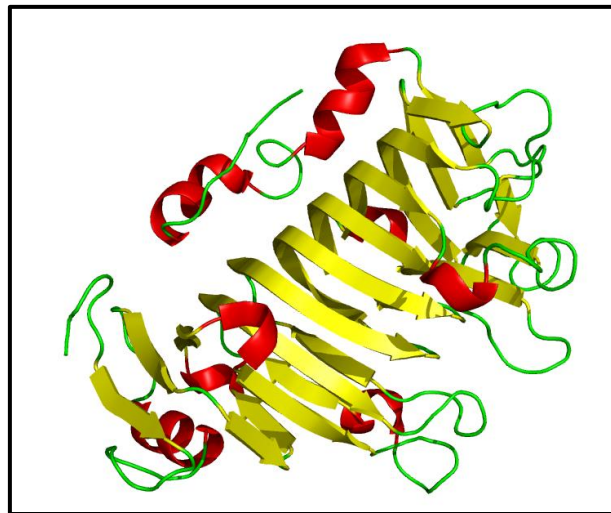




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**ΠΗΚΤΙΝΟΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣΗ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΟΥ *NAVEL*:
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗ ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:
ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ ΓΙΩΡΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΤΑΟΥΚΗΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2011

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ, καθώς και στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. κατά το ακαδημαϊκό έτος 2010-2011.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου Π. Ταούκη όχι μόνον γιατί μου εμπιστεύθηκε ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα αλλά και για το συνεχές ενδιαφέρον του για την εξέλιξη της διπλωματικής εργασίας και την σχετική καθοδήγηση. Ευχαριστίες επίσης εκφράζονται προς όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τον τρόπο με τον οποίο αντιμετώπισαν έναν νέο μέλλοντα συνάδελφό τους καθώς και για τις ενδιαφέρουσες συζητήσεις που είχαμε κατά καιρούς σχετικά με τα τρόφιμα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Ζαχαρία Αλεξανδράκη για την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε.

Ευχαριστώ τέλος την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και ενθάρρυνσή που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Γιώργος Δημόπουλος

Ιούνιος 2011

Περίληψη

Η επεξεργασία των τροφίμων με υπερυψηλή υδροστατική πίεση (ΥΥΠ) είναι μια νέα τεχνολογία επεξεργασίας τροφίμων η οποία επιτρέπει την απενεργοποίηση των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών, καθώς και ενζύμων διατηρώντας παράλληλα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά πρακτικά αναλλοίωτα. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για την επεξεργασία πληθώρας προϊόντων όπως φρέσκα φρούτα, λαχανικά και προϊόντα αυτών και έχει τη δυνατότητα να απενεργοποιήσει ενδογενή ένζυμα που προκαλούν αλλοιώσεις στην ποιότητα. Τέτοιο ένζυμο είναι και η πηκτινομεθυλεστεράση, που συναντάται σε όλα τα ανώτερα φυτά και είναι υπεύθυνη για τη μεταβολή της υφής των φρούτων και των λαχανικών καθώς και για την απώλεια θολότητας φρουτοχυμών.

Η αναλυτική μελέτη των φυτικών ενζύμων ως προς τη δομή, τις βιοχημικές ιδιότητες και τη δραστικότητα απαιτεί την παραλαβή τους σε καθαρή μορφή από τους ιστούς των φυτών. Στην παρούσα εργασία απομονώθηκε και καθαρίστηκε πηκτινομεθυλεστεράση από το φλοιό πορτοκαλιών ποικιλίας *Navel* με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της θερμικής επεξεργασίας και της επεξεργασίας με ΥΥΠ στην κινητική απενεργοποίησης του ενζύμου.

