

Možnosti použití enzymových preparátů při výrobě kalných šťáv a při zvyšování výlisnosti moštů

663.8.054.9

Ing. LUBOMÍRA RITTSTEINOVÁ, Výzkumný ústav potravinářského průmyslu, Praha

Klíčová slova: celulasý, β -glukanasy, pektinhydrolasy, polyglukanasy, karboxymethylcelulasý, ovocné a zeleninové nápoje

ÚVOD

Moderní požadavky na výživu, potravinářskou technologii, neustále rostoucí objem výroby a v neposlední řadě i ekologický tlak, nutí výrobce k zavádění nových technologických postupů. Jednou z možností, jež nacházejí uplatnění též v nápojovém průmyslu, je i aplikace enzymových preparátů.

Při čiření a filtraci ovocných šťáv a vinných moštů jsou již delší dobu používány dovezené pektolytické přípravky, v pivovarském průmyslu pomáhají řešit technologické problémy různé amylasové preparáty, při výrobě diabetických piv se používá amyloglukosidasa a v některých případech jsou aplikovány proteasy za účelem stabilizace.

Méně známa je však možnost aplikace celulasových (v širším smyslu poly- β -glukanasových) přípravků při výrobě nápojů.

Celulasý účelně umocňují účinek pektinas při zpracování rostlinných surovin obsahujících celulosu a pektin. Tato možnost je aktuální zejména při výrobě tzv. kalných ovocných a zeleninových nápojů, kde umožňuje efektivní bezodpadovou technologii, avšak i aplikace při výrobě ovocných a vinných moštů je účelná, protože se zvyšuje výlisnost šťávy, popř. se zlepšují filtrační parametry [1, 2, 3]. V pivovarství jsou naopak β -glukanasy aplikovány samostatně k odbourání β -glukanů způsobujících obtíže při scezování sladiny a filtraci piva [4, 5, 6, 7, 8].

Výroba džusových nápojů typu „kalné šťávy“ za pomoci enzymů je v současné době velmi žádána. Jedná se o technologii umožňující lepší využití suroviny a zvýšení nutriční hodnoty produktu obohacením šťávy o biologicky cenné látky (vitamíny, proteiny, lehce stravitelné oligosacharidy a sacharidy), které se uvolní enzymovou destrukcí buněčných stěn či rozštěpením nestravitelných polysacharidů.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Na pracovišti oddělení mikrobiálních enzymů Výzkumného ústavu potravinářského průmyslu (VÚPP) v Praze byla v laboratorním měřítku experimentálně ověřována efektivnost enzymového působení polyglukanasového (celulasového) preparátu při výrobě mrkvové šťávy. Byla používána přefiltrovaná kultivační kapalina po kultivaci plísňe *Trichoderma viridae* o aktivitě 0,309 μ kat karboxymethylcelulasý/ml [EC 3.2.1.4 endo-1,4(1,3; 1,4)- β -D-glukan-4-glukanhydrolasa]. Experimenty byly zaměřeny na optimalizaci podmínek působení tohoto preparátu v kombinaci s pektolytickým preparátem Pectofeotidin (SSSR) o aktivitě 3,45 μ kat pektinhydrolasy na 1 g preparátu [EC 3.2.1.15 poly(1,4- α -D-galakturonid) glykanohydrolasa] [9].

Vzorky byly inkubovány na rotační třepačce v 500 ml kultivačních baňkách při teplotě 40 °C, popř. 30 °C s výchozí koncentrací substrátu 50 g mrkvové strouhaniny na 100 ml tekutiny, bez úpravy pH. Podmínky inkubace byly voleny na základě předchozích zkušeností [10, 11].

Vzhledem k tomu, že při výrobě šťáv je hlavním požadavkem maximální konverze substrátu, bylo jako hlavní kritérium enzymového působení zvoleno stanovení sušiny zbytku na sítu 0,4 mm. Souběžně byla stanovena stoupající koncentrace redukcí látek v roztoku metodou podle Nelsona [12], jako orientační měřítko koncentrace nižších štěpů celulosy a pektinu; pH šťávy bylo kontrolováno pH indikátorovými papírky Lachema. Bylo též provedeno jednorázové stanovení β -karotenu v suspenzi před enzymovou konverzí a ve šťávě po inkubaci s enzymem metodou podle ČSN [13]. Pro každý experiment byla též stanovována sušina použitého substrátu (mrkvové strouhaniny).

