Enzimi u prehrambenoj industriji

Šošić, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:109:483137

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

Martina Šošić

Enzimi u prehrambenoj industriji

završni rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

Nastavni predmet

Kemija hrane

Enzimi u prehrambenoj industriji

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Studentica: Martina Šošić MB: 3341/10

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Predano:

Pregledano:

Ocjena:

Potpis mentora:

_____

Enzimi u prehrambenoj industriji

SAŽETAK

Enzimi su proteini koji su proizvedeni od strane živih organizama. Selektivno ubrzavaju kemijske reakcije bitnih životnih procesa, kao što je probava, disanje, metabolizam i održavanje tkiva. Drugim riječima, oni su vrlo specifični biološki katalizatori. Kroz povijest enzimi su se koristili za pravljenje piva, vina, sira i kruha, te su ovi proizvodi izvrsni primjeri industrijske eksploatacije snage i selektivnosti enzima.

Enzimi su od tada, i nadalje, neophodni za opskrbu fermentacijskim supstratima (pivo i vino), za razvoj okusa i mirisa (vino) ili za stvaranje strukture proizvoda (sir). U sljedećim poglavljima ovog rada biti će opisano kako enzimi kataliziraju reakcije u tim i u drugim sirovinama. Cilj ovog rada je objasniti osnovna svojstva enzima, njihovu funkciju u hrani, njihovo ne idealno ponašanje u prehrambenim sustavima, raspon prehrambenih tehnologija u kojima se koriste i njihovu proizvodnju.

Ključne riječi: enzimi, biološki katalizatori, prehrambena tehnologija.

Enzymes in food industry

SUMMARY

Enzymes are proteins 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 maintenance. In other words, they are highly specific biological catalysts. Throughout history enzymes were used to make beer, wine, cheese and bread, and these products are elegant examples of the industrial exploitation of the power and selectivity of enzymes.

The enzymes were then, and remain, essential for the provision of fermentation substrates (beer and bread), the development of flavour and aroma (wine), or the creation of the very structure of the product (cheese). The following chapters of this work will describe and discuss how enzymes catalyze reactions in these and other foods. The goal of this work is to explain the basic properties of enzymes, their function in food, their non-ideal behaviour in food systems, the range of food technologies in which they are used and their production.

Key words: enzymes, biological catalysts, food technology.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. PRIRODA ENZIMA I NJIHOVA FUNKCIJA U HRANI 2

2.1. Nomenklatura i klasifikacija enzima 2

2.2. Primarna struktura enzima 2

2.3. Trodimenzionalna struktura enzima 3

2.4. Kinetika enzima 4

2.5. Izvori i količina enzima za prehrambenu tehnologiju 5

3. ENZIMI ZA PROIZVODNJU KRUHA 7

3.1. Gljivična *alfa*-amilaza 7

3.2. Xylanases/pentosanases/hemicellulases 7

3.3. Lipaza 8

3.4. Oksidaza 8

4. ENZIMI U PROIZVODNJI PIVA 10

4.1. Enzimi u proizvodnji slada 10

4.2. Prisutni enzimi tijekom procesa gnječenja 10

4.3. Enzimi za razgradnju dodataka 11

4.4. Enzimi tijekom filtracije kaše 11

4.5. Enzimi tijekom fermentacije 11

4.6. Enzimi tijekom zrenja 11

5. ENZIMI U PROIZVODNJI VINA 13

5.1. Svojstva i sastav enzima 13

5.2. Primjena enzima pri proizvodnji sorti bijelog i ružičastog vina 13

5.3. Primjena enzima pri proizvodnji sorti crnog vina 14

6. ENZIMI U PROIZVODNJI MLIJEČNIH PROIZVODA 15

6.1. Enzimi za zgrušavanje mlijeka 15

6.2. Prirodni enzimi mlijeka 15

7. ENZIMSKA PROMJENA PROTEINA U HRANI 17

7.1. Uloga enzima u mesnoj hrani 17

7.2. Reakcije katalizirane transglutaminazom 18

7.3. Enzimsko omekšavanje mesa 19

7.4. Prerada ribe 20
8. ENZIMI U EKSTRAKCIJI SOKA IZ VOĆA I POVRĆA 21
8.1. Pektini 21
8.2. Celuloza i hemiceluloza 21
8.3. Škrob 22
8.4. Proteini 23
10. ZAKLJUČAK 29
11. LITERATURA 30

1. UVOD

Po definiciji, svi enzimi su biokatalizatori. Kao i što je i karakteristično za katalizatore, oni ubrzavaju biokemijske reakcije te ostaju nepromijenjeni tijekom reakcije (Whitehurst, 2002.).

Enzimi su važni u hrani jer kataliziraju različite reakcije koje utječu na boju, okus ili teksturu, te doprinose kvaliteti hrane. Neke od ovih reakcija mogu biti poželjne dok su druge nepoželjne i dovode do nepoželjnih promjena u boji ili okusu hrane. Svaki enzim ima jedinstvenu strukturu i konformaciju što omogućava da se na njega veže supstrat i katalizira reakciju. Kada je reakcija gotova, enzim se otpušta da ponovno djeluje kao katalizator (Vaclavik, 2008.).

Enzimi su proteini velike molekulske mase, te prema tome pokazuju karakteristično ponašanje proteina s obzirom na temperaturu i pH osjetljivost. Svi enzimi imaju optimalan raspon temperature i pH pri kojima se reakcija najbrže odvija. To je posebno važno za ciljanu upotrebu enzima, budući da se željena aktivnost svakog enzima može odvijati samo pod pravim uvjetima okoline. Nepovoljni temperaturni uvjeti i pH mogu denaturirati enzime što onemogućava vezivanje supstrata, odnosno enzimi se deaktiviraju (Whitehurst, 2002.).

Ako je neka enzimska reakcija potrebna u proizvodnji hrane, važno je osigurati optimalan raspon temperature i pH za taj enzim koji se koristi. S druge strane, ako je djelovanje enzima nepoželjno enzimi se moraju inaktivirati. To se obično postiže pomoću toplinske obrade, ali se također može provesti dodavanjem kiseline za promjenu pH (Vaclavik, 2008.).

Primjeri poželjnih enzimskih reakcija uključuju zgrušavanje mlijeka pomoću sirila što je prvi korak u proizvodnji sira. Ostale poželjne enzimske reakcije uključuju omekšavanje mesa pomoću proteolitičkih enzima kao što su papain, ficin i bromelain. Primjeri nepoželjnih enzimskih reakcija uključuju enzimsko posmeđivanje, koje se javlja kada se voće ili povrće ošteti, uslijed djelovanja polifenola oksidaze, prilikom čega proizvodi mijenjaju boju. Razvoj nepoželjnih okusa u mastima i hrani koja sadrži masti može također biti problem u nekim slučajevima, a to može biti uzrokovano djelovanjem lipaze ili lipoksigenaze. Prije skladištenja hrane, enzimi koji bi mogli uzrokovati promjene boje ili razvoj nepoželjnih okusa tijekom skladištenja se, procesom topline, inaktiviraju u voću i povrću. U krajnjem proizvodu enzimi ostaju kao denaturirani, neaktivni enzimi (Vaclavik, 2008.).

2. PRIRODA ENZIMA I NJIHOVA FUNKCIJA U HRANI

2.1. Nomenklatura i klasifikacija enzima

Enzimi se klasificiraju prema prirodi reakcija koje kataliziraju, na primjer oksidacija/redukcija, hidroliza, sinteza i tako dalje, te prema točnom identitetu njihovih supstrata i proizvoda. Prema tome, svi su svrstani u šest glavnih skupina (Hui, 2006.):

1. Oksidoreduktaze kataliziraju reakcije oksidacije i redukcija.
2. Transferaze kataliziraju prijenos funkcionalnih grupa sa jedne molekule na drugu.
3. Hidrolaze kataliziraju hidrolitičko cijepanje C-C, C-N, C-O, C-S ili O-P veza. Ovo su reakcije prijenosa funkcionalnih grupa, gdje je akceptor uvijek voda.
4. Liaze kataliziraju reakcije eliminacije, te dolazi do cijepanja C-C, C-N, C-O ili C-S veza ili stvaraju dvostruke veze ili obrnuto, i dodavaju skupine na dvostruke veze.
5. Izomeraze kataliziraju reakcije izomerizacije, na primjer racemizacija, epimerizacija, *cis*-*trans*-izomerizacija, tautomerizacija.
6. Ligaze kataliziraju stvaranje veza, zajedno s hidrolizom fosfatne veze visoke energije, u ATP-u ili sličnim fosfatima.

Sustavna imena enzima su često vrlo duga i više su prikladna kratka imena i sustavni brojevi za označavanje enzima. Kraća imena su poznata pod nazivom preporučena imena. Preporučena imena se sastoje od sufiksa *–aza*, koji se dodaje na naziv radnje koju obavlja taj enzim. Treba napomenuti da se nomenklatura i klasifikacija enzima samo temelji na reakciji koje kataliziraju i ne uzima se u obzir porijeklo enzima, odnosno iz koje vrste (biljke, životinje ili mikroorganizmi) ili iz kojeg tkiva potječe (Hui, 2006.).

2.2. Primarna struktura enzima

Enzimi se sastoje od L-α-aminokiselina povezanih peptidnim vezama između karboksilne skupine jedne aminokiseline i amino skupine druge aminokiseline. Postoji 20 aminokiselina u proteinima koje su određene genetskim kodom. U rijetkim slučajevima druge se javljaju kao produkti enzimske modifikacije nakon translacije. Aminokiseline se mogu podijeliti u četiri različita razreda, ovisno o strukturi njihovih bočnih lanaca koje se nazivaju R-grupe (Hui, 2006.):

- nepolarne,

- polarne,
- negativno nabijene,
- pozitivno nabijene.

