



Lipazy w przemyśle mleczarskim

Joanna Niedbalska-Tarnowska, Marek Szotłysik*, Anna Dąbrowska
Katedra Rozwoju Funkcjonalnych Produktów Żywnościowych, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności,
*autor korespondencyjny: marek.szotlysik@upwr.edu.pl

Enzymy lipolityczne w technologii mleczarskiej wykorzystywane są w modyfikacjach bezwodnego tłuszczu mlecznego, lipolizie masła i śmietanki oraz w serowarstwie. W szczególności lipazy wykorzystywane są w produkcji serów typu włoskiego, których charakterystyczne walory smakowo-zapachowe powstają przede wszystkim w wyniku przemian degradacyjnych tłuszczu. Niemniej procesy lipolityczne zachodzą we wszystkich typach serów podczas ich dojrzewania. Źródłami enzymów lipolitycznych w serach jest zarówno sam surowiec, jak i preparaty koagulujące, kultury starterowe oraz niestarterowe bakterie kwasu mlekowego i ewentualnie egzogenne preparaty lipolityczne (Fox 1993, Houde i wsp. 2004, Hasan i wsp. 2006).

Endogenny enzym mleka - lipaza lipoproteinowa bierze udział w degradacji tłuszczu mlekowego w serach wytwarzanych głównie z mleka niepasteryzowanego. Jednak jej aktywność może być ograniczona ze względu na niskie pH młodego sera, dalekie od pH optymalnego dla tego enzymu. Tradycyjnymi źródłami lipaz dla potrzeb serowarskich są tkanki zwierzęce i wyizolowane z nich enzymy, jak lipaza pregastryczna (esteraza) (PGE) i lipaza trzustkowa. W produkcji serów typu włoskiego wykorzystuje się pasty podpuszczkowe otrzymane w drodze maceracji żołądków młodych przeżuwaczy. Pasty te prócz podpuszczki zawierają główny enzym uczestniczący w katalizie tłuszczu u młodych cieląt - esterazę pregastryczną, która jest specyficzna wobec krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (masłowy, kapronowy, i kaprylowy) zlokalizowanych w pozycjach Sn-1 i Sn-3 w cząsteczce triacyloglicerolu. Poza produkcją serów esteraza pregastryczna jest również stosowana w produkcji dodatków smakowo-zapachowych charakteryzujących się maślanym i śmietankowym lub serowym posmakiem. Skład past podpuszczkowych jest zmienny i zależy od gatunku zwierząt, ich wieku, i technologii pozyskiwania. Obszerną grupę preparatów enzymatycznych pozbawioną wad past podpuszczkowych i chętnie wykorzystywaną w produkcji sera stanowią enzymy pochodzenia mikrobiologicznego, głównie z *R. miehei*, *A. niger*, *A. oryzae*. W Tabeli 1 przedstawiono wybrane preparaty lipolityczne stosowane w technologii mleczarstwa. Enzymy lipolityczne charakteryzują się wysoką aktywnością i zróżnicowaną specyficznością substratową, wobec długości łańcuchów kwasów tłuszczowych oraz ich pozycji w cząsteczce triacyloglicerolu (Kilcawley i wsp. 2002). Preparaty z *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Penicillium roqueforti* charakteryzują się wyższą aktywnością esterolityczną, natomiast enzymy pochodzące z *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizomucor miehei* i *P. camemberti* wykazują wyższą aktywność lipolityczną.



Największe znaczenie technologiczne mają preparaty enzymatyczne o dobrze opisanych właściwościach i znanej specyficzności, dzięki czemu możliwe jest otrzymywanie przy ich udziale produktów o konkretnych cechach organoleptycznych. Preparaty lipolityczne z *A. niger*, *R. arrhizus*, *R. delemar*, *R. miehei* oraz *P. fragi* są aktywne wobec kwasów tłuszczowych zlokalizowanych w pozycjach skrajnych cząsteczki triglicerydu, natomiast enzymy z *Geotrichum candidum*, *Penicillium cyclopium* oraz *Chtomobacterium viscosum* nie wykazują specyficzności wobec miejsca przyłączenia kwasów tłuszczowych (McSweeney i Sousa 2000). Jednak są bardziej swoiste wobec rodzaju kwasu tłuszczowego, jak np. lipaza z *G. cadidum* preferencyjnie odłączająca kwasy tłuszczowe z pozycji cis podwójnego wiązania w łańcuchu węglowodorowym kwasu tłuszczowego.