Ένα ισόένζυμο της ΠΜΕ απομονώθηκε από το φλοιό του πορτοκαλιού *Navel*, με διαδικασία που περιελάμβανε στάδια ομογενοποίησης, διήθησης, εξαλάτωσης, υπερδιήθησης καθώς και χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής και μοριακής διήθησης. Το ένζυμο παραλήφθηκε σε καθαρότητα μεγαλύτερη του 95% με ανάκτηση 9.5% της ενεργότητας του ανεπεξέργαστου εκχυλίσματος και ανηγμένη ενεργότητα 1125U/mg συνολικής πρωτεΐνης. Με ηλεκτροφόρηση πήγματος πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) προσδιορίστηκε το μοριακό του βάρος, ως μία μονή ζώνη στα 36kDa. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές Michaelis-Menten για την αντίδραση του ενζύμου με υπόστρωμα πηκτίνης (1% πηκτίνη DE=70-75%, 0.3M NaCl 30°C, pH=7.5) και βρέθηκαν $K_m=2.03\text{mg/mL}$, $V_m=5.18\mu\text{mol/mL min}$.

Η θερμική απενεργοποίηση του καθαρού ενζύμου (σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris-HCl, pH=7.5) μελετήθηκε σε θερμοκρασίες 50, 55, 60 και 65 °C. Η απενεργοποίηση βρέθηκε ότι ακολουθεί κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης με σταθερές ρυθμού απενεργοποίησης που κυμαίνονται μεταξύ 0.011 και 0.351min⁻¹. Η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία περιγράφηκε ικανοποιητικά από την εξίσωση Arrhenius με ενέργεια ενεργοποίησης που υπολογίστηκε ίση με 218kJ/mol.

Η συνδυασμένη επεξεργασία του ενζύμου με ΥΥΠ και θερμοκρασία έγινε σε πιέσεις από 400 έως 700MPa και θερμοκρασίες 45, 50 και 55°C. Η κινητική απενεργοποίησης βρέθηκε να ακολουθεί εξίσωση πρώτης τάξης. Οι σταθερές του ρυθμού κυμαίνονται μεταξύ 0.012 και 0.2415 min⁻¹ για τις εξεταζόμενες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση της πίεσης και της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση του συγκεκριμένου ενζύμου. Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης εκφράστηκε ικανοποιητικά μέσω της εξίσωσης Arrhenius. Οι ενέργειες ενεργοποίησης που υπολογίστηκαν κυμαίνονται μεταξύ 87 και 160kJ/mol για τις διάφορες πιέσεις επεξεργασίας. Αντίστοιχα, η επίδραση της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης εκφράστηκε ικανοποιητικά μέσω της σχέσης Eyring. Οι όγκοι ενεργοποίησης που υπολογίστηκαν κυμαίνονται μεταξύ -10.04 και -18.54mL/mol. Αρνητικοί όγκοι ενεργοποίησης δηλώνουν ότι αύξηση της πίεσης αυξάνει τη σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης στην ίδια θερμοκρασία. Η ενέργεια ενεργοποίησης βρέθηκε ότι αυξάνεται με αύξηση της πίεσης μέσω εκθετικής σχέσης, δηλαδή σε υψηλότερες πιέσεις η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης είναι μεγαλύτερη. Ο απόλυτος όγκος ενεργοποίησης βρέθηκε ότι αυξάνεται γραμμικά με τη θερμοκρασία, δηλαδή σε υψηλότερες θερμοκρασίες η επίδραση της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης είναι μεγαλύτερη.

Για την έκφραση της συνδυασμένης επίδρασης πίεσης και θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης αναπτύχθηκαν δύο μαθηματικά μοντέλα, ένα εκθετικό και ένα πολυωνυμικό. Οι παράμετροι των μοντέλων υπολογίστηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση στα πειραματικά δεδομένα. Και τα δύο μοντέλα έδωσαν ικανοποιητικό συντελεστή συσχέτισης ($R^2=0.995$). Το εύρος ισχύος και των δύο μοντέλων είναι για πιέσεις 400-700MPa και θερμοκρασίες 45-55°C. Μέσα στο πεδίο αυτό η εκτίμηση των σταθερών ρυθμού απενεργοποίησης κρίνεται ικανοποιητική, αποδεικνύοντας ότι και τα δύο μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Το εκθετικό μοντέλο υπερτερεί σε σχέση με το πολυωνυμικό στο ότι έχει πολύ μικρότερο αριθμό παραμέτρων και είναι συνεπώς πιο εύχρηστο.