Svojstva bočnih lanaca aminokiselina određuju svojstva proteina od kojih su sačinjeni. Formiranje slijeda peptidnih veza stvara glavni lanac ili okosnicu. Okosnica proteina se sastoji od ugljikovog atoma, Cα, na koji se veže bočni lanac NH skupine, koja se veže za Cα, i od karbonilne skupine C=O, gdje se ugljikov atom veže na Cα. Peptidna veza je planarna, jer djelomično sadrži dvostruku vezu (40%), koja je karakterizirana sa π elektronima podijeljenim između C-O i C-N veza. Peptidna veza ima *trans* konformaciju, odnosno kisik karbonilne skupine i vodik NH skupine su u *trans* položaju, dok se *cis* konformacije javljaju samo u iznimnim slučajevima. Primarna struktura je odgovorna za više razine enzimske strukture pa stoga i za enzimsku aktivnost (Hui, 2006.).

2.3. Trodimenzionalna struktura enzima

Općenito, enzimi su vrlo tijesno upakirane globularne strukture, sa vrlo malim brojem unutarnjih šupljina, koje su popunjene sa molekulama vode. Sekundarnu strukturu enzima sačinjavaju polipeptidni lanci koji su organizirani u poredane regije povezane vodikovom vezom. U ovako organiziranoj strukturi, vodikovom vezom se povezuju amino NH-skupina iz jedne peptidne veze sa C=O skupinom druge ne susjedne peptidne veze. Time se postiže formiranje α-spirala i β-nabranih ploča. Za α-uzvojnicu možemo smatrati da joj je struktura slična namotaju ili opruzi, dok se β-ploča može opisati kao povezani paralelni nizovi postavljeni na vrh papira presavijenog u oblik harmonike. Ove strukture su određene primarnom strukturom proteina (Hui, 2006.).

Trodimenzionalna struktura proteina, sastavljena od jednog polipeptidnog lanca, je poznata kao njegova tercijarna struktura. Ona je, u velikoj mjeri, određena interreakcijom R-skupina, na površini proteina, sa vodom i sa drugim R-skupinama na površini proteina. Intermolekularne, nekovalentene privlačne sile, koje su uključene u stabiliziranje strukture enzima, obično se dijele u tri vrste (Hui, 2006.):

- ionske veze,
- vodikove veze,
- Van der Waals-ove interakcije.

Vodikova veza nastaje formiranjem vodikovih mostova između odgovarajućih atoma. Elektrostatske veze nastaju uslijed privlačenja suprotno nabijene skupine koje se nalaze na dva bočna lanca aminokiselina. Van der Waalsove sile nastaju interakcijom između elektrostatskih oblaka. Druga važna sila, ali slaba, stvorena je pomoću trodimenzionalne strukture vode koja teži tome da prisili hidrofobne skupine da budu zajedno kako bi se smanjio njihov razoran učinak na mrežu molekula vode povezane vodicima. Osim peptidne veze jedini drugi tip kovalentne veze, koji je uključen u povezivanje aminokiselina u enzime, je disulfidna veza (-S-S-) koja se može, pod uvjetima oksidacije, formirati između dva bočna lanca cisteina. Disulfidna veza značajno doprinosi strukturnoj stabilnosti enzima i preciznije dovodi do tercijarne strukturne stabilnosti. Određene kombinacije α-heliksa i β-ploča se omotaju jedan oko drugog, te formiraju kompaktno presavijene globularne jedinice od kojih se svaka naziva domena. Dok mali proteini mogu sadržavati samo jednu domenu veći enzimi sadržavaju veliki broj domena. Odnosno, većina enzima su dimeri, tetrameri ili polimeri velikog broja polipeptidnih lanaca. Svaki polipeptidni lanac je podjedinica i mogu biti identični ili različiti od drugih. Bočni lanci na svakom polipeptidnom lancu mogu međusobno djelovati jedna s drugim kao i sa molekulama vode kako bi se dobila konačna struktura enzima. Sveukupna organiziranost podjedinica poznata je pod nazivom kvarterna struktura, a time je i kvarterna struktura karakteristična za enzime sa više podjedinica (Hui, 2006.).

2.4. Kinetika enzima

Osnovni mehanizam djelovanja enzima i interakcija enzima u nekom mediju može se matematički opisati prihvatljivom preciznošću. Međutim, većina jednadžbi (konstantnih i osnovnih pravila enzimske kinetike) su razrađene za idealne situacije u kojima pojedini enzimi djeluju na jednostavne, pojedine podloge pod predvidljivim uvjetima koje se nalaze unutar žive stanice. Prehrambeni tehnolozi trebaju znati ne samo koji enzimi razgrađuju, sintetiziraju ili vrše promjene hranjivih podloga, te koje su to hranjive podloge, već moraju imati i razrađen način koliko odabranog enzima koristiti pod bilo kojim uvjetima da se postigne ekonomična brzina i učinkovitost materijalne pretvorbe. Kvalitativna i kvantitativna kinetika enzima nam pokazuje da se enzimi ponašaju sasvim predvidljivo u jednostavnim, idealnim sustavima poput onih koji se koriste za klasifikaciju i karakterizaciju enzimskih preparata u istraživačkim laboratorijima i laboratorijima koji osiguravaju kvalitetu. Dostižu vrhunac rada pri određenim pH vrijednostima, temperaturi i koncentraciji supstrata, te prema dobro utvrđenim pravilima.

Temperatura i pH, koji su izvedeni iz jednostavnih uvjeta analize, obično su primjenjivi na složene uvjete u kojima se nalazi hrana jer oni više ovise o molekularnim svojstvima proteinskog enzima nego o svojstvima supstrata (Whitehurst, 2002.).

Enzimski proteini su precizno presavijeni polipeptidni lanci koji se drže zajedno sa relativno slabim molekulskim vezama. Presavijena struktura određuje integritet katalitičkog mjesta („aktivno mjesto“) unutar enzima i to se lako poremeti promjenom energije u okolišu enzima (npr. promjena temperature). Ova promjena se zove denaturacija i može biti reverzibilna ili ireverzibilna ovisno o jačini deformacije ili oštećenja strukture. Međutim, čak i male promjene u intramolekulskim vezama u enzimu kao što su one uzrokovane malim promjenama temperature ili promjene naboja ovisnog o pH na aminokiselinama koje čine primarnu strukturu polipeptidnog lanca mogu također uzrokovati promjene strukturne konformacije. Promjene ove veličine manifestiraju se tipičnim temperaturnim i pH krivuljama aktivnosti. Prema tome, kako se povećava temperatura klasična, kemijska kinetika određuje ubrzavanje reakcije, ali iznad određene temperature (karakteristika svakog pojedinog enzima) dolazi do poremećaja presavijene strukture proteinskog enzima koji ponovno smanjuje njegovu katalitičku učinkovitost i aktivnost repova. U slučaju pH manifestira se krivulja u obliku zvona zbog optimalne prostorne strukture enzima koja se stvara pri određenom pH, te se tako omogući maksimalno vezanje supstrata i modifikacija veze. Promjene u naboju i u učinkovitosti vodikovih veza mogu ili deformirati aktivno mjesto zbog promjene u trodimenzionalnom naboru polipeptidnog lanca proteina, ili skratiti dipolne veze funkcionalni grupe aktivnog mjesta, te tako smanjujući njihovu sposobnost da oslabe energiju aktivacije koja služi za promjenu supstrata. Razumijevanje povezanosti između redoslijeda aminokiselina, trodimenzionalne strukture i katalitičke učinkovitosti enzima je prilično opsežno i to omogućava molekularnim enzimolozima da mijenjaju strukturu enzima i time poboljšavaju njihova svojstva tijekom tehnološke obrade kao što su otpornost na toplinu, optimalni pH, otpornost na katalitičke inhibitore/neinhibitore, pa čak i da poboljšavaju osobine supstrata (Whitehurst, 2002.).

2.5. Izvori i količina enzima za prehrambenu tehnologiju

Tkiva biljaka i životinja su bila tradicionalni izvori enzima prehrambene tehnologije. Iako se još uvijek široko koriste u proizvodnji hrane postoje mnogi utjecaji koji upravljaju proizvodnjom

enzima za hranu i koriste se kao mikrobiološka alternativa uključujući i genetski modificirane derivate tih organizama (Vaclavik, 2008.).

Postoji mnogo primjera uporabe enzima koji razgrađuju ugljikohidrate tijekom proizvodnje hrane osobito tijekom pečenja, u proizvodnji piva ili proizvodnji voćnih sokova. Međutim, njihova ekonomična proizvodnja iz mikroorganizama u industrijskim fermentorima znači da upotreba enzima kao što su amilaza i pektinaza prisutne u tradicionalnim sirovinama (pšenica, ječam, citrusno voće, brašno) je ograničena njihovim djelovanjem *in situ* i nisu naširoko ekstrahirani za egzogenu upotrebu. S druge strane, određene biljne i životinjske amilaze ostaju i dalje u rasprostranjenoj upotrebi kroz njihove, dobro utvrđene, učinkovitosti u nekim temeljnim procesima proizvodnje sira i preradi mesa. Od posebnog značaja su papain (i povezane proteaze) u omekšavanju mesa i kimozin u fazi koagulacije mlijeka tijekom proizvodnje sira. Ekstrahirani kimozin iz telećih iznutrica bio je zamijenjen u nekim zemljama istim tim enzimom koji je proizveden fermentacijom kvasaca i gljivica. Međutim, unatoč ponudi čistih i fermentacijskih proizvedenih proizvoda, još uvijek se preferira u mnogim tradicionalnim proizvodnjama sira (Whitehurst, 2002.).

