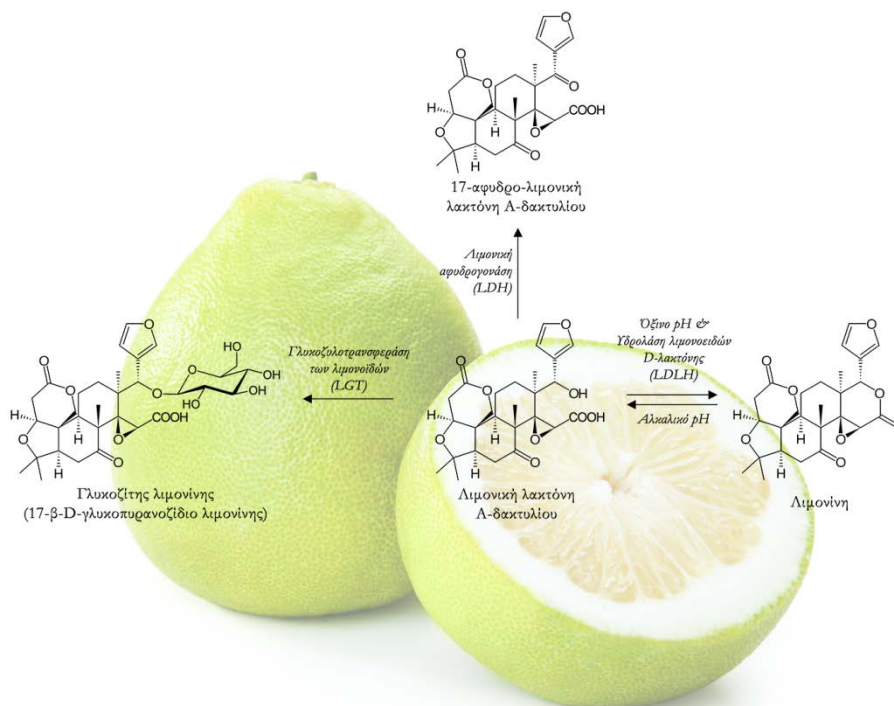




**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**  
**Εργαστήριο Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
Μάρκος Στροφύλλας



Παραλαβή γλυκοζυλοτρανσφεράσης λιμονοειδών από  
εσπεριδοειδή και μελέτη της επίδρασης της υπερυψηλής  
πίεσης στη δραστηριότητα της με εφαρμογή την ενζυμική  
αποπύκρωση πορτοκαλοχυμού

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
Πέτρος Ταούκης

Αθήνα 2015







## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου.

Η επιτυχής εκπόνηση μίας διπλωματικής, ως πρωτόλειο ερευνητικό έργο, απαιτεί την καθοδήγηση και συμπαράσταση συναδέλφων, φίλων και αρωγών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντά καθηγητή μου κ. Πέτρο Ταούκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της εργασίας αυτής και για τη διαρκή στήριξη της προσπάθειάς μου ακόμα και στις δυσκολότερες στιγμές της. Του είμαι ευγνώμων για την καθοδήγησή του, τις πολύτιμες συμβουλές του και τις ευκαιρίες προσωπικής και επαγγελματικής ανάπτυξης που μου έδωσε κατά τη συνεργασία μας.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τη διδάκτορα Ελένη Γώγου, της οποίας η αμέριστη συμπαράσταση, οι πολύτιμες συμβουλές και η έμπρακτη βοήθεια αποτέλεσαν καίριο παράγοντα για την περάτωση της εργασίας αυτής. Πέρα όμως από συνάδελφος, η Ελένη μου παραστάθηκε και σαν πραγματική φίλη, στηρίζοντας με στις δυσκολίες και μετέχοντας στις χαρές.

Οι ευχαριστίες αυτές θα είναι ελλιπείς αν δε συμπεριλάβουν όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, και ιδιαίτερα τους Δημήτρη Τσιμογιάννη, Μαρία Τσεβδού, Ζαχαρία Αλεξανδράκη και Έφη Δερμεσονλούογλου για τις πολύτιμες επιστημονικές -και όχι μόνο- συμβουλές τους.

Τέλος οφείλω ένα εγκάρδιο και ειλικρινές ευχαριστώ στους φίλους και την οικογένειά μου για τη διαρκή στήριξη και ενθάρρυνση της προσπάθειάς μου.

*Μάρκος Στροφύλλας*

*Αθήνα, 2015*



# Περιεχόμενα

<b>Πρόλογος</b>	
<b>Περιεχόμενα</b>	<b>i</b>
<b>Περίληψη</b>	<b>vii</b>
<b>Εισαγωγή</b>	<b>ix</b>
<b>Introduction &amp; abstract</b>	<b>xi</b>
<b>Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Χαρακτηριστικά &amp; σημασία εσπεριδοειδών</b>	<b>1</b>
1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Το πορτοκάλι & ποικιλίες του	3
1.2.1 Ποικιλίες πορτοκαλιών	3
1.2.2 Δομή του καρπού των εσπεριδοειδών	5
1.2.3 Βιοχημεία των εσπεριδοειδών & των χυμών τους	6
1.3 Παραγωγή πορτοκαλοχυμού	7
1.3.1 Συγκομιδή & αποθήκευση καρπών	7
1.3.2 Μεταφορά, πλύσιμο & διαλογή μεγέθους	8
1.3.3 Εκχύμωση & φινίρισμα	9
1.4 Κατεργασία πορτοκαλοχυμού	13
1.4.1 Κατηγορίες χυμών	13
1.4.2 Απομάκρυνση ελαίου & απαέρωση	14
1.4.3 Θερμική παστερίωση	14
1.4.4 Αποπίκρυνση	16
1.4.5 Συμπύκνωση	16
1.4.6 Συσκευασία	16
1.5 Εναλλακτικές μέθοδοι παστερίωσης	17
1.5.1 Εναλλακτικές θερμικές μέθοδοι	17
1.5.2 Μη θερμικές μέθοδοι παστερίωσης	18
1.6 Υπερψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΥΠ)	20

1.6.1 Εξοπλισμός Υπερψηλής Υδροστατικής Πίεσης	20
1.6.2 Βιομηχανικές μονάδες ΥΥΠ	22
1.6.3 Εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα επεξεργασμένα με ΥΥΠ	24
1.6.4 Νομοθεσία που αφορά στην επεξεργασία τροφίμων με ΥΥΠ	27
1.6.5 Κρίσιμες παράμετροι της διεργασίας ΥΥΠ	27
Βιβλιογραφία 1ου κεφαλαίου	29
<b>Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>: Λιμονοειδή &amp; πικρότητα χυμού εσπεριδοειδών</b>	<b>33</b>
2.1 Εισαγωγή	33
2.2 Λιμονίνη και πικρότητα χυμού	34
2.3 Βιοδραστικότητα και οφέλη λιμονοειδών στην ανθρώπινη υγεία	37
2.3.1 Αντινεοπλασματική δράση	37
2.3.2 Υποχοληστερολαιμική δράση	38
2.3.3 Αντιρετροϊκή δράση	39
2.4 Αποπίκρυνση πορτοκαλοχυμού	39
2.4.1 Ιστορικές και τρέχουσες μέθοδοι	39
2.4.2 Αποπίκρυνση πορτοκαλοχυμού με ρητίνες στυρενίου-διβινυλβενζολίου	40
2.4.3 Εναλλακτικές μέθοδοι αποπίκρυνσης πορτοκαλοχυμού	41
Βιβλιογραφία 2ου κεφαλαίου	44
<b>Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Γλυκοζυλοτρανσφεράση λιμονοειδών</b>	<b>51</b>
3.1 Εισαγωγή	51
3.2 Κινητική κορεσμού	52
3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική δραστηριότητα	53
3.3.1 Επίδραση pH	53
3.3.2 Επίδραση θερμοκρασίας	53
3.3.3 Επίδραση της πίεσης	55
3.3.4 Επίδραση διεργασιών ΥΥΠ σε ένζυμα και μικροοργανισμούς	56
3.4 Γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών	62
3.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά LGT. Φυσική εμφάνιση και δραστηριότητα σε εσπεριδοειδή	62
3.4.2 Επίδραση pH και θερμοκρασίας	64
3.4.4 Επίδραση μεταλλικών ιόντων	64
3.4.5 Ακινητοποίηση LGT για χρήση σε αποπίκρυνση χυμού εσπεριδοειδών	64
Βιβλιογραφία 3 <sup>ου</sup> κεφαλαίου	66
<b>Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>: Υλικά &amp; μέθοδοι - Πειραματική διαδικασία</b>	<b>69</b>
4.1 Εισαγωγή	69



4.2 Υλικά	69
4.3 Πειραματική διαδικασία	69
4.3.1 Παραλαβή ακατέργαστου εκχυλίσματος ενζύμου	69
4.3.2 Καθαρισμός ενζύμου	71
4.3.3 Κατεργασία ενζύμου με ΥΥΠ	72
4.3.4 Ανάλυση ενεργότητας ενζύμου	76
4.4 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού φυσικοχημικών παραμέτρων ποιότητας χυμού	78
4.4.1 Μέτρηση pH	78
4.4.2 Προσδιορισμός ολικής οξύτητας	78
4.4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός L-ασκορβικού οξέος (Βιταμίνη C)	79
4.4.4 Μέτρηση ολικών διαλυτών στερεών	79
Βιβλιογραφία 4 <sup>ου</sup> κεφαλαίου	80
<b>Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα και συζήτηση</b>	<b>81</b>
5.1 Επεξεργασία δεδομένων HPLC και υπολογισμός ενεργότητας LGT	81
5.2 Απομόνωση & καθαρισμός LGT από μεσοκάρπιο φράπας	82
5.3 Συμπεριφορά LGT υπό υπερυψηλή πίεση	84
5.3.1 Επεξεργασία δεδομένων ενζυμικής ενεργότητας	84
5.3.2 Προσδιορισμός εμπειρικού μοντέλου κινητικής της LGT σε διεργασίες ΥΥΠ	87
5.3.3 Ανάπτυξη μαθηματικού μοντέλου πρόρρησης κινητικής ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της LGT κατά τις διεργασίες ΥΥΠ	92
5.3.4 Περιορισμοί στην εφαρμογή του υπολογιστικού μοντέλου και προτάσεις βελτίωσης	94
5.4 Εφαρμογή LGT σε αποπίκρυνση πορτοκαλοχυμού	95
5.5 Συνδυασμός LGT και ψυχρής παστερίωσης με ΥΥΠ σε δείγματα χυμού	96
5.5.1 Περιγραφή δειγμάτων χυμού Navel	96
5.5.2 Περιγραφή επεξεργασίας δειγμάτων χυμού Navel με συνδυασμό ενζυμικής προκατεργασίας και ψυχρής παστερίωσης με ΥΠ	97
5.5.3 Περιγραφή επεξεργασίας δειγμάτων χυμού Navel με συνδυασμό ενζυμικής προκατεργασίας και θερμικής παστερίωσης	97
5.5.4 Επίδραση του σταδίου επεξεργασίας στη συγκέντρωση λιμονίνης	97
5.5.5 Επίδραση του είδους προκατεργασίας και παστερίωσης στη συγκέντρωση λιμονίνης	98
5.5.6 Επίδραση χρόνου και θερμοκρασίας αποθήκευσης στη συγκέντρωση λιμονίνης	99
5.6 Διακύμανση φυσικοχημικών-ποιοτικών παραμέτρων χυμού πορτοκαλιού Navel κατά τη διάρκεια του έτους παραγωγής	100
Βιβλιογραφία 5 <sup>ου</sup> κεφαλαίου	104
<b>Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup>: Συμπεράσματα και προτάσεις</b>	<b>107</b>







## Περίληψη

Η παρούσα εργασία είχε ως αντικείμενο τη μελέτη της παραλαβής & καθαρισμού του ενζύμου γλυκοζυλοτρανσφεράση λιμονοϊδών (limonoid glucosyltransferase, LGT) από ιστούς δύο τύπων εσπεριδοειδών (φράπα & πορτοκάλι τύπου Navel) και την επίδραση της επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση (ΥΠ) στην ενεργότητα αυτού.

Αρχικά μελετήθηκε η διαδικασία παραλαβής & καθαρισμού του ενζύμου από καρπούς εσπεριδοειδών. Η παραλαβή της ακατέργαστης LGT έγινε με υδατική εκχύλιση του μεσοκαρπίου των καρπών ακολουθούμενη από καταβύθιση με εξαλάτωση των παραληφθεισών πρωτεϊνών. Η ενεργότητα του ενζυμικού εκχυλίσματος υπολογίστηκε εμμέσως με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Ο καθαρισμός του προκύπτοντος ενζύμου βασίστηκε στην τεχνική της χρωματογραφίας ανταλλαγής ανιόντων. Η διεργασία καθαρισμού είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της ειδικής ενεργότητας του εκχυλίσματος.

Για την πρώτη απόπειρα παραλαβής LGT ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκαν πορτοκάλια τύπου Navel ελληνικής προέλευσης (*Citrus × sinensis* var. *brasiliensis*). Η παραλαβή αξιολογήθηκε ως ανεπιτυχής, καθώς δεν ανιχνεύθηκε μετρήσιμη ενεργότητα της LGT στο ενζυμικό εκχύλισμα.

Η δεύτερη απόπειρα αποτέλεσε τροποποίηση της αρχικής μεθόδου, καθώς ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε φράπα (*Citrus maxima*), επίσης ελληνικής προέλευσης. Η παραλαβή και ο καθαρισμός κρίθηκαν ως επιτυχής, καθώς παρήγαγαν εκχύλισμα LGT υψηλής ενζυμικής ενεργότητας ( $4.179 \pm 0.500$  nkat·mg<sup>-1</sup> στο καθαρισμένο ενζυμικό εκχύλισμα, παράγοντας ενίσχυσης  $\times 15.3$  επί του ακάθαρτου).

Το παραληφθέν ένζυμο κατόπιν κατεργάστηκε περαιτέρω με υπερυψηλή υδροστατική πίεση (ΥΥΠ). Οι συνθήκες κατεργασίας περιελάμβαναν πιέσεις 100 έως και 600 MPa και χρόνους έως και 15 min. Η τυποποιημένη ανάλυση ενεργότητας των κατεργασμένων δειγμάτων έδειξε πως κατεργασία για σύντομο χρόνο (2 - 3 min) σε ήπιες πιέσεις (200 - 300 MPa) προκαλούν ενεργοποίηση του ενζύμου (με μέγιστη παρατηρηθείσα αύξηση ενεργότητας  $23.5 \pm 5.44$  % ως προς το δείγμα ελέγχου υπό πίεση 300 MPa και χρόνο 3 min), ενώ μεγαλύτεροι χρόνοι ή/και μεγαλύτερες πιέσεις κατεργασίας προκαλούν απενεργοποίηση του ενζύμου.

Τελικά, τα δεδομένα ενεργότητας της LGT συναρτήσε της πίεσης & του χρόνου κατεργασίας χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή ενός εμπειρικού κινητικού μοντέλου, το περιγράφει τόσο το στάδιο ενεργοποίησης όσο και το στάδιο απενεργοποίησης του ενζύμου. Τα δεδομένα της μαθηματικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων ενσωματώθηκαν σε κώδικα Matlab ο οποίος μπορεί να προβλέψει τη συμπεριφορά του ενζύμου υπό ΥΥΠ καθώς και να προσδιορίσει τις συνθήκες διεργασίας που βελτιστοποιούν την ενεργοποίηση (πρόβλεψη 6.3 min υπό πίεση 250 MPa).



## Εισαγωγή

Στην Ελλάδα η παραγωγή πορτοκαλιών αποτελεί μια από τις βασικότερες δραστηριότητες καλλιέργειας, με σημαντικό ποσοστό των καλλιεργούμενων πορτοκαλιών να μεταποιείται για την παραγωγή χυμού. Το 85% των καλλιεργούμενων πορτοκαλιών στην Ελλάδα αποτελούν είναι ποικιλίας Navel, τα οποία εμφανίζουν έντονα το φαινόμενο της ανάπτυξης πικρής γεύσης κατά τη διάρκεια της χυμοποίησης και επεξεργασίας τους.

Η εμφάνιση πικρής γεύσης οφείλεται στην παρουσία της λιμονίνης. Η ένωση αυτή ανήκει στα λιμονοειδή, μια οικογένεια χημικών ενώσεων οι οποίες εντάσσονται στα υψηλά οξυγονωμένα τετρακυκλικά τριτερπενοειδή. Όταν η συγκέντρωση λιμονίνης στο χυμό είναι μεγαλύτερη από 6 ppm η πικρότητα θεωρείται μη επιθυμητή καθιστώντας το χυμό μη αποδεκτό οργανοληπτικά. Η αντιμετώπιση του φαινομένου της πικρής γεύσης πραγματοποιείται με διεργασίες αποπίκρασης.

Η συμβατική βιομηχανική μέθοδος στηρίζεται στη χρήση ρητινών προσρόφησης στυρενίου-διβινυλβενζολίου ή οξικής κυτταρίνης. Η τεχνολογία αυτή, αν και επιλύει το πρόβλημα, προσθέτει μια σειρά από προκατεργασίες (απομάκρυνση της διαλυτής πούλπας και επαναπρόσθεσή της σε επόμενο στάδιο) που αυξάνουν το κόστος και δυσχεραίνουν την παραγωγή. Ταυτόχρονα η χρήση ρητινών υποβαθμίζει ποιοτικά και οργανοληπτικά τον πορτοκαλοχυμό εξαιτίας της μη επιλεκτικής δράσης τους, καθώς αφαιρεί από το χυμό και ενώσεις που του προσδίδουν επιθυμητά χαρακτηριστικά. Κατά συνέπεια, οι τρέχουσες μέθοδοι αποπίκρασης με τη χρήση ρητινών, πέρα από την αύξηση του κόστους παραγωγής έχουν σαν αποτέλεσμα και την υποβάθμιση της ολικής ποιότητας του χυμού.

Η ανάπτυξη και εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων αποπίκρασης στην τεχνολογία του πορτοκαλοχυμού Navel αποτελεί ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας που απασχολεί τόσο την επιστημονική κοινότητα όσο και τη βιομηχανία μεταποίησης πορτοκαλιών. Η έρευνα στο πεδίο της αποπίκρασης των χυμών εσπεριδοειδών έχει επικεντρωθεί στη χρήση ενζύμων. Η ενζυμική αποπίκραση των χυμών με στόχο τη μείωση της συγκέντρωσης λιμονίνης μπορεί να γίνει με την δράση δύο διαφορετικών ενζύμων, της γλυκοζυλοτρανσφεράσης των λιμονοειδών (*limonoid glucosyltransferase, LGT*) και της λιμονικής αφυδρογονάσης (*limonoate dehydrogenase, LDH*). Η δράση και των δύο ενζύμων έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή της πρόδρομης ένωσης της πικρής λιμονίνης σε μη πικρές ενώσεις.

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των εσπεριδοειδών η αντίδραση της γλυκοζυλίωσης της λιμονίνης για την παραγωγή λιμονοειδών γλυκοζιτών καταλύεται από το ένζυμο γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών. Σε πολλές ποικιλίες όμως η συγκέντρωση του ενζύμου είναι πολύ χαμηλή για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί αυτή η φυσική αποπίκραση στους φυτικούς ιστούς. Το ένζυμο έχει απομονωθεί από Navel πορτοκάλια, όπου αποδείχτηκε ότι η

γλυκοζυλοτρανσφεράση καταλύει την γλυκοζυλίωση όλων των λιμονοειδών και όχι μόνο της λιμονίνης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η δυνατότητα παραλαβής της γλυκοζυλοτρανσφεράσης λιμονοειδών από τους καρπούς φράπας (*Citrus maxima*) και η εφαρμογή του για την ανάπτυξη μιας εναλλακτικής μεθόδου ενζυμικής αποπίκρανσης. Επιπλέον μελετήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής υπερυψηλής πίεσης ως μεθόδου ενίσχυσης της δραστηριότητας του ενζύμου.

Η δράση της LGT ερευνήθηκε σε εύρος συνθηκών, τόσο σε πρότυπα συστήματα όσο και σε βιομηχανικά δείγματα πορτοκαλοχυμού. Η ενεργοποίηση του ενζύμου με ΥΥΠ μελετήθηκε υπό ποικίλες παραμέτρους διεργασίας, και περιγράφηκε με χρήση υπολογιστικού μοντέλου.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων και της μαθηματικής μοντελοποίησης καταδεικνύουν πιθανές κατευθύνσεις μελλοντικών ερευνών και προβάλλουν τη συνδυαστική χρήση γλυκοζυλοτρανσφεράσης λιμονοειδών και υπερυψηλής πίεσης ως μία ελκυστική εναλλακτική μέθοδο αποπίκρανσης πορτοκαλοχυμών.



## Introduction & abstract

Juice products from certain citrus fruits may pose important economic problems in their commercial production due to delayed bitterness caused by the presence of limonoids, triterpenoid compounds present in the fruits. Limonin is the most significant of these compounds, and its presence can negatively affect the acceptability of the final product. Limonin production rate depends on processing conditions (temperature, pH) and is accelerated by the enzyme limonin D-ring-lactone hydrolase (*LDLH*).

Limonin and its precursor, as well as other limonoids, have exhibited a wide range of biological activity, including anti-cancer, anti-HIV and various other pharmacological properties. Their presence in the final product is therefore desirable from a health standpoint.

The current industrial practice involves the removal of limonin by a combination of ion-exchange resins and selective adsorption on polymeric adsorbents, followed by re-pasteurization. This however both adds complexity to the production operations and detracts from the health-promoting value of the juice due to the removal of beneficial limonoids.

On the other hand, bitterness can be reduced by the enzymatic conversion of limonin to the non-bitter limonoid glucoside. The key enzyme in this conversion is limonoid glucosyltransferase (*LGT*), an enzyme found naturally in abundance in the tissues of citrus fruits, and particularly in the albedo tissue of pomelo. Enhanced activity of this enzyme can reduce the amount of limonoid aglycones in the juice, reducing correspondingly the bitterness without affecting the level of limonoids.

The objective of this research was to investigate the effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on the activity of *LGT* from pomelo (*Citrus maxima*).

The first part involved isolating and purifying the enzyme from citrus albedo tissues. Enzyme isolation was achieved by aqueous extraction followed by ammonium sulfate precipitation of proteins. The activity of *LGT* in the crude extract was determined indirectly using high performance liquid chromatography. Purification of the enzyme was performed using anion exchange chromatography and resulted in the collection of a high specific activity enzyme extract.

The initial isolation was attempted from the albedo tissue of Greek Navel oranges (*Citrus × sinensis* var. *brasiliensis*). The isolation was unsuccessful as no LGT activity was detected in the crude extract.

Following attempts used albedo from Greek pomelo (*Citrus maxima*) fruits as raw material. The isolation step was successful, with the crude isolate exhibiting measurable catalytic activity. Further purification steps resulted in a final LGT extract exhibiting a specific activity of  $4.179 \pm 0.500$  nkat·mg<sup>-1</sup>, achieving a 15.3-fold increase over the crude extract.

The purified enzyme was subsequently subjected to high hydrostatic pressure (HHP) treatment. The process parameters involved pressures from 100 - 600 MPa and times up to 15 min. Analysis of LGT activity in the treated samples showed that mild processing pressure (200 - 300 MPa) combined with short holding time (2 - 3 min) resulted in enhancement of residual enzyme activity. The maximum activation amounted to an increase of  $23.5 \pm 5.44$  % over the basal activity of the untreated (control) sample and was observed after treatment for 3 min at 300 MPa. Longer processing time and/or higher pressure resulted in partial inactivation of the enzyme samples.

The experimental data of LGT activity were used to construct an empirical model describing both the activation and inactivation phenomena. The empirical parameters were used to construct a black box computational model in Matlab code, which can be used to predict the behaviour of the enzyme during HHP treatment as well as determine the process parameter values that optimise the LGT activation step (predicted as treatment of 6.3 min at 250 MPa).

# Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Χαρακτηριστικά & σημασία εσπεριδοειδών

## 1.1 Εισαγωγή

Ο όρος *εσπεριδοειδή* αποτελεί την εμπειρική περιγραφή μιας ομάδας φυτών της οικογένειας των ρυτοειδών (*Rutaceae*), και συγκεκριμένα του γένους *κίτρος* (*Citrus*). Τα εσπεριδοειδή είναι αειθαλή μικρά δένδρα τα οποία φέρουν καρπούς, επίσης αποκαλούμενους εσπεριδοειδή (*hesperidia*).

Ιστορικά, θεωρείται πως τα εσπεριδοειδή προήλθαν από την Νοτιοανατολική Ασία, με πρώτες αναφορές στην καλλιέργειά σε κινεζικά χειρόγραφα του 23<sup>ου</sup> π.Χ. αιώνα (Reuther et al., 1989).

Τα ευρύτερα καλλιεργούμενα είδη εσπεριδοειδών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

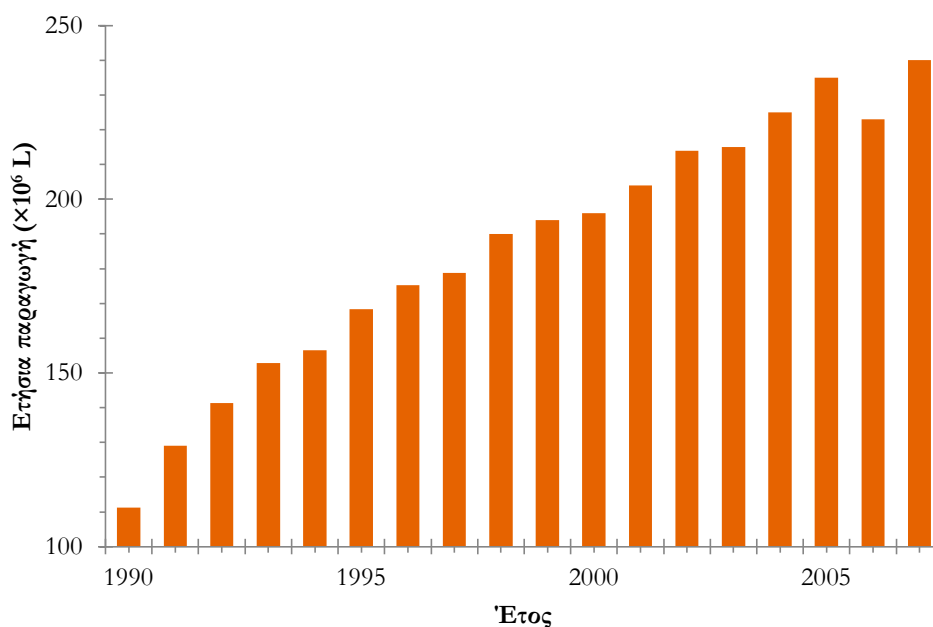
<b>Είδος</b> (× υποδηλώνει υβρίδιο)	<b>Ονομασία</b>
Citrus × sinensis	Πορτοκαλιά
Citrus × limon	Λεμονιά
Citrus × paradisi	Γκρέιπφρουτ
Citrus reticulata	Μανταρινιά
Citrus × aurantium	Νεραντζιά
Citrus maxima	Φράπα
Citrus × bergamia	Περγαμόντο
Citrus japonica	Κουμκουάτ

Σήμερα τα εσπεριδοειδή καλλιεργούνται ευρέως ως καρποφόρα δένδρα σε εύκρατες, ημιτροπικές και τροπικές περιοχές. Το έτος 2012 παρήχθησαν παγκοσμίως περίπου 131.3 εκατομμύρια τόνοι εσπεριδοειδών, σημαντικότερο των οποίων, σε ποσοστό άνω του 50% (68.2 εκ. τόνοι) είναι το πορτοκάλι (FAO 2014). Την ίδια περίοδο στην Ελλάδα παρήχθησαν συνολικά 976,500 τόνοι εσπεριδοειδών, εκ των οποίων 791,600 τόνοι πορτοκάλια (81%).



Εικόνα 1-1 - Περιοχές εμπορικής καλλιέργειας εσπεριδοειδών (Weltenburger, 1987)

Σε παγκόσμιο επίπεδο, περίπου το 50% της παραγωγής πορτοκαλιών διατίθεται ως πρώτη ύλη για κατεργασμένα προϊόντα, πρωτίστως χυμό. Οι κύριες περιοχές καλλιέργειας πορτοκαλιών προς χυμοποίηση είναι η πολιτεία της Florida στις ΗΠΑ και η πολιτεία του São Paulo στη Βραζιλία, οι οποίες μοιράζονται το 85% της παγκόσμιας παραγωγής χυμού. Στην ελληνική αγορά για το έτος 2006 (τελευταίο έτος για το οποίο υπάρχουν δημοσιευμένα στατιστικά δεδομένα) το ποσοστό της χυμοποιηθείσας ποσότητας πορτοκαλιών ανήλθε στο 43%.



Εικόνα 1-2 - Ετήσια εγχώρια παραγωγή χυμών 1990-2007

## 1.2 Το πορτοκάλι & ποικιλίες του

Η συνήθης χρήση της ονομασίας *πορτοκάλι (orange)* περιγράφει τους καρπούς του φυτού *Citrus × sinensis*, αν και στη διεθνή βιβλιογραφία ο όρος χρησιμοποιείται, μεταξύ άλλων, και για το νεράντζι (bitter orange), το περγαμόντο (bergamot orange) και το μανταρίνι (mandarin orange). Για αποφυγή παρερμηνειών είναι σύνηθες τα πορτοκάλια να περιγράφονται και ως γλυκά πορτοκάλια (sweet oranges).

### 1.2.1 Ποικιλίες πορτοκαλιών

Τα γλυκά πορτοκάλια, στα οποία θα επικεντρωθεί το παρόν και τα οποία θα αναφέρονται ακολούθως ως *πορτοκάλια*, ταξινομούνται περαιτέρω στις ακόλουθες ποικιλίες:

• **Κοινό πορτοκάλι** (common orange), το οποίο αποτελεί περίπου τα 2/3 της παγκόσμιας παραγωγής πορτοκαλιών. Η κοινότερη ποικιλία είναι το πορτοκάλι Valencia, το οποίο μάλιστα αποτελεί και το κυριότερο εσπεριδοειδές σε παγκόσμια παραγωγή. Η ποικιλία Valencia παρουσιάζει εκτεταμένη περίοδο καρποφορίας (Ιούνιο – Μάρτιο), κάτι που την καθιστά ευπροσάρμοστη σε μεγάλο εύρος κλιματικών συνθηκών και προσφέρεται για συγκομιδή τους καλοκαιρινούς μήνες (Μάρτιο – Ιούνιο).

Ενδεικτικά αναφερόμενες, άλλες ποικιλίες οι οποίες εμπίπτουν στην κατηγορία του κοινού πορτοκαλιού είναι οι Hamlin (υψηλή απόδοση ανά ρίζα, αντοχή στο ψύχος), Moro Tarocco (Ιταλική ποικιλία, χαρακτηριστικό καραμελόχρωμο ενδοκάρπιο), Biondo Comune («κοινό ξανθό», καλλιεργούμενο στην ευρύτερη Μεσόγειο).

Οι κοινές πορτοκαλιές είναι σχετικά ευπαθείς στον παγετό, καθώς υφίστανται ζημιές σε θερμοκρασίες κάτω των -5°C.

• **Πορτοκάλι Navel**, το οποίο χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός δεύτερου, υποανεπτυγμένου καρπού στο κορυφαίο μερίστωμα (apical meristem) του καρπού. Ο δευτερογενής καρπός προεξέχει ελαφρώς από το φλοιό δίνοντας την εικόνα ενός αφαλού, από την οποία προκύπτει η ονομασία της ποικιλίας αυτής. Το πορτοκάλι Navel προορίζεται κυρίως για βρώση, κάτι που οφείλεται στο ότι ο καρπός είναι λιγότερο χυμώδης αλλά με αρωματική σάρκα, χωρίς κουκούτσια και με χονδρό, εύκολα αφαιρούμενο φλοιό.

Περαιτέρω, λόγω αυξημένης παρουσίας λιμονοειδών, ιδιαίτερα σε πρώιμους καρπούς, ο χυμός του πορτοκαλιού Navel εμφανίζει υψηλή πικρότητα κατά την κατεργασία του, κάτι που καθιστά την εμπορική χυμοποίησή του δυσχερέστερη σε σχέση με άλλες ποικιλίες (το πρόβλημα της πικρότητας του



Εικόνα 1-3 - Πορτοκάλι Navel

πορτοκαλοχυμού εξετάζεται εκτενέστερα στο κεφάλαιο 2 του παρόντος). Παρά ταύτα, στην Ελλάδα τα πορτοκάλια Navel καλλιεργούνται ευρέως για παραγωγή χυμού.

Η συνηθέστερα καλλιεργούμενη ποικιλία Navel είναι η Washington, η οποία αναπαράγεται αποκλειστικά με εμβολιασμό καθώς οι καρποί δε φέρουν σπόρους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα όλες οι πορτοκαλιές Washington Navel να είναι γενετικά όμοιες (κλώνοι) με την πρώτη πορτοκαλιά Navel. Το φυτό αυτό θεωρείται πως ήταν μια πορτοκαλιά ποικιλίας Seleta η οποία στις αρχές του 19<sup>ου</sup> αιώνα υπέστη μια τυχαία μετάλλαξη που κατέστησε άσπερμους τους καρπούς της (Dorsett et al., 1917).

Η συγκομιδή των πορτοκαλιών Navel γίνεται από το Νοέμβριο μέχρι το Μάιο. Οι πορτοκαλιές Navel είναι ευπαθέστερες από τις κοινές στο ψύχος, εμφανίζοντας βλάβες σε θερμοκρασίες μικρότερες των -2°C.



Εικόνα 1-4 - Σαγκουίνι

● **Σαγκουίνι** (blood orange), ποικιλία η οποία χαρακτηρίζεται από το έντονο ερυθρό χρώμα του ενδοκαρπίου τους. Ο χρωματισμός αυτός είναι αποτέλεσμα της παρουσίας ανθοκυανών, φαινολικών ενώσεων με έντονο ερυθρό ή ιώδες χρώμα. Ο χρωματισμός εντείνεται όταν το φρούτο εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες κατά την ανάπτυξή του.

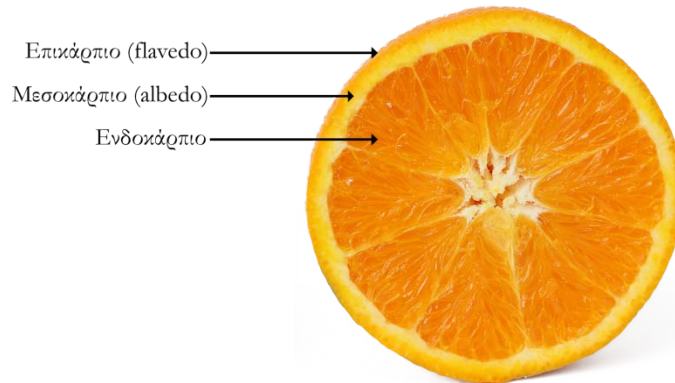
Ο χυμός των σαγκουινιών είναι ιδιαιτέρως εύγευστος και με χαρακτηριστικό άρωμα, όμως η παραγωγή του δυσχεραίνεται από την τάση των ανθοκυανών να αποχρωματίζονται κατά την κατεργασία και αποθήκευση.

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ο χυμός να αποκτά θολό, «λασπώδη» χρωματισμό, κάτι που τον καθιστά μη αρεστό στους καταναλωτές. Το ζωηρό χρώμα του κατεργασμένου χυμού μπορεί να αποκατασταθεί με διήθηση από ενεργό άνθρακα, αφαιρώντας παράλληλα και την πικρότητα του χυμού. Η διεργασία αυτή παρουσιάζει το μειονέκτημα πως ελαττώνει σημαντικά τη συγκέντρωση τόσο της βιταμίνης C όσο και των λιμονοειδών (βλ. κεφάλαιο 2) από το χυμό, απομειώνοντας έτσι τη διατροφική του αξία.

● **Πορτοκάλι «άνευ οξέος»** (acidless/sugar orange), ή πορτοκάλι «ζάχαρη», ποικιλία η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλή ή μηδενική συγκέντρωση οργανικών οξέων. Γενικά η πολύ χαμηλή οξύτητά τους τα καθιστά επιρρεπή στην ανάπτυξη παθογόνων & αλλοιογόνων μικροοργανισμών και κατά συνέπεια ακατάλληλα προς κατεργασία σε χυμό και λοιπά προϊόντα. Η καλλιέργεια τους γίνεται αποκλειστικά προς τοπική κατανάλωση, και ως εκ τούτου δεν παρουσιάζουν σημαντικό εμπορικό ενδιαφέρον.

### 1.2.2 Δομή του καρπού των εσπεριδοειδών

Οι καρποί των εσπεριδοειδών (*εσπερίδια*) αποτελούνται από τρεις μορφολογικά διακριτές στοιβάδες:

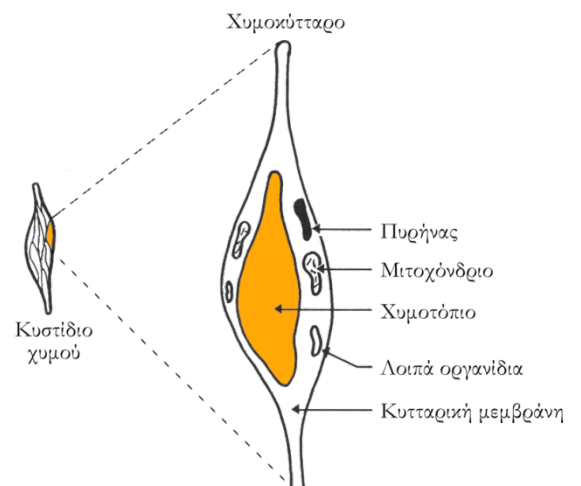


Εικόνα 1-5 - Τομή καρπού πορτοκαλιού

Το **επικάρπιο** (flavedo) είναι το εξώτερο μέρος του καρπού, αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη και επικαλύπτεται από φυσικό κηρό. Χαρακτηριστικές δομές του επικαρπίου είναι οι χρωμοπλάστες, κύτταρα με καρτενοειδείς χρωστικές (πρωτίστως ξανθοφύλλη) καθώς και οι ελαιοθύλακες, σφαιρικοί ή επιμήχεις πολυκυτταρικοί ασκοί οι οποίοι περικλείουν τα αιθέρια έλαια του καρπού.

Το **μεσοκάρπιο** (albedo ή rith) είναι το ανοιχτόχρωμο σπογγώδες τμήμα του καρπού, το οποίο μαζί με το επικάρπιο αποτελούν το περικάρπιο ή φλοιό. Το μεσοκάρπιο περιέχει ουσίες σχετιζόμενες τόσο με την οργανοληπτική, όσο και με τη διατροφική αξία των φρούτων, όπως πηκτίνη, τερπενοειδή & φλαβονοειδή. Σε ορισμένα είδη, συμπεριλαμβανομένων και των πορτοκαλιών Navel, στο μεσοκάρπιο απαντώνται ένζυμα υψηλής σημασίας όπως η γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών, και τα οποία εξετάζονται ενδελεχώς στο κεφάλαιο 3 του παρόντος.

Το **ενδοκάρπιο** αποτελεί το εδώδιμο μέρος του καρπού. Χωρίζεται με μεμβράνες σε πολλαπλά επιμέρους τμήματα (π.χ. συνήθως 10 για το πορτογάλι, 7-14 για το μανταρίνι), τα οποία προκύπτουν από τα καρπόφυλλα του άνθους. Τα τμήματα αυτά περιέχουν τα κυστιδια του χυμού, πολυκυτταρικές δομές αποτελούμενες από πολλαπλά επιμέρους χυμοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά αποτελούνται ως επί το πλείστο από το χυμοτόπιο, ένα οργανίδιο το οποίο περιέχει το χυμό. Τα υπόλοιπα οργανίδια του χυμοκυττάρου, όπως και ο πυρήνας του αποτελούν ουσιαστικά μέρος της μεμβράνης που περικλείει το χυμοτόπιο. Κατά τη διαδικασία της χυμοποίησης τα κύτταρα απελευθερώνουν το χυμό τους, ενώ η μεμβράνη διαχωρίζεται και απορρίπτεται ως πούλπα.



Εικόνα 1-6 - Κυστίδιο & χυμοκύτταρο

### 1.2.3 Βιοχημεία των εσπεριδοειδών & των χυμών τους

Η ζήτηση για εσπεριδοειδή, καθώς και η αποδοχή τους ως σημαντικές τροφές βασίζεται τόσο στα επιθυμητά οργανοληπτικά (ευχάριστο άρωμα, έντονη γεύση, ζωηρό χρώμα) όσο και στα θρεπτικά χαρακτηριστικά τους. Οι παράγοντες αυτοί είναι απόρροια της ιδιαίτερης βιοχημείας των εσπεριδοειδών, και εξαρτώνται άμεσα από την προαναφερθείσα δομή, αλλά και από τη χημική σύσταση των καρπών.

Η κατανάλωση εσπεριδοειδών, με πρωτεύον το πορτοκάλι, αποτελεί μία από τις κύριες πηγές πρόσληψης βιταμίνης C, και δευτερεύουσα πηγή αμινοξέων, υδατανθράκων, αντιοξειδωτικών & ανόργανων συστατικών. Η χημική σύστασή τους, και κατά συνέπεια η αξία τους, εξαρτάται τόσο από γενετικούς παράγοντες όσο και από τις συνθήκες ανάπτυξης, συγκομιδής & κατεργασίας των καρπών. Το παρόν θα εξετάσει ενδελεχέστερα τα συστατικά και τις ιδιότητες του πορτοκαλοχυμού καθώς, όπως προαναφέρθηκε, είναι το σημαντικότερο εμπορικά προϊόν εσπεριδοειδών.

Τα κύρια συστατικά ενδιαφέροντος του χυμού πορτοκαλιού, ακολουθούμενα από τις προσεγγιστικές συγκεντρώσεις τους του είναι τα παρακάτω:

- **Οργανικά οξέα** (9.6% των ολικών διαλυτών στερεών), κυρίως κιτρικό και μηλικό, τα οποία ευθύνονται για τη χαρακτηριστική οξύτητά του (pH 2.9 – 4, με συνηθέστερο όριο αποδοχής το pH 3.5). Σημαντική παράμετρος της αξίας του χυμού είναι και το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), ενώ άλλα οργανικά οξέα (φολικό, παντοθενικό, νιασίνη) απαντώνται ως μικροθρεπτικά συστατικά.

- **Υδατάνθρακες** (76-80% των ολικών διαλυτών στερεών), κυρίως σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, σε τυπική αναλογία 2:1:1. Η συγκέντρωση των υδατανθράκων επηρεάζει τόσο τη γεύση όσο και την υφή και το χρώμα του πορτοκαλοχυμού και ποικίλει αναλόγως των εποχιακών συνθηκών και της περιοχής καλλιέργειας καθώς και την ποικιλία του καρπού.

- **Βιταμίνες** (2.5% των ολικών διαλυτών στερεών), με κυριότερη την προαναφερθείσα βιταμίνη C. Η βιταμίνη C αποτελεί κύριο παράγοντα ποιότητας του πορτοκαλοχυμού, και η συγκέντρωσή της εξαρτάται από την ποικιλία & καλλιέργεια του καρπού, την κατεργασία του χυμού αλλά και από τις συνθήκες αποθήκευσης του εμπορεύσιμου προϊόντος. Με τυπικές μεθόδους κατεργασίας ο άρτι εμφιαλωμένος χυμός διατηρεί το 97% της αρχικής περιεκτικότητας βιταμίνης C, με ακόλουθη απώλεια 1-2 εκατοστιαίων μονάδων ανά μήνα αποθήκευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Εκτός της βιταμίνης C, ο πορτοκαλοχυμός περιέχει μικροποσότητες βιταμινών A (σε μορφή καροτενοειδών) και συμπλέγματος B.

- **Ανόργανα συστατικά** (3.2% των ολικών διαλυτών στερεών), με πρωτεύον το κάλιο (περίπου 70% των ανοργάνων) ακολουθούμενο από ασβέστιο, μαγνήσιο και φώσφορο. Επίσης ως ιχνοστοιχεία απαντώνται σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγγάνιο & ιώδιο, ενώ η πολύ χαμηλή περιεκτικότητα νατρίου αποτελεί όφελος για καταναλωτές με προβλήματα του κυκλοφορικού συστήματος.

- **Φλαβονοειδή** (<1% των ολικών διαλυτών στερεών), φαινολικές ενώσεις οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά το χρώμα & τη γεύση του χυμού. Στα εσπεριδοειδή απαντώνται κυρίως ως φλαβανόνες (εσπερετίνη, ναρινγινίνη) και γλυκοζίτες (εσπεριδίνη, ναρινγίνη, ρουτίνη, κερσιτρίνη). Πέραν της προφανούς σημασίας των φαινολικών ενώσεων στην ποιότητα του πορτοκαλοχυμού, τα φλαβονοειδή έχουν ερευνηθεί εκτενώς ως δυνητικά ωφέλιμες για την υγεία ενώσεις, με ιδιαίτερη έμφαση στην υγεία του καρδιαγγειακού συστήματος.



• **Αρωματικά συστατικά**, τα οποία έχουν καθοριστικό ρόλο στην αποδοχή του χυμού από τους καταναλωτές. Αποτελούνται κυρίως από αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες και τερπένια και συγκεντρώνονται κυρίως στο περιάριπιο. Κατά συνέπεια, στη βιομηχανική παραγωγή χυμού πρέπει να επαναπροστεθούν στο χυμό κατά την κατεργασία του.

• **Ένζυμα**, τα οποία επηρεάζουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του χυμού. Βασικότερο αυτών είναι η πηκτινομεθυλεστεράση (PME), ένα πηκτινολυτικό ένζυμο το οποίο καταλύει την αποεστεροποίηση της πηκτίνης προκαλώντας διάλυση, ιδιότητα ανεπιθύμητη για τον πορτοκαλοχυμό. Επίσης σημαντικά, και αντικείμενα του παρόντος είναι ένζυμα σχετιζόμενα με τα λιμονοειδή (*υδρολάση της λιμονικής λακτόνης, λιμονική αφυδρογονάση & γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών*) τα οποία θα αναλυθούν εκτενέστερα στα κεφάλαια 2 & 3.

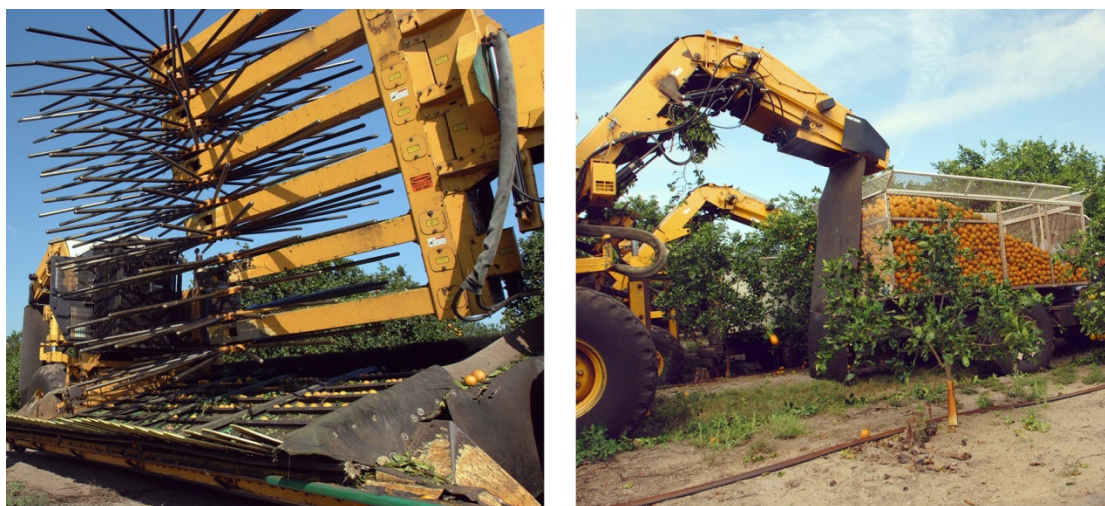
### 1.3 Παραγωγή πορτοκαλοχυμού

Η εμπορική αξία του πορτοκαλοχυμού είναι άμεσα εξαρτώμενη από τα ποιοτικά και θρεπτικά του χαρακτηριστικά. Προκειμένου αυτά να διασφαλιστούν, κάθε στάδιο της παραγωγής του, από τη συγκομιδή των καρπών μέχρι τη διάθεση των συσκευασιών στον τελικό καταναλωτή υπόκειται σε συνεχείς ελέγχους. Τα συνήθη στάδια παραγωγής πορτοκαλοχυμού είναι αναλύονται στις ακόλουθες παραγράφους.

