



Notat
State of the Art – Mørningsenzymmer
Louise Hededal Hofer

3. marts 2016
Projekt nr. 2004287-16
Init. LHHR/MT

Introduktion

Mørhed er en vigtig faktor for spisekvaliteten af kødprodukter. Variationen mellem forskellige muskler i samme dyr medfører en stor variation i mørhed og herved også økonomisk diversitet mellem udkæringer fra samme dyr.

LTLT (lav temperatur i lang tid) har længe været kendt som en metode til at mørne kødudskæringer. Ved LTLT holdes kødet længe ved en temperatur omkring 50-65°C, hvorved de naturlige enzymer i kødet får tid til at mørne kødet. Den naturlige enzymatiske nedbrydning af myofibrillære proteiner sker fra ca. 40-80°C, men fra 60-80°C sker en væsentlig forringelse af vandbindeevnen. Nedbrydelsen af kollagen i bindevæv sker tidligst fra 55°C. Warner-Bratzler shear force siges normalt at falde fra 50-65°C og stiger så igen fra 65-80°C. [Baldwin, (2012)].

Bindevæv er den primære årsag til sejt kød [Suriaatmaja, (2013)].

I den seneste årrække er tilsætning af proteolytiske enzymer (proteaser) blevet undersøgt i relation til mørning af kød. Tilsætningen af proteolytiske enzymer bidrager til den naturlige enzymatiske nedbrydning, der sker i en muskel efter slagtning.

Proteolytiske enzymer udvundet fra planter eller mikroorganismer er blevet fundet relevante at undersøge i forhold til mørning af kød, idet de minder om de naturligt forekommende enzymer i kød.

Godkendte enzymer

I USA er 5 enzymer blevet kategoriseret som "Generally Recognized as Safe" (GRAS) af United States Department of Agriculture (USDA) food safety inspection service (FSIS). De godkendte enzymer er papain (fra papaya), bromelain (fra ananas), ficin (fra figer), protease fra *Aspergillus oryzae* og *Aspergillus niger*, protease fra *Bacillus subtilis* og *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* [Tarté, (2009)].

I Danmark skal enzymer godkendes ved en risikovurdering samt ansøgning til Fødevarestyrelsen. Ved godkendelse af et enzym gælder godkendelsen kun for den virksomhed, der har søgt, og til de produk-

ter og i de mængder, der er ansøgt om. (<http://www.foedevarestyrelsen.dk/Selvbetjening/Guides/Sider/Saadan-faar-du-godkendt-et-enzym.aspx>)

*Ikke-godkendte
enzymer*

Foruden de i USA godkendte enzymer har actinidin, som udvindes fra kiwi, ingefærs rhizome protease, *Zingipain*, og Protease fra *Sodomonas* æbler også vist en mørningseffekt på kød (Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procera* latex).

Papain

Virkning

Papain er en cystein protease, som findes i papaya. Den er blevet fundet til at have en mørningseffekt [Calkins & Sullivan, (2007); Tarté, (2009)]. Papain virker ved, at den nedbryder både de myofibrillære proteiner samt kollagen. Nedbrydningen af proteiner startes ved en deprotonering af en thiolgruppe og resulterer gennem en række trin i dannelsen af en carboxylsyre.

Papain er mest aktiv ved temperaturer omkring 65°C [Tarté, (2009)]. Der er dog målt mørningseffekt på køl [Calkins & Sullivan, (2007)]. Denaturering sker ved temperaturer omkring 80-90°C [Tarté, (2009)]. Papain er blevet sat i relation til smagsændringer af kødet, idet den øger smagen af lever og mindsker kødsmag og saftighed [Tørngren, (2010)].

Papain, såvel som andre enzymer, bør injiceres i kødet, da de ellers har svært ved at trænge ind. Mange har også tumbled kødet efter injektionen for at opnå så jævn en fordeling som muligt [Calkins & Sullivan, (2007); Suriaatmaja, (2013)].