Goveđi i svinjski tripsin se i dalje koristi za proizvodnju proteinskih hidrolizata hrane, ali na tržištu postoje mnoge dobre mikrobiološke alternative posebno one koje su manje sklone stvaranju proizvoda gorkog okusa. Kao i proteaze, životinjske lipaze, koje su u prošlosti bile glavne u mliječnoj industriji, postepeno se zamjenjuju odgovarajućim enzimima mikrobiološkog podrijetla. Lipoksigenaza soje i pšenice je važan enzim za pečenje kruha i tradicionalno se koristi u obliku endogenog enzima pšeničnog brašna s dodatkom sojinog brašna. Potonji se ne dodaje samo za aktivnost lipoksigenaze u tijestu, već također opskrbljuje lipidne supstrate sa oba izvora enzima da bi se poboljšala tekstura, „obradivost“ i boja tijesta za kruh preko oksidacije sulfihidrilne skupine u proteinima pšenice i za oksidativno izbjeljivanje pigmenata. Lizozim i laktoperoksidaza su životinjski enzimi ekstrahirani iz prirodnih izvora, ali se razlikuju od većine životinjskih i biljnih enzima po njihovoj primjeni i u tome što su oba antimikrobna enzima, te se zato mogu koristiti za kontrolu različitih vrsta kvarenja sira i mlijeka. Danas se sve više i više enzima, za prehrambenu industriju, dobiva iz posebno odabranih ili genetski modificiranih mikroorganizama koji se uzgajaju u industrijskim fermentorima (Whitehurst, 2002.).

3. ENZIMI ZA PROIZVODNJU KRUHA

3.1. Gljivična *alfa*-amilaza

Pšenica i pšenično brašno sadrže endogene, autohtone enzime uglavnom amilaze. Međutim, aktivnost amilaze varira ovisno o vrsti pšenice. Količina α-amilaze je zanemariva kod zdrave, neproklijale pšenice i raženog brašna. Dakle, većina brašna za kruh mora biti obogaćena sa α-amilazom koja se dodaje u obliku ječmenog brašna ili gljivičnih enzima. Gljivične α-amilaze su općenito manje termostabilne, te se inaktiviraju na temperaturama od oko 65 ˚C. Gljivične α-amilaze djeluju na oštećenu količinu škroba što može varirati ovisno o vrsti pšenice i uvjetima mljevenja. Probavljive šećere osiguravaju α-amilaze što dovodi do povećanog volumena, bolje boje kore i poboljšanog okusa. Zbog hidrolize oštećenog škroba pogodna doza α-amilaze rezultira poželjnim omekšavanjem tijesta. Međutim, kod predoziranja α-amilazom dolazi do opsežne razgradnje oštećenog škroba i to obično dovodi do ljepljivog tijesta (Whitehurst, 2002.).

3.2. Ksilanaza/pentozanaza/hemicelulaza

U normalnom pšeničnom brašnu postoji 3-4% djelomično topljive i djelomično netopljive pentoze. Ksilanaza ili pentozanaze, obično nazvani hemicelulaze, dugo se upotrebljavaju kao enzimi za kondicioniranje tijesta osobito za Europski tip kruha jer su pokazali poželjne učinke kao enzimi za kondicioniranje tijesta. Pri optimalnoj dozi mogu poboljšati obradivost i stabilnost tijesta, te se postiže veći volumen kruha i poboljšana struktura sredine kruha. Zbog blagotvornih učinaka na volumen kruha i strukturu sredine dodavanjem hemicelulaze postiže se mekša sredina kruha. Uz prisutnost gljivične α-amilaze u proizvodu učinak na mekoću je još izraženiji. Predoziranje sa pentozom i ksilanazom je moguće zbog pretjerane degradacije pentoze iz pšenice čime se uništava sposobnost pentoze iz pšenice da veže vodu. Rezultat predoziranja je ljepljivo tijesto. Prikladna doza ovih enzima rezultira poželjnim omekšavanjem tijesta čime se poboljšava obradivost tijesta. Optimalna doza se stoga definira kao doza koja daje maksimalno poboljšanje svojstava tijesta i kruha bez stvaranja ljepljivog tijesta. Optimalna doza pentoze i ksilanaze ovisi o tipu brašna (Vaclavik, 2008.).

Pravi mehanizam nastajanja ksilanaze u kruhu još nije rasvijetljen iako je veliki broj različitih pristupa ispitan. Sastav pentoze ovisi o tipu brašna. Važnu ulogu ima interreakcija između pentoze i glutena koja još nije definirana. Većina komercijalno dostupnih pripravaka enzima,

koji se koriste za proučavanje, sastoje se od amilaze, proteaze i hemicelulaze. Različiti pripravci ksilanaze ili pentoze imaju različite učinke na izradu kruha. Iako mnoge analitičke metode za ispitivanje pentozanaze ili ksilanaze koriste veliki broj supstrata, još uvijek ne postoji analitička metoda u kojoj se enzimi povezuju sa učincima pečenja kada se uspoređuju različite vrste ovih enzima (Whitehurst, 2002.).

3.3. Lipaza

Lipaza je, od nedavno, prepoznata kao enzim za razvijanje tijesta. Pokazuje izvrsne učinke na svojstva kruha. Značajno povećava volumen kruha, te je struktura sredine kruha svilenkasta i ujednačena, te poprima bjelji izgled. Lipaza može djelomično ili potpuno zamijeniti emulgatore poput DATEM ili SSL/CSL. Cjelokupna učinkovitost ovisi o procesu, formulaciji, sirovinama i prisutnosti ostalih sastojaka za poboljšanje kruha. Utjecaj lipida pšenice, tijekom proizvodnje kruha i način djelovanja lipaze još nije potpuno poznata. Hipoteza da se monogliceridi proizvode *in situ* ne može objasniti učinke lipaze koji su gore opisani. Monogliceridi imaju mali učinak na tijesto u usporedbi sa lipazom. Sadržaj ukupnih lipida, u većini pšeničnog brašna, iznosi 1-1,5%. Budući da lipaza dobiva sve više i više pozornosti u pekarskoj industriji studije u budućnosti bi nam trebale omogućiti bolje razumijevanje način djelovanja lipaze na proizvodnju kruha (Whitehurst, 2002.).

3.4. Oksidaza

Oksidansi, kao što su askorbinska kiselina, bromat i azodikarbonamid, temeljito su proučeni i široko se koriste za proizvodnju kruha. Međutim, pravi mehanizam antioksidansa u proizvodnji kruha nije utvrđen iako su ponuđene brojne hipoteze. Općenito je poznato da je bromat, pri visokim temperaturama, sporo djelujući antioksidans. Kod pečenja maksimalni učinak pokazuje u kasnim fazama, a u ranim fazama pečenja, s obzirom da su askorbinska kiselina i drugi antioksidansi brzo djelujući antioksidansi, maksimalni učinak pokazuje tijekom miješanja. Zbog povećavanja zahtjeva potrošača za prirodnim proizvodima odnosno za proizvodima sa manje kemikalija, a posebno zbog brige o mogućim rizicima za zdravlje uzrokovanim prisutnošću bromata u hrani, stvorila se potreba za zamjenom bromata. Tu oksidaze dobivaju veću pozornost u pekarskoj industriji. Od 1957. godine glukoza oksidaza je poznata za proizvodnju kruha. Glukoza oksidaza ima dobro oksidirajuće djelovanje, te dovodi do formiranja čvrstog tijesta. U proizvodnji nekih pekarskih proizvoda može se koristiti kao

zamjena za bromat ili askorbinsku kiselinu dok u drugim slučajevima, uz askorbinsku kiselinu, izvrstan je za zgušnjavanje tijesta (Whitehurst, 2002.).

4. ENZIMI U PROIZVODNJI PIVA

4.1. Enzimi u proizvodnji slada

Enzimi iz sirovina koje se koriste u proizvodnje piva imaju iznimno ključnu ulogu u tom procesu, ali se razine enzima mogu značajno razlikovati u sirovinama. Tijekom procesa proizvodnje slada aktiviraju se enzimi iz ječma (amilaza, glukanaza, proteaza i hemicelulaza). Kao rezultat, ječmeni slad je pristupačniji za mljevenje i ekstrakciju škroba/ugljikohidrata. Osim endogenih enzima prisutnih u sladu (i ječmu), egzogeni enzimi se ne primjenjuju u proizvodnji slada. Ključni cilj sladara je proizvesti dobro izmijenjen, homogen slad. Promjena se odnosi na promjenu endosperma uz pomoć enzima. U slučaju ne promijenjenog ili homogenog slada loše kvalitete, egzogeni enzimi kao što su amilaza i glukonaza mogu pomoći u razgradnji polimernih supstrata kao što su škrob, glukani, proteini i druge komponente male molekulske mase (Whitehurst, 2002.).

4.2. Prisutni enzimi tijekom procesa gnječenja

Gnječenje obično počinje razgradnjom proteina slada pomoću proteaze i peptidaze koje, u odnosu na druge prisutne enzime, nisu termički stabilni. Stoga se u ovoj fazi primjenjuju niže temperature, od 45 do 55 ˚C. Tijekom proizvodnje slada se već dogodila djelomična razgradnja proteina, te egzogeni enzimi mogu pomoći da se poveća količina slobodnog amino dušika koji je potreban kao izvor dušika za vrijeme fermentacije kvasca. Međutim, treba uzeti u obzir da prekomjerna razgradnja proteina može uzrokovati pretjerano razvijanje boje, te može utjecati na mogućnost pjenjenja konačnog proizvoda (Vaclavik, 2008.).