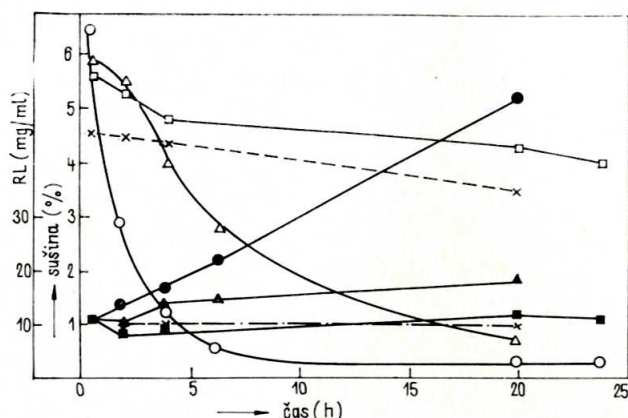
VÝSLEDKY A JEJICH DISKUSE

Vhodně volenými parametry (koncentrace a vzájemný poměr obou enzymů, teplota a čas inkubace) ovlivňujeme vlastnosti konečného produktu enzymové hydrolýzy.

Efektivní čas inkubace byl zvolen na základě experimentálního posouzení časové závislosti průběhu enzymové destrukce během 24hodinové inkubace s přidavkem a bez přidavku enzymů (obr. 1).

Jak dokumentuje obrázek, je enzymová destrukce substrátu nejrychlejší v průběhu prvních 6 hodin inkubace. Proto byly následující experimenty zaměřeny na studium rozdílného stupně degradace ve stanoveném čase při různých koncentracích a poměru obou typů enzymů. Byla sledována jednak závislost enzymové destrukce substrátu (mrkve) na koncentraci celulasý v rozmezí 2,5 až 25 %, tj. 15 až 150 nkat karboxymethylcelulasý na g substrátu, při konstantní koncentraci pektolytického enzymu (postupně 0,1; 0,2; 0,5 a 1,0 %, tj. 6,66; 13,33; 34,5 a 69,0 nkat pektinhydrolasy na g substrátu) a jednak závislost degradace substrátu na proměnné koncentraci pektolytického enzymu (0,1 až 3,0 %, tj. 6,6—260,7 nkat pektinhydrolasy na g substrátu) při konstantní koncentraci celulasý (postupně 5,0; 7,5 a 10 %, tj. 30,8; 46,3 a 61,6 nkat karboxymethylcelulasý na g substrátu).

Na základě hodnocení vzorků tohoto poměrně rozsáhlého souboru experimentů byla vybrána optimální kombinace enzymů. 5 % celulasý (30,8 nkat karboxymethylcelulasý na g substrátu) a 1 % Pectofeotidinu (68,3 nkat pektinhydrolasy na g substrátu), při inkubačním čase 2,5 hodiny. Za těchto podmínek se sníží nerozpustná sušina o 90 % původní



Obr. 1. Průběh enzymové destrukce substrátu během 24hodinové inkubace při teplotě 40 °C

- RL — koncentrace redukujících látek ve filtrátu
 ■ — samotná celulasa (30,8 nkat karboxymethylcelulasy/g substrátu)
 ▲ — samotný pektolytický enzym (6,91 nkat pektinhydrolasy na g substrátu)
 ● — kombinace obou enzymů (30,8 nkat karboxymethylcelulasy/g substrátu + 6,91 nkat pektinhydrolasy/g substrátu)
 ---- — kontrola bez enzymů
 Sušina — (%) zbytku na sítu 0,4 mm
 □ — samotná celulasa, △ — samotný pektolytický enzym, ○ — kombinace obou enzymů, — — — kontrola bez enzymů

hodnoty sušiny inkubační směsi (z 6 % na 0,6 %). Stejného účinku bylo dosaženo aplikací 10 % celulasy (61,6 nkat karboxymethylcelulasy na g substrátu) a 5,5 % Pectofoetidinu (34,5 nkat pektinhydrolasy na g substrátu).

