih enzimskih pripravka zahtijeva primjenu znanja iz mikrobiologije, genetike, biokemije i inženjerstva. Zahtjevi za razvojem i proizvodnjom novih enzimskih pripravka proizlaze iz nedovoljne učinkovitosti komercijalno dostupnih pripravka. Najveći utjecaj na razvoj proizvodnje industrijskih enzima imalo je genetičko inženjerstvo. Razvoj novih tehnika genetičkog inženjerstva omogućilo je proizvođačima enzima proizvodnju dovoljnih količina gotovo bilo kojeg enzima, neovisno o njegovom podrijetlu. Nadalje, proteinsko inženjerstvo omogućilo je prilagođavanje različitih svojstava enzima prije proizvodnje željama krajnjih korisnika. Neki od najpoznatijih proizvođača enzima danas su: Amano, BASF, Biocon India, Biozyme Laboratories, Novozymes, Genzyme , Prodigene, Genencor International, itd. (Marić, 2000.).

3.1. Podrijetlo i proizvodnja industrijskih enzima

Kako je već navedeno, industrijski enzimi prema podrijetlu mogu biti mikrobnog, biljnog i životinjskog podrijetla. Enzimi mikrobnog podrijetla, uključujući i one dobivene tehnologijom rekombinantne DNK, danas imaju najrašireniju upotrebu te još ponegdje i oni biljnog podrijetla (Hood, 2002.).

Dvije su osnovne tehnike za proizvodnju enzima mikrobnog podrijetla (Duvnjak, 1984b):

1. Površinski uzgoj mikroorganizma na čvrstim supstratima (fermentacije na čvrstim nosačima, eng. *Solid State Fermentation*)
2. Submerzni uzgoj mikroorganizama u tekućim podlogama

Fermentacije na čvrstim nosačima su procesi rasta mikroorganizama na vlažnim čvrstim nosačima koji istovremeno mogu biti i supstrati za rast mikroorganizama. U većini SSF procesa kao radni mikroorganizam koriste se filamentozne gljive, a nešto rjeđe bakterije i kvasci. Uglavnom su to aerobni procesi u kojima se kao supstrati koriste nusproizvodi iz poljoprivrede te šumarske i prehrambene industrije (Mitchell i sur., 2006.). Iako se uzgoj na čvrstim supstratima koristi već stoljećima za proizvodnju različitih tradicionalnih prehrambenih proizvoda, u zadnjih nekoliko desetljeća ponovno se javlja velik interes za primjenom ove vrste uzgoja te dolazi do značajnog povećanja broja proizvoda dobivenih ovom tehnologijom uključujući i industrijske enzime.

Većina biotehnološke proizvodnje još uvijek se odvija primjenom submerzne tehnike uzgoja u tekućim supstratima. Za submerzni uzgoj koriste se uglavnom bioreaktori s mješalom koji omogućuju provođenje kontrole rasta mikroorganizama i biosinteze enzima. Tehnika submerznog uzgoja zahtijeva manje prostora i manje ručnog rada od površinskog uzgoja na čvrstim supstratima te je moguća dobra kontrola cijeloga prostora uz malu mogućnost kontaminacije (Duvnjak, 1984b).

Neovisno o tehnici uzgoja, tehnološki proces proizvodnje enzima sastoji od: odabira odgovarajućeg radnog mikroorganizma, pripreme inokuluma, pripreme supstrata (hranjive podloge), pripreme bioreaktora, bioprocesa (kultivacije proizvodnog mikroorganizma za biosintezu enzima) te pražnjenja bioreaktora i izolacije proizvoda, nakon čega slijedi pročišćavanje s ciljem dobivanja više ili manje čistog enzima.