Styring

Papain har flere gange resulteret i overmørning af kødet [Calkins & Sullivan, (2007)]. Enzymet virker i et bredt temperaturinterval fra 5-90°C [Ashie et al., (2002); Tarté, (2009); Calkins & Sullivan, (2007)]. Der er dog rapporteret om denaturering allerede ved 70°C [Ionescu et al., (2008)].

Leverandør

Enzyme Development Corporation, USA.

Bromelain

Virkning

Bromelain er en cystein protease, hvis mørningseffekt har været studeret længe. Bromelain nedbryder i højere grad kollagen end myosin. Den viser lav, men dog signifikant aktivitet ved 0°C. Der er målt aktivitet op til 80°C [Calkins & Sullivan, (2007)].

Bromelain kan resultere i ujævn overmørning og dårlig farve af kødet [Suriaatmaja, (2013)].

Styring Bromelain virker i et bredt temperaturinterval. Ved temperaturstyring vil det kræve en opvarmning af kødet til en kernetemperatur på 80°C.

Leverandør Enzyme Development Corporation, USA.
Dupont, Danmark

Ficin

Virkning Ficin er et enzym udvundet fra figner. Sammenlignet med papain og bromelain er det mindre aktivt mod både myosin og kollagen. Aktiviteten for nedbrydningen er dog lav ved temperaturer under 40°C. Elastin nedbrydes ned til temperaturer på 20°C [Calkins & Sullivan, (2007)].

Styring Ficin er aktivt i et temperaturinterval fra 45-70°C. Det relativt snævre temperaturinterval muliggør styring ved enten opvarmning eller nedkøling.

Leverandør Enzyme Development Corporation, USA. (Udgået fra sortiment)

Actinidin

Virkning Der er delte meninger om actinidins virkning. Tarté, (2009), skriver, at enzymet hovedsageligt nedbryder kollagen, mens Ha et al., (2012), rapporterer om nedbrydning af de myofibrillære proteiner. Christensen et al., (2009), rapporterede både om nedbrydning af myofibrillære proteiner og øget kollagenopløselighed.

Styring Actinidin har en denatureringstemperatur omkring 60°C og et temperaturoptimum ved 58-62°C [Tarté, (2009)]. Enzymaktiviteten stiger jævnt fra 30°C indtil 60-65°C, hvorefter aktiviteten falder drastisk [Lee et al., (2010)].
Enzymet har en mørningseffekt ved 2°C [Christensen et al., (2009)]. Den lave denatureringstemperatur giver en teoretisk mulighed for at styre enzymet ved at denature det i slutningen af varmebehandlingen.

Leverandør Kiwienzymes.com, New Zealand.

Zingipain

Virkning Zingipain er en protease udvundet fra ingefær. Enzymet er hovedsageligt kollagenaktivt [Tarté, (2009)]. Enzymet nedbryder kødets tekstur pga. bred substratspecifikation, hvilket er uønsket [Kim et al., (2011)]. Enzymet afgiver smag til kødet [Tarté, (2009), Kim et al., (2011)].

Styring Enzymet denatureres ved 70°C og har et optimum på 60°C [Tarté, (2009)]. Enzymet er ikke så undersøgt som andre mørningsenzymer, og det er derfor ukendt, hvorvidt der forekommer aktivitet ved lave temperaturer.

Den relativt lave denatureringstemperatur giver mulighed for denaturering af enzymet ved slutningen af varmebehandling.

Leverandør

Ukendt.

Virkning

Aspergillus oryzae protease

Der er delte meninger omkring aktiviteten af protease fra *Aspergillus oryzae*. Tarté, (2009), nævner god proteolytisk aktivitet mod kollagen og elastin, mens Calkins & Sullivan, (2007), hovedsageligt rapporterer om nedbrydning af myofibrillære proteiner og kun lidt, hvis nogen, nedbrydning af kollagen. Denne forskel kan skyldes, at der findes proteaser med forskellige mekanismer, alle produceret fra *Aspergillus oryzae*. Gerelt et al., (2000), rapporterede, at aspartic protease fra *Aspergillus oryzae* har en lavere, men mere specifik nedgradering af myofibrillært og intramuskulært bindevæv.

