

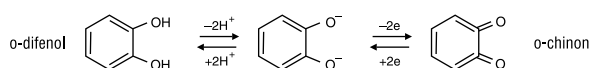
# Inaktivace oxidoreduktáz z pohledu výroby cukerného sirupu

INACTIVATION OF OXIDOREDUCTASES IN VIEW OF SUGAR SYRUP PRODUCTION

Weronika Konka, Marcin Kucner, Jan Grabka – Politechnika Łódzka, Polsko

Ovoce a zelenina jsou velmi náchylné na nežádoucí změny způsobené poškozením při uskladnění, manipulaci nebo v průběhu technologického zpracování. Změny v textuře, vůni, chuti, nebo barvě mají vliv na komerční hodnotu produktu, což může mít za následek značné ekonomické ztráty. Jedním, z organoleptických parametrů, které určují, zda výrobek je pro spotřebitele atraktivní, je vzhled, přičemž barva je jeho hlavním atributem. Jedním z nejdůležitějších faktorů, které mají vliv na barevnou změnu meziproductů a finálních produktů, je tvorba nebo rozklad barevných sloučenin, které jsou obvykle přítomny ve výrobku ve formě prekurzorů. V tomto procesu působí i vysoce aktivní exogenní a endogenní enzymy. Oba typy enzymů se mohou vyskytovat ve výrobku nebo v okolní mikroflóře. Z technologického hlediska vyvolávají tyto změny příznivé nebo nepříznivé účinky. Příznivý účinek se projevuje při zpracování masa, sýrů nebo při zrání mouky. V cukrovarnické technologii je tento proces nepříznivý a vede k enormním kvantitativním a kvalitativním ztrátám. Aktivita enzymů je spojena s výskytem tmavě hnědých polymerů chinonu, vznikajících v cukrovarnických meziproductech. K zamezení tohoto jevu bychom měli naše zkoumání zaměřit na enzymy, které jsou za něj odpovědné a minimalizovat jejich nežádoucí aktivitu. Enzym, který způsobuje hnědnutí, je v mezinárodním EC systému (5) veden jako EC 1. Za oxidoreduktázy se označují enzymy, které katalyzují oxidační a redukční reakce. Jsou přítomny v mitochondriích a vytvářejí skupinu mitochondriálních enzymů. Mají účast při dýchání rostlinných a živočišných buněk. Jinou skupinu enzymů představují extramitochondriální enzymy (26, 16, 13). Jejich hlavní úlohou je transport protonů a elektronů z *o*-fenolů nebo *p*-fenolů na kyslík za přítomnosti vody, která je současně produktem reakce. Tyto typicky rostlinné enzymy se vyskytují v membránách stěn buněk (14, 3). Oxidázy jako *o*-difenol oxidázy nebo katecholázy oxidují *o*-difenoly na *o*-chininy a rovněž katalyzují hydroxylaci monofenolů do polohy orto, obě tyto reakce mohou probíhat současně (obr. 1.) (11, 19); *o*-difenol oxidáza je velmi aktivní enzym, který při kontaktu s kyslíkem reaguje bezprostředně se sloučeninami obsahujícími fenolovou skupinu, což způsobuje tmavnutí šťávy jako důsledek tvorby melaninových barviv (obr. 2.). Při výrobě sirupů to vede k vytvoření nežádoucí hnědé barvy, která je spotřebitelem hodnocena jako nepříznivá. Barviva jsou odstraňována při čerání, avšak účinkem použití vápna dochází k významnému poškození organoleptických vlastností sirupu. Proto je důležité snížit aktivitu zmíněného enzymu na minimum v co nejkratší době.