Σύγκριση που έγινε με αποτελέσματα επεξεργασίας με ΥΥΠ σε καθαρή ΠΜΕ από φλοιό πορτοκαλιού ποικιλίας *Valencia* αποκαλύπτει ότι η απενεργοποίηση και στα δύο ένζυμα ακολουθεί την ίδια συμπεριφορά ως προς την πίεση και τη θερμοκρασία, αλλά η ΠΜΕ του πορτοκαλιού *Valencia* είναι σημαντικά πιο θερμοευαίσθητη, με ρυθμό απενεργοποίησης στα 700MPa και 55°C κατά 4 φορές μεγαλύτερο από αυτόν της ΠΜΕ πορτοκαλιού *Navel*.

Μελέτη φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού στην καθαρή ΠΜΕ φλοιού πορτοκαλιού *Valencia* αποκάλυψε έντονη σχέση μεταξύ απώλειας ενζυμικής δραστηριότητας και μεταβολής δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής, μετά από επεξεργασία με ΥΥΠ. Είναι πολύ πιθανό αντίστοιχες μεταβολές να παρατηρηθούν

και στην ΠΜΕ από φλοιό πορτοκαλιού *Navel*, παρατήρηση που δίνει έναυσμα για περαιτέρω μελέτη της σχέσης δομής-απενεργοποίησης του συγκεκριμένου ενζύμου.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1 : Πηκτίνη και πηκτινολυτικά ένζυμα.....	1
1.1 Πηκτίνη.....	1
1.1.1 Πηκτινικές ουσίες	1
1.1.2 Ταξινόμηση και δομή πηκτινικών ουσιών.....	1
1.1.1 Φυσικές και χημικές ιδιότητες της πηκτίνης.....	3
1.1.2 Η πηκτίνη στα φρούτα.....	5
1.2 Πηκτινολυτικά ένζυμα	5
1.2.1 Ταξινόμηση των πηκτινολυτικών ενζύμων.....	5
1.2.2 Ρόλος των πηκτινολυτικών ενζύμων στην ωρίμανση των φρούτων	7
1.2.3 Χρήση των πηκτινολυτικών ενζύμων στην τεχνολογία τροφίμων.....	8
1.3 Πηκτινομεθυλεστεράσες	13
1.3.1 Ρόλος των ΠΜΕ στα φυτά.....	14
1.3.2 Βιοφυσικές ιδιότητες των ΠΜΕ	15
1.3.3 Βιοχημικές ιδιότητες της ΠΜΕ.....	15
1.3.4 Δομή και μηχανισμός δράσης της ΠΜΕ	16
1.4 Σημασία της ΠΜΕ στους χυμούς φρούτων	18
1.4.1 Δομή και σύσταση του αιωρήματος.....	19
1.4.2 Μηχανισμός απώλειας θολότητας χυμών	20
Κεφάλαιο 2 : Η διεργασία της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης	23
2.1 Μέθοδοι επεξεργασίας τροφίμων	23
2.1.1 Θερμικές μέθοδοι	23
2.1.2 Επίδραση των θερμικών μεθόδων στην ποιότητα των τροφίμων	24
2.1.3 Μη θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας.....	25
2.2 Η διεργασία της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης	27
2.2.1 Εισαγωγή.....	27
2.2.2 Μηχανολογικός εξοπλισμός της ΥΥΠ.....	28
2.3 Επίδραση της ΥΥΠ στην ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων.....	32
2.3.1 Αδιαβατική θέρμανση: Θερμοδυναμική θεώρηση	32
2.3.2 Επίδραση της ΥΥΠ στους μικροοργανισμούς	34