#### 1.3.1 Συγκομιδή & αποθήκευση καρπών

Η περίοδος συγκομιδής πορτοκαλιών χυμοποίησης Navel ξεκινά τον Νοέμβριο και ολοκληρώνεται τον Μάιο του επομένου έτους. Για τα πορτοκάλια Valencia η αντίστοιχη περίοδος είναι από το Μάρτιο μέχρι τον Ιούνιο. Η συγκομιδή γίνεται είτε χειρωνακτικά (σε χώρες με χαμηλό εργατικό κόστος) είτε μηχανικά με την υποβοήθηση χημικών ουσιών που διευκολύνουν την αποκοπή του καρπού, όπως η CMNP (5-χλωρο-3-μεθυλ-4-νιτρο-1H- πυραζόλη), το etherphon (2-χλωροεθυλφωσφονικό οξύ) και η coronatine. Οι καρποί συλλέγονται σε κάδους ή σάκους και μεταφέρονται οδικώς στο εργοστάσιο επεξεργασίας.

Κατά την εκφόρτωση των καρπών στο εργοστάσιο, και πριν την αποθήκευσή τους σε αυτό, γίνεται και απομάκρυνση των ακαθαρσιών που συλλέγονται μαζί με τους καρπούς. Οι ακαθαρσίες αυτές είναι φύλλα, μικρά κλαδιά και χώμα τα οποία προκύπτουν λόγω της αδιάκριτης μηχανικής συγκομιδής και διαχωρίζονται με ειδικές συσκευές, είτε βαρυντικά είτε με μηχανική υποβοήθηση.



Εικόνα 1-7 - Μηχανική συγκομιδή καρπών

Στη συνέχεια οι καρποί περνούν από δειγματολήπτη ο οποίος λαμβάνει αντιπροσωπευτικό δείγμα κάθε παρτίδας πορτοκαλιών για ποιοτικές δοκιμές (απόδοση, ολικά διαλυτά στερεά, οξύτητα και °Brix) και από σταθμό διαλογής, όπου προσωπικό απορρίπτει ακατάλληλους καρπούς καθώς και τυχόν προσκολλημένους μίσχους.

Τέλος οι καρποί μεταφέρονται με ταινιόδρομους σε αποθηκευτικούς κάδους, όπου και παραμένουν μέχρι να προωθηθούν για περαιτέρω επεξεργασία.

### 1.3.2 Μεταφορά, πλύσιμο & διαλογή μεγέθους

Οι καρποί εκφορτώνονται βαρυτικά από τους κάδους αποθήκευσης και μεταφέρονται με ταινιόδρομους & αναβατόρια στο κτίριο επεξεργασίας τους.

Το πρώτο στάδιο επεξεργασίας είναι το πλύσιμο των καρπών προκειμένου να απομακρυνθεί τόσο η σκόνη όσο και τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων & εντομοκτόνων. Σε γραμμές παραγωγής συμπυκνωμένου χυμού το πλύσιμο γίνεται συχνά με συμπύκνωμα από τους εξατμιστήρες, ελατώνοντας έτσι τις ανάγκες νερού του εργοστασίου.

Μετά την πλύση οι καρποί περνάνε από δεύτερο σταθμό διαλογής και στη συνέχεια περνούν από διαχωριστή, όπου κατατάσσονται βάσει του μεγέθους τους.



Εικόνα 1-8 - Διαχωριστής μεγέθους Brown 5500

### 1.3.3 Εκχύμωση & φινίρισμα

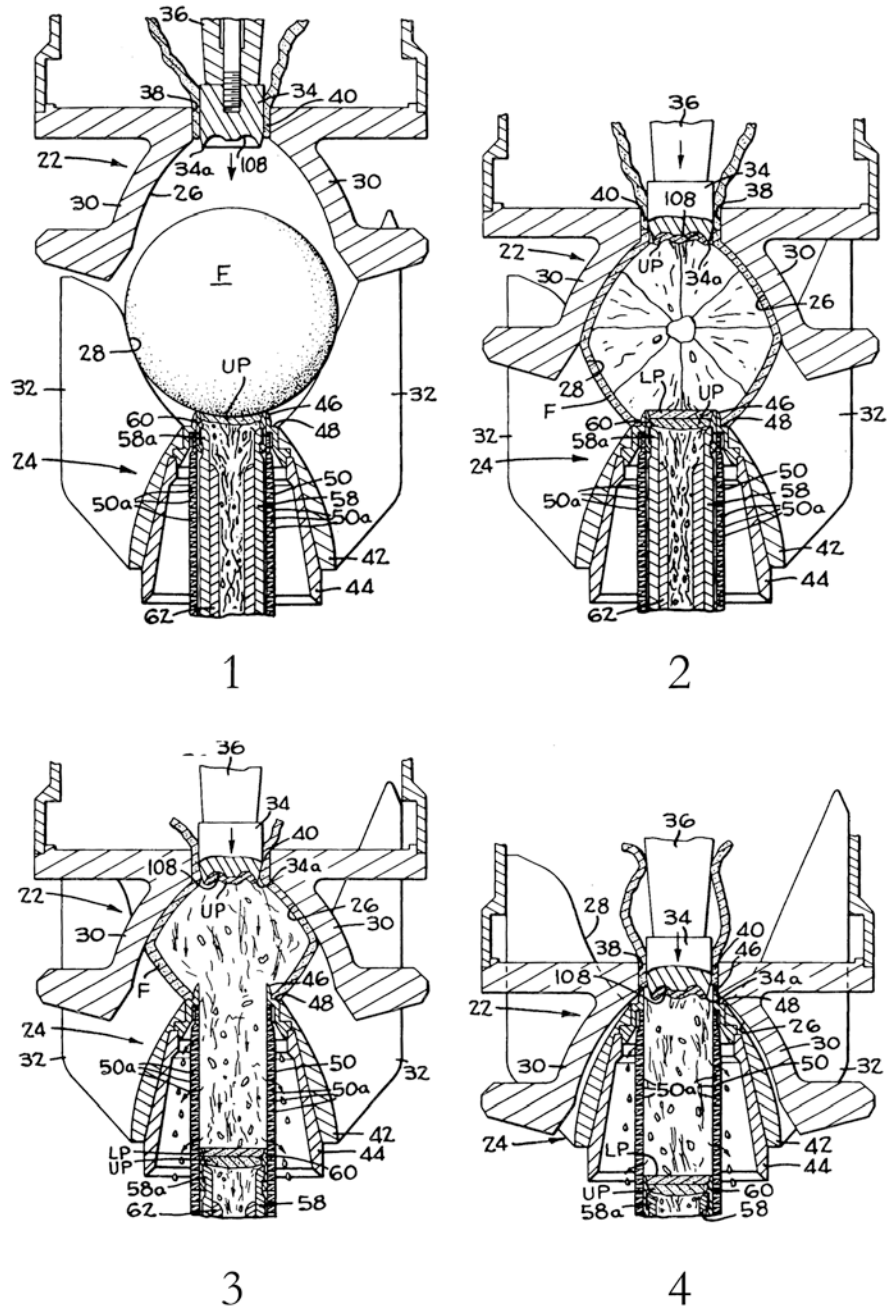
Η βιομηχανία φρούτων χρησιμοποιεί ως επί το πλείστο δύο τύπους εκχυμωτών, ονομαζόμενους από τις αντίστοιχες εταιρίες παραγωγής τους.

Ο εκχυμωτής τύπου **FMC** (Food Machinery Corporation) εξάγει το χυμό από ολόκληρο τον καρπό, χωρίς να προηγηθεί κοπή του στη μέση. Η κεφαλή του εκχυμωτή αποτελείται από δύο ημισφαιρικά στελέχη κατασκευασμένα από αλληλοεπικαλυπτόμενες μεταλλικές λωρίδες, έτσι ώστε το πάνω ημισφαίριο να μπορεί να ολισθήσει προς τα κάτω, και από ένα μεταλλικό σωλήνα προφινιρίσματος με αιχμηρά χείλη, προσαρμοσμένο στο κατώτατο σημείο του κάτω στελέχους.



Εικόνα 1-9 - Συστοιχία χυμοποιητών FMC

Στο πρώτο στάδιο του κύκλου εκχύμωσης ο καρπός πέφτει από τον τροφοδότη στην κάτω ημισφαιρική θήκη και το πάνω στέλεχος αρχίζει την κίνησή του προς τα κάτω (εικ. 1-9.1). Καθώς το πάνω στέλεχος ασκεί πίεση στον καρπό, ο σωλήνας προφινιρίσματος τρυπά το φλοιό του καρπού (εικ. 1-9.2). Στη συνέχεια του κύκλου το πάνω στέλεχος συνεχίζει την καθοδική του πορεία, ασκώντας περαιτέρω πίεση στον καρπό. Η πίεση ωθεί καθοδικά το ενδοκάρπιο στο σωλήνα προφινιρίσματος και αναγκάζει το φλοιό να βγει από το διάκενο του πάνω στελέχους (εικ. 1-9.3). Στο 4<sup>ο</sup> και τελευταίο στάδιο του κύκλου, με άσκηση μηχανικής πίεσης στο σωλήνα προφινιρίσματος το ενδοκάρπιο διαχωρίζεται σε χυμό και πούλπα, με το χυμό να οδηγείται προς περαιτέρω φινιρίσμα και την πούλπα μαζί με τα σπόρια να απορρίπτονται. Ο κύκλος ολοκληρώνεται με το άνοιγμα των δύο ημισφαιρικών στελεχών και την εισαγωγή του επόμενου καρπού.

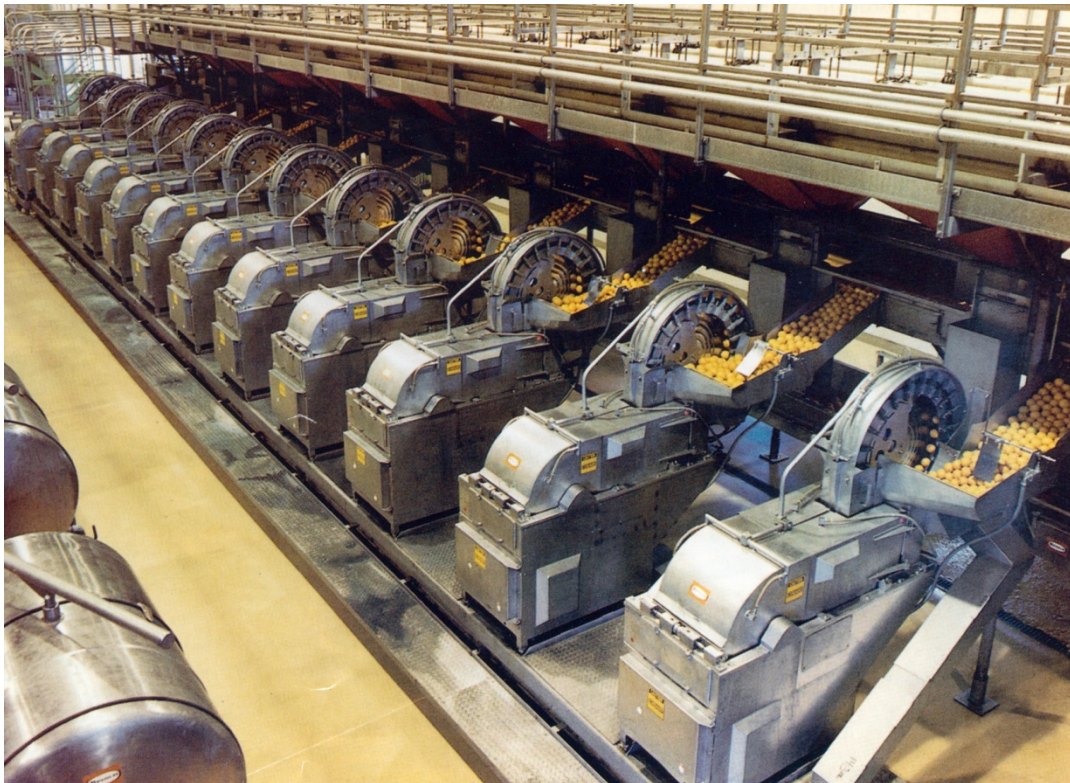


Εικόνα 1-10 - Κύκλος λειτουργίας εκχυμωτή FMC (US Patent 4700620 A)

Παράλληλα με την εκχύμωση, λόγω της σύνθλιψης του επικαρπίου απελευθερώνεται και σημαντική ποσότητα αιθερίων ελαίων, η οποία ανακτάται ως γαλάκτωμα με χρήση καταιονστή νερού και οδηγείται στο σύστημα ανάκτησης ελαίου.

Οι εκχυμωτές FMC διατίθενται σε μοντέλα 5 κεφαλών ανά εκχυμωτή (για μεσόια πορτοκάλια) καθώς και 3 κεφαλών (για μεγάλα πορτοκάλια και γκρέιπφρουτ) και 8 κεφαλών (για λεμόνια, λάιμ και μανταρίνια). Ένας εκχυμωτής 5 κεφαλών που λειτουργεί υπό ονομαστικές συνθήκες (δυναμικότητα 90%, ταχύτητα 100 στροφές/min) επεξεργάζεται 450 καρπούς/min, αποδίδοντας ~41 L/min χυμού 12 °Brix.

Αντίθετα με τα προαναφερθέντα, οι εκχυματές Brown κόβουν τον κάθε καρπό στη μέση. Στα μοντέλα Brown 520, 570, 620 & 720 το κάθε ήμισυ τοποθετείται σε μια κοίλη ημισφαιρική θήκη και πιέζεται με μία αντίστοιχη κυρτή ημισφαιρική ή κωνική κεφαλή, αφαιρώντας έτσι το χυμό και την πούλπα, ενώ ο εκχυματής Brown 1100 ασκεί πίεση μεταξύ στον καρπό τοποθετώντας τον μεταξύ ενός περιστρεφόμενου αυλακωτού δίσκου και ενός μεταλλικού πλέγματος. Καθώς ο δίσκος περιστρέφεται μαζί με τον καρπό, το διάκενο μεταξύ δίσκου και πλέγματος μειώνεται, πιέζοντας έτσι τον καρπό και απομακρύνοντας το χυμό και την πούλπα από τα διάκενα του πλέγματος. Λόγω του μηχανισμού άσκησης πίεσης, ειδικά στα μοντέλα 520-720 είναι πιθανότερο να συμπαρασυρθούν και μεγάλα κομμάτια περικαρπίου με το χυμό, κάτι που περιπλέκει το φινιρίσμα του χυμού.



Εικόνα 1-11 - Συστοιχία χυμοποιητών Brown 720

Οι χυμοί που παράγονται από εκχυματές Brown θεωρούνται χαμηλότερης ποιότητας αφενός για λόγους υγιεινής (καθώς έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να έρθουν σε επαφή με το εξωτερικό του καρπού) και αφετέρου διότι ο χυμός παραμένει σε επαφή με τα στερεά υπολείμματα του καρπού για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας τη διάχυση στο χυμό πικρών ουσιών καθώς και προδρόμων ενώσεών τους. Έτσι ο χυμός της διεργασίας Brown μπορεί να έχει έως και 25% υψηλότερη συγκέντρωση λιμονίνης από τον αντίστοιχο χυμό της διαδικασίας FMC. Η διαφορά αυτή είναι σημαντική, όπως θα αναλυθεί στο κεφάλαιο 2 του παρόντος, ειδικά σε ποικιλίες επιρρεπείς προς την πικρότητα όπως η Navel.

Ανεξαρτήτως της μεθόδου εκχύμωσης, ο παραληφθείς πολφός απαιτεί φινιρίσμα πριν την περαιτέρω επεξεργασία του. Οι συσκευές φινιρίσματος διαχωρίζουν την πούλπα, τα σπόρια και τις μεμβράνες από το χυμό πιέζοντας τον πολφό μεταξύ ενός περιστρεφόμενου κοχλία και ενός πλέγματος με οπές μικρής διαμέτρου (0.5-0.75 mm). Η πίεση που ασκείται για το διαχωρισμό ρυθμίζεται από τη βαλβίδα εξόδου της συσκευής φινιρίσματος και καθορίζει την ποιότητα του

χυμού αλλά και την απόδοση της διεργασίας. Υψηλότερη πίεση έχει σαν αποτέλεσμα υψηλότερη απόδοση καθώς μικρότερο μέρος του χυμού απορρίπτεται μαζί με την πούλλα, αλλά χαμηλότερη ποιότητα χυμού αφού τα συστατικά της πούλλας που προκαλούν ανεπιθύμητη γεύση συμπαρασύρονται στο φινιρισμένο χυμό.

Σε ορισμένες περιπτώσεις οι συσκευές φινιρίσματος τοποθετούνται σε σειρά, με την πρωτεύουσα να επιτυγχάνει την πρώτη παραλαβή χυμού με χαμηλό ποσοστό πούλλας υπό χαμηλή πίεση. Η πούλλα αυτής, με υψηλή περιεκτικότητα χυμού τροφοδοτείται στη δευτερεύουσα συσκευή η οποία ασκεί υψηλότερη πίεση, επιτυγχάνοντας έτσι υψηλή ανάκτηση χυμού. Η απορριφθείσα πούλλα χρησιμοποιείται συνήθως σε ζωοτροφές, είτε απ'ευθείας μετά τη συσκευή φινιρίσματος είτε μετά από πλύση για ανάκτηση διαλυτών συστατικών.

## 1.4 Κατεργασία πορτοκαλοχυμού

### 1.4.1 Κατηγορίες χυμών

Ανάλογα με την επιθυμητή χρήση του ο χυμός υποβάλλεται σε διαφορετική ένταση κατεργασίας, και βάσει αυτής προκύπτουν οι διαφορετικές κατηγορίες του τελικού προϊόντος. Τα είδη του πορτοκαλοχυμού μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

- Φυσικός χυμός, μη συμπυκνωμένος (*Not from concentrate, NFC*): είναι οι χυμοί που προέρχονται από την εκχύμωση του πορτοκαλιού και υποβάλλονται σε διήθηση, απαέρωση και παστερίωση.
- Συμπυκνωμένος χυμός: πέραν της παραπάνω κατεργασίας, οι συμπυκνωμένοι χυμοί υφίστανται συμπύκνωση με εξάτμιση.
- Χυμός πλήρους σύνθλιψης (*Comminute*): Ειδικό προϊόν το οποίο προκύπτει από την πολτοποίηση του πλήρους καρπού, ακολουθούμενη από διήθηση και συμπύκνωση του πολτού.
- Σακχαρούχοι χυμοί: Προκύπτουν από προσθήκη ζάχαρης σε φυσικό ή συμπυκνωμένο χυμό.

Ο μη συμπυκνωμένος χυμός είναι ποιοτικά ανώτερος του συμπυκνωμένου, καθώς στην παραγωγή του δεν περιλαμβάνεται στάδιο συμπύκνωσης-εξάτμισης, και κατά συνέπεια διατηρεί τις πτητικές ουσίες που του προσδίδουν ευχάριστα γευστικά χαρακτηριστικά. Ο NFC χυμός έχει μικρότερη διάρκεια ζωής από τον συμπυκνωμένο. Παρόλα αυτά οι καταναλωτές προτιμούν τον πρώτο καθώς εκτός των ανώτερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του, διατηρούνται κατά το δυνατόν αμετάβλητες και σημαντικές φυσικές ουσίες του πορτοκαλιού (βιταμίνες, αμινοξέα, αντιοξειδωτικά).

#### 1.4.2 Απομάκρυνση ελαίου & απαέρωση

Κατά την εκχύμωση ένα μέρος των αιθέριων ελαίων του επικαρπίου διασπείρεται στο χυμό, με το φαινόμενο αυτό να παρατηρείται εντονότερο στους εκχυμωτές FMC. Υψηλές συγκεντρώσεις ελαίου αποδίδουν ανεπιθύμητο άρωμα στο χυμό, και κατά συνέπεια καθίσταται απαραίτητη η ρύθμισή τους. Παλαιότερα αυτή μπορούσε να επιτευχθεί μόνο με ελάττωση της πίεσης εκχύμωσης. Στις σύγχρονες γραμμές παραγωγής υπάρχουν απελαιωτές, οι οποίοι επιτυγχάνουν απομάκρυνση των ελαίων με θέρμανση και απότομη εκτόνωση (flash evaporation) σε θάλαμο κενού. Οι ατμοί συμπυκνώνονται και διαχωρίζονται φυγοκεντρικά σε υδατική και ελαιώδη φάση, με την πρώτη να επιστρέφεται στο χυμό.

Η απαέρωση του χυμού είναι απαραίτητη καθώς η παρουσία διαλυμένου οξυγόνου ελαττώνει την περιεκτικότητα της βιταμίνης C αλλά και υποβαθμίζει τα οργανοληπτικά συστατικά του τελικού προϊόντος λόγω οξειδωτικών αντιδράσεων. Οι απελαιωτές κενού επιτυγχάνουν ταυτόχρονα και απαέρωση του χυμού, οπότε δεν απαιτείται ξεχωριστή διεργασία.

Στις γραμμές παραγωγής μη συμπυκνωμένου χυμού η θερμοκρασία της απελαιώσης ρυθμίζεται έτσι ώστε παράλληλα να επιτυγχάνεται και παστερίωση του χυμού (περίπου 90-91 °C), ο οποίος ακολούθως συσκευάζεται υπό υψηλή θερμοκρασία.

#### 1.4.3 Θερμική παστερίωση

Ο πορτοκαλοχυμός παστεριώνεται με σκοπό την ενζυμική και μικροβιακή σταθεροποίησή του. Συνήθη προβλήματα που εμφανίζονται στους μη παστεριωμένους χυμούς είναι ο διαχωρισμός τους (με συνέπεια την απώλεια θολερότητας), ενζυμικές μεταβολές στο χρώμα και το άρωμα, ζυμώσεις και μικροβιακές αλλοιώσεις.

Η παστερίωση των φρέσκιων χυμών αποσκοπεί πρωτίστως στην απενεργοποίηση της πηκτινομεθυλεστεράσης (PME), η οποία προκαλεί διαχωρισμό του χυμού. Το ένζυμο παρουσιάζει αρκετά υψηλή θερμοανθεκτικότητα, οπότε η απενεργοποίησή του γίνεται με παστερίωση υψηλής θερμοκρασίας/σύντομου χρόνου (HTST), σε θερμοκρασία 85-95°C και χρόνο 10-60s. Η θέρμανση του χυμού γίνεται σε επίπεδους (πλακοειδείς) ή σωληνοειδείς εναλλάκτες θερμότητας με χρήση ατμού, ενώ μετά την παστερίωσή του ο χυμός ψύχεται τάχιστα σε ακόλουθους εναλλάκτες προκειμένου να αποφευχθεί ανεπιθύμητη υποβάθμιση των ποιοτικών του χαρακτηριστικών.





Εικόνα 1-12 - Πλακιοειδής παστεριωτής χυμού APV

Εκτός της απενεργοποίησης της ΠΜΕ η παστερίωση του χυμού επιτυγχάνει και τη μικροβιακή σταθεροποίησή του. Οι χρησιμοποιούμενες συνθήκες παστερίωσης επιτυγχάνουν ικανοποιητική απενεργοποίηση αλλοιογόνων βακτηρίων (κυρίως *Lactobacillus* spp. και *Leuconostoc* spp.) και ζυμομυκήτων, αν και στην πρόσφατη βιβλιογραφία αναφέρονται περιστατικά μόλυνσης πορτοκαλοχυμού με βακτήρια του γένους *Alicyclobacillus*.

Τα βακτήρια αυτά, με προεξάρχον το είδος *A. acidoterrestis*, χαρακτηρίζονται ως θερμοφιλά οξεόφιλα (Thermophilic Acidophilic Bacteria) και όπως υποδηλώνεται από την ονομασία τους επιδεικνύουν ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στις σχετικά ήπιες συνθήκες παστερίωσης του χυμού, παρουσιάζοντας εύρος τιμών  $D_{95^{\circ}\text{C}}$  από 2.5 έως 8.7 λεπτά (Eiroa et al., 1999). Μόλυνση του χυμού με *A. acidoterrestis* έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη χαρακτηριστικού «φαρμακευτικού» αρώματος λόγω της παραγωγής γουαϊακόλης.

Ακόμα υψηλότερη σημασία παρουσιάζει φυσικά η αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών. Ο πορτοκαλοχυμός παρουσιάζει ιδιαίτερος όξινο περιβάλλον (τυπικό pH 2.9-4), με αποτέλεσμα μέχρι πρόσφάτως να θεωρείται αδύνατη η ανάπτυξη παθογόνων σε αυτόν (Μαζζοτά, 2001), αλλά η πρόσφατη βιβλιογραφία (Jain et al., 2009; Vojdani et al., 2008) ανατρέπει την πεποίθηση αυτή καθώς παρουσιάζει περιστατικά μόλυνσης εμπορικά διαθέσιμου πορτοκαλοχυμού με παθογόνα βακτήρια, και συγκεκριμένα *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium (οροποικιλία της *Salmonella enterica* subsp. *enterica*) και *Listeria monocytogenes*. (S-Y Lee et al., 2012). Οι απαιτούμενη ελάττωση του μικροβιακού φορτίου των πορτοκαλοχυμών κατά 5-log μπορεί να επιτευχθεί με συμβατικές μεθόδους θερμικής παστερίωσης, αλλά με σημαντική επίπτωση στα οργανοληπτικά & θρεπτικά συστατικά του χυμού (Braddock, 1999).

Εναλλακτικές μέθοδοι για την αντιμετώπιση των προαναφερθέντων παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών αναπτύσσονται στα τμήματα 1.5 & 1.6 του παρόντος.

#### 1.4.4 Αποπίκρυνση

Ο πορτοκαλοχυμός που προέρχεται από πρώιμους καρπούς, καθώς και από ποικιλίες Navel αναπτύσσει έντονα πικρή γεύση μετά την παστερίωσή του. Προκειμένου ο χυμός να είναι οργανοληπτικά αποδεκτός υποβάλλεται σε κατάλληλη επεξεργασία προκειμένου να μειωθεί η ένταση της πικρότητας. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αποπίκρυνση και βασίζεται στην προσρόφηση των πικρών συστατικών σε πορώδεις συνθετικές ρητίνες.

Οι τρέχουσες μέθοδοι αποπίκρυνσης παρουσιάζουν μειονεκτήματα όσον αφορά το κόστος αλλά και την επίδρασή τους στα θρεπτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του χυμού, με αποτέλεσμα την ενεργή έρευνα πάνω σε εναλλακτικές μεθόδους.

Η διεργασίες αποπίκρυνσης, τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους καθώς και οι εναλλακτικές διεργασίες μελετώνται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2 του παρόντος.

#### 1.4.5 Συμπύκνωση

Ορισμένες κατηγορίες πορτοκαλοχυμού, αλλά και άλλων χυμών εσπεριδοειδών υφίστανται συμπύκνωση προκειμένου να καταστεί ευκολότερη η αποθήκευσή και μεταφορά τους. Επιπλέον, η απομάκρυνση νερού έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της χημικής και μικροβιακής σταθερότητας του χυμού και κατά συνέπεια την αύξηση της διάρκειας ζωής του.

Οι θερμοκρασίες που απαιτούνται για την εξάτμιση του νερού επηρεάζουν αρνητικά τη γεύση και το άρωμα του πορτοκαλοχυμού, για αυτό και η συμπύκνωση του πραγματοποιείται σε εξατμιστήρες TASTE (*Thermally Accelerated Short Time Evaporator*), με εφαρμογή θερμοκρασίας 85 - 90°C υπό μερικό κενό για ~30 δευτερόλεπτα. Ο χυμός ψύχεται σε εναλλάκτες θερμότητας μέχρι θερμοκρασίας ~13 °C και στη συνέχεια υφίσταται υπερδιήθηση για το διαχωρισμό της πούλπας και περαιτέρω συμπύκνωση με αντίστροφη ώσμωση. Τέλος, η πούλπα επαναπροστίθεται στο χυμό. Το προκύπτον προϊόν έχει περιεκτικότητα σε στερεά μεταξύ 60 - 65 °Brix.

#### 1.4.6 Συσκευασία

Ο φρέσκιος (*not from concentrate, NFC*) πορτοκαλοχυμός συσκευάζεται μετά την παστερίωση υπό υψηλή θερμοκρασία προκειμένου να επιτευχθούν ασηπτικές συνθήκες. Οι περιέκτες (πολυστρωματικές συσκευασίες, μεταλλικά κουτιά ή γυάλινα μπουκάλια) προθερμαίνονται πριν την πλήρωση, και στη συνέχεια ο συσκευασμένος χυμός οδηγείται προς ψύξη. Τα τελικά προϊόντα αποθηκεύονται σε δροσερό μέρος, ή υπό ψύξη (~4 °C).

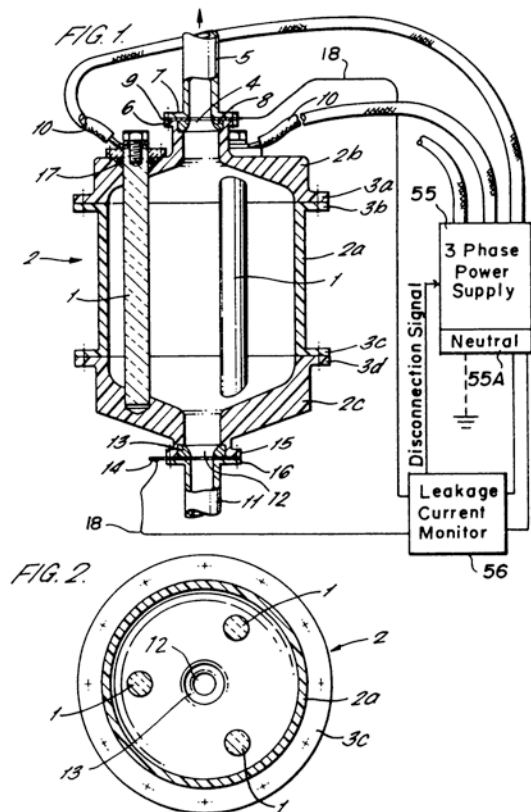
Ο χυμός που προκύπτει από συμπύκνωση συσκευάζεται ασηπτικά και αποθηκεύεται υπό κατάψυξη, σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των -12 °C. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα υποβάλλεται σε ελέγχους για να ελεγχθεί το μη ενζυμικό μαύρισμα, η περιεκτικότητά του σε ασκορβικό οξύ καθώς και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του.

## 1.5 Εναλλακτικές μέθοδοι παστερίωσης

### 1.5.1 Εναλλακτικές θερμικές μέθοδοι

Εκτός της συμβατικής θερμικής μεθόδου παστερίωσης, τις τελευταίες δεκαετίες αναπτύσσονται εναλλακτικές θερμικές μέθοδοι, οι οποίες είναι πλέον εμπορικά εφαρμόσιμες. Οι κυριότερες αυτών, ειδικά στην επεξεργασία του πορτοκαλοχυμού είναι η ωμική θέρμανση, με δευτερεύοντα ρόλο να κατέχουν η θέρμανση με ραδιοσυχνότητες και με μικροκύματα.

Οι πρώτες ευρεσιτεχνίες για τεχνικές ωμικής θέρμανσης εμφανίζονται στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, όμως οι ιδιαίτερες απαιτήσεις της μεθόδου (αυστηρός έλεγχος των λειτουργικών παραμέτρων και χημικά αδρανή ηλεκτρόδια) κατέστησαν αδύνατη την εφαρμογή στην παραγωγή τροφίμων της μέχρι το 1989 (Goullieux & Pain, 2005).



Εικόνα 1-13 - Διάταξη ωμικής θέρμανσης  
(US Patent 5440667 A)

του αλλοιογόνου *A. acidoterrestris* (Baysal & Icier, 2010) όσο και των παθογόνων *E. coli* O157:H7, *Salm. Typhimurium* & *L. monocytogenes* (S-Y Lee et al., 2012).

Η ένταση και η συχνότητα του ηλεκτρικού πεδίου, καθώς και η κυματομορφή του (ημιτονοειδής, τριγωνική ή τετραγωνική), επηρεάζουν το ρυθμό θέρμανσης του τροφίμου αλλά και την προαναφερθείσα μη θερμική δράση. Κατά συνέπεια, η σωστή επιλογή των λειτουργικών παραμέτρων της διεργασίας έχει καθοριστική σημασία για την επίτευξη της βέλτιστης σταθεροποίησης με την ελάχιστη υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών (Su-Yeon Lee et al., 2013).

Η ωμική θέρμανση βασίζεται στο φαινόμενο Joule, δηλαδή στην παραγωγή θερμότητας σε ένα αγωγίμο μέσο λόγω της διέλευσης ηλεκτρικού ρεύματος. Σε υγρά τρόφιμα όπως ο πορτοκαλοχυμός η μέθοδος είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική καθώς παράγει έντονη θέρμανση με ομοιογενές θερμοκρασιακό προφίλ και εξαιρετικό έλεγχο της θερμοκρασίας, βοηθώντας έτσι την αποτελεσματική αδρανοποίηση ενζύμων & μικροοργανισμών χωρίς σημαντική απώλεια ποιοτικών χαρακτηριστικών.

Η ωμική θέρμανση παρουσιάζει και ένα δευτερεύον πλεονέκτημα έναντι της συμβατικής όσον αφορά την απενεργοποίηση των μικροοργανισμών. Το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο (συνήθως της τάξης των 20-60 V/cm) και η χαμηλή συχνότητα (50-60 Hz) δημιουργούν ηλεκτροπόρωση της μεμβράνης των μικροβιακών κυττάρων, δρώντας επικουρικά στη θερμική απενεργοποίησή τους (Icier, 2012). Κατά συνέπεια η ωμική θέρμανση αποτελεί αποτελεσματικότερη μέθοδο απενεργοποίησης τόσο

Η ωμική θέρμανση συνεχούς ροής βρίσκει αυξανόμενη αποδοχή στις βιομηχανίες επεξεργασίας χυμού καθώς προσφέρει ένα ποιοτικά ανώτερο και μικροβιακά ασφαλέστερο προϊόν σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους παστερίωσης.

Σε αντίθεση με την ωμική θέρμανση, η θέρμανση με μικροκύματα δεν παρουσιάζει κάποιο συνεργιστικό φαινόμενο, καθώς η μικροβιακή απενεργοποίηση οφείλεται αποκλειστικά στη θέρμανση του τροφίμου (Cañumir et al., 2002). Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και για τη θέρμανση με χρήση ραδιοσυχνότητας εξαιτίας της χαμηλής έντασης του εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (Geveke et al., 2002). Παρ'όλα αυτά, οι δύο αυτές τεχνικές θεωρούνται υποσχόμενες καθώς προσφέρουν πολύ καλό έλεγχο των λειτουργικών παραμέτρων της παστερίωσης, επιτρέποντας έτσι τη διατήρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του τροφίμου.

### 1.5.2 Μη θερμικές μέθοδοι παστερίωσης

Εκτός των συμβατικών & εναλλακτικών μεθόδων θερμικής κατεργασίας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μη θερμικές μέθοδοι. Όπως υποδηλώνει η ονομασία τους, αυτές προσφέρουν αποτελεσματική επεξεργασία του προϊόντος, επιτυγχάνοντας πλήρη ενζυμική & μικροβιακή σταθεροποίησή του, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (ή χαμηλότερη από τις αντίστοιχες θερμικές) και κατά συνέπεια χωρίς τη θερμική υποβάθμιση των ποιοτικών του χαρακτηριστικών. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία σε προϊόντα όπως ο πορτοκαλοχυμός, πρωτεύοντα χαρακτηριστικά των οποίων είναι η υψηλή θρεπτική αξία και η φρέσκια γεύση & εμφάνιση. Οι μη θερμικές μέθοδοι κατεργασίας βρίσκουν αυξανόμενη αποδοχή από τη βιομηχανία τροφίμων, παρά το υψηλό κόστος επενδύσεων που τις συνοδεύει.

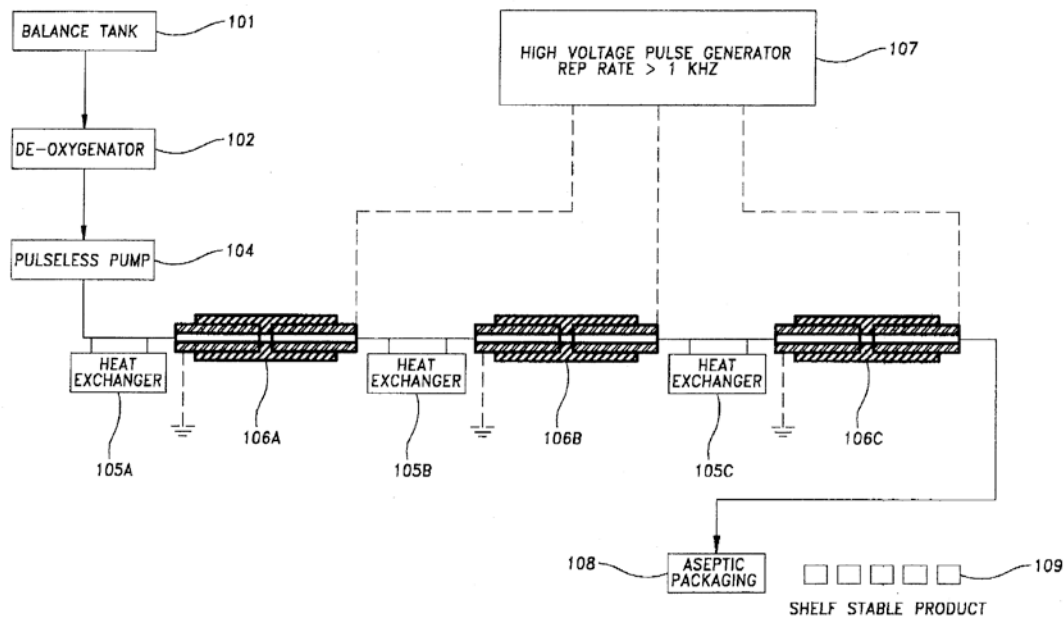
Μια ιστορική μη θερμική μέθοδος παστερίωσης, με ευρεία εφαρμογή από τα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα, είναι η ακτινοβολία με ιονίζουσα ακτινοβολία. Η συνηθέστερη ακτινοβολία είναι οι ακτίνες γ, οι οποίες παράγονται από τη διάσπαση του ραδιοϊσοτόπου <sup>60</sup>Co, αν και σε ορισμένες εφαρμογές χρησιμοποιούνται ακτίνες X ή σωματίδια β (δέσμη ηλεκτρονίων). Η ιονίζουσα ακτινοβολία έχει διπλό μηχανισμό δράσης, καθώς απενεργοποιεί μικροοργανισμούς τόσο μέσω πρόκλησης απευθείας βλαβών στο γενετικό τους υλικό όσο και μέσω της δημιουργίας ελεύθερων ριζών λόγω της ραδιόλυσης του τροφίμου. Η ακτινοβολία χρησιμοποιείται συνήθως για αποστείρωση τροφίμων πολύ μακράς διάρκειας, κυρίως κονσέρβες, ενώ δε βρίσκει εφαρμογή στην παραγωγή χυμών. Τα τρόφιμα που έχουν υποστεί επεξεργασία με ιονίζουσα ακτινοβολία επισημαίνονται με το λογότυπο Radura (εικ. 1-14).



Εικόνα 1-14 - Σήμα Radura

Μια υποσχόμενη μέθοδος μη θερμικής κατεργασίας χυμών είναι τα παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία (PEF). Η μέθοδος αυτή καλύπτει πλήρως τις απαιτήσεις των καταναλωτών για επεξεργασμένα τρόφιμα με φρέσκια εμφάνιση και μικρή υποβάθμιση των παραμέτρων ποιότητας. Η μέθοδος βασίζεται στην εφαρμογή ταχέως παλλόμενων (πολλαπλά kHz) ηλεκτρικών πεδίων υψηλής έντασης (15-100 kV/cm), τα οποία προκαλούν ηλεκτροδιάτρηση (μη αναστρέψιμη ηλεκτροπόρωση) των μικροβιακών κυττάρων.

Οι κύριες λειτουργικές παράμετροι που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα της διεργασίας είναι η ένταση του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου και ο αριθμός των παλμών που δέχεται το τρόφιμο (ή αντίστοιχα ο ολικός χρόνος κατεργασίας του τροφίμου). Ο βαθμός απενεργοποίησης των μικροοργανισμών εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού, το pH του τροφίμου και από την ένταση & διάρκεια της κατεργασίας (García et al., 2005).



Εικόνα 1-15 - Διάταξη κατεργασίας χυμού με PEF (US Patent 5690978 A)

Η εφαρμογή παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας του τροφίμου λόγω ωμικής θέρμανσης. Το φαινόμενο αυτό, αν και δευτερεύον, δρα συνεργιστικά διευκολύνοντας την ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων και αυξάνοντας αντίστοιχα την αποτελεσματικότητα της μεθόδου (Pothakamury et al., 1996). Η θέρμανση αυτή ελέγχεται με εναλλάκτες θερμότητας προκειμένου να αποφευχθεί η θερμική υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του χυμού.

Η παραπάνω μέθοδος, αν και έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή χυμού πολύ υψηλής ποιότητας & σταθερότητας (Ayhan et al., 2002) δεν έχει βρει ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία, καθώς έχει ως βασικό ανασταλτικό παράγοντα το σημαντικό κόστος του απαιτούμενου εξοπλισμού.

Η σημαντικότερη μέθοδος μη θερμικής κατεργασίας πορτοκαλοχυμού, αλλά και με ευρύ πεδίο εφαρμογής σε άλλα υγρά & στερεά τρόφιμα, είναι η υπερυψηλή υδροστατική πίεση (ΥΥΠ). Λόγω της εκτεταμένης χρήσης της στη βιομηχανία χυμών, αλλά και της εφαρμογής της στην παρούσα εργασία, η μέθοδος θα αναλυθεί εκτενέστερα στην ενότητα 1.6.

## 1.6 Υπερυψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΥΠ)

Η αγορά των χυμών στρέφεται σταδιακά προς προϊόντα ελάχιστης κατεργασίας (minimally processed), καθώς οι καταναλωτές απαιτούν χυμούς υψηλής ποιότητας, άνευ προσθέτων & συντηρητικών και με φρέσκια γεύση & άρωμα (Pilavtere-Çelik, 2013). Φυσικά, η μικροβιακή σταθερότητα και η παρατεταμένη διάρκεια ζωής του τροφίμου θεωρούνται δεδομένες.

Η τεχνολογία της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης αποτελεί μία άκρως ελιυστική εναλλακτική της θερμικής παστερίωσης για χυμούς φρούτων & λαχανικών, καθώς διατηρεί αναλλοίωτα τα θρεπτικά & οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των χυμών, επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα τη μικροβιακή & ενζυμική αδρανοποίησή τους.

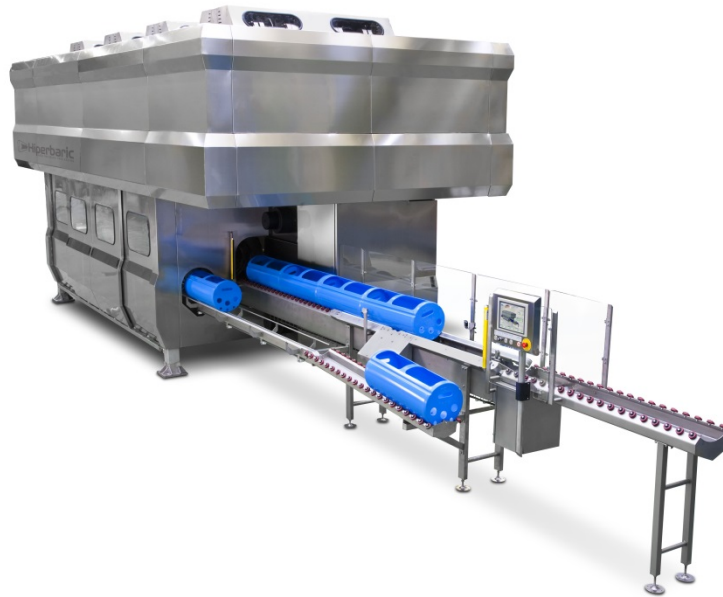
Η έρευνα επί της εφαρμογής ΥΥΠ στην κατεργασία τροφίμων ξεκίνησε στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, με την κατασκευή διάταξης άσκησης πίεσης από τον B.H. Hitte το 1899. Η διάταξη του Hitte, παρά την πρωτοποριακή για την εποχή τεχνολογία και την αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητά της, ήταν ακατάλληλη για μαζική χρήση στη βιομηχανία τροφίμων. Λόγω των υψηλών εφαρμοζόμενων πιέσεων, η τεχνολογία ΥΥΠ απαιτεί τόσο υλικά υψηλής αντοχής όσο και συστήματα ελέγχου υψηλής ακριβείας προκειμένου να επιτύχει υψηλή δυναμικότητα (Balci & Wilbey, 1999). Κατά συνέπεια η εφαρμογή της σε ευρεία κλίμακα δεν ήταν οικονομικά εφικτή μέχρι την αρχή της δεκαετίας του 1990, όταν τα πρώτα κατεργασμένα με ΥΥΠ προϊόντα (χυμοί, μαρμελάδες και τρυφεροποιημένο κρέας) έκαναν την εμφάνισή τους στην Ιαπωνική αγορά (Mertens, 1995; Thakur & Nelson, 1998).

Σήμερα η τεχνολογία της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης χρησιμοποιείται ευρέως σε παγκόσμιο επίπεδο για την κατεργασία χυμών & παρασκευασμάτων φρούτων, τυριών, αλλαντικών, προϊόντων κρέατος, ψαριών, μαλακίων και οστρακοδέρμων (Rastogi et al., 2007). Το κόστος εφαρμογής της κυμαίνεται μεταξύ \$0.05-0.5 ανά kg ή L, το οποίο την καθιστά συγκρίσιμη ή ακριβότερη της συμβατικής θερμικής παστερίωσης (Balasubramaniam, 2003; Thakur & Nelson, 1998).

### 1.6.1 Εξοπλισμός Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης

Στον πυρήνα ενός τυπικού βιομηχανικού συστήματος ΥΥΠ βρίσκεται ένα κυλινδρικό δοχείο πίεσης, το οποίο είναι κατασκευασμένο από ανοξείδωτο ατσάλι και ενισχύεται με περιτύλιξη ατσάλινου σύρματος υψηλής αντοχής (τεχνολογία wirewound).

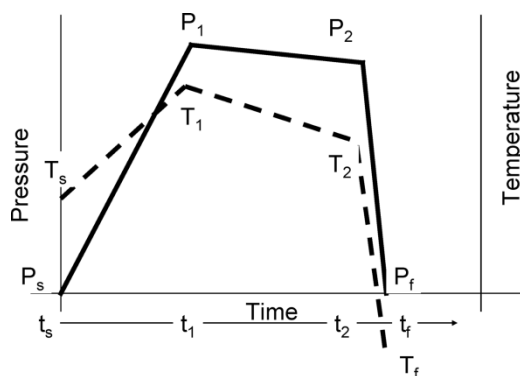
Το τρόφιμο συσκευάζεται σε εύκαμπτη συσκευασία (ασκό ή πλαστική φιάλη) και τοποθετείται σε κυλινδρικά κάμιστρα τα οποία ακολούθως φορτώνονται στο δοχείο πίεσης.