Obr. 1. Schéma oxidace *o*-difenolu pomocí *o*-difenol oxidázy (11)



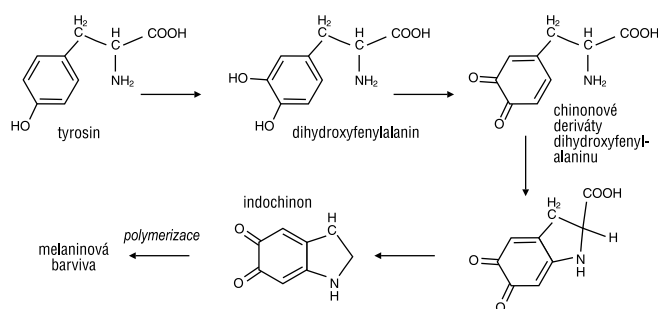
V cukrovarnictví se směs makromolekulárních sloučenin vytvořená enzymatickou oxidací derivátů fenolů s jednou či více hydroxylovými skupinami nazývá melaniny. Melaniny se v porovnání s ostatními barvivy vyskytují nejčastěji. Vznikají při řezání řízků z řepy. Řízky rychle tmavnou na povrchu – z bílé na krémovou až hnědou. K podobné změně barvy dochází u surové šťávy. K barvivům vytvořeným v cukrovaru patří také karamely, barevné produkty rozkladu invertního cukru a melanoidinů. Zahrnují směs obtížně identifikovatelných chemických sloučenin se složitou molekulární strukturou a s různou chemickou a fyzikálně-chemickou povahou (4). Při výzkumu chemických základů tvorby barviv bylo zjištěno, že nárůst barvy šťávy závisí na těchto faktorech (8, 24):

- době technologických jednotkových operací,
- teplotě,
- pH,
- obsahu sušiny,
- obsahu redukcujících látek a aminokyselin.

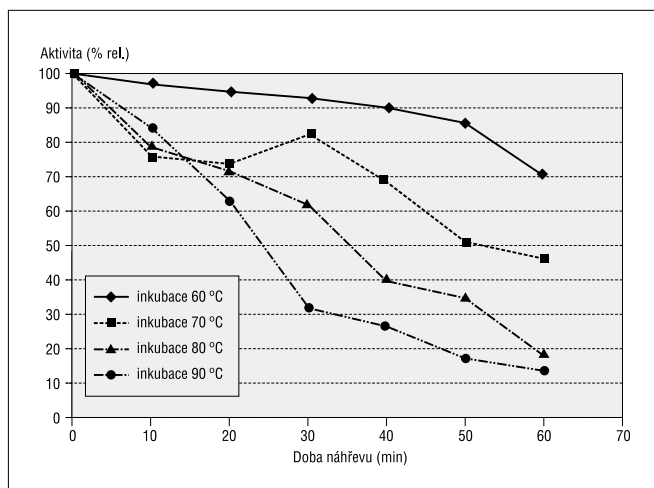
Tyto poznatky jsou stále více využívány v postupech, které eliminují nebo zabraňují vzniku polyfenol oxidáz v surovém materiálu (9). Existuje rozsáhlá literatura o metodách enzymové inaktivace. Mezi mnohými známými inaktivačními metodami můžeme zmínit:

- tepelnou inaktivaci enzymů – blanšování, které předchází dalším krokům technologického procesu (1, 2, 6),
- sorpci na bentonitu (9),
- snížení pH prostředí (10, 9),
- aplikaci inhibitorů, např. SO<sub>2</sub> (17), benzoátů (9), organických kyselin (22), přírodních inhibitorů – medu (17),
- působení ultravysokého tlaku (ultra high pressure – UHP) (13, 21), oxidu uhličitého za zvýšeného tlaku (22) a vysokého hydrostatického tlaku (high hydrostatic pressure – HHP) (18),
- kombinované metody, např. snížení pH a blanšování (1, 6, 10, 20 13).

