

Vitana Food Ingredients

Bílkovinné hydrolyzáty (HVP) – kvalita a bezpečnost

Jan Pánek *, Trond Gisle Raa**, Lenka Kouřimská***, Radomír Molín **, Tomáš Potůček**

*Department of Food Chemistry and Analysis, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic

** Rieber Food Ingredients, Norway

***Department of Agricultural Products Quality, Czech University of Agriculture, Prague, Czech Republic

Úvod

Od poloviny 20. století prakticky po celém světě výrazně roste spotřeba různých potravinových přísad. Účelem jejich použití je vždy zvýšení sensorické, nutriční nebo užitné (funkční) jakosti potravin rostlinného nebo živočišného původu a pokrmů z nich připravených. Velmi významné místo mezi používanými přísadami zaujímají kořenící přípravky, jejichž základem jsou hydrolyzáty rostlinných bílkovin (HVP – Hydrolysed Vegetable Proteins). V potravinářském průmyslu se používají zejména pro zlepšení chuti a aroma polévek, omáček, salátů, masových a zeleninových pokrmů a hotových pokrmů.

Snad veškeré potraviny a potravinářské suroviny, které slouží k výživě člověka, obsahují některé látky představující určité zdravotní riziko. Stejně tak, veškeré procesy zpracování potravin a surovin mohou vést ke vzniku látek, které jsou ze zdravotního hlediska nepřijatelné. Úkolem potravinářského průmyslu je potom vývoj technologií, které by tato zdravotní rizika minimalizovaly.

V případě HVP představují určité zdravotní riziko již samotné suroviny, které obsahují podíl allergenních bílkovin. Je ale třeba poznamenat, že tyto proteiny člověk v daleko větší míře konzumuje v jiných typech potravin, zejména v chlebu, houskách a dalších pekařských výrobcích. Alergie na pšeničné a sojové proteiny jsou ale vzácné, častější je výskyt celiakie (nesnášenlivosti k pšeničnému lepku). Porovnání spotřeby HVP, pekařských výrobků a dalších sojových výrobků ukazuje na pouze okrajový negativní význam surovin používaných pro přípravu HVP. Přítomnost allergenů v samotném hydrolyzátu je pak prakticky vyloučena, jak bude zmíněno v dále.

Technologie kyselé hydrolyzy může vést ke vzniku toxických tzv. chlorhydrinů glycerolu (MCPD a DCP). Mechanismus jejich vzniku, výskyt a hygienicko-toxikologické aspekty jsou diskutovány dále.

Suroviny pro výrobu kyselých hydrolyzátů

Pro výrobu kyselých hydrolyzátů bílkovin se používají tyto suroviny: odtučněný sójový šrot, pšeničný lepek a kukuřičná mouka. Všechny suroviny obsahují minimálně 50 % bílkovinného podílu, dále balastní látky (celulosa atd.), menší množství využitelných sacharidů (hlavně škrobu) a zbytkový tuk. Bílkovinný podíl pšeničného lepku a sójového šrotu obsahuje proteinové frakce, které mohou vyvolávat alergické reakce a v případě frakcí lepku i celiakii.

Charakteristika nejvýznamnějších allergenů sóji a pšenice

Sójové alergeny

- Beta-conglycinin: glykoprotein o molekulové hmotnosti 180 kDa; tvoří jej 3 podjednotky – α -, α' -, β -; největší alergenní efekt má α -podjednotka označovaná také (Gly m Bd 60K)
- Glycinin: patří do skupiny leguminů – složené proteiny o molekulové hmotnosti až 360 kDa; II S proteinová frakce; tvoří 35 – 40 % sójových proteinů
- Papainové proteasy: (P34/Gly m Bd 30 K) je zřejmě nejvýznamnější alergen sóji vyvolávající většinou atopické ekzémy; může ale být příčinou i dalších typů alergických reakcí; je součástí proteinů vakuol
- R-10 Bet v 1 alergeny: v sóji je alergen (SAM22/Gly m 4), který je odpovědný za alergie v horní části dýchacího systému, projevující se otoky jazyka a hrtanu (tzv. oral allergy)

- syndrome – OAS)
- Inhibitory proteas Kunitzova typu: patří sem proteiny o nízké molekulové hmotnosti do 21 kDa s dvěma disulfidovými můstky; jsou obsaženy hlavně v sóji, ale i v dalších luštěninách; mohou vyvolávat anafylaktické reakce

