

Encimi v živilih

Encimi, ki jih dodajamo z namenom procesiranja (Eksogeni)

- Encimi za pretvorbo ogljikovih hidratov
- Encimi za pretvorbo proteinov
- Encimi za pretvorbo lipidov

Encimi, ki so v živilih (endogeni) in vplivajo na lastnosti živil med procesiranjem in skladiščenjem

- Polifenol-oksidge
- Peroksidaze
- Nekateri ostale oksidoreduktaze
- Lipooksigenaze
- Hidroperoksid-liaze
- Mirozinaze
- Alinaze
- Endogene pektin-metilesteraze in pektinaze
- Endogene proteinaze
- ...

Encimi za pretvorbo ogljikovih hidratov

Encimi s katerimi transformiramo (hidroliziramo) škrob

- α -amilaze: α -1 \rightarrow 4 glukoza (hidroliza-endo)
- β -amilaze: α -1 \rightarrow 4 glukoza (hidroliza-exo)
- Pululanaze (tudi klestilni encim): α -1 \rightarrow 6 glukoza (hidroliza)
- Glukoamilaze (tudi amiloglikozidaza): α -1 \rightarrow 4 in α -1 \rightarrow 6 glukoza (hidroliza)
- Ciklomaltodekstrin-transferaze: α -1 \rightarrow 4 glukoza (ciklizacija/hidroliza)

Encimi s katerimi transformiramo sladkorje

- Glukoza-izomeraze: glukoza \leftrightarrow fruktoza (izomerizacija)
- Glukoza-oksidge: oksidacija glukoze na C1 ogljiku v ciklični obliki
- Invertaze: β -1 \rightarrow 2 glikozidna vez med glukozo in fruktozo v saharozi (hidroliza)
- β -galaktozidge: β -1 \rightarrow 4 glikozidna vez med glukozo in galaktozo v saharozi (hidroliza)
- β -glukozidge: β -1 \rightarrow 4 glikozidna vez med glukozama v celobiozi (hidroliza)

Encimi s katerimi transformiramo pektin

- Poligalakturonaze: α -1 \rightarrow 4 galakturonska kislina (hidroliza)
- Pektin-metilesteraze: hidroliza metilnega estra galkuronske kisline v petinu
- Pektat-liaze in pektin-liaze: nehidrolitičen razcep α -1 \rightarrow 4 glikozidne vezi v pektinu

In mnogi drugi...

Amilaze

α -amilaze:

- Hidroliza α -1 \rightarrow 4 glikozidnih vezi v škrobu znotraj verige (endo)
- Ca^{2+} je stabilizator strukture; pH stabilnost 6-10; pH optimumi v območju od 4 do 7
- Rezultat hidrolize je hitro zmanjševanje molekulske mase škroba
- Tipični produkti so maltodekstrini z 2 do 12 glukoznih enot (odvisno od pogojev hidrolize in izvora amilaz (glive delajo krajše oligosaharide kot bakterijske)
- Tehnološko najbolj uporabljane so termostabilne α -amilaze iz rodu Bacillus (80 °C-110 °C).
- V rastlinskem svetu se α -amilaze aktivirajo (ekspresija) pri kaljenju semen in sodelujejo pri razgradnji škroba.

β -amilaze:

- Hidroliza α -1 \rightarrow 4 glikozidnih vezi v škrobu. Encim sprošča disaharid maltozo z nereducirajočih koncev (ekso).
- pH optimumi v območju od 4 do 7
- Rezultat hidrolize amilopektina so molekule maltoze in visokomolekularni dekstrini, ki vsebujejo (α -1 \rightarrow 6 glikozidne vezi)
- β -amilaze, ki se tehnološko uporabljajo imajo pH optimume med 45 °C in 70 °C
- V rastlinskem svetu so β -amilaze stalno prisotne. Prispevajo k povečevanju sladkosti med zorenjem sadja. So tudi ključen encim pri hidrolizi slada (ječmen) v pivovarstvu.

Pululanaze in glukoamilaze

Pululanaze:

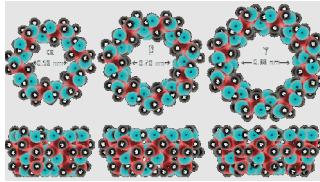
- Zaradi hidrolize α -1 \rightarrow 6 glikozidnih vezi med glukozami se imenuje tudi klestilni encim.
- Dobro razgrajuje dekstrine, ki se nastali z delovanjem α in β amilaz (slabše hidrolizira 1 \rightarrow 6 glikozidne vezi v amilopektinu).
- Najdemo je v mnogih bakterijah, kvasovkah in v žitih. Pomembno prispeva k tvorbi sladkorjev pri ječmenovem sladku.
- Tehnološko uporabne pululanaze mikrobiološkega izvora imajo pH optimum med pH 3,5 in pH 6,5. Hitrost denaturacije se občutno poveča v območju med 55 °C in 65 °C. Nekatere so aktivirane tudi s Ca^{2+} .
- Nekatere pululanaze mikrobiološkega izvora imajo tudi α -1 \rightarrow 4 hidrolitično aktivnost