Obr. 2. Schéma tvorby melaninových barviv (11)



Obr. 3. Změny aktivity o-difenol oxidázy v průběhu zahřívání



Avšak ne všechny zmíněné metody našly využití v cukrovarnictví. Některé z nich vyžadují speciální zařízení a náležitě provozní podmínky, např. metoda UHP, jejíž zavedení stojí vysoké výdaje, které často převáží nad možnými výhodami. Tepelná inaktivace se zdá být jednou z optimálních metod. To lze doložit několika důležitými argumenty:

- proces může být realizován ve spařovacím misidle, kde dochází k tepelnému ohřevu, nebo v extraktoru, kde probíhá denaturace řepné tkáně; proces realizovaný v anaerobním extraktoru zabraňuje přístupu vzdušného kyslíku do řízků,
- možnost řídit inaktivaci procesní parametry, tzn. teplotu a čas.

Bylo by rovněž efektivní používat kombinované metody, zvláště snížení pH a zvýšení teploty nebo blanšování řízků. Ale musí být zváženy další faktory, např. že příliš vysoká teplota či příliš nízké pH mohou vést k inverzi cukru – nežádoucímu jevu v této fázi výroby. Jednou z nejlevnějších a relativně snadno adaptabilních metod v cukrovarnické technologii je tepelná inaktivace. Ta umožňuje rychlou a efektivní inhibici nežádoucího působení enzymů.

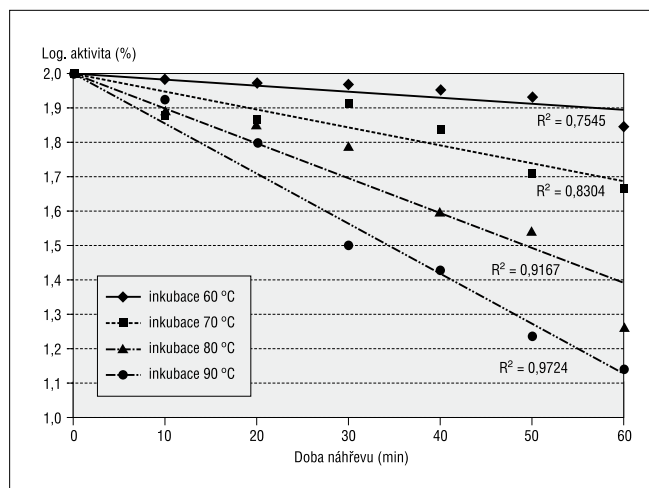
Cílem tohoto výzkumu bylo určit aktivitu oxidoreduktáz v meziprojektu cukrovarnické technologie a charakterizaci zkoumaných enzymů. Rozsah bádání zahrnoval stanovení aktivity o-difenol oxidázy v řízcích před a po tepelné inaktivaci a porovnání barvy získaných surových šťáv. Charakterizace enzymů se týkala určení optimální provozní teploty a termostability. Výzkum zahrnoval rovněž určení účinku inaktivace enzymu na barvu surové šťávy. Zkoumání byla zvláště významná v experimentech týkajících se těžení surové šťávy z řepy. Významným cílem bylo odstranění specifického zápachu a získání cukerného sirupu o vysoké čistotě (12).

### Použitá metoda

Testovaným materiálem byla cukrová řepa z kampaně 2008/2009 skladovaná v písku do května 2009.

Enzym byl z cukrovky extrahován metodou GONZALEZE ET AL. (7). Aby byl získán extrakt, bylo dezintegrováno 10 g řízků a doplněno 0,05M fosfátovým pufrem o pH 7,0 na objem 50 ml. Extrakce byla prováděna 2 hodiny při teplotě 4 °C, poté byl vzorek odstředěn.

Obr. 4. Změny aktivity o-difenol oxidázy při zahřívání, v log. měřítku



Gonzalezova metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení barevných produktů kondenzace o-chinonu vytvořeného jako důsledek oxidace pyrokatecholu. Stanovení enzymové aktivity spočívá v měření absorbance reakční směsi obsahující pyrokatechol a enzymový extrakt v závislosti na čase. Jednotka aktivity o-difenol oxidázy je definována jako přírůstek absorbance o 0,01 za 1 min při experimentálních podmínkách. Nárůst absorbance po 2 min byl nahráván na spektrofotometru při vlnové délce  $\lambda = 420$  nm. Reakce započala v momentu přidavku enzymového extraktu k roztoku pyrokatecholu. Aktivita o-difenol oxidázy byla vypočtena podle rovnice:

$$Act = \frac{\Delta A \cdot V_{mix} \cdot V_{extr} \cdot R_{enzyme}}{\tau \cdot V_{enzyme} \cdot m_{prod} \cdot 0,01}$$