2.3.3 Επίδραση της ΥΥΠ στα συστατικά, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη θρεπτική αξία των τροφίμων	36
2.3.4 Άλλες εφαρμογές και νέα προϊόντα	38
Κεφάλαιο 3 : Επίδραση της ΥΥΠ στα ένζυμα.....	41
3.1 Επίδραση της πίεσης στις βιοχημικές αντιδράσεις: Θερμοδυναμική θεώρηση	41
3.2 Επίδραση της πίεσης στις πρωτεΐνες	41
3.3 Επίδραση της ΥΥΠ στα ένζυμα.....	43
3.3.1 Κινητική ενζυμικής απενεργοποίησης.....	44
3.4 Επίδραση της ΥΥΠ σε ένζυμα που σχετίζονται με την ποιότητα των τροφίμων	49
3.4.1 Πολυφαινολική οξειδάση	49
3.4.2 Περοξειδάση	50
3.4.3 Πολυγαλακτουρονάση.....	51
3.4.4 Λιποξυγενάση	51
3.4.5 Πηκτινομεθυλεστεράση (PME).....	52
Κεφάλαιο 4 : Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών και ενζύμων	61
4.1 Εισαγωγή.....	61
4.2 Προκαταρκτικές προετοιμασίες και σχεδιασμός	62
4.2.1 Επιλογή της πηγής ενζύμων	62
4.2.2 Ιδιότητες και ευαισθησίες της πρωτεΐνης.....	63
4.2.3 Χρήση της καθαρής πρωτεΐνης.....	63
4.2.4 Πρόσθετες ουσίες.....	63
4.2.5 Ο πίνακας προόδου του καθαρισμού	64
4.3 Αρχικά στάδια καθαρισμού	65
4.3.1 Καταβύθιση πρωτεϊνών.....	65
4.3.2 Συμπύκνωση πρωτεϊνικών διαλυμάτων και αφαίρεση διαλυτών συστατικών	68
4.4 Χρωματογραφικές μέθοδοι	73
4.4.1 Χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής	73
4.4.2 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης.....	76
4.5 Μέθοδοι μέτρησης και προσδιορισμού καθαρότητας.....	80
4.5.1 Ηλεκτροφόρηση πήγματος.....	80

4.5.2 Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεΐνης	82
Κεφάλαιο 5 : Μελέτη της δομής των πρωτεϊνών με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού	85
5.1 Εισαγωγή.....	85
5.2 Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού	86
5.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	86
5.2.2 Όργανα του κυκλικού διχρωισμού	88
5.2.3 Πληροφορίες που λαμβάνονται από τον CD σχετικά με τη δομή των πρωτεϊνών.....	89
5.2.4 Προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων για δομική μελέτη με κυκλικό διχρωισμό	92
5.2.5 Μελέτη της μεταβολής της δομής ηκτηνομεθυλεστεράσης από φλοιό πορτοκαλιού <i>Valencia</i> μετά από επεξεργασία με ΥΥΠ	93
Κεφάλαιο 6 : Υλικά και μέθοδοι	99
6.1 Εισαγωγή.....	99
6.2 Απομόνωση και καθαρισμός PME από φλοιό πορτοκαλιού <i>Navel</i>	100
6.2.1 Υλικά και μέθοδοι καθαρισμού και απομόνωσης	100
6.2.2 Χρωματογραφικοί διαχωρισμοί	101
6.2.3 Ηλεκτροφόρηση.....	103
6.3 Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού κινητικών σταθερών της PME	105
6.4 Πειραματική διαδικασία θερμικής απενεργοποίησης PME και απενεργοποίησης με ΥΥΠ	105
6.4.1 Πειραματική διαδικασία θερμικής απενεργοποίησης.....	105
6.4.2 Περιγραφή της μονάδας ΥΥΠ	105
6.4.3 Πειραματική διαδικασία απενεργοποίησης με ΥΥΠ	107
6.5 Μέτρηση ενεργότητας PME (PME assay).....	108
6.6 Μέτρηση συνολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	110
Κεφάλαιο 7 : Επεξεργασία μετρήσεων και αποτελέσματα	113
7.1 Εισαγωγή.....	113
7.2 Καθαρισμός PME φλοιού πορτοκαλιού <i>Navel</i>	113
7.2.1 Εκχύλιση.....	113
7.2.2 Καταβύθιση και διήθηση.....	114
7.2.3 Υπερδιήθηση.....	114