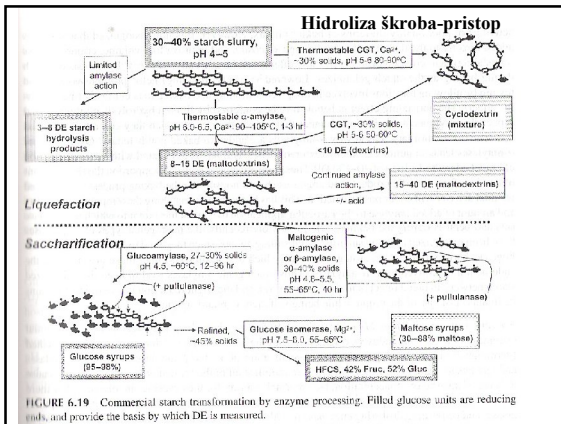
Glukoamilaze (amiloglukozidaze):

- Hidrolizira molekule glukoze vezane z α -1 \rightarrow 4 glikozidnimi vezmi z nereducirajočih koncev. Ima tudi α -1 \rightarrow 6 glikozidno aktivnost (počasi).
- Samo z delovanjem glukoamilaze lahko dobimo iz škroba glukozo.
- Gluamoilaze so pretežno mikrobiološkega izvora.
- Imajo pH optimum med pH 3,5 in pH 5 in temperaturni optimu okoli 60 °C.
- Uporaba v proizvodnji kousnega sirupa in piva.

Ciklomaltodekstrin-transferaze

- Encimi s široko paleto aktivnosti
 - Katalizirajo intramolekularno in intermolekularno transglikozilacijo (prenos oligosaharidnih enot znotraj molekule ali na druge molekule)
 - Ciklizacijo heksa, hepta in okta saharidov (nastanek ciklodekstrinov)
 - Prenos nekaterih drugih skupin na ogljikove hidrate kot so flavonoidi in askorbinska kislina
- pH optimum 5-6; termostabilne ciklomaltodekstrin-transferaze so stabilne do 90 °C





Uporaba α -amilaz v pekarski industriji

- Dodatek encimov v testo (endogene α -amilaze so že prisotne v moki)
- Delna hidroliza škroba z namenom zagotavljanja hrane za kvasovke med vzhajanjem kruha.
- Delovanje encima zmanjša viskoznost testa, poveča se voumen, sredica kruha je mehkejša, zaradi Maillardove reakcije (reducirajoči sladkorji) je skorjica bolj zapečena.
- Zaradi delne hidrolize amiloze in amilopektina je ponovna delna kristalizacija polisharidov upočasnjena (v manjši meri pride do retrogradacije). Stroški v ZDA zaradi retrogradacije dosegajo na letnem nivoju nekaj milijard \$.
- Pretirana hidroliza lahko vodi v nezaželeno teksturo (gumijast in lepljiv kruh). Paziti je treba na količino dodane α -amilaze in uporabiti termolabilne encime, saj α -amilaze ne smejo biti aktivne v pečenem kruhu. Važna je tudi specifičnost encimov, saj so zaželjene α -amilaze, ki dajejo daljše dekstrine.

Uporaba encimov, ki hidrolizirajo škrob v pivovarstvu

• amilaze so že prisotne v različnih zrnih. V procesu priprave piva se dodatno dodaja encime ki pospešijo hidrolizo škroba v praženih in zmletih zrnih

Kratek opis priprave sladu in drozganja:

• Zrnje se prepoji z vodo da nabrekne (lahko v rahlo alkalnem, da ni mikrobioloških okužb)

• Nato nekaj dni kali (poteče sinteza α -amilaze; škrob se prične hidrolizirati)

• Kaleča zrnja se nato pri zmerni temperaturi sušijo (poteka delna hidroliza); nato pa pražijo nekaj ur (okoli 100 °C), da dobimo dehidrirana zrna. Glede na tempearturo obdelave je zrnje bolj ali manj temno (Maillard-svetlo/temno pivo)

• V pivovarni se pražena kaljena zrnja zemelejo in zmešajo z vodo in se nekaj ur inkubirajo pri 45°C do 65 °C. V tej fazi (drozganje) se lahko dodajo tudi različni encimi (amilaze, glukoamilaze, pululanaze), ki pomagajo hidrolizirati škrob. V tej fazi poteka tudi hidroliza proteinov z endogenimi proteazami.



Encimi, ki pretvarjajo sladkorje1

Glukoza-(ksiloza) izomeraza:

- Eden najpomembnejših encimov v tehnologiji OH (fruktoza je bolj sladka od glukoze 1,7x)
- Encim potrebuje kofaktorje (Mn^{2+} , Mg^{2+} ; Co^{2+})
- V praksi je največkrat kovalentno vezan na kolono (imobilizirani encimi).
- Reakcija poteka tako, da se gost glukozen sirup (50%) pri pH 7,5 spusti skozi kolono. Temperatura je okoli 60 °C (čeprav je encim glivnega izvora stabilen tudi do 80 °C- zmanjševanje stroškov zaradi denaturacije)
- Iz kolone priteče sirup v katerem je okoli 45% fruktoze
- Tehnološki problemi so povezani predvsem s termično stabilnostjo encima (Maillard)

Glukoza-oksidadza:

- Oksidacija glukoze v ciklični obliki (območje aktivnsoti od pH 4,5 do pH 7,5; termična stabilnost do 60 °C)