Alergeny pšenice

- PR-9 peroxidasy: peroxidasy obsahující hemově vázané železo; významný alergen pšenice je (Tri a Bd 36 K), glykoprotein o molekulové hmotnosti 36 kDa; hydrolyzou se poměrně snadno rozkládá
- Obilné prolaminy: alergeny obilovin, např. pšenice; typická sekvence aminokyselin Gln-Gln-Gln-Pro-Pro; jsou poměrně termostabilní a odolné vůči enzymové proteolýze; amidy aminokyselin jsou velmi snadno kyselé hydrolyzovatelné
- Omega-5-gliadin: významný alergen pšenice; vyvolává respirační anafylaktické reakce, označované jako „pekařské astma“ (baker's asthma)
- Polysacharidy: v rozpustné frakci pšeničné mouky se vyskytuje polysacharid mannoglucan (složený z glukosy a mannosy v molárním poměru 4,4:1) o molekulové hmotnosti okolo 50kDa, který způsobuje dlouhotrvající alergické reakce
- Poměrně často se v Evropě vyskytuje nesnášenlivost (intolerance) lepku tzv. celiakie (celiac disease) (latinsky *coeliac sprue*). U disponovaných osob dochází k reakci antigen – protilátka na gliadinovou a glutelinovou (prolaminovou) frakci pšeničných bílkovin (tzv. lepku) nebo glutelinovou frakci bílkovin ječmene, žita a ovsa. Celiakii způsobují dvě sekvence aminokyselin v těchto proteinech: Pro-Ser-Gln-Gln a Gln-Gln-Gln-Pro.

Technologie

Hydrolyza se provádí poměrně koncentrovaným roztokem kyseliny chlorovodíkové (asi 20 % roztok), za vysoké teploty (100 – 120 °C) a obvykle za mírně zvýšeného tlaku. Doba hydrolyzy závisí na druhu použité suroviny, teplotě a tlaku a pohybuje se většinou od 6 do 20 hodin. Hydrolyzát je následně neutralizován hydroxidem sodným a/nebo uhličitánem sodným na pH přibližně 5,5.

Hydrolyzát obsahuje vedle vody a chloridu sodného (vznikajícího při neutralizaci kyseliny chlorovodíkové) volné aminokyseliny, které jsou hlavními produkty hydrolyzy, ve vodě rozpustná hnědá barviva a aromatické látky. Barevné a aromatické sloučeniny (těkavé i netěkavé) jsou produkty vedlejších reakcí neenzymového hnědnutí (zejména Maillardových reakcí). Obsah volných aminokyselin odpovídá obvykle 75 – 90 % obsahu původní bílkoviny.

Technologickým odpadem je směs ve vodě nerozpustných látek označovaná jako huminy. Huminy obsahují nehydrolyzovatelný podíl původních surovin (hlavně celulosu, případně lignin a další látky), barevné, ve vodě nerozpustné melanoidiny (vznikající opět jako produkt reakcí neenzymového hnědnutí), chlorid sodný a případně i nezreagované bílkoviny, které se vysrážely při neutralizaci. Odpadní huminy mohou být následně dále zpracovány a použity jako hnojivo nebo krmivo.

Reakce složek surovin při výrobě kyselých hydrolyzátů

Vliv pH na fyzikální vlastnosti bílkovin

V surovinách pro výrobu hydrolyzátů jsou původní proteiny a případně přítomné peptidy a volné aminokyseliny v neionizované formě. V této formě jsou velmi špatně rozpustné ve vodě. V kyselém prostředí se ionizuje volná amino-skupina N-koncové aminokyseliny a bílkoviny, peptidy a aminokyseliny přecházejí do formy hydrochloridů, které jsou ve vodě dobře rozpustné a velmi snadno podléhají dalším reakcím.

Tato reakce je vratná (reversibilní) a nevede ke ztrátě aktivity bílkovinné molekuly. Po ukončení hydrolyzy se hydrolyzát neutralizuje na pH, které je blízké izoelektrickému bodu bílkoviny. Za

těchto podmínek přechází bílkovina zpět do neionizované formy a má velmi omezenou rozpustnost. Malé množství bílkovin, které by případně zůstaly nehydrolyzovány, se při neutralizaci vysráží a přechází do odpadních huminů.

Denaturace proteinů

Jako denaturace bílkovin se označuje soubor fyzikálních reakcí vedoucích ke změně konformace bílkovinné molekuly a (v případě aktivních bílkovin) ke ztrátě jejich aktivity.