Prednost upotrebe mikroorganizama kao izvora, odnosno radnog mikroorganizma za proizvodnju enzima je da ima kratko generacijsko vrijeme (rastu brzo), može ih se uzgojiti u velikim količinama u vrlo kratkom vremenu. Naravno, količina i brzina proizvodnje pojedinih enzima, kao i njihova svojstva, razlikuju se ovisno o primijenjenom mikroorganizmu. Osnovni zahtjev koji se postavlja za radni mikroorganizam za proizvodnju industrijskih enzima je da ima GRAS status, odnosno da je općenito prepoznat kao siguran, što znači da nije toksičan, da je nepatogen i da ne proizvodi antibiotike. Ova lista trenutno uključuje oko 50 vrsta bakterija i gljiva, kao što su primjerice *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, laktobacili, neke vrste roda *Streptomyces*, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i filamentozne gljive koje pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Mucor* i *Rhizopus*. U slučaju roda *Bacillus*, odabiru se sojevi koji su mutanti te više ne produciraju spore. U proizvodnji industrijskih enzima preferira se onaj mikroorganizam koji daje što veći prinos enzima u što kraćem vremenu uzgoja. Uobičajeno je da su proizvodni sojevi mikroorganizama modificirani metodama genetičkog inženjerstva kako bi postigli što veće prinose.

Od industrijskih enzima mikrobnog podrijetla (Tablica 1.) najčešće se koriste: proteaze, amilaze, glukoza-izomeraza, invertaza, ciklodekstrin, penicilin-acilaza, celulaza, hemicelulaza i pektinaze (Walsh i sur., 1994.). Proteaze se koriste za enzimatsku razgradnju proteina, alfa i beta amilaze za hidrolizu glikozidnih veza i enzimatsku razgradnju škroba, glukoamilaza se koristi za hidrolizu škroba i daje glukozni sirup, invertaza se upotrebljava za hidrolizu saharoze do glukoze i fruktoze, ciklodekstrin daje istoimeni proizvod iz škroba, celulaza se koristi za enzimatsku hidrolizu materijala koji sadrži celulozu, a pektinaze se primjenjuju za enzimatsku hidrolizu pektina (Walsh i sur., 1994.).

Tablica 1. Primjeri industrijskih enzima mikrobnog podrijetla (Duvnjak, 1984b)

Enzim	**Mikroorganizam proizvođač**
amilaze	*Bacillus subtilis, Aspergillus niger*
invertaze	*Saccharomyces cerevisiae*
pektinaze	*Aspergillus niger, Aspergillus oryzae*
proteaze	*A. niger, A. oryzae, B. subtilis, S. griseus*
glukoza-oksidaza	*Aspergillus niger*
celulaze	*Trichoderma viride*

Usprkos prednostima enzima mikrobnog podrijetla, još je ekonomski opravdana proizvodnja i nekih enzima biljnog i životinjskog podrijetla, budući da su u tim izvorima prisutni u dovoljnim količinama. Nadalje, u proizvodnji nekih enzima biljnog i životinjskog podrijetla obnovljivi poljoprivredni ili klaonički otpad prevodi se u proizvode s dodanom vrijednošću, tj. industrijske enzime. Enzimi izolirani iz biljnih izvora uključuju različite proteaze, kao što su papain, ficin, bromelain, kao i peroksidaze. Papain, poznat i kao biljni pepsin, najčešće je primjenjivan enzim ove skupine. Koristi se za smekšavanje mesa. Ficin je cisteinska proteaza iz istoimene tropske biljke. Dobiva se filtracijom i sušenjem vanjskog dijela biljke a primjenjuje se za purifikaciju proizvoda. Bromelain je također biljna proteaza koja se dobiva iz stabljike ananasa. Bromelain je i glikoprotein i koristi se za jačanje otpornosti piva na smrzavanje (Walsh i sur., 1994.).

Enzimi izolirani iz animalnih izvora su primjerice proteaze kao tripsin, kimotripsin i urokinaza, zatim laktat dehiddrogenaza, lizozim i sl. Kimozin katalizira proteolizu u sirevima, a dobiva se od buraga teladi. Urokinaza se osim u industrijske svrhe koristi i u terapeutske svrhe kao trombolitički agens (Walsh i sur., 1994.). Osim navedenih, ostali značajniji industrijski enzimi životinjskog podrijetla su: tripsin, acetilkolin esteraza, kolesterol esteraza i kreatin kinaza (Walsh i sur., 1994., Tablica 2.). Tripsin se dobiva iz životinjske gušterače a služi za purifikaciju i pomoć pri probavljanju hrane. Acetilkolin esteraza se dobiva iz goveđih eritrocita a koristi se u dijagnostičke i analitičke svrhe za detekciju organofosfornih spojeva poput pesticida. Kolesterol esteraza se dobiva iz svinjske gušterače i služi za određivanje razine kolesterola u serumu.