Aplikacije

- Oksidacija glukoze v jajčnem beljaku pred shranjevanjem (preprečevanje porjavanja)
- Zmanjševanje vsebnosti kisika v pakirani embalaži
- Dodatek v zobne paste (nastanek peroksida v ustni votlini, antimikrobni učinek)
- Dodatek v testo (zaradi nastanka oksidantov, poteka oksidacija cisteinov -bolj čvrst kruh)

Encimi, ki pretvarjajo sladkorje 2

Invertaza:

- Katalizira hidrolizo saharoze v glukozo in fruktozo
- Veliko število izoencimov v rastlinskem svetu (različni pH optimumi; 4-8)
- Velika prednost encima je, da je aktiven pri izjemni osmolarosti (30 mol/l saharoze!!!)
- V uporabi so predvsem encimi iz kvasovk (izdelava "umetnega medu"; priprava sladice s tekočim centrom)
- Posledica hidrolize saharoze je tudi zmanjšana vodna aktivnost in povečana mikrobiološka varnost

β -galaktozidaza (laktaza):

- Katalizira hidrolizo laktoze v glukozo in galaktozo
- Komerčni encimi (bakterije, glive, kvasovke imajo pH optimume v območju od 2,5 do 7,5
- Encimi so aktivirani z Mg^{2+} in imajo temperaturne optimume do 60 °C

Aplikacija

- Povečevanje sladkosti
- Povečanje reduktivne moči
- Hidroliza laktoze zaradi preprečevanja kristalizacije (sladoled)
- Zmanjševanje vsebnosti laktoze zaradi laktozne intolerance

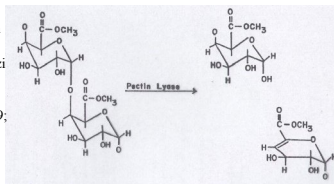
Encimi, ki hidrolizirajo pektin (pektični encimi)

Poligalakturonaza:

- Hidroliza glikozidnih vezi v pektinu
- V uporabi so encimi gliv (*A. Niger*); pH optimum 3,5-6; stabilnost do 55 °C
- Encim je uporaben za bistrenje raznih sokov in vina (zmanjša se viskoznost, delci se posedejo.
- Boljši so tudi izkoristki pri stiskanju raznih bistrnih sokov (jabolčni), saj se vsebina celic lažje sprosti.

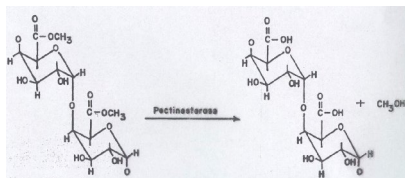
Pektin-liaza (kislina) in pektat-liaza (ester):

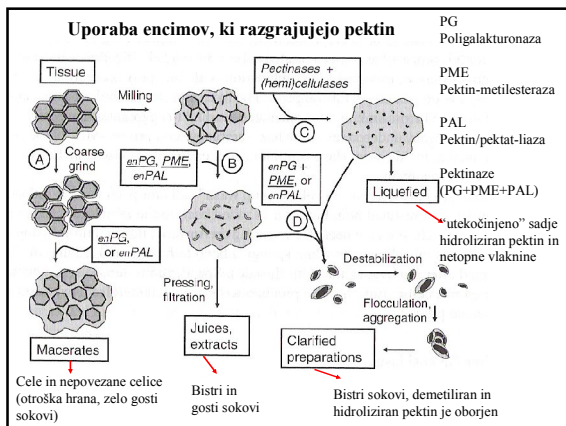
- Nehidrolitičen razcep glikozidne vezi dveh galakturonskih kislín, oziroma metilnih estrov v pektinu
- Pektat-liaza ima pH optimum okoli 9; pektin-liaza okoli 6 (bolj uporaban)
- Podobna aplikacija kot poligalakturonaza



Pektin-metilesteraza

- Hidroliza metilnih estrov galakturonske kisline v pektinu
- Ostala imena (pektaza, pektinesteraza, pektin demetilaza)
- Pektin-metilesteraze se razlikujejo v substratni specifičnosti (začetna metilirana pektina) in poteko hidrolize (točkasto, kontinuirno) Močno demetiliran pektin se v prisotnosti kalcija posedejo na dno (bistrenje sokov)
- Glivni encimi, ki so v uporabi imajo pH optimum 4-6 (rastlinski 6-8, kar je previsoko za sadje) in termično stabilnost do 70 °C





Proteinaze-klasifikacija

Encimska aktivnost: Katalizirajo hidrolizo peptidnih vezi v proteinih

Alternativna poimenovanja: proteinaze, peptidaze, proteaze, proteolitični encimi

Klasifikacija glede na aminokislino v aktivnem mestu/tip katalize:

- Serinske proteinaze
- Cisteinske proteinaze
- Metalne proteinaze
- Aspartatne proteinaze

Klasifikacija glede na mesto cepitve proteinskega/peptidnega substrata

- Endoproteinaze
- Eksoproteinaze (aminopeptidaze in karboksipeptidaze)

Funkcije v organizmih: protein recycling (hidroliza "izrabljenih", telesu lastnih proteinov), aktivacija različnih proteinov (velika vloga v regulaciji procesov), prebava...