- kde  $Act$  – enzymatická aktivita ( $U \cdot g^{-1} \cdot \text{prod.}$ )  
 $\Delta A$  – přírůstek absorbance v čase,  
 $V_{enzyme}$  – objem roztoku enzymu pro reakci (1 ml),  
 $V_{mix}$  – objem reakční směsi (6 ml),  
 $V_{extr}$  – objem enzymového extraktu (ml),  
 $R_{enzyme}$  – zředění roztoku enzymu pro reakci,  
 $m_{prod}$  – navážka (g),  
0,01 – přepočtový faktor pro jednotku aktivity,  
 $\tau$  – reakční doba (2 min).

K určení optimální teploty reakce byla měřena shora popsaná enzymová aktivita po předchozí inkubaci řízků ve vodní lázni při vhodné teplotě. Reakce probíhaly při teplotách 60–90 °C v intervalech 10 °C. K určení tepelné stability o-difenol oxidázy byly řízků inkubovány při teplotách 60, 70, 80, 90 a 115 °C po určenou dobu. Pro teploty 60–90 °C byla volena tato doba 10–60 min, pro 115 °C jen 15 min. Z nahřátých řízků vystavených enzymatické inaktivaci byla extrahována surová šťáva v difuzéru sestávajícím ze tří nádob. Všechny vzorky byly extrahovány za stejných podmínek (80 °C, 30 min) (25).

### Výsledky a diskuse

#### Účinek teploty a času na aktivitu o-difenol oxidázy

Z experimentů vyplývá, že počáteční enzymová aktivita o-difenol oxidázy se lišila u následujících vzorků řízků a nabývala hodnot 7 000–12 000  $U \cdot g^{-1}$  (tab. I.). To bylo způsobeno tím,

Tab. I. Závislost inaktivace o-difenol oxidázy na čase a teplotě

Číslo vzorku	Teplota (°C)	Čas (min)	Aktivita	
			(%)	(U.g <sup>-1</sup> )
1	60	0	100,00	11 377
		10	96,75	11 007
		20	94,72	10 776
		30	92,95	10 575
		40	90,00	10 239
		50	85,69	9 746
		60	70,41	8 010
2	70	0	100,00	7 543
		10	76,15	5 744
		20	73,82	5 568
		30	82,41	5 462
		40	68,69	5 106
		50	51,25	3 866
		60	46,28	3 491
3	80	0	100,00	7 863
		10	77,69	6 109
		20	71,87	5 651
		30	62,16	4 888
		40	39,93	3 140
		50	35,34	2 779
		60	18,47	1 452
4	90	0	100,00	12 108
		10	84,49	10 290
		20	63,02	7 631
		30	31,65	7 464
		40	26,78	3 242
		50	17,30	2 095
		60	13,83	1 674
5	115	0	100,00	7 437
		15	15,92	1 184

že každá řepa byla charakteristická svými individuálními vlastnostmi, včetně enzymové aktivity. Avšak pokud vyjádříme změny aktivity v procentech, můžeme pozorovat, že všechny testované vzorky závisely na čase a teplotě inkubace. Enzymová aktivita klesala s vyšší teplotou a delší dobou reakce. Grafy na obr. 3. a na obr. 4. ukazují tepelnou stálost a vliv teploty na o-difenol oxidázu. Po šedesátiminutové inkubaci nejnižší aktivitu (< 15 %) měl enzym v řízkách zpracovávaných při 90 °C. Podobného výsledku (18 %) bylo dosaženo při 80 °C po stejné době inkubace. Teploty 60 °C a 70 °C nesnižovaly aktivitu enzymu ani o polovinu.