Tablica 2. Primjeri industrijskih enzima životinjskog podrijetla (Walsh i sur., 1994.)

Enzim	**Izvor**	**Primjena**
kimozin	teleći burag	proizvodnja sira
urokinaza	urin	tromboliza
tripsin	gušterača	pospješitelj probave
pankreatin	gušterača	pospješitelj probave
pepsin	želudac	pospješitelj probave
acetilkolin esteraza	goveđi eritrociti	analiza organofosfornih spojeva
kolesterol esteraza	svinjska gušterača	određivanje razine kolesterola u serumu

3.2. Prednosti i nedostaci primjene enzimskih pripravaka

Osnova prednost primjene enzima kao katalizatora u industrijskim procesima je njihova visoka učinkovitost i relativna jednostavnost primjene u odnosu na klasične kemijske katalizatore. Budući da djeluju pri blagim uvjetima, primjena enzima je često prihvatljivija za okoliš nego primjena kemijskih katalizatora, što enzimski katalizirane industrijske procese čini „zelenima“. Treća ključna prednost upotrebe enzima je činjenica da je ukupna cijena proizvodnje većine industrijskih proizvodnih procesa kataliziranih enzimima često niža nego kod primjene konvencionalnih katalizatora, pri čemu je kvaliteta proizvoda visoka, a količina neželjenih nusproizvoda mala.

Nedostatci primjene enzima u industrijskim procesima uključuju cijenu enzimskih pripravaka, koja ovisno o zahtijevanoj čistoći enzima za proces, može biti vrlo visoka. Nadalje, problemi sa skladištenjem enzima - budući da se radi o biološki aktivnim molekulama cijena skladištenja zbog specifičnih uvjeta koji se moraju osigurati često je puno veća nego cijena skladištenja konvencionalnih katalizatora (Cowan, 1999.). Gubitak enzimske aktivnosti i smanjenje učinkovitosti enzimskih pripravaka tijekom vremena skladištenja također može utjecati na povećanje troškova proizvodnje.

3.3. Čuvanje i sigurnost enzimskih pripravaka

Upute za čuvanje enzimskih pripravaka obično su navedene u uputstvima za primjenu pojedinog enzimskog pripravka. Moderni enzimski pripravci su relativno stabilni pri čuvanju, pa čak i na duže vrijeme (Spok, 2005.).Najčešće deklarirana optimalna temperatura za čuvanje enzimskih pripravaka je 5 °C, jer tada enzimi ostaju maksimalno sačuvani (Marić, 2000.). Čuvanje pri višim temperaturama dovodi do smanjenja deklarirane aktivnosti i učinkovitosti enzimskog pripravka. Uz temperaturu, treba paziti i na mjesto čuvanja. Treba ih čuvati u zatvorenim posudama, na suhom mjestu i hladnom mjestu (Spok, 2005.).

Nepravilna i nestručna uporaba i rukovanje enzimima, ne samo da ugrožava ljudsko zdravlje, već šteti i okolini. Kako su enzimi bioaktivni proteini, dovode do alergija, nadraženja i preosjetljivosti. Osobe koje boluju od kroničnih bolesti (astma, dermatitis, ekcem, otežano disanje), ne bi trebale rukovati enzimima (Spok, 2005.). Posebno opasno je udisanje enzima praškastog oblika, zbog čega se danas enzimi u tom obliku rijetko koriste (Spok, 2005.; Cowan, 1999.). Vrlo je važno pridržavati se sigurnosnih mjera. Neke od najčešćih mjera predostrožnosti su: zamjena praškastih enzima tekućim, nošenje zaštitne nepropusne odjeće, obrazovanje osoblja za rukovanje enzimima različitih vrsta, praćenje i izvješćivanje o bilo kakvim abnormalnim reakcijama tijela i kože (Marić, 2000.). No, ponekad su nezgode u proizvodnom pogonu neizbježne te može doći do prolijevanja i dodira s enzimima. U