Proteinaze so bolj ali manj specifične (npr. hidroliza za bazičnimi AK v proteinu)

Priloga 1: Priprava proteinskih hidrolizotov

Namen:
Izboljšava funkcionalnih lastnosti (topnost, penjenje, emulgatorske lastnosti)
Zmanjšanje alergeničnosti (razgradnja epitopov, ki jih prepoznajo protitelesa)
Povečanje prehranske vrednosti (bioaktivni peptidi, lažja prebavljivost)

Stopnja hidrolize:
DH (degree of hydrolysis): delež peptidnih vezi (%), ki so hidrolizirane v proteinskem substratu po delovanju proteinaz

Protease	Type	Specificity
Elastase	Endoproteinase	Ala—aa; Gly—aa
Bromelain	Endoproteinase	Ala—aa; Tyr—aa
Trypsin	Endoproteinase	Lys—aa; Arg—aa
Chymotrypsin	Endoproteinase	Phe—aa; Trp—aa; Tyr—aa
Pepsin	Endoproteinase	Leu—aa; Phe—aa
V-8 protease	Endoproteinase	Asp—ca; Glu—aa
Thermolysin	Endoproteinase	aa—Phe; aa—Leu
Alcalase	Endoproteinase	Nonspecific
Papain	Endoproteinase	Lys—aa; Arg—aa; Phe—aa; Gly—aa
Prolylendopeptidase	Endoproteinase	Pro—aa
Subtilisin A	Endoproteinase	Nonspecific

Razmerje med stopnjo hidrolize in tehnološko/prehranskimi lastnostmi

DH < 10 %: Izboljšava funkcionalnih lastnosti povezanih s penjenjem in emulgiranjem. Čeprav dobro tvorijo pene in emulzije, le-te pogostokrat niso najbolj stabilne. Od vseh delno hidroliziranih proteinov le želatina (delno hidroliziran kolagen) tvori gele.

DH ≈ 10: Izboljšanje topnosti. Proteini pogostokrat niso topni v zelo širokem pH območju "denaturacija". Pogostokrat pride do obarjanja v kislem pH-ju (3-4). Krajši peptidi so največkrat dobro topni v tem pH območju (kot rezultat hidrolize se uvajajo ionizirajoče skupine; terminalna amino in karboksilna)

DH > 50%: Hipoalergenska hrana (dojenčki), klinična prehrana (po sondi; možno tudi direktno v žilo); prehrana za športnike (hitra resorpcija)

Grenkost proteinskih hidrolizotov

Določeni peptidi, dolgi nekaj AK, ki vsebujejo veliko hidrofobnih AK so pogostokrat grenki. Grenki so tudi mnogi hidrolizati prehransko bogatih proteinov (kazeni, sojini proteini, proteini jajčnega beljaka. Manj grenki so hidrolizati kolagena (ki pa ima žal majhno prehransko vrednost).

Pristop za zmanjševanje grenkosti:

Dodatna obdelava proteinskih hidrolizotov z mešanico aminopeptidaz in karboksipeptidaz, ki skrajšajo grenke peptide in odcepljajo hidrofobne AK s koncev peptidov (npr. Flavourzyme).

Problem grenkih peptidov v siru:

Starani siri so pogostokrat grenki, saj se tvorijo krajši hidrofobni peptidi. Za razgrenjevanje se lahko doda bakterijske seve, ki imajo močno eksopeptidazo aktivnost. Sproščene proste AK tudi pozitivno vplivajo na razvoj arome.

Uporaba proteinaz v obdelavi živil 1

Sirjenje mleka:

Aspartatna proteinaza kimozi, ki se nahaja v prebavnem traktu teletčkov se uporablja za sirjenje mleka v proizvodnji sira. Najprej se doda starterske mikrobiološke kulture, ki znižajo pH mleka na 6, nato se pri 40 °C do 45 °C doda kimozi, ki po delni hidrolizi sproži obarjanje kazeina. Ostanek kimozina v siru poleg bakterijskih proteaz prispeva k razvoju arome. Uporabljajo se tudi rekombinanti (genetsko modificirani) kimozini. Za sirjenje mleka se uporabljajo tudi nekater druge proteinaze, ki imajo manjšo hidrolitično moč, vendar tvorijo tudi manj grenkih peptidov

Mehčanje mesa:

Da pospešimo mehčanje mesa zaradi endogenih proteinaz se lahko doda tudi eksogene proteaze. Uporabne so predvsem nekatere cisteinske endopeptidaze (papain, ficin). Učinkovito hidrolizirajo proteine vezivna tkiva kot sta kolagen in elastin (reduktivni pogoji-*post mortem*). Encime se doda na površino v obliki praška, ali pa se jih v slanici vbrizga v notranjost tkiva. Lahko se jih tudi vbrizga v žilo živali nekaj minut pred usmrtnitvijo (enakomerna razporeditev). Ker so relativno termostabilne pride do mehčanja mesa tudi na začetku kuhanja.

Uporaba proteinaz v obdelavi živil 2

Bistrenje pijač:

V pivu se lahko pojavijo meglice, ki so posledica kompleksov taninov in proteinov. Tvorbo takšnih kompleksov lahko preprečimo z dodatkom proteinaz (papain, bakterijske, glivne proteinaze) pred končno filtracijo piva. Proteinaze se denaturira s pasterizacijo.

Proteaze se lahko doda tudi med drozganjem, da povečajo topnost proteinov/peptidov, ki so hrana kvasovkam med fermentacijo.