Při výrobě kyselých hydrolyzátů dochází k denaturaci prostřednictvím vysoké teploty, vyššího tlaku a velmi nízkého pH v reakční směsi. Spojení všech tří zmíněných fyzikálních jevů způsobuje rozsáhlou denaturaci přítomných bílkovin již v začátku hydrolýzy.

Samotná denaturace by ale k odstranění alergenů z výrobku zřejmě nestačila. Některé bílkovinné struktury s alergenní aktivitou jsou poměrně termostabilní a po určité době by mohly denuraci odolávat. Kromě toho, alergenní aktivitu vykazují i některé polysacharidy, kterých se denaturace samozřejmě netýká.

Štěpení peptidových vazeb a další hydrolytické reakce

Při výrobě hydrolyzátů dochází vlivem poměrně koncentrované kyseliny chlorovodíkové, vysoké teploty a případně i vyššího tlaku k velmi masivní, rychlé a účinné hydrolýze bílkovin a peptidů, hydrolyzovatelných polysacharidů a tuků.

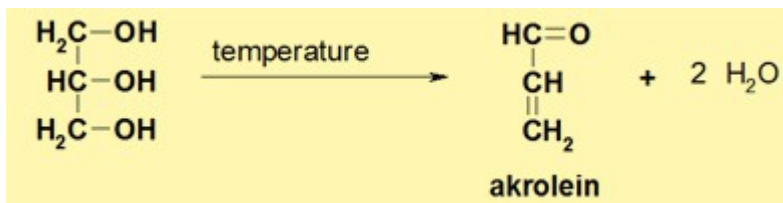
U bílkovin a peptidů dochází k hydrolýze na peptidové vazbě za vzniku kratších peptidů a následně aminokyselin. Vzhledem k přebytku kyseliny chlorovodíkové v reakční směsi a vysoké teplotě ztrácejí na významu rozdíly ve stabilitě různých peptidových vazeb. Rozdíly v rychlosti hydrolýzy jednotlivých bílkovin jsou tak dány pouze mechanickými zábranami dokonalého styku bílkovinné suroviny s kyselinou vznikajícími při nedokonalém promíchávání reakční směsi. Časový interval hydrolýzy je ale velmi dlouhý, což dává naprostou jistotu toho, že každá bílkovinná molekula bude buď zcela hydrolyzována až na příslušné aminokyseliny nebo alespoň parciálně hydrolyzována na směs peptidů a aminokyselin. Z tohoto důvodu je prakticky vyloučena možnost přetrvání i minimálního množství alergenních bílkovin v produktu.

U polysacharidů dochází k hydrolýze glykosidické vazby za vzniku jednodušších oligosacharidů a monosacharidů. Polysacharidy, které je člověk schopen trávit a využít, včetně sacharidů vykazujících alergenní aktivitu mají snadno hydrolyzovatelné glykosidové vazby. Masivní hydrolýza při výrobním procesu dává opět prakticky jistotu nepřítomnosti alergenních sacharidů v produktu. Obtížně hydrolyzovatelné sacharidy typu celulosy alergenní aktivitu nevykazují.

Během hydrolýzy sacharidů dochází k tvorbě řady reaktivních sloučenin, které se potom následně velmi snadno zapojují do reakcí neenzymového hnědnutí.

V průběhu výrobního procesu dochází i k poměrně rychlé hydrolýze přítomných tuků až na glycerol a mastné kyseliny. Většina vznikajícího glycerolu se po dehydrataci na akrolein zapojuje do reakcí neenzymového hnědnutí. U části glycerolu může dojít k substituci hydroxy-skupiny chlorem za vzniku toxických tzv. chlorhydrinů glycerolu (hlavně MCPD – monochlorpropandiol a DCP - dichlorpropanol). Limitní hladina MCPD v komerčních hydrolyzátech je dána legislativně, v současné době se za limitní považuje hladina 20 mikrogramů / kg produktu. Obsah MCPD v hydrolyzátech při správně vedené technologii se zařazením dekontaminace bývá obvykle hluboko pod hygienickým limitem. Tato problematika bude ještě diskutována samostatně.

- Glycerol dehydration



Část mastných kyselin při hydrolýze oxiduje, převážně za vzniku aldehydů, které se rovněž velmi snadno zapojují do reakcí neenzymového hnědnutí.