Styring

Ashie et al., (2002), rapporterede, at enzymets aktivitet hovedsageligt sker under opvarmning, idet de fandt, at lagringsperioden før varmebehandling ikke har betydning for mørningsgraden. Enzymet er self-limiting, og det er derfor muligt at undgå overmørning [Ashie et al., (2002)]. Enzymet nedbrydes ved 60-70°C og har et optimum på 55-60°C [Calkins & Sullivan, (2007); Tarté, (2009)]. Den relativt lave denatureringstemperatur giver mulighed for denaturering af enzymet ved slutningen af varmebehandling. Enzymets begrænsede virkning medvirker også til mulighed for styring af enzymets aktivitet.

Leverandør

Enzyme Development Corporation, USA.

Virkning

Basillus subtilis protease

Protease fra *Basillus subtilis* er et alternativ til enzymet ficin [Calkins & Sullivan, (2007)]. Der findes forskellige slags, subtilisin og neutral protease, neutral proteasen bliver omtalt som et billigere alternativ til Ficin. Aktiviteten af enzymet er meget afhængigt af, hvilken organisme det er produceret fra.

Neutral proteaseaktivitet stiger hurtigt indtil 50°C og falder drastisk ved 65°C.

Styring

Det relativt snævre aktive temperaturinterval gør det teoretisk muligt at styre enzymet ved temperaturændringer. Inaktivering kan opnås ved ca. 65°C.

Leverandør

Enzyme Development Corporation, USA.

Enzym	EC nr.	Klasse	Kilde	Mol vægt [kDa]	Temperatur [°C]			pH	Kommentarer	Godkendt	Kilde
					Optimum	Denaturering	Minimum				
Papain	3.4.22.2	Cysteine Protease	Papaya	23,4	65	70-90	5	5-7	Mest aktiv på myofibrillær proteiner. Meget aggressiv	Ja i USA	[1],[2],[3],[4]
Bromelain	3.4.22.32	Cysteine Protease	Ananas stilk/frugt	20-33,2	50-75	70-80	0	5-9	Mest aktiv på kollagen proteiner. Mere aktiv på kollagen end papain.	Ja i USA	[1],[2],[3]
Ficin	3.4.22.3	Cysteine Protease	Figner	25-26	65	70	40	5-7	Mildere og mere kontrollerbare reaktioner. Samme reaktioner på myofibrillar	Ja i USA	[1],[2]
Actinidin	3.4.22.14	Cysteine Protease	Kiwi	23-26	58-62	60	2	5-7	Kollagen aktiv. Myofibrillær aktiv. Saftighed og smag påvirkes ikke.	Ja i New Zealand	[1],[5],[6]
Zingipain	3.4.22.67	Ingefærs rhizome protease	Ingefær		60	70			Mest aktiv på kollagen proteiner. Afgiver smag. Nedbryder kødets tekstur pga. bred substratspecification. Giver uønsket smag		[1],[7]
Protease fra <i>Aspergillus oryzae</i>	3.4.21.14, 3.4.23.6, 3.4.24.4	Alkaline, aspartic and neutral proteinase	<i>Aspergillus oryzae</i>		55-60	60-70	4	2,5-7	God proteolytisk aktivitet imod både kollagen og elastin. Nedbryder hovedsageligt myofibrillære proteiner og kun lidt, hvis overhoved nogen, nedbrydning af kollagen. Lagringstiden på køl inden varmebehandling har ikke betydning.	Ja i USA	[1],[2],[4],[7]
Protease fra <i>Bacillus subtilis</i>	3.4.21.62 3.4.24.28	Subtilisin og neutral proteinase	<i>Bacillus subtilis</i>		55-60	65	50	5-9	Minder om Ficin, lettere at kontrollere pga. lav denatureringstemperatur, neutral proteinasen billige at producere.	Ja i USA	[1], [2]
Protease fra <i>Calotropis procera</i>			Sodomonas æbler						Mørner svinekød, oksekød og kyllingekød. Forringer WHC med ca. 2%. Billigt alternativ til mørning af kød.		[8]
Protease fra <i>Bacillus polyfermenticus</i>			<i>Bacillus polyfermenticus</i>						Større kogesvind ved tilsætning af enzymer. Mørner ikke kun, men har mange andre positive effekter.		[7]
Protease fra Kachri			Kachri						Nedbryder kødets struktur pga. bred substrat specification. Afgiver en uønsket smag		[7]