takvim slučajevima preporuča se navedeno: sakupiti manje količine pripravka na hrpicu i pokupiti ih vlažnom krpom, velike nakupine isprati vodom da se ne digne prašina, velike količine mogu se pokupiti usisavačem te sakupljene ostatke spaliti u običnoj peći ili peći za spaljivanje (Spok, 2005.; Marić, 2000.). U slučaju dodira s enzimom, pojedincu se preporuča dodirnuto mjesto odmah isprati pod mlazom vode, jer su svi enzimi topljivi u vodi. Onečišćenu odjeću treba skinuti i natopiti, a tijelo istuširati (Spok, 2005.). Ukoliko enzimi dospiju u usta, treba popiti puno vode, a ukoliko je došlo do udisanja, treba se odmah javiti liječniku. Većina kemijskih laboratorija i tvornica prilagodili su cijeli proces proizvodnje ne bi li smanjili izloženost radnika enzimima (Spok, 2005.).

Enzimi u prehrambenoj industriji su vrlo specifični i kao takvi, na njih se primjenjuje široki raspon regulacija. Tako većina zemalja razlikuje procedure ovisno o tome hoće li se enzim u proizvodu zadržati do završetka procesa proizvodnje ili ne (Cowan, 1999.). Općenito se smatra da najnapredniji sustav regulacije dodataka pri proizvodnji hrane imaju Sjedinjene američke države. Posebna kategorija aditiva i pripravaka za upotrebu u proizvodnji mora imati GRAS status, tako da većina enzimskih pripravaka koji se koriste imaju taj status (Spok, 2005.; Cowan, 1999.).

4. Primjena industrijskih enzima u prehrambenoj industriji

Enzimi su u proizvodnji hrane prisutni dugo, pri čemu su enzimi koji su se uobičajeno koristili u prošlosti bili izolirani iz biljnih ili životinjskih tkiva. Iako se enzimi biljnog i životinjskog podrijetla još uvijek ponegdje koriste u procesima proizvodnje hrane, u novije se vrijeme koriste uglavnom enzimi mikrobnog podrijetla, uključujući i one proizvedene pomoću genetički preinačenih mikroorganizama. Enzimi se u prehrambenoj industriji najčešće koriste za hidrolizu sirovina (Tablica 3.), dobivanje jednostavnih šećera iz škrobnih sirovina, enzimske transformacije čistih supstrata, ubrzanje procesa dozrijevanja različitih vrsta proizvoda, poboljšanje probavljivosti hrane, uklanjanje nepoželjnih sastojaka i nusproizvoda itd. Enzimi se danas najviše i najčešće primjenjuju u pekarstvu, u proizvodnji konditorskih proizvoda, u proizvodnji piva i vina, sokova, pirea, juha, prahova , te u mliječnoj i mesnoj industriji (Law, 2002.)

Tablica 3. Primjena komercijalnih enzimskih pripravaka za pripremu biotehnoloških sirovina (Marić, 2000.)

Enzimi	Podrijetlo	Područje primjene
ß-amilaza	biljno	ošećerenje sladne komine
alfa-amilaza, glukoamilaza i pululanaza	bakterijsko i fungalno	priprava mikrobnih podloga, dobivanje tekućih šećera, pekarstvo, tekstil
glukoza izomeraza	bakterijsko	pretvaranje glukoze u fruktozu
amiloglukozidaza	fungalno	niskokalorijska piva
alfa-acetolaktat dekarboksilaza	bakterijsko	konverzija acetolaktata u acetoin (dozrijevanje piva)
ß-glukanaza	fungalno	razgradnja glukana
alkalne i neutralne proteaze	bakterijsko i fungalno	razgradnja proteina (pivarstvo, tijesto, kruh i slastice)
pektinaze	fungalno	razgradnja pektina u vinarstvu i voćnim sokovima
renin, renet, kimaza i kimozin	animalno, fungalno ili bakterijsko	grušanje mlijeka pri proizvodnji sira
lipaze	fungalno	zrenje sira
laktaze	bakterijsko i fungalno	razgradnja laktoze
penicilinacilaze	bakterijsko	dobivanje6-aminopenicilanske kiseline