7.2.4 Χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής.....	114
7.2.5 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης.....	115
7.2.6 Ηλεκτροφόρηση.....	118
7.3 Προσδιορισμός κινητικών σταθερών για την αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος.....	119
7.4 Θερμική απενεργοποίηση ΠΜΕ	122
7.4.1 Απενεργοποίηση της ΠΜΕ σε συνάρτηση με το χρόνο	123
7.4.2 Υπολογισμός ενέργειας ενεργοποίησης.....	125
7.4.3 Υπολογισμός της σταθεράς Z_T για τη θερμική επεξεργασία της ΠΜΕ.....	127
7.5 Απενεργοποίηση ΠΜΕ συνδυάζοντας θερμότητα και ΥΥΠ.....	128
7.5.1 Επεξεργασία ΠΜΕ με ΥΥΠ στους 45°C.....	129
7.5.2 Επεξεργασία ΠΜΕ με ΥΥΠ στους 50°C.....	131
7.5.3 Επεξεργασία ΠΜΕ με ΥΥΠ στους 55°C.....	134
7.5.4 Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για σταθερή πίεση	137
7.5.5 Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από την πίεση σε σταθερή θερμοκρασία.....	140
7.5.6 Εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού από τη θερμοκρασία και την πίεση	144
7.5.7 Σύγκριση κινητικής απενεργοποίησης με ΥΥΠ της ΠΜΕ από πορτοκάλι <i>Navel</i> με ΠΜΕ από πορτοκάλι <i>Valencia</i>	146
7.5.8 Προσδιορισμός των παραμέτρων των πολυπαραμετρικών κινητικών μοντέλων.....	148
Κεφάλαιο 8 : Συμπεράσματα.....	155
Βιβλιογραφία	159

Κεφάλαιο 1 : Πηκτίνη και πηκτινολυτικά ένζυμα

1.1 Πηκτίνη

1.1.1 Πηκτινικές ουσίες

Με τον όρο πηκτινικές ουσίες χαρακτηρίζεται μία ευρεία ομάδα ομο- και ετεροπολυσακχαριτών που συναντώνται στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Οι ουσίες αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των φυτών καθώς συμμετέχουν σε διεργασίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση συμβάλλοντας στην σκληρότητα και ανθεκτικότητα των φυτικών ιστών. Ως εκ τούτου προσδίδουν στα φυτά προστασία έναντι παθογόνων παραγόντων και τραυματισμών. Ως συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και λόγω της ανιοντικής τους φύσης θεωρείται ότι λαμβάνουν μέρος στην μεταφορά ιόντων διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος. Ακόμη, καθορίζουν το πορώδες του τοιχώματος και συνεπώς τη διαπερατότητά του σε ένζυμα και άλλα μεγαλομόρια [1].

Οι πηκτινικές ουσίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην υφή των φρούτων κατά την ανάπτυξη, την ωρίμανση και την αποθήκευση. Το ποσό και η δομή των πηκτινικών πολυσακχαριτών επηρεάζει τις διαδικασίες αυτές και εξαρτάται από την παρουσία ενζύμων που τροποποιούν τη δομή των πηκτινών [1].

1.1.2 Ταξινόμηση και δομή πηκτινικών ουσιών

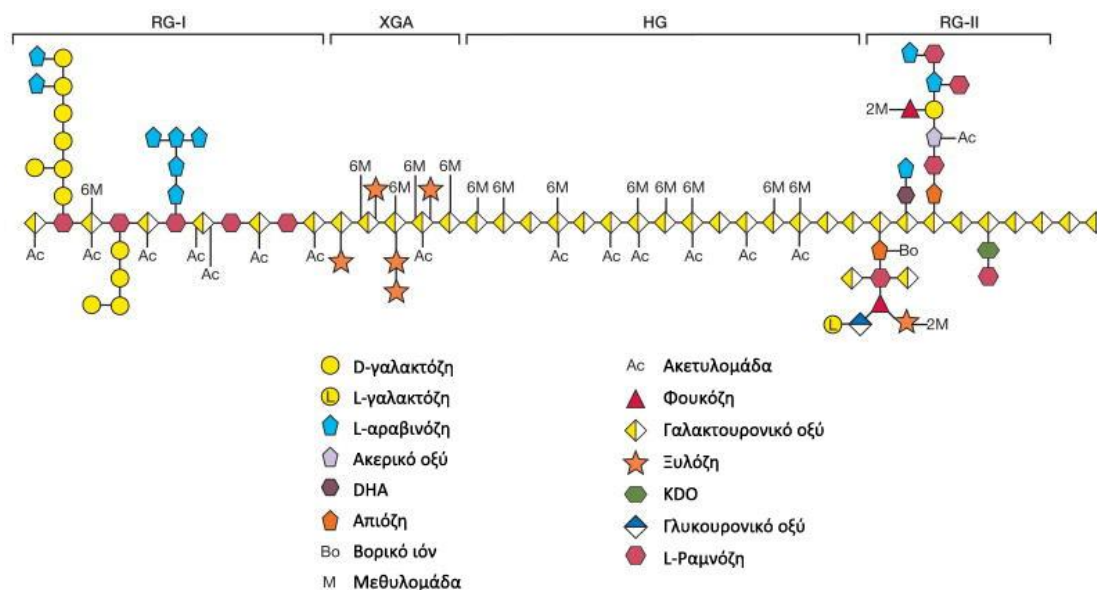
Ως πηκτινικές ουσίες χαρακτηρίζονται οι παρακάτω πολυσακχαρίτες:

- **Γραμμική ομογαλακτουρονάνη (HG):** αποτελείται από μονομερή D-γαλακτουρονικού οξέος ενωμένα με β -(1 \rightarrow 4) γλυκοζιτικό δεσμό. Οι καρβοξυλικές ομάδες των μονομερών εστεροποιούνται σε διαφορετικό βαθμό από μεθανόλη. Ο βαθμός εστεροποίησης (DM, degree of methyl esterification) συνήθως εκφράζεται ως mol μεθανόλης παρόντα σε 100 mol γαλακτουρονικού οξέος. Με βάση το βαθμό αυτό οι πηκτίνες διακρίνονται σε υψηλού βαθμού εστεροποίησης (DM>50) και χαμηλού βαθμού εστεροποίησης (DM<50). Η θέση των εστεροποιημένων μονάδων γαλακτουρονικού οξέος της ομογαλακτουρονάνης διαφέρει ανάλογα με την

προέλευση της πηκτίνης. Η κατανομή κατά μήκος του μορίου μπορεί να είναι στατιστική ή μπορεί να συναντώνται εναλλασσόμενες περιοχές (blocks) εστεροποιημένου οξέος ή όχι. Η American Chemical Society [2] έχει ταξινομήσει τις ομογαλακτουρονάνες σε πηκτικά οξέα, όταν περιέχουν αμελητέο ποσοστό μεθυλεστέρων, ή καθόλου μεθυλεστέρες, και σε πηκτινικά οξέα όταν το ποσοστό μεθυλεστεροποίησης γίνεται σημαντικό. [1]

- **Γραμμικά διακλαδισμένη ξυλογαλακτουρονάνη (XG)** με πλευρικές μονάδες ξυλοπυρανόζης και η απιογαλακτουρονάνη που φέρει πλευρικές αλυσίδες με μονάδες ενός ή δύο μορίων απιόζης [1].
- **Έντονα διακλαδισμένη γαλακτουρονάνη (ή ραμνογαλακτουρονάνη II, RG-II)**. Αποτελείται από μία κύρια αλυσίδα περίπου 9 μονάδων γαλακτουρονικού οξέος τα οποία φέρουν τέσσερις πλευρικές αλυσίδες που αποτελούνται από σπάνια σάκχαρα (π.χ. απιόζη, ακερικό οξύ, KDO και DHA). Η δομή αυτή χρησιμοποιείται στην σύνδεση δύο μορίων πηκτίνης με το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα [1].
- **Ραμνογαλακτουρονάνη (RG-I)**: διαθέτει στην κύρια αλυσίδα της εναλλασσόμενες μονάδες L-ραμνόζης συνδεδεμένες με α -(1 \rightarrow 2) γλυκοζιτικό δεσμό και μονάδες D-γαλακτουρονοζυλουρινικού οξέος συνδεδεμένες με α -(1 \rightarrow 4) γλυκοζιτικό δεσμό. Το πολυμερές φέρει πλευρικές διακλαδώσεις στο O-4 των μονάδων ραμνόζης οι οποίες αποτελούνται από ουδέτερα σάκχαρα και ποικίλλουν στο μήκος. Οι καρβοξυλικές ομάδες, όπως και στην ομογαλακτουρονάνη, μπορεί να είναι μεθυλιωμένες ή ακετυλιωμένες σε ποσοστό που ποικίλλει ανάλογα με την προέλευση της πηκτίνης.
- **Πολυμερείς πλευρικές αλυσίδες της πηκτίνης**, συνήθως αραβινάνες, γαλακτάνες και αραβινογαλακτάνες. Οι αραβινάνες είναι διακλαδισμένες ομογλυκάνες που αποτελούνται από κύρια αλυσίδα μονάδων αραβινόζης ενωμένες με α -L-(1 \rightarrow 5) γλυκοζιτικό δεσμό και μπορεί να έχουν μοριακό βάρος μέχρι και 10 kDa. Οι γαλακτάνες και οι αραβινογαλακτάνες είναι ομο και ετεροπολυμερή, αντίστοιχα, της γαλακτόζης και της αραβινόζης [1].