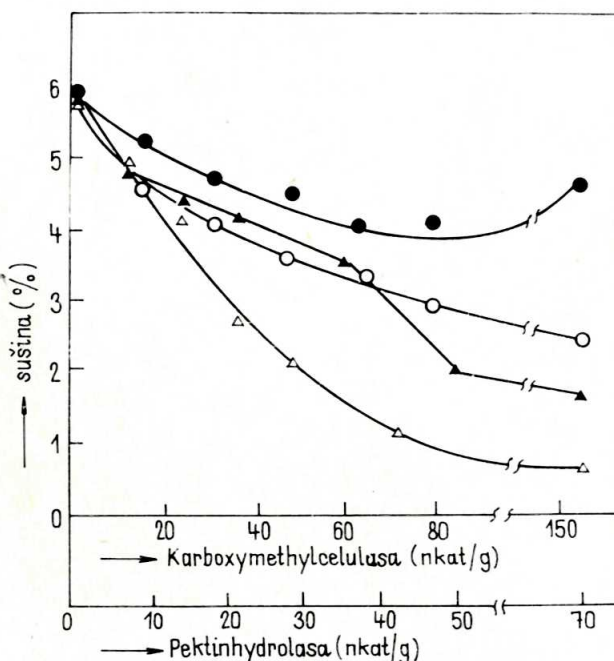
Samotný pektolytický enzym by bylo nutno užít v 2krát až 3krát vyšší koncentraci, aby bylo dosaženo stejného stupně ztekucení. Samotná celulasa vykazuje jen slabý degradační účinek (snížení zbytkové sušiny o 20 % původní hodnoty sušiny). Prostou extrakcí bez použití enzymů se dosáhlo snížení sušiny pouze o 10 %. Rozdílná účinnost různých kombinací preparátů je dobře patrna z obr. 2a. Obrázek 2b ilustruje stejný experiment, ale z hlediska závislosti změny koncentrace redukujících látek ve šťávě na koncentraci a poměru obou enzymů. Z obou obrázků je patrna vzájemná korelace sledovaných kritérií; čím větší je ztekucení, tím vyšší je koncentrace redukujících látek ve šťávě a nižší obsah sušiny nerozpustného zbytku.

Laboratorní testy byly uzavřeny srovnáním průběhu enzymové destrukce substrátu za podmínek optimální koncentrace enzymů při dvou různých teplotách inkubace 30 °C a 40 °C. Bylo prokázáno, že pro dosažení požadovaného stupně ztekucení substrátu (pod 1 % zbytkové sušiny) je postačující teplota 30 °C, neboť v rozmezí teplot 30 °C až 40 °C nebyly zaznamenány technologicky významné rozdíly.

Stanovením celkového obsahu karotenů v suspenzi před enzymovou degradací a ve šťávě po konverzi bylo ověřeno, že enzymovou destrukcí buněk se skutečně významně zvýší obsah vitamínu A ve šťávě o 25 % (z 2,052 mg vitamínu na 2,547 mg vitamínu A na 100 g tekutiny). Hodnotíme-li produkt z hlediska obsahu stravitelných sacharidů, je možno konstatovat, že aplikací enzymů dochází ke zvýšení jejich koncentrace asi

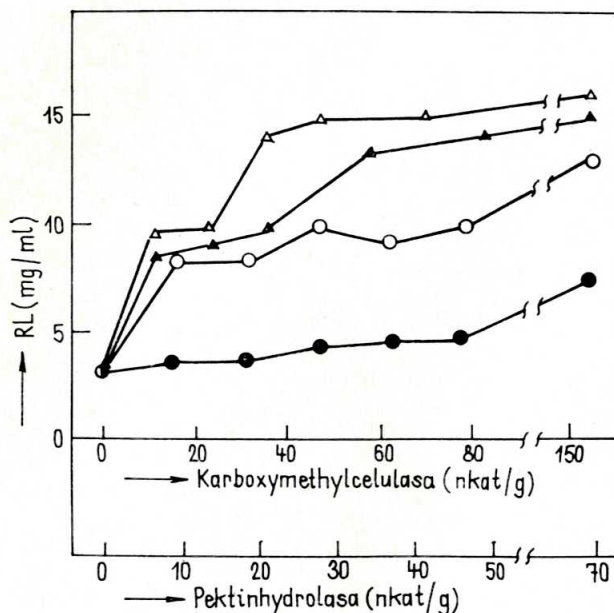
o 70 % ve srovnání s kontrolou bez přídavku enzymů, což představuje 1,5 % redukujících látek oproti 0,4 %.