4.1 Pekarstvo

Kada je u pitanju primjena enzima u pekarstvu, tada se najčešće koriste amilaze, proteinaze, lipaze i glukozaoksidaze. Najčešće se koriste amilaze mikrobnog podrijetla dobivene iz plijesni. Naime, one djelomično razgrađuju škrob, pri tome oslobađajući 2-4 % šećera koje kvasci mogu prevreti (Cowan, 1999.). U tom procesu nastaje ugljikov(IV) oksid, koji je zaslužan za pekarske proizvode finije arome, ljepše kore i većeg volumena (Duvnjak, 1984a.). Ostali pozitivni učinci upotrebe amilaza uključuju značajnu redukciju vremena (od 30 do 50 %) potrebnog za pripravljanje tijesta, dulja svježina pekarskih proizvodi (Kirk i sur., 2002.)i sl. Uz amilaze iz plijesni, koriste se i bakterijske amilaze kojima se ipak rjeđe pribjegava jer imaju nešto slabiji učinak zbog blago lošijih svojstava (Duvnjak, 1984a.). Nadalje, za razgradnju škroba iz kukuruza, također se koriste amilaze, pomoću kojih dolazi do enzimatske hidrolize kada se škrob kuha pod pritiskom, dok se ne formira gel (Cherry i Fidantsef, 2003.). Osim amilaza, u pekarskoj industriji se često koriste i proteaze. Ponekad se proteaze koriste u kobinaciji s amilazama za jači učinak (Kirk i sur., 2002.). Proteaze se posebno koriste ukoliko je brašno lošije kvalitete i ljepljivo (Cowan, 1999.). Za izbjeljivanje sredine pekarskog proizvoda, koriste se lipooksidaze iz sojinog brašna, koje oksidiraju nezasićene masne kiseline. Ukoliko se pri pripravljanju pekarskih proizvoda koristi mlijeko, može se dodati i ß-galaktozidaza, koja tijekom pečenja dovodi do formiranja boje kore pekarskog proizvoda na način da cijepa molekulu laktoze u glukozu (Soares, 2012.).

4.2 Proizvodnja konditorskih proizvoda

Najčešći enzimi koji se koriste u proizvodnji konditorskih proizvoda su lipaze, invertaze i amilaze (Duvnjak, 1984a.). Invertaza (saharaza, beta-fruktofuranozidaza), koja se najčešće koristi, je enzim koji katalizira hidrolizu saharoze u jednostavne šećere glukozu i fruktozu. Nastala ekvimolarna smjesa glukoze i fruktoze naziva se invertni šećer. Invertaza dodana u konditorske proizvode ima za cilj spriječiti stvaranje kristalića saharoze u proizvodima, pri čemu konditorski proizvodi ostaju duže svježi i ne skrutnu se. Invertaza se ponekad dodaje i u druge proizvode, poput sladoleda i krema. Od ostalih enzima, kao pojačivači okusa koriste se lipaze, najčešće u čokoladnim proizvodima (Soares, 2012.), budući da dovode do intenziviranja

arome proizvoda. α-amilaza se u konditorskoj industriji često koristi pri razgradnji i likvefakciji škroba, koji se nalazi u manjim količinama u čokoladnim i ostalim sirupima (Cowan, 1999.). Pektinaze se koriste kada je potrebno ukloniti sluzave naslage na zrnima kakaa ili na kavi (Soares, 2012.) te ponekad i za enzimatsku hidrolizu pektina. β-amilaze se također koriste za enzimatsku razgradnju škroba ali nešto rjeđe, pri čemu nastaje maltoza (Walsh i sur., 1994.).

4.3 Proizvodnja vina i piva

U industriji pića koriste se amilaze, proteaze, katalaze, pektinaze i citolitički enzimi. Amilaze i proteaze koje se koriste najčešće su mikrobnog podrijetla, pri čemu se najčešće upotrebljavaju za ošećerenje škroba iz neslađenih žitarica, koje se koriste kao sirovina u proizvodnji primjerice piva (Kirk i sur., 2002.). Tradicionalni izvor enzima u pivarstvu je slad kao osnovna sirovina za proizvodnju piva. Enzimi prisutni u endospermu zrna ječma su amilaze, proteaze, glukanaze i celulaze. U proizvodnji piva se ponekad koriste i citolitički enzimi u cilju ubrzavanja cijelog procesa i njegove što uspješnije provedbe, što rezultira većim udjelom ekstrakta u konačnom proizvodu. Nadalje, enzimi se u proizvodnji piva koriste i s ciljem povećanja stabilnosti i bistroće piva (Duvnjak, 1984a). Dodatkom enzima glukoza-oksidaze uklanja se kisik iz piva čime se povećava njegova stabilnost, a upotrebom diacetil-reduktaze poboljšava se okus piva. Dodatak mikrobnih amilaza pozitivno utječe na procesu ošećerenja škronih sirovina, pri čemu se njihovom upotrebom povećava iskorištenje sirovine (Cowan, 1999.). Dodatak enzima bromelaina, smanjuje se stvaranje kristala leda i povećava otpornost piva na smrzavanje.