Ως πηκτίνη χαρακτηρίζονται γενικά πολυμερικά μόρια που είναι συνδυασμός των δομών που περιγράφονται παραπάνω. Τα πολυμερικά μόρια αυτά αποτελούνται από γραμμικά τμήματα (smooth regions) και από έντονα διακλαδισμένα τμήματα (hairy regions). Τα γραμμικά τμήματα αποτελούνται κυρίως από ομογαλακτουρονάνη και ξυλογαλακτουρονάνη, ενώ τα διακλαδισμένα αποτελούνται από ραμνογαλακτουρονάνη I και II με πλευρικές αλυσίδες αραβινάνης, γαλακτάνης ή αραβινογαλακτάνης [3].



Σχήμα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση της πηκτίνης όπου φαίνονται τα τρία βασικά είδη πηκτινικών πολυσακχαριτών: ραμνογαλακτουρονάνη I (RG-I, αριστερά) και ραμνογαλακτουρονάνη II (RG-II, δεξιά) εκατέρωθεν μιας αλυσίδας ομογαλακτουρονάνης (HG). Απεικονίζεται επίσης μια περιοχή ξυλογαλακτουρονάνης (XGA) ανάμεσα στις περιοχές RG-I και HG. Οι δομές XGA και HG αποτελούν το γραμμικό κομμάτι (smooth region) ενώ οι έντονα διακλαδισμένες περιοχές RG-I και RG-II το διακλαδισμένο (hairy region). Να σημειωθεί ότι το παραπάνω σχήμα δεν παρουσιάζεται υπό κλίμακα αλλά είναι απλώς ενδεικτικό της σύνθεσης της πηκτίνης. (Πηγή: [4])

Η πηκτίνη χρησιμοποιείται ευρέως και στην τεχνολογία τροφίμων ως πρόσθετο συστατικό με σκοπό να αυξήσει το ιξώδες των τροφίμων και να τα σταθεροποιήσει. Οι πηκτίνες που συναντώνται στο εμπόριο προέρχονται από παραπροϊόντα αγροτικών διεργασιών, όπως φλοιούς εσπεριδοειδών και οπό μήλων, και περιέχουν άνω του 65% κατά βάρος γαλακτουρονικό οξύ. Το μεγάλο ποσοστό αυτό οφείλεται στη φύση των μεθόδων απομόνωσης της πηκτίνης, οι οποίες απομακρύνουν το μεγαλύτερο μέρος των ουδέτερων πλευρικών αλυσίδων. Οι πηκτίνες εκχυλίζονται υπό όξινες συνθήκες από τη φυτική πρώτη ύλη, ακολούθως καταβυθίζονται με αλκοόλη και κατεργάζονται με όξινες αλκοόλες για την απομάκρυνση αλάτων. Οι ακριβείς συνθήκες της διεργασίας (pH, χρόνος, θερμοκρασία) καθορίζουν στο τελικό προϊόν το μοριακό βάρος, το ποσοστό πλευρικών αλυσίδων και το βαθμό εστεροποίησης [1].