Razgradnju stanične stjenke provodi enzim glukanaza. Glavni problem nepotpune razgradnje stanične stjenke, u slučaju heterogenog slada, je negativan utjecaj polisaharida tijekom procesa filtracije kaše, procesa filtracije piva te negativan utjecaj na stabilnost konačnog proizvoda. Najvažniji polisaharid, koji je potrebno razgraditi, naziva se β-glukan. Ovaj polimer najviše doprinosi viskoznosti sladovine i pivo je sklono formiranju netopljivih kompleksa. Glukan ječma se uglavnom sastoji od jedinica β-glukoze međusobno povezanih β-1-3 vezama. Glukan slada je manje temperaturno stabilan od mikrobnih enzima dok je gljivična glukanaza vrlo stabilna na primijenjenom pH (Whitehurst, 2002.).

4.3. Enzimi za razgradnju dodataka

Dodatci koji se primjenjuju u proizvodnji piva su jeftina zamjena za fermentirajuće ekstrakte u odnosu na ječmeni slad. Najčešći izvori dodataka su kukuruz, riža, ječam i pšenica. Sve ove žitarice zahtijevaju upotrebu šećernog sirupa (kiseli hidrolizat škroba). Najbolji enzim je bakterijska (*Bacillus*) α-amilaza koja dobro podnosi visoke temperature, te ne proizvodi slobodne šećere koji imaju negativan učinak na fermentaciju. Primjena ove vrste enzima je posebno pogodna kada izvor škroba nije ječam već druge žitarice kao na primjer riža, sirak i druge. Temperatura želatinizacije škroba ovih izvora je između 68 ˚C i 80 ˚C, dok kod ječmenog škroba oko 63 ˚C. Najstabilniji enzim je enzim dobiven iz *B. licheniformis* (djeluje na temperaturi do 105 ˚C) dok enzim iz skupine *B. subtilis* ima srednju stabilnost (djeluje na temperaturi do 80 ˚C) (Whitehurst, 2002.).

4.4. Enzimi tijekom filtracije kaše

Filtracija kaše se obično provodi pri temperaturama od 75 do 78 ˚C. Gotovo svi enzimi (β-glukanaza, proteaza, β-amilaza, α-amilaza) slada su inaktivirani pri ovim temperaturama. Samo mala količina preostale α-amilaze će biti aktivna gdje se koriste relativno niske temperature filtracije (Whitehurst, 2002.).

4.5. Enzimi tijekom fermentacije

Proces vrenja inaktivira sve enzimske aktivnosti bili oni iz slada ili iz egzogenih izvora. Tijekom aktivnosti enzima unutar stanica kvasca molekule šećera se odvajaju i u anaerobnoj fazi se pretvaraju u ugljični dioksid, te etanol i aminokiseline prelaze u proteine kvasca i neke aromatske komponente, na primjer fenil-etanol. Egzogeni enzimi se koriste u fermentaciji da bi se izbjegle poteškoće koje se javljaju u procesu. Ako dođe do problema tijekom filtracije piva u fermentor se dodaje β-glukanaza (ili se može dodati tijekom zrenja) koja zatim razgrađuje zaostale glukane koji mogu dovesti do začepljenja filtera. Još je jedan razlog za upotrebu enzima tijekom filtracije, a to je da oni smanjuju probleme mutnoće piva. Nakon analize materijala dodaje se gljivična α-amilaza li β-glukanaza (Whitehurst, 2002.).

4.6. Enzimi tijekom zrenja

Egzogeni enzimi se, osim u procesu filtracije, mogu primijeniti i prilikom zrenja piva. Jedan od ciljeva zrenja je resorpcija diacetila, koji stvara nepoželjni okus u zrelom pivu. Ovaj sastojak stvara kvasac tijekom primarne fermentacije. Spontana pretvorba prekursora α-acetolaktata

u diacetil jako je spora. Ova reakcija se može ubrzati povećanjem temperature na kraju primarne fermentacije i drugih reakcija od koji su neke nepoželjne, na primjer autoliza. Stoga je razvijen mikrobni enzim, α-acetolaktat dekarboksilaza, koji je odgovoran za pretvorbu α-acetolaktata u acetoin, prije nego α-acetolaktat prijeđe u diacetil (Whitehurst, 2002.).

5. ENZIMI U PROIZVODNJI VINA

5.1. Svojstva i sastav enzima

Enzimi igraju ključnu ulogu u proizvodnji vina. Vino se može smatrati kao proizvod nastao pomoću enzimske promjene soka od grožđa. Enzimi ne potječu samo od grožđa, već i od kvasaca, gljivica i drugih mikroorganizama. U današnje vrijeme djelovanje tih endogenih enzima je ojačano i prošireno upotrebom industrijskih, egzogenih enzima. Enzimi koji potječu od mikroorganizama, koji su slučajno inficirali grožđe, također igraju važnu ulogu. Endogeni enzimi, koji su prisutni u grožđu, imaju bitnu ulogu u zrenju. Ipak, njihova je uloga vrlo ograničena pri uvjetima proizvodnje vina zbog vrlo slabih i ograničenih aktivnosti. Stoga, se egzogeni enzimi koriste kao pomoćnici u procesu proizvodnje jer mogu pojačati ili nadomjestiti aktivnosti enzima grožđa. Poboljšano znanje o prirodi i strukturi makromolekula u moštu i vinu nudi nove mogućnosti za primjenu enzima u proizvodnji vina prilikom procesa bistrenja i filtracije, ekstrakcije i stabilizacije kod bijelog i crnog vina. Danas, glavni industrijski enzimi, koji se primjenjuju u proizvodnji vina su pektinaze, hemicelulaze i pripravci glukanaze. Enzimski pripravci se nalaze u obliku granula, tekućine ili praha. Nije poželjno koristiti pripravke u obliku praha zbog mogućnosti alergije. Enzimski pripravci u obliku granula ne stvaraju prašinu zbog toga jer su čestice enzima čvrsto povezane. Ostale prednosti granuliranih pripravaka su te što ne sadrže konzervanse i stabilni su tijekom skladištenja. Tekući enzimski pripravci obično sadrže konzervanse (Whitehurst, 2002.).

5.2. Primjena enzima pri proizvodnji sorti bijelog i ružičastog vina

Za proizvodnju bijelog i ružičastog vina je preporučeno koristiti pročišćene enzimske pripravke odnosno pripravke kojima su uklonjene aktivnosti cinamil esteraze. Prirodno ih proizvode *Aspergillus niger* i *Botrytis cinerea*, te su odgovorne za hidrolizu fumarne i ferulne kiseline koje, nakon dekarboksilacije, vode ka formiranja vinil-4-fenola i vinil-4-gvajakola. Ovi spojevi bijelom vinu daju nepoželjni, „farmaceutski“ okus. Postoje dva glavna razloga za upotrebu enzima u proizvodnji bijelog i ružičastog vina. Prvi razlog je pitanje kvalitete: nakon kratke predinkubacije sa enzimima može se primijeniti više kontroliran proces prešanja što dovodi do smanjene oksidacije, bolje kvalitete prvog prešanja i bolje ekstrakcije okusa, a to dovodi do boljih organoleptičkih svojstava. Drugi razlog je tehnički: upotreba enzima omogućuje veće punjenje opreme za prešanje i centrifugiranje, kraće vrijeme prešanja i brže okretanje

cjelokupne opreme. Sveukupno to dovodi do veće učinkovitosti i većeg kapaciteta opreme (Whitehurst, 2002.).

5.3. Primjena enzima pri proizvodnji sorti crnog vina

Tijekom proizvodnje crnog vina enzimi djeluju na stanice pulpe i kore grožđa. Enzimi se dodaju na samom početku maceracije vina. Količina enzima ovisi o kvaliteti grožđa prilikom branja (vrlo zrelo, zrelo, nezrelo, oštećeno) i o vrsti vina (kratka ili duga fermentacija). S obzirom na tanine crnog grožđa posebno je zanimljivo selektivno djelovanje enzima na polisaharide koji se nalaze u kori. Otpušteni su samo slobodni tanini u vakuolama i tanini, zajedno sa polisaharidima, prisutni u složenim strukturama. Otpuštanje kompleksa ugljikohidrat-tanin ima pozitivni učinak na crno vino koje je ocijenjeno kao manje oporo i manje gorko u usporedbi sa netretiranim vinom. Veća količina dodanih enzima i duže vrijeme inkubacije rezultira intenzivnijim djelovanjem enzima, a time i većom ekstrakcijom sastojaka kore. Prema tome, moguća je proizvodnja više sorti crnih vina s obzirom na količinu dodanih enzima, te na vrijeme inkubacije. Pri većim količinama enzima veći je i doprinos iz tanina (Whitehurst, 2002.).

6. ENZIMI U PROIZVODNJI MLIJEČNIH PROIZVODA

6.1. Enzimi za zgrušavanje mlijeka

Mlijeko se razlikuje ovisno o fizičkom i kemijskom sastavu na koje utječu čimbenici kao što su dob i pasmina krava, stadij laktacije, razina aktivnosti, upotreba lijekova i razmak između mužnji. Sastoji se uglavnom od vode i sadrži neke tvari cjepiva ili nemasne tvari mlijeka kao što su laktoza, kazein, proteini sirutke i minerale. Mlijeko također prirodno sadrži masnoću (Vaclavik, 2008.).