Vino nastaje enzimskom „transformacijom“ soka od grožđa. Proizvodnja vina visoke kakvoće uvelike ovisi o usmjeravanju enzimskih procesa koji se odvijaju tijekom njegove proizvodnje. Izvor enzima u proizvodnji vina su prvenstveno sirovina i kvasac koji se koristi kao radni mikroorganizam, ali su također razvijeni različiti komercijalni enzimski pripravci koji se uobičajeno koriste u proizvodnji vina. Industrijski enzimi za upotrebu u vinarstvu uglavnom su mikrobnog podrijetla, dobiveni iz gljiva različitih rodova uključujući *Aspergillus*, *Rhizopus* i *Trichoderma*. OIV (*International Organisation of Vine & Wine*) je krovna organizacija koja propisuje metode za proizvodnju komercijalnih enzima za vinarstvo u Europskoj Uniji. Trenutno je za proizvodnju enzima za vinarstvo dozvoljeno koristiti samo vrstu *Aspergillus*

niger i neke vrste roda *Trichoderma*. Komercijalni enzimski pripravci za vinarstvo koriste se kako bi se ubrzao cijeli proces proizvodnje vina. Enzimska aktivnost tih pripravaka najčešće se svodi na razgradnju pektina, hemiceluloze, celuloze i glikozida. Većina komercijalnih pripravaka sadrže različite pektinaze. Enzimski pripravci razlikuju se po svojoj funkciji. Neki su odgovorni za razvijanje tvari arome negi za bolju ekstrakciju spojeva koji utječu na boju, neki za bistrenje vina ili taloženje. Upotreba pektinaza omogućuje bolju razgradnju staničnih struktura sirovine (grožđa) pri čemu dolazi do oslobađanja spojeva boje, okusa, arome i različitih prekursora. Enzimi se dodaju u različitim fazama proizvodnje vina, kao što je muljanje grožđa kako bi se povećala ekstrakcija soka, u vino radi poboljšanja filtracije prije punjenja u boce i sl. (de Felice Renton i Jones, 2012).

4.4 Proizvodnja sokova

U proizvodnji sokova, često se koriste pektinaze, glukoza-oksidaza i katalaza. Djelovanjem pektinaza dolazi do razgradnje staničnih struktura i hidrolize pektina, pri čemu dolazi do povećanja prinosa soka iz voća (Soares, 2012.). Prinos soka od šljiva i bresaka povećava se za 25 % do 30 % nakon obrade pektinazama, posebno zato što su to teže obradivi plodovi. Uz veći prinos, pektinazom se postiže i brže bistrenje i filtracija (Soares, 2012.), te se olakšava proces pravljenja sirupa, jer su pektini hidrolizirani te pri vakuum uparavanju ne nastaju koloidi koji otežavaju pravljenje sirupa (Duvnjak, 1984a.). Za hidrolizu škroba, koji može negativno utjecati na proces zgušćivanja soka, koriste se amilaze, pri čemu dolazi do razrijeđivanje soka. Kao antioksidans i stabilizator, koriste se glukoza-oksidaza i katalaza. Uslijed oksidacije, u soku ponekad dolazi do naknadnog formiranja boje ili do gubitka obojenih tvari, kao i oksidacije aromatskih tvari, zbog čega dolazi do smanjenja kvaliteta i pogoršanja okusa soka (Cowan, 1999.). Glukoza-oksidaza dodana u hermetički zatvoren sok, u potpunosti uklanja otopljeni kisik iz soka čime sok zadržava boju i okus i do 8 mjeseci (Duvnjak, 1984a.). Neki enzimi se koriste za uklanjanje neugodnih okusa gorčine iz soka. Primjerice, pri proizvodnji soka iz citrusnih plodova, koriste se ramnozidaza i ß-glukozidaza. One uklanjaju gorke vrste naringina iz kore tih plodova, i time u konačnici nestaje gorki okus tih sokova. Za proizvodnju visoko-fruktoznih voćnih sirupa zaslužne su amilaze (Cherry i Fidantsef, 2003.).