Uporaba v pekarski industriji:

V določenih primerih je zaželjena delna hidroliza glutena. Delna hidroliza rezultira v večjemu volumnu vzhajanege testa. Pečen kruh ima večji volumen, bolj enakomerno sredico in je mehkejši. Encimi so aktivni tudi nekaj časa med peko (denaturacija). Prekomerna hidroliza rezultira v trdem kruhu, ki ne bo dovolj vzhajal (poruši se glutenska mreža).

Hidroliza je uporabna tudi pri izdelkih, kjer je zaželjeno bolj mehko testo, ki se lažje oblikuje (pica, vaflji, piškoti)

Transglutaminaze

Aktivnost transglutaminaz:

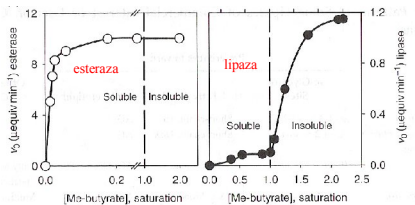
Encimi, ki katalizirajo kovalentno povezovanje polipeptidnih verig preko glutaminske kisline. Največkrat pride do kovalentne povezave glutaminske kisline na enem proteinu in lizina na drugem proteinu. Rezultat reakcije so spojine z veliko molekulsko maso

Uporabnost transglutaminaz v živilstvu:

- V proizvodnji jogurta se dodajo v začetni fazi, da se poveča čvrstost gela. Zmanjša se tudi sinereza-izločanje vode.
- Če je zaželjeno bolj čvrsto testo, se lahko to doseže z dodatkom transglutaminaz
- Očvrščevanje surimi-ja (drobno zmleto meso-uporabno za razne imitacije predvsem morske hrane)
- Povezovanje delčkov mesa (klobase, "doručki")
- Priprava bolj čvrstih rezancev

Lipaze-encimi, ki delujejo na lipide na fazni meji

Encimi katalizirajo hidrolizo esterske vezi, če so ti del koloidnih agregatov ali micel. Klasične esteraze delujejo na vodotopne substrate



Endogene lipaze so pogostokrat nezaželjene (proste MK, oksidativna žarkost)

Uporabnost eksogenih lipaz v živilski industriji

- Sproščanje krakoverižnih MK (razvoj ugodne arome)
- Premeščanje MK znotraj triacilglicerolov

Uporabnost lipaz v sirařtvu in pekarstvu

Sirařstvo:

- Pri starih sirař je zaželjena bolj pikantna aroma
- Dodamo lahko mikrobnne lipaze, ki sproščajo kratkoverižne MK (ketoni, aldehidi)
- Preoziranje lahko rezultira v milnatem okusu in grobi aromi

Pekarstvo:

- Mikrobne lipaze se relativno pogost doatek pri pripravi testa
- Izboljša se volumen, sredica je bolj uniforma in zračni mehurči v kruhu ostanejo večji
- Izboljšana lastnosti so posledica nastanka monoacil in diacilglicerolov, ki so dobri emulgatorji ter delno hidroliziranih fosfolipidov
- Zaradi nastanka emulgatorjev se upočasni tudi retrogradacija škroba (kruh ostane svež dalj časa)
- Manjša potreba po dodatku emulgatorjev v testo ("kupcu prijaznejša" deklaracija)

Kemijske modifikacije lipidov z lipazami

Reakcije hidrolize in ponovne tvorbe estrskih vezi v TAG potekajo pri manj kot 1% vode

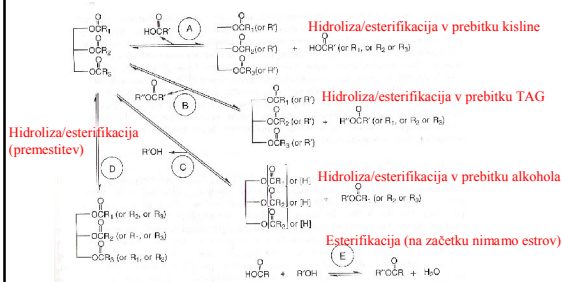


FIGURE 6.26 Types of acyl-structuring reactions mediated by lipase in aqueous media. (A) Acidolysis, (B) trans-esterification, (C) alcoholysis, (D) inter-esterification, and (E) esterification.

Izboljšanje tehnoloških in prehranskih lastnosti TAG

Nekatere ostale aplikacije encimov v živilstvu

Ureaza (hidroliza sečnine):

Dodaja se v mleko, da se prepreči nastanek toksičnega etilkarbamata

Katalaza (hidroliza vodikovega peroksida):

V primerih, ko mleka ni možno optimalno skladiščiti (temperatura) se mu doda peroksid, da ga mikrobiološko stabilizira. Prebiten peroksid je potrebno nato odstraniti.

Tiol-oksidaza (oksidacija SH skupin v proteinih):

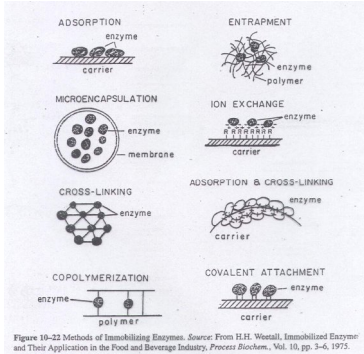
Dodatek v testo, kjer posepi tvorbo disulfidnih vezi v glutenu, kar privede do bolj čvrste glutenske mreže in večje viskoznosti.