Tabela 1. Przykładowe preparaty lipolityczne/esterazowe wykorzystywane w technologii mleczarstwa (Kilcawley i wsp.2002).

Firma	Nazwa handlowa	Źródło	Nr IUB	Enzym	Zastosowanie	Optimum	
						pH	temp
Amano	Lipase A6	<i>A. niger</i>	EC 3.1.1.3	hydrolaza triacyloglicerolu	żywność	6,5	45
Stern	Sternzyme LP6063	<i>R. arrhizus</i>	EC 3.1.1.3	hydrolaza triacyloglicerolu	żywność	7,0	37-50
Amano	Lipase F-AP15	<i>R. oryzae</i>	EC 3.1.1.3	hydrolaza triacyloglicerolu	żywność	7,0	35-45
Amano	Lipase M 10	<i>M. javanicus</i>	EC 3.1.1.3	hydrolaza triacyloglicerolu	żywność	7,0	40
Novo	Palatase 2000	<i>R. miehei</i>	EC 3.1.1.3	hydrolaza triacyloglicerolu	produkcja serów i EMS	7,5	40
Amano	Lipase AY30	<i>C. rugosa</i>	EC 3.1.1.3	hydrolaza triacyloglicerolu	produkcja EMS, żywność	7,0	45
Amano	Lipase G 50	<i>P. cememberti</i>	EC 3.1.1.23	hydrolaza acyloglicerolu	przetwórstwo oleju i tłuszczu	5,0	45
Amano	Lipase R	<i>p. roqueforti</i>	EC 3.1.1.3	hydrolaza tracyloglicerolu	produkcja EMS i żywność	7,0	30
Biocatalysts	Lipomod 338P	<i>P. roqueforti</i>	EC 3.1.13	hydrolaza tracyloglicerolu	produkcja EMS Blue	5,0-7,0	40-50
Biocatalysts	Lipomod 187	grzyby	EC 3.1.1.3	hydrolaza tracyloglicerolu	produkcja EMS Cheddar	5,0-7,0	40-50
Ch Hansen	Lipaza cielęca	cielęca esteraza pregastryczna	EC 3.1.1.3	hydrolaza tracyloglicerolu	produkcja serów	-	-
Gist-Brocades	Piccantase C	cielęta	EC 3.1.1.3	hydrolaza triacylogliceroli	produkcja sera	6.0-6,5	27-38
Gist-Brocades	Piccantase K	koźłeta	EC 3.1.1.3	hydrolaza triacylogliceroli	produkcja sera	6.0-6,5	27-38
Gist-Brocades	Piccantase L	jagnięta	EC 3.1.1.3	hydrolaza triacylogliceroli	produkcja sera	6.0-6,5	27-38
Chr Hansen	Lamb lipase	Pregastryczna esteraza jagnięca	EC 3.1.1.3	hydrolaza triacyloglicerolu	produkcja sera	-	-
Biocatalysts	Lipomod224	Lipaza trzuskowa s proteinazą	EC 3.1.13 EC 3.4.21.4	hydrolaza triacyloglicerolu trypsyna	produkcja EMS Cheddar	7,0-8,0	45-50
Biocatalysts	Lipomod 299	Lipaza trzuskowa s proteinazą	EC 3.1.13 EC 3.4.21.4	hydrolaza triacyloglicerolu trypsyna	produkcja EMS Cheddar	7,0-8,0	45-50