Εικόνα 1-16 - Σύστημα κατεργασίας ΥΥΠΙ Hiperbaric 420

Ο θάλαμος σφραγίζεται, πληρώνεται με μέσο μεταφοράς πίεσης (συνήθως γλυκερόλη) και η πίεση αυξάνεται μέχρι της επιθυμητής με τη χρήση ενισχυτών πίεσης, η λειτουργία των οποίων αναλύεται στο κεφάλαιο 4 του παρόντος. Λόγω της ισοστατικής εφαρμογής πίεσης η γεωμετρία του τροφίμου συνήθως δεν επηρεάζει την εφαρμοζόμενη πίεση, με αποτέλεσμα την εξαιρετικά ομοιογενή κατεργασία των τροφίμων, αν και στη βιβλιογραφία απαντώνται περιπτώσεις ανομοιογένειας σε στερεά & ημιστερεά τρόφιμα (Minerich & Labuza, 2003).

Για την κατεργασία χυμών εφαρμόζονται συνήθως πιέσεις 100-900 MPa, ενώ ο χρόνος κατεργασίας ποικίλει από 1-10 λεπτά (Rastogi et al., 2007). Κατά την άσκηση πίεσης η θερμοκρασία του τροφίμου αυξάνεται λόγω της αδιαβατικής θέρμανσής του. Η αύξηση της θερμοκρασίας για το καθαρό νερό είναι περίπου 3°C ανά 100 MPa πίεσης (Knoerzer et al., 2010), τιμή η οποία αποτελεί πολύ καλή προσέγγιση και για με υψηλό ποσοστό νερού, όπως οι χυμοί.



Εικόνα 1-17 - Τυπικό διάγραμμα πίεσης - θερμοκρασίας σε μη μονωμένο δοχείο πίεσης

Η εφαρμογή της πίεσης μπορεί να συνοδεύεται και από επιπλέον θέρμανση του τροφίμου. Η αυξημένη θερμοκρασία δρα συνεργιστικά με την πίεση (Hogan et al., 2005) στην αδρανοποίηση των μικροοργανισμών, ιδιαίτερα για θερμοκρασίες 50-70°C. Η συνεργιστική δράση πίεσης-θερμοκρασίας είναι μία αποτελεσματική μέθοδος καταπολέμησης θερμοάντοχων μικροοργανισμών όπως τα σπόρια των *Clostridium spp.* & *Bacillus spp.* (Meyer et al., 2000).

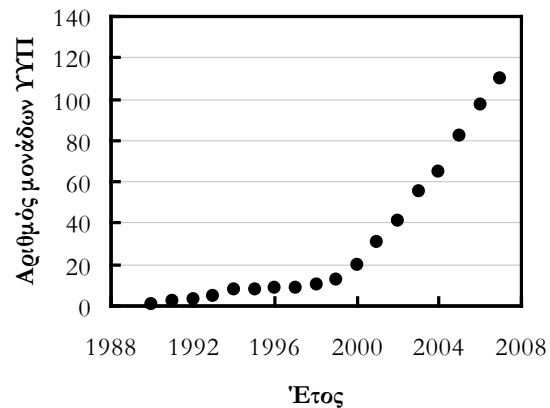
### 1.6.2 Βιομηχανικές μονάδες ΥΥΠ

Οι δύο πρώτες εγκαταστάσεις ΥΥΠ βιομηχανικής κλίμακας κατασκευαστήκαν στις αρχές της δεκαετίας του '90 στην Ιαπωνία από τη Mitsubishi Heavy Industry (MHI). Η πρώτη εγκατάσταση (1990) πραγματοποιήθηκε σε εργοστάσιο της Ιαπωνικής εταιρείας Meidi-Ya και χρησιμοποιήθηκε για την παστερίωση μαρμελάδων. Ένα χρόνο αργότερα (1991) εγκαταστάθηκε η δεύτερη μονάδα στην εταιρεία Rosca και χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία χυμού γκρέιπφρουτ (Hoti et al., 1992). Μέχρι τα τέλη του 2007, περίπου 110 μονάδες ΥΥΠ λειτουργούσαν στη βιομηχανία τροφίμων παγκοσμίως, το 80% αυτών εγκαταστάθηκαν μετά το 2000 (Εικόνα 1-18). Η αργή είσοδος της ΥΥΠ στη βιομηχανία τροφίμων οφείλεται αφενός στο γεγονός ότι πρόκειται για μια καινοτόμο διεργασία τα πλεονεκτήματα της οποίας άρχισαν να γίνονται ευρέως γνωστά με την έναρξη της καινούριας χιλιετίας και αφετέρου από την τυχόν ανεπάρχεια των πρώτων εξοπλισμών ΥΥΠ.

Ο μεγαλύτερος αριθμός μονάδων ΥΥΠ βρίσκεται κυρίως στη Β. Αμερική (Καναδά, Μεξικό και ΗΠΑ), στην Ευρώπη (Ισπανία, Ιταλία, Πορτογαλία, Γαλλία, Αγγλία και Γερμανία) και στην Ασία, κυρίως στην Ιαπωνία. Η συνολική παραγωγή προϊόντων ΥΥΠ εκτιμάται να είναι περίπου 150000 τόνοι/χρόνο και αυξάνεται σταθερά (Hernando Saiz et al., 2008). Η εφαρμογή της ΥΥΠ στην Ευρώπη ήρθε αργότερα σε σχέση με εκείνη του Καναδά, των ΗΠΑ και της Ιαπωνίας, γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην υπάρχουσα ευρωπαϊκή νομοθεσία, σύμφωνα με την οποία τρόφιμα και συστατικά τροφίμων για τα οποία έχει εφαρμοστεί μέθοδος παραγωγής που δεν χρησιμοποιείται ευρέως θα πρέπει να εναρμονίζονται με τον κανονισμό σχετικά με τα νέα τρόφιμα και τα νέα συστατικά τροφίμων (ΕΚ, αριθ. 258/97 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 27ης Ιανουαρίου 1997).

Ο αντικειμενικός στόχος των κατασκευαστριών εταιριών κατά το σχεδιασμό μονάδων ΥΥΠ είναι η κατασκευή ασφαλούς, αξιόπιστου και παραγωγικού εξοπλισμού. Επίσης, πολύ σημαντική είναι η κατασκευή εξοπλισμού εύκολου στην εγκατάσταση και το χειρισμό, με μεγάλη διάρκεια ζωής λειτουργώντας για πολλές συνεχόμενες ώρες σε πίεση 600 MPa (πίεση η οποία χρησιμοποιείται στα περισσότερα προϊόντα ΥΥΠ). Ο υπάρχον εξοπλισμός διακρίνεται σε εκείνους που βρίσκονται σε οριζόντια και εκείνους σε κάθετη θέση (Εικόνα 1-19).

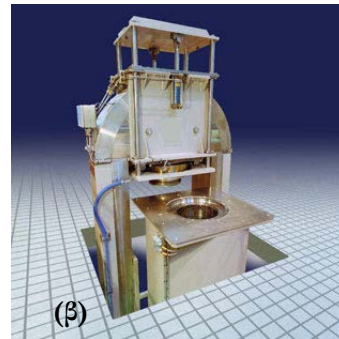
Η ιδέα της οριζόντιας θέσης (με τη δυνατότητα πολλαπλών δοχείων συμπίεσης συνδεδεμένα σε συστοιχία ενισχυτών πίεσης) είχε αρχικά προταθεί από τη Mitsubishi Heavy Industry με στόχο τη βελτιστοποίηση της ροής συσκευασμένων τροφίμων. Ο σχεδιασμός εξοπλισμού ΥΥΠ σε οριζόντια θέση παρουσιάζει τρία βασικά πλεονεκτήματα. Αρχικά, βοηθάει στην ιχνηλασιμότητα των προϊόντων αφού τα προϊόντα εισέρχονται στον θάλαμο συμπίεσης από τη μία πλευρά και εξέρχονται αυτού από την άλλη πλευρά. Αντίθετα, στην περίπτωση της κάθετης θέσης η είσοδος και η έξοδος των προϊόντων πραγματοποιείται από την ίδια πλευρά του δοχείου συμπίεσης αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο σύγχυσης μεταξύ των επεξεργασμένων και των προς επεξεργασία προϊόντων. Κατά



Εικόνα 1-18 - Ο αριθμός μονάδων ΥΥΠ που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως στη βιομηχανία τροφίμων (Tonello, 2014)



δεύτερον, οι διαστάσεις ενός εξοπλισμού ΥΥΠ σε οριζόντια θέση ευνοούν τη μεταφορά και εγκατάστασή του στο εργοστάσιο. Τέλος, δίνει τη δυνατότητα αυτόματης φόρτωσης/εκφόρτωσης των προϊόντων ελαχιστοποιώντας έτσι τον χρόνο φόρτωσης και εκφόρτωσης (η κατασκευάστρια εταιρία NC Hyperbaric έχει μειώσει τον χρόνο στα 8 s) δίνοντας έτσι τη δυνατότητα εργασίας με ένα συνεχή τρόπο αφού την ώρα που τα επεξεργασμένα προϊόντα εξέρχονται του θαλάμου συμπίεσης από τη μία πλευρά ταυτόχρονα μπορεί να γίνεται η φόρτωση των προς επεξεργασία προϊόντων από την άλλη πλευρά του θαλάμου.



Εικόνα 1-19 - Εξοπλισμός ΥΥΠ βιομηχανικής κλίμακας (α) οριζόντιας θέσης (Wave 600/55, NC Hyperbaric) και (β) κάθετης θέσης (215L-600 HPP System, Avure)

Παγκοσμίως υπάρχουν αρκετές εταιρίες κατασκευής εξοπλισμού ΥΥΠ, τόσο πιλοτικής όσο και βιομηχανικής κλίμακας. Στον Πίνακα 1.1 αναφέρονται μερικές από τις μεγαλύτερες εταιρίες.

Πίνακας 1-1 - Εταιρίες κατασκευής εξοπλισμού Υπερψηλής Υδροστατικής Πίεσης

<b>Κατασκευαστική εταιρία</b>	<b>Χώρα</b>
ABB Pressure Systems AB	Lund, Sweden
Avure Technologies Inc. ( <a href="http://www.avure.com">www.avure.com</a> )	Washington, USA
Elmhurst Research Inc ( <a href="http://www.elmhurstresearch.com">www.elmhurstresearch.com</a> )	Albany, NY, USA
Engineered Pressure Systems Inc. ( <a href="http://www.epsi-highpressure.com">www.epsi-highpressure.com</a> )	Haverhill, Mass., USA
Engineered Pressure Systems International N.V. ( <a href="http://www.epsi-highpressure.com">www.epsi-highpressure.com</a> )	Temse, Belgium
GEC ALSTHOM ACB ( <a href="http://www.ind.alstom.com">www.ind.alstom.com</a> )	Nantes, France
Kobelco (Kobe Steel Ltd.) ( <a href="http://www.kobelco.co.jp">www.kobelco.co.jp</a> )	Tokyo, Japan
Mitsubishi Heavy Industries, Ltd. ( <a href="http://www.mhi.co.jp">www.mhi.co.jp</a> )	Hiroshima, Japan
N.C. Hyperbaric ( <a href="http://www.nchyperbaric.com">http://www.nchyperbaric.com</a> )	Burgos, Spain
Resato International BV ( <a href="http://www.resato.com">www.resato.com</a> )	Roden, Holland
Stansted Fluid Power (SFP) Ltd. ( <a href="http://www.stanstedfluidpower.com">www.stanstedfluidpower.com</a> )	Stansted, Essex, UK
Stork Food & Dairy Systems B.V. ( <a href="http://www.fds.storkgroup.com">www.fds.storkgroup.com</a> )	Amsterdam, The Netherlands
Uhde High Pressure Technologies GmbH ( <a href="http://www.uhde-hpt.com">www.uhde-hpt.com</a> )	Hagen, Germany

### 1.6.3 Εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα επεξεργασμένα με ΥΥΠ

Όπως αναλύθηκε και παραπάνω, η δυνατότητα εκτεταμένης εφαρμογής της νέας τεχνολογίας της ΥΥΠ στις βιομηχανίες τροφίμων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις δυνατότητες που προσφέρει η τεχνολογία όσον αφορά τον εξοπλισμό και τα συστήματα παραγωγής ΥΥΠ. Η εκτεταμένη μελέτη της εφαρμογής της ΥΥΠ, τα αποτελέσματα της επιστημονικής έρευνας και ταυτόχρονα η διαρκής βελτίωση του εξοπλισμού από τις κατασκευάστριες εταιρίες εξοπλισμού ΥΥΠ έδωσε το εφαλτήριο στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή προϊόντων με χρήση της νέας τεχνολογίας. Μια πλειάδα από επεξεργασμένα με ΥΥΠ τρόφιμα είναι εμπορικά διαθέσιμα τις τελευταίες δύο

δεκαετίες. Η ΥΥΠ έχει βρει μεγάλη εφαρμογή σε φρούτα και τα προϊόντα τους όπως είναι χυμοί, φρουτοσαλάτες και μαρμελάδες. Η χρήση της ΥΥΠ επιτρέπει την ψυχρή παστερίωση τέτοιων προϊόντων και την παραγωγή προϊόντων με βελτιωμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τα οποία προσεγγίζουν ικανοποιητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά εκείνων των φρέσκων ανεπεξέργαστων φρούτων. Ταυτόχρονα μειώνεται η συνολική μικροβιακή χλωρίδα αυξάνοντας τη διάρκεια ζωής χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση πρόσθετων και συντηρητικών.

Τα θαλασσινά και ιδιαίτερα τα στρείδια είναι ένα παράδειγμα εμπορικά διαθέσιμου προϊόντος ΥΥΠ το οποίο καλύπτεται από δίπλωμα ευρεσιτεχνίας (US Patent 6217435). Η ΥΥΠ εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1999 από την Innovative Seafood Systems (Houma, LA, USA) και έκτοτε πολλές βιομηχανίες οστρακοειδών τη χρησιμοποιούν. Η εφαρμογή σχετικά χαμηλών πιέσεων (από 200 έως 350 MPa) είναι ικανή να μειώσει τον πληθυσμό της μικροβιακής χλωρίδας των φρέσκων θαλασσινών ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται το άνοιγμα του κελύφους τους μειώνοντας έτσι το κόστος σε εργατοώρες.

Πολλά προϊόντα κρέατος όπως είναι τα αλλαντικά είναι επίσης εμπορικά διαθέσιμα. Στην περίπτωση των προϊόντων κρέατος οι πιέσεις που χρησιμοποιούνται είναι της τάξης των 600 MPa και ο χρόνος διεργασίας μπορεί να κυμανθεί από 4 έως 10 min, η εφαρμογή ΥΥΠ σε τέτοιου είδους προϊόντα έχει σαν αποτέλεσμα την καταστροφή της *Listeria* ενώ ταυτόχρονα το χρώμα και η γεύση του κρέατος μένει αναλλοίωτη. Τέλος, έχει διαπιστωθεί αύξηση της διάρκειας ζωής χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση πρόσθετων και συντηρητικών. Στην Ελλάδα μόλις πρόσφατα διατέθηκαν στη λιανική αγορά προϊόντα ΥΥΠ ελληνικής βιομηχανίας προϊόντων κρέατος.

Στον Πίνακα 1-2 δίνονται προϊόντα ΥΥΠ τα οποία είναι εμπορικά διαθέσιμα μετά το έτος 2000. Τα επόμενα χρόνια αναμένεται να παράγονται ακόμα περισσότερα τρόφιμα ΥΥΠ και να ενταθεί η έρευνα στην ανάπτυξη καινοτόμων και λειτουργικών τροφίμων ΥΥΠ. Το 2004 στην Τσεχία παράχθηκε το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο λειτουργικό τρόφιμο επεξεργασμένο με ΥΥΠ, πρόκειται για χυμό μήλου – μπρόκολου.

Η εισοδος προϊόντων ΥΥΠ στην ευρωπαϊκή αγορά ήρθε μόλις τα τελευταία χρόνια, πολύ αργότερα από ότι στην περίπτωση της Ιαπωνίας και της Αμερικής. Αν και οι επιστημονικές έρευνες τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αποδείξει τα οφέλη από τη χρήση της ΥΥΠ στην Ευρώπη η βιομηχανία τροφίμων βρίσκει εμπόδια λόγω του Ευρωπαϊκού κανονισμού περί νέων τροφίμων και η νέα αυτή τεχνολογία παραμένει σχεδόν άγνωστη στους Ευρωπαίους καταναλωτές.

Στα πλαίσια του ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος (FAIR-CT96-1113) μελετήθηκε η στάση των καταναλωτών απέναντι στη διεργασία τροφίμων με ΥΥΠ. Σύμφωνα με την έρευνα του Butz και των συνεργατών του (2003) σε καταναλωτές στη Γαλλία, τη Γερμανία και την Αγγλία το 67% των καταναλωτών θα αγόραζαν προϊόντα ΥΥΠ. Για τους καταναλωτές ήταν πολύ ελκυστική η αύξηση της διάρκειας ζωής των προϊόντων καθώς επίσης και η υψηλή θρεπτική αξία τέτοιων προϊόντων. Επίσης, για όλους τους καταναλωτές είναι σημαντικό αυτά τα προϊόντα να μην είναι ακριβότερα από τα συμβατικά προϊόντα, θα πλήρωναν ακριβότερα τέτοιου είδους προϊόντα μόνο εάν εξασφαλιζόταν η υψηλή ποιότητα και θρεπτική τους αξία.

Πίνακας 1-2 - Εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα επεξεργασμένα με Υπερψηλή Υδροστατική Πίεση (πηγή: NC Hyperbaric, <http://www.nchyperbaric.com/index.htm>)

Χώρα (έτος)	Προϊόν	Συνθήκες διεργασίας ΥΥΠ
Ιαπωνία (2000)	Προμαγειρεμένο ρύζι Υποαλλεργικό ρύζι	400 MPa
Ιταλία (2001)	Επιδόρπια φρούτων Μήλο, αχλάδι και φράουλα	600 MPa/ 17 °C/ 3-5 min
ΗΠΑ (2001)	Στρείδια	240 MPa/ 90 s
Πορτογαλία (2001)	Χυμός μήλου και εσπεριδοειδών	450 MPa/ 12 °C/ 20-90 s
Ιταλία (2001)	Χυμός φρούτων	600 MPa/ 17 °C/ 3-5 min
ΗΠΑ (2002)	Προϊόντα αβοκάντο	
Ισπανία (2002)	Τεμαχισμένο ζαμπόν, Προϊόντα κοτόπουλου και γαλοπούλας	500 MPa/ 8 °C/ 4-10 min
Μεξικό (2002)	Προϊόντα αβοκάντο	
ΗΠΑ (2003)	Τεμαχισμένα κρεμμύδια	
Ιταλία (2003)	Προσούτο, Σαλάμι, Μορταδέλα	600 MPa/ 7 °C/ 10 min
Ισπανία (2004)	Σολωμός, μπακαλιάρος (RTE <sup>1</sup> )	500 MPa
Ιταλία (2004)	Μπακαλιάρος	600 MPa
Τσεχία (2004)	Χυμός μπρόκολου-μήλου <sup>2</sup>	
Ισπανία (2005)	Πιάτα φρούτων (RTE <sup>1</sup> )	500 MPa
Ιαπωνία (2005)	Ζαμπόν, λουιάνικα, μπέικον	600 MPa/ 5 °C/ 5 min
Γερμανία (2005)	Καπνιστό ζαμπόν	600 MPa/ 5 °C/ 2 min
N. Κορέα (2006)	Στρείδια	
Αυστραλία (2007)	Χυμός φρούτων	
Ελλάδα (2009)	Αλλαντικά	600 MPa/ 22.8 °C/ 180 s

<sup>1</sup>RTE: Ready-to-eat

<sup>2</sup>Το πρώτος εμπορικά διαθέσιμο λειτουργικό τρόφιμο επεξεργασμένο με ΥΥΠ

Η διεργασία της ΥΥΠ δεν μπορεί να θεωρηθεί ως μια διεργασία με την οποία μπορεί να μειωθεί το κόστος παραγωγής ενός υπάρχοντος προϊόντος το οποίο παράγεται με συμβατικές μεθόδους όπως είναι η παστερίωση. Στην περίπτωση όμως υψηλής ποιότητας προϊόντων ή καινοτόμων προϊόντων το κόστος μπορεί να είναι οικονομικά αποδεκτό. Το κόστος παραγωγής με χρήση της διεργασίας ΥΥΠ μπορεί να κυμανθεί από 0.07 έως 0.15 €/kg και εξαρτάται από το είδος του εξοπλισμού, το βαθμό αυτοματοποίησης, το ποσοστό πλήρωσης του θαλάμου συμπίεσης και τις συνθήκες πίεσης-θερμοκρασίας-χρόνου οι οποίες χρησιμοποιούνται (Tonello, 2007). Το μεγαλύτερο κόστος είναι το πάγιο αφού περίπου το 60% του κόστους παραγωγής είναι η απόσβεση του εξοπλισμού. Το κόστος των ανταλλακτικών και το ενεργειακό κόστος συμβάλλουν κατά 36% και 4%, αντίστοιχα. Το κόστος που αφορά στην κατανάλωση νερού θεωρείται αμελητέο. Τέλος, το κόστος θα πρέπει να προσαυξηθεί κατά 10-40% ώστε να συμπεριληφθεί το εργατικό κόστος που και αυτό εξαρτάται από το βαθμό αυτοματοποίησης της διεργασίας (Hernando Saiz et al., 2008). Από ενεργειακή άποψη, η εφαρμογή της ΥΥΠ αντί των συμβατικών θερμικών διεργασιών μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της απαιτούμενης ενέργειας κατά 20 % (Goerfl et al., 2006).

### 1.6.4 Νομοθεσία που αφορά στην επεξεργασία τροφίμων με ΥΥΠ

Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία ο κανονισμός για νέα τρόφιμα ισχύει για όλα εκείνα τα τρόφιμα τα οποία δεν έχουν, μέχρι τον Μάιο του 1997, χρησιμοποιηθεί ευρέως για ανθρώπινη κατανάλωση μέσα στην Κοινότητα. Συγκεκριμένα, τα προϊόντα ΥΥΠ ανήκουν στην κατηγορία τροφίμων και συστατικών τροφίμων για τα οποία έχει εφαρμοστεί μέθοδος παραγωγής που δεν χρησιμοποιείται ευρέως, εφόσον η μέθοδος αυτή προκαλεί μεταβολές στη σύνθεση ή τη δομή των τροφίμων ή σημαντικές αλλαγές που επηρεάζουν τη θρεπτική τους αξία, το μεταβολισμό τους ή την περιεκτικότητά τους σε ανεπιθύμητες ουσίες. Το 2001 η Danone υπέβαλε αίτηση στην ΕΕ για την παραγωγή και διάθεση νέων προϊόντων (χυμοί φρούτων και επιδόρπια φρούτων) επεξεργασμένα με ΥΥΠ. Η Ευρωπαϊκή κοινότητα, αφού ερεύνησε και διαπίστωσε ότι τα εν λόγω προϊόντα ήταν το ίδιο ασφαλή με εκείνα που είχαν παραχθεί με χρήση της συμβατικής μεθόδου παστερίωσης, αποφάσισε ότι τα προϊόντα είναι ασφαλή για κατανάλωση και ότι μπορούν να διατεθούν στην αγορά ως νέα προϊόντα. Επιπλέον, αποφασίστηκε ότι ο όρος "παστερίωση με υπερυψηλή πίεση" θα πρέπει να αναγράφεται στη συσκευασία αυτών των νέων προϊόντων (Commission Decision 2001/424/EC, Document number C(2001) 1462).

### 1.6.5 Κρίσιμες παράμετροι της διεργασίας ΥΥΠ

#### α. Παράμετροι σχεδιασμού

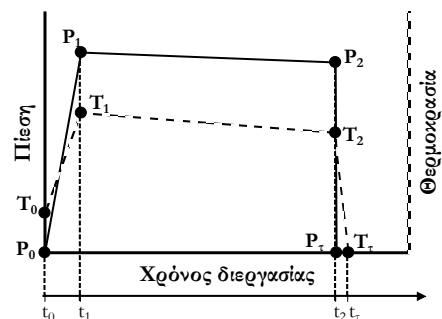
Οι παράμετροι σχεδιασμού μιας διεργασίας ΥΥΠ είναι η πίεση, η θερμοκρασία και ο χρόνος. Στην εικόνα 1-20 δίνεται ένα τυπικό διάγραμμα πίεσης-θερμοκρασίας-χρόνου στο οποίο διακρίνονται τρεις χρονικά διακριτές φάσεις της διεργασίας ΥΥΠ, όπου φαίνονται επίσης οι αυξομειώσεις πίεσης και θερμοκρασίας.

- **Χρόνος για την αύξηση της πίεσης (pressure build-up),  $t_0 - t_1$ :**

Είναι ο χρόνος ο οποίος απαιτείται για να αυξηθεί η πίεση του τροφίμου από την ατμοσφαιρική στην επιθυμητή τιμή,  $P_1$ . Αυτός ο χρόνος εξαρτάται από το ρυθμό συμπίεσης του ρευστού μεταφοράς πίεσης και του τροφίμου και φυσικά από την ισχύ του ενισχυτή πίεσης του εξοπλισμού. Η διαφορά της θερμοκρασίας πριν και μετά την εφαρμογή της πίεσης,  $T_1 - T_0$ , οφείλεται στην αδιαβατική θέρμανση του τροφίμου.

- **Χρόνος διεργασίας,  $t_1 - t_2$ :**

Η χρονική περίοδος μεταξύ της ολοκλήρωσης της συμπίεσης,  $t_1$ , και της έναρξης της αποσυμπίεσης,  $t_2$ , είναι εκείνη η περίοδος όπου η πίεση είναι σταθερή,  $P_1 \approx P_2$ . Η πιθανή διαφορά θερμοκρασίας,  $T_1 - T_2$ , κατά τη διάρκεια της διεργασίας οφείλεται σε φαινόμενα μεταφοράς θερμότητας.



Εικόνα 1-20 - Διάγραμμα πίεσης-θερμοκρασίας-χρόνου σε μια τυπική διεργασία ΥΥΠ

- **Χρόνος αποσυμπίεσης,  $t_2 - t_r$ :**

Είναι ο χρόνος που χρειάζεται για να μειωθεί η πίεση του τροφίμου στην ατμοσφαιρική,  $P_r$ .

### **β. Αδιαβατική θέρμανση**

Κατά τη διάρκεια της συμπίεσης σε μια διεργασία ΥΥΠ, η θερμοκρασία του τροφίμου αυξάνεται λόγω αδιαβατικής θέρμανσης περίπου κατά 3 °C ανά 100 MPa, ανάλογα με τη σύνθεση του τροφίμου και την περιεκτικότητά του σε νερό (Farkas & Hoover 2001).

Κατά τη διάρκεια μιας συμπίεσης η θερμοκρασία όλων τα συμπιέσιμων υλικών αλλάζει, έτσι σε ισεντροπικά συστήματα τα οποία συμπιέζονται λαμβάνει χώρα αδιαβατική θέρμανση. Η αδιαβατική θέρμανση είναι το αποτέλεσμα της τριβής όταν τα ρευστά συμπιέζονται αδιαβατικά σε υψηλές πιέσεις.

## Βιβλιογραφία 1ου κεφαλαίου

- Ayhan, Z., Zhang, Q., & Min, D. B. (2002). Effects of pulsed electric field processing and storage on the quality and stability of single-strength orange juice. *Journal of Food Protection*, 65(10), 1623–7.
- Balasubramaniam, V. M. (2003). High pressure food preservation. In D. Heldman (Ed.), *Encyclopedia of Agriculture, Food and Biological Engineering* (pp. 490–496). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Balci, A. T., & Wilbey, R. A. (1999). High pressure processing of milk—the first 100 years in the development of a new technology. *International Journal of Dairy Technology*, 52(4), 149–155.
- Baysal, A. H., & Icier, F. (2010). Inactivation kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in orange juice by ohmic heating: effects of voltage gradient and temperature on inactivation. *Journal of Food Protection*, 73(2), 299–304.
- Braddock, R. J. (1999). Single strength orange juices and concentrate. In *Handbook of Citrus By-Products and Processing Technology* (pp. 53–83). New York: Wiley.
- Cañumir, J. A., Celis, J. E., de Bruijn, J., & Vidal, L. V. (2002). Pasteurisation of Apple Juice by Using Microwaves. *LWT - Food Science and Technology*, 35(5), 389–392.
- Dorsett, P. H., Shamel, A. D., & Popenoe, W. (1917). The navel orange of Bahia: with notes on some little known Brazilian fruits. *U.S. Dept. Agr. Bul.*, 445.
- Eiroa, M. N., Junqueira, V. C., & Schmidt, F. L. (1999). *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *Journal of Food Protection*, 62(8), 883–886.
- García, D., Gómez, N., Mañas, P., Condón, S., Raso, J., & Pagán, R. (2005). Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 94–104.
- Geveke, D. J., Kozempel, M., Scullen, O. J., & Brunkhorst, C. (2002). Radio frequency energy effects on microorganisms in foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 133–138.
- Goullieux, A., & Pain, J.-P. (2005). Ohmic heating. In D.-W. Sun (Ed.), *Emerging technologies for food processing* (pp. 469–505). London: Elsevier Academic Press.
- Hogan, E., Kelly, A. L., & Sun, D.-W. (2005). High Pressure Processing of Foods: An Overview. In D.-W. Sun (Ed.), *Emerging technologies for food processing* (pp. 3–32). London: Elsevier Academic Press.

- Icier, F. (2012). Ohmic Heating of Fluid Foods. In P. J. Cullen, B. K. Tiwari, & V. Valdramidis (Eds.), *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods* (pp. 305–368). London: Elsevier Academic Press.
- Jain, S., Bidol, S. A., Austin, J. L., Berl, E., Elson, F., Lemaile-Williams, M., ... Lynch, M. F. (2009). Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium and Saintpaul infections associated with unpasteurized orange juice--United States, 2005. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48(8), 1065–71.
- Knoerzer, K., Buckow, R., Sanguansri, P., & Versteeg, C. (2010). Adiabatic compression heating coefficients for high-pressure processing of water, propylene-glycol and mixtures – A combined experimental and numerical approach. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 229–238.
- Lee, S.-Y., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2013). Effect of frequency and waveform on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in salsa by ohmic heating. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 10–7.
- Lee, S.-Y., Sagong, H.-G., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2012). Effect of continuous ohmic heating to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in orange juice and tomato juice. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 723–31.
- Mertens, B. (1995). Hydrostatic pressure treatment of food: equipment and processing. In G. W. Gould (Ed.), *New Methods of Food Preservation* (pp. 135–158). New York: Springer.
- Meyer, R., Cooper, K., Knorr, D., & Lelieveld, H. (2000). High pressure sterilisation of foods. *Food Technology*, 54(11), 67–72.
- Minerich, P. L., & Labuza, T. P. (2003). Development of a pressure indicator for high hydrostatic pressure processing of foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(3), 235–243.
- Pilavtepe-Çelik, M. (2013). High hydrostatic pressure (HHP) inactivation of foodborne pathogens in low-acid juices. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(4), 673–677.
- Pothakamury, U. R., Vega, H., Zhang, Q., Barbosa-Canovas, G. V., & Swanson, B. G. (1996). Effect of Growth Stage and Processing Temperature on the Inactivation of *E. coli* by Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Protection*, 59(11), 1167–1171.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjan, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 69–112.



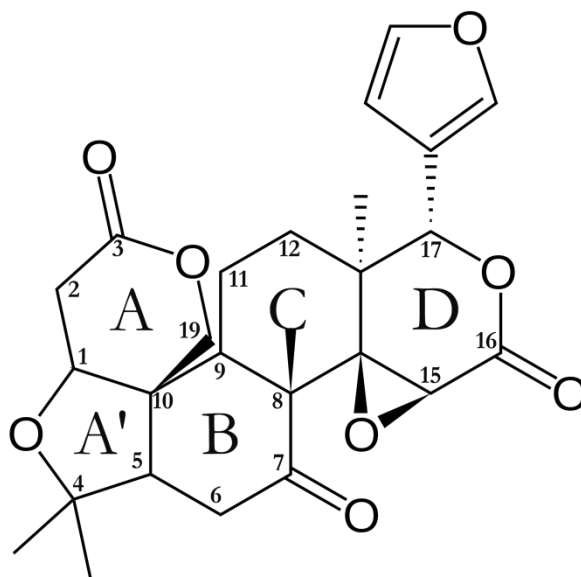
- Reuther, W., Webber, H. J., & Batchelor, L. D. (Eds.). (1989). *The Citrus Industry*. Riverside, CA.
- Thakur, B. R., & Nelson, P. E. (1998). High pressure processing and preservation of food. *Food Reviews International*, 14(4), 427–447.
- Vojdani, J. D., Beuchat, L. R., & Tauxe, R. V. (2008). Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection*, 71(2), 356–364.



## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>: Λιμονοειδή & πικρότητα χυμού εσπεριδοειδών

### 2.1 Εισαγωγή

Τα λιμονοειδή είναι μια οικογένεια χημικών ενώσεων οι οποίες εντάσσονται στα υψηλά οξυγονωμένα τετρακυκλικά τριτερπενοειδή και διαχωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες. Οι αγλυκόνες (ουδέτερη μορφή) εμφανίζουν γενικά έντονα πικρή γεύση και είναι αδιάλυτες στο νερό, ενώ οι γλυκοζίτες (όξινη μορφή) είναι γενικά άγευστοι και υδατοδιαλυτοί.



Εικόνα 2-21 - Λιμονίνη, το κύριο λιμονοειδές στα εσπεριδοειδή

Τα λιμονοειδή βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε φυτά των οικογενειών *Meliaceae* και *Rutaceae* και σπανιότερα σε φυτά της οικογένειας *Simaroubaceae*. Τα εσπεριδοειδή, μέλη της οικογένειας των *Rutaceae*, περιέχουν τουλάχιστον 36 λιμονοειδείς αγλυκόνες και 17 γλυκοζίτες (Hasegawa & Miyake, 1996), με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να παρατηρούνται στο μεσοκάρπιο και στους σπόρους των καρπών τους (Berhow et al., 1996; Karim & Hashinaga, 2002a). Η βιοσύνθεσή των λιμονοειδών ξεκινά με μία σειρά αντιδράσεων στο φλοιώμα του φυτού. Πρόδρομη ένωση είναι ένα αλειφατικό τριτερπένιο (σικουαλένιο), το οποίο υφίσταται κυκλοποίηση, διαδοχικές οξειδώσεις και ανακατατάξεις καταλήγοντας σε μία ευρεία ποικιλία παραγώγων λιμονοειδών (Roy & Saraf, 2006). Στα εσπεριδοειδή το κύριο ενδιάμεσο παράγωγο είναι η νομιλίνη, η οποία μεταφέρεται από τον

κορμό στα φύλλα, τους καρπούς και τους σπόρους, όπου και βιομετατρέπεται σε άλλα λιμονοειδή (Endo et al., 2002; Moriguchi et al., 2003; Pichaiyongvongdee & Haruenkit, 2009).

Οι συνηθέστερες πικρές λιμονοειδείς αγλυκόνες των εσπεριδοειδών είναι η λιμονίνη, η νομιλίνη, η ισαγκίνη καθώς και τα οξέα ομπακουνοϊκό, νομιλικό και δεοξυλιμονοϊκό. Η έντονη πικρότητα που παρουσιάζουν οφείλεται στα κοινά δομικά χαρακτηριστικά τους, μεταξύ των οποίων ο κλειστός D-δακτύλιος, το εποξειδίο στη θέση C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>, καθώς και το κετονικό καρβονύλιο στη θέση C<sub>7</sub> (Hasegawa et al., 1996).

Παράλληλα με τις αγλυκόνες, στα εσπεριδοειδή απαντώνται και γλυκοζίτες των λιμονοειδών. Οι ενώσεις αυτές είναι άπικρες και, όπως θα αναφερθεί σε ακόλουθο τμήμα, συνεισφέρουν στην φυσική αποφυγή πικρότητας των εσπεριδοειδών. Η ολική συγκέντρωση των γλυκοζιτών στους χυμούς εσπεριδοειδών είναι ~150 - 300 ppm ή mg·L<sup>-1</sup> χυμού, ενώ στα στερεά παραπροϊόντα και τους φλοιούς η συγκέντρωση αγγίζει τα ~500 ppm. Ο κύριος γλυκοζίτης στους χυμούς, σε ποσοστό ~66%, είναι ο γλυκοζίτης της λιμονίνης, ενώ στους σπόρους ο γλυκοζίτης της νομιλίνης απαντάται σε υψηλότερη συγκέντρωση (Herman et al., 1990; Ozaki et al., 1991, 1995).

Η υψηλή συγκέντρωση γλυκοζιτών των λιμονοειδών στα στερεά των εσπεριδοειδών, σε συνδυασμό με την υψηλή βιοδραστικότητά τους, καθιστά τις ενώσεις αυτές ελκυστικές για απομόνωση από τα παραπροϊόντα της χυμοποίησης. Αναπτυσσόμενες μέθοδοι για την ανάκτηση των γλυκοζιτών από τη μελάσα των καρπών είναι η ιοντοεναλλαγή με ρητίνες στυρενίου-διβινυλβενζολίου (SDVB) καθώς και η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά, ενώ ο επιλεκτικός διαχωρισμός λιμονοειδών από τους σπόρους είναι δυνατός με διαδοχικές εκχυλίσεις με διαλύτες ή με υπερκρίσιμα ρευστά (Manners, 2007).

Μεταξύ των λιμονοειδών που απαντώνται στους καρπούς των εσπεριδοειδών βρίσκεται και η λιμονική λακτόνη Α-δακτυλίου (*limonoate A-ring lactone*, LARL), μία άπικρη ένωση η οποία, όπως αναλύεται παρακάτω, μετατρέπεται σε λιμονίνη κατά την επεξεργασία των εσπεριδοειδών.

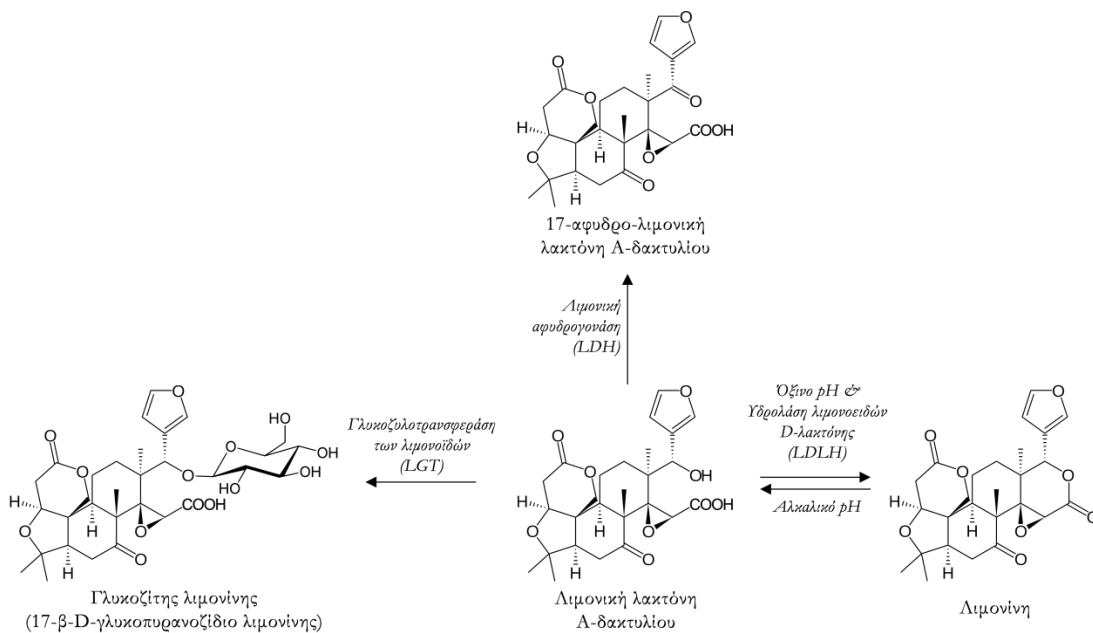
## 2.2 Λιμονίνη και πικρότητα χυμού

Η λιμονίνη είναι μία έντονα πικρή λιμονοειδής αγλυκόνη, και ένα από τα κύρια λιμονοειδή βάση συγκέντρωσης (Hasegawa et al., 1996; Kimball, 1999). Η πικρότητά της είναι αισθητή σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 3 ppm, ενώ για τους εμπορεύσιμους πορτοκαλοχυμούς το όριο αποδοχής είναι τα 6 ppm, ή 6 mg·L<sup>-1</sup> χυμού (Guadagni et al., 1973, 1974). Τα παραπροϊόντα της χυμοποίησης (φλοιός και πούλπα) περιέχουν λιμονίνη σε συγκέντρωση 100 - 800 mg·kg<sup>-1</sup> ξηρής μάζας, ενώ οι σπόροι περιέχουν μέχρι και 8000 mg·kg<sup>-1</sup> ξηρής μάζας (Widmer & Haun, 2000).

Η μέτρηση της λιμονίνης σε χυμούς και προϊόντα εσπεριδοειδών απαιτεί σημαντική κατεργασία των δειγμάτων. Τα λιμονοειδή απομονώνονται από τα υπόλοιπα συστατικά του χυμού με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και χρήση κατάλληλου διαλύτη, και μετρώνται ποσοτικά με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Chandler & Kefford, 1966; Hasegawa & Berhow, 2000) ή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Abbasi et al., 2005). Νέες μέθοδοι καθιστούν τη μέτρηση πρακτικότερη για τους ερευνητές, αυτοματοποιώντας την εκχύλιση (Widmer & Haun,

2000) ή επιτρέποντας την παράλληλη ανίχνευση και μέτρηση πολλαπλών λιμονοειδών (Vikram et al., 2007). Παράλληλα, η χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (LC-MS) επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση λιμονοειδών σε χυμούς και παραπροϊόντα εσπεριδοειδών (Manners et al., 2000) ή ακόμα και την απευθείας μέτρηση της πρόδρομης ένωσης, λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου (Brekša et al., 2005).

Η λιμονίνη παράγεται από το αντιστρεπτό κλείσιμο του D-δακτυλίου (λακτονοποίηση) της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου, η οποία πραγματοποιείται αυθόρμητα σε όξινο περιβάλλον (pH<6.5). Κατά την εκχύμωση των πορτοκαλιών η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται σταδιακά λόγω της επαφής της πρόδρομης ένωσης, οποία βρίσκεται στο μεσοκάρπιο και τις μεμβράνες, με τον όξινο χυμό.

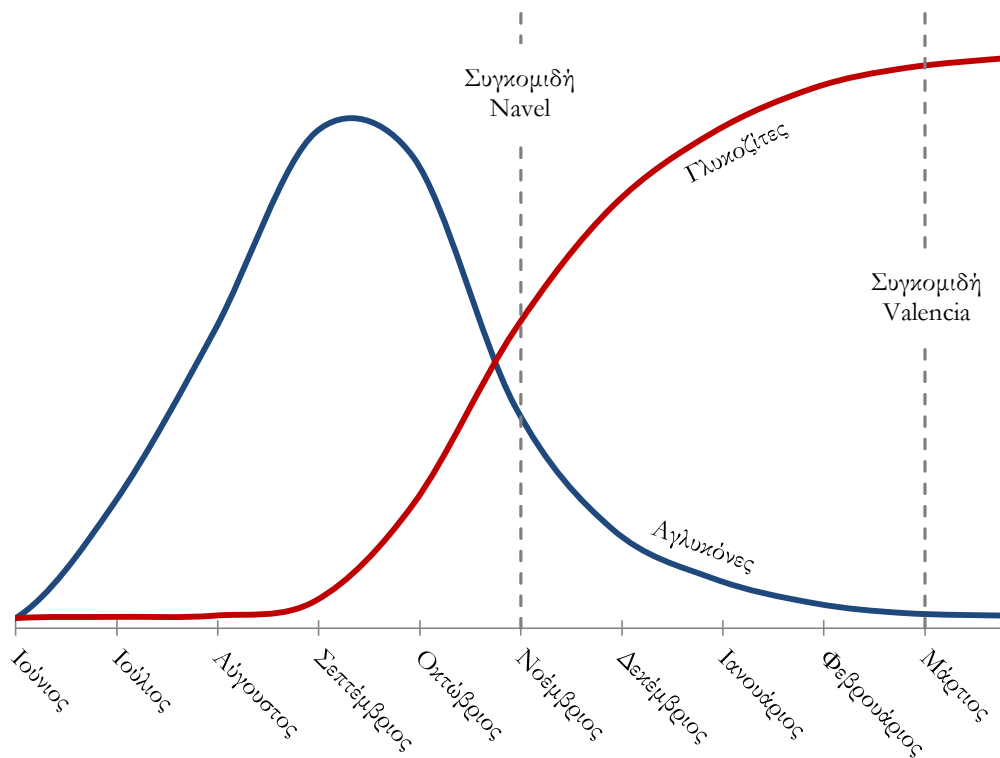


Εικόνα 2-22 - Μεταβολικά μονοπάτια των κυρίων λιμονοειδών των εσπεριδοειδών

Η μετατροπή σε λιμονίνη επιταχύνεται παρουσία του ενζύμου υδρολάση λιμονοειδών D-λακτόνης (limonoid D-ring lactone hydrolase, LDLH) το οποίο απαντάται φυσικά σε ιστούς εσπεριδοειδών (Maier & Beverly, 1968). Το ένζυμο αυτό καταλύει τη λακτονοποίηση σε pH<6 και την -αντίστροφη- υδρόλυση σε pH>8, είναι δε εξαιρετικά θερμοάντοχο, καθώς απαιτείται θερμική κατεργασία 5 λεπτών σε 100°C για ελάττωση της ενεργότητάς του κατά 70% (Adlercreutz, 1994) και 15 λεπτών σε 100°C για πλήρη απενεργοποίηση (Maier et al., 1980).

Κατά τη θερμική παστερίωση του χυμού η αντίδραση λακτονοποίησης πραγματοποιείται με ιδιαίτερα αυξημένο ρυθμό λόγω της επίδρασης της θερμοκρασίας αλλά και της υψηλής εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου LDLH, με αποτέλεσμα την υψηλή συγκέντρωση λιμονίνης και την εμφάνιση ανεπιθύμητης έντονης πικρότητας στον παστεριωμένο χυμό. Η πικρότητα αυτή χαρακτηρίζεται ως καθυστερημένη, καθώς δεν παρατηρείται στα ακατέργαστα φρούτα ή το φρεσκοστυμμένο χυμό. Η εμφάνιση και ένταση της καθυστερημένης πικρότητας εξαρτάται τόσο από την ποικιλία των εσπεριδοειδών όσο και από την περίοδο συγκομιδής.

Στα πορτοκάλια η συγκέντρωση της πρόδρομης λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου στους καρπούς αυξάνεται σημαντικά κατά τους πρώτους μήνες καρποφορίας (Ιούνιο - Σεπτέμβριο). Σε διάστημα περίπου 120 ημερών μετά την πλήρη άνθιση, περί τα μέσα Σεπτεμβρίου, το γονίδιο *CitLGT-1* που κωδικοποιεί το ένζυμο γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών (*limonoid glucosyltransferase, LGT*) αρχίζει να εκφράζεται στους ιστούς του μεσοκαρπίου (Kita et al., 2003; Zaare-Nahandi et al., 2008). Το ένζυμο LGT, το οποίο εξετάζεται ενδελχώς στο κεφάλαιο 3 του παρόντος, μετατρέπει την πρόδρομη ένωση στον άπικρο γλυκοζίτη της λιμονίνης (*limonin glucoside, LG*), με αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης της λακτόνης και την αντίστοιχη αύξηση του γλυκοζίτη, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 2-3. Η μετατροπή αυτή συνεχίζεται μέχρι τη συγκομιδή του καρπού.