Lipooksigenaze (uvajanje peroksidov na lipide):

Dodatek v testo (povečuje oksidativne moči). Podoben posreden učinek kot tiol-oksidaza. Lahko se doda malo sojine moke, ki je bogata z lipooksigenazami.

Imobilizirani encimi- zmanjšanje stroškov in izboljšanje stabilnosti

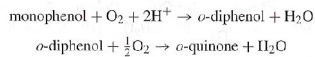
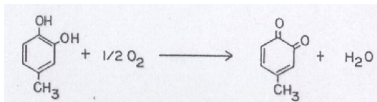
- Encimi, ki so vezani na neko v vodi netopno, inertno površino.
- Encimi zadržijo svojo aktivnost, in so zaradi imobilizacije pogostokrat bolj stabilni
- Dodajamo ali odstranimo jih iz reakcijske mešanice, možno je izvesti kontinuirni postopek in jih večkrat uporabiti.
- Applikacija
glukoza-izomeraza
β-galaktozidaza



Encimi v živilih

- Encimi so v tkivu pogostokrat lokalizirani in ločeni od substratov
- Lokalne koncentracije encimov so lahko zelo velike
- V "normalnih" razmerah so lahko encimi nekativni oziroma je njihova aktivnost močno regulirana (inhibitorji, cimogeni, odsotnost kofaktorjev, odsotnost substratov)
- Procesiranje in fiziološke spremembe v živilih lahko privedejo do porušanja tega razmerja
- Encimi se lahko aktivirajo, pridejo v stik s substratom ali pa izgubijo aktivnost (denaturacija, inhibicija)
- Rezultat delovanja encimov je večplasten. Učinki so lahko zaželeni in prispevajo k tipični aromi in teksturnim lastnostim.
- Pogostokrat so spremembe nezaželene, saj rezultirajo v velikih strukturnih spremembah, zmanjšujejo prehransko vrednost in dajo izdelku nezaželjene organoleptične lastnosti (aroma, barva)

Fenol-oksidge (polifenol-oksidge)-PPO



- Encimi so razširjeni v mikroorganizmih, rastlinah in živalih (kožni pigmenti)
- V rastlinah je njihova osnovna funkcija zaščita pred patogeni
- Mehanska poškodba rezultira v izlitju PPO iz kloroplastov in njihovi aktivaciji. Pridejo v stik s polifenolnimi substrati (vakuole) in jih pričnejo oksidirati v kinone.
- PPO potrebujejo za aktivnost Cu^{2+} ione (kofaktor); O_2 je poleg polifenolov substrat v reakciji.
- PPO so aktivne med pH 4 in 7; temperaturni optimum (do 50 °C); relativno počasni se denaturirajo, zato so aktivne nekaj minut tudi pri T nad 70 °C (problem rušenja membran pri 60 °C)

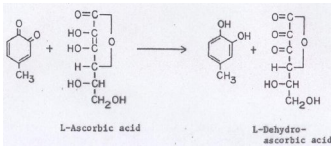
**Učinki polifenol-oksidadz (željeni in nezaželjeni)
Encimsko porjavenje**



- Mehanske poškodbe rastlinskih tkiv privedejo do površinskega porjavenja, ki je zelo nezaželjeno pri svežem sadju in zelenjavi. Porjavenje poškodovanega sadja in zelenjave na mestih poškodbe se še dodatno pospeši (na nivoju dni) zaradi intenziviranja biosinteze polifenolov
- Z oksidacijo nastali kinoni so reaktivne molekule in polimerizirajo v visoko molekularne produkte, ki so temno rjavo obarvani. Reakcija polimerizacije ni encimsko katalizirana.
- Do oksidacije polifenolov v kinone (in nadaljnje polimerizacije) pride tudi pri termični obdelavi na rahlo povišani temperaturi (60 °C), ko se membrane poškoduje PPO pa je še vedno nekaj minut aktivna.
- Encimsko porjavenje je prisotno tudi pri porjavenju raznih sokov pred termično obdelavo.
- Med živalskimi tkivi pride do nezaželenega porjavenja (točkovnega) raki
- V določenih primerih je encimsko porjavenje tudi zaželjeno (črni čaj, kakav, rozine, suhe slive).

Kako preprečiti (upočasni) encimsko porjavenje?

- **Termična obdelava** živil pred shranjevanjem (blanširanje)
- **Zmanjšanje koncentracije kisika** (pakiranje v modificirano atmosfero, obilvanje z raznimi sladkornimi sirupi (zmanjša se dostop kisika). Problem pakiranja živih tkiv je, da jih ne smemo pakirati v atmosfero brez kisika-anaerobni procesi.
- **Dodatek reducentov**, ki reducirajo kinone nazaj v polifenole (askorbinska kislina, sulfiti, cistein)
- **Dodatek kelatorjev** divalentnih kationov (citrati, oksalna kislina), ki vežejo Cu^{2+} in zmanjšajo njegovo koncentracijo v aktivnem mestu.
- **Dodatek inhibitorjev** (Cl^- , F^-); inhibirajo PPO)
- **Nižanje pH** (PPO so zelo slabo aktivne pri pH manjšem od 3): Idelana kombinacija za preprečevanje porjavenja je npr. limonin sok (3 v enem –nizek pH, citrat, askorbinska kislina)