Technologicky důležitý je též poznatek, že čím vyšší je koncentrace použité pektinhydrolasy, tím



Obr. 2a. Závislost sušiny zbytku na sítu 0,4 mm [sušina (%)] na koncentraci aplikovaných enzymů po inkubaci 2,5 h při teplotě 40 °C

- — samotná celulasa, ○ — samotný pektolytický enzym,
 ▼ — kombinace (karboxymethylcelulasa = 30,8 nkat/g pektinhydrolasa 6,91–69,1 nkat/g substrátu,
 △ — kombinace (karboxymethylcelulasa = 15,4–154 nkat/g substrátu + pektinhydrolasa = 6,91 nkat/g substrátu)



Obr. 2b. Závislost koncentrace redukujících látek ve filtrátu (RL mg/ml) na koncentraci aplikovaných enzymů po inkubaci 2,5 h při teplotě 40 °C
 Význam symbolů shodný s obr. 2a

více klesá pH šťávy [z počáteční hodnoty 5,4 až na hodnotu 4,0]. Aplikací celulasu nedochází ke změně pH během inkubace, hodnota pH zůstává 5,4 i na konci inkubace. Oba poznatky jsou v souladu s chemismem příslušných enzymových reakcí. Pokles pH během inkubace s pektinhydrolasou lze vysvětlit uvolňováním karboxylových skupin vlivem pektinesterasy přítomné v pektolytickém preparátu (konečným produktem hydrolýzy pektinu je kyselina galakturonová) [14]. Z tohoto důvodu není jisté žádoucí zvyšovat koncentraci aplikované pektinasy, aby nenastaly negativní změny senzoric-
kých vlastností výrobku. Zvýšení ztekucení substrátu je vhodné zajistit volbou optimálního poměru celulasu a pektinasy.

Kvalita mrkve z hlediska stanovené sušiny a obsahu nerozpustných polysacharidů se během roku mění. Sušina se pohybuje v rozmezí 9 až 13 %. Mrkev v jarních měsících je snáze atakovatelná enzymy než mrkev z podzimní sklizně, v níž byl stanoven vyšší obsah sušiny.

Volba optimálních podmínek enzymové konverze rostlinného substrátu závisí tedy též na ročním období sklizně. Doba inkubace by však neměla překročit 10 hodin vzhledem k možnosti negativního ovlivnění nutriční a senzoricke kvality produktu. Hodnocením barvy, chuti a vůně získané šťávy byl skutečně prokázán negativní vliv dlouhé inkubační doby na tyto vlastnosti.

Laboratorně byla též hodnocena možnost zvýšení výlisnosti vinného moštu aplikací enzymů do vinného rmutu při maceraci. Vzhledem k tomu, že se jednalo o laboratorní zkoušky, které byly podkladem pro poloprovozní experiment, snažili jsme se zachovat podmínky blízké provozním podmínkám.

Byla testována efektivnost působení práškové celulasu z VÚPP o aktivitě 58 745 nkat karboxymethylcelulasu na g preparátu a sovětského pektolytického preparátu Pektotoetidinu o aktivitě 3 450,7 nkat pektinhydrolasy na g preparátu. Podmínky inkubace byly zvoleny na základě zkušeností získaných při studiu enzymové degradace mrkve.