Reakce neenzymového hnědnutí

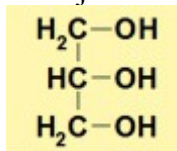
U tohoto procesu dochází primárně k reakci amino-skupiny s karbonylovou skupinou za vzniku tzv. Schiffových bází, které následně dále reagují za vzniku řady barevných a aromatických produktů.

Při výrobě bílkovinných hydrolyzátů dochází k reakci amino-skupiny volných aminokyselin nebo N-koncové aminokyseliny peptidů a bílkovin s volnou aldehydovou skupinou sacharidů přítomných ve výchozí surovině. Tento jeden typ z řady reakcí neenzymového hnědnutí se nazývá reakcemi Maillardovými. Podobným způsobem může s volnou aminoskupinou reagovat i aldehydová skupina oxidačních produktů tuků nebo mastných kyselin.

Aktivační energie těchto reakcí pro protein a polysacharid je velmi vysoká. Přesto, za podmínek výroby bílkovinných hydrolyzátů je schopen i protein a polysacharid (zejména díky vysoké teplotě) se do sledu Maillardových reakcí zapojit. Proto protein nebo polysacharid s alergenní aktivitou touto chemickou reakcí svoji aktivitu ztrácí.

Chlorované deriváty propanolu

V kyselých hydrolyzátech, ale i v dalších potravinách, vznikají chlorované deriváty substitucí jedné nebo dvou hydroxy- skupin glycerolu chlorem. Zdrojem chloru je u HVP kyselina chlorovodíková, v případě dalších potravin běžně přítomné chloridy. Nejčastěji se vyskytuje volný (R,S)-3-chlor-propan-1,2-diol (3-MCPD), vznik dalších derivátů (2-chlor-propan-1,3-diol; 1,3-dichlor-propan-2-ol; 2,3-dichlor-propan-1-ol; 3-chlor-propan-1-ol) je velmi potlačen a vyskytují se v množstvích, která jsou na hranici jejich detekce.



(S)-(+)-3-chlor-propan-1,2-diol

Legislativní limit pro obsah 3-MCPD v hydrolyzátech je 20 µg/kg (ppb). Pro většinu dalších potravin stanoven není. Obsah v běžných potravinách se ale většinou okolo této hodnoty pohybuje. Vyšší obsah lze najít např. ve fermentovaných salámech (až k 50 ppb) nebo tavených sýrech (do 30 ppb). Velmi vysoký obsah byl zjištěn v parmazánu (82 ppb).

K extrémním nárůstům obsahu 3-MCPD dochází u chleba při toastování nebo grilování (až 300 ppb).

Rámcové složení sušeného hydrolyzátu Rieber & Son, ASA

Sušina	min. 95 %
Obsah aminokyselin (Nx6,25)	26 ± 4 %
Tuk	2 ± 1 %
Obsah NaCl	50 ± 4 %
Obsah glutamové kyseliny (přirozené)	7 ± 1 %
pH (10 % roztok)	< 10 µg/kg (ppb)
3-MCPD	

Závěr

Výroba bílkovinných hydrolyzátů je procesem, při kterém se výchozí suroviny obsahující zejména bílkoviny a menší podíl sacharidů hydrolyzují poměrně koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou za vysoké teploty a případně i zvýšeného tlaku poměrně dlouhou dobu. Při tomto procesu dochází k prakticky totální destrukci veškerých bílkovin a sacharidů za vzniku volných aminokyselin a produktů reakcí neenzymového hnědnutí. Neutralizace hydrolyzátu po ukončení hydrolýzy vede navíc k vysrážení dalších, případně nehydrolyzovaných bílkovin. Důsledkem tohoto procesu je prakticky úplná absence původních bílkovin a polysacharidů v konečném produktu. Stejně tak jsou zcela inaktivovány veškeré bílkoviny a sacharidy s aktivitou alergenu, které jsou přítomny v původní surovině.

Kyselé bílkovinné hydrolyzáty je tedy z hlediska výskytu alergických reakcí organismu možno považovat za potravinu zcela bezpečnou.

Obsah 3-MCPD je při správně vedené technologii se zařazením dekontaminačního kroku pod hygienickým limitem a je srovnatelný nebo většinou nižší než obsah v potravinách běžné spotřeby.

Hyrolyzát rostlinných bílkovin je tedy možno považovat z hlediska potravinové bezpečnosti za zcela vyhovující.

[1] Correspondence: Prof. Dr. Jan Pánek; e-mail: jan.panek@vscht.cz