Peroxisidaze

- Encimi, ki katalizirajo oksidacijo različnih substratov z vodikovim peroksidom (H_2O_2)
- $2AH + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + 2A^*$
- Naravni substrati za peroksidaze so zelo različni (polifenoli, askorbinska kislina, NADH...)
- Funkcija encimov (tvorba in razgradnja lignina, zaščita pred mikrobi, zmanjšanje celične koncentracije H_2O_2 vloga v celični signalizaciji)
- V aktivnem mestu so Fe ioni ($3^+/5^+$)
- pH območje aktivnosti je široko 2-10, optimum okoli pH 5
- Rastlinske peroksidaze imajo temperaturni optimum največkrat okoli 50 °C, vendar so termično zelo obstojne, saj je hitrost denaturacije zelo majhna tudi pri močno povišani temperaturi-blizu vrelišča

Peroksidaze v živilih

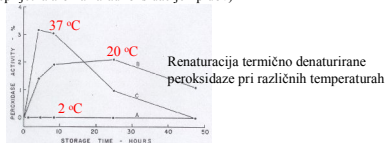
•Čeprav peroksidaze lahko oksidirajo enake substrate kot PPO, njihova vloga v encimskem pojavanju ni popolnoma jasna. Probleme lahko predstavlja le v določenih primerih (npr. globinsko porjavenje ananasa)

•S tehnološkega vidika so peroksidaze zaradi dobre termične stabilnosti dober indikator učinkovitosti nekega termičnega postopka- npr. blanširanje (če se denaturirale peroksidaze, so se tudi drugi encimi)

•Zanimivo je, da se peroksidaze v določeni meri lahko renaturirajo po termični obdelavi (refolding, je temperaturno pogojen)

•Peroksidaze lahko katalizirajo določene reakcije, ki vodijo v razgradnjo betalainov (rdeča pesa) in razbarvanje klorofilov

•Denaturirane peroksidaze lahko tudi posredno predstavljajo problem, saj Fe ioni niso več vezani v aktivnem mestu in lahko oddisocirajo v raztopino, kjer katalizirajo razne oksidacijske procese (neprijetna aroma zaradi oksidacije lipidov)



Lipooksigenaze

•Lipooksigenaze najdemo v rastlinah, živalih in pri glivah

•Vključujejo molekularni kisik v molekulo substrata (največkrat lipidi z dvojno vezjo)

•Pri rastlinah imajo funkcije v regulaciji razvoja in rasti, obrambe pred mikroorganizmi in v procesih staranja. V živalskem metabolizmu so vključene v biosintezo poti prostaglandinov in leukotrienov (arahidonska kislina).

•Pri rastlinah je poznanih veliko različnih izoform, ki se razlikujejo v celični lokalizaciji, substratni specifičnosti in pH optimumu (nevtralnemu do rahlo alkalnemu).

•V aktivnem mestu encima so Fe ioni ($2^+/3^+$)

•Najpomembnejši substrat za lipooksigenazo v živalskih sistemih je linolenska kislina (C_18 in C_{13})

•Oksidirane MK so nestabilne in v seriji različnih reakcij razpadejo na hlapne produkte (aldehidi in ketoni)

Lipooksigenaze v živilih

Encimska aktivnost lipooksigenaz v živilih je največkrat nezaželjena

•Razvoj nezaželjene arome (žarkost) razne zelenjave (soja, koruza, grašek), ki vsebujejo mnogo lipooksigenaz-tudi v skrinji

•Oksidacija karotenoidov (razbarvanje)

Encimska aktivnost lipooksigenaz je večasih zaželjena

•Zatradi oksidacije pigmentov je kruh bolj bel, reakcije polimerizacije lahko rezultirajo v boljših viskozielastičnih lastnostih testa

•Zaželjena aroma v svežih ribah (kasneje ne)

Pristopi za zmanjševanje aktivnosti lipooksigenaz

•Termična deaktivacija pred skladiščenjem (blanširanje)

•Regulacija pH (največkrat kisanje)

•Uporaba fenolnih antioksidantov (ki stabilizirajo, produkte nastale s peroksidacijomaj nezaželenih hlapnih arom)

•Uporaba inhibitorjev (kelatorji Fe ionov, nekateri polifenoli-resveratrol)

Hidroperoksid-liaze v živilih

- Katalizirajo pretvorbo peroksidov, ki so nastali z lipooksigenazo, v ustrezne aldehide in ketone.
- Encimi, ki jih uvrščamo med citokrome (hem z železom v aktivnem mestu). Tetramerni encimi, vezani na membrano.
- Od ostalih citokromov se razlikujejo v tem, da v potek reakcije direktno ni vključen kisik, ampak peroksid MK.
- Delovanje hidroperoksid-liaze je pogostokrat zaželeno, saj za razliko od neencimske katalizirane razgradnje peroksidov nastajajo zaželeni produkti, ki imajo za določene rastline tipično aromo (banane, kumare, paradiznik, hruške).
- Obstaja velik tržni interes za genetsko modificirano sadje, kjer bi z ustreznim izborom encimov vključenih v pretvorbo lipidov (kipoooksigenaze, hidroperoksid-liaze,desaturaze) dosegli željene arome.