Tabel 1: Oversigt over mørningsenzymer og deres egenskaber samt inaktiveringstemperaturer. Kilder: [1] Tarté, (2009); [2] Calkins & Sullivan, (2007); [3] Ionescu et al., (2008); [4] Ashie et al., (2002); [5] Ha et al., (2012); [6] Christensen et al., (2009) [7] Kim et al., (2011); [8] Rawdkuen et al., (2013)

Litteratur

- Ashie et al., (2002) Ashie, I.N.A., Sørensen, T.L., Nielsen, P.M., (2002). Effect of Papain and a Microbial Enzyme on Meat Proteins and Beef Tenderness. *Journal of Food Science*, 67(6), 2138-2142.
- Baldwin (2012) Baldwin, D.E., (2012). Sous vide cooking: A review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 1, 15-30.
- Calkins & Sullivan (2007) Calkins, C.R. & Sullivan, G., (2007). Adding Enzymes to Improve Beef Tenderness. www.beefresearch.org.
- Christensen et al. (2009) Christensen, M., Tørngren, M.A., Gunvig, A., Rozlosnik, N., Lametsch, R., Karlsson, A.H. & Ertbjerg, P., (2009). Injection of marinade with actinidin increases tenderness of porcine *M. biceps femoris* and affects myofibrils and connective tissue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1607-1614
- Gerelt et al., (2000) Gerelt, B., Ikeuchi, Y., and Suzuki, A. (2000). Meat Tenderization by proteolytic enzymes after osmotic dehydration. *Meat Science* 56:311-318.
- Ionescu et al., (2008) Ionescu, A., Aprodu, I., Pascaru, G., (2008). Effect of papain and bromelin on muscle and collagen proteins in beef meat. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology*, New Series year II (XXXI).
- Kim et al., (2011) Kim, J.-M., Choi, Y.-S., Choi, J.-H., Choi, G.-H., Lee, J.-H., Paik, H.-D., and Kim, C.-J., (2011). Effect of Crude Proteases Extracted from *Bacillus polyfermenticus* on Tenderizing Pork Meat. *Korean Journal of Food Science of Animal Resources*
- Lee et al., (2010) Lee, K.-A., Jung, S.-H., and Park, I., (2010). Applications of Proteolytic Enzymes from Kiwifruit on Quality Improvements of Meat Foods in Foodservice. *Korean Journal of Food Science of Animal Resources* 30(4):669-673.
- Rawdkuen and Benjakul (2012) Rawdkuen, S., and Benjakul, S., (2012). Biochemical and microstructural characteristics of meat samples treated with different plant proteases. *African Journal of Biotechnology* 11(76):14088-14095.
- Rawdkuen et al. (2013) Rawdkuen, S., Jaimakreu, M. & Benjakul, S., (2013). Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procere* latex. *Food Chemistry*, 136, 909-916.
- Suriaatmaja (2013) Suriaatmaja, D., (2013). Mechanism of Meat Tenderization by Long-Time Low-Temperature Heating. *Graduate Faculty of North Carolina State University*. Thesis.
- Tarté (2009) Tarté, R., (2009). Ingredients in Meat Products – Properties, Functionality and Applications. *Springer*. ISBN: 978-0-387-71326-7. 173-198.
- Tørngren (2010) Tørngren, M.A., (2010). Tenderizing Effect of Brine-Injected Proteolytic Enzymes on Aged and Non-Aged Beef *Semimembranosus*. *ICOMST 2010*.
- Zhao et al., (2012) Zhao, G.-Y., Zhou, M.-Y., Zhao H.L., Chen, X.-L., Xie, B.-B., Zhang, X.-Y., He, H.-L., Zhou, B.-C., and Zhang, Y.-Z. (2012). Tenderization effect of cold-adapted collagenolytic protease MCP-01 on beef meat at low temperature and its mechanism. *Food Chemistry* 134:1738-1744.