Vždy 5 kg částečně rozdrčených bobulí bylo podrobeno 24hodinové maceraci v přítomnosti enzymů i bez přídavku enzymů při teplotě $14 \pm 2^\circ\text{C}$. Během inkubace byl obsah několikrát (asi 5krát) promíchán. Celulasa byla aplikována v koncentracích 5,0, 15,0 a 30,8 nkat karboxymethylcelulasu na g substrátu; pektinhydrolasa v koncentracích 5,0, 10,0 a 20,0 nkat na 1 gram substrátu. Účinnost enzymů byla posuzována na základě vyhodnocení látkové bilance macerace substrátu s enzymy v různé koncentraci a poměru a kontrolního pokusu bez přídavku enzymů. Měřítkem efektivnosti byla výlisnost šťávy, což je objem vylisované šťávy vyjádřený v procentech původního objemu rmutu. Tímto způsobem bylo prokázáno, že nejvhodnější je aplikace kombinovaného preparátu celulasu s pektinasou v koncentraci 5,0 nkat karboxymethylcelulasu a 5,0 nkat pektinhydrolasy na 1 gram substrátu. Přítom dojde ke zvýšení výlisnosti až o 10 %.

V roce 1987 bylo provedeno též několik provozních zkoušek na pracovištích JRD Petrova Ves a ve Vinařských závodech v Modré. Úspěšné výsledky těchto experimentů jsou v souladu s našimi la-

boratorními testy. V provozním měřítku byla výlisnost zvýšena o 13 až 16 %, což je pochopitelné vzhledem k vyšší účinnosti provozní lisovací techniky. Naše výsledky jsou též v korelaci s výsledky experimentů prováděných pracovištěm VÚ LIKO Bratislava, kde se problémem použití enzymových preparátů při zpracování zeleniny a ovoce podrobně zabývají [15]. Podle druhu použité suroviny (rybíz, černý bez, jablka, maliny, jahody, borůvky) docilují aplikací celulasových a pektinasových preparátů zvýšení výlisnosti o 7,8 až 16,0 %.

ZÁVĚR

Z výsledků referovaných experimentů je zřejmé, že použití enzymových preparátů nabízí možnost intenzifikace a racionalizace výroby, jak z hlediska ekonomického, tak z hlediska požadavků racionální výživy.

Literatura

- [1] VILLETAZ J. C., STEINER D., TROGAS H.: Am. Enol. Viticul., **33**, 1984, 253.
- [2] CLARK A. E., STONE B. A.: Phytochem., **1**, 1962, 175.
- [3] ANDERSON M. A., STONE B. A.: FEBS Letters, **52**, 1975, 202.
- [4] Naarden International Chem. Division. Wormerveer, Information letter, 1987.
- [5] MARTIN H. L., BAMFORTH C. W.: J. Inst. Brew., **90** 1983, 34.
- [6] MARTIN H. L., BAMFORTH C. W.: J. Inst. Brew., **87** 1984, 88.
- [7] MARTIN H. L., BAMFORTH C. W.: J. Inst. Brew., **90** 1984, 65.
- [8] BAMFORTH C. W.: J. Inst. Brew., **89**, 1983, 391.
- [9] PÁSKOVÁ J., FABIÁN J.: Final Report 1978, Research Institute of Food Packaging, ČSSR.
- [10] PÁSKOVÁ J., FABIÁN J.: Final Report 1977, Res. Inst. of Food Pack., ČSSR.
- [11] PÁSKOVÁ J., FABIÁN J.: Final Report 1979, Res. Inst. of Food Packing, ČSSR.
- [12] NELSON, W.: J. Biol. Chem. **153**, 1944, 375.
- [13] ČSN 56 0053.
- [14] ŠICHO V., VODRÁŽKA Z., KRÁLOVÁ B.: Potravinařská biochemie, SNTL Praha 1981.
- [15] ROJEKOVÁ J.: Výskum výroby a využitie enzymov v rôznych oblastiach národného hospodárstva (predbežná správa), VÚ LIKO, Bratislava, 1987.

Lektoroval Ing. J. Čepička, CSc.

Rittsteinová, L.: Možnosti použití enzymových preparátů při výrobě kalných šťáv a při zvyšování výlisnosti moštů. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 8—9, s. 247—250.