Uwolnione w reakcji lipolizy kwasy tłuszczowe, zwłaszcza krótko- i średniołańcuchowe są odpowiedzialne za charakterystyczne walory organoleptyczne serów. Kwasy tłuszczowe są też prekursorami innych związków warunkujących smak i zapach typowy dla danego sera. W kaskadzie reakcji katabolicznych wolne kwasy tłuszczowe przekształcane są do metyloketonów (alkan-2-on), laktonów, estrów, alkanów i drugorzędowych alkoholi. Znaczące stężenie ketonów odnotowano w serach z przerostem błękitnej pleśni (tzw. blue cheese). Ich produkcję przypisuje się lipazom z *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti* i *Geotrichum candidum*. Estry i tioestry są również powszechnie występującymi składnikami związków zapachowych w serach. Powstają w reakcji estryfikacji wolnych kwasów tłuszczowych (krótko- i średniołańcuchowych) z alkoholami, pochodzącymi z procesu fermentacji laktozy lub katabolizmu aminokwasów. Estry etylowe pochodzą z reakcji estryfikacji etanolu z kwasami tłuszczowymi, cechują się dużą różnorodnością i intensywnością zapachów. Niektóre z nich mogą jednak nadawać nietypowy posmak serom np. owocowy. Tioestry powstają w serach w reakcjach wolnych kwasów tłuszczowych z grupami sulfhydrylowymi. Szczególnie bogate są w nie sery typu Cheddar, w których wszystkie aktywności przejawiają enzymy z bakterii *Micrococcaceae*, czy z komercyjnych kultur starterowych: *Lactococcus lactis* i *Leuconostoc* spp. Tioestry mogą być również otrzymywane przy użyciu immobilizowanej lipazy z *Rhizomucor miehei* (Cavaille-Lefebvre i Combez 1997; Cavaille-Lefebvre i wsp. 1998).

Drugorzędowe alkohole mogą powstawać w reakcji redukcji ketonów. *Penicillium* spp. jest odpowiedzialna za powstawanie 2-pentanolu, 2-heptanolu i 2-nonanolu w serach z przerostem błękitnej pleśni, z kolei w serze typu Cheddar powstaje 2-propanol z acetonu i 2-butanol z butanonu. Laktony są cyklicznymi związkami powstającymi w wyniku wewnątrzcząsteczkowej estryfikacji hydroksykwasów (Guerzoni i wsp. 2001). Mogą się one tworzyć w produktach mlecznych i kształtować ich cechy sensoryczne. W wielu typach serów wykrywane są γ - i δ -laktony natomiast rzadziej się stwierdza obecność α - i β - laktonów, które są zbyt reaktywne i mniej stabilne w serze (Mallia i wsp. 2008). Kolejną grupą związków nadających smak i zapach serom są głównie aldehydy, które generalnie powstają z przemian aminokwasowych pod wpływem działania enzymatycznych systemów bakteryjnych (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* syntetyzują aldolazę treoninową katalizującą konwersję treoniny i glicyny o acetaldehydu), jednak niektóre liniowe aldehydy (butanal, heptanal, nonanal) mogą powstawać w skutek β -oksydacji kwasów tłuszczowych. Wysoki ich poziom wykryto w Parmezanie i serze typu szwajcarskiego Gruyère (Guerzoni i wsp. 2001).

Kultury starterowe oraz drugorzędowa mikroflora starterowa jak *P. roqueforti* i *P. camembertii* w serach odpowiednio z przerostem i porostem pleśni produkują lipazy odpowiedzialne za charakterystyczne walory wymienionych serów (McSweeney i Sousa 2000, Kilcawley i wsp. 2002, McSweeney 2004).

Dodatek preparatów lipolitycznych lub mieszaniny proteaz, peptydaz i lipaz wykorzystywany jest w serowarstwie w celu przyspieszenia dojrzewania sera, a także w produkcji enzymatycznie modyfikowanych serów (EMS). W technologii tej surowcem jest skrzep parakazeinowy, lub młode ser, który poddaje się homogenizacji z emulgatorami do otrzymania konsystencji pasty tzw. „slurry” (do 40-45% suchej masy) a następnie pasteryzacji. Do tak przygotowanego surowca dodaje się preparaty enzymatyczne i inkubuje w temperaturze zależnej od właściwości enzymu i produktu jaki ma być uzyskany. Za duży dodatek enzymów może prowadzić do zbyt gwałtownej degradacji białek i tłuszczu i rozwoju niepożądanych cech sensorycznych (McSweeney i Sousa 2000). Zastosowanie technologii liposomowych do przyspieszania dojrzewania sera może zredukować goryczkę i spadki wydajności (Aravindan i wsp. 2007).