Jako neúčinnější se ukázal průchod řízků vodní párou při 115 °C po dobu 15 min. Pára inaktivovala enzym na 1184 U.g<sup>-1</sup>, zatímco při 90 °C aktivita dosáhla 1674 U.g<sup>-1</sup> až po 60 min. Ani v jednom z případů nedošlo k 100% inaktivaci o-difenol oxidázy. Experimenty umožnily provést předběžné porovnání barvy surové šťávy získané po tepelném zpracování řepných řízků (obr. 5.).

### Organoleptické vyhodnocení získaných surových šťáv

Barva šťávy č. 1 byla tmavá a našedlá. Vzhledem k této tmavé barvě šťávy způsobené přítomností barevných melaninových sloučenin bylo obtížné určit čírost šťávy. Získaná barva působila nepříjemné asociace, takže produkt bylo možno označit jako nepřitažlivý. Šťávy po inkubaci řízků č. 2, 3 a 4 byly mnohem světlejší, bez účinku melaninů a s vizuálně příjemnou barvou a čírostit. V závislosti na teplotě inkubace se vzorky lišily v barvě a zákalu. Barva vzorků přecházela z kaštanově hnědé (vzorek č. 1) přes hnědou (vzorek č. 2) do žlutohnědé (vzorky č. 3 a 4). Barvy vzorků č. 2, 3 a 4 navozovaly příjemné asociace. Velmi tmavá barva vzorku č. 1 byla způsobena nejnižší teplotou inkubace řízků, tj. 60 °C, jejímž důsledkem byla neúplná inaktivace o-difenol oxidázy. Vzorky č. 5 a 6 byly nejsvětější – nažloutlé. Tyto surové šťávy byly extrahovány z řízků zpracovávaných při 90 °C po dobu 60 min (vzorek č. 5) a při 115 °C po dobu 15 min (vzorek č. 6) (obr. 5.). Parametry tepelně ošetřené surové šťávy měly následující parametry: sacharizace 9–11 %, polarizace 8–9,5 % a čistota 86,8–91,7 % (tab. II.).

### Závěrečné poznámky

Na základě experimentálních výsledků mohou být formulovány následující závěry:

1. Aktivita o-difenol oxidázy je charakteristickou vlastností, která závisí na mnoha faktorech, mj. na skladovacích podmínkách.
2. Technologické parametry řízků, teplota a čas inkubačního procesu mají synergický účinek na enzymatickou aktivitu o-difenol oxidázy.
3. Nejnižší aktivity o-difenol oxidázy bylo dosaženo po inkubaci při teplotě 80 °C a 90 °C po dobu 60 min. Alternativou inkubačního procesu je blanširování.
4. Nejsvětější barvu měly surové šťávy extrahované z řízků inkubovaných při teplotě 90 °C po dobu 60 min nebo blanširované při 115 °C po dobu 15 min.

Získané výsledky svědčí o tom, že optimální řízení procesu enzymatické inaktivace může být uskutečněno nastavením vhodné teploty a času. Uvažovaná technologie by mohla být použita v cukrovarnictví jako jeden z kroků výroby sirupu z cukrové řepy. Šťáva by měla vhodné organoleptické vlastnosti, tj. nažloutlou barvu a příjemnou vůni.

### Souhrn

V článku jsou předloženy výsledky výzkumu vlivu teploty a času na aktivitu o-difenol oxidázy, která se přirozeně vyskytuje v cukrové řepě. Aby byla určena optimální teplota a doba inaktivace enzymu, byly řízky podrobeny tepelnému zpracování působením horkou vodou a párou. Poté byla z řízků extrahována surová šťáva a barva takto získaných šťáv byla porovnána v závislosti na enzymatické aktivitě o-difenol oxidázy. Neúčinnější inaktivace enzymu byla pravděpodobně při 115 °C po dobu 15 min. Šťáva extrahovaná za těchto podmínek měla nejjasnější barvu. Experimenty potvrdily závislost aktivity enzymu na teplotě a čase, a dále vliv o-difenol oxidázy na barevnou intenzitu extrahované šťávy. Tato zjištění umožňují další výzkum ve větším měřítku v této oblasti.