Mliječna mast se sastoji od 98% triglicerida i 1% fosfolipida. Također sadrži male količine di- i monoacilglicerola, sterola, više masne kiseline, karotenoide i vitamine (Sikorski, 2002.).

Prilikom proizvodnje mliječnih proizvoda također se koriste enzimi. Najpoznatiji mliječni pripravak enzima se naziva sirilo, a to je komercijalni pripravak koji sadrži uglavnom kimozin, enzim koji je odgovoran za hidrolizu κ-kazeina i destabilizaciju kazeina. Međutim, ovisno o dobi teladi iz kojih je ekstrahiran, sirilo može sadržavati manje ili više pepsina. Sirilo zgrušava mlijeko tako što uklanja fragment κ-kazeina koji se nalazi na površini micelarnog kazeina, glavnog oblika proteina mlijeka. Destabilizirane micele kazeina se skupe i tvore strukturu zgrušanog (usirenog) mlijeka koji se zatim zakiseli mliječnim kulturama da nastane sirutka (Whitehurst, 2002.).

6.2. Prirodni enzimi mlijeka

Mlijeko sadrži oko 60 prirodnih enzima koji predstavljaju manji, ali vrlo važan dio sustava proteina mlijeka. Enzimi potječu iz sekrecijskih stanica ili krvi. Plazmin i lipoprotein proteaza su povezani sa micelama kazeina, te je nekoliko enzima je prisutno u serumu mlijeka. Prirodno enzimi su značajni iz nekoliko razloga (Hui, 2006.):

Tehnološki razlozi (Hui, 2006.)

- plazmin uzrokuje proteolizu u mlijeku i nekim mliječnim proizvodima. Može biti odgovoran za geliranje mlijeka pri jako visokim temperaturama i pridonosi proteolizi u siru tijekom zrenja posebno kod vrste sira koji su kuhani pri viskom temperaturama i u kojima je koagulant potpuno denaturiran, kao na primjer Emmentaler, Parmezan i Mozzarella,

- lipoprotein lipaza može uzrokovati hidrolitičku užeglost mlijeka ili maslaca, ali pozitivno doprinosi zrenju sireva koji su od sirovog mlijeka,
- kisela fosfataza može uzrokovati defosforilaciju kazeina i može mijenjati svoja funkcionalna svojstva te doprinosi zrenju sira,
- ksantin oksidaza je veoma moćni prooksidans i može uzrokovati oksidativnu užeglost mlijeka; smanjuje količinu nitrata,
- laktoperoksidaza je, u prisutnosti niske razine H_2O_2 i SCN^-, vrlo učinkovito baktericidno sredstvo i koristi se za hladnu sterilizaciju mlijeka.

Indikatori kvalitete mlijeka (Hui, 2006.)

- inaktivacija alkalne fosfataze je standardni test za procjenu adekvatnosti HTST pasterizacije. Predloženi testovi za sterilizaciju mlijeka su glavni kod inaktivacije γ-glutamil transpeptidaze ili laktoperoksidaze,
- koncentracija i aktivnost nekolicine enzima u mlijeku poraste tijekom mastitisa i neki su korišteni kao indikatori za ovo stanje, kao na primjer katalaza, kisela fosfataza i pogotovo N-acetil glukozamin.

Antibakterijski (Hui, 2006.)

- mlijeko sadrži nekoliko baktericidnih sredstava od koji su najpoznatiji lizozim i laktoperoksidaza:
    - laktoperoksidaza se prirodno nalazi u sirovom mlijeku, kolostrumu i slini. Smatra se da je dio zaštitnog sustava protiv crijevnih infekcija kod mladunčadi koja sisa. Djeluje baktericidno na gram-negativne bakterije, a na gram-pozitivne djeluje bakteristatsko (Whitehurst, 2002.),
    - lizozim je široko rasprostranjen u prirodi. Bektericidan je za mnoge gram-pozitivne bakterije jer razbija njihove stanične stjenke. Također inhibira rast *Listeria monocytogenes* u jogurtu i svježem siru visoke kiselosti (pH<5,0), ali učinak nije dovoljno dosljedan kod komercijalnih, fermentiranih mliječnih proizvoda međutim, visoka kiselost je obično dovoljna sama po sebi da inhibira ove patogene.

7. ENZIMSKA PROMJENA PROTEINA U HRANI

7.1. Uloga enzima u mesnoj hrani

Reakcije katalizirane endogenim enzimima na proteinima i drugim dušičnim spojevima su odgovorne za poželjna i nepoželjna senzorska svojstva hrane (boja, okus i tekstura) kao i za razvoj spojeva koji su nutricionistički djelotvorni ili imaju štetne učinke na zdravlje ljudi. Neki proteini utječu na senzorska i funkcionalna svojstva hrane, zbog djelovanja enzima na proteine u njihovom prirodnom okruženju ili kada se enzimi namjerno dodaju, tijekom obrade, u obliku preparata obogaćenih enzimima, čistih enzimskih preparata ili starter kultura mikroorganizama. Primjeri koji obuhvaćaju promjene uzrokovane promjenama na proteinima uključuju gubitak početne svježine ribe nakon ulova, *rigor mortis* i osjetljivost mesa, zrenje usoljene ribe i sira, omekšavanje ribljeg gela, fermentacija tijekom obrade soje i proteolitičke promjene brašna (Sikorski, 2002.).

Na senzorsku kakvoću mesa i morskih plodova značajno utječu endogene proteaze. Proteaze kataliziraju hidrolitičku razgradnju peptidnih lanaca. Kada proteaza djeluje na proteinski supstrat dolazi do katalizacije uzastopnih reakcija. Lizosomi sadrže najmanje 12 katepsina koji mogu zajednički djelovati na proteine i peptide. Optimalna pH vrijednost za djelovanje katepsina se nalazi u slabo kiselom području. Lizosomi koji su pohranjeni u sarkoplazmi govedine otpuštaju katepsine. Većina katepsina u mesu hidroliziraju neke miofibrilne proteine. Proteoliza katepsinom se smatra jednim od odgovornih čimbenika za omekšavanje mesa. Iako enzimi mogu hidrolizirati miozin i aktin samo jedan mali dio razgradnje tih glavnih miofibrilnih proteina se odvija za vrijeme omekšavanja mesa. Mišići također sadrže nelizosomne proteaze koje su sposobne za hidrolizu nekoliko miofibrilnih proteina odgovornih za cjelokupnu strukturu mišićnih vlakana posebno proteina citoskeleta (Sikorski, 2002.).

Kalpain, kalcij-aktivirana neutralna metaloproteinaza, zahtjeva cistein-tiolnu skupinu za djelovanje. Najveće djelovanje kalpeina je pri pH od 7,0 do 7,5, dok pri pH 6 i 4,5 djelovanje mu je oko 80% i 40% od maksimalne vrijednosti. Poznate promjene koje se događaju prilikom omekšavanja različitih vrsta mesa nastaju zbog razlike u djelovanju kalpaina i kalpastatina (obitelj endogenih inhibitora proteina koji se nalaze na istom staničnom prostoru kao i enzimi). Proces omekšavanja mesa također uključuje razgradnju drugih citoskeletnih proteina kao što su timin, nebulin i desmin. Promjena proteina koja je katalizirana endogenim enzimima utječe

na senzorsku kvalitetu različitih slanih, hladno-dimljenih i mariniranih ribljih proizvoda. Kod lagano posoljenog lososa, jesetre, haringe, srdela i mnogih drugih vrsta, reakcije hidrolize dovode do razvoja meke teksture. Aroma postaje uglavnom riblja i slana sa mesnom, sirastom i pomalo užeglom notom (Sikorski, 2002.).

Aktivnost endogenih proteaza, koja se mijenja ovisno o sezoni i o intenzitetu hranjenja ribe, utječe na podobnost ribe za slano zrenje. Kod proizvoda, koji su predugo uskladišteni na previsokoj temperaturi, dolazi do prekomjerne reakcije proteolize i to dovodi do neprihvatljivog omekšavanja mesa. Na površini prezrele, usoljene ribe mogu se pojaviti bijeli „cvjetovi“ kristaliziranih peptida i aminokiselina, uglavnom tirozina. U sirovim, mariniranim haringama zrenje nastaje zbog mišićnih katepsina. Različite endogene proteaze su uključene u raspadanje strukture ribljih gelova i to se često događa zbog sporog kuhanja pri temperaturama od 50 do 70 ˚C (Sikorski, 2002.).

Proteoliza je, u velikom postotku, uključena u proizvodnju jestivih, ribljih umaka, silaži za stočnu hranu i hidrolizata za upotrebu kao funkcionalnih sastojaka hrane. Riblja silaža je uglavnom napravljena od usput ulovljene ribe i iznutrica koje se melju, a potom zakiseljavaju sa mravljom kiselinom ili smjesom mravlje i sumporne kiseline, te tu dolazi do proteolize katalizirane endogenim enzimima. Nakon dva dana, pri temperaturi od 30 do 40 ˚C, veći dio tkiva se rastvori. Proizvod koji je komercijalno proizveden u velikoj mjeri se koristi kao sastojak hrane za svinje, perad i ribu. Riblji hidrolizati se sastoje uglavnom od neiskorištenih riba ili od fileta koji su nusproizvodi, a proizvedeni su postupkom koji je kataliziran dodanim proteinazama iz biljaka, životinja ili proteinazama mikrobiološkog podrijetla. Proizvod se može koristiti kao izvor amino kiselina, kao medij za rast mikroorganizama, kao zamjena za mlijeko u stočnoj hrani ili kao sastojak funkcionalne hrane (Sikorski, 2002.).