Glukozinolati in mirozinaza 1

Glucosinolate R group	Common name	Enriched source
	S-nigrin	Muscaric Cabbage
	Glucoraphanin	Broccoli
	Glucobrassicin	Cabbage
	Progoitrin	Brussels sprouts
	Dehydroaucurin	(horse)radish

- Rastline iz družine kapusnic (zelje, brokoli, cvetača, repa, gočino seme, hren...) vsebujejo spojine, ki jih imenujemo glukozinolati (tioglikozidi).
- Po poškodbi rastlinskega tkiva pridejo glukozinolati v stik z encimom mirozinaza (β -D-tioglikozidaza), ki katalizira hidrolizo glikozidne vezi. Območje pH aktivnosti 4-8; temperaturna stabilnost do 70 °C.
- Pri tem nastajajo različni hlapni produkti, ki predstavljajo zaščito kapusnic pred različnimi rastlinojedi (neprijeten vonj, toksični za nekatere živali-naravni insekticidi)

Glukozinolati in mirozinaza 2

Zaželeni učinki glukozinolatov:

- Tipična aroma (sveže narezano zelje, hren, gorčica)
- Razgradni produkti nekaterih glukozinolatov (glukoraphanin→sulfofufam) imajo dokazano antikancerogeni učinek, saj inducirajo različne encime za detoksikacijo prostih radikalov.

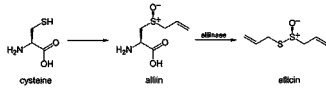
Nezaželeni učinki

- V reakcijah razgradnje nastajajo tudi cianati, ki zmanjšajo absorpcijo joda (golšavost). Danes te nevarnosti praktično ni (jodirana sol). Pozitivni učinki močno prevladajo.

•Na potek hidrolize in nadaljnih pretvorb močno vplivajo pogoji pri katerih potekajo reakcije. Optimalno naj bi bilo nekaj minutno termična obdelava na 60 °C (pH 5 do 8), kjer je mirozinaza še aktivna in kjer potече sinteza zaželenih produktov.

- Aktivator mirozinaze je tudi askorbinska kislina (v zelju je dosti vit C)

Alinaze in razvoj arome (pri rastlinah iz rodu lukov-alium)



- Rastline iz rodu lukov vsebujejo žveplo vsebujoče spojine (npr. alicin); ki so derivati AK cistein
- Alinaze, encimi, ki razgrajujejo te žveplo vsebujoče spojine, predstavljajo velik del mase proteinov (npr 10 % vseh proteinov) v česnu. Ko pride do poškodbe tkiva, reakcija praktično trenutno poteče (v 1 minuti se pretvori do 90 % molekul substrata). Nastali alicin ima močan antimikrobni učinek-naravni antibiotik.
- Tvorba hlapnih produktov je pomembna za razvoj tipične arome lukov, zato je potrebno pri shranjevanju procesiranih lukov paziti, da se aktivnost alinaze čimbolje ohrani (liofilizacija).
- Domnevno pozitivnih učinkov uživanja lukov povezanih z zniževanjem krvnega pritiska niso uspeli dokazati

Endogeni encimi, ki vplivajo na strukturo pektina

Pravilna regulacija termične obdelave je ključna za ohranjanje strukturne integritete rastlinskega tkiva.

Paradižnik:

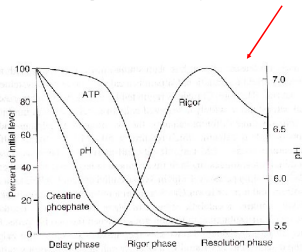
- Pri segrevanju paradižnika pri temperaturah nad 90 °C se ohranja struktura pektina. Paradižnikova meza ima ustrezno viskoznost in dobro veže vodo.
- Pri segrevanju paradižnika pri temperaturah 60-70 °C pektični encimi razgrajujejo pektin. Izguba viskoznosti, izločanje vode. Prednost teh razmer je bogatejša aroma zaradi delovanja lipooksigenaz in hidroperoksid-liaz (kompromis)

Krompir, kumare, paprika, korenje:

- Termična obdelava pri T 50-60°C z namenom povečanja čvrstosti tkiva (30-120 min).
- Pride do razpada celic. Pektin-metilesteraza hidrolizira estrske vezi.
- Tvorijo se nabite skupine, ki s sproščenim kalcijem iz celic (ali eksogeno dodanim) prispevajo k čvrstejši strukturi.
- Če tako predhodno tretirano zelenjavo nato blanširamo, bo ostal bolj čvrsta.
- Posreden pozitiven učinek demetilacije je tudi, da pektin-liaza hidrolizira le glikozidne vezi ob metiliranih galakturonskih kislinah.

Endogeni encimi, ki vplivajo na teksturo mesa

Proteinaze so povezane z mehčanjem mesa *post mortem*



Kalpaini:
Cisteinske proteinaze, aktivirane s Ca^{2+} , ki se sprostijo iz celic
aktivne pri neutralnem pH
 μ -kalpains (aktivirani z nekaj $\mu\text{mol/l } Ca^{2+}$)
m-kalpains (aktivirani z nekaj $\text{mmol/l } Ca^{2+}$)
Hidrolizirajo miofibrilare in citoskeletne proteine (najpomembnejša vloga)

Katepsini:
Cisteinske proteinaze, ki se nahajajo v lizosomih (organeli)
aktivne v blago kislem pH-ju

Proteosom:
Proteinski kompleks, ki hidrolizira peptide nastale z delovanjem kalpainov, na proste AK (le malo prostih AK-aroma)