4.5 Enzimi u proizvodnji pirea, juha i prahova

U proizvodnji pirea, juha i prahova koriste se amilaze i glukoza-oksidaza. Amilaze se koriste kod prerade sirovina, te za povećavanje prehrambene vrijednost koncentrata i većine konzerviranih proizvoda. Dodatni učinak amilaza je povećanje iskoristivosti sirovine (Cowan, 1999.). Amilaze se koriste i u proizvodnji dječje hrane, jer razgrađuju škrob do jednostavnih šećera koji su lako probavljivi. U proizvodnji koncentrata iz graha, graška i kukuruza često se koriste enzimski pripravci u kojima se nalaze amilaze, proteinaze i celulaze (Duvnjak, 1984a.). Učinak i mehanizam djelovanja enzimskih pripravaka je višestruk: oni razgrađuju škrob i proteine, čime se ubrzava cijeli proces kuhanja, poboljšava okus i u konačnici povećava hranidbena vrijednost proizvoda. Za razgradnju škroba najčešće se koriste α-amilaze, koje se dodaju prije negoli nastupi želatinizacija (Cherry i Fidantsef, 2003.). U proizvodnji hrane u konzervama od posebnog značaja je glukoza-oksidaza, kao i kombinacija glukoza-oksidaze i katalaze (Cowan, 1999.). Koristi ih se za uklanjanje glukoze iz konzerviranih proizvoda. Primjerice, kod proizvodnje jaja u prahu, glukoza sa slobodnim aminokiselinama stvara melanoide, oni pak uzrokuju tamnjenje proizvoda, te izazivaju nepoželjne promjene okusa i mirisa. Prethodno navedeni enzimi koriste se i za uklanjanje kisika iz konzerviranih proizvoda, što blagotvorno djeluje na boju i okus proizvoda, te prevenciju korozije metalne ambalaže. Rok trajanja majoneze povećava se za šest puta, upotrebom glukoza-oksidaze i katalaze, u usporedbi s majonezom kojoj enzimi nisu dodani (Duvnjak, 1984a.).

4.6 Enzimi u mesnoj i mliječnoj industriji

Enzimi u industriji mesa i mesnih prerađevina imaju raširenu upotrebu. Za omekšavanje mesa se primjerice koristi više vrsta proteolitičkih enzima. Meso životinja nakon klanja je vrlo tvrdo, te mu je potrebno do mjesec dana da omekša zahvaljujući aktivnosti proteolitičkih enzima, koji se prirodno nalaze u mišićima životinja. U tom procesu zrenja mesa se koriste dodatni proteolitički enzimi koji se uštrcavaju u meso, ne bi li se cijeli proces što više ubrzao (Duvnjak, 1984a.). Ponekad se prije klanja životinje u njene vene ubrizga enzimska otopina s ciljem bolje raspodjele proteolitičkih enzima u mišićnom tkivu. U nekim zemljama se taj proces prepušta pojedinim domaćinstvima. Za kućno tretiranje proteolitičkim enzimima koristi se

prije svega enzimi biljnog podrijetla, poput primjerice bromelaina iz ananasa. Osim proteolitičkih enzima, koristi se i papain, enzim biljnog podrijetla koji također omekšava meso i olakšava cijeli proces zrenja (Walsh i sur., 1994.). U novije vrijeme životinjama se prije klanja daju enzimi iz skupine fitaza u obliku prehrambenog suplementa. One višestruko povećavaju nutritivnu vrijednost dobivenog mesa tako što oslobađaju fosfate i povezane metale iz fitata (Cherry i Fidantsef, 2003.). Osim toga, fitaze smanjuju količinu oslobođenog fosfora u otpadnoj lešini za do 30%, čime povoljno djeluju na okoliš (Cherry i Fidantsef, 2003.). U proizvodnji kobasica koriste se učestalo proteinaze - njima se tretiraju crijeva koja se pune mesom i time se pospješuje njihova elastičnost i mekoća (Cowan, 1999.). Pri proizvodnji i preradi ribe koriste se proteolitički enzimi koji ubrzavaju usoljavanje i sazrijevanje. Tako se sazrijevanje skraćuje za primjerice 6 puta u nekih vrsta riba. Uz to se i smanjuje neugodan miris nekih vrsta riba (Duvnjak, 1984a.).