7.2. Reakcije katalizirane transglutaminazom

Transglutaminaza ili protein-glutamin γ-glutamiltransferaza katalizira prijenos acilne skupine glutaminskog ostatka u proteinima ili peptidima na primarni amin ili molekule vode. Sudjeluje u nekoliko fizioloških procesa biljnih i životinjskih organizama. Također, proizvedena je kao izvanstanični enzim *Streptoverticillium sp., Physarium sp.* i drugih mikroorganizama. Općenito, aktivnost transglutaminaze, koja je biljnog i mikrobiološkog podrijetla, ne ovisi o prisutnosti Ca^{2+} dok enzim koji je prisutan u životinjskim tkivima ovisi o Ca^{2+}. Međutim, potrebu za Ca^{2+} diktira vrsta supstrata (Sikorski, 2002.).

Transglutaminaza se javlja u obliku monomera, dimera ili tetramera, te je otopljena u citosolu ili je vezana u mitohondrijima i lizosomima. Maksimalnu aktivnost ima pri temperaturi od 50˚C, te se zato mogu učinkovito koristiti za modifikaciju proteina u hrani pri temperaturnom rasponu od 5 do 20 ˚C. Za aktivnost transglutaminaze različitog podrijetla optimalni raspon pH je od 6 do 9,5. Uloga transglutaminaze u proizvodnji hrane nastupa tijekom učinka umrežavanja proteina, ugradnje amina i deaminiranja glutaminskog ostatka. Učinak enzimske aktivnosti, izražena kao umrežavanje, ovisi o koncentraciji NaCl-a kao i o svojstvima proteinskih supstrata. Na aktivnost deaminiranja transglutaminaze različitog podrijetla utječe specifičnost enzimskih supstrata. Komercijalno proizvedene mikrobiološke transglutaminaze su pronašle brojne primjene u preradi hrane. Mogu se koristiti za povećanje čvrstoće gela, za poboljšanje reoloških svojstava mliječnih proizvoda, te u proizvodnji različitih mesnih proizvoda. Reakcije katalizirane pomoću dodane transglutaminaze mogu dovesti do, „po mjeri“, pripremljenih proteinskih pripavaka kao na primjer jestivi filmovi od proteina sirutke, te za kovalentno vezanje saharida sa biljnim proteinima koji su bogati ostatcima glutaminaze. Transglutaminaza, neovisna o Ca^{2+} i koja proizlazi iz *Streptoverticillium sp.*, može izazvati geliranje glicina i legumina pri temperaturi od 37 ˚C, te su ti gelovi krući i elastičniji nego toplinski geliranih proizvoda. Tijekom skladištenja proizvoda zbog aktivnosti transglutaminaze može doći do promjene reoloških svojstava gela. Da ne bi došlo do tih promjena, aktivnost transglutaminaze se može nakon inkubacije otopine gela sa enzimom zaustaviti zagrijavanjem do 90 ˚C (Sikorski, 2002.).

7.3. Enzimsko omekšavanje mesa

Već dugi niz godina je poznata upotreba biljne proteaze papaina, ficina i bromelaina za enzimsko omekšavanje mesa. Ovi enzimi imaju relativno dobar učinak na sastojke mišićnog tkiva kao što su kolagen i elastin. Također, mikrobiološke proteaze su pokazale mogućnost da omekšavaju meso. Enzimi se primjenjuju posipanjem enzimskog praha na tanki komad mesa, uranjanjem mesa u otopinu enzima ili prskanjem reza na mesu otopinom enzima pomoću sustava za ubrizgavanje. Koja god metoda se primjenjuje vanjski enzimi stvaraju poteškoće ravnomjerne raspodjele enzima kroz tkiva prilikom omekšavanja mesa (Whitehurst, 2002.).

7.4. Prerada ribe

Za poboljšanje kvalitete krajnjeg proizvoda i ekonomičnosti proizvodnje fileta koristi se novi, razvijeni proces proizvodnje korištenjem okosnice i dodataka ribljih fileta. Tijekom hidrolize sirovina se zagrijava kroz 45 minuta na temperaturi od 55 ˚C. Koristi se 1 kg enzima Protamex™ na 1000 kg sirovine. Nakon hidrolize zagrijava se na temperaturu od 90 ˚C, kroz 15 minuta, te se tako inaktiviraju enzimi. Smjesa se zatim cijedi kroz sito i odvaja pomoću trofazne centrifuge. Filtracijom se dobiva kristalno čist proizvod. Zgušnjavanje se postiže isparavanjem vode i dodavanjem soli. Kao alternativa, otopina proteina se može koristiti i bez zgušnjavanja direktno kao podloga za proizvodnju marinada uz dodatak soli (Sikorski, 2002.).

8. ENZIMI U EKSTRAKCIJI SOKA IZ VOĆA I POVRĆA

8.1. Pektini

Voće sadrži visoki udio pektinskih tvari. Pektini pripadaju skupini kiselih polisaharida koji se nalaze u središnjoj lameli primarne stanične stjenke biljaka. Količina i svojstva pektinskih tvari određuju teksturu voća i povrća. U nezrelom voću pektini su uglavnom prisutni u obliku netopljivih protopektina koji, tijekom sazrijevanja, prelaze u topljive pektine. Ovom pretvorbom pektinaze se stvaraju unutar voća i čine ga mekšim. Taj isti mehanizam se može izvršiti i pomoću mikrobne poligalakturonaze odnosno protopektinaze koja ima svojstva omekšavanja. Kemijski gledano pektini nisu homogene tvari. Naprotiv, oni su vrlo heterogene mješavine polisaharida različitih molekulskih masa i različitih stupnjeva esterifikacije. Sastoje se od tzv. glatke pektinske regije, koja zauzima relativno veliki dio, od 60 do 90%. Njihove glavne komponente su neesterificirane jedinice galakturonske kiseline ili jedinice galakturonske kiseline esterificirane sa metanolom. Protopektin, koji je netopljiv u vodi, se sastoji od lanaca metoksilirane poli-D-galakturonske kiseline povezanih preko iona metala (Ca^{2+}, Mg^{2+}), polisaharidnih spojeva (arabinoza, ksiloza, ramnoza, galaktoza), fosforne kiseline, spojeva karboksil estera i vodikovih mostova. Pektini, koji su topljivi u vodi, formirani su enzimima za omekšavanje prisutnih u voću tijekom sazrijevanja, te su visokog stupnja esterifikacije. Većina njih su glatke regije pektinske tvari čija topljivost raste sa povećavanjem stupnja estreifikacije i smanjenjem molekulske mase. Nitasta regija pektina čini od 10 do 40%, te uglavnom sadrži mješavinu arabana, rhamnogalakturonana i arabinogalaktona kao i proteina (Whitehurst, 2002.).

8.2. Celuloza i hemiceluloza

Celuloza je jedan od sastojaka staničnog zida voća i povezan je ksiloglukanima sa glatkom i nitastom pektinskom regijom. Prema sadašnjim saznanjima razgradnja celuloze uzrokuje interreakciju između tri različite hidrolaze. Prvi korak je razdvajanje amorfnih područja pomoću endoglukanaze također nazvane C_x-celulaza. Ovo uzrokuje stvaranje novih supstrata za sljedeći korak, a to je cijepanje celobioze pomoću tzv. celobiohidrolaze ili C_1-celulaze. Sinergistički učinak C_x- i C_1-celulaza dovodi do rasta molekula celobioze koje se razgrade na glukozu pomoću trećeg enzima celobiaze, također poznata kao i β-glukozidaza. Hemiceluloze su skupine polimernih ugljikohidrata koji se mogu svrstati, u širem smislu, u nitastu regiju

pektina. Glavni predstavnici ove skupine su galaktomanani, ksilani i β-glukani. Također, biljne gume pripadaju u ovu skupinu tvari. Ovisno o vrsti voća i tehnologiji obrade ove se tvari otope i ometaju obradu ili filtriranje. U ovom slučaju, pogodni enzimi spadaju pod kategoriju hemicelulaze i redovito provode sekundarne aktivnosti u produktima pektolitičkih enzima. Produkti celulaze dobiveni iz vrste *Trichoderma* su posebno pogodni za preradu voća i povrća, te se uglavnom koriste u kombinaciji sa pektolitičkim enzimima. Oni omogućuju daljnje smanjenje viskoznosti posebno tijekom procesa omekšavanja i otapanja, te olakšavaju proces razdvajanja krutine i tekućine. Glavni cilj je optimizirati proces, ali i povećati prinos (Whitehurst, 2002.).

8.3. Škrob

Škrob je biljni polisaharid pohranjen u korijenu i sjemenkama biljaka, a nalazi se još i u endospermu zrna žita. Zahvaljujući kiselim pH zahtjevima voćnih sokova jedini enzimi koji se mogu koristiti su oni enzimi dobiveni iz plijesni i gljivica budući da bakterijski enzimi pokazuju učinak od pH 5 pa nadalje, a također jako ovise i o temperaturi. Ovisno o njhovom specifičnom djelovanju razlikujemo četiri enzima: α-amilazu, β-amilazu, glukoamilazu i pululanazu. Endoenzimi poput α-amilaze djeluju na bilo kojem mjestu škrobnog lanca i razgrađuju neoštećeni škrob. Produkti hidrolize β-amilaze koji, ovisno o stupnju hidrolize, su poželjni tijekom komercijalne proizvodnje kruha su glukoza, maltoza i dekstrini. Egzogena β-amilaza djeluje na α-1,4 glikozidne veze sa ne reducirajućeg kraja i na oštećen lanac amiloze ili amilopektina (Vaclavik, 2008.).