Εικόνα 2-23 - Μεταβολή στη συγκέντρωση λιμονοειδών στους καρπούς πορτοκαλιού κατά την περίοδο ωρίμανσης (Hasegawa, 1999)

Καθώς η συγκομιδή των πορτοκαλιών Navel πραγματοποιείται το Νοέμβριο, η μετατροπή της πρόδρομης λακτόνης προς το γλυκοζίτη δεν έχει επαρκή χρόνο να ολοκληρωθεί με αποτέλεσμα την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης πρόδρομης LARL στους καρπούς, και κατά συνέπεια εμφάνιση έντονης καθυστερημένης πικρότητας στο χυμό.

Αντίθετα, τα πορτοκάλια Valencia συλλέγονται το Μάρτιο, περίπου έξι μήνες μετά την έκφραση του ενζύμου LGT, με αποτέλεσμα η μετατροπή της LARL να έχει προχωρήσει πρακτικά σε πληρότητα (Fong et al., 1992). Η εναπομείνουσα LARL μετατρέπεται κατά τη χυμοποίηση σε πικρή λιμονίνη, η συγκέντρωση της οποίας όμως βρίσκεται κάτω από το όριο ανιχνευσιμότητας. Ως εκ τούτου ο χυμός των πορτοκαλιών Valencia δεν παρουσιάζει καθυστερημένη πικρότητα.

Τα πορτοκάλια είναι πιθανό να εμφανίσουν πικρότητα ακόμα και πριν τη χυμοποίηση εάν οι καρποί υποστούν φυσικές βλάβες ή παγετό κατά την ωρίμανση. Οι βλάβες αυτές προκαλούν ρήξη των εσωτερικών ιστών και επαφή της πρόδρομης LARL με τον όξινο χυμό και το ένζυμο LDLH, με

αποτέλεσμα την παραγωγή λιμονίνης μέσα στον καρπό. Η ανάπτυξη πικρότητας λόγω παγετού είναι δυνατόν να οδηγήσει σε απώλεια σοδειάς με σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις για τους παραγωγούς (Manners, 2007).

## 2.3 Βιοδραστικότητα και οφέλη λιμονοειδών στην ανθρώπινη υγεία

Οι πρώτες ενδείξεις για πιθανή βιολογική δραστηριότητα των λιμονοειδών προήλθαν από τη φυσική αντίσταση των φυτών της οικογένειας *Meliaceae* στα έντομα. Η αζαδιρακίνη, ένα λιμονοειδές που προέρχεται από το δέντρο neem (*Azadirachta indica*) χρησιμοποιείται σαν εντομοκτόνο ευρέος φάσματος. Άλλα λιμονοειδή προερχόμενα από φυτά *Azadirachta* spp. εμφανίζουν αντινεοπλασματική δράση κατά ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων (Cui et al., 1998).

Αν και τα λιμονοειδή της οικογένειας *Meliaceae* διαφέρουν δομικά από τα λιμονοειδή των εσπεριδοειδών (οικογένεια *Rutaceae*), αμφότερες κατηγορίες ενώσεων περιέχουν δακτυλλίους φουρανίου, εποξειδίου και λακτόνης. Η δομή αυτή είναι κοινή με δύο ενώσεις με γνωστή χημειοπροστατευτική δράση που απαντώνται στον ακατέργαστο καφέ (καφεστόλη και καβεόλη), κάτι που καθοδήγησε την έρευνα προς τη μελέτη της βιοδραστικότητας των λιμονοειδών των εσπεριδοειδών.

Πέραν της εντομοκτόνου δράσης των λιμονοειδών, η βιοδραστικότητά τους παρατηρείται σε τρεις τομείς, όπως αναλύονται παρακάτω.

### 2.3.1 Αντινεοπλασματική δράση

Η αντινεοπλασματική δράση των λιμονοειδών έχει μελετηθεί τόσο σε ζωικά (in vivo) όσο και σε κυτταρικά (in vitro) μοντέλα. Όπως προαναφέρθηκε, η μελέτη των αντικαρκινικών ιδιοτήτων τους καθοδηγήθηκε από τη δομική συγγένεια των λιμονοειδών με τα διτερπένια καβεόλη και καφεστόλη. Οι ενώσεις αυτές προάγουν τη δράση του αποτοξινωτικού ενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης, φαινόμενο που οφείλεται στην παρουσία της λειτουργικής ομάδας φουρανίου (Lam et al., 1987).

Μελέτες σε in vivo μοντέλα (ποντίκια και χάμστερ) έχουν δείξει πως χορήγηση των λιμονοειδών λιμονίνη και νομιλίνη μετά από έκθεση σε γονιδοτοξικές ενώσεις αναστέλλει την ανάπτυξη όγκων στον προστόμαχο, τους πνεύμονες, και το δέρμα (Lam, Zhang, & Hasegawa, 1994; Lam, Zhang, Hasegawa, et al., 1994). Σε περαιτέρω μελέτες σε χάμστερ η λιμονίνη, ο γλυκοζίτης της, η παράγωγη δεοξυλιμονίνη και η συνθετική ένωση καρβοξυμεθοξίμη της λιμονίνης παρουσιάζουν σημαντική χημειοπροστατευτική δράση στην εμφάνιση και ανάπτυξη όγκων της στοματικής κοιλότητας (Miller et al., 1992), ενώ σε ζωικά μοντέλα αρουραίων οι αγλυκόνες λιμονίνη και ομπακουνόνη αναστέλλουν την ογκογένεση στο ορθό (Tanaka et al., 2001).

Αντίστοιχα, σε in vivo συστήματα ανθρώπινων κυττάρων η νομιλίνη, ο γλυκοζίτης της, η παράγωγη δεακετυλονομιλίνη και η συνθετική καρβοξυμεθοξίμη της λιμονίνης αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του μαστού με αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς (estrogen

receptor negative). Παράλληλα, η δεακετυλονομιλίνη και ο γλυκοζίτης της νομιλίνης παρουσιάζουν παρόμοια αντινεοπλασματική δράση σε καρκινικά κύτταρα με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς (estrogen receptor positive). Τα παραπάνω λιμονοειδή παρουσιάζουν δραστηριότητα αυξημένη κατά  $10-10^3$  φορές συγκριτικά με την ταμοξιφαίνη, μία συνήθη χημειοπροστατευτική δραστηκή ουσία (Guthrie et al., 2000). Ακόλουθες έρευνες έχουν δείξει πως και άλλα λιμονοειδή παρουσιάζουν αντιπολλαπλασιαστική δράση κατά του νευροβλαστώματος και του καρκίνου του ορθού σε ανθρώπινα κύτταρα (Poulose et al., 2006).

Συγκριτικές μελέτες μεταξύ των διαφορετικών λιμονοειδών αποκαλύπτουν σχέσεις δομής-δραστηριότητας. Η ακεραιότητα του Α-δακτυλίου είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνιση αντινεοπλασματικής δράσης. Ενώσεις όπως ο γλυκοζίτης του νομιλικού οξέος, στις οποίες ο Α-δακτύλιος είναι ανοικτός, δεν παρουσιάζουν αντικαρκινική δραστηριότητα. Αντίθετα, το άνοιγμα του D-δακτυλίου, όπως στο γλυκοζίτη της λιμονίνης δεν επιφέρει εμφανή απώλεια δραστηριότητας. Επιπρόσθετα, η παρουσία διπλού δεσμού στη θέση C<sub>7</sub> φαίνεται να συνεισφέρει στην αντικαρκινική δράση σταθεροποιώντας τη στερεοχημική διαμόρφωση του Β-δακτυλίου. Απώλεια του διπλού δεσμού, όπως στην ένωση λιμονόλη, οδηγεί σε εξαφάνιση της αντινεοπλασματικής δραστηριότητας (Miller et al., 1992).

Ο ακριβής μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης των λιμονοειδών δεν είναι γνωστός. Τα λιμονοειδή δεν περιέχουν συζυγείς διπλούς δεσμούς, και κατά συνέπεια δεν παρουσιάζουν σταθεροποιητικές δομές συντονισμού. Αποτέλεσμα της δομής τους είναι η απουσία αντιοξειδωτικής δράσης, κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε κατόπιν μελέτης των τριών κυρίων λιμονοειδών (λιμονίνη, νομιλίνη και γλυκοζίτης της λιμονίνης) (Brekša & Manners, 2006).

Η στερεοχημική ομοιότητά τους με τις ενώσεις καβέολη και καφεστόλη προτείνει την υπόθεση πως τα λιμονοειδή προάγουν τη δράση του ενζύμου μεταφοράς της γλουταθειόνης (*glutathione S-transferase, GST*). Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έδειξαν πως η νομιλίνη, και δευτερευόντως η λιμονίνη, αυξάνουν την ενεργότητα της GST στον εντερικό βλεννογόνο ποντικών καθώς και σε ηπατικούς ιστούς αρουραίων (Kelly et al., 2003). Αντίθετα, οι γλυκοζίτες των λιμονοειδών δεν προάγουν τη δράση της GST, αφήνοντας ανεξήγητη την αντινεοπλασματική δράση τους (Ahmad et al., 2006).

### 2.3.2 Υποχοληστερολαιμική δράση

Οι πρώτες ενδείξεις για τη συνεισφορά των λιμονοειδών στην ελάττωση της χοληστερόλης προήλθαν από έρευνα για την επίδραση της κατανάλωσης χυμού εσπεριδοειδών στο μεταβολισμό της χοληστερόλης σε ζωικά μοντέλα κουνελιών. Η κατανάλωση χυμού πορτοκαλιού και γκρέιπφρουτ είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική ελάττωση της συγκέντρωσης λιποπρωτεΐνης LDL, φαινόμενο που αποδόθηκε στην παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών στο χυμό (Kurowska, Borradaile, et al., 2000). Τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν σε κλινικές μελέτες πάνω σε ανθρώπους, στις οποίες η κατανάλωση αυξημένης ποσότητας πορτοκαλοχυμού οδήγησε στην αύξηση της συγκέντρωσης HDL λιποπρωτεΐνης και την αντίστοιχη ελάττωση του λόγου συγκεντρώσεων LDL : HDL (Kurowska, Spence, et al., 2000).

Η συνεισφορά δευτερογενών μεταβολιτών, και συγκεκριμένα 14 λιμονοειδών, στην ελάττωση της LDL λιποπρωτεΐνης μελετήθηκε έμμεσα σε *in vitro* μοντέλο ανθρώπινων ηπατικών κυττάρων, μέσω



της μέτρησης του ρυθμού έκκρισης απολιποπρωτεΐνης-B (*apo B*) από τα κύτταρα. Η *apo B* είναι η κύρια πρωτεΐνη της LDL, και η ελάττωση της παραγωγής της από το ήπαρ συνδέεται με την ελάττωση της συγγέντρωσης LDL στον οργανισμό. Η λιμονίνη προκάλεσε σημαντική ελάττωση της έκκρισης *apo B* από τα κύτταρα, ενώ άλλες αγλυκόνες παρουσίασαν χαμηλότερη δραστηριότητα. Αντίθετα οι μελετηθέντες γλυκοζίτες δεν παρουσίασαν καμία δραστηριότητα στην ελάττωση της *apo B* (Kurowska, Banh, et al., 2000).

Το συμπέρασμα αυτό φαίνεται να αντιφάσκει με τα αποτελέσματα των *in vivo* μελετών, καθώς οι χυμοί εσπεριδοειδών περιέχουν πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκοζιτών (~150 - 300 ppm) συγκριτικά με τις αγλυκόνες (~ 5 ppm). Ακόλουθες κλινικές μελέτες έδειξαν πως οι γλυκοζίτες των λιμονοειδών βιομετατρέπονται σε αγλυκόνες στον ανθρώπινο οργανισμό, προσδίδοντας έτσι υποχοληστερολαιμική δραστηριότητα στους χυμούς (Manners et al., 2003).

### 2.3.3 Αντιρετροϊκή δράση

Η αντιική δραστηριότητα της λιμονίνης και νομιλίνης κατά του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας-1 (HIV-1) μελετήθηκε σε καλλιέργεια περιφερικών μονοπύρηνων αιματικών κυττάρων (peripheral blood mononuclear cells, PBMC). Και τα δύο λιμονοειδή παρουσίασαν παρεμφερή ανασταλτική δράση στην αναπαραγωγή του ιού, φαινόμενο που αποδίδεται στην αναστολή της ιικής πρωτεάσης (Battinelli et al., 2003).

## 2.4 Αποπίκρανση πορτοκαλοχυμού

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.2, η διεργασία χυμοποίησης και παστερίωσης του πορτοκαλοχυμού έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή λιμονίνης στο χυμό, οδηγώντας σε ανεπιθύμητη πικρότητα και καθιστώντας απαραίτητη την ελάττωση της λιμονίνης σε αποδεκτά επίπεδα προκειμένου ο χυμός να είναι εμπορικά εμπορεύσιμος. Η διεργασία αποπίκρανσης αποτελούν πεδίο εντατικής έρευνας (και, εν τέλει, αντικείμενο της παρούσης εργασίας) καθώς επηρεάζουν σημαντικά τόσο την οργανοληπτική και θρεπτική ποιότητα όσο και το κόστος του τελικού προϊόντος. Η συνηθέστερη μέθοδος αποπίκρανσης αναλύεται παρακάτω, ακολουθούμενη την παρουσίαση εναλλακτικών μεθόδων και τη σύγκριση των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων τους.

### 2.4.1 Ιστορικές και τρέχουσες μέθοδοι

Η πρώτη εμπορική μονάδα αποπίκρανσης χυμού λειτούργησε στην Αυστραλία στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και βασιζόταν στην προσρόφηση της λιμονίνης σε στερεό πολυμερές (Chandler & Johnson, 1976). Το προσροφητικό υλικό, αποτελούμενο από μικροσφαιρίδια οξικής κυτταρίνης, σχημάτιζε πληρωμένες στήλες μέσα από τις οποίες διερχόταν ο χυμός. Η αναγέννηση του πληρωτικού υλικού γινόταν περιοδικά με έκπλυση των στηλών με νερό. Το μειονέκτημα της

μεθόδου ήταν πως οι στήλες έτειναν να φράσσουν λόγω των αιωρούμενων στερεών του χυμού (πούλπα), με αποτέλεσμα τη σταδιακή εγκατάλειψη της διεργασίας.

Κατά τη δεκαετία του 1980 η χρήση προσροφητικών μέσων ερευνήθηκε περαιτέρω, με αποτέλεσμα την ανακάλυψη νέων υλικών, μεταξύ των οποίων οι ρητίνες ανιονικής εναλλαγής στυρενίου - διβινυλβενζολίου (SDVB) και ακρυλονιτριλίου - διβινυλβενζολίου (ADVB) (Johnson & Chandler, 1982; Maeda et al., 1984). Τα συμπολυμερή αυτά επαρκούσαν για την ελάττωση της λιμονίνης και νομιλίνης κατά 75 - 90%. Η πρώτη μονάδα που χρησιμοποίησε τα νέα υλικά ξεκίνησε τη λειτουργία της το 1988 στις ΗΠΑ και χρησιμοποίησε στήλες ιοντοεναλλαγής πληρωμένες με ρητίνη SDVB. Το πρόβλημα απόφραξης αποφεύχθηκε με χρήση ενός σταδίου φυγοκέντρωσης, κατά το οποίο η πούλπα απομακρυνόταν με αποτέλεσμα ο διαυγασμένος χυμός να περνά ανεμπόδιστα από τις στήλες.

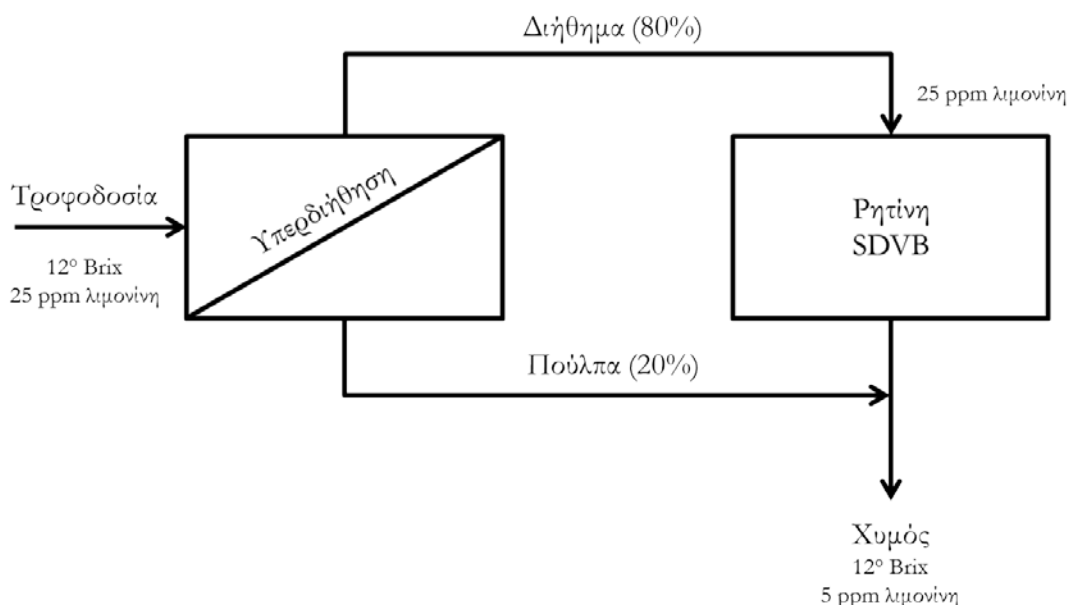
Η μέθοδος αυτή παραμένει σε χρήση μέχρι και σήμερα, με κύρια διαφορά την αντικατάσταση της φυγοκέντρωσης με υπερδιήθηση (Εικόνα 2-4), αλλά και παράπλευρες βελτιώσεις στη διαδικασία αναγέννησης των ρητινών. Η αποπίκραση με ρητίνες απομακρύνει τόσο τις πικρές ενώσεις λιμονίνη (σε πορτοκαλοχυμούς) και ναριγκίνη (σε χυμούς γκρέιπφρουτ) όσο και άλλες ενώσεις που υποβαθμίζουν ποιοτικά τους χυμούς όπως εσπεριδίνη και κουμαρίνη. Παράλληλα με τις ανεπιθύμητες ενώσεις απομακρύνονται και άλλα άγευστα λιμονοειδή και φλαβονοειδή.

#### **2.4.2 Αποπίκραση πορτοκαλοχυμού με ρητίνες στυρενίου-διβινυλβενζολίου**

Οι περισσότερες σύγχρονες μονάδες αποπίκρασης χυμού ακολουθούν η διεργασία που απεικονίζεται στην εικόνα 2-4. Ο παστεριωμένος & απειλαιωμένος χυμός, ο οποίος τυπικά περιέχει ~25 ppm λιμονίνης, τροφοδοτείται αρχικά σε διάταξη υπερδιήθησης αποτελούμενη από μεμβράνες κοίλης ίνας (hollow fibre), όπου και διαχωρίζεται σε πούλπα και διήθημα. Η αναλογία των δύο ρευμάτων αποτελεί παράμετρο της διεργασίας και καθορίζει την πικρότητα του τελικού προϊόντος (καθώς η πούλπα περιέχει λιμονίνη σε συγκέντρωση ίση με της τροφοδοσίας). Ακολούθως, το διαυγές διήθημα διέρχεται από στήλη πληρωμένη με σφαιρίδια ρητίνης SDVB, υπό ρυθμό ροής και θερμοκρασία (τυπικά ~50 °C) που βελτιστοποιούν την προσρόφηση της λιμονίνης στο πληρωτικό υλικό.

Μετά την διέλευση από τη στήλη, ο χυμός και η πούλπα αναμιγνύονται εκ νέου. Όπως προαναφέρθηκε η πούλπα περιέχει υψηλή συγκέντρωση λιμονίνης (~25 ppm), με αποτέλεσμα το τελικό προϊόν να περιέχει μετρήσιμη ποσότητα λιμονίνης (~5 ppm), σε συγκέντρωση όμως που δεν επηρεάζει αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του χυμού.

Οι συνήθεις διατάξεις αποπίκρασης χυμού περιλαμβάνουν δύο στήλες, οι οποίες χρησιμοποιούνται εναλλάξ για αποπίκραση και αναγέννηση της ρητίνης, με τυπικό διάστημα εναλλαγής μεταξύ των στηλών 6-12 ώρες. Η αναγέννηση της ρητίνης γίνεται με αραιό αλκαλικό διάλυμα, από το οποίο είναι δυνατό να ανακτηθούν τα προσροφηθέντα λιμονοειδή & φλαβονοειδή.



Εικόνα 2-24 - Διάγραμμα ροής τυπικής διεργασίας αποπύκνωσης πορτοκαλοχυμού

Τα κύρια μειονεκτήματα της τρέχουσας μεθόδου είναι η μεγάλη αρχική επένδυση λόγω του αναγκαίου εξοπλισμού φυγοκέντρισης ή υπερδιήθησης και το υψηλό λειτουργικό κόστος (~4-5% επί της αξίας του χυμού) για την αντικατάσταση των μεμβρανών και ρητινών (LaFlamme & Weinand, 1993). Υπό ορισμένες συνθήκες παρατηρείται απώλεια του επιθυμητού αρώματος ή/και εμφάνιση ανεπιθύμητων οσμών στο τελικό προϊόν (Fayoux et al., 2007). Παράλληλα, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.3 τα λιμονοειδή παρουσιάζουν δυνητικά ποικίλα οφέλη για την ανθρώπινη υγεία. Είναι λοιπόν προφανές πως η ανάπτυξη νέων μεθόδων αποπύκνωσης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή χυμού με χαμηλότερο κόστος και βελτιωμένα ποιοτικά και θρεπτικά χαρακτηριστικά. Εναλλακτικές μέθοδοι παρουσιάζονται στην ακόλουθη ενότητα καθώς και στο κεφάλαιο 3.

## 2.4.3 Εναλλακτικές μέθοδοι αποπύκνωσης πορτοκαλοχυμού

### 2.4.3.1 Ενζυμικές & μικροβιακές μέθοδοι

Η εμφάνιση της πικρότητας στον κατεργασμένο πορτοκαλοχυμό οφείλεται στην αντιστρεπτή ενζυμική λακτονοποίηση της άπικρης λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου (LARI) προς λιμονίνη κατά την παστερίωση του χυμού. Η πικρότητα μπορεί να αποφευχθεί με απομάκρυνση της LARI από τον ακατέργαστο χυμό, πριν η μετατροπή της σε λιμονίνη προχωρήσει σημαντικά.

Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 2-2, η λιμονική λακτόνη Α-δακτυλίου μπορεί να μετατραπεί μη αντιστρεπτά σε δύο άλλα άπικρα λιμονοειδή, αποφεύγοντας έτσι την παραγωγή λιμονίνης. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από δύο ένζυμα, τη λιμονική αφυδρογονάση (*limonoate dehydrogenase, LDH*) και τη γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών (*limonoid glucosyltransferase, LGT*). Η ενζυμική αποπύκνωση παρουσιάζει πλεονεκτήματα ως προς την απλότητα της διεργασίας (μετατροπή σε ένα στάδιο), τις ήπιες συνθήκες κατεργασίας που προστατεύουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του χυμού και το χαμηλό λειτουργικό κόστος.

Η λιμονική αφυδρογονάση (LDH) είναι ένα ένζυμο που ανήκει στις οξειδοαναγωγάσες και καταλύει την αντίδραση οξείδωσης της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου προς την 17-αφυδρο-λιμονική μορφή της. Το ένζυμο έχει απομονωθεί από μικροοργανισμούς *Arthrobacter globiformis* (Hasegawa et al., 1972), *Pseudomonas* sp (Hasegawa, Maier, & King, 1974), και *Rhodococcus fascians* (Humanes et al., 1997). Αντίστοιχη δραστηριότητα έχει ανακαλυφθεί και σε ιστούς από το μεσοκάρπιο πορτοκαλιών navel (Hasegawa, Maier, & Bennett, 1974) χωρίς όμως την επιτυχή απομόνωση του ενζύμου.

Η LDH έχει μοριακό βάρος ~ 118-128 kDa και αποτελείται από τέσσερις όμοιες υπομονάδες ~ 31 kDa έκαστη, χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τη LARL και το συνένζυμο NAD<sup>+</sup> και κατά την οξείδωση της LARL το ένζυμο προσβάλλει το υδροξύλιο στη θέση C<sub>17</sub> του ανοικτού D-δακτυλίου. Η κετόνη που προκύπτει από την οξείδωση του υδροξυλίου αποτρέπει το κλείσιμο του D-δακτυλίου, καθιστώντας έτσι αδύνατο το σχηματισμό λιμονίνης. Η βέλτιστη δραστηριότητα της LDH παρατηρείται σε pH 8.0-9.5, κάτι που καθιστά προβληματική τη χρήση του ενζύμου ως έχει στον όξινο πορτοκαλοχυμό.

Καθώς η LDH εκφράζεται φυσικά σε μικροοργανισμούς, η χρήση ακινητοποιημένων μικροοργανισμών για την οξείδωση της LARL φαίνεται υποσχόμενη. Η μέθοδος έχει αποδειχθεί αποτελεσματική με χρήση βακτηρίων *A. globiformis* (Hasegawa et al., 1983), *R. fascians*<sup>1</sup> (Cánovas et al., 1998; Hasegawa et al., 2006; Iborra et al., 1994; Martinez-Madrid et al., 1989) και *Acinetobacter* sp. (Vaks & Lifshitz, 1981), και ποικίλων μέσων ακινητοποίησης όπως πήγματα ακρυλαμιδίου, αλγινικού οξέος, αγαρόζης και κ-καραγεννάνης, καθώς και αφρό πολυουρεθάνης. Η αποπίκρανση του χυμού από τις ακινητοποιημένες καλλιέργειες ήταν δυνατή στο φυσικό pH του χυμού και αποδίδεται στην εγγενή δράση της βακτηριακής LDH, καθώς σε κάθε περίπτωση στα προϊόντα της αποπίκρανσης ανιχνεύεται η παράγωγος ένωση 17-αφυδρο-λιμονική λακτόνη.

Οι ακόλουθες έρευνες στοχεύουν στη δημιουργία διαγονιδιακών μικροοργανισμών ασφαλών για χρήση σε τρόφιμα (*generally recognized as safe, GRAS*) που εκφράζουν την LDH προκειμένου να καταστεί δυνατή η χρήση βιοαντιδραστήρων για την αποπίκρανση πορτοκαλοχυμού σε βιομηχανική κλίμακα (Humanes et al., 1997). Παράλληλες έρευνες έχουν εστιαστεί στον προσδιορισμό της γονιδιακής αλληλουχίας που κωδικοποιεί το ένζυμο με απώτερο στόχο τη δημιουργία διαγονιδιακών πορτοκαλιών navel, στους καρπούς των οποίων το ένζυμο θα εκφράζεται φυσικά. Η ενισχυμένη δραστηριότητα της LDH στα διαγονιδιακά φυτά θα συνεισφέρει στη φυσική αποφυγή πικρότητας του χυμού, καθιστώντας περιττή την αποπίκρανση του (Suhayda et al., 1995).

Ένα άλλο ένζυμο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποπίκρανση του πορτοκαλοχυμού είναι η γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών (LGT). Το ένζυμο αυτό καταλύει τη γλυκοζυλίωση της LARL στη θέση C<sub>17</sub> προς γλυκοζίτη της λιμονίνης (*limonin glucoside, LG*). Η χρήση του ενζύμου για μετατροπή της λιμονίνης σε πορτοκαλοχυμό έχει μελετηθεί με υποσχόμενα αποτελέσματα (Σαριδάκη, 2012). Καθώς η LGT αποτελεί βασικό αντικείμενο της παρούσης εργασίας, η δομή, δραστηριότητα και συμπεριφορά της αναλύονται εκτενέστερα στο κεφάλαιο 3.

---

<sup>1</sup> Σε παλαιότερη βιβλιογραφία το βακτήριο *R. fascians* αναφέρεται ως *Corynebacterium fascians*

#### 2.4.3.2 Χημική κατεργασία καρπών με φυτοορμόνες

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.2, η συγκέντρωση λιμονίνης στον πορτοκαλοχυμό συσχετίζεται αρνητικά με την ωρίμανσή του, καθώς οι ώριμοι καρποί περιέχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις LARL συγκριτικά με τους πρώιμους. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο λογικό συμπέρασμα πως χημικοί παράγοντες που επιταχύνουν την ωρίμανση των καρπών είναι πιθανό να επιταχύνουν και τη βιομετατροπή της LARL προς τον άπικρο γλυκοζίτη της λιμονίνης στους ιστούς.

Το αιθυλένιο είναι μία από τις βασικές φυτικές ορμόνες που συνεισφέρουν στην ωρίμανση. Κατεργασία καρπών πορτοκαλιού navel με αέριο αιθυλένιο ή διάλυμα etephon (2-χλωροαιθυλφωσφονικό οξύ, ένωση η οποία μεταβολίζεται προς αιθυλένιο μέσα στον καρπό) προκαλεί ελάττωση της συγκέντρωσης λιμονίνης στον τελικό χυμό χωρίς να υποβαθμίζει τα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του (Maier et al., 1973). Έκθεση του χυμού σε αέριο αιθυλένιο δεν έχει καμία επίπτωση στη συγκέντρωση λιμονίνης (Pichaiyongvongdee & Haruenkit, 2011), κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα πως το αιθυλένιο δεν αντιδρά με καθεαυτή τη λιμονίνη. Η αποπίεραση φαίνεται να οφείλεται στην επιτάχυνση της ενζυμικής μετατροπής της LARL σε γλυκοζίτη μέσα στον καρπό και κατά συνέπεια στην αποφυγή παραγωγής της λιμονίνης, ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν είναι όμως γνωστός.

Άλλες φυτοορμόνες που δρουν στη βιοσύνθεση των λιμονοειδών είναι αυξίνες όπως το ινδολοοξικό, ινδολοβουτανικό και τριχλωροφαινοξυοξικό οξύ (Hasegawa et al., 1986) και τα παράγωγα της τριαιθυλαμίνης (Hasegawa et al., 1977). Οι ορμόνες αυτές αναστέλλουν τη βιοσύνθεση της πρόδρομης νομιλίνης στους βλαστούς και της LARL στα φύλλα των εσπεριδοειδών αντίστοιχα. Η δράση τους θεωρείται πως οδηγεί δυνητικά σε ελαττωμένη συγκέντρωση λιμονίνης στο χυμό από τους καρπούς των κατεργασμένων φυτών.

## Βιβλιογραφία 2ου κεφαλαίου

- Abbasi, S., Zandi, P., & Mirbagheri, E. (2005). Quantitation of limonin in Iranian orange juice concentrates using high-performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *European Food Research and Technology*, 221, 202–207.
- Adlercreutz, P. (1994). Applications. In J. M. . Cabral, D. Best, L. Boross, & J. Tramper (Eds.), *Applied Biocatalysis* (pp. 130–132). Chur: Harwood Academic Publishers.
- Ahmad, H., Li, J., Polson, M., Mackie, K., Quiroga, W., & Patil, B. S. (2006). Citrus Limonoids and Flavonoids: Enhancement of Phase II Detoxification Enzymes and Their Potential in Chemoprevention. In B. S. Patil, N. D. Turner, E. G. Miller, & J. S. Brodbelt (Eds.), *Potential Health Benefits of Citrus* (pp. 130–143). Washington, DC: American Chemical Society.
- Battinelli, L., Mengoni, F., Lichtner, M., Mazzanti, G., Saija, A., Mastroianni, C. M., & Vullo, V. (2003). Effect of Limonin and Nomilin on HIV-1 Replication on Infected Human Mononuclear Cells. *Planta Medica*, 69, 910–913.
- Berhow, M. A., Fong, C. H., & Hasegawa, S. (1996). Limonoid and flavonoid composition in varieties of Papeda and Papedocitrus. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24(3), 237–242.
- Brekša, A. P., & Manners, G. D. (2006). Evaluation of the antioxidant capacity of limonin, nomilin, and limonin glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3827–3831.
- Brekša, A. P., Zukas, A. A., & Manners, G. D. (2005). Determination of limonoate and nomilinoate A-ring lactones in citrus juices by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1064, 187–191.
- Cánovas, M., García-Cases, L., & Iborra, J. L. (1998). Limonin consumption at acidic pH values and absence of aeration by *Rhodococcus fascians* cells in batch and immobilized continuous systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(2), 111–116.
- Chandler, B. V., & Johnson, R. L. (1976). Contacting citrus juice with a cellulose ester adsorbent to remove limonin. U.S. Patent 3 989 854.
- Chandler, B. V., & Kefford, J. F. (1966). Chemical assay of limonin, the bitter principle of oranges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17, 193–197.
- Cui, B., Chai, H., Constant, H. L., Santisuk, T., Reutrakul, V., Beecher, C. W. W., ... Kinghorn, A. D. (1998). Limonoids from *Azadirachta excelsa*. *Phytochemistry*, 47, 1283–1287.

- Endo, T., Kita, M., Shimada, T., Moriguchi, T., Hidaka, T., Matsumoto, R., ... Omura, M. (2002). Modification of Limonoid Metabolism in Suspension Cell Culture of Citrus. *Plant Biotechnology*, 19, 397–403.
- Fayoux, S. C., Hernandez, R. J., & Holland, R. V. (2007). The debittering of navel orange juice using polymeric films. *Journal of Food Science*, 72(4), E143–54.
- Fong, C. H., Hasegawa, S., Coggins, J. C. W., Atkin, D. R., & Miyake, M. (1992). Contents of Limonoids and Limonin 17- $\beta$ -D-Glucopyranoside in Fruit Tissue of Valencia Orange during Fruit Growth and Maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(7), 1178–1181.
- Guadagni, D. G., Maier, V. P., & Turnbaugh, J. G. (1973). Effect of some Citrus Juice Constituents on Taste Thresholds for Limonin and Naringin Bitterness. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24, 1277–1288.
- Guadagni, D. G., Maier, V. P., & Turnbaugh, J. G. (1974). Effect of subthreshold concentrations of limonin, naringin and sweeteners on bitterness perception. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25, 1349–1354.
- Guthrie, N., Morley, K., Hasegawa, S., Manners, G. D., & Vandenberg, T. (2000). Inhibition of Human Breast Cancer Cells by Citrus Limonoids. In M. A. Berhow, S. Hasegawa, & G. D. Manners (Eds.), *Citrus Limonoids: Functional Chemicals in Agriculture and Food* (Vol. 758, pp. 164–174). American Chemical Society.
- Hasegawa, S. (1999). Limonin Bitterness in Citrus Juices. In R. Teranishi, E. L. Wick, & I. Hornstein (Eds.), *Flavor Chemistry: 30 Years of Progress* (pp. 91–93). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Hasegawa, S., Bennett, R. D., Maier, V. P., & King, A. D. (1972). Limonoate dehydrogenase from *Arthrobacter globiformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20, 1031–1034.
- Hasegawa, S., & Berhow, M. A. (2000). Analysis of Limonoids by Thin-Layer Chromatography. In M. A. Berhow, S. Hasegawa, & G. D. Manners (Eds.), *Citrus Limonoids: Functional Chemicals in Agriculture and Food* (pp. 31–39). Washington, DC: American Chemical Society.
- Hasegawa, S., Maier, V. P., & Bennett, R. D. (1974). Detection of limonoate dehydrogenase activity in albedo tissues of *Citrus sinensis*. *Phytochemistry*.
- Hasegawa, S., Maier, V. P., Herman, Z., & Ou, P. (1986). Phytohormone bioregulation of nomilin biosynthesis in Citrus limon seedlings. *Phytochemistry*, 25, 1323–1325.
- Hasegawa, S., Maier, V. P., & King, A. D. (1974). Isolation of new limonoate dehydrogenase from *Pseudomonas*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22, 523–526.
- Hasegawa, S., & Miyake, M. (1996). Biochemistry and biological functions of citrus limonoids. *Food Reviews International*, 12, 413–435.

- Hasegawa, S., Miyake, M., Ozaki, Y., & Berhow, M. A. (1996). Limonin: A non-volatile bitter principle in citrus juice. In W. Pickenhagen, C.-T. Ho, & A. M. Spanier (Eds.), *The Contribution of Low and Nonvolatile Materials to the Flavor of Foods* (pp. 137–145). Carol Stream, IL: Allured Publishing.
- Hasegawa, S., Pelton, V. A., & Bennett, R. D. (1983). Metabolism of limonoids by *Arthrobacter globiformis* II: basis for a practical means of reducing the limonin content of orange juice by immobilized cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(1974), 1002–1004.
- Hasegawa, S., Vandercook, C. E., Choi, G. Y., Herman, Z., & Ou, P. (2006). Limonoid Debittering of Citrus Juice Sera By Immobilized Cells of *Corynebacterium fascians*. *Journal of Food Science*, 50, 330–332.
- Hasegawa, S., Yokoyama, H., & Hoagland, J. E. (1977). Inhibition of limonoid biosynthesis in leaves of *Citrus limon*, by triethylamine derivatives. *Phytochemistry*, 16, 1083–1085.
- Herman, Z., Fong, C. H., Ou, P., & Hasegawa, S. (1990). Limonoid glucosides in orange juices by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1860–1861.
- Humanes, L., López-Ruiz, A., Merino, M. T., Roldán, J. M., & Diez, J. (1997). Purification and characterization of limonoate dehydrogenase from *Rhodococcus fascians*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(ii), 3385–3389.
- Iborra, J. L., Manjón, A., Cánovas, M., Lozano, P., & Martínez, C. (1994). Continuous limonin degradation by immobilized *Rhodococcus fascians* cells in K-carrageenan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 487–493.
- Johnson, R. L., & Chandler, B. V. (1982). Reduction of bitterness and acidity in grapefruit juice by adsorptive processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33, 287–293.
- Karim, M. R., & Hashinaga, F. (2002). Isolation and characterization of limonoid glucosyltransferase from pummelo albedo tissue. *Food Chemistry*, 76(4), 431–436.
- Kelly, C., Jewell, C., & O'Brien, N. M. (2003). The effect of dietary supplementation with the citrus limonoids, limonin and nomilin on xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of the rat. *Nutrition Research*.
- Kimball, D. A. (1999). *Citrus Processing: A Complete Guide* (2nd ed. 19., p. 473). Springer US.
- Kita, M., Endo, T., Shimada, T., Moriguchi, T., Hirata, Y., Hasegawa, S., & Omura, M. (2003). Allelic structures of UDP-glucose:limonoid glucosyltransferase affect limonoid bitterness in *Citrus unshiu* and *C. sinensis*. *Euphytica*, 132, 87–94.
- Kurowska, E. M., Banh, C., Hasegawa, S., & Manners, G. D. (2000). Regulation of Apo B Production in HepG2 Cells by Citrus Limonoids. In M. A. Berhow, S. Hasegawa, & G.



- D. Manners (Eds.), *Citrus Limonoids: Functional Chemicals in Agriculture and Food* (pp. 175–184). Washington, DC: American Chemical Society.
- Kurowska, E. M., Borradaile, N. M., Spence, J. D., & Carroll, K. K. (2000). Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. *Nutrition Research*, 20, 121–129.
- Kurowska, E. M., Spence, J. D., Jordan, J., Wetmore, S., Freeman, D. J., Piche, L. A., & Serratore, P. (2000). HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 1095–1100.
- LaFlamme, J., & Weinand, R. (1993). New developments by the combination of membrane filtration and adsorption technology. *Fruit Processing*, 9, 336–342.
- Lam, L. K. T., Sparnins, V. L., & Wattenberg, L. W. (1987). Effects of derivatives of kahweol and cafestol on the activity of glutathione S-transferase in mice. *Journal of Medicinal Chemistry*, 30, 1399–1403.
- Lam, L. K. T., Zhang, J., & Hasegawa, S. (1994). Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis. *Food Technology*, 48, 104–108.
- Lam, L. K. T., Zhang, J., Hasegawa, S., & Schut, H. A. J. (1994). Inhibition of Chemically Induced Carcinogenesis by Citrus Limonoids. In M.-T. Huang, T. Osawa, C.-T. Ho, & R. T. Rosen (Eds.), *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I* (Vol. 546, pp. 209–219). American Chemical Society.
- Maeda, H., Takahashi, Y., Miyake, M., Ifuku, Y., Agricultural, W., Hassaku, W., & Nov, R. (1984). Removal of Bitterness and Reduction of Acidity in Hassaku (*Citrus hassaku* Tanaka) Juice with Ion Exchange Resins and Adsorbents. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 31(6), 413–420.
- Maier, V. P., & Beverly, G. D. (1968). Limonin monolactone, the nonbitter precursor responsible for delayed bitterness in certain citrus juices. *Journal of Food Science*, 33, 488–492.
- Maier, V. P., Brewster, L. C., & Hsu, A. C. (1973). Ethylene-accelerated limonoid metabolism in citrus fruits. Process for reducing juice bitterness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21, 490–495.
- Maier, V. P., Hasegawa, S., Bennett, R. D., & Echols, L. C. (1980). Limonin and limonoids: Chemistry, biochemistry, and juice bitterness. In S. Nagy & J. A. Attaway (Eds.), *Citrus nutrition and quality* (Vol. 143, pp. 63–82). American Chemical Society.
- Manners, G. D. (2007). Citrus limonoids: analysis, bioactivity, and biomedical prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8285–8294.
- Manners, G. D., Hasegawa, S., Bennett, R. D., & Wong, R. Y. (2000). LC-MS and NMR Techniques for the Analysis and Characterization of Citrus Limonoids. In M. A. Berhow, S. Hasegawa, & G. D. Manners (Eds.), *Citrus Limonoids: Functional*

Chemicals in Agriculture and Food (pp. 40–59). Washington, DC: American Chemical Society.

- Manners, G. D., Jacob, R. A., Breksa, A. P., Schoch, T. K., & Hasegawa, S. (2003). Bioavailability of citrus limonoids in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4156–4161.
- Martinez-Madrid, C., Manjon, A., & Iborra, J. L. (1989). Degradation of limonin by entrapped *Rhodococcus fascians* cells. *Biotechnology Letters*, 11(1989), 653–658.
- Miller, E. G., Gonzales-Sanders, A. P., Couvillon, A. M., Wright, J. M., Hasegawa, S., & Lam, L. K. T. (1992). Inhibition of hamster buccal pouch carcinogenesis by limonin 17-beta-D-glucopyranosid. *Nutrition and Cancer*, 17, 1–7.
- Moriguchi, T., Kita, M., Hasegawa, S., & Omura, M. (2003). Molecular approach to citrus flavonoid and limonoid biosynthesis. *Agriculture*, 1(January), 22–25.
- Ozaki, Y., Ayano, S., Inaba, N., Miyake, M., Berhow, M. A., & Hasegawa, S. (1995). Limonoid Glucosides in Fruit, Juice and Processing by-products of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marcov.), 60, 186–189.
- Ozaki, Y., Fong, C. H., Herman, Z., Maeda, H., Miyake, M., Yasushi, I., & Hasegawa, S. (1991). Limonoid Glucosides in Citrus Seeds. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(1), 137–141.
- Pichaiyongvongdee, S., & Haruenkit, R. (2009). Comparative studies of limonin and naringin distribution in different parts of pummelo [*Citrus grandis* (L.) Osbeck] cultivars grown in Thailand. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 43(2009), 28–36.
- Pichaiyongvongdee, S., & Haruenkit, R. (2011). Effect of Ethylene Treatments on Limonin Reduction in Thai Pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) Fruit. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 45, 1105–1114.
- Poulose, S. M., Harris, E. D., & Patil, B. S. (2006). Antiproliferative effects of citrus limonoids against human neuroblastoma and colonic adenocarcinoma cells. *Nutrition and Cancer*, 56, 103–112.
- Roy, A., & Saraf, S. (2006). Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(2).
- Suhayda, C. G., Omura, M., & Hasegawa, S. (1995). Limonoate dehydrogenase from *Arthrobacter globiformis*: The native enzyme and its N-terminal sequence. *Phytochemistry*, 40, 17–20.
- Tanaka, T., Maeda, M., Kohno, H., Murakami, M., Kagami, S., Miyake, M., & Wada, K. (2001). Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by the citrus limonoids obacunone and limonin. *Carcinogenesis*, 22, 193–198.

- Vaks, B., & Lifshitz, A. (1981). Debittering of orange juice by bacteria which degrade limonin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 1258–1261.
- Vikram, A., Jayaprakasha, G. K., & Patil, B. S. (2007). Simultaneous determination of citrus limonoid aglycones and glucosides by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 590, 180–186.
- Widmer, W. W., & Haun, C. A. (2000). Analysis of Limonin and Flavonoids in Citrus Juices and Byproduct Extracts by Direct Injection and In-Line Sample Clean-Up. In M. A. Berhow, S. Hasegawa, & G. D. Manners (Eds.), *Citrus Limonoids: Functional Chemicals in Agriculture and Food* (pp. 60–72). Washington, DC: American Chemical Society.
- Zaare-Nahandi, F., Hosseinkhani, S., Zamani, Z., Asadi-Abkenar, A., & Omidbaigi, R. (2008). Delay expression of limonoid UDP-glucosyltransferase makes delayed bitterness in citrus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(1), 59–62.



## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Γλυκοζυλοτρανσφεράση λιμονοειδών

### 3.1 Εισαγωγή

Τα ένζυμα είναι βιολογικά μόρια τα οποία καταλύουν χημικές αντιδράσεις. Τα περισσότερα ένζυμα είναι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους ( $\sim 10^4 - 10^9$  Da). Επιπλέον, καταλυτική δράση επιδεικνύουν και ορισμένα μόρια RNA, τα οποία αποκαλούνται ριβοένζυμα (ribozymes).

Η καταλυτική δράση των ενζύμων οφείλεται στην ελάττωση της ενέργειας ενεργοποίησης των αντιδράσεων που καταλύουν, με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού της ελάχιστοτε αντίδρασης και είναι ιδιαιτέρως εξειδικευμένη, με πολλά ένζυμα να δέχονται ένα μόνο υπόστρωμα.

Τα ενζυμικά μόρια παρουσιάζουν ευρεία ποικιλία δομών, τόσο ως προς το μέγεθός όσο και ως προς την πολυπλοκότητά τους. Στη απλούστερη μορφή του ένα ένζυμο αποτελείται από μια αναδιπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα, ενώ πολλά ένζυμα αποτελούνται από πολλαπλές υπομονάδες. Σε αρκετές περιπτώσεις το ένζυμο εκτός από το πρωτεϊνικό μόριο περιέχει και μια μη-πρωτεϊνική ένωση, η οποία αποκαλείται συμπαράγοντας. Οι συμπαράγοντες μπορεί να είναι σύνθετα οργανικά ή οργανομεταλλικά μόρια όπως  $\text{NAD}^+$ , συνένζυμο A (CoA) ή βιταμίνες, τα οποία χαρακτηρίζονται ως συνένζυμα (coenzymes) ή ανόργανα μεταλλικά ιόντα όπως  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+/3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ . Οι συμπαράγοντες συμβάλλουν στη δράση του ενζύμου είτε μεταβάλλοντας τη στερεοχημεία της πρωτεΐνης είτε συμμετέχοντας απευθείας στην καταλύομενη αντίδραση. Το σύμπλοκο μόριο που σχηματίζεται ονομάζεται ολοένζυμο (holoenzyme), ενώ το πρωτεϊνικό μέρος του αποένζυμο (apoenzyme). Η τελική δομή του ενζύμου περιλαμβάνει μία ενεργό περιοχή, στην οποία γίνεται η πρόσδεση του υποστρώματος.

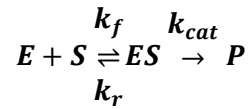
Όπως προαναφέρθηκε τα ένζυμα είναι υψηλά εξειδικευμένα τόσο ως προς το υπόστρωμά τους όσο και προς το είδος των αντιδράσεων που καταλύουν, και βάσει των οποίων κατατάσσονται σε έξι βασικές κατηγορίες, καθώς και πολλαπλές υποκατηγορίες.