Enzimi koji su se u prošlosti primjenjivali u mliječnoj industriji uglavnom su bili animalnog podrijetla, dok se danas koriste enzimi mikrobnog podrijetla(Soares, 2012.). Enzimi se koriste u proizvodnji sira za koagulaciju kazeina, za ubrzavanje zrenja sireva. U proizvodnji sira koristi se renin (kimozin), koji destabilizira kazein, što utječe na taloženje i formira sirutku (Walsh i sur., 1994.).Proteinaze se u mliječnoj industriji koriste u proizvodnjiu različitih dijetetskih proizvoda od mlijeka (Soares, 2012.). Uz proteinaze, koriste se i katalaze za uklanjanje vodikovog peroksida koji je konzervans za mlijeko (Cowan, 1999.). U proizvodnji koncentriranog mlijeka sa šećerom, koriste se laktaze i invertaze jer hidroliziraju laktozu i vrše inverziju saharoze, čime se onemogućuje kristalizacija šećera (Duvnjak, 1984a.)

5. Zaključak

Velika prednost upotrebe industrijskih enzima u prehrambenoj industriji najbolje se očituje kroz proizvodnju stabilnih, kvalitetnih, održivih i ukusnih prehrambenih proizvoda, koji su dobro prihvaćeni od krajnjih potrošača. Pri tome su ulaganja u takvoj proizvodnji relativno niska u odnosu na povrat uloženih sredstava. Ipak, još uvijek je mnogo nepoznanica u primjeni komercijalnih industrijskih pripravaka u prehrambenoj i ostalim industrijama, što će svakako dodatno intenzivirati znanstvenu aktivnost u području industrijskih enzima. Neki od smjerova u kojima će istraživanja ići su optimiranje proizvodnje i dorade/pripreme industrijskih enzima, s ciljem povećanja iskoristivosti dobivenog proizvoda te smanjenja troškova proizvodnje. Nadalje, istraživanja idu i u smjeru pronalaženja novih izvora za dobivanje enzima s ciljem dobivanja jeftinog i učinkovitog proizvoda, koji se jednostavno implementira u procesu proizvodnje i koji ne djeluje štetno na radnike koji manipuliraju s njime ili na krajnje potrošače prehrambenih proizvoda.

6. Literatura

Cherry J, Fidantsef A: Directed evolution of industrial enzymes, *Current Opinion in Biotechnology* 14:438-443, 2003.

Cowan D: Industrial enzymes. U *Biotechnology – The science and the business*, Harwood Academic Publishers, London, 1999.

Duvnjak Z.: Primjena enzima. U *Industrijska Mikrobiologija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 1984.

Duvnjak Z: Proizvodnja enzima mikrobnog podrijetla. U *Industrijska Mikrobiologija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 1984.

Hood E.: From green plants to industrial enzymes, *Enzyme and microbial technology* 30:278-285, 2002.

Marić V.: *Biotehnologija i sirovine*, Stručna i poslovna knjiga d.o.o., Zagreb, 2000.

Matošić S: Imobilizirani biokatalizatori, enzimi i stanice organizama. U *Biokemijsko inženjerstvo,* Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, Zagreb, 1991.

Mitchell D A, Krieger N, Berovič M: *Solid-stateFermentationBioreactors: Fundamentals of Design and Operation*. Springer, Heidelberg, 2006

Ole K, Torben B, Fuglsang C: Industrial enzyme applications, *Current Opinion in Biotechnology* 13:345-369, 2002.

Soares I, Tavora Z, Barcelos R, Baroni S: Microorganism-produced enzymes in the food industry, *Scientific, health and social aspects of food industry*, InTech, Brazil, 2012.

Spok A: Safety regulations of food enzymes, *Food technology and biotechnology*, 44:197-209, 2006.

Stryer L: Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 1991.

Walsh H: The industrial production of enzymes, *Biotechnology advanced* 12:635-646, 1994.