Nadalje, ona hidrolizira škrob po dvije jedinice glukoze odjednom, te se tako dobije maltoza. Škrob ne mogu hidrolizirati β-amilaze izvan točke grananja amilopektina. Enzim glukoamilaza hidrolizom α-1,4 veza proizvodi glukozu i polagano hidrolizira α-1,4 veze u škrobu. Pululanaze su endohidrolaze koje isključivo cijepaju α-1,6 veze amilopektina zbog čega se nazivaju i „enzimi razgranavanja“. Hidroliza razgranatih veza uništava prostornu strukturu amilopektina. Produkti hidrolize su linearni dijelovi amiloze. Kada su enzimi prvi put upotrijebljeni za preradu voća samo su se koristile α-amilaze jer tada nisu bile dostupne druge gljivične amilaze i problemi sa škrobom su bili, više-manje, rijetkost. Nakon uvođenja horizontalnih preša povećala se količina škroba u soku. Tek nakon uvođenja vrućeg bistrenja po prvi put se počela koristiti glukoamilaza. Gljivične α-amilaze nisu tada korištene jer nisu bile pogodne za vruće

bistrenje zbog njihove stabilnosti pri niskoj temperaturi. Gljivične α-amilaze se danas sve više i više koriste za hladno bistrenje (Whitehurst, 2002.).

8.4. Proteini

Voće sadrži samo male količine proteina, ali oni postaju sve više i više važni u novim tehnologijama. Trenutno korištenje proteaza u preradi voća nije rasprostranjeno. Kako tehnologija membrana postaje popularnija tako se sve više povećava interes za tu zanemarenu skupinu enzima. Bentoniti su korišteni za taloženje proteina u konvencionalnom procesu bistrenja, ali ovaj tip taloženja proteina se ne koristi u membranskim procesima. Zato se proteini mogu nakupiti na membranu, te tako ugrožavaju tok i sposobnost filtracije. Dijelovi proteina prolaze kroz membranu, te tako negativno utječu na kvalitetu voćnih koncentrata stvarajući naknadno zamućenje soka. Uglavnom, jedina prikladna proteaza je ona čiji je pH optimum u kiselom području. Zato su samo odgovarajuće gljivične proteaze vrijedne razmatranja. One pokazuju vrlo dobru aktivnost u pH području od 3 do 5 što dovodi do željenog učinka. Posebne gljivične proteaze su dobivene iz *Aspergillus niger* sa optimalnim pH područjem od 3 do 5 i vrlo su učinkovite u soku od grožđa. Hidrolizom proteina velike molekulske mase u fragmente proteina ovi sokovi gube sposobnost da vežu tanine i da formiraju protein-tanin komplekse. Protein-tanin kompleksi su odgovorni za začepljenje membrana. Osobito je to slučaj prilikom prerade citrusa. Također je iskustvo stabilizacije koncentrata od jezgričavog voća pomoću prikladnih proteaza bilo pozitivno. Daljnji problem koji se može riješiti uz pomoć prikladnih proteaza, je formiranje pjene tijekom prerade (Vaclavik, 2008.).

9. KOMERCIJALNA PROIZVODNJA ENZIMA

Postoje tri glavna izvora komercijalnih enzima koji se trenutno koriste za obradu hrane:

1. Životinje,
2. Biljke i
3. Mikroorganizmi.

Daleko najveća skupina komercijalnih enzima koji se trenutno koriste u prehrambenoj industriji su proizvodi fermentacije mikroorganizama, ali se i dalje primjenjuju enzimi dobiveni iz nekih životinja i manja skupina enzima koji potječu iz biljaka. Enzimi dobiveni iz životinja i koji se danas koriste u proizvodnji hrane obično potječu iz organa različitih vrsta, na primjer enzim pepsin je izoliran iz sluznice želuca svinje. On ima za prioritet cijepanje peptidnih veza gdje karbonilna skupina potječe od fenilalanina, leucina ili glutaminske kiseline (pepsin A), te je njegova primjena ograničena u proizvodnji sira, hidrolize proteina te tijekom probave. Najmanja grupa enzima koja se danas koristi u prehrambenoj industriji je dobivena iz biljaka. Upotreba biljnih enzima seže stoljećima unatrag u vrijeme kada su starosjedioci iz tropskih zemalja prije kuhanja mesa zamotavali ga u lišće biljke papaje i uvidjeli da to ima omekšavajući učinak, ali nisu bili svjesni biokemijskih reakcija koje se odvijaju. Međutim, s povećanjem znanja o biokemiji utvrđeno je da svojstvo omekšavanja nastaje zbog prisutnosti proteolitičkih enzima u papaji koji djeluju na proteine mesa. Trenutno ta svojstva se komercijalno iskorištavaju za prehrambenu industriju i tri glavna biljna enzima koji se koriste u prehrambenoj industriji su papain iz papaje, bromelain iz ananasa i ficin iz smokve. Od ta tri enzima papain je daleko najvažniji i danas se puno koristi prvenstveno za proizvodnju piva i za omekšavanje mesa (Whitehurst, 2002.).

Najveća skupina industrijskih enzima koji se danas koriste u prehrambenoj industriji su dobiveni pomoću mikrobne fermentacije. Fermentacija je proces u kojem se mikroorganizmi uzgajaju pod vrlo kontroliranim uvjetima koji omogućuju maksimalnu proizvodnju i izražaj osobina željenog enzima. Sve tri kategorije mikroorganizama (bakterije, gljivice i kvasci) su izvori komercijalnih enzima. Proces započinje obnovom očuvane kulture i postepeno se razvijaju stanice preko razvijenog, multi-serijskog inokuluma, te se vrhunac postiže u fermentoru. U ovoj fazi, kultura je spremna za potpunu fermentaciju gdje se postiže maksimalni rast mikroorganizama i proizvodnja enzima. Cilj posljednje faze proizvodnje je

maksimalni oporavak količine enzima proizvedenog tijekom fermentacije (Whitehurst, 2002.).

Najvažnija imovina bilo kojeg proizvođača komercijalnih enzima je njegova zbirka kultura i stoga je od glavnog značaja očuvanje i dugoročno skladištenje tih mikroorganizama. Postoji nekoliko načina za očuvanje kultura. Kulture bujona ili stanice uzete sa kosine epruvete se raspoređuju u bočice i zamrzavaju. Pohranjuju se pri standardnim uvjetima zamrzavanja od -5 do -20 ˚C, te tako imaju mogućnost da žive do dvije godine. Za dugoročno očuvanje koriste se mehanički zamrzivači gdje je temperaturni raspon od -50 do -80 ˚C. Kulture se još mogu pohraniti za dugoročno čuvanje u tekući dušik (-196 ˚C) ili u pari tekućeg dušika (-156 ˚C). Danas se tekući dušik smatra jednim od najuspješnijih sredstava za očuvanje stabilnosti kultura upravo zbog njegove sposobnosti da pouzdano očuva mikroorganizme kroz duže vrijeme. Sušenje zamrzavanjem ili liofilizacija kultura obuhvaća uklanjanje vode iz smrznutih staničnih suspenzija pomoću sublimacije pod sniženim tlakom. Većina sojeva može biti sačuvana u ovom stanju u razdoblju do 10 godina. Procjepljivanje je metoda održavanja kultura na životu pomoću periodičnog prijenosa na svježi agar nakon čega slijedi inkubacija na pogodnoj temperaturi rasta. Kulture se potom pohranjuju u hladnjak pri temperaturi do 5 ˚C. Ova metoda je prikladna i jeftina, ali se ne preporučuje za dugoročno pohranjivanje kultura (Whitehurst, 2002.).

Prva faza komercijalne proizvodnje enzima uključuje oporavak sačuvanih kultura i višefaznu akumulaciju biomase, te se to naziva razvoj inokuluma. Za početak procesa se tekućem mediju u epruveti dodaje mala količina pohranjene kulture. Nakon inkubacije pri odgovarajućoj temperaturi i tijekom određenog vremenskog razdoblja (dan ili dva za bakterije, nekoliko dana za gljivice) kultura je spremna za višefazni razvoj. To obično počinje sa prijenosom inokuluma u tikvicu sa tekućim medijem. Procjepljivanje inokuluma u tikvice se vrši u kontroliranim uvjetima kako bi se spriječila kontaminacija. Tikvice se stave u naizmjeničnu mućkalicu i snažno se mućkaju. Nakon što je postignut željeni učinak sadržaj u tikvici se prenosi u spremnik za miješanje poznat kao bioreaktor. Bioreaktori se razlikuju po kapacitetu, od nekoliko stotina litara do 20 000 litara. Ako se željeni proces provodi pomoću submerzne fermentacije inokulum se isporuči u bioreaktor za proizvodnju dok se u slučaju površinske kulture prenosi na čvrstu podlogu. U submerznoj fermentaciji enzim se proizvodi pomoću mikroorganizama tijekom rasta u tekućem mediju koji je pohranjen u velike, duboke

proizvodne bioreaktore. Veličina bioreaktora za komercijalnu proizvodnju može varirati od 20 000 do 200 000 litara. Bioreaktor se priprema za komercijalnu proizvodnju tako što se prvo dodaje voda nakon čega slijedi dodavanje hranjivih sastojaka koji sačinjavaju propisani, proizvodni medij za određenu fermentaciju. Proizvodni medij osigurava ugljik, dušik, sve minerale i vitamine potrebne za rast mikroorganizama i za maksimalnu proizvodnju enzima. Sadržaj biorektora se obično sterilizira ubrizgavanjem pare pri temperaturi od 121 ˚C, 30-60 minuta. Trajanje svake fermentacije ovisi o vrsti organizma koji se fermentira i o tome da li se enzimi sintetiziraju tijekom faze rasta ili tijekom eksponencijalne i/ili stacionarne faze. Općenito, bakterijska fermentacija može trajati malo manje od 24 sata za potpunu proizvodnju enzima koja se postiže u fermentoru, dok gljivična fermentacija može potrajati od 6 do 10 dana da bi se postigao isti cilj. Fermentacija se stalno prati kako bi se osigurao stalan rast kulture i proizvodnja enzima. Čimbenici, kao što su mućkanje, otopljeni kisik, pH, temperatura i nedostatak plina u potpunosti se provjeravaju i kontroliraju da bi se osigurala optimalna proizvodnja enzima pomoću kultura u fermentacijskom bujonu. Sljedeći korak u komercijalnoj proizvodnji enzima je oporavak proizvoda u nizu koraka nakon fermentacije (Whitehurst, 2002.).