Πίνακας 3-1 - Ταξινόμηση των ενζύμων βάσει του συστήματος EC (Enzyme Commission)

Κατηγορία	Σύνηθες όνομα	Καταλύομενες αντιδράσεις
EC 1	Οξειδάσες και αφυδρογονάσες	Οξειδοαναγωγή
EC 2	Τρανσφεράσες (μεταγωγάσες)	Μεταφορά λειτουργικών ομάδων
EC 3	Υδρολάσες	Υδρόλυση
EC 4	Λυάσες	Προσθήκη σε διπλούς δεσμούς
EC 5	Ισομεράσες	Ισομερίωση
EC 6	Λιγάσες και συνθετάσες	Σχηματισμός δεσμών με διάσπαση ATP

### 3.2 Κινητική κορεσμού

Η κινητική που περιγράφει τις συνήθεις ενζυμικές αντιδράσεις ονομάζεται Michaelis-Menten ή κινητική κορεσμού. Η γενική χημική εξίσωση που περιγράφει μια αντίδραση υποστρώματος (S) προς προϊόν (P) η οποία καταλύεται από ένζυμο (E) είναι η:



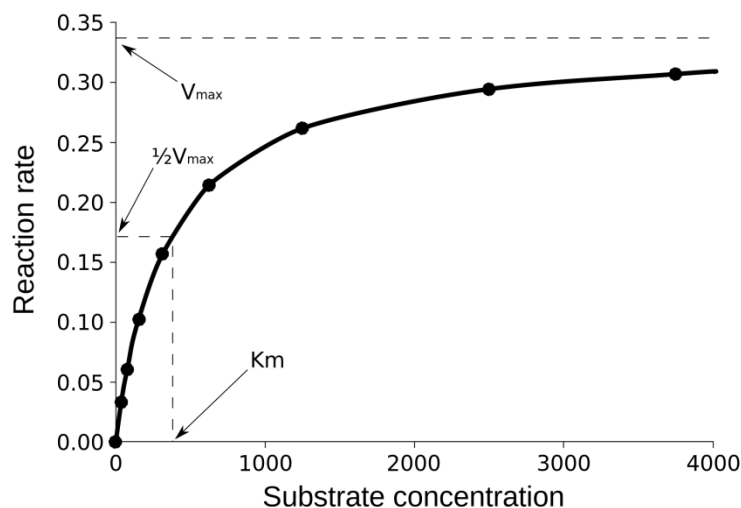
όπου (ES) το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Η κινητική κορεσμού κάνει τις ακόλουθες παραδοχές:

- 1) Το σύμπλοκο ES βρίσκεται σε ισορροπία (steady-state):  $\frac{d[ES]}{dt} = 0$
- 2) Η συγκέντρωση του ελεύθερου υποστρώματος είναι ίση με την ολική συγκέντρωση υποστρώματος (ή, η συγκέντρωση του συμπλόκου είναι πολύ μικρότερη από την ολική συγκέντρωση υποστρώματος):  $[ES] \ll [S]$
- 3) Η πρόσδεση και διάσπαση του υποστρώματος είναι πολύ ταχύτερη του σχηματισμού του προϊόντος:  $k_{cat} \ll k_f$ .

Επίσης ορίζονται η μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης, η οποία επιτυγχάνεται όταν όλο το ένζυμο είναι συμπλοκοποιημένο με το υπόστρωμα,  $V_m = k_{cat} \times [E_T]$  καθώς και η σταθερά Michaelis,  $K_m = \frac{k_r + k_{cat}}{k_f}$ .

Τα παραπάνω οδηγούν στην εξίσωση ρυθμού Michaelis-Menten:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = V_m \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$$



Εικόνα 3-25 - Απεικόνιση κινητικής Michaelis-Menten για τιμές παραμέτρων  $K_m = 400$  και  $V_{max} = 0.34$  (αυθαίρετες μονάδες)

### 3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική δραστηριότητα

Η δραστηριότητα των ενζύμων εξαρτάται από την ικανότητά τους να προσδεθούν με το υπόστρωμα. Ο βασικός παράγοντας που καθορίζει τη συγγένεια ενζύμου-υπόστρώματος είναι η στερεοχημική διαμόρφωση της πρωτεΐνης, η οποία επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες.

#### 3.3.1 Επίδραση pH

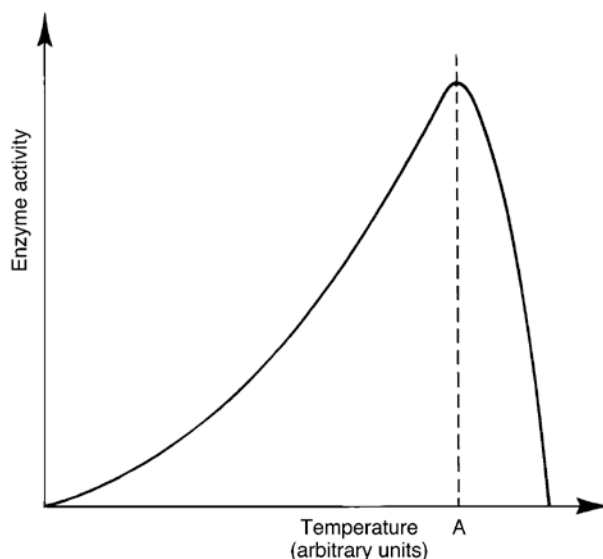
Η ενεργός περιοχή των ενζύμων αποτελείται από αμινοξέα τα οποία προσδένονται στο υπόστρωμα μέσω δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων ή και δυνάμεων Van der Waals. Ορισμένα από αυτά τα αμινοξέα φέρουν όξινες (Asp, Glu) ή βασικές (Lys, Arg, His) πλευρικές αλυσίδες, το φορτίο των οποίων μεταβάλλεται ανάλογα με το pH του περιβάλλοντός τους, κάτι που επηρεάζει την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα. Επιπλέον, μεταβολές του pH μπορεί να οδηγήσουν και σε μεταβολές της στερεοχημικής διαμόρφωσης του ενζύμου, με αποτέλεσμα τη μεταβολή στη δραστηριότητα αλλά και τη σταθερότητά του. Τέλος, εάν και το υπόστρωμα περιέχει ιοντικές ομάδες, το pH του περιβάλλοντος μπορεί να επηρεάσει περαιτέρω τη συγγένεια του με το ένζυμο.

Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την εξάρτηση της δραστηριότητας των ενζύμων από το pH του περιβάλλοντός τους, με τα περισσότερα ένζυμα να εμφανίζουν μέγιστη δραστηριότητα σε τιμές pH μεταξύ 5.5 και 7.5 (Belitz et al., 2009, pp. 93–157). Η συμπεριφορά αυτή παρουσιάζει πάντως και εξαιρέσεις σε ένζυμα όπως η παπαΐνη, ή δραστηριότητα της οποίας παραμένει πρακτικά αμετάβλητη σε μία ευρεία κλίμακα τιμών pH.

#### 3.3.2 Επίδραση θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά τη δράση των ενζύμων. Κατά κανόνα ο ρυθμός των ενζυμικών αντιδράσεων αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τη βέλτιστη τιμή της. Σε θερμοκρασίες υψηλότερες της βέλτιστης η δραστηριότητα μειώνεται δραστικά λόγω της μετουσίωσης του ενζύμου.

Η αύξηση της δραστηριότητας με την αυξανόμενη θερμοκρασία αποκαλείται θερμική ενεργοποίηση του ενζύμου και η απώλεια δραστηριότητας λόγω περαιτέρω θέρμανσης θερμική απενεργοποίηση (heat inactivation).



Εικόνα 3-26 - Επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστηριότητα των ενζύμων

Εαν θεωρηθεί πως ο ρυθμός της αντίδρασης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου βάσει της εξίσωσης  $v = k_{cat} \times [E]$ , στην περιοχή της θερμικής ενεργοποίησης η σταθερά ρυθμού  $k_{cat}$  ακολουθεί την εξίσωση Arrhenius:

$$k_{cat} = k_{cat}^{T_{ref}} \times \exp \left[ -\frac{E_a}{R} \times \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right],$$

όπου  $k_{cat}^{T_{ref}}$  η σταθερά ρυθμού σε θερμοκρασία αναφοράς  $T_{ref}$  και  $E_a$  η ενέργεια ενεργοποίησης της καταλυτικής αντίδρασης.

Στην περιοχή θερμικής απενεργοποίησης η αντίδραση μετουσίωσης του ενζύμου περιγράφεται από την εξίσωση  $-\frac{d[E]}{dt} = k_d \times [E]^n$ , όπου  $k_d$  η σταθερά ρυθμού και  $n$  η τάξη της αντίδρασης μετουσίωσης. Για αντιδράσεις 1<sup>ης</sup> τάξης, από την παραπάνω εξίσωση προκύπτει πως  $[E] = [E_0] \times e^{-k_d \times t}$ , όπου  $[E_0]$  η αρχική συγκέντρωση του ενζύμου. Επιπλέον, η σταθερά μετουσίωσης  $k_d$  μεταβάλλεται με τη θερμοκρασία σύμφωνα με την εξίσωση Arrhenius:

$$k_d = k_d^{T_{ref}} \times \exp \left[ -\frac{E_d}{R} \times \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right],$$

όπου  $k_d^{T_{ref}}$  η σταθερά σε θερμοκρασία αναφοράς  $T_{ref}$  και  $E_d$  η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης μετουσίωσης.



### 3.3.3 Επίδραση της πίεσης

Κατά κανόνα η επίδραση της πίεσης σε ένα σύστημα που βρίσκεται σε θερμοδυναμική ισορροπία διέπεται από την αρχή Le Châtelier, καθώς αύξηση της πίεσης οδηγεί το σύστημα προς τη διαμόρφωση που μειώνει τον όγκο του, και αντίστροφα. Η σχέση μεταξύ πίεσης  $P$ , σταθεράς ισορροπίας  $K$  και μεταβολής του όγκου  $\Delta V$  για σταθερή θερμοκρασία  $T$  δίνεται από τη σχέση  $\left(\frac{\partial \ln(K)}{\partial P}\right)_T = -\frac{\Delta V}{R \cdot T}$  (Boonyaratanakornkit et al., 2002).

Στην περίπτωση των πρωτεϊνών, οι βασικοί παράγοντες που καθορίζουν το πρόσημο και το μέγεθος της παραμέτρου  $\Delta V$  είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, η ηλεκτροσυστολή των φορτισμένων και πολικών πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, και η εξάλειψη των εσωτερικών κενών της δομής (Frye & Royer, 1998). Η πρωτοταγής δομή των ενζύμων δεν επηρεάζεται από την εφαρμογή πίεσης. Αντίθετα, η διαταραχή των υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, καθώς και των δεσμών υδρογόνου, οδηγούν σε αποσταθεροποίηση της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής υπό πίεση ανώτερη των 200 MPa. Η δευτεροταγής δομή καταστρέφεται σε υψηλότερες πιέσεις, τυπικά σε πιέσεις μεγαλύτερες των 500 - 1000 MPa λόγω ενυδάτωσης της πρωτεΐνης (Payne et al., 1997).

Κατά συνέπεια πιθανοί μηχανισμοί μεταβολής της δραστηριότητας ενός ενζύμου είναι μεταξύ άλλων οι αλλαγές στη στερεοχημική διαμόρφωσή του ενεργού κέντρου, αλλαγή της πύκνωσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, διαχωρισμός των υπομονάδων και μεταβολή της επιδιαλύτωσης του μορίου.

Όπως ισχύει και στη θερμική απενεργοποίηση, ο ρυθμός μεταβολής ενεργότητας περιγράφεται από τη σχέση  $-\frac{d[E]}{dt} = k_d \times [E]^n$ , η τάξη  $n$  της οποίας εξαρτάται από το μηχανισμό της απενεργοποίησης. Εφόσον ένας από τους παραπάνω μηχανισμούς κυριαρχεί, η κινητική ενεργοποίησης/απενεργοποίησης μπορεί να θεωρηθεί 1<sup>ης</sup> τάξης, ενώ εάν πραγματοποιούνται ταυτόχρονα περισσότερα από ένα φαινόμενα είναι απαραίτητη η χρήση πιο σύνθετης κινητικής.

Η σταθερά ρυθμού ενεργοποίησης/απενεργοποίησης  $k_d$  σε σταθερή θερμοκρασία  $T$  εξαρτάται από την πίεση βάσει της εξίσωσης Eyring:

$$k_d = k_d^{P_{ref}} \times \exp\left[-\frac{V_a}{R \cdot T} \times (P - P_{ref})\right] \text{ (Eyring et al., 1946),}$$

όπου  $k_d^{P_{ref}}$  η σταθερά σε πίεση αναφοράς  $P_{ref}$  και  $V_a$  ο όγκος ενεργοποίησης της αντίδρασης μετουσίωσης.

Η συνδυαστική επίδραση θερμοκρασίας και πίεσης στην ενεργότητα ενός ενζύμου μπορεί να περιγραφεί με μία σχέση της μορφής

$$k_{P,T} = k_{ref}^{P,T} \times \exp\left[-\frac{E_a(P)}{R} \times \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) - \frac{V_a(T)}{R \cdot T} \times (P - P_{ref})\right],$$

όπου  $E_a(P)$  και  $V_a(T)$  η ενέργεια και ο όγκος ενεργοποίησης ως συνάρτηση της πίεσης και της θερμοκρασίας αντίστοιχα (Polydera et al., 2004).

Παρότι κατά κύριο λόγο η μεταβολή της δομής των ενζύμων οδηγεί σε μετουσίωση και απώλεια δραστηριότητάς τους, για ορισμένα ένζυμα έχει αναφερθεί βελτίωση τόσο της δραστηριότητας όσο και της σταθερότητάς τους (Eisenmenger & Reyes-De-Corcuera, 2009; Vila-Real et al., 2007, 2010).

### 3.3.4 Επίδραση διεργασιών ΥΥΠ σε ένζυμα και μικροοργανισμούς

Η θερμοκρασία και η πίεση είναι σημαντικές θερμοδυναμικές παράμετροι οι οποίες μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση σε βιολογικά συστήματα όπως είναι οι πρωτεΐνες και οι μικροοργανισμοί. Η πίεση επιδρά κυρίως σε μη-ομοιοπολικούς δεσμούς (ιοντικούς, δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις) ενώ δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τους ομοιοπολικούς δεσμούς. Έτσι τα χαμηλού μοριακού βάρους συστατικά ενός τροφίμου όπως είναι οι βιταμίνες, χρωστικές, αρωματικές και γευστικές ενώσεις διατηρούνται σχεδόν αναλλοίωτα (Hoover, 1993; Knorr, 1993; Tewari et al., 1999). Αντίθετα, οι υψηλού μοριακού βάρους ενώσεις όπως είναι οι πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην πίεση. Οι μεταβολές στην πρωτεϊνική δομή οι οποίες πραγματοποιούνται κατά την εφαρμογή της ΥΥΠ σε ένα τρόφιμο ευθύνονται για την απενεργοποίηση ή ενεργοποίηση ενζύμων (Seyderhelm et al., 1996) καθώς και για την καταστροφή παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Hoover et al., 1989; Smelt, 1998). Η επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας σε βιολογικά συστήματα περιγράφεται θερμοδυναμικά στην παράγραφο που ακολουθεί.

Γενικά η επίδραση της πίεσης ( $P$ ) και της θερμοκρασίας ( $T$ ) σε ένα θερμοδυναμικό σύστημα μπορεί να περιγραφεί ποσοτικά από την ελεύθερη ενέργεια Gibbs ( $G$ ):

$$G = H - TS \quad (3.1)$$

όπου,  $S$  η εντροπία και  $H$  η ενθαλπία. Χρησιμοποιώντας την εξίσωση της ενθαλπίας:

$$H = U + PV \quad (3.2)$$

όπου,  $U$  η εσωτερική ενέργεια και  $V$  ο όγκος. Με τη χρήση της Εξ. 3.2 μπορεί να υπολογιστεί η παράγωγος της Εξ. 1.3:

$$dG = dU + PdV + VdP - TdS - SdT \quad (3.3)$$

Με το δεδομένο ότι ισχύουν ο πρώτος και ο δεύτερος νόμος της θερμοδυναμικής και θεωρώντας ότι υπάρχει μεταβολή μόνο στην ελεύθερη ενέργεια,  $\Delta G$ , η Εξ. 3.3 μετασχηματίζεται στην Εξ. 3.6.

$$dU = dq - PdV \quad (3.4)$$

$$dq = TdS \quad (3.5)$$

$$d(\Delta G) = \Delta VdP - \Delta SdT \quad (3.6)$$

Από την Εξ. 3.6 προκύπτει ότι οι μεταβολές στην ελεύθερη ενέργεια ενός φυσικοχημικού συστήματος οφείλονται σε μεταβολές του όγκου και της εντροπίας. Άρα δράσεις όπως αλλαγές στη μοριακή δομή ή αλλαγές στη διαμόρφωση της δομής των πρωτεϊνών εξαρτώνται από τη συνεργιστική δράση πίεσης και θερμοκρασίας και δεν θα μπορούσε να μελετηθούν ξεχωριστά.

Με ολοκλήρωση της Εξ. 3.6 και χρησιμοποιώντας σειρά Taylor προκύπτει η Εξ. 3.7:

$$\Delta G = \Delta G_0 + \Delta V_0(P - P_0) - \Delta S_0(T - T_0) + \left(\frac{\Delta\beta}{2}\right)(P - P_0)^2 - \left(\frac{\Delta C_p}{2T_0}\right)(T - T_0)^2 + \Delta\alpha(P - P_0)(T - T_0) \quad (3.7)$$

όπου,  $\alpha = (dV/dT)_P$  ο συντελεστής θερμομικής διαστολής,  $\beta = (dV/dP)_T$  ο συντελεστής συμπίεσης και  $C_p = (dq/dT)_P$  η ειδική θερμοχωρητικότητα.

Σε μια διεργασία ΥΥΠ τα προϊόντα οδηγούνται στο θάλαμο συμπίεσης όπου και εφαρμόζεται η πίεση. Κατά τη συμπίεση η αδιαβατική θέρμανση έχει σαν αποτέλεσμα την έκλυση θερμότητας μέσα από τα τοιχώματα του θαλάμου συμπίεσης. Τα φαινόμενα μεταφοράς θερμότητας εξαρτώνται από το μέγεθος του θαλάμου συμπίεσης, το ρυθμό συμπίεσης, τις παραμέτρους μεταφοράς θερμότητας και φυσικά τις αρχικές και οριακές συνθήκες. Οι χημικές δράσεις εξαρτώνται τόσο από την πίεση όσο και από τη θερμοκρασία. Πρώτος ο Arrhenius (1889) δημοσίευσε την εξίσωση που περιγράφει τη θερμοκρασιακή εξάρτηση του ρυθμού δράσης,  $k$  (Εξ. 3.8):

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial T}\right)_P = -\frac{E_a}{RT^2} \quad (3.8)$$

όπου,  $E_a$  η ενέργεια ενεργοποίησης (J/mol) και  $R$  η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8.3145 J/mol·K).

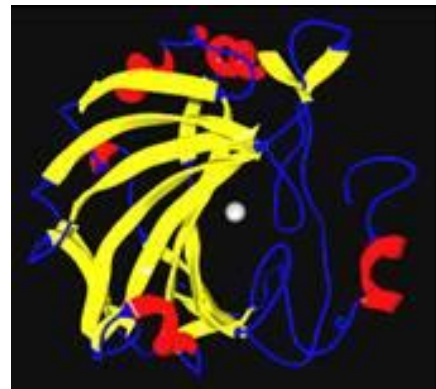
Αρκετά χρόνια αργότερα ο Eyring (1935a,b) χρησιμοποίησε μια παρόμοια εξίσωση για να περιγράψει την εξάρτηση του ρυθμού,  $k$ , από την πίεση:

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial P}\right)_T = -\frac{\Delta V}{RT} \quad (3.9)$$

όπου,  $\Delta V$  ο όγκος ενεργοποίησης (cm<sup>3</sup>/mol).

Οι πρωτεΐνες είναι ευμετάβλητες δομές που εξαρτώνται από αλληλεπιδράσεις μέσα στην πρωτεϊνική αλυσίδα και από αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται (Jaenicke, 1991). Αλλαγές σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και η πίεση, μπορεί να διαταράξουν την ισορροπία των διαμοριακών δεσμών και αλληλεπιδράσεων και να οδηγήσουν στο ξεδίπλωμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (μετουσίωση). Τα ένζυμα είναι μια ειδική κατηγορία πρωτεϊνών. Η εξειδίκευση στην καταλυτική δράση ενός ενζύμου προέρχεται από τη δομή του ενεργού του κέντρου.

Μικρές αλλαγές στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου του ενζύμου είναι ικανές να οδηγήσουν σε μεταβολή της ενζυμικής δραστηριότητας. Η επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας μπορούν να επιφέρουν μεταβολές στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου των ενζύμων οδηγώντας



Εικόνα 3-27 - Τριδιάστατη δομή του ενζύμου λιποξυγενάση.

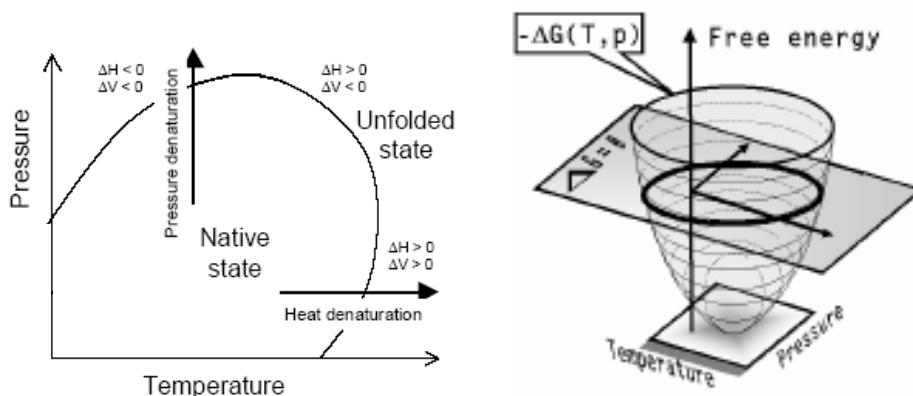
στην αντιστρεπτή ή μη αντιστρεπτή ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση. Στη δομή των ενζύμων υπάρχουν πεπτιδικοί, ομοιοπολικοί, μη ομοιοπολικοί δεσμοί και δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες και υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις και ηλεκτροστατικές δυνάμεις (Πίνακας 3-2). Ο τρόπος με τον οποίο η πίεση και η θερμοκρασία επιδρά σε αυτούς τους δεσμούς οδηγεί στην ερμηνεία του μηχανισμού μετουσίωσης των πρωτεϊνών και των ενζύμων από την πίεση και τη θερμοκρασία. Η θερμική μετουσίωση των ενζύμων είναι συχνά μη αντιστρεπτή και οφείλεται στη διάσπαση των ομοιοπολικών δεσμών ή/και στη συσσωμάτωση πρωτεϊνικών μορίων. Αντίθετα, στη μετουσίωση των ενζύμων από την εφαρμογή πιέσεων, μεγάλο μέρος των πρωτεϊνικών μορίων διατηρούνται αμετάβλητα. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός μετουσίωσης των ενζύμων από την πίεση και τη θερμοκρασία διαφέρει.

Αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί στην καταστροφή των δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι σταθεροποιούν τη δευτεροταγή και την τριτοταγή δομή των ενζύμων. Επίσης, αύξηση της θερμοκρασίας σε υδατικά διαλύματα ενζύμων προκαλεί τη μεταφορά μη πολικών ομάδων από τις υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες του πολυπεπτιδίου στο νερό. Το φαινόμενο αυτό διαταράσσει την τριτοταγή δομή του ενζύμου και προκαλεί τη μετουσίωση του ενζύμου.

Η μετουσίωση των ενζύμων από την εφαρμογή πιέσεων οφείλεται στη διατάραξη της δομής των ενζύμων και εξαρτάται από το ίδιο το ένζυμο, το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται (pH,  $a_w$ ), τη θερμοκρασία και την εφαρμοζόμενη πίεση. Όπως αναλύθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο η επίδραση της πίεσης σε βιολογικά συστήματα περιγράφεται από τη θερμοδυναμική παράμετρο του όγκου ενεργοποίησης και ευνοεί φαινόμενα τα οποία συνοδεύονται από μείωση του όγκου (Heremans, 1982; Gross & Jaenicke, 1994). Αντίθετα, φαινόμενα τα οποία συνοδεύονται από αύξηση όγκου δεν ευνοούνται από την εφαρμογή πίεσης. Όπως προκύπτει από το συνδυασμό των Εξισώσεων 3.11 και 3.14 ο όγκος ενεργοποίησης ( $\Delta V$ ) εξαρτάται από τη μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs ( $\Delta G$ ) και περιγράφεται από την Εξίσωση 3.10:

$$\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial P}\right)_T = -RT \left(\frac{\partial \ln k}{\partial P}\right)_T = \Delta V \quad (3.10)$$

Κατά τη μετουσίωση οι πρωτεΐνες μεταβαίνουν από την καταλυτική διαμόρφωση στη μετουσιωμένη. Το φαινόμενο της μετάβασης από τη φυσική (native state) στη μετουσιωμένη (unfolded state) διαμόρφωση των ενζύμων μπορεί να απεικονισθεί μέσω θερμοδυναμικής θεώρησης και χρήσης της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (Εικόνα 3-4).



Εικόνα 3-28 - (α) Μετουσίωση πρωτεϊνών από την πίεση και τη θερμοκρασία ακολουθούμενη από μεταβολές ενθαλπίας ( $\Delta H$ ) και μεταβολές όγκου ( $\Delta V$ ) (Heremans, 2002) και (β) μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs συναρτήσει της πίεσης και της θερμοκρασίας (Heinz & Knorr, 2002)

Η πίεση δεν επιδρά στους ομοιοπολικούς δεσμούς (Funtenerberger et al., 1997) αφήνοντας ανεπηρέαστη την πρωτοταγή δομή των ενζύμων. Οι  $\alpha$ -έλικες και τα  $\beta$ -πτυχωτά φύλλα, τα οποία αποτελούν τη δευτεροταγή δομή των ενζύμων, σχηματίζονται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων ενός τμήματος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και είναι ανθεκτικά στην πίεση (Heremans & Smeller, 1998). Αυτό έχει αποδοθεί στο γεγονός ότι η υπαρκτή δεσμών υδρογόνου εξασφαλίζει μικρές διαμοριακές αποστάσεις άρα και μείωση του όγκου των μορίων οπότε και ευνοούνται από την πίεση. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις οι δεσμοί υδρογόνου μπορεί να οδηγήσουν σε μικρή αύξηση του όγκου (Morild, 1981; Balny & Masson, 1993). Καταστροφή της δευτεροταγούς δομής των ενζύμων έχει παρατηρηθεί σε πιέσεις μεγαλύτερες των 700 MPa. Η καλά οργανωμένη τριτοταγής δομή καταστρέφεται κατά την εφαρμογή πιέσεων (Heremans, 1993; Mozhaev et al., 1994). Στην τριτοταγή δομή των ενζύμων οι δισουλφιδικές γέφυρες, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις και οι πολικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις εξασφαλίζουν την αναδίπλωση του πολυπεπτιδίου στο χώρο.

Η μετουσίωση των ενζύμων από την πίεση συσχετίζεται με τη διατάραξη των μη ομοιοπολικών δεσμών (ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις) (Mozhaev et al., 1994; Barbosa-Canovas et al., 1997). Στα υδατικά αιωρήματα ή μίγματα ενζύμων το νερό αποτελεί μέρος του ενζυμικού συστήματος και η ενυδάτωση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων επιδρά στη σταθερότητα και τη διαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου των ενζύμων. Η διάσπαση των μη ομοιοπολικών δεσμών από την πίεση έχει σαν αποτέλεσμα την αναδιάταξη των μορίων νερού η οποία οδηγεί στο ξεδίπλωμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η διατάραξη των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων οδηγεί στην έκθεση των μη πολικών πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων στο νερό με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ενυδατωμένου στρώματος. Η μεταβολή του όγκου η οποία οφείλεται στη διατάραξη των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων είναι αρνητική (από -20 έως -10 mL/mol) (Weale, 1967; Morild, 1981) και επομένως ευνοείται από αύξηση της πίεσης.

Γενικά, η διεύδυση μορίων νερού στις πρωτεΐνες θεωρείται ότι είναι αναγκαία προϋπόθεση για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών σε υψηλές πιέσεις (Zhang et al., 1995; Nash & Jonas, 1997). Συμπερασματικά, η διατάραξη της τριτοταγούς δομής των ενζύμων μπορεί να αποδοθεί στην αναδιάταξη των μορίων νερού λόγω της καταστροφής των μη ομοιοπολικών δεσμών. Η σταθερότητα που παρουσιάζουν ορισμένα ένζυμα στην πίεση έχει αποδοθεί στην ικανότητα τους να

αντισταθμίσουν την καταστροφή των μη ομοιοπολικών δεσμών μέσω αναδιάταξης της τριτοταγούς δομής τους (Priev et al., 1996; Boonyaratanakornkit et al., 2002; Smeller, 2002), η οποία εξασφαλίζει την καταλυτική τους διαμόρφωση. Στην τεταρτοταγή δομή των ενζύμων (καθορίζεται από τον τρόπο που οι υπομονάδες που αποτελούν την πρωτεΐνη συνδυάζονται μεταξύ τους) οι αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί είναι ίδιοι με αυτούς της τριτοταγούς δομής και εξαρτώνται έντονα από την εφαρμογή πίεσης. Οι υπομονάδες των ενζύμων διαχωρίζονται σε πιέσεις έως 200 MPa. Σε πιέσεις μεγαλύτερες των 200 MPa οι υπομονάδες ξεδιπλώνονται και καταστρέφεται η τεταρτοταγής δομή των ενζύμων.

Εκτός από την απενεργοποίηση, η μεταβολή της πίεσης μπορεί να προκαλέσει σταθεροποίηση, ακόμα και αύξηση, της δραστηριότητας των ενζύμων (Eisenmenger & Reyes De Corcuera, 2009a,b). Η εφαρμογή πιέσεων είναι ικανή να οδηγήσει στη σταθεροποίηση ή την ενεργοποίηση των ενζύμων όταν η μεταβολή του όγκου μεταξύ της φυσικής (native state) και της μετουσιωμένης (unfolded state) διαμόρφωσης των ενζύμων είναι θετική. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην παρατήρηση ότι η πίεση ευνοεί τους δεσμούς υδρογόνου και τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις Van der Waals οι οποίοι συνδέονται με μεταβολές του όγκου του πολυπεπτιδίου. Αυτό το είδος δυνάμεων (οι οποίες βρίσκονται στη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή) μειώνουν τις διαμοριακές αποστάσεις προκαλώντας μείωση του όγκου της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Gross & Jaenicke, 1994; Boonyaratanakornkit et al., 2002).

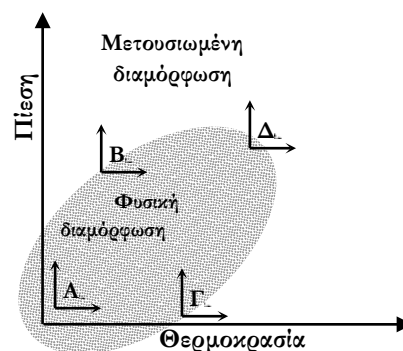
Σε πολλές έρευνες έχει παρατηρηθεί ότι η εφαρμογή πιέσεων μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της θερμοανθεκτικότητας των πρωτεϊνών και των ενζύμων (Heremans & Smeller, 1998; Kunugi & Tanaka, 2002; Northrop, 2002; Smeller, 2002; Buckow et al., 2005; Meersman et al., 2006). Αυτή η ανταγωνιστική δράση πίεσης και θερμοκρασίας μπορεί να αποδοθεί στην αντίθετη επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας στους δεσμούς υδρογόνου και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Balny & Masson, 1993; Mozhaev et al., 1996). Ο Mozhaev και οι συνεργάτες του (1996) θεώρησαν ότι στο αρχικό στάδιο της θερμικής μετουσίωσης, οι πρωτεΐνες χάνουν μόρια νερού τα οποία είναι σημαντικά δομικά στοιχεία. Ενώ, όπως έχει ήδη αναλυθεί, η πίεση ενισχύει την ενυδάτωση τόσο των πολικών όσο και των μη πολικών ομάδων, της πρωτεΐνης εμποδίζοντας το αρχικό στάδιο της θερμικής μετουσίωσης πρωτεϊνών και ενζύμων.

Πίνακας 3-2 - Η επίδραση της πίεσης, P, και της θερμοκρασίας, T, στους δεσμούς και τις αλληλεπιδράσεις σχηματισμού των τεσσάρων δομών των πρωτεϊνών (✓: ευνοούνται, δεν καταστρέφονται, \*: διαταράσσονται).

Δομή	Περιγραφή	Δεσμοί/αλληλεπιδράσεις	T	P
Πρωτοταγής	Αλληλουχία αμινοξέων- Δημιουργία πεπτιδίου	Πεπτιδικοί δεσμοί		
Δευτεροταγής	Δημιουργία πολυπεπτιδίου, α-έλικας και β-πτυχωτών φύλλων	Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ πεπτιδικών δεσμών	x	✓
Τριτοταγής	Αναδίπλωση πολυπεπτιδίου στο χώρο	Δεσμοί υδρογόνου	x	✓
		Μη ομοιοπολικοί δεσμοί Δυνάμεις Van der Waals	x	x
Τεταρτοταγής	Σύνδεση πρωτεϊνικών υπομονάδων	Δεσμοί υδρογόνου	x	✓
		Μη ομοιοπολικοί δεσμοί	x	x
		Δισουλφιδικές γέφυρες	x	✓

Η ανταγωνιστική δράση πίεσης και θερμοκρασίας ορισμένων ενζύμων μπορεί να οδηγήσει στην επιλεκτική απενεργοποίηση ενδογενών ενζύμων τα οποία υπάρχουν στα τρόφιμα. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η απενεργοποίηση της πηκτινομεθυλεστεράσης (ΠΜΕ) και της πολυγαλακτουρονάσης (ΠΓ), ένζυμα τα οποία υπάρχουν στην τομάτα. Αρχικά, η δράση της ΠΜΕ υδρολύει τις μεθυλιωμένες καρβοξυλικές ομάδες των πηκτινών και το παραγόμενο πολυγαλακτουρονικό οξύ διασπάται από τη δράση της ΠΓ. Η συνεργιστική δράση των δύο ενζύμων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ιξώδους και συνεπώς την υποβάθμιση της ποιότητας των προϊόντων τομάτας. Στη θερμική διεργασία τομάτας η ΠΓ είναι περισσότερο θερμοάντοχη από την ΠΜΕ. Αντίθετα, σε διεργασίες ΥΥΠ η ΠΜΕ έχει βρεθεί να είναι πιο ανθεκτική από την ΠΓ. Αυτή η επιλεκτική απενεργοποίηση ενζύμων από την ΥΥΠ έχει σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση της ενεργότητας της ΠΜΕ με παράλληλη απενεργοποίηση της ΠΓ οδηγώντας στην παραγωγή προϊόντων υψηλότερου ιξώδους (Verlent et al., 2006; Μπουλέκου, 2009).

Μια εκτενής ανασκόπηση της συνδυαστικής επίδρασης πίεσης-θερμοκρασίας στη μετουσίωση των πρωτεϊνών έχει δημοσιευτεί από τον Smeller (2002). Ο Smeller λαμβάνοντας υπόψη τους έως σήμερα προτεινόμενους μηχανισμούς μετουσίωσης των πρωτεϊνών και τα κινητικά βιβλιογραφικά δεδομένα απενεργοποίησης των ενζύμων από την πίεση και τη θερμοκρασία οδηγείται στο συμπέρασμα ότι αύξηση της θερμοκρασίας και της πίεσης μπορεί να οδηγήσει είτε σε σταθεροποίηση είτε σε απενεργοποίηση των ενζύμων, ανάλογα με τις αρχικές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας (Εικόνα 2-5). Θεωρείται ότι υπάρχει μια περιοχή (ελλειπτικής μορφής) όπου τα ένζυμα διατηρούν τη φυσική τους δομή. Για παράδειγμα αύξηση της πίεσης και της θερμοκρασίας από το σημείο Α δεν οδηγεί στη μετουσίωση, ενώ αντίστοιχη αύξηση από το σημείο Δ έχει ως αποτέλεσμα τη μετουσίωση. Στα σημεία Β και Γ παρατηρείται ανταγωνιστική δράση πίεσης και θερμοκρασίας. Στο σημείο Β το ένζυμο απενεργοποιείται

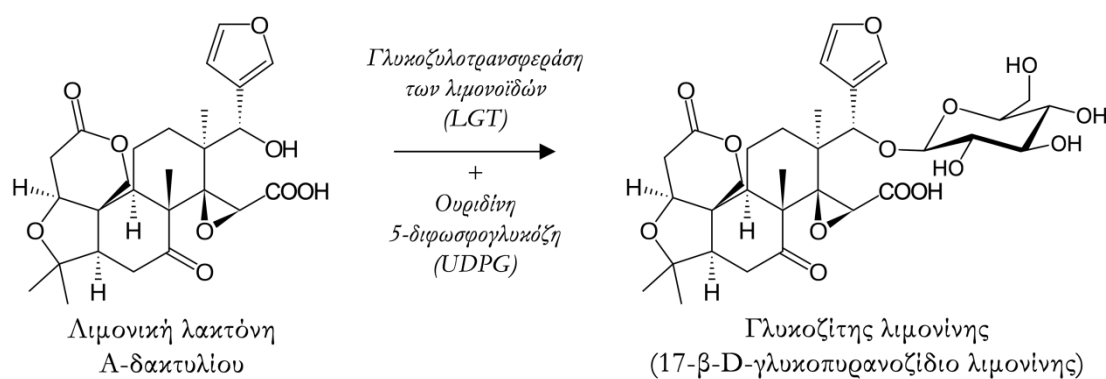


Εικόνα 3-29 - Γραφική απεικόνιση των περιοχών πίεσης και θερμοκρασίας όπου οι πρωτεΐνες μπορούν να βρουν φυσική (καταλυτική) ή σε μετουσιωμένη διαμόρφωση

από αύξηση της πίεσης ενώ ταυτόχρονα σταθεροποιείται από αύξηση της θερμοκρασίας και το αντίθετο για το σημείο Γ.

### 3.4 Γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών

Η γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών (*limonoid glucosyltransferase*, *LGT*, EC 2.4.1.210) είναι ένα ένζυμο που ανήκει στις τρανσφεράσες, και συγκεκριμένα στις γλυκοζυλοτρανσφεράσες. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν τη μεταφορά ενός μορίου γλυκόζης από την ένωση ουριδίνη 5'-διφωσφογλυκόζη (UDPG) σε άλλα μόρια. Η *LGT* καταλύει τη γλυκοζυλίωση της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου (LARL) προς γλυκοζίτη της λιμονίνης (LG), συνδέοντας το μόριο γλυκόζης στη θέση C<sub>17</sub> του D-δακτυλίου με β-γλυκοζιτικό δεσμό (Hasegawa et al., 1997; Zaare-Nahandi et al., 2008).



Εικόνα 3-30 - Αντίδραση γλυκοζυλίωσης της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου (LARL)

Η αντίδραση γλυκοζυλίωσης είναι μη αντιστρεπτή και το προκύπτον μόριο ονομάζεται 17-β-D-γλυκοπυρανοζίδιο λιμονίνης, ή χάριν συντομίας, γλυκοζίτης λιμονίνης. Σε αντίθεση με τη λιμονίνη, το άλλο δυνητικό προϊόν ενζυμικής μετατροπής της LARL, ο γλυκοζίτης αυτός είναι άπικρος (βλ. κεφάλαιο 2). Ως εκ τούτου η *LGT* έχει ιδιαίτερη σημασία για την παραγωγή πορτοκαλοχυμού, τόσο στη φυσική της έκφανση όσο και ως στάδιο επεξεργασίας του χυμού.

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου έχουν μελετηθεί εκτενώς και παρουσιάζονται στις ακόλουθες ενότητες.

#### 3.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά *LGT*. Φυσική εμφάνιση και δραστηριότητα σε εσπεριδοειδή

Με βάση έρευνες που έχουν γίνει σε *LGT* απομονωμένη από το μεσοκάρπιο εσπεριδοειδών βρέθηκε πως αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα μοριακού βάρους 55 kDa (Karim & Hashinaga, 2002a). Το ένζυμο κωδικοποιείται από τα αλληλόμορφα γονίδια CitLTG-1 και CitLTG-2, εκ των οποίων το αλληλόμορφο CitLTG-2 συνεισφέρει σε μεγαλύτερο βαθμό στην εμφάνιση ενζυμικής ενεργότητας (Kita et al., 2003). Το χαρακτηριστικό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της πικρότητας διαφορετικών ποικιλιών εσπεριδοειδών καθώς η



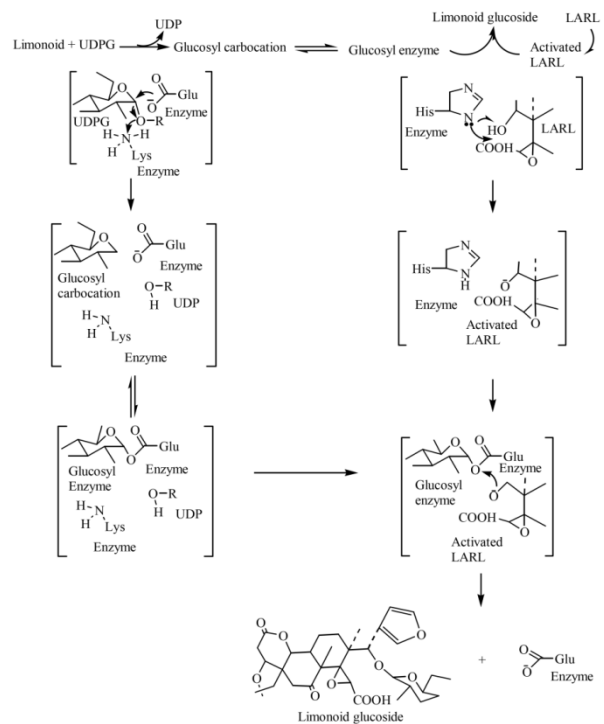
ύπαρξη ή μη του αλληλόμορφου 2 αποτελεί γενετικό δείκτη για την αυξημένη μετατροπή LARL σε LG στους καρπούς.

Οι τιμές των παραμέτρων Michaelis-Menten της αντίδρασης γλυκοζυλίωσης για τη λιμονίνη έχουν προσδιοριστεί σε  $K_m$  65  $\mu\text{M}$  και  $V_{max}$  2  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  πρωτεΐνης. Για την UDPG οι αντίστοιχες τιμές είναι  $K_m$  200  $\mu\text{M}$  και  $V_{max}$  0.5  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  πρωτεΐνης.

Η έκφραση των παραπάνω γονιδίων στους ιστούς των εσπεριδοειδών ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών ειδών, των τύπων ιστού και κατά τη διαδικασία ωρίμανσης των καρπών. Ο κύριος ιστός στον οποίο απαντάται LGT είναι το μεσοκάρπιο (albedo), αν και έκφρασή των γονιδίων παρατηρείται και στα φύλλα κατά το τέλος του κύκλου ωρίμανσης (Zaare-Nahandi et al., 2008). Κατά την έκφραση του, το ενζύμο καταλύει τη βιομετατροπή της LARL στον άπικρο γλυκοζίτη μέσα στον καρπό, με αποτέλεσμα ο καρπός και τα προϊόντα του να εμφανίζουν ελαττωμένη εγγενή πικρότητα.

Η καθυστερημένη έκφραση των γονιδίων σε ορισμένα είδη εσπεριδοειδών (*C. limetoides*, *C. paradisi* cv. Marsh) οδηγεί σε υψηλή συγκέντρωση LARL κατά τη συγκομιδή των καρπών και κατά συνέπεια την εντονότερη πικρότητά τους. Στα πορτοκάλια (*C. sinensis*) η LGT αρχίζει να εκφράζεται περίπου 120 ημέρες μετά την άνθιση (days after fruition, DAF), με αποτέλεσμα την ελάττωση της συγκέντρωσης λιμονίνης στους καρπούς που συλλέγονται κατόπιν (Hasegawa, 1999).

Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμπλέκονται στη δράση του ενζύμου έχουν προσδιοριστεί με χημική τροποποίηση της πρωτεΐνης. Τροποποίηση των αμινοξέων ιστιδίνη (His), τρυπτοφάνη (Trp) και λυσίνη (Lys), καθώς και ομάδων καρβοξυλίου της πολυπεπτιδικής αλυσίδας οδήγησε σε απώλεια δραστηριότητας του ενζύμου, η ένταση της οποίας βρέθηκε να εξαρτάται από τη συγκέντρωση των χημικών τροποποιητών (Karim & Hashinaga, 2010). Τα αποτελέσματα οδηγούν στην πρόταση ενός πιθανού μηχανισμού κατάλυσης (εικόνα 3-7) και εξηγούν ικανοποιητικά την εξάρτηση της δραστηριότητας του ενζύμου από το pH, όπως αυτή αναλύεται στην ακόλουθη ενότητα.



Εικόνα 3-31 - Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης LGT (Karim & Hashinaga, 2010)

### 3.4.2 Επίδραση pH και θερμοκρασίας

Το ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστο pH 7.8, με μείωση ενεργότητας κατά 63% σε pH 5.5 - 10.5. Κατά την αποθήκευση του σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl και pH 7.5 βρέθηκε ότι η ενεργότητα του μειώθηκε στο 95% της αρχικής μετά από 3 μήνες και στο 73% μετά από 9 μήνες.

Όσον αφορά τη θερμοκρασία, εμφανίζει ενεργότητα σε ένα εύρος θερμοκρασιών 30 - 60 °C με βέλτιστη θερμοκρασία τους 37 °C. Πειράματα έδειξαν, πως το ένζυμο διατηρεί την ενεργότητά του μέχρι και τους 40 °C, ενώ με επώαση 30 min στους 40 °C απενεργοποιείται σταδιακά. Τέλος, μετά από επώαση 2 h στην ίδια θερμοκρασία παραμένει μόλις το 56% της αρχικής ενεργότητας (Karim & Hashinaga, 2002a).

### 3.4.4 Επίδραση μεταλλικών ιόντων

Σε pH 7.8 βρέθηκε ότι η προσθήκη ιόντων 5mM ιόντων  $Mn^{2+}$  αυξάνει την ενεργότητα της LGT κατά 33%. Παρόμοια αποτελέσματα έχει η προσθήκη  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ . Από την άλλη, η προσθήκη EDTA και ιόντων  $Cu^{2+}$  και  $Hg^{2+}$  παρεμποδίζουν τη δράση του ενζύμου. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται και στον πίνακα 3-3.

Πίνακας 3-3 - Επίδραση μεταλλικών ιόντων και EDTA στην ενεργότητα της LGT (Karim & Hashinaga, 2002a)

Reagent	Relative activity (%)		
	1 mM	5 mM	10 mM
None	100	100	100
$Ca^{2+}$	92	104	87
$Co^{2+}$	95	130	100
$Cu^{2+}$	67	42	49
$Fe^{2+}$	99	110	106
$Hg^{2+}$	67	67	66
$Mg^{2+}$	92	74	78
$Mn^{2+}$	98	133	123
$Zn^{2+}$	108	113	112
EDTA	0	0	0

### 3.4.5 Ακίνητοποίηση LGT για χρήση σε αποπίκρυνση χυμού εσπεριδοειδών

Η LGT παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την αποπίκρυνση χυμού εσπεριδοειδών κατά την επεξεργασία τους. Λόγω της σημαντικής διαφοράς μεταξύ του pH των χυμών και του βέλτιστου pH του ενζύμου είναι σκόπιμη η μελέτη της ακίνητοποίησης του σε κατάλληλα υποστρώματα για χρήση σε βιοαντιδραστήρες.