**Klíčová slova:** řepný sirup, barviva, blanširování, enzymatické hnědnutí.

Přeložil Evžen Šárka

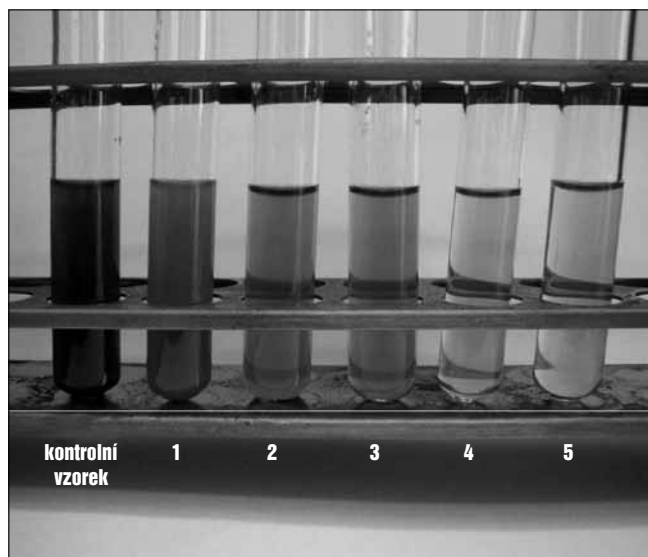
Tab. II. Sušina, polarizace a čistota surové šťávy

Číslo vzorku	Teplota (°C)	Sacharizace	Polarizace	Čistota
		(%)		
1	60	9,0	8,3	91,7
2	70	9,5	8,6	90,5
3	80	11,0	9,5	86,8
4	90	9,0	7,9	87,8
5	115	9,5	8,0	84,2