Nakon fermentacije se primjenjuje nekoliko postupaka za razdvajanje tekuće faze, koja sadrži enzime, od čvrste faze.

Tehnike koje se koriste su (Whitehurst, 2002.):

- filtracija sa prikladnim filterom koji sadrži pomoćno sredstvo za filtraciju,
- mikrofiltracija poprečnog protoka,
- centrifugiranje.

Uglavnom se koriste dvije metode filtracije, a to su okvirna i komorna i rotacijsko-vakuumska filtracija. Okvirna i komorna filtracija uključuje prethodno oblaganje filtera sa slojem odgovarajućeg medija za zadržavanje tvari. Fermentacijska smjesa koja također sadrži pomoćno sredstvo za filtraciju se pumpa kroz filter gdje odgovarajući medij zadržava pomoćno sredstvo i krutine. Ovaj postupak rezultira bistrim filtratom koji zahtjeva daljnju obradu. Rotacijsko-vakuumska filtracija je prikladna alternativa za okvirnu i komornu filtraciju. U ovom procesu se koristi filter prethodno obložen debelim slojem odgovarajućeg medija za zadržavanje tvari koji se smješta u rotirajući bubanj gdje se primjenjuje vakuum kako bi filter

ostao na mjestu. Također je moguće fermentacijsku smjesu filtrirati pomoću mikrofiltera da se ponovno dobije bistri filtrat (Whitehurst, 2002.).

Membrane koje se koriste za ovaj proces moju biti od polimera ili keramike dok se veličina pora određuje probnim radom. Veličine pora se kreću u rasponu od 0,1 do 0,5 mikrona. Proces podrazumijeva kruženje fermetacijske smjese oko sustava koji čuva sve sastojke smjese u suspenziji. Ovo zahtjeva veliku brzinu protoka na površini membrane da bi se smanjila začepljenost. Mikrofiltracijski sustav je obično cjevaste strukture sa promjerom od 6 mm. Brzina protoka je promjenjiva i ovisi o materijalu koji dolazi u kontakt sa površinom membrane. Smjesa se ispire vodom da se osigura ponovno stjecanje metabolita, no potrebna je ravnoteža između ciljanog prinosa, količine dodane vode i vremena trajanja procesa. Fermentacijsku smjesu je moguće centrifugirati, a količina prisutnih krutih tvari određuje vrstu potrebnog separatora. Također je nemoguće da će se odvajanje postići jednim prolaskom tvari kroz separator, te to zahtjeva dva ili više prolaska kroz centrifugu ovisno o potrebnoj učinkovitosti ekstrakcije. Nakon odvajanja krute tvari od fermentacijske smjese filtrat, koji se sada sastoji od velike količine razrijeđenih enzima, spreman je za sljedeći korak, a to je koncentriranje. To je proces u kojem se proteinski sadržaj filtrata koncentrira tako da se iz filtrata ukloni velika količina vode koja sadrži minerale, vitamine i slične tvari. Postoji mnogo mogućih metoda koncentriranja i izabrana metoda ovisi o fizičkim karakteristikama enzima kao što je molekularna veličina, pH stabilnost, toplinska svojstva i cijena odabranog procesa. Najčešća metoda koncentriranja koja se koristi je ultrafiltracija gdje selektivno-propusna membrana zadržava potrebne tvari, a otpad prolazi kroz membranu i odbacuje se. Ove membrane se mogu izabrati samo na temelju eksperimentalnih ispitivanja dok su veličina i oblik molekula enzima promjenjivi. Koristeći ovu tehniku moguće je postići koncentraciju od približno 30% suhe tvari. Koncentrat enzima se pohranjuje i spreman je za miješanje u tekući proizvod ili se može dalje procesirati sušenjem ako je konačan proizvod potreban u obliku praha (Whitehurst, 2002.).

Postoje mnoge metode sušenja za daljnju obradu koncentrata do praha. Najčešća metoda koja se koristi je sušenje raspršivanjem. Sušenje raspršivanjem rezultira finim prahom. Prikladnost tehnike i optimalni uvjeti procesa se utvrđuju probnim radom. Za uspješno sušenje većine enzima se primjenjuje ulazna temperatura od oko 200 ˚C, a izlazna temperatura od oko 80 ˚C. Prah proizveden na ovaj način može se granulirati pomoću sušilice pri temperaturi od 45 ˚C.

Pomoću ove tehnike se proizvode mikrogranule jedinstvene veličine koje su također i fluidne, te se mogu dispergirati u tekućini. Kod izrade enzimskog proizvoda za tržište završna faza je oblikovanje tog enzima za specifičnu aktivnost miješanjem koncentriranog praha ili razrjeđivanjem tekućeg koncentrata. Oblikovanje praha za tržište uključuje miješanje koncentriranog praha iz sušilice koja radi na principu raspršivanja. Za razrjeđivanje koncentrata suhog enzima koristi se odgovarajući nosač. Tipični nosači ili razrjeđivači koji se koriste za miješanje komercijalnih proizvoda enzima uključuju škrob, maltodekstrin, laktozu i dijelove brašna. Konačni izbor nosača će ovisiti o brojnim faktorima uključujući veličinu čestica i boje. Postoji široki niz različitih miješalica, a izbor miješalica ovisi o materijalima, količini, čvrstoći, zampremini i o mnogim drugim fizičkim karakteristikama sastojaka koji se miješaju. Komercijalni proizvodi enzima, koji se prodaju u tekućem obliku, oblikovani su razrjeđivanjem koncentrata tekućeg enzima visoke aktivnosti sa vodom do specifične aktivnosti koja je potrebna za konačni proizvod. Ovaj proces se provodi u spremnicima za razrjeđivane čiji kapacitet se kreće u rasponu od nekoliko stotina do nekoliko tisuća litara. Konačni proizvod će također sadržavati određene stabilizatore kao što su sorbitol ili glicerin kako bi se osigurala stabilnost enzima tijekom skladištenja. Također će sadržavati konzervanse kao što su natrijev benzoat i kalijev sorbat da bi se spriječila mikrobiološka kontaminacija konačnog proizvoda tijekom produženog skladištenja. Prije konačne prodaje enzimski prah i tekućina se provjeravaju kako bi se osiguralo da ispunjavaju zahtijevane specifikacije (Whitehurst, 2002.).

10. ZAKLJUČAK

Enzimi se mogu opisati kao funkcionalni, katalitički proteini. Nalaze se u svakoj stanici biljne i životinjske vrste. Bez njih, pivo ne bi fermentiralo, a voće ne bi sazrelo. Oni su tvornica svake stanice koja pokreće kemijske reakcije ili ih čini još bržima, dok u isto vrijeme ostaje nepromijenjena. Enzimi su neophodni za život kakvi poznajemo, jer su mnoge reakcije koje se odvijaju u stanicama organizma prespore te bi vodile do bitno drugačijih produkata koje organizmu trebaju ili ne trebaju, ili bi štetili. Snižavaju energiju aktivacije pojedine reakcije, te je na taj način ubrzavaju i do nekoliko milijuna puta. Do sada je otkriveno tek nekoliko tisuća enzima, a ostalo ih je još na milijune koje treba otkriti. Snažan napredak biokemijskih znanosti omogućio je bolje razumijevanje uloge enzima u svim životnim procesima i proizvodnji najrazličitijih vrsta proizvoda. Rezultat toga je njihova industrijska proizvodnja i široka primjena kao katalizatora mnogih industrijskih postupaka. Suvremena znanost neprestano ističe važnost hrane i njezine probave kao ključnog čimbenika u razvoju degenerativnih bolesti, pa čak i procesa starenja. U prehrambenoj industriji se uglavnom koriste „slobodni enzimi“ tehničke čistoće i s definiranim djelovanjem (okus, miris, izgled, stupanj konverzije i dr.) koje utječe na vrijeme i uvjete procesa prerade proizvoda.

11. LITERATURA

Hui YH, Nip WK, Nollet LM, Paliyath G, Simpson BK: *Food biochemistry and food processing*. Blackwell publishing, Iowa, 2006.

Sikorski ZE*: Chemical and functional properties of food components*. CRC press, Boca Raton, 2002.

Vaclavik VA, Christian EW*: Essentials of food science*. Springer, New York, 2008.

Whitehurst RJ, Law BA: *Enzymes in food technology*. Sheffield academic press, Sheffield, 2002.