Σε πρότερες δημοσιεύσεις περιγράφεται η ιοντική και ομοιοπολική ακίνητοποίηση σε διάφορους φορείς (Karim & Hashinaga, 2002b). Η ιοντική ακίνητοποίηση πραγματοποιήθηκε στον φορέα DEAE-Toyopearl (DE-Trp-LGT) και η ομοιοπολική σε χιτοζάνη διασταυρωμένη με γλουτεράλδεϋδη (*chitosan cross-linked with gluteraldehyde*) (Chito-Ga-LGT) και ανθρακική κυτταρίνη (Ce-Ca-LGT). Η ακίνητοποίηση βρέθηκε να επιφέρει αλλαγές στο βέλτιστο pH, τη βέλτιστη

θερμοκρασία και τη θερμική σταθερότητα σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο, εξαρτώμενες από το φορέα αλλά και τις συνθήκες ακινητοποίησης.

Κατά την ομοιοπολική ακινητοποίηση της LGT σε χιτοζάνη διασταυρωμένη με γλουτεραλδεΐδη παρατηρήθηκε μείωση του βέλτιστου pH στο 7.4 και βελτιωμένη θερμική σταθερότητα. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανέβηκε από τους 37 °C του ελεύθερου ενζύμου στους 40 °C. Στην περίπτωση αυτή μετά από 9 κύκλους χρήσης το ένζυμο διατήρησε το 80% της αρχικής της ενεργότητας.

Η ακινητοποιημένη σε ανθρακική κυτταρίνη LGT διατήρησε το ίδιο βέλτιστο pH με το ελεύθερο ένζυμο και αυξήθηκε η βέλτιστη θερμοκρασία, όπως και στην παραπάνω περίπτωση ομοιοπολικής ακινητοποίησης. Βέβαια, στην περίπτωση αυτή το ακινητοποιημένο ένζυμο εμφάνισε καλύτερη λειτουργική σταθερότητα, γιατί ακόμα και μετά από 15 κύκλους χρήσης η ενεργότητα του διατηρήθηκε στο 80% της αρχικής.

Όσον αφορά την ιοντική ακινητοποίηση της LGT σε DEAE-Toyopearl παρατηρήθηκε αύξηση του βέλτιστου pH στο 8.2, αλλά η βέλτιστη θερμοκρασία παρέμεινε σταθερή. Η λειτουργική σταθερότητα δεν ήταν τόσο καλή όσο στην ομοιοπολική ακινητοποίηση, καθώς μετά από μόλις 6 κύκλους χρήσης η ενεργότητα έφτανε στο 80% της αρχικής. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως η ομοιοπολική ακινητοποίηση της LGT είναι δυνητικά περισσότερο αποτελεσματική από την ιοντική.

### Βιβλιογραφία 3<sup>ου</sup> κεφαλαίου

- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* (4th ed.). Springer.
- Boonyaratankornkit, B. B., Park, C. B., & Clark, D. S. (2002). Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1595, 235–249.
- Daniel, J. J., Owens, D. K., & McIntosh, C. A. (2011). Secondary product glucosyltransferase and putative glucosyltransferase expression during *Citrus paradisi* (c.v. Duncan) growth and development. *Phytochemistry*, 72(14-15), 1732–8.
- Eisenmenger, M. J., & Reyes-De-Corcuera, J. I. (2009). High pressure enhancement of enzymes: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(5), 331–347.
- Eyring, H., Johnson, F. H., & Gensler, R. L. (1946). Pressure and reactivity of proteins, with particular reference to invertase. *The Journal of Physical Chemistry*, 50, 453–464.
- Frye, K. J., & Royer, C. A. (1998). Probing the contribution of internal cavities to the volume change of protein unfolding under pressure. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 7, 2217–2222.
- Hasegawa, S. (1999). Limonin Bitterness in Citrus Juices. In R. Teranishi, E. L. Wick, & I. Hornstein (Eds.), *Flavor Chemistry: 30 Years of Progress* (pp. 91–93). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Hasegawa, S., Suhayda, C. G., Hsu, W. J., & Robertson, G. H. (1997). Purification of limonoid glucosyltransferase from navel orange albedo tissues. *Phytochemistry*, 46(1), 33–37.
- Karim, M. R., & Hashinaga, F. (2001). Screening and some properties of limonoid glucosyltransferase from selected citrus varieties. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(4), 483–486.
- Karim, M. R., & Hashinaga, F. (2002a). Isolation and characterization of limonoid glucosyltransferase from pummelo albedo tissue. *Food Chemistry*, 76(4), 431–436.
- Karim, M. R., & Hashinaga, F. (2002b). Preparation and properties of immobilized pummelo limonoid glucosyltransferase. *Process Biochemistry*, 38, 809–814.
- Karim, M. R., & Hashinaga, F. (2010). Possible Role of Carboxyl and Imidazole Groups in the Catalysis of Pummelo Limonoid Glucosyltransferase. *Chinese Journal of Catalysis*, 31, 1445–1451.
- Kita, M., Endo, T., Shimada, T., Moriguchi, T., Hirata, Y., Hasegawa, S., & Omura, M. (2003). Allelic structures of UDP-glucose:limonoid glucosyltransferase affect limonoid bitterness in *Citrus unshiu* and *C. sinensis*. *Euphytica*, 132, 87–94.

- Payne, V. A., Matubayasi, N., Murphy, L. R., & Levy, R. M. (1997). Monte Carlo study of the effect of pressure on hydrophobic association. *Journal of Physical Chemistry B*, 101, 2054–2060.
- Polydera, A. C., Galanou, E., Stoforos, N. G., & Taoukis, P. S. (2004). Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions. *Journal of Food Engineering*, 62, 291–298.
- Vila-Real, H. J., Alfaia, A. J., Calado, A. R., & Ribeiro, M. (2007). High pressure-temperature effects on enzymatic activity: Naringin bioconversion. *Food Chemistry*, 102(3), 565–570.
- Vila-Real, H. J., Alfaia, A. J., Phillips, R. S., Calado, A. R., & Ribeiro, M. H. L. (2010). Pressure-enhanced activity and stability of  $\alpha$ -l-rhamnosidase and  $\beta$ -d-glucosidase activities expressed by naringinase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 65(1-4), 102–109.
- Zaare-Nahandi, F., Hosseinkhani, S., Zamani, Z., Asadi-Abkenar, A., & Omidbaigi, R. (2008). Delay expression of limonoid UDP-glucosyltransferase makes delayed bitterness in citrus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(1), 59–62.



## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>: Υλικά & μέθοδοι - Πειραματική διαδικασία

### 4.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η διαδικασία παραλαβής & καθαρισμού του ενζύμου γλυκοζυλοτρανσφεράση λιμονοϊδών (limonoid glucosyltransferase, LGT) από ιστούς δύο τύπων εσπεριδοειδών, η επίδραση της επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση (ΥΠ) στην ενεργότητα αυτού, ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου καθώς και η μέτρηση άλλων ποιοτικών παραμέτρων του πορτοκαλοχυμού.

### 4.2 Υλικά

Για την παραλαβή της ακατέργαστης LGT χρησιμοποιήθηκαν δύο κατηγορίες εσπεριδοειδών: πορτοκάλια τύπου Navel (*Citrus × sinensis* var. *brasiliensis*), προερχόμενα από τη βιομηχανία Ασπίς στο Άργος (συλλογή τον Απρίλιο του 2010) καθώς και φράπες (*Citrus maxima*), προερχόμενες από ιδιωτική καλλιέργεια στην Ήπειρο (συλλογή τον Νοέμβριο του 2010). Οι καρποί και των δύο ποικιλιών διαχωρίστηκαν σε επικάρπιο (φλοιός, flavedo), μεσοκάρπιο (λευκός σπογγώδης ιστός, albedo) και ενδοκάρπιο (σάρκα) και αποθηκεύτηκαν υπό κατάψυξη (-30°C).

### 4.3 Πειραματική διαδικασία

#### 4.3.1 Παραλαβή ακατέργαστου εκχυλίσματος ενζύμου

Η εκχύλιση της ακατέργαστης (crude) LGT έγινε από το μεσοκάρπιο (albedo) των καρπών σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφουν οι Karim & Hashinaga (2002). Όλες οι διεργασίες παραλαβής & καθαρισμού του ενζύμου εκτελέστηκαν υπό ψύξη (4 °C) προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν απώλεια ενεργότητας αυτού.

Το υδατικό διάλυμα εκχύλισης περιείχε 0.1 M NaCl (*Panreac Quimica, Barcelona, Spain*), 0.5% w/v PVP (polyvinylpyrrolidone) και 1mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, αμφότερα *Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany*). Μετά την παρασκευή του, το διάλυμα ψύχθηκε σε θερμοκρασία 4 °C και χρησιμοποιήθηκε το συντομότερο δυνατόν καθώς το PMSF υφίσταται αυτόλυση σε υδατικό περιβάλλον.

Η επιθυμητή ποσότητα μεσοκαρπίου ζυγίστηκε και ομογενοποιήθηκε με 5 όγκους διαλύματος εκχύλισης σε ομογενοποιητή τύπου stomacher (*Interscience Bagmixer, St. Nom, France*) για 4 min. Ο προκύπτων πολφός αφέθηκε υπό ψύξη & συνεχή ανάδευση για 2 ώρες προκειμένου να προχωρήσει η εκχύλιση του ενζύμου. Ακολούθως ο πολφός διήλθε από φίλτρο γάζας (με υποβοήθηση ήπιου κενού) και το προκύπτον ίζημα απερριφθή.

Το διήθημα υπέστη φυγοκέντριση (30 min, 10000×g) υπό ψύξη, με συλλογή του διαυγασμένου υπερκειμένου & απόρριψη του ιζήματος. Το υπερκείμενο κορέσθηκε κατά 75% με σταδιακή προσθήκη (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (*Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA*) και αφέθηκε υπό ψύξη & ήπια ανάδευση για 14 ώρες (ολονύκτια) και εν συνεχεία σε ηρεμία για 2 ώρες προκειμένου να ολοκληρωθεί η καταβύθιση των πρωτεϊνών.

Οι καταβυθισμένες πρωτεΐνες συνελέγησαν με φυγοκέντριση (30 min, 10000×g) υπό ψύξη. Κατόπιν απόρριψης του υπερκειμένου το ίζημα παρελήφθη με αναδιάλυση σε προψυγμένο ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούμενο από 10 mM Tris-HCl (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany & Riedel-de Haën, Seelze, Germany* αντίστοιχα), pH 7.8.

Το παραπάνω πρωτεϊνικό διάλυμα αφαλατώθηκε με διαδοχικές συμπυκνώσεις κατά το ήμισυ & αραιώσεις μέχρις του αρχικού όγκου. Οι συμπυκνώσεις επετεύχθησαν με χρήση μονάδας υπερδιήθησης, αποτελούμενης από μεμβράνη Pellicon XL με μοριακό βάρος αποκοπής (molecular weight cut-off, MWCO) 30 kDa και περισταλτική αντλία ρυθμιζόμενης ροής (αμφότερα *Millipore, Billerica, MA, USA*). Η μεμβράνη παρακράτησε την LGT (μ.β.: 55 kDa) και απέρριψε τα λοιπά συστατικά του διαλύματος (άλατα, πρωτεΐνες χαμηλότερου μοριακού βάρους κ.α.).

Κατόπιν 5 επαναλήψεων της παραπάνω διαδικασίας η συγκέντρωση του θειικού αμμωνίου θεωρήθηκε αμελητέα (<0.25% κορεσμού) και η αφαλάτωση ολοκληρωθείσα<sup>2</sup>.

Το αφαλατωμένο διάλυμα υπέστη φυγοκέντριση (30 min, 10000×g) προκειμένου να αφαιρεθούν τυχόν αδιάλυτα στερεά. Το ίζημα απερριφθή, ενώ το υπερκείμενο συμπυκνώθηκε με χρήση μεμβράνης υπερδιήθησης Amicon Ultra με MWCO 5 kDa (*Millipore, Billerica, MA, USA*) και αποτέλεσε το ακατέργαστο εκχύλισμα (crude extract) LGT.

Το παραπάνω αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 0 °C και χρησιμοποιήθηκε ως βάση για τον περαιτέρω καθαρισμό του ενζύμου με χρήση χρωματογραφίας ιοντοεναλλαγής.

---

<sup>2</sup> Γενική σημείωση: όσο υψηλότερος ήταν ο βαθμός συμπύκνωσης σε κάθε κύκλο, τόσο λιγότεροι κύκλοι συμπύκνωσης-αραιώσης απαιτούντο για την επίτευξη της επιθυμητής αφαλάτωσης. Το μειονέκτημα που παρουσιάζει η υψηλή συμπύκνωση είναι το ότι, όσο συμπυκνώνεται το πρωτεϊνικό διάλυμα, τόσο καθυστερεί η διεργασία της υπερδιήθησης. Κατόπιν άτυπων δοκιμών, ο ιδανικός συμβιβασμός μεταξύ ταχύτητας συμπύκνωσης & απαιτούμενων επαναλήψεων εκτιμήθηκε στους 5 κύκλους συμπύκνωσης 1:2.



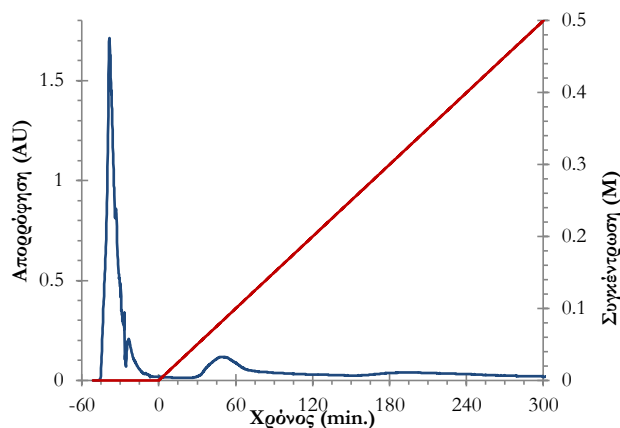
### 4.3.2 Καθαρισμός ενζύμου

Το ακατέργαστο εκχύλισμα LGT που προέκυψε από την εκχύλιση του μεσοκαρπίου εσπεριδοειδών υπέστη απομόνωση & καθαρισμό (isolation & purification) με χρήση χρωματογραφίας ανταλλαγής ανιόντων (anion exchange chromatography), βάσει της μεθόδου των Karim & Hashinaga (2002). Κατά παρέκκλιση της παραπάνω, η διεργασία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος λόγω των τεχνικών δυσχερειών που παρουσίαζε η ψύξη της χρωματογραφικής διάταξης.

Προκειμένου να διευκολυνθεί & επιταχυνθεί ο καθαρισμός του, το εκχύλισμα υπέστη συμπύκνωση με υπερδιήθηση πριν το χρωματογραφικό διαχωρισμό του. Η διάταξη υπερδιήθησης αποτελείται από αναδευόμενο δοχείο πίεσης (stirred cell) 8000 Series και μεμβράνη υπερδιήθησης Amicon με μοριακό βάρος αποκοπής 10 kDa (αμφότερα *Millipore, Billerica, MA, USA*).

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό του ακατέργαστου ενζυμικού εκχυλίσματος ανήκει στη σειρά BioLogic LP, αποτελούμενο από περιστατική αντλία ρυθμιζόμενης ροής, μετρητική βαλβίδα 2 καναλιών, ανιχνευτή φωτοδιόδου ρυθμισμένο σε μήκος κύματος 280 nm, μετρητή ηλεκτρικής αγωγιμότητας και συλλογέα κλασμάτων BioFrac Fraction Collector (άπαντα *Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA*). Οι μετρήσεις απορρόφησης & αγωγιμότητας καταγράφονται σε συνδεδεμένο υπολογιστή με το λογισμικό BioLogic LP Data View.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός του ενζυμικού εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε σε στήλη πληρωμένη με ρητίνη ανιωνικής ανταλλαγής Uno Q (*Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA*), ισορροπημένη με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 10 mM pH 7.8. Η ροή του διαλύτη παρέμεινε σταθερή στο  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$  καθ'όλη τη διάρκεια του διαχωρισμού.



Εικόνα 4-32: Τυπικό προφίλ έκλουσης εκχυλίσματος LGT σε στήλη Bio-Rad UNO-Q. Απεικονίζεται η απορρόφηση 280 nm (—) και η συγκέντρωση NaCl (—).

Μετά την εισαγωγή του δείγματος έγινε έκπλυση της στήλης με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, μέχρις ότου η απορρόφηση UV του εκλύσματος να επανέλθει στη γραμμή βάσης, οπότε και ξεκίνησε ο διαχωρισμός (κατά σύμβαση χρόνος 0 min.). Η έκλουση του δείγματος έγινε με γραμμική βαθμίδα 0-0.5 M NaCl στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα εντός χρόνου 300 min. Συνολικά συνελέγησαν 100 κλάσματα (με ρυθμό 1 ανά 3 min.), με άμεση ψύξη των προκύπτων δειγμάτων.

### 4.3.3 Κατεργασία ενζύμου με ΥΥΠ

Η κατεργασία του ενζύμου με ΥΥΠ πραγματοποιήθηκε στη μονάδα Food Pressure Unit FPU 1.01 (Resato International BV, Roden, Holland), η οποία αποτελεί συνιδιοκτησία του Ε.Μ.Π. και του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικών Ερευνών (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.). Η συγκεκριμένη μονάδα είναι εγκατεστημένη και λειτουργεί σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. Ο συγκεκριμένος εξοπλισμός περιλαμβάνει μία μονάδα ΥΥΠ, η οποία συνδέεται με δύο τύπους θαλάμων υπερυψηλών πιέσεων που λειτουργούν ανεξάρτητα μεταξύ τους.

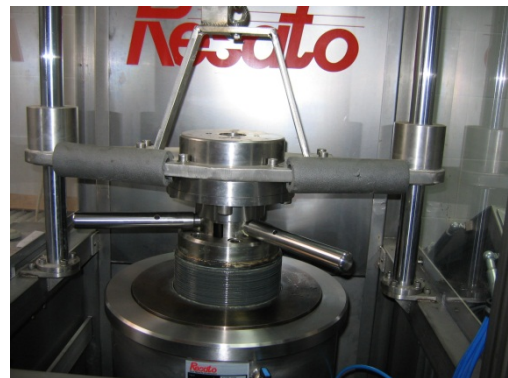


Εικόνα 4-33: Λεπτομερής άποψη της μονάδας με τα 6 κελιά ΥΥΠ των 42ml το καθένα.

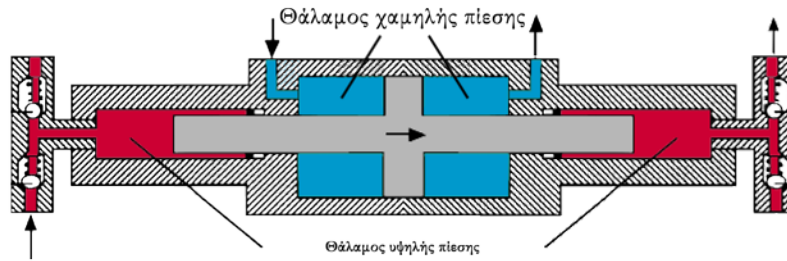
Ο πρώτος περιλαμβάνει μια συστοιχία 6 κυλινδρικών μικροθαλάμων πίεσης όγκου 42 mL έκαστος, όπως φαίνεται στην εικόνα 4-2, συνδεδεμένων κατά τρόπο που επιτρέπει ανεξάρτητο χειρισμό. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται για την συλλογή κινητικών δεδομένων των αντιδράσεων καταστροφής των παραγόντων αλλοίωσης ή μεταβολής των ποιοτικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών των τροφίμων κατά την επεξεργασία τους με υπερυψηλή πίεση.

Ο δεύτερος τύπος περιλαμβάνει ένα θάλαμο υπερυψηλής πίεσης όγκου 1.5 L, ο οποίος χρησιμοποιείται για την παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων προϊόντων επεξεργασμένων με την τεχνολογία της υπερυψηλής πίεσης και παρουσιάζεται στην εικόνα 4-3.

Για τη δημιουργία των υπερυψηλών πιέσεων η μονάδα πίεσης χρησιμοποιεί έναν υδραυλικό ενισχυτή πίεσης (pressure intensifier), ο οποίος χρησιμοποιεί ως ρεύμα εισόδου υγρό μεταφοράς πίεσης προερχόμενο από αντλία χαμηλής πίεσης & υψηλής ογκομετρικής παροχής, και παράγει ως ρεύμα εξόδου υγρό μεταφοράς πίεσης σε υψηλή πίεση & χαμηλή ογκομετρική παροχή.



Εικόνα 4-34: Θάλαμος ΥΥΠ επεξεργασίας τροφίμων όγκου 1,5 L.



Εικόνα 4-35: Υδραυλικός ενισχυτής πίεσης διπλής δράσης.

Σε έναν υδραυλικό ενισχυτή διπλής δράσης (double action) αυτό επιτυγχάνεται, όπως φαίνεται στην εικόνα 4-4, με τη μηχανική σύνδεση εμβόλου μεγάλης επιφάνειας (πλευρά χαμηλής πίεσης ■) με ένα μικρότερης επιφάνειας (πλευρά υψηλής πίεσης ■). Ο κύλινδρος επαναλαμβάνεται με αντιστροφή των πλευρών παροχής ρευστού χαμηλής πίεσης: όταν το υδραυλικό έμβολο του ενισχυτή φτάσει στο τέλος της διαδρομής του ενεργοποιεί έναν ηλεκτρονικό διακόπτη και η ροή του υγρού χαμηλής πίεσης αντιστρέφεται, καθώς πλέον το έμβολο κινείται προς την αντίθετη κατεύθυνση.

Ο παράγοντας αύξησης της πίεσης που επιτυγχάνει ένας υδραυλικός ενισχυτής ισούται με το λόγο επιφάνειας του εμβόλου χαμηλής πίεσης προς την επιφάνεια του εμβόλου υψηλής πίεσης. Ο ενισχυτής πίεσης της συγκεκριμένης μονάδας λειτουργεί με τη βοήθεια μιας υδραυλικής αντλίας (τροφοδοτούμενης από ηλεκτρικό κινητήρα), η οποία διοχετεύει το απαιτούμενο υγρό χαμηλής πίεσης στον ενισχυτή και κατά συνέπεια η ρύθμιση της πίεσης εξόδου μπορεί να γίνει ρυθμίζοντας την πίεση λειτουργίας της αντλίας. Μια μικρότερη αντλία χρησιμοποιείται για την κυκλοφορία του υγρού μεταφοράς πίεσης μέσω ενός συστήματος ψύξης (για τον έλεγχο της θερμοκρασίας του) και ενός φίλτρου χαμηλής πίεσης. Ο ενισχυτής πίεσης διαθέτει βαλβίδες ελέγχου εισόδου και εξόδου λειτουργώντας έτσι ως παλινδρομική αντλία. Η πίεση του υγρού αυξάνεται σύμφωνα με την παραπάνω αρχή και μεταβιβάζεται προς τους θαλάμους υπερυψηλής πίεσης μέσω της ροής του υγρού σε σωλήνες από ανοξείδωτο χάλυβα. Πνευματικές χειροκίνητες βαλβίδες ρυθμίζουν την εισαγωγή ή όχι του υγρού σε κάθε έναν από τους θαλάμους. Για λόγους ασφαλείας, το σύστημα περιλαμβάνει ειδικούς δακτυλίους, οι οποίοι διαρρηγνύονται σε περίπτωση προβλήματος για την εκτόνωση της υψηλής πίεσης.

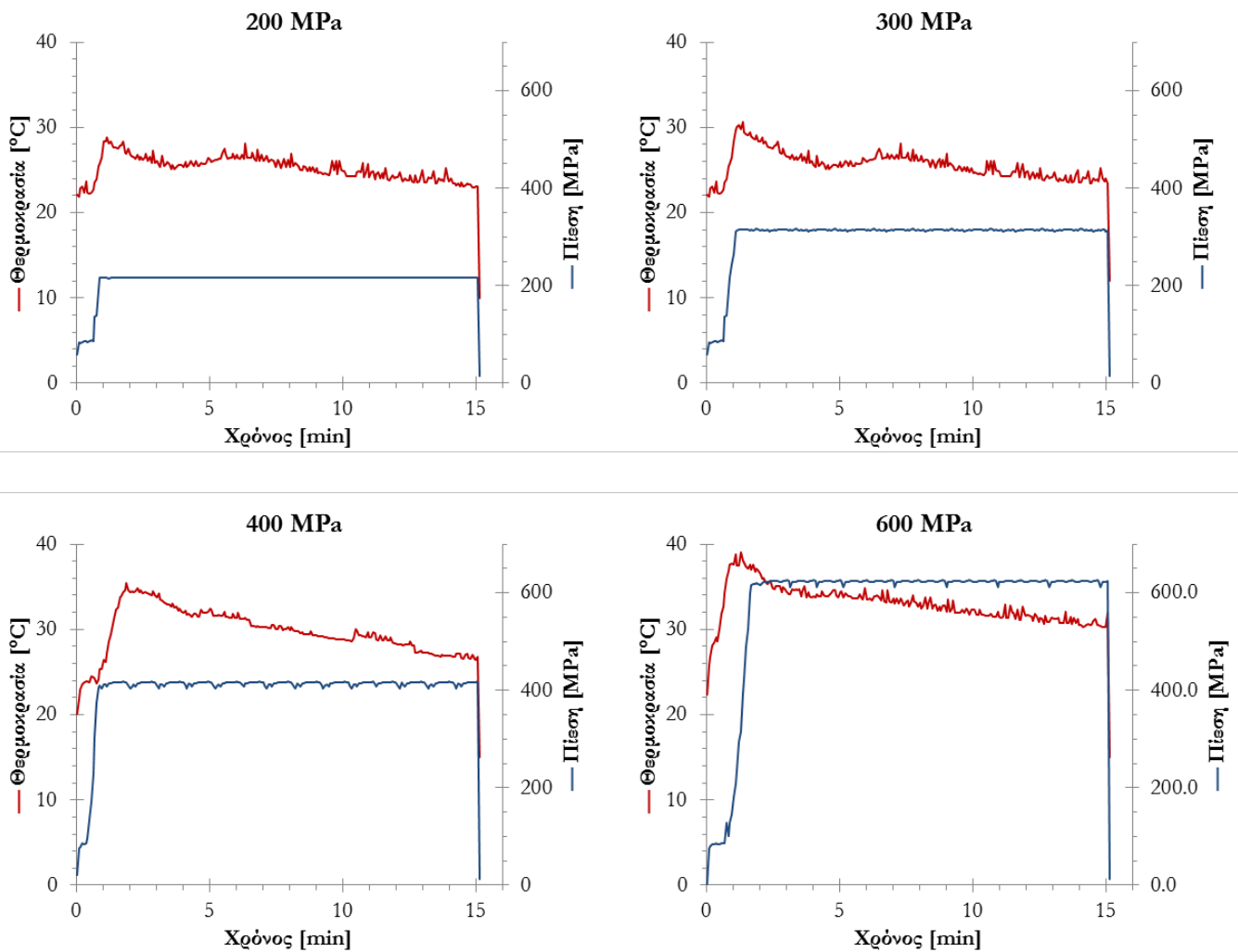


Εικόνα 4-36: Γενική άποψη του Εργαστηρίου Υπερυψηλής Πίεσης και της μονάδας ΥΠ. Στο κέντρο διακρίνεται η μονάδα για την επεξεργασία τροφίμων όγκου μέχρι 1,5lt και στα δεξιά η μονάδα με τα 6 δοχεία ΥΠ των 42mL το καθένα.

Στα γενικά τεχνικά χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης μονάδας ΥΠ αναφέρονται τα 1000 MPa ως μέγιστη πίεση λειτουργίας. Το μέσο μεταφοράς της πίεσης του συστήματος είναι πολυγλυκόλη κατηγορίας (ISO viscosity class) VG 15 (Resato International BV, Roden, Holland), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εύρος της θερμοκρασιών από -40 °C έως +100 °C. Ο ρυθμός αύξησης της πίεσης είναι περίπου 100 MPa/7 s, ενώ ο χρόνος εκτόνωσης της πίεσης είναι μικρότερος από 3 s. Η πίεση του συστήματος, καθώς και η πίεση στο εσωτερικό του μεγάλου θαλάμου, ελέγχονται και καταγράφονται μέσω δύο μετατροπέων σήματος (transducers), ενώ

εμφανίζονται κατά την διάρκεια λειτουργίας του συστήματος στην οθόνη του προγραμματιζόμενου λογικού ρυθμιστή (programmable logic controller, PLC) της μονάδας ΥΥΠ, καθώς και σε ηλεκτρονικό υπολογιστή συνδεδεμένο με την μονάδα μέσω κατάλληλου λογισμικού. Η καταγραφή της θερμοκρασίας στο εσωτερικό καθενός θαλάμου πίεσης του συστήματος γίνεται με τη χρήση θερμοστοιχείων και παρακολουθείται μέσω του ίδιου λογισμικού από την οθόνη του υπολογιστή. Η πίεση λειτουργίας της μονάδας ρυθμίζεται με τη βοήθεια των πλήκτρων του PLC με βήμα αύξησης ή μείωσης 25 MPa. Για την επίτευξη ταχύτερου ελέγχου της μονάδας, υπάρχει δυνατότητα άμεσης συμπίεσης στα 250, 500 και 750 MPa. Ο χρόνος επίτευξης της επιθυμητής πίεσης εξαρτάται από καθ'αυτή την πίεση και από το μέγεθος του υπό πίεση δοχείου.

Κατά την εφαρμογή πίεσης το σύστημα θερμαίνεται λόγω αδιαβατικής συμπίεσης του ρευστού. Η θερμοκρασία του ρευστού αυξάνεται κατά  $\sim 3$  °C ανά 100 MPa εφαρμοζόμενης πίεσης. Η αδιαβατική θέρμανση είναι αρχικά ομοιόμορφη σε όλο τον όγκο του δοχείου πίεσης και για μικρά δείγματα μπορεί να θεωρηθεί πως υπάρχει θερμοδυναμική ισορροπία δείγματος-ρευστού συμπίεσης. Κατά την πάροδο χρόνου η θερμοκρασία ελαττώνεται λόγω απώλειας θερμότητας προς το περιβάλλον του δοχείου. Τα δεδομένα χρόνου-πίεσης-θερμοκρασίας για πιέσεις 200 - 600 MPa παρουσιάζονται στο ακόλουθο σύνθετο διάγραμμα.



Εικόνα 4-37 - Μεταβολή πίεσης (—) και θερμοκρασίας (—) του ρευστού μεταφοράς πίεσης σε διεργασία ΥΥΠ για πιέσεις 200 - 600 MPa

Για την προστασία και την αποφυγή μόλυνσης του επεξεργαζόμενου δείγματος, τα δείγματα συσκευάζονται κατάλληλα. Η χρήση προστατευτικής εξωτερικής συσκευασίας είναι απαραίτητη όχι μόνο για να αποφευχθεί η επαφή της γλυκόλης με το δείγμα, αλλά και το φράξιμο της οπής εισόδου/εξόδου του υγρού μεταφοράς της πίεσης στον πυθμένα των δοχείων πίεσης από τυχόν σωματίδια του δείγματος.

Για την διεξαγωγή των ισοβαρών κινητικών πειραμάτων ενεργοποίησης/ απενεργοποίησης της LGT φράπας χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των έξι μικροθαλάμων πίεσης. Δείγματα του καθαρού εκχυλίσματος LGT υπέστησαν κατεργασία με ΥΠ από 100 έως και 600 MPa και κυμαινόμενα χρονικά διαστήματα 0 έως και 15 min ξεκινώντας από θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Για κάθε πίεση δείγματα όγκου 200  $\mu$ L ενζυμικού διαλύματος συσκευάστηκαν σε περιέκτες πολυστρωματικού υλικού (αποτελούμενου από πολυαιθυλένιο, φύλλο αλουμινίου & πολυπροπυλένιο) διαστάσεων περίπου 1x2 cm, και στη συνέχεια σφραγίστηκαν με θερμοκόλληση κατόπιν αφαίρεσης του αέρα. Για αποφυγή τυχόν διαρροής του δείγματος οι περιέκτες τοποθετήθηκαν σε δεύτερη συσκευασία και σφραγίστηκαν πάλι με θερμοκόλληση αφού πρώτα αφαιρέθηκε όλος ο αέρας μεταξύ των δύο συσκευασιών.

Η κατεργασία των δειγμάτων έγινε πολλαπλές φορές, μία για κάθε επιθυμητή πίεση. Σε κάθε επανάληψη χρησιμοποιήθηκαν τόσα δοχεία πίεσης όσοι και οι χρόνοι που μελετήθηκαν (συμπεριλαμβανομένου και του μηδενικού χρόνου). Τα δείγματα φορτώθηκαν στους αντίστοιχους μικροθαλάμους, οι οποίοι ακολούθως σφραγίστηκαν. Κατά τη φάση συμπίεσης, οι βαλβίδες εισαγωγής του υγρού πίεσης στα δοχεία παρέμειναν ανοιχτές ώστε η επιθυμητή πίεση του συστήματος να μεταφερθεί σε κάθε ένα από αυτά. Με την επίτευξη της επιθυμητής πίεσης οι βαλβίδες του κάθε δοχείου έκλεισαν, οπότε οι θάλαμοι πίεσης απομονώθηκαν και η πίεση διατηρήθηκε σταθερή σε κάθε έναν από αυτούς. Η χρονική αυτή στιγμή θεωρήθηκε ως ο χρόνος έναρξης των πειραμάτων, οπότε και εξασφαλίστηκαν ισοβαρείς συνθήκες του πειράματος. Ο θάλαμος που περιείχε το δείγμα μηδενικού χρόνου κατεργασίας παρέμεινε ασφραγίστος, οπότε και η πίεσή του εκτονώθηκε με αυτήν της μονάδας. Οι υπόλοιποι θάλαμοι εκτονώθηκαν ύστερα από καθορισμένα χρονικά διαστήματα που είχαν προσδιοριστεί κατά τον σχεδιασμό του πειράματος.

Όλα τα δείγματα μετά την επεξεργασία με ΥΠ διατηρήθηκαν υπό ψύξη (0 °C) έως τον πειραματικό προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου σε κάθε συνθήκη.

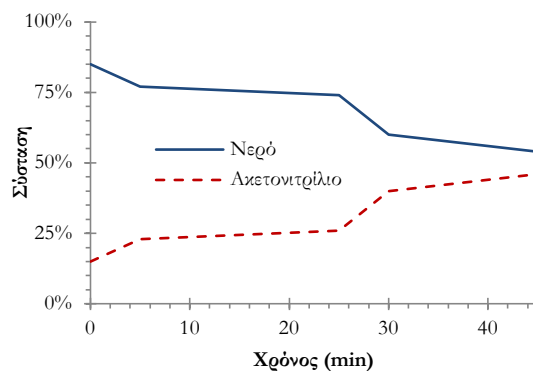
#### 4.3.4 Ανάλυση ενεργότητας ενζύμου

Η ενεργότητα της LGT προσδιορίστηκε βάσει της μεθόδου των Cai et al. (1998), όπως περιγράφεται από τους Karim & Hashinaga (2002)<sup>3</sup> με κάποιες τροποποιήσεις. Το διάλυμα ανάλυσης συνολικού όγκου 200  $\mu\text{L}$  περιείχε 1 mM λιμονίνης, 2 mM UDPG-2Na, 5 mM  $\text{MnCl}_2$  (άπαντα *Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany*) και 20 mM Tris-HCl (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany* & *Riedel-de Haën, Seelze, Germany* αντίστοιχα), με pH ρυθμισμένο σε τιμή 7.8. Η επώαση του διαλύματος έγινε σε δοκιμαστικούς σωλήνες (τύπου erpendorf, όγκου 1.5 mL) για 30 min σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C (λουτρό τύπου WB-10, *Memmert GmbH, Schwabach, Germany* ελεγχόμενο από ρυθμιστή PID τύπου SR-91, *Shimaden Co., Ltd., Tokyo, Japan*). Μετά το πέρας του χρόνου επώασης η αντίδραση διακόπηκε με βρασμό των σωλήνων για 5 min. Το διάλυμα αντίδρασης αραιώθηκε με 3 όγκους (600  $\mu\text{L}$ ) νερού:ακετονιτρίλιου 1:1 (αμφότερα ποιότητας HPLC, *Fisher Scientific, Loughborough, UK*) και διηθήθηκε με φίλτρο σύριγγας PTFE 0.45  $\mu\text{m}$  (*Captiva, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*).

Η ενεργότητα της LGT προσδιορίστηκε εμμέσως, με μέτρηση της εναπομείνουσας ποσότητας λιμονίνης μετά την επώαση των διαλυμάτων αντίδρασης<sup>4</sup>.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της λιμονίνης πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σύμφωνα με τη μέθοδο των Vikram et al. (2007).

Το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στη σειρά HP series 1100 (*HP/Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*). Αποτελείται από αντλία βαθμωτής έλлуσης (gradient pump) τεσσάρων καναλιών, απαερωτή κενού, βρόχο εισαγωγής δείγματος (injection loop) όγκου 20  $\mu\text{L}$  (*Rheodyne/IDEX Health & Science, Oak Harbor, WA, USA*) και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector). Το σύστημα ελέγχεται και οι μετρήσεις καταγράφονται & επεξεργάζονται από συνδεδεμένο υπολογιστή ο οποίος εκτελεί το λογισμικό HP ChemStation.



Εικόνα 4-38: Τυπική σύσταση διαλυτών έλлуσης στην ανάλυση λιμονίνης με HPLC

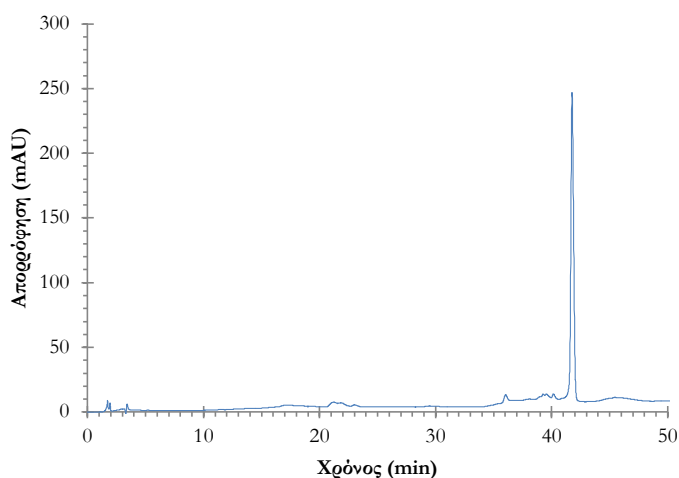
Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε στήλη ανάστροφης φάσης Hypersil ODS C-18 με μέγεθος σωματιδίων 5  $\mu\text{m}$  (*MZ Analysentechnik, Mainz, Germany*). Για τη συγκεκριμένη ανάλυση, η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε αποτελείτο από νερό (διαλύτης A) και ακετονιτρίλιο (διαλύτης B), (αμφότερα ποιότητας HPLC, *Fisher Scientific, Loughborough, UK*), με βαθμιαία μεταβαλλόμενη σύσταση ως εξής: εκκίνηση με 85% A, ελάττωση σε 77% μετά από 5 λεπτά, 74% στα 25 λεπτά, 60% στα 30 λεπτά και τέλος 54% στα 45 λεπτά. Η ροή διατηρείτο σταθερή στα 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Η ανίχνευση των λιμονοϊδών πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 210

<sup>3</sup> Η πρωτότυπη δημοσίευση από τους (Cai et al., 1998) είναι στα ιαπωνικά, χωρίς κάποια μετάφραση άμεσα διαθέσιμη. Κατά συνέπεια ο πειραματικός σχεδιασμός βασίστηκε σε αυτόν του παράγωγου πειράματος των (Karim & Hashinaga, 2002a).

<sup>4</sup> Η ιδιορρομία αυτή ήταν απόρροια του ότι, κατά τη διεξαγωγή της παρούσης εργασίας, δεν υπήρχε εμπορικά διαθέσιμο πρότυπο δείγμα γλυκοζίτη της λιμονίνης, και κατά συνέπεια δε θα ήταν δυνατή η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

nm. Μεταξύ δύο διαδοχικών μετρήσεων η στήλη αφηνόταν να ισορροπήσει με διέλευση νερού:ακετονιτρίλιου σε αναλογία 85:15% μέχρις επαναφοράς της απορρόφησης στη γραμμική βάση.

Η απόκριση & γραμμικότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε με παρασκευη πρότυπου διαλύματος λιμονίνης (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany*) σε νερό:ακετονιτρίλιο 1:1, συγκέντρωσης



Εικόνα 4-39: Τυπικό χρωματογράφημα πρότυπου δείγματος λιμονίνης. Η κορυφή της λιμονίνης παρατηρείται σε χρόνο 41.80 min.

$0.32 \text{ mg mL}^{-1}$  (0.68 mM). Διαλύματα χαμηλότερων συγκεντρώσεων (0.24, 0.16, 0.08, 0.04 &  $0.02 \text{ mg mL}^{-1}$ ) παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις του αρχικού. Η παραπάνω περιοχή συγκεντρώσεων επελέγη με βάση την αναμενόμενη συγκέντρωση λιμονίνης στα διαλύματα μέτρησης ενζυμικής ενεργότητας (0-0.25 mM, καθώς τα δείγματα αραιώνονταν σε αναλογία 1:4 πριν την κάθε μέτρηση), ενώ επιβεβαιώθηκε και η γραμμικότητα της μεθόδου στο εύρος συγκεντρώσεων ενδιαφέροντος.

Η συγκέντρωση πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα LGT προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm κατόπιν μηδενισμού με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 10 mM, pH 7.8.

## 4.4 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού φυσικοχημικών παραμέτρων ποιότητας χυμού

### 4.4.1 Μέτρηση pH

Για την μέτρηση του pH χρησιμοποιήθηκε πεχάμετρο (UV Bayern, WTW Bayern, Germany) (Εικόνα 4-8). Για τη βαθμονόμηση της συσκευής χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα σταθερής τιμής pH 4 και 7.



Εικόνα 4-40 - Συσκευή μέτρησης pH (UV Bayern, WTW Bayern, Germany)

### 4.4.2 Προσδιορισμός ολικής οξύτητας

Ο προσδιορισμός της ολικής οξύτητας του πορτοκαλοχυμού έγινε με τιτλοδότηση 5 mL δείγματος χυμού με διάλυμα NaOH 0,1 N παρουσία δείκτη φαινολοφθαλείνης. Λόγω της παρουσίας του δείκτη το χρώμα του χυμού αλλάζει από πορτοκαλί σε ροζ, γεγονός που υποδεικνύει την πλήρη εξουδετέρωση των οξέων του χυμού από τη βάση NaOH.



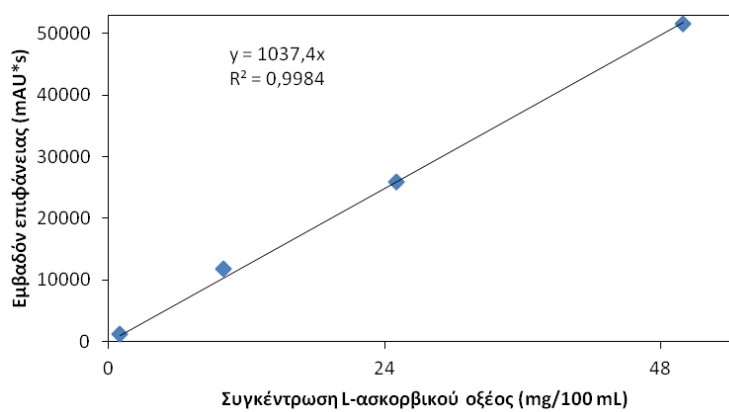
Εικόνα 4-41 - Αλλαγή του χρώματος του πορτοκαλοχυμού κατά την πλήρη εξουδετέρωση των οξέων από τη βάση NaOH

Η ολική οξύτητα εκφράστηκε σε g κιτρικού οξέος/L χυμού και υπολογίστηκε από την εξίσωση  $A [g \cdot L^{-1}] = 3.8448 \times V [L]$ , όπου A η ολική οξύτητα του πορτοκαλοχυμού [ $g \cdot L^{-1}$ ] και V ο όγκος του διαλύματος NaOH 0.1 N [L].



#### 4.4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός L-ασκορβικού οξέος (Βιταμίνη C)

Για τη μέτρηση του L-ασκορβικού οξέος χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφική μέθοδος υψηλής απόδοσης HPLC (Otuña-Concha et al., 1998). Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση 1 mL δειγματος πορτοκαλοχυμού σε ίσο όγκο διαλύματος μεταφωσφορικού οξέος 4.5% w/v με ανάδευση 5 min. Τα δείγματα διηθήθηκαν με φίλτρο L.E. Nylon 0.2 μm και μικρή ποσότητα αυτών διοχετεύθηκε με τη βοήθεια ένεσης στη χρωματογραφική στήλη του συστήματος, η οποία ήταν στήλη ανάστροφης φάσης Hypersil ODS C18 με μέγεθος σωματιδίων 5 μm. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν νερό καθαρότητας HPLC με μεταφωσφορικό οξύ για ρύθμιση του pH στο 2.2. Ο ρυθμός ροής ήταν 0.5 mL/min και η ανίχνευση του L-ασκορβικού οξέος πραγματοποιήθηκε στα 245 nm με χρόνο έκλουσης 8.2 min. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης (Εικόνα 4-11).



Εικόνα 4-42 - Καμπύλη αναφοράς ποσοτικού προσδιορισμού συγκέντρωσης L-ασκορβικού οξέος με χρήση υγρής χρωματογραφίας HPLC

Η εξίσωση υπολογισμού της συγκέντρωσης ασκορβικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε είναι η  $C = \frac{E_{chr}}{1037.4}$ , όπου C η συγκέντρωση σε mg/100 mL χυμού και  $E_{chr}$  [mAU·s] το εμβαδό της κορυφής του οξέος.

#### 4.4.4 Μέτρηση ολικών διαλυτών στερεών

Για τη μέτρηση των ολικών διαλυτών στερεών (°Brix) του πορτοκαλοχυμού χρησιμοποιήθηκε η φορητή συσκευή Atago N-1a Refractometer (Εικόνα 4-12). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Εικόνα 4-43 - Συσκευή μέτρησης ολικών διαλυτών στερεών

## Βιβλιογραφία 4<sup>ου</sup> κεφαλαίου

- Cai, H., Xia, X., Watanabe, Y., & Hashinaga, F. (1998). In vitro Synthesis of Limonoid Glucoside by Albedo Extracts of Pummelo Fruit (*Citrus grandis* Osbeck). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*.
- Karim, M. R., & Hashinaga, F. (2002). Isolation and characterization of limonoid glucosyltransferase from pummelo albedo tissue. *Food Chemistry*, 76(4), 431–436.
- Oruña-Concha, M. J., López-Hernández, J., Simal-Lozano, J. A., Simal-Gándara, J., González-Castro, M. J., & de la Cruz García, C. (1998). Determination of volatile components in fresh, frozen, and freeze-dried Padrón-type peppers by gas chromatography-mass spectrometry using dynamic headspace sampling and microwave desorption. *Journal of Chromatographic Science*, 36, 583–588.

## Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα και συζήτηση

### 5.1 Επεξεργασία δεδομένων HPLC και υπολογισμός ενεργότητας LGT

Η ανάλυση των δειγμάτων με HPLC έγινε σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο των Karim & Hasinaga (2002), όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 4. Από την ανάλυση των προτύπων δειγμάτων προέκυψε πως η λιμονίνη εκλύεται σε μέσο χρόνο  $41.80 \pm 0.12$  min. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε από τον μέσο όρο 3 μετρήσεων σε πρότυπα δείγματα συγκεντρώσεων. Η εξίσωση που την περιγράφει είναι η:

$$C [mg \cdot mL^{-1}] = \frac{A [mAU \cdot s] - 8.484}{12864} \quad \text{ή, ισοδύναμα} \quad C [mM] = \frac{A [mAU \cdot s] - 8.484}{6052.4}$$

όπου  $A$  το εμβαδόν σε mAU's της κορυφής που αντιστοιχεί στη λιμονίνη,  $C$  η συγκέντρωση της λιμονίνης σε  $mg \cdot mL^{-1}$  &  $C_M$  η συγκέντρωση της λιμονίνης σε mM. Η καμπύλη παρουσιάζει έντονη γραμμικότητα στη μελετηθείσα περιοχή συγκεντρώσεων, με συντελεστή συσχέτισης  $R^2 > 0.999$ .