Hydrolizaty tłuszczu mlecznego (LMF), znalazły zastosowanie jako składniki aromatyczne w produkcji szerokiej gamy produktów m. in.: polew i syropów czekoladowych, aromatów maślanych w margarynach, sztucznych kremach, przyprawach, aromatyzowanej śmietance do kawy i w serowych dodatkach smakowo-zapachowych. Charakterystyczne aromaty: kremowy, maślany i serowy pochodzą od produktów lipolizy tłuszczu mlecznego: krótkołańcuchowych i średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz ich pochodnych.



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU



SZKOŁA GŁÓWNA
GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO



UNIWERSYTET
ROLNICZY
W KRAKOWIE



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
W POZNAMIU



Surowcem do produkcji LMF jest skondensowane mleko lub emulsja oleju maślanego, do którego dodawane są lipazy. Reakcję prowadzi się do momentu uzyskania wymaganego aromatu, lub osiągnięcia ustalonego z góry poziomu kwasowości – który odpowiada zwolnieniu określonej ilości kwasów tłuszczowych. Następnie produkt podlega pasteryzacji i suszeniu. Dobór preparatów enzymatycznych w tym procesie zależy od planowanej aplikacji LMF. Zasadniczo hydrolizaty tłuszczu mlecznego produkuje się z użyciem preparatów trzustkowej lipazy oraz cielęcej lub koźłej esterazy pregastrycznej oraz lipaz pochodzenia mikrobiologicznego (zwłaszcza z grzybów: *A.niger*, *Geotrichum candidum* i *P. roqueforti* oraz bakterii: *Achromobacter lipolyticum* i *Pseudomonas*) (Wiley, 2009).

Literatura

1. Aravindan R., Anbumath P., Viruthagiri T. (2007) Lipase applications in food industry. IJBT.; 6:141-158
2. Cavaille-Lefebvre D., Combes D., (1997) Lipase synthesis of short-chain flavour thioesters in solvent-free medium. Biocat. Biotrans., 15: 265–279.
3. Cavaille-Lefebvre D., Combes D., Rehbock B., Berger R.G., (1998) A chromatographic and mass-spectrometric approach for the analysis of lipase produced thioester derivatives. Appl.Microbiol. Biotechnol.; 49:136–140.
4. Fox P. F., (1993) Exogenous enzymes in dairy technology – A review. J. Food Biochem.; 17(3): 173–199.
5. Guerzoni M.E., Lanciotti R., Vannini L., Galgeno F., Favati F., Gardini F., Suzzi G., (2001). Variability of lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. Internat. J. of Food Microbiol.; 69: 79-89.
6. Hasan F., Shah A.A., Hameed A., (2006). Industrial applications of microbial lipases. Enz. Microb.Tech.; 39(2): 235-251.
7. Houde A., Kademi A., Leblanc D., (2004) Lipases and their industrial applications. Appl. Biochem. Biotech.; 118(1-3) 155-170
8. Kilcawley K.N., Wilkinson M.G., Fox P.F., (2002) Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. Enzym. Microb.Tech.; 31: 310–320
9. Mallia S., Escher F., Schlichtherle-Cerny H.,(2008) Aroma-active compounds od butter: a review. Eur. Food Res. Technol.; 226:315-325
10. McSweeney P.L.H., (2004) Biochemistry of cheese ripening. Int.J. of Dairy Technol.; 57:127–144,
11. McSweeney P.L.H., Sousa M.J., (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. Dairy Sci. Tech.; 80: 293-324
12. Wiley J. (2009) Enzymes in Food Technology. John Wiley and Sons Ltd. United Kingdom.



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU



SZKOŁA GŁÓWNA
GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO



UNIWERSYTET
ROLNICZY
W KRAKOWIE



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
W POZNANIU