Byla řešena možnost aplikace enzymů při výrobě ovocných, resp. zeleninových nápojů džusového typu. Přitom byla hodnocena efektivnost a optimální podmínky působení polyglukanasového preparátu získaného submerzní kultivací plísně *Trichoderma viridae*. Glukanasový preparát byl aplikován též ve směsi s pektolytickým přípravkem (Pektotoetidin — SSSR). Experimentálně byla potvrzena vysoká účinnost takto kombinovaného preparátu. Získaný produkt je tzv. kalná šťáva bohatá na vitamín A a lehce stravitelné sacharidy vzniklé konverzí polysacharidických složek substrátu.

Byla řešena možnost zvýšení výlisnosti vinného moštu aplikací uvedených enzymů do vinného rmutu při maceraci. Výsledky laboratorních experimentů naznačují, že tímto způsobem lze zvýšit výlisnost průměrně o 10 %.

Риттштейнова, Л.: Возможность применения энзимных препаратов при производстве мутных соков и при повышении выхода при выжимании соков. Квас. прум., 35, 1989, № 8—9, стр. 247—250.

Была решена возможность применения энзимов при производстве фруктовых или овощных напитков типа «джус». При этом оценивалась эффективность и оптимальные условия действия полиглюканазного препарата, полученного субмерсным культивированием плесневого гриба *Trichoderma viridae*. Глюканазный препарат был применен также в смеси с пектолитическим средством (Пектофоэтидин-СССР). Экспериментально была подтверждена высокая действенность таким способом комбинированного препарата. Полученный продукт — т. наз. мутный сок, богатый витамином А и легко усваиваемые сахараиды, возникшие путем конверсии полисахаридных компонент субстрата.

Была также испытана возможность повышения выхода при выжимании виноградного сока путем приложения приведенных энзимов в мезгу при мацерации. Результаты лабораторных экспериментов показывают предположения, что таким способом можно повысить выход при выжимании в среднем на 10 %.

Rittsteinová, L.: Application of Enzyme Preparates in Production of Turbid Juices and Higher Yields of Mash Pressing. Kvas. prům., 35, 1989, No. 8—9, pp. 247—250.

Enzyme applications in a production of fruit and/or vegetable beverages of the juice type has been solved. The efficiency and the optimum conditions of the effect of the polygluconate preparation obtained from the submerged culture of *Trichoderma viridae* were tested. The gluconate preparation has also been applied in the mixture with the pectolytic preparation (Pectofoetidin —

USSR). The high efficiency of this combined preparation was experimentally confirmed. The product obtained is so called turbid juice having a high content of vitamin A and well digestive saccharides resulting from the conversion of polysaccharides of the substrate. Further, the above mentioned enzymes has also been added into grape mash during maceration with the aim to increase the yield of a mash pressing. The results of laboratory experiments showed that the yield of pressing can be increased by about 10 % using these enzymes.

Rittsteinová, L.: Möglichkeiten der Anwendung von Enzympräparaten bei der Herstellung trüber Säfte und bei der Steigerung der Preßausbeute von Weinmosten. Kvas. prům., 35, 1989, Nr. 8—9, S. 247—250.

Es wurde die Möglichkeit der Enzymapplikation bei der Herstellung von Obst- bzw. Gemüsegetränken von dem Juice-Typ gelöst und erprobt. Dabei wurde die Effektivität und die optimalen Wirkungsbedingungen eines Polyglukanasepräparats bewertet, das durch submerse Kultivation des Schimmelpilzes *Trichoderma viridae* gewonnen wurde. Das Glukanasepräparat wurde auch im Gemisch mit einem pektolytischen Präparat (Pectofoetidin aus der UdSSR) appliziert. Experimentell wurde die hohe Wirksamkeit des so kombinierten Präparats bewiesen. Das gewonnene Produkt ist der sog. trübe Saft, reich an Vitamin A und leicht verdauliche Saccharide, die durch Konversion der polysaccharidischen Bestandteile des Substrats entstehen.

Es wurde weiter auch die Möglichkeit der Steigerung der Preßausbeute von Weinmost durch Applikation der erwähnten Enzyme in die Traubenmaische bei der Mazeration erprobt. Die Ergebnisse der Laborexperimente deuten an, daß man auf diese Weise die Preßausbeute im Durchschnitt um 10 % verbessern kann.