## Literatura

- CANO, M. P.; HERNANDEZ, A.; DE ANCOS, B.: High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *J. Food Sci.*, 62, 1997 (1), s. 85–88.
- CHANG, B. S.; PARK, K. H.; LUND, D. B.: Thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase. *J. Food Sci.*, 53, 1988 (3), s. 920–923.
- CHAZARRA, S. ET AL.: Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa L.*). *J. Agric. Food Chem.*, 1996 (44), s. 984–988.
- DOBRYZYCKI, J.: *Chemiczne podstawy technologii cukru*. Warszawa: WNT, 1984.
- FILIPOWICZ, B.; WIĘCKOWSKI, W.: *Biochemia Tom 1*. W-wa: PWN, 1990.
- GANTHAVORN, C.; NAGEL, C. W.; POWERS, J. R.: Thermal inactivation of asparagus lipoxigenase and peroxidase. *J. Food Sci.*, 56, 1991 (1), s. 47–49.
- GONZALEZ, E. M.; DE ANCOS, B.; CANO, M. P.: Partial Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Raspberry Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1999, s. 4068–4072.
- GRUSZECKA, H.; STREBSKA, J.; SUMIŃSKA, T.: Przebieg reakcji Maillarda w roztworach modelowych. *Informator STC*, 2002 (9), s. 5–28.
- HALASIŃSKA, A.; TRZCIŃSKA, M.: Oksydazy polifenolowe w przemyśle spożywczym. *Przem. Spoż.*, 2001 (10), s. 34–35.
- HALIM, D. H.; MONTGOMERY, M. W.: Polyphenol oxidase of d'anjou pears (*Pyrus communis L.*). *J. Food Sci.*, 43, 1978, s. 603–608.
- KĄCZKOWSKI, J.: *Podstawa biochemii*. Warszawa: WNT, 1999.
- KONKA, W.; GRABKA, J.: Process aspects of receiving syrup from sugar beet for food industry. *Gaz. Cukrown.*, 2009 (10).
- LEE, C. Y.: Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health, In Ho, C.-T.; LEE, C.Y.; HUANG, M.-T. (Eds.): *ACS Symposium Series 506*, Washington DC: Am. Chemical Society, 1992, s. 305.
- MACDONALD, L.; SCHASCHKE, C. J.: Combined effect of high pressure, temperature and holding time on polyphenoloxidase and peroxidase activity in banana (*Musa acuminata*). *J. Sci. Food Agric.*, 80, 2000, s. 719–724.
- MAYER, A. M.: Polyphenol oxidase in plants – recent progress. *Phytochemistry*, 26, 1987 (1), s. 11–20.
- NAGAI, T.; SUZUKI, N.: Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage *Brassica rapa L.* *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2001, s. 3922–3926.
- OSZMIANŃSKI, J.; LEE, CH. Y.: Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1990, s. 1892–1895.
- PALOU, E. ET AL.: Polyphenoloxidase activity and colour of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. *J. Food Sci.*, 64, 1999 (1), s. 42–44.
- PAUL, B.; GOWDA, R.: Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lahlah*). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2000, s. 3839–3846.
- RATCLIFFE, B. ET AL.: Tyrosinase, laccase and peroxidase in mushrooms (*Agaricus, crimini, oysters and shiitake*). *J. Food Sci.*, 59, 1994 (4), s. 824–827.
- SEYDERHELM, I. ET AL.: Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *J. Food Sci.*, 61, 1996 (2), s. 308–309.
- SON, S. M.; MOON, K. D.; LEE, C. Y.: Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2000, s. 2071–2074.
- TEDJO, W.; ESTHIAGHI, M. N.; KNORR, D.: Impact of supercritical carbon dioxide and high pressure on lipoxigenase and peroxidase activity. *J. Food Sci.*, 65, 2000 (8), s. 1284–1287.
- WALERIANCZYK, E. W.: Czynniki rytmicznej pracy ekstraktora w procesie dyfuzji cukru w tkance buraczanej. *Gaz. Cukrown.*, 103, 1995, s. 221–220.
- WNUK, B. ET AL.: Losy sacharozy i składników nieorganicznych w procesie ekstrakcji krajanki. *Gaz. Cukrown.*, 110, 2002 (10), s. 287–292.
- ZHANG, X.; FLURKEY, W. H.: Phenol Oxidases in Portabella mushrooms. *J. Food Sci.*, 62, 1997 (1), s. 97–100.

Obr. 5. Surové šťávy získané po tepelném zpracování řízků



Kontrolní vzorek – šťáva extrahovaná z řízků bez tepelné úpravy; 1 – šťáva extrahovaná z řízků zpracovaných při  $t = 60^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 60$  min; 2 –  $t = 70^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 60$  min; 3 –  $t = 80^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 60$  min; 4 –  $t = 90^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 60$  min; 5 –  $t = 115^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 15$  min

## Konka W., Kucner M., Grabka J.: Inactivation of Oxidoreductases in View of Sugar Syrup Production

Results of studies on the effect of temperature and time on the activity of o-diphenol oxidase which occurs naturally in sugar beet are presented in the paper. To determine optimum temperature and enzyme inactivation time cosettes were subjected to thermal treatment with hot water vapor and water. After the thermal treatment, raw juice was extracted from the cosettes and color of the obtained juices was compared depending on the enzymatic activity of o-diphenol oxidase. The most efficient enzyme inactivation in the experiments appeared to be the one carried out at  $115^\circ\text{C}$  for 15 minutes. Juice extracted in these conditions had the brightest color. The experiments confirmed dependence of the enzyme activity on temperature and time and the effect of o-diphenol oxidase on color intensity of the extracted juices. This gives good reason for further studies on a bigger scale in this area.

**Key words:** beet syrup, colored compounds, blanching, enzymatic browning.

## Kontaktní adresa – Contact address:

Mgr. Inž. Weronika Konka, Prof. dr hab. Inž. Jan Grabka, Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Chemicznej Technologii Żywności, Zakład Cukrownictwa, ul. B. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź, Polska, e-mail: grabka@snack.p.lodz.pl