Η συγκέντρωση πρωτεΐνης  $C_{pr} [mg \cdot mL^{-1}]$  σε οπτικά αραιά διαλύματα ( $OD_{280} < 1 AU$ ) θεωρήθηκε ίση με την απορρόφησή τους, ενώ πυκνότερα διαλύματα αραιώθηκαν κατάλληλα και επαναμετρήθηκαν.

Σημειώνεται εδώ πως η μέθοδος δίνει προσεγγιστικές τιμές συγκέντρωσης, αλλά και πως ο όγκος ορισμένων δειγμάτων δεν επαρκούσε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής τους.

Η αναγωγή των δεδομένων συγκέντρωσης λιμονίνης σε ενζυμική ενεργότητα έγινε υπολογίζοντας αρχικά την ποσότητα λιμονίνης που αντέδρασε:

$$\Delta N_{lim} [nmol] = (C_{sample} [mM] - C_{blank} [mM]) \times V_{aliquot} [\mu L],$$

όπου  $C_{sample}$  και  $C_{blank}$  η συγκέντρωση λιμονίνης στα δείγματα με προσθήκη LGT και buffer αντίστοιχα, και  $V_{aliquot}$  ο όγκος του διαλύματος αντίδρασης (τυπικά 200  $\mu L$ ). Η ολική ενεργότητα, εκφρασμένη σε [nkat] ( $= 10^{-9}$  katal ή  $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ) προέκυψε διαιρώντας την παραπάνω ποσότητα με το χρόνο αντίδρασης  $t_r$ , τυπικά 1800 s:

$$A_{total} [nkat] = \frac{\Delta N_{lim} [nmol]}{t_r [s]},$$

ενώ η ειδική ενεργότητα του εκχυλίσματος LGT,  $A$ , υπολογίστηκε με διαίρεση της ολικής ενεργότητας με τον όγκο ενζυμικού εκχυλίσματος σε κάθε δείγμα,  $V_{ex}$ , τυπικά 41.4  $\mu\text{L}$  και τη συγκέντρωση πρωτεΐνης  $C_{pr}$ :

$$A [\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ πρωτεΐνης}] = \frac{A_{total}[\text{nkat}]}{V_{ex} [\mu\text{L}] \cdot C_{pr}[\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}]} \times 1000.$$

## 5.2 Απομόνωση & καθαρισμός LGT από μεσοκάρπιο φράπας

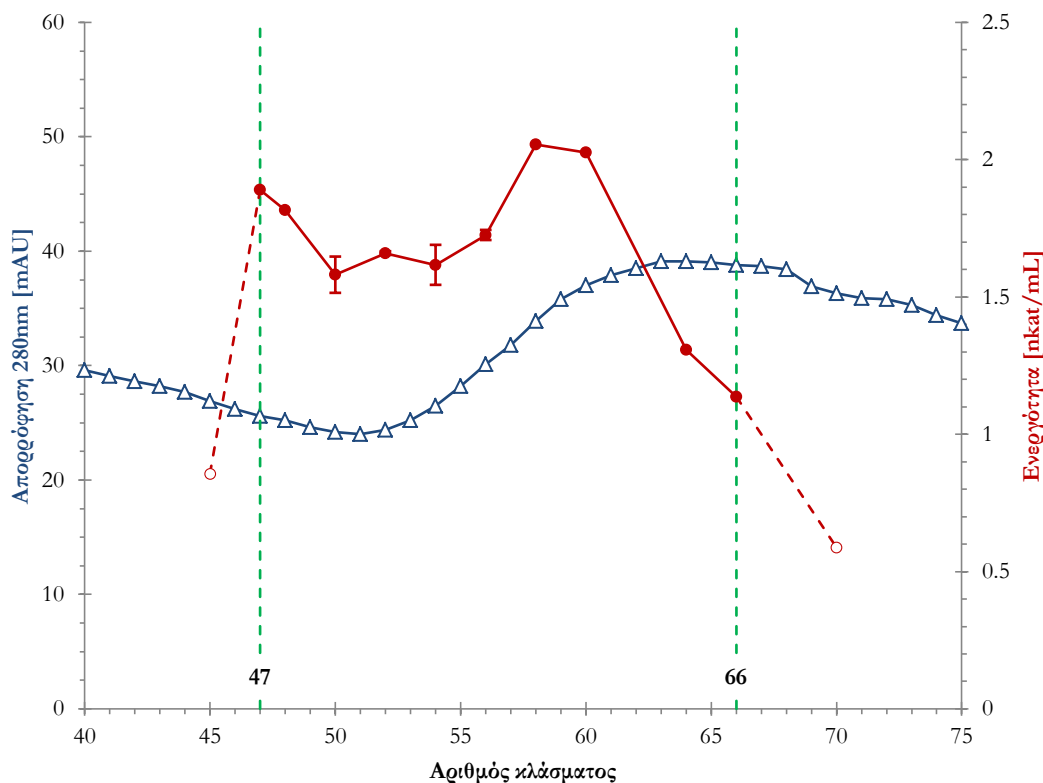
Το δείγμα LGT που μελετήθηκε απομονώθηκε από ιστούς μεσοκαρπίου φράπας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 4.

Η παρουσία του ενζύμου στο ακατέργαστο εκχύλισμα επιβεβαιώθηκε και μετρήθηκε με την μέθοδο των Karim & Hashinaga (2002). Η ενεργότητα της LGT προσδιορίστηκε ως 0.658 ( $\pm 0.022$ )  $\text{nkat} \cdot \text{mL}^{-1}$  εκχυλίσματος. Η συγκέντρωση πρωτεϊνών στο εκχύλισμα αυτό προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά ως 2.397  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , αποδίδοντας ειδική ενεργότητα  $A_{crude} = 0.274$  ( $\pm 0.009$ )  $\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  πρωτεΐνης.

Κατά τον καθαρισμό του ενζύμου με χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων 26 κλάσματα, υπ'αριθμόν 45 - 70, (αντιστοιχούντα σε χρόνους έκλουσης 135 - 210 min. και συγκέντρωση άλατος 0.225 - 0.35 M) παρουσίασαν αυξημένη απορρόφηση UV και συνελέγησαν ως υποψήφια ενεργά κλάσματα LGT. Τα κλάσματα συμπυκνώθηκαν με υπερδιήθηση και η ενεργότητά τους μετρήθηκε<sup>5</sup>.

---

<sup>5</sup> Λόγω του μεγάλου αριθμού δειγμάτων και του χρονοβόρου της διαδικασίας μέτρησης, ο προσδιορισμός ενεργότητας έγινε δειγματοληπτικά σε 12 από τα 26 συλλεχθέντα κλάσματα.



Εικόνα 5-44 - Προφίλ έκλουσης χρωματογραφίας ιοντοεναλλαγής UNO-Q. Με (Δ) απεικονίζεται η απορρόφηση 280 nm και με (●) η ενεργότητα της LGT. Τα δείγματα που συνελέγησαν περιλαμβάνονται στις κάθετες διακεκομμένες γραμμές.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 5-1. Η μπλε γραμμή (Δ) απεικονίζει την απορρόφηση του εκλουόμενου διαλύματος ενώ με κόκκινο χρώμα (●) σημειώνεται η ενεργότητα των κλασμάτων 45 - 70. Τα δραστηότερα κλάσματα αντιστοιχούσαν σε χρόνους έκλουσης 141 - 198 min και περιλαμβάνονται στις πράσινες κάθετες διακεκομμένες γραμμές.

Τα κλάσματα που παρουσίασαν την υψηλότερη ενεργότητα (υπ'αριθμόν 47 - 66) ενοποιήθηκαν και αφαιρέθηκαν με 3 διαδοχικές αραιώσεις και συμπυκνώσεις με υπερδιήθηση. Η συμπύκνωση έγινε με χρήση μεμβρανών φυγοκέντρου Amicon Ultra-4 με μοριακό βάρος αποκοπής (MWCO) 5 kDa (Millipore, Billerica, MA, USA). Εν τέλει το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε σε και το συμπύκνωμα (καθαρή LGT) αποθηκεύθηκε σε θερμοκρασία 0 °C. Η ενεργότητά του προσδιορίστηκε σε 1.279 ( $\pm 0.153$ ) nkat·mL<sup>-1</sup> και η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε 0.306 mg·mL<sup>-1</sup>, προσδίδοντας στο καθαρό εκχύλισμα LGT ειδική ενεργότητα  $A_{\text{pure}} = 4.179 (\pm 0.500)$  nkat·mg<sup>-1</sup>.

Η διαδικασία καθαρισμού με ιοντοεναλλαγή είχε ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό της ειδικής δραστητικότητας της LGT κατά παράγοντα  $\times 15.3$ , τιμή που συμβαδίζει με πρότερες έρευνες (Karim & Hashinaga, 2002a). Η εκτίμηση της ποσοτικής ανάκτησης του ενζύμου δεν ήταν δυνατή λόγω απώλειας ποσότητας εκχυλίσματος κατά τον καθαρισμό του.

Πίνακας 5-1 - Καθαρισμός & ανάλυση γλυκοζυλοτρανσφεράσης λιμονοειδών

Δείγμα	Συγκέντρωση πρωτεϊνών [mg·mL <sup>-1</sup> ]	Ενεργότητα LGT [nkat·mL <sup>-1</sup> ]	Ειδική ενεργότητα [nkat·mg <sup>-1</sup> ]	Παράγοντας ενίσχυσης [-]	Ποσοτική απόδοση [%]
Ακατέργαστο	2.397	0.658±0.022	0.274±0.009	1.0	100
UNO-Q	0.306	1.279±0.153	4.179±0.500	15.3	N/A

### 5.3 Συμπεριφορά LGT υπό υπερυψηλή πίεση

#### 5.3.1 Επεξεργασία δεδομένων ενζυμικής ενεργότητας

Ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 4, η καθαρή LGT διαχωρίστηκε σε επιμέρους δείγματα, τα οποία υποβλήθηκαν σε κατεργασία με υπερυψηλή υδροστατική πίεση. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση ενεργότητας του ενζύμου σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την κατεργασία τους (χρόνος αναμονής υπό ψύξη < 4 hrs) και στη συνέχεια αναλύθηκαν με χρήση της μεθόδου HPLC που περιγράφηκε προηγουμένως.

Συνολικά μελετήθηκαν 24 ζεύγη πίεσης-χρόνου, με κύμανση της πίεσης 100 - 600 MPa και του χρόνου 0 - 15 min<sup>6</sup>, καθώς και ένα δείγμα ελέγχου<sup>7</sup>, το οποίο δεν υποβλήθηκε καθόλου σε ΥΥΠ. Η επιλογή των παραμέτρων της κατεργασίας έγινε με βάση πρότερες έρευνες πάνω στην ενίσχυση της δραστηριότητας των ενζύμων, το διαθέσιμο εξοπλισμό ΥΥΠ καθώς και τη συνετή κατανομή του εργαστηριακού χρόνου καθώς η αναλυτική μέθοδος απαιτεί -με συντηρητική εκτίμηση- περίπου 1.5 ώρες ανά μέτρηση, και πολλαπλές επαναλήψεις για ορισμένα δείγματα.

Η κατεργασία ΥΥΠ έλαβε χώρα σε δύο συνεδρίες, με μεταξύ τους απόσταση δύο εβδομάδων. Την πρώτη ημέρα μελετήθηκαν πιέσεις 100, 300 και 600 MPa και χρόνοι 0, 3 και 15 min. Τα 9 δείγματα αναλύθηκαν άμεσα και τα πρώτα αποτελέσματα συμπεριφοράς της LGT υπό υπερυψηλή πίεση καθοδήγησαν το δεύτερο σύνολο πειραματικών συνθηκών. Κατά τη δεύτερη συνεδρία τα δείγματα LGT υποβλήθηκαν σε επιπλέον πιέσεις 200 και 400 MPa και χρόνους 1, 2, 4 και 6 min, ακολουθούμενους από τυπική ανάλυση δραστηριότητας.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 28 χρωματογραφικές αναλύσεις δειγμάτων ΥΥΠ, 2 αναλύσεις του δείγματος ελέγχου και 3 μετρήσεις του τυφλού δείγματος. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων μετατράπηκαν σε τιμές ειδικής ενεργότητας σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 5.1 και παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα. Να σημειωθεί πως το τυφλό δείγμα έχει -εξ ορισμού- μηδενική δραστηριότητα.

<sup>6</sup> Ως μηδενικός λογίζεται ο χρόνος που απαιτείται για την αύξηση της πίεσης μέχρι την πίεση διεργασίας. Τα δείγματα μηδενικού χρόνου σφραγίζονται στο δοχείο, υποβάλλονται στην αύξηση της πίεσης (5 - 30 s) και εκτονώνονται αμέσως μόλις η πίεση φτάσει το επιθυμητό επίπεδο.

<sup>7</sup> Αντίθετα, το δείγμα ελέγχου υποβάλλεται στις ίδιες ακριβώς διεργασίες (ψύξη/απόψυξη, μεταφορά προς και από την εγκατάσταση ΥΥΠ) με τα υπόλοιπα δείγματα αλλά δεν τοποθετείται ποτέ στο δοχείο πίεσης.

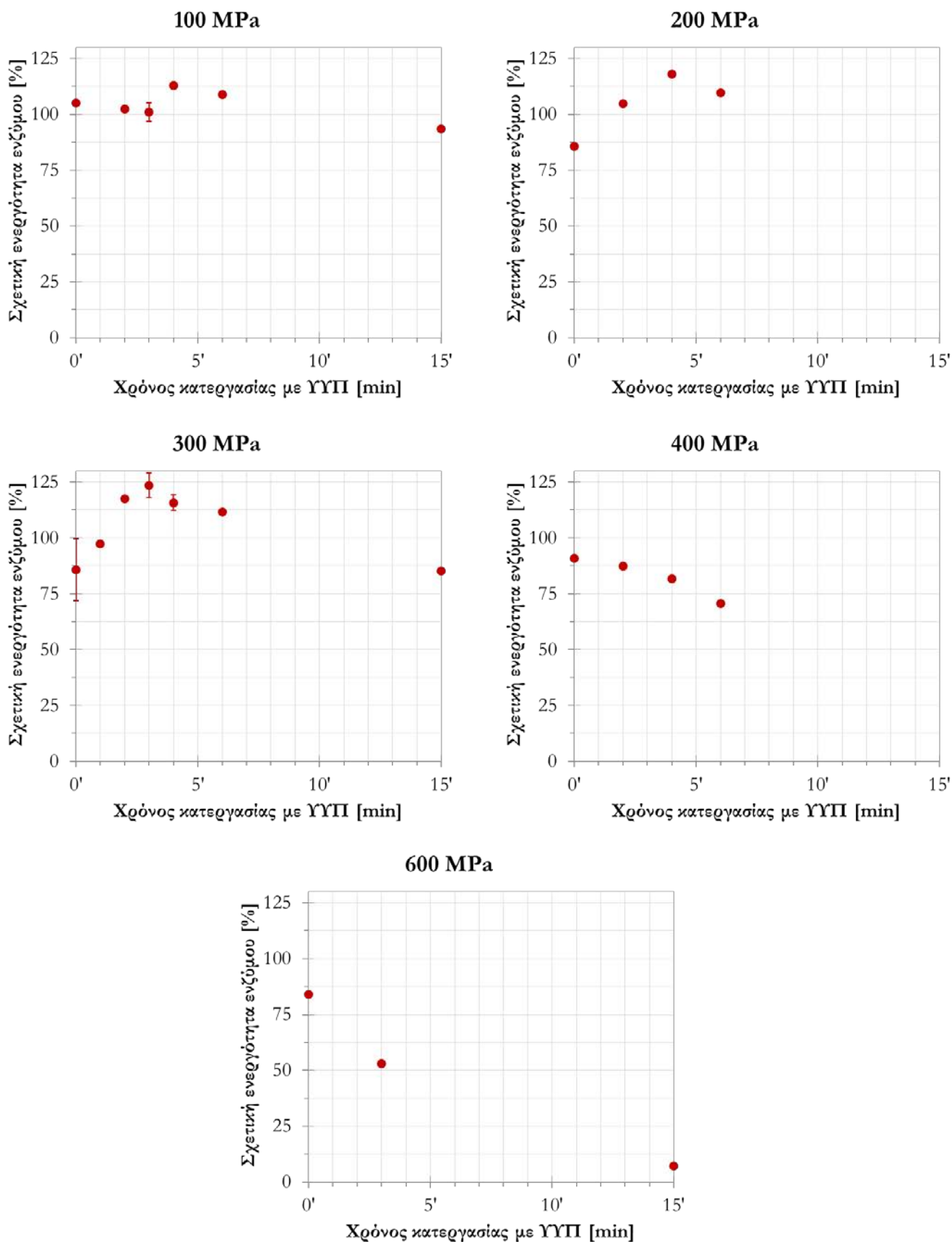
Πίνακας 5-2 - Ειδική ενεργότητα LGT μετά από κατεργασία με υπερυψηλή υδροστατική πίεση. Σε επίλεκτα δείγματα παρατίθεται εντός παρένθεσης η τυπική διακύμανση των μετρήσεων.

Ειδική ενεργότητα LGT [nkat/mg]					
	Πίεση [MPa] →				
↓Χρόνος [min]	100	200	300	400	600
0	4.391	3.575	3.992 (±0.178)	3.799	3.508
1			4.068		
2	4.275	4.377	4.915	3.646	
3	4.225 (±0.053)		5.160 (±0.070)		2.223
4	4.717	4.928	4.836 (±0.044)	3.408	
6	4.546	4.589	4.666	2.947	
15	3.912		3.557		0.302
Δείγμα ελέγχου (χωρίς ΥΥΠ)		4.179 (±0.153)			
Τυφλό δείγμα (χωρίς LGT)		0.000			

Στη συνέχεια τα παραπάνω δεδομένα μετατράπηκαν σε εκατοστιαίο ποσοστό εναπομείνουσας ενεργότητας (% residual activity, %RA), η οποία αποτελεί μέτρο σύγκρισης της ενεργότητας μετά από κατεργασία με ΥΥΠ με την ενεργότητα του δείγματος ελέγχου. Η εναπομείνουσα ενεργότητα προκύπτει από τη σχέση  $RA = \frac{A}{A_{control}} \times 100\%$ .

Πίνακας 5-3 - Εναπομείνουσα σχετική ενεργότητα LGT μετά από κατεργασία υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης. Σε επίλεκτα δείγματα παρατίθεται εντός παρένθεσης η τυπική διακύμανση των μετρήσεων.

Εναπομείνουσα ενεργότητα LGT [%]					
	Πίεση [MPa] →				
↓Χρόνος [min]	100	200	300	400	600
0	105.1	85.5	85.7(±13.9)	90.9	83.9
1			97.3		
2	102.3	104.7	117.6	87.3	
3	101.1(±4.17)		123.5(±5.44)		53.2
4	112.9	117.9	115.7(±3.45)	81.5	
6	108.8	109.8	111.6	70.5	
15	93.6		85.1		7.2
Δείγμα ελέγχου (χωρίς ΥΥΠ)		100.0			
Τυφλό δείγμα (χωρίς LGT)		0.0			



Εικόνα 5-45 - Εναπομείνουσα σχετική προς το δείγμα ελέγχου ενεργότητα LGT κατόπιν κατεργασίας με ΥΥΠ σε πίεση 100 - 600 MPa και χρόνο 0 - 15 min. Τα σημεία που περιέχουν γραμμές σφάλματος απεικονίζουν μέσες τιμές πολλαπλών επαναλήψεων  $\pm$  τυπική διακύμανση.



Από τα δεδομένα του πίνακα 5-3, και ειδικά κατόπιν γραφικής αναπαράστασής τους γίνεται εμφανές πως η μεταβολή ενεργότητας της LGT παρουσιάζει δύο διακριτές περιοχές. Στην περιοχή *ήπιας κατεργασίας*, όπου επικρατούν χαμηλές πιέσεις ( $\leq 300$  MPa) και σύντομοι χρόνοι άσκησης πίεσης ( $\leq 4$  min) η ενεργότητα του ενζύμου αυξάνεται. Η μέγιστη τιμή ενεργότητας εμφανίζεται μετά από κατεργασία με πίεση 300 MPa για 3 min, με αύξηση κατά 23.5 ( $\pm 5.4$ ) % σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου. Η ενεργοποίηση οφείλεται δυνητικά σε μη αναστρέψιμες αλλαγές στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, καθώς η αύξηση της ενεργότητας ήταν μετρήσιμη μετά από τουλάχιστον 2 αλλά και μέχρι και 4 ώρες μετά την εφαρμογή ΥΥΠ.

Αντίθετα, στην περιοχή *εντατικής κατεργασίας*, με υψηλότερες πιέσεις ή/και μεγαλύτερους χρόνους παραμονής υπό πίεση παρατηρείται απώλεια ενεργότητας. Σε πιέσεις μεγαλύτερες των 300 MPa δεν παρατηρείται καμία αύξηση ενεργότητας, και στην ακραία περίπτωση εφαρμογής πίεσης 600 MPa για 15 min μετρήθηκε μείωση κατά 92.8 % συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου. Και στην περίπτωση της απενεργοποίησης οι αλλαγές είναι μόνιμες και παραμένουν μετά την απομάκρυνση της πίεσης.

Η μεταβολή της ενεργότητας της LGT στο εύρος συνθηκών που μελετήθηκαν οφείλεται σε διατάραξη της τριτοταγούς δομής της καθώς η πρωτοταγής δομή παραμένει ανεπηρέαστη από την πίεση, η δευτεροταγής δομή διαταράσσεται τυπικά σε πιέσεις άνω των 700 MPa (Γώγου, 2010). Επιπρόσθετα, η LGT είναι μονομερής πρωτεΐνη (Karim & Hashinaga, 2002a) και κατά συνέπεια δε διαθέτει τεταρτοταγή δομή. Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των ενζύμων υπό ΥΥΠ αναλύονται εκτενέστερα στο κεφάλαιο 3 του παρόντος.

### 5.3.2 Προσδιορισμός εμπειρικού μοντέλου κινητικής της LGT σε διεργασίες ΥΥΠ

Τα πειραματικά δεδομένα ενεργότητας προσαρμόστηκαν στη συνέχεια σε ένα μαθηματικό μοντέλο με σκοπό την κατανόηση και πρόρρηση της συμπεριφοράς της LGT σε κατά τις διεργασίες ΥΥΠ. Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε και παρουσιάζεται στο παρόν είναι καθαρά εμπειρικό και επελέγη λόγω της καλής ταύτισής του με τα πειραματικά δεδομένα. Τα εμπειρικά μοντέλα δε βασίζονται κατ'ανάγκη σε *de profundis* κατανόηση των φυσικών μηχανισμών αλλά επιδιώκουν να προβλέψουν τη συμπεριφορά συστημάτων, αντιμετωπίζοντάς τα ως μαύρα κουτιά<sup>8</sup>.

Τέτοια μοντέλα απαντώνται συχνά σε πολύπλοκα συστήματα και έχουν μάλιστα χρησιμοποιηθεί σε αρκετές πρότερες δημοσιεύσεις για την περιγραφή της κινητικής απενεργοποίησης ενζύμων με σημασία στα τρόφιμα υπό συνθήκες υψηλής πίεσης (Chakraborty et al., 2014). Ενδεικτικά παρατίθενται δημοσιεύσεις σχετικές με την απενεργοποίηση πηκτινομεθυλεστεράσης (PME) σε πορτοκαλοχυμό (Katsaros et al., 2010; Polydera et al., 2004), πούλπα ροδάκινου (Boulekou et al., 2010) και χυμό τομάτας (Crelrier et al., 2001; Stoforos et al., 2002), πολυφαινολικής οξειδάσης (PPO) σε χυμό λίτσι (Kaushik et al., 2013) και καρπουζιού (Liu et al., 2013), όπως και άλλων ενζύμων όπως πολυγαλακτιουρονάση (PG), υπεροξειδάση (POD) και λυσύλ-οξειδάση (LOX).

---

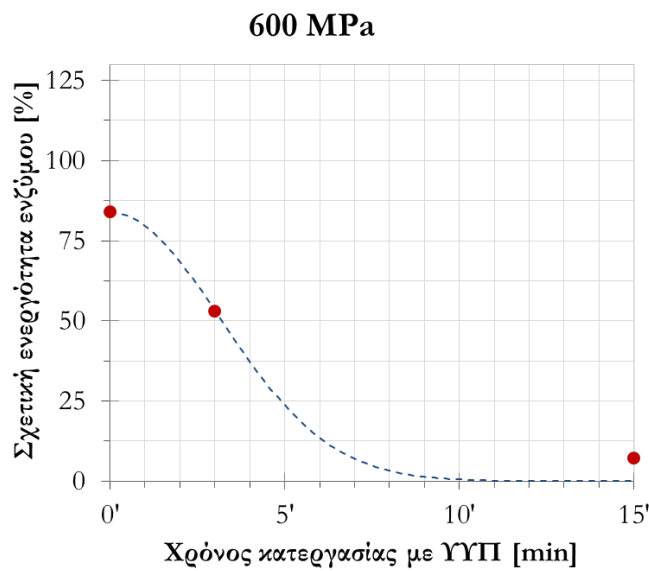
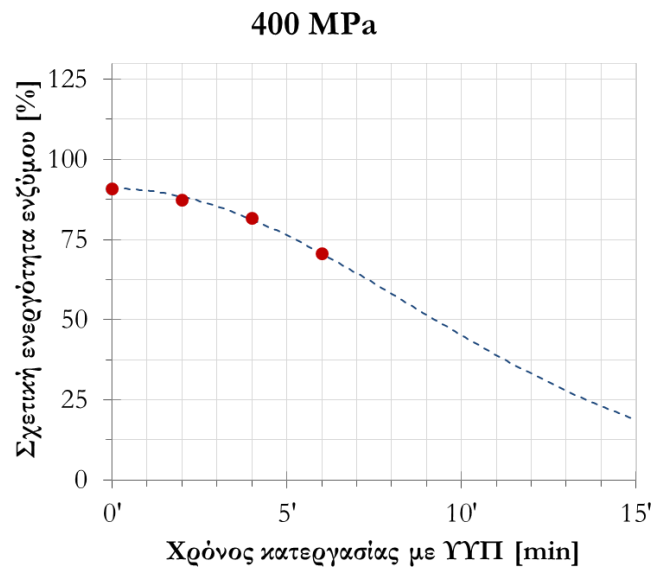
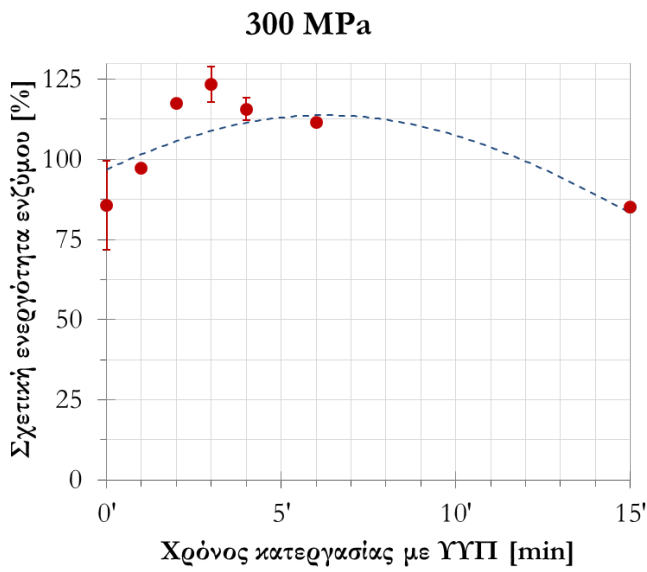
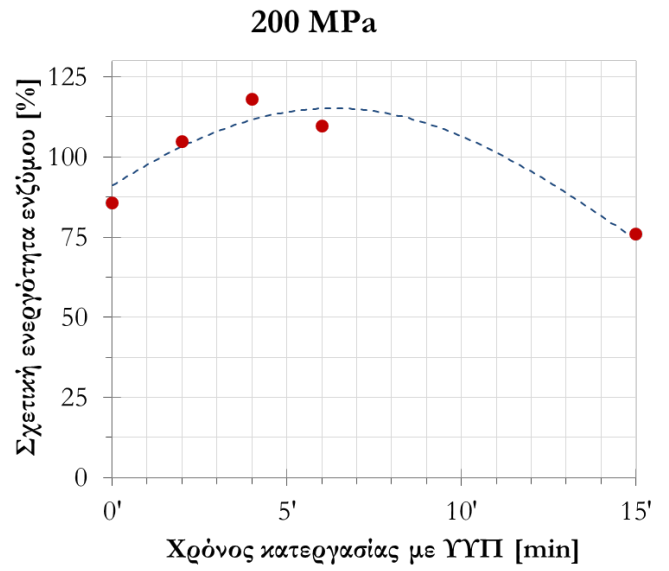
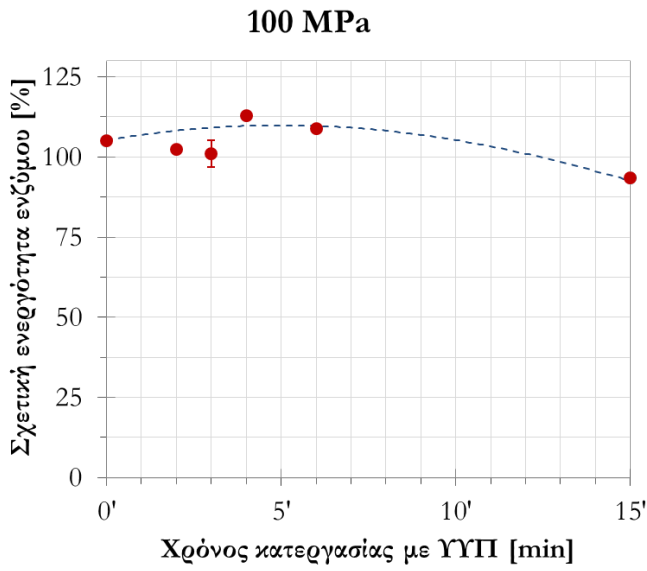
<sup>8</sup> Στη θεωρία συστημάτων τα «μαύρα κουτιά» (black box models) είναι δυναμικά συστήματα τα οποία δεν μπορούν να μοντελοποιηθούν βάσει πρότερης γνώσης. Κατ'αντιστοιχία «λευκά κουτιά» είναι συστήματα τα οποία μπορούν να περιγραφούν πλήρως και των οποίων ο μηχανισμός είναι γνωστός. Τέλος, ως «γκρι κουτιά», ή ημι-φυσικά μοντέλα, αντιμετωπίζονται συστήματα των οποίων η αρχή λειτουργίας είναι τουλάχιστον εν μέρει γνωστή.

Το μοντέλο που εφαρμόστηκε στα δεδομένα της LGT έλαβε υπόψη μόνο τα δεδομένα της ισοβαρικής διεργασίας, κάνοντας την παραδοχή πως ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη της πίεσης είναι χαμηλός σε σύγκριση με τον ολικό χρόνο διεργασίας. Η παραδοχή αυτή δεν είναι κατ'ανάγκη ακριβής, παρά ταύτα το μοντέλο είναι επαρκώς εύρωστο για να δώσει μια ακριβή πρώτη εικόνα για τη συμπεριφορά του ενζύμου. Καθώς η διεργασία ΥΥΠ απέδωσε τόσο ενεργοποίηση όσο και ακόλουθη απενεργοποίηση του ενζύμου ήταν επιθυμητή η χρήση ενός μοντέλου οποίο θα μπορεί να συμπεριλάβει και τα δύο φαινόμενα. Η βασική σχέση αποδίδει τη σχετική εναπομείνουσα ενεργότητα ως συνάρτηση του χρόνου διεργασίας  $t$  [s] και της σταθεράς ρυθμού  $k$  [ $s^{-2}$ ], αλλά παράλληλα εισάγει και δύο νέες έννοιες προκειμένου να περιγράψει επαρκώς και τις δύο φάσεις της διεργασίας:

$$\frac{A}{A_{control}} = A_{max} \times e^{-k \cdot (t-\tau)^2}$$

Οι παράμετροι αυτές είναι η σταθερά ενεργοποίησης  $A_{max}$  [–] και ο παράγοντας χρόνου  $\tau$  [s]. Σχηματικά, η σταθερά ενεργοποίησης περιγράφει τη μέγιστη ενεργότητα που μπορεί να αποκτήσει το ένζυμο σε δεδομένη πίεση, ενώ ο παράγοντας χρόνου αποδίδει το μήκος της διεργασίας που απαιτείται για την επίτευξη μέγιστης ενεργότητας. Σημειώνεται εδώ πως και οι τρεις παράμετροι εξαρτώνται από την πίεση διεργασίας, και μοντελοποιούνται ως προς αυτή σε ακόλουθη ενότητα.

Το προτεινόμενο μοντέλο έχει το πλεονέκτημα ικανοποιητικής περιγραφής όλων των συνθηκών που μετρήθηκαν, ακόμη και σε συνθήκες όπου δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της LGT ούτε σε σύντομους χρόνους υπό πίεση. Οι παράμετροι  $k$ ,  $\tau$  και  $A_{max}$  βελτιστοποιήθηκαν ως προς το σύνολο πειραματικών δεδομένων χρόνου-ενεργότητας ξεχωριστά για κάθε τιμή πίεσης με χρήση μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων και παρατίθενται στον πίνακα 5-4.



Εικόνα 5-46 - Προσαρμογή μαθηματικού μοντέλου (---) στα πειραματικά δεδομένα (●) ενεργοποίησης-απενεργοποίησης LGT με υπερυψηλή υδροστατική πίεση

Πίνακας 5-4 - Παράμετροι εμπειρικού μοντέλου ενεργότητας LGT για διεργασίες ΥΥΠ 100 - 600 MPa

	100 MPa	200 MPa	300 MPa	400 MPa	600 MPa
$A_{max}$ [-]	0.995	1.045	1.100	0.917	0.757
$k$ [ $\times 10^{-6} s^{-2}$ ]	0.494	1.514	1.356	2.094	15.94
$\tau$ [s]	342.0	379.7	375.7	0.0	0.0

Η σταθερά ρυθμού  $k$  βρέθηκε να ακολουθεί τη σχέση Eyring (βλέπε κεφάλαιο 3):

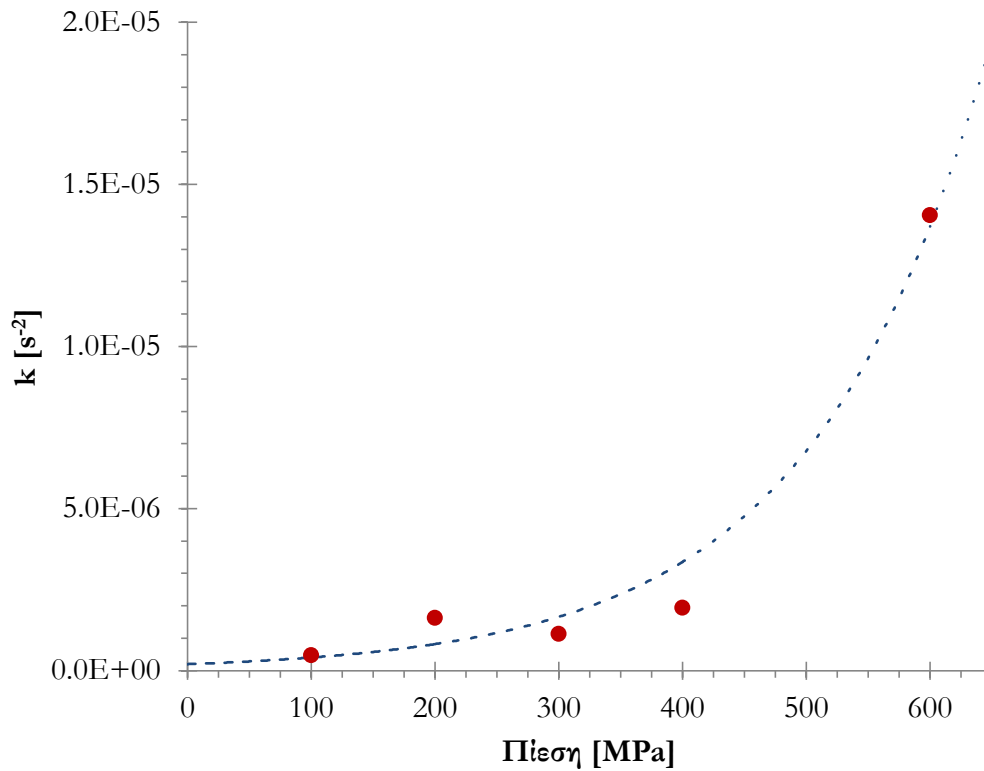
$$k = k_{ref} \times e^{-\frac{V_a}{R \cdot T} \cdot (P - P_{ref})},$$

όπου  $k_{ref}$  [ $s^{-2}$ ] η τιμή της σταθεράς υπό πίεση αναφοράς  $P_{ref}$  [MPa],  $V_a$  [ $cm^3 \cdot mol^{-1}$ ] ο όγκος ενεργοποίησης του ενζύμου και  $T$  [K] η θερμοκρασία κατά τη διεργασία. Οι τιμές των παραπάνω παραμέτρων προσδιορίστηκαν υπολογιστικά στις τιμές που παρουσιάζονται στον πίνακα 5-5.

Πίνακας 5-5 - Τιμές των παραμέτρων Eyring για την LGT υπό συνθήκες ΥΥΠ

$k_{ref}$	$2.027 \times 10^{-7} s^{-2}$
$V_a$	$-17.14 cm^3 \cdot mol^{-1}$
$P_{ref}$	1.062 MPa

Οι τιμές αυτές συνάδουν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία πάνω στη χρήση διεργασιών ΥΥΠ για ενεργοποίηση ωφέλιμων ενζύμων, όπως η ναρινγκινάση, στην περίπτωση της οποίας ο όγκος ενεργοποίησης έχει τιμή  $-15.0 \pm 1.8 cm^3 \cdot mol^{-1}$  (Vila-Real et al., 2007).



Εικόνα 5-47 - Προσαρμογή μαθηματικού μοντέλου (---) στα δεδομένα (●) σταθεράς ρυθμού της ενεργοποίησης/απερνεργοποίησης LGT υπό ΥΥΠ.

Αντίστοιχες σχέσεις χρησιμοποιήθηκαν για τη σταθερά ενεργοποίησης και τον παράγοντα χρόνου:

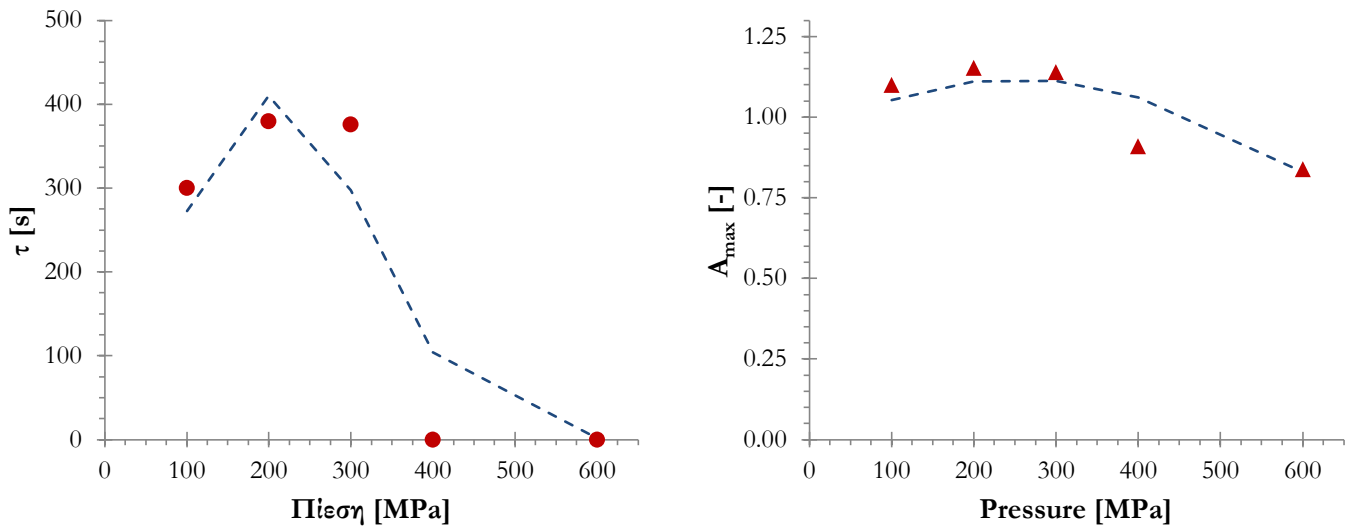
$$\tau = A \times e^{-B \cdot (P-C)} \text{ και } A_{max} = D \times e^{-E \cdot (P-F)},$$

όπου A-F εμπειρικές σταθερές, οι τιμές των οποίων υπολογίστηκαν με βελτιστοποίηση του μαθηματικού μοντέλου και παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5-6 (α) & (β) - Τιμές εμπειρικών σταθερών του μοντέλου προσδιορισμού κινητικής ενεργοποίησης/απερνεργοποίησης LGT σε διεργασίες ΥΥΠ

$A$ [s]	410.43
$B$ [ $MPa^{-1}$ ]	$3.65 \times 10^{-5}$
$C$ [ $MPa$ ]	205.91

$D$ [-]	1.187
$E$ [ $MPa^{-1}$ ]	$2.52 \times 10^{-6}$
$F$ [ $MPa$ ]	255.0



Εικόνα 5-48 (α) & (β) - Προσαρμογή του μαθηματικού μοντέλου κινητικής ενεργοποίησης/απενεργοποίησης (---) της LGT σε συνθήκες ΥΥΠ στις τιμές των εμπειρικών σταθερών  $\tau$  (● αριστερά) και  $A_{max}$  (▲ δεξιά).

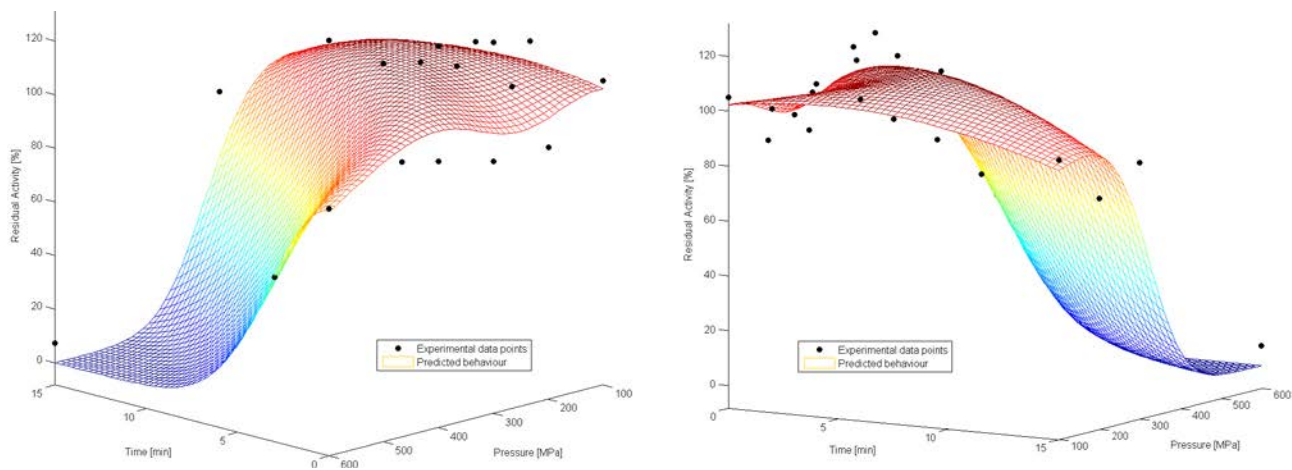
### 5.3.3 Ανάπτυξη μαθηματικού μοντέλου πρόρρησης κινητικής ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της LGT κατά τις διεργασίες ΥΥΠ

Όπως περιγράφηκε παραπάνω η διαδικασία απομόνωσης, καθαρισμού, επεξεργασίας με ΥΥΠ και μέτρησης της ενεργότητας της LGT είναι χρονοβόρος και επίπονη, καθώς το ένζυμο είναι μάλλον ευπαθές προς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Περαιτέρω μελέτη των ιδιοτήτων του ενζύμου μπορεί να διευκολυνθεί -ή αν μη τι άλλο να καθοδηγηθεί- από ένα πλήρες *in silico* μοντέλο το οποίο θα προβλέπει την κινητική του ενζύμου υπό *οποιοσδήποτε* συνθήκες επιλέξει ο ερευνητής.

Ένα τέτοιο μοντέλο είναι δύσκολο -αν όχι αδύνατο- να κατασκευαστεί χωρίς ντετερμινιστική γνώση του μηχανισμού ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της LGT. Παρόλα αυτά, είναι δυνατή και σκόπιμη η κατασκευή ενός υπολογιστικού μοντέλου το οποίο επιτρέπει τη διερεύνηση της συμπεριφοράς του ενζύμου σε συνθήκες παρεμφερείς με τις εργαστηριακά μελετηθείσες. Ένα τέτοιο μοντέλο περιγράφεται εδώ και χρησιμοποιείται για την εύρεση των βέλτιστων παραμέτρων επεξεργασίας της LGT με υπερυψηλή πίεση προς ενίσχυση της αποπικραντικής δράσης της.

Οι παράμετροι της εμπειρικής εξίσωσης που υπολογίστηκαν στην προηγούμενη ενότητα ενσωματώθηκαν σε ένα υπολογιστικό πρόγραμμα γραμμένο επί τούτου σε κώδικα Matlab με σκοπό την πλήρη περιγραφή της συμπεριφοράς του ενζύμου σε όλο το εύρος των συνθηκών που μελετήθηκαν εργαστηριακά στα πλαίσια του παρόντος. Το πρόγραμμα υπολογίζει την κινητική συμπεριφορά της LGT σε όλο το εύρος πιέσεων 100 - 600 MPa και χρόνων 0 - 15 min και παράγει δεδομένα εναπομείνουσας ενεργότητας (%RA) τα οποία απεικονίζονται σε τρισδιάστατη επιφάνεια (σύνθετη εικόνα 5-6) ή ισοδραστικές καμπύλες (εικόνα 5-7).

Ο κώδικας Matlab που εκτελεί τους υπολογισμούς παρατίθεται σε ακόλουθο παράρτημα.

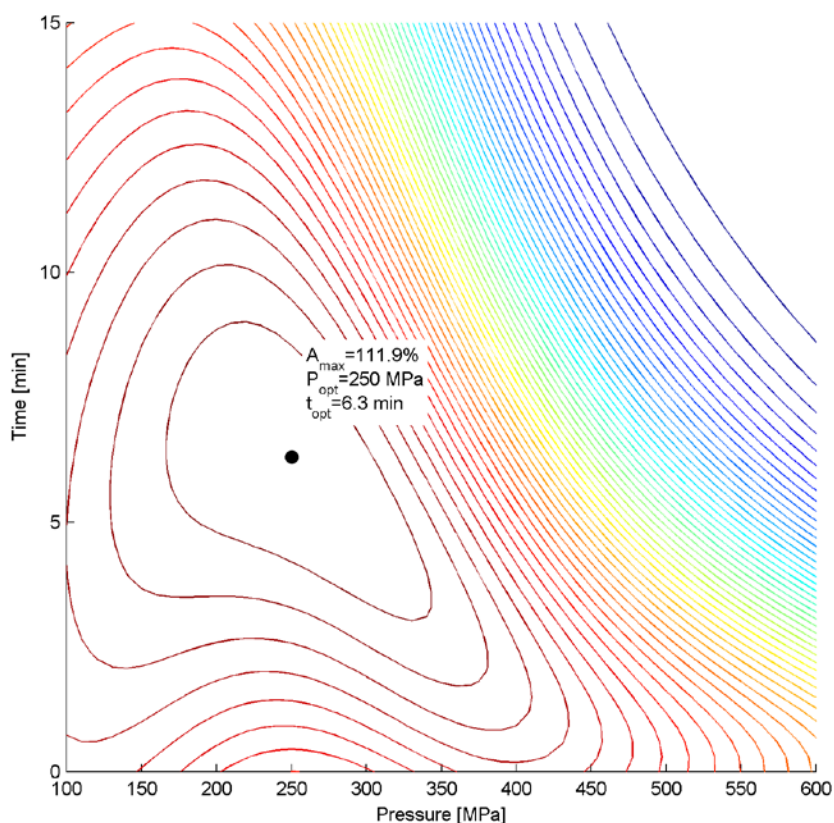


Εικόνα 5-49- Δύο όψεις της πρόρρησης εναπομείνουσας ενεργότητας της LGT (επιφάνεια) καθώς και των πειραματικών μετρήσεων (●) σε διεργασίες ΥΥΠ.

Στην απεικόνιση που προκύπτει από το μοντέλο μπορούν επίσης να ενσωματωθούν τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, κάτι το οποίο δρα και ως ορατή επιβεβαίωση της εγκυρότητας του.

Μία άλλη δυνατότητα που παρέχεται στους ερευνητές από το πρόγραμμα είναι η αυτόματη εύρεση των συνθηκών που βελτιστοποιούν τη διεργασία ΥΥΠ καθώς προσδίδουν τη μέγιστη ενεργότητα στο ένζυμο. Από τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται στο παρόν οι βέλτιστες συνθήκες προσδιορίστηκαν σε υποβολή πίεσης 250 MPa για χρόνο 6.3 min, αποδίδοντας αύξηση ενεργότητας κατά 11.9%. Το σημείο μεγιστοποίησης της ενεργότητας είναι άμεσα ορατό στην εικόνα 5-7.

Το υπάρχον μοντέλο μπορεί να προσαρμοστεί σε νέα πειραματικά δεδομένα, ακόμα και για πρόβλεψη συμπεριφοράς διαφορετικών ενζύμων, καθώς είναι αγνωστικό ως προς το μηχανισμό της ενεργοποίησης και απενεργοποίησης. Ως αντιστάθμισμα της προσαρμοστικότητας αυτής είναι η ευπάθειά του σε εσφαλμένα ή ελλιπή πειραματικά δεδομένα. Οι αδυναμία του αυτή, καθώς και κάποιες προτάσεις για περαιτέρω ανάπτυξη και αξιοποίηση του αναπτύσσονται στην ακόλουθη ενότητα.



Εικόνα 5-50 - Ισοδραστικές καμπύλες LGT σε διεργασίες ΥΥΠ και δείκτης βέλτιστων συνθηκών επεξεργασίας (●).

### 5.3.4 Περιορισμοί στην εφαρμογή του υπολογιστικού μοντέλου και προτάσεις βελτίωσης

Το μοντέλο που παρουσιάστηκε παραπάνω είναι καθαρά black box, καθώς οι τιμές των παραμέτρων του προκύπτουν με μαθηματική προσαρμογή των εξισώσεων σε πειραματικές τιμές ενεργότητας. Ως εκ τούτου η εγκυρότητα των προβλέψεων του εξαρτάται από την ακρίβεια των πειραματικών δεδομένων. Όπως παρουσιάστηκε στον πίνακα 5-3 και την αντίστοιχη εικόνα 5-2, τα δεδομένα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των εργαστηριακών δειγμάτων παρουσιάζουν τυπική διακύμανση από 3% έως και 16% επί της μετρηθείσας ενεργότητας. Κατά συνέπεια οι υπολογισμοί μπορεί να θεωρηθεί πως περιέχουν αντίστοιχου μεγέθους σφάλματα.

Ο εμπειρικός χαρακτήρας του μοντέλου συμβάλλει όμως και στην αντιμετώπιση της παραπάνω πηγής αβεβαιότητας. Με εισαγωγή περισσότερων ή και ακριβέστερων πειραματικών δεδομένων ενεργότητας και επανυπολογισμό των εμπειρικών παραμέτρων, η ακρίβεια της πρόρρησης μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά.

Μία άλλη συνιστώσα αβεβαιότητας στους υπολογισμούς αποτελεί ο υπολογισμός της σταθεράς χρόνου  $\tau$ . Όπως φαίνεται και στην εικόνα 5-5 (α), η εξίσωση πρόβλεψης της παραμέτρου από την πίεση παρουσιάζει σημαντικές ανακρίβειες, ειδικά σε ενδιάμεσες πιέσεις 300 - 400 MPa. Το πιο ορατό αποτέλεσμα αυτών των σφαλμάτων είναι η ασυμφωνία στην πρόβλεψη του χρόνου μέγιστης ενεργοποίησης συγκριτικά με τις πειραματικές παρατηρήσεις. Το μοντέλο προβλέπει βέλτιστο



χρόνο άσκησης πίεσης 6.3 min, κάτι το οποίο αποκλίνει από τις μετρήσεις που δείχνουν μέγιστη ενεργότητα μετά από χρόνο 3 - 4 min.

Είναι πιθανό σε αυτήν την περίπτωση η προσθήκη περαιτέρω πειραματικών δεδομένων να μην επαρκεί για βελτίωση της ακρίβειας. Δοκιμή διαφορετικών μορφών εξισώσεων είναι σκόπιμη καθώς μπορεί να περιγράψουν καλύτερα τις τιμές της παραμέτρου.

Ένας τρίτος περιορισμός στην εγκυρότητα των προβλέψεων είναι το ότι δεν ελήφθη υπόψιν η επίδραση της αδιαβατικής θέρμανσης κατά την άσκηση πίεσης. Η προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα έγινε θεωρώντας σταθερή θερμοκρασία δείγματος 293 K (20 °C). Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1, και όπως φαίνεται και από τις μετρήσεις θερμοκρασίας κατά την επεξεργασία των δειγμάτων LGT με υπερυψηλή υδροστατική πίεση (εικόνα 4-6 η θερμοκρασία των δειγμάτων αυξήθηκε κατά τη διεργασία έως και 20 °C (σε πίεση 600 MPa). Η ενσωμάτωση των δεδομένων αυτών μπορεί να γίνει είτε προσεγγιστικά, με χρήση μέσης θερμοκρασίας στην εξίσωση Eyring, είτε ακριβέστερα με υπολογισμό ισοδύναμων χρόνων επεξεργασίας για κάθε τιμή πίεσης. Η τεχνική υπολογισμού ισοδύναμου χρόνου έχει χρησιμοποιηθεί σε πρότερες έρευνες κινητικής απενεργοποίησης ενζύμων υπό ΥΥΠ (Γώγου, 2010, pp. 104–108).

#### 5.4 Εφαρμογή LGT σε αποπικρανση πορτοκαλοχυμού

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω δείχνουν πως η επεξεργασία χυμού με LGT είναι μία δυνητικά υποσχόμενη μέθοδος αποπικρανσης του. Για παράδειγμα, το δείγμα ενζύμου που παρουσίασε την υψηλότερη ενεργότητα ( $5.160 \pm 0.070 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  σε συνθήκες 300 MPa για 3 min) θα μπορούσε θεωρητικά να αποπικράνει  $7.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{LGT}^{-1}$  χυμού με αρχική συγκέντρωση λιμονίνης 25 ppm προς αποδεκτή συγκέντρωση 5 ppm.

Η πρότυπη μέτρηση ενεργότητας των δειγμάτων έγινε υπό συνθήκες που έχουν προσδιοριστεί σε πρότερη δημοσίευση (Karim & Hashinaga, 2002a) ως βέλτιστες για το ενζυμο (pH 7.8, 5 mM  $\text{Mn}^{2+}$ ), και οι οποίες δεν ταυτίζονται με το περιβάλλον του πορτοκαλοχυμού (pH 2.5 - 3, απουσία ιόντων  $\text{Mn}^{2+}$ ). Ως εκ τούτου θεωρήθηκε σκόπιμη η περαιτέρω μελέτη της επίδραση της ΥΥΠ σε δείγματα που περιείχαν χυμό και το ένζυμο LGTase, προκειμένου να διερευνηθεί η συνεργιστική δράση του ενζύμου και της πίεσης.

Τα πρώτα δείγματα που εξετάστηκαν περιείχαν 30 mL πορτοκαλοχυμού και 200  $\mu\text{L}$  ενζύμου, στα οποία εφαρμόστηκε πίεση 300 MPa για 10 min. Η επιλογή της συγκεκριμένης πίεσης έγινε βάσει των αποτελεσμάτων ενεργοποίησης τα οποία παρουσιάστηκαν παραπάνω. Η κατεργασία με ΥΥΠ είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της συγκέντρωσης λιμονίνης κατά 49.1 % συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου θερμικά παστεριωμένου χυμού, από την αρχική συγκέντρωση 11.93 ppm σε 6.07 ppm. Να σημειωθεί πως η τελική συγκέντρωση λιμονίνης είναι πρακτικά ίση με το όριο αποδεκτής πικρότητας για εμπορεύσιμο πορτοκαλοχυμό.

Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση του pH στην αποπικραντική δράση της LGT χωρίς επίδραση ΥΥΠ. Το ένζυμο προστέθηκε σε δείγματα παστεριωμένου χυμού Navel, τα οποία

επωάστησαν σε ατμοσφαιρική πίεση και τιμές pH ίσες με 3.2, 5 και 7.5. Η επιλογή των τιμών αυτών έγινε επιδιώκοντας τη μελέτη δράσης της LGT κοντά στο φυσικό pH του χυμού (3.5-4), ενώ η τιμή pH 7.5 επιλέχθηκε γιατί βρίσκεται κοντά στο βέλτιστο pH λειτουργίας του ενζύμου (Karim & Hashinaga, 2002b). Στα δείγματα επίσης εμπλουτίστηκαν με πρότυπο διάλυμα λιμονίνης (εν είδει εσωτερικού προτύπου) προκειμένου να αντιμετωπιστούν αποκλίσεις στις μετρηθείσες συγκεντρώσεις.

Πίνακας 7 - Μεταβολή λιμονίνης σε δείγματα χυμού κατόπιν προσθήκης LGT υπό ατμοσφαιρική πίεση και pH 3.2 - 7.5

Δείγμα	Συγκέντρωση λιμονίνης [ppm]	Μεταβολή ως προς δείγμα ελέγχου [%]
Control	30.3	
pH 3.2	28.1	- 7.3
pH 5.0	22.1	- 27.1
pH 7.5	19.8	- 34.7

Η LGT παρουσίασε την υψηλότερη δραστηριότητα σε pH 7.5, ελαττώνοντας τη συγκέντρωση λιμονίνης στα δείγματα κατά 34.7 % σε σύγκριση με τον παστεριωμένο χυμό, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς η τιμή αυτή είναι πολύ κοντά στο βέλτιστο pH 7.8. Αντίθετα σε όξινο pH παρόμοιο με αυτό του πορτοκαλοχυμού η δραστηριότητα του ενζύμου ήταν σημαντικά ελαττωμένη, επιτυγχάνοντας μείωση λιμονίνης κατά 7.3 % σε pH 3.2.

## 5.5 Συνδυασμός LGT και ψυχρής παστερίωσης με ΥΥΠ σε δείγματα χυμού

### 5.5.1 Περιγραφή δειγμάτων χυμού Navel

Δείγματα χυμού Navel μεταφέρθηκαν (13 Δεκεμβρίου 2014) καταψυγμένα από την εταιρεία ΑΣΠΙΣ στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Συνολικά παρελήφθησαν τρία διαφορετικά δείγματα χυμού από τρία διαφορετικά στάδια της γραμμής παραγωγής συμπυκνωμένου πορτοκαλοχυμού Navel. Τα δείγματα χυμού περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5-8 - Περιγραφή δειγμάτων χυμού Navel

Στάδιο παραγωγής	°Brix	Οξύτητα	% καρποκυττάρων
Αμέσως μετά τη χυμοποίηση	10.82	9.77	8 - 9
Χυμός μετά την παστερίωση	10.78	9.75	8
Χυμός μετά την αποπίκραση	11.09	9.22	(Ιχνη)
Συμπυκνωμένος χυμός	59.88	50.54	0.5

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων Υπερυψηλής Πίεσης (ψυχρή παστερίωση) χρησιμοποιήθηκε ο χυμός αμέσως μετά τη χυμοποίηση. Συνολικά παρήχθησαν δύο διαφορετικές ομάδες δειγμάτων ΥΠ.

### **5.5.2 Περιγραφή επεξεργασίας δειγμάτων χυμού Navel με συνδυασμό ενζυμικής προκατεργασίας και ψυχρής παστερίωσης με ΥΠ**

Η πρώτη ομάδα δειγμάτων είναι χυμός αμέσως μετά το στάδιο της χυμοποίησης ο οποίος παστεριώθηκε με ΥΠ, με την εφαρμογή πίεσης 600 MPa για 5 min, τα δείγματα κωδικοποιούνται ως *HP*. Η εφαρμογή της ΥΠ έγινε σε δείγματα όγκου 30 ml συσκευασμένα σε πλαστικούς περιέκτες.

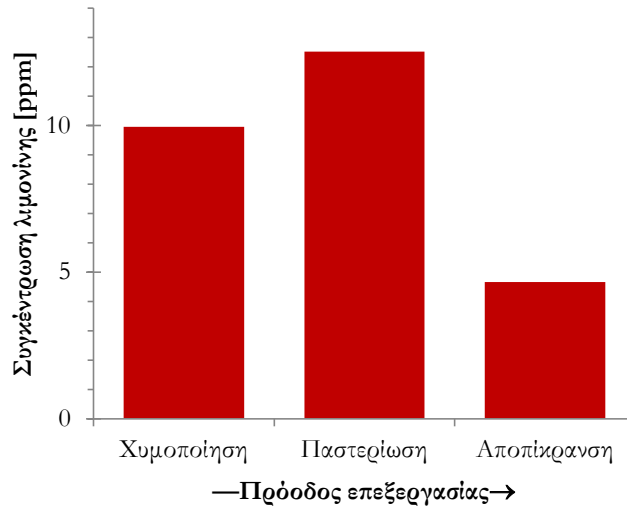
Στη δεύτερη ομάδα δειγμάτων πριν την εφαρμογή της ΥΠ πραγματοποιήθηκε μια ενζυμική προκατεργασία του χυμού. Για την ενζυμική προκατεργασία χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο λιμονική γλυκοζυλοτρανσφεράση, limonoid glucosyltransferase (LGTase). Το συγκεκριμένο ένζυμο εκχυλίστηκε και παραλήφθηκε από το μεσοκάρπιο του φρούτου της φράπας. Ο ενζυμικός εμπλουτισμός του χυμού πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 3.1 g λυοφιλιωμένου ενζυμικού εκχυλίσματος LGTase σε 660 ml πορτοκαλοχυμού Navel (αμέσως μετά το στάδιο της χυμοποίησης). Το διάλυμα ομογενοποιήθηκε με ήπια ανάδευση και οδηγήθηκε στο στάδιο της θερμικής επώασης (σε ατμοσφαιρική πίεση). Η θερμική ενζυμική επώαση πραγματοποιήθηκε στους 50°C για 20 min. Στη συνέχεια ο χυμός μοιράστηκε σε πλαστικούς περιέκτες των 30 ml και ακολούθησε επεξεργασία ΥΠ δύο διαδοχικών κύκλων συμπίεσης. Αρχικά, ο χυμός συμπίεστηκε στα 200 MPa για 2 min και στη συνέχεια ακολούθησε παστερίωση στα 600 MPa για 5 min. Τα δείγματα κωδικοποιήθηκαν ως *HP-LGTase*.

### **5.5.3 Περιγραφή επεξεργασίας δειγμάτων χυμού Navel με συνδυασμό ενζυμικής προκατεργασίας και θερμικής παστερίωσης**

Η τρίτη ομάδα δειγμάτων είναι ο μάρτυρας των δειγμάτων αφού χυμός αμέσως μετά τη χυμοποίηση παστεριώθηκε θερμικά με τη χρήση ενός συστήματος συνεχούς διεργασίας στους 90°C για 38 sec προσομοιώνοντας τη συμβατική θερμική παστερίωση η οποία χρησιμοποιείται στη βιομηχανία. Στη συνέχεια ο παστεριωμένος χυμός συσκευάστηκε ασηπτικά σε αποστειρωμένους πλαστικούς περιέκτες των 30 ml. Τα δείγματα κωδικοποιήθηκαν ως *THERMAL*.

### **5.5.4 Επίδραση του σταδίου επεξεργασίας στη συγκέντρωση λιμονίνης**

Τα βιομηχανικά δείγματα που περιγράφηκαν στην ενότητα 5.6.1 αναλύθηκαν ως προς τη συγκέντρωση λιμονίνης που περιείχαν αμέσως μετά τη συλλογή. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στην εικόνα 5-13.

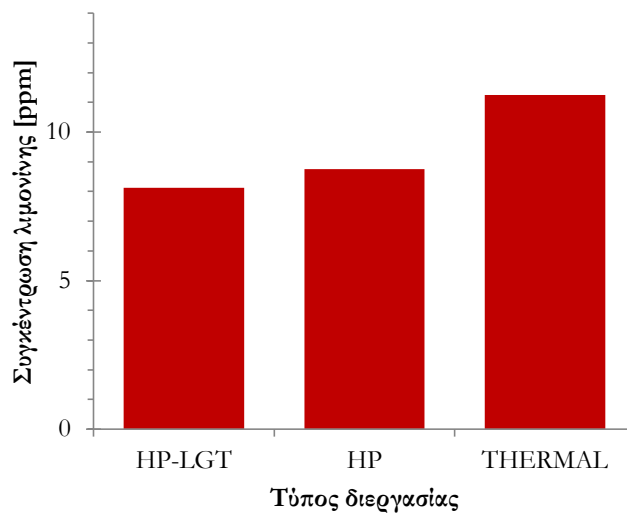


Εικόνα 5-51 - Συγκέντρωση λιμονίνης σε βιομηχανικά δείγματα πορτοκαλοχυμού μετά από κύρια βήματα επεξεργασίας (x-άξονας)

Όπως αναμένεται, η θερμική παστερίωση του χυμού κατά τη βιομηχανική επεξεργασία του οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης λιμονίνης, ενώ στη συνέχεια το στάδιο αποπίκρυνσης ελαττώνει τη συγκέντρωση σε αποδεκτά επίπεδα (< 5 ppm).

### 5.5.5 Επίδραση του είδους προκατεργασίας και παστερίωσης στη συγκέντρωση λιμονίνης

Η συγκέντρωση λιμονίνης στα εργαστηριακά δείγματα HP, HP-LGT και THERMAL προσδιορίστηκε αμέσως μετά το πέρας της κατεργασίας τους προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της φύσης της διεργασίας στην άμεση εμφάνιση λιμονίνης. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στην εικόνα 5-14.

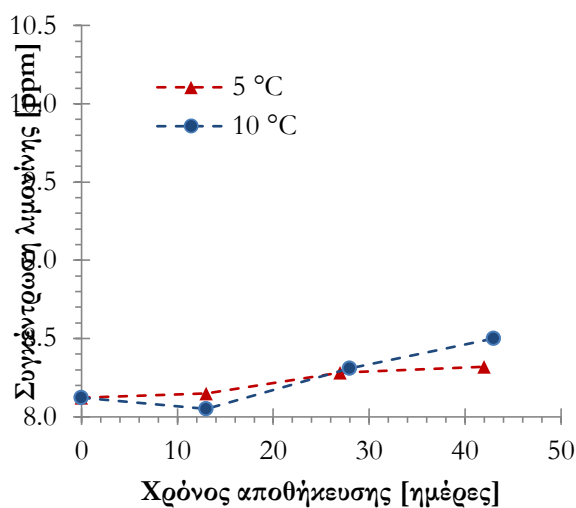


Εικόνα 5-52 - Συγκέντρωση λιμονίνης σε μηδενικό χρόνο μετά την κατεργασία δειγματος πορτοκαλοχυμού με διαφορετικές μεθόδους (x-άξονας)

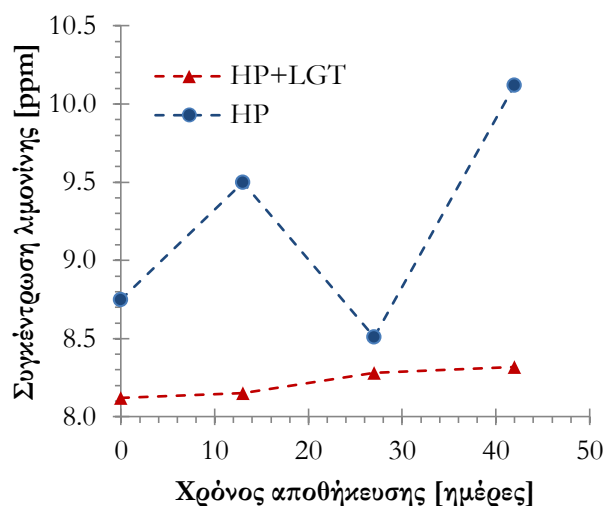
Όπως είναι ίσως αναμενόμενο, το δείγμα θερμικής παστερίωσης εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση λιμονίνης, ακολουθούμενο από το δείγμα ψυχρής παστερίωσης. Ο χυμός που υπέστη συνδυαστική κατεργασία LGT-ΥΠ εμφανισε τη χαμηλότερη αρχική συγκέντρωση λιμονίνης. Αξίζει πάντως να σημειωθεί πως και στα τρία δείγματα η αρχική συγκέντρωση ήταν ανώτερη του αποδεκτού ορίου 6 ppm.

### 5.5.6 Επίδραση χρόνου και θερμοκρασίας αποθήκευσης στη συγκέντρωση λιμονίνης

Τα δείγματα HP αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 5 °C, ενώ τα HP-LGT σε θερμοκρασίες 5 και 10 °C. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα δύο εβδομάδων μετρήθηκε η συγκέντρωση λιμονίνης στα επιμέρους δείγματα προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση του χρόνου και της θερμοκρασίας αποθήκευσης. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών παρουσιάζονται στις εικόνες 5-11 και 5-12.



Εικόνα 5-11 - Εξέλιξη της συγκέντρωσης λιμονίνης σε δείγματα χυμού κατόπιν συνδυαστικής επεξεργασίας ΥΠ+LGT και αποθήκευσης σε θερμοκρασία 5 (▲) και 10 (●) °C



Εικόνα 5-12 - Εξέλιξη της συγκέντρωσης λιμονίνης σε δείγματα χυμού κατόπιν συνδυαστικής επεξεργασίας ΥΠ (●) και ΥΠ+LGT (▲) και αποθήκευσης σε θερμοκρασία 5 °C

Στα δείγματα HP+LGT (εικ. 5-12) παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης λιμονίνης με την πάροδο του χρόνου. Ο ρυθμός αύξησης είναι υψηλότερος στο δείγμα που αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 10 °C, φαινόμενο που μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη ταχύτητα της αντίδρασης λακτονοποίησης της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου (LARI) προς λιμονίνη.

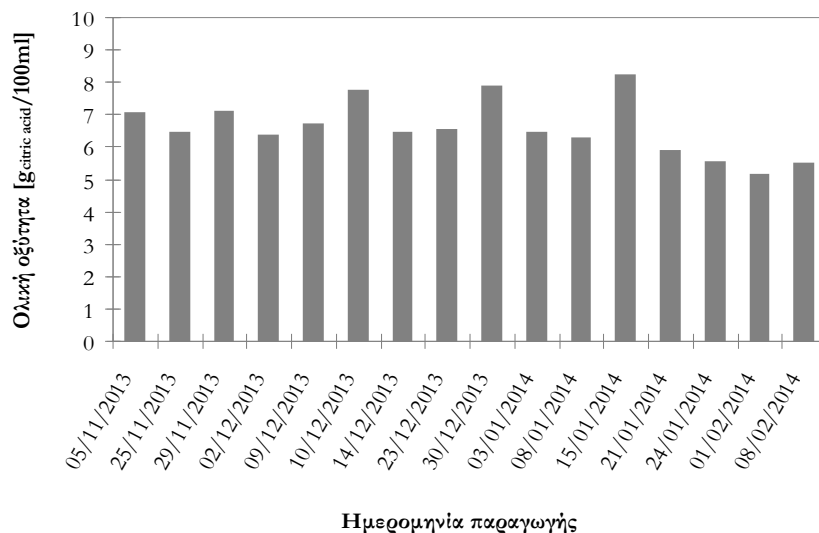
Αντίστοιχα, στη σύγκριση δειγμάτων των δύο μεθόδων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία 5 °C (εικ. 5-11), παρατηρείται πως το δείγμα HP παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση και ταχύτερο ρυθμό συσσώρευσης λιμονίνης. Η παρατήρηση αυτή αποδίδεται στην αυξημένη συγκέντρωση LARI κατά την αρχή του χρόνου αποθήκευσης και στην μετατροπή LARI προς LG στο δείγμα χωρίς την προσθήκη ενζύμου.

Και σε αυτά τα δείγματα η συγκέντρωση λιμονίνης είναι μεγαλύτερη του ορίου οργανοληπτικής αποδοχής. Είναι σαφές πως η προσθήκη LGT στο χυμό δεν είναι από μόνη της επαρκής μεθοδος για την καταπολέμηση της πικρότητας, ακόμα και μετά την ενεργοποίησή της με ΥΠ. Οι μετρήσεις αυτές δε συμβαδίζουν με τα δεδομένα ενεργότητας σε πρότυπα συστήματα. Η απόκλιση

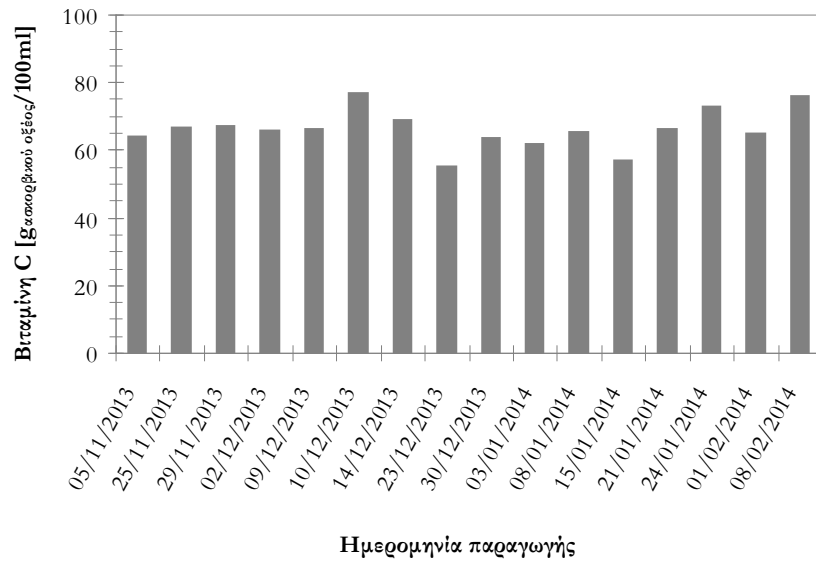
αυτή αποδίδεται στο χαμηλό pH των χυμών (pH 2.5-3.5), το οποίο απέχει σημαντικά από το βέλτιστο pH του ενζύμου (pH 7.8). Μία πιθανή μέθοδος αντιμετώπισης της ελάττωσης ενεργότητας παρουσιάζεται στο κεφάλαιο 6.

## 5.6 Διακύμανση φυσικοχημικών-ποιοτικών παραμέτρου χυμού πορτοκαλιού Navel κατά τη διάρκεια του έτους παραγωγής

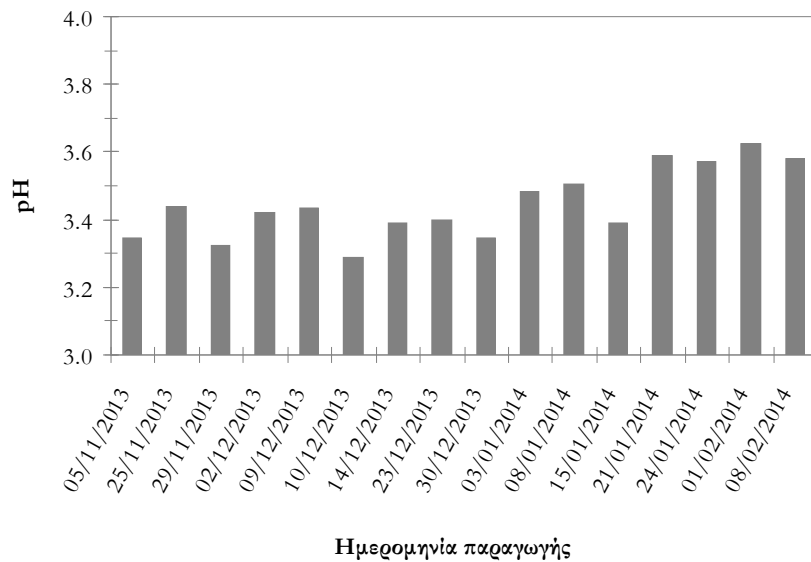
Μέσα στα πλαίσια της εργασίας μελετήθηκε η εξέλιξη της περιεχόμενης λιμονίνης σε χυμό πορτοκαλιού κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και μεταποίησης για το έτος παραγωγής 2013-2014. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τη βιομηχανία ΑΣΠΙΣ ΑΕ (Αργος) σε εβδομαδιαία βάση. Αμέσως μετά την παραλαβή των δειγμάτων εκτός από τη συγκέντρωση λιμονίνης προσδιορίστηκαν και άλλα βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του χυμού πορτοκαλιού όπως οι βαθμοί °Brix, η ολική οξύτητα (εκφρασμένη σε g κιτρικού οξέος ανά 100 ml χυμού), το pH και η βιταμίνη C (εκφρασμένη σε g ασκορβικού οξέος ανά 100 ml χυμού). Τα συνολικά αποτελέσματα απεικονίζονται στα διαγράμματα που ακολουθούν.



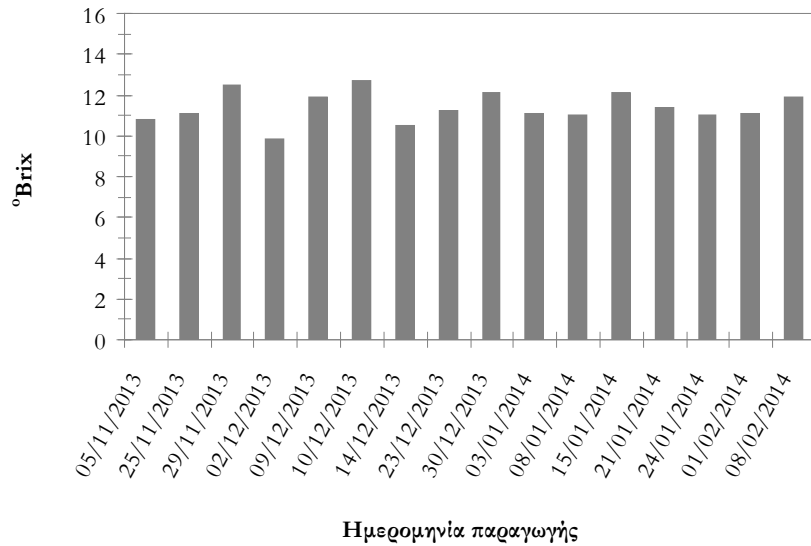
Εικόνα 5-55 - Παρουσίαση των διακυμάνσεων της ολικής οξύτητας σε δείγματα χυμού πορτοκαλιού σε διαφορετικές ημερομηνίες παραγωγής κατά τη διάρκεια του παραγωγικού έτους 2013-2014



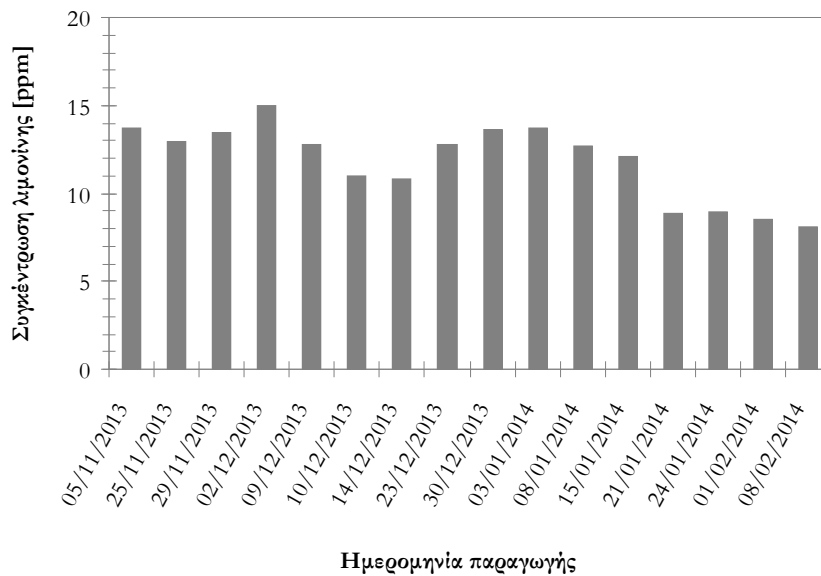
Εικόνα 5-56 - Παρουσίαση των διακυμάνσεων της συγκέντρωσης βιταμίνης C σε δείγματα χυμού πορτοκαλιού σε διαφορετικές ημερομηνίες παραγωγής κατά τη διάρκεια του παραγωγικού έτους 2013-2014



Εικόνα 5-57 - Παρουσίαση των διακυμάνσεων της τιμής pH σε δείγματα χυμού πορτοκαλιού σε διαφορετικές ημερομηνίες παραγωγής κατά τη διάρκεια του παραγωγικού έτους 2013-2014.



Εικόνα 5-58 - Παρουσίαση των διακυμάνσεων των βαθμών °Brix σε δείγματα χυμού πορτοκαλιού σε διαφορετικές ημερομηνίες παραγωγής κατά τη διάρκεια του παραγωγικού έτους 2013-2014



Εικόνα 5-59 - Παρουσίαση των διακυμάνσεων της συγκέντρωσης λιμονίνης σε δείγματα χυμού πορτοκαλιού σε διαφορετικές ημερομηνίες παραγωγής κατά τη διάρκεια του παραγωγικού έτους 2013-2014

Σύμφωνα με τις συνολικές μετρήσεις οι φυσικοχημικές παράμετροι παρουσιάζουν διακύμανση κατά τη διάρκεια ενός παραγωγικού έτους. Αυτές οι διακυμάνσεις θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την παραγωγική διαδικασία του χυμού. Ως προς την ένταση της πικρής γεύσης που εκφράζεται από τα επίπεδα της συγκέντρωσης λιμονίνης, φαίνεται ότι στην αρχή του παραγωγικού έτους και κατά τη διάρκεια των μηνών Νοεμβρίου και Δεκεμβρίου ο χυμός χαρακτηρίζεται από αριετά



υψηλές συγκεντρώσεις λιμονίνης που φτάνουν μέχρι και τα 16 ppm. Καθώς όμως προχωράει ο χρόνος συγκομιδής-μεταποίησης του πορτοκαλιού οι τιμές της συγκέντρωσης λιμονίνης μειώνονται σταδιακά και μειώνονται έως και τα 8 ppm τον τελευταίο μήνα ποαραγωγής πορτοκαλοχυμού Navel.

Οι διακυμάνσεις στα υπόλοιπα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά είναι παρόμοια. Τα ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Κλουκίνας, 2010; Σαριδάκη, 2012) όπου διαπιστώθηκε ότι κατά τη διάρκεια ενός παραγωγικού έτους αναμένεται να έχουμε διακυμάνσεις σε βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά χυμού πορτοκαλιού. Μάλιστα έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση λιμονίνης συσχετίζεται με φυσικοχημικές παραμέτρους όπως αυτήν της ολικής οξύτητας και των βαθμών °Brix.

## Βιβλιογραφία 5<sup>ου</sup> κεφαλαίου

- Boulekou, S. S., Katsaros, G. J., & Taoukis, P. S. (2010). Inactivation kinetics of peach pulp pectin methylesterase as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 699–706.
- Chakraborty, S., Kaushik, N., Rao, P. S., & Mishra, H. N. (2014). High-pressure inactivation of enzymes: A review on its recent applications on fruit purees and juices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.
- Crelier, S., Robert, M. C., Claude, J., & Juillerat, M. A. (2001). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) pectin methylesterase and polygalacturonase behaviors regarding heat- and pressure-induced inactivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5566–5575.
- Karim, M. R., & Hashinaga, F. (2002a). Isolation and characterization of limonoid glucosyltransferase from pummelo albedo tissue. *Food Chemistry*, 76(4), 431–436.
- Karim, M. R., & Hashinaga, F. (2002b). Preparation and properties of immobilized pummelo limonoid glucosyltransferase. *Process Biochemistry*, 38, 809–814.
- Katsaros, G. I., Tsevdou, M., Panagiotou, T., & Taoukis, P. S. (2010). Kinetic study of high pressure microbial and enzyme inactivation and selection of pasteurisation conditions for Valencia orange juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1119–1129.
- Kaushik, N., Kaur, B. P., & Rao, P. S. (2013). Application of high pressure processing for shelf life extension of litchi fruits (*Litchi chinensis* cv. Bombai) during refrigerated storage. *Food Science and Technology International*, 20(7), 527–541.
- Liu, Y., Zhao, X. Y., Zou, L., & Hu, X. S. (2013). Effect of high hydrostatic pressure on overall quality parameters of watermelon juice. *Food Science and Technology International = Ciencia Y Tecnología de Los Alimentos Internacional*, 19, 197–207.
- Polydera, A. C., Galanou, E., Stoforos, N. G., & Taoukis, P. S. (2004). Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions. *Journal of Food Engineering*, 62, 291–298.
- Stoforos, N. G., Crelier, S., Robert, M.-C., & Taoukis, P. S. (2002). Kinetics of Tomato Pectin Methylesterase Inactivation by Temperature and High Pressure. *Journal of Food Science*, 67, 1026–1031.
- Vila-Real, H. J., Alfaia, A. J., Calado, A. R., & Ribeiro, M. (2007). High pressure-temperature effects on enzymatic activity: Naringin bioconversion. *Food Chemistry*, 102(3), 565–570.

- Γώγου, Ε. Γ. (2010). Ανάπτυξη δεικτών αξιολόγησης και ελέγχου της διεργασίας υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης στα τρόφιμα. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Κλουκίνας, Β. (2010). Μέτρηση λιμονίνης σε χυμό πορτοκαλιού Navel και συσχέτιση με φυσικοχημικούς δείκτες. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Σαριδάκη, Α. (2012). Μελέτη της επίδρασης των διεργασιών παστερίωσης και αποπύκνωσης στις φυσικοχημικές παραμέτρους χυμού πορτοκαλιού Navel και διερεύνηση της ενζυμικής αποπύκνωσης του. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.



## Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup>: Συμπεράσματα και προτάσεις

Το πρόβλημα εμφάνισης πικρότητας στον πορτοκαλοχυμό έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς η καλλιέργεια και μεταποίηση πορτοκαλιών Navel σε χυμό αποτελεί σημαντική οικονομική δραστηριότητα στην Ελλάδα. Οι τρέχουσες μέθοδοι αποπίκρασης παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα, απαιτώντας πολύπλοκες διεργασίες και δαπανηρό εξοπλισμό, ενώ παράλληλα αφαιρούν από τον τελικό χυμό συστατικά τα οποία συνεισφέρουν σημαντικά στα οργανοληπτικά και ποιοτικά του χαρακτηριστικά. Καθίσταται λοιπόν προφανής η σκοπιμότητα ανάπτυξης εναλλακτικών μεθόδων αποπίκρασης οι οποίες απλουστεύουν την επεξεργασία του χυμού και διαφυλάσσουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του.

Μια υποσχόμενη μέθοδος είναι η χρήση ενζύμων για την αποφυγή εμφάνισης της πικρότητας. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η απομόνωση, ο καθαρισμός και ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου γλυκοζυλοτρανσφεράση της λιμονίνης (LGT), καθώς και η επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στις ιδιότητές του. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη γλυκοζυλίωση της πρόδρομης ένωσης της λιμονίνης, αποφεύγοντας έτσι την εμφάνιση πικρότητας.

Το πρώτο στάδιο της εργασίας αποτέλεσε η παραλαβή LGT από καρπούς εσπεριδοειδών. Ιστοί πορτοκαλιών Navel δεν απέδωσαν σημαντική ποσότητα ενζύμου, ενώ επανάλληψη της διαδικασίας απομόνωσης σε ιστούς φράπας κατέληξε σε ενζυμικό εκχύλισμα υψηλής καταλυτικής ενεργότητας. Ο καθαρισμός του ενζύμου ενίσχυσε περαιτέρω τη δραστηριότητά του.

Ακολούθως, κατά το δεύτερο στάδιο της εργασίας μελετήθηκε η συμπεριφορά του ενζύμου σε εύρος συνθηκών υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης. Υπό ορισμένες συνθήκες κατεργασίας (3 - 4 min υπό πίεση 200 - 300 MPa) η LGT παρουσίασε σημαντική ενίσχυση της ενεργότητάς της, της τάξης του 15 - 20 % συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου.

Ταυτόχρονα μελετήθηκε και η δυνατότητα εφαρμογής του ενζύμου σε σύστημα πορτοκαλοχυμού, με απώτερο σκοπό τη χρήση του σε βιομηχανικές διεργασίες αποπίκρασης. Παρατηρήθηκε η εμφάνιση συνεργιστικής δράσης LGT και ΥΥΠ σε σύστημα πορτοκαλοχυμού, με αποτέλεσμα την ελάττωση της συγκέντρωσης λιμονίνης συγκριτικά με τη χρήση των επιμέρους μεθόδων. Βάσει των παραπάνω παρατηρήσεων, καθίσταται προφανής η σκοπιμότητα της μελέτης των μηχανισμών ενίσχυσης και προστασίας της ενζυμικής ενεργότητας σε χαμηλές πιέσεις.

Παρότι το ένζυμο που παραλήφθηκε ήταν ικανό να μειώσει σημαντικά τη συγκέντρωση λιμονίνης σε πρότυπο σύστημα, η εφαρμογή του σε δείγματα χυμού παρουσίασε σημαντικά ελαττωμένη δραστηριότητα. Η απώλεια αυτή οφείλεται στην απόκλιση του όξινου pH του χυμού από το ελαφρώς

βασικό βέλτιστο pH του ενζύμου. Μία πρόταση για την αντιμετώπισή της είναι η μελέτη της χρήσης αινητοποιημένου ενζύμου, τεχνική η οποία έχει δώσει υποσχόμενα αποτελέσματα σε πρότυπα συστήματα. Ο συνδυασμός σταθεροποίησης με αινητοποίηση και ενεργοποίηση με διεργασία ΥΥΠ είναι πιθανό να αποδώσει ένα σύστημα το οποίο είναι αξιοποιήσιμο για την βιομηχανική αποπίκρυνση πορτοκαλοχυμού.

Εν τέλει, η συμπεριφορά του ενζύμου υπό συνθήκες ΥΥΠ χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή ενός εμπειρικού υπολογιστικού μοντέλου, το οποίο είναι ικανό να προβλέψει τις βέλτιστες συνθήκες διεργασίας για μεγιστοποίηση της ενζυμικής ενεργότητας της LGT. Αν και το μοντέλο αυτό ως έχει μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να κατευθύνει μελλοντική έρευνα, παρουσιάζει ορισμένες αδυναμίες οι οποίες περιορίζουν τη χρησιμότητά του. Περαιτέρω μελέτη των πιθανών μηχανισμών ενζυμικής ενεργοποίησης και απενεργοποίησης θα είναι χρήσιμη για να εξαλείψει τις απλοποιήσεις και παραδοχές του. Περισσότερα πειραματικά δεδομένα πίεσης-χρόνου-ενεργότητας, καθώς και χρήση δεδομένων θερμοκρασίας, είναι ικανά να βελτιώσουν σημαντικά την ακρίβεια της εκτίμησης των παραμέτρων του.

Όπως προέκυψε από την παρούσα εργασία, η χρήση γλυκοζυλοτρανσφεράσης λιμονοειδών σε συνδυασμό με υπερυψηλή υδροστατική πίεση φαίνεται ως μελλοντικά υποσχόμενη μέθοδος επεξεργασίας πορτοκαλοχυμού. Η περαιτέρω μελέτη και κατανόηση της συμπεριφοράς του ενζύμου καθώς και η εξέλιξη μαθηματικών μοντέλων περιγραφής της αποτελεί πεδίο έρευνας με σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον.

## Παράρτημα: Κώδικας Matlab για υπολογισμό ενζυμικής ενεργότητας LGT υπό συνθήκες ΥΥΠ

Ο παρακάτω κώδικας ορίζει στο λογισμικό Matlab μία συνάρτηση με μεταβλητές τιμές πίεσης P και χρόνου διεργασίας t και αποδίδει τιμή σχετικής ενεργότητας που παραμένει μετά την επεξεργασία.

```
function [RA] = LGTActPred(P, t)

% LGTActPred Predictive fuction of LGT residual activity
% Outputs relative residual activity of LGT under HHP processing
% conditions, given the process pressure P, in [MPa]
% and time t, in [s].
%
% Created by Markos Strofyllas
% Date: 2015-03-08
%%

% Physical constants
T = 293; % Process temperature in [K]
R = 8.314; % Ideal gas constant [J*mol^-1*K^-1]
%%

% Calculation of time constant tau from empirical parameters
A = 410.429111954145;
B = 0.0000364624596987984;
C = 205.90874015493;
tau = A .* exp(-B .* (P - C).^2);

%%

% Calculation of amplification parameter Amax from
% empirical parameters
D = 1.11867252336433;
E = 0.0000025155759722497;
F = 254.99995790729;
Amax = D .* exp(-E .* (P - F).^2);
%%

% Calculation of rate constant k from Eyring equation parameters
kref = 2.02665820596458E-07; % Ref. rate constant, in [s^-2]
Pref = 1.06199939937791; % Reference pressure, in [MPa]
Va = -17.140002; % Activation volume, in [cm^3*mol^-1]
k = kref .* exp(-(Va/(R.*T)) .* (P-Pref));
%%

% Calculation of residual % activity from empirical equation
RA = Amax .* exp(-k .* (t - tau).^2);

end
```

Η συνάρτηση δέχεται βαθμωτά (*scalar*) ορίσματα αλλά και πίνακες (*meshgrid matrices*) και αποδίδει αντίστοιχη κατηγορία τιμών, καθιστώντας εφικτή την κατασκευή τρισδιάστατης επιφάνειας ( $P$ ,  $t$ ,  $\%RA$ ) με εκτέλεση του παρακάτω κώδικα (απαιτεί την προηγούμενη αποθήκευση της συνάρτησης LGTActPred.m)

```
% Computational prediction and plotting of LGT behaviour under
% HHP conditions

[P, t] = meshgrid([100:10:600], [0:18:900]); % Range of variables
Z = LGTActPred(P, t).*100; % Calculation of predicted activity

figure(1)

mesh(P, t/60, Z);
    colormap jet;
    xlabel('Pressure [MPa]');
    ylabel('Time [min]');
    zlabel('Residual Activity [%]');
    hidden on;
    axis('square');
    view(135, 15);
```

Αντίστοιχα, η κατασκευή ισοδραστικών καμπυλών και η βελτιστοποίηση μπορούν να κατασκευαστούν με εκτέλεση του κώδικα:

```
figure(2)
hold on

contour(P, t/60, Z, 50);
    xlabel('Pressure [MPa]');
    ylabel('Time [min]');
    axis('square');

[maxval, maxidx] = max(Z(:)); % Find max. activity value & index
[maxPidx, maxtidx] = ind2sub(size(Z), maxidx); % Get P, t indices
Pmax = P(maxPidx, maxtidx); % Get optimal P value [MPa]
tmax = t(maxPidx, maxtidx)/60; % Get optimal t value [min]
plot(Pmax, tmax, 'r*')

maxtxt = [cellstr(['A_{max}='], num2str(maxval, 4), '%']);
         cellstr(['P_{opt}='], num2str(Pmax, 4), ' MPa']);
         cellstr(['t_{opt}='], num2str(tmax, 3), ' min']);
text(Pmax+10, tmax+1, maxlab, 'BackgroundCol or', [1 1 1])

hold off
```