1.1.1 Φυσικές και χημικές ιδιότητες της πηκτίνης

1.1.1.i Φυσικές ιδιότητες

Η πηκτίνη είναι διαλυτή στο καθαρό νερό. Τα άλατά των πηκτινικών και πηκτικών οξέων με μονοσθενή κατιόντα (αλκάλια) είναι συνήθως διαλυτά στο νερό, ενώ τα άλατα με δι- και τρισθενή ιόντα είναι αδιάλυτα. Όπως τα διαλύματα των περισσότερων πολυσακχαριτών, έτσι και τα διαλύματα των πηκτινών εμφανίζουν

μη νευτωνική, και συγκεκριμένα ψευδοπλαστική, ρεολογική συμπεριφορά. Το ιξώδες των διαλυμάτων αυτών (όπως και η διαλυτότητα της πηκτίνης) εξαρτάται από τη συγκέντρωση και το pH του εκάστοτε διαλύματος, τον βαθμό μεθυλίωσης, το μοριακό βάρος καθώς και την παρουσία ιόντων. Προσθήκη μονοσθενών κατιόντων σε πηκτινικό διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του ιξώδους ενώ προσθήκη δι- και τρισθενών ιόντων επιφέρει αύξηση του ιξώδους [2].

Ως γραμμικό πολυανιόν (πολυκαρβοξυλικό πολυμερές) τα μονοσθενή κατιοντικά άλατα της πηκτίνης εμφανίζουν έντονο ιονισμό όταν βρίσκονται εν διαλύσει. Οι ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των ανιοντικών ομάδων κατά μήκος των πολυμερικών αλυσίδων τις διατηρούν ξεδιπλωμένες, γεγονός στο οποίο οφείλονται οι ρεολογικές ιδιότητες των πηκτινών [2].

Σημαντική ιδιότητα για τη βιομηχανία τροφίμων αποτελεί η ικανότητα των πηκτινών να σχηματίζουν εφαπλώσιμα πήγματα σε pH κοντά στο 3 και παρουσία ενός μέσου αφυδάτωσης (π.χ. ζάχαρη) και ιόντων ασβεστίου. Την ικανότητα ζελοποίησης και την τελική σταθερότητα του πηγματος επηρεάζουν παράγοντες όπως η συγκέντρωση πηκτίνης, η θερμοκρασία, το pH, η συγκέντρωση κατιόντων και άλλων διαλυμένων συστατικών (όπως π.χ. σάκχαρα) [2].

1.1.1.ii Χημικές ιδιότητες

Σε υδατικά διαλύματα οι πηκτίνες υφίστανται αυθόρμητα αποπολυμερισμό και απομεθυλίωση, με pH ισορροπίας γύρω στο 4. Ο ρυθμός και των δύο αντιδράσεων είναι αντιστρόφως ανάλογος της συγκέντρωσης άλλων συστατικών στο διάλυμα. Ο αποπολυμερισμός προχωρά με μηχανισμό όξινης καταλυτικής υδρόλυσης των γλυκοζιτικών δεσμών ενώ η αποεστεροποίηση με μηχανισμό όξινης ή βασικής υδρόλυσης των εστερικών δεσμών [2].

Σε pH 5-6 οι αλυσίδες της πηκτίνης είναι σταθερές παρά μόνο σε θερμοκρασία δωματίου. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, οι αλυσίδες υφίστανται σχάση με μηχανισμό β-απόσπασης ενώ παράλληλα προχωρά και η αντίδραση απομεθυλίωσης σε μεθυλιωμένους μονοσακχαρίτες. Σε pH άνω του 6 οι αντιδράσεις αυτές είναι ταχύτερες ακόμη και σε θερμοκρασία δωματίου και ο ρυθμός τους αυξάνεται αυξανόμενου του pH. Οι παραπάνω ιδιότητες είναι πολύ σημαντικές στην παρασκευή αναλυτικών διαλυμάτων για τη μέτρηση ενεργότητας πηκτινικών ενζύμων [2].

1.1.2 Η πηκτίνη στα φρούτα

Τα φρούτα απαρτίζονται από τρεις βασικές δομές: τον φλοιό, τον οπό (flesh) και τους σπόρους. Τα κύτταρα του οπού συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω ενός άκαμπτου και ανθεκτικού κυτταρικού τοιχώματος το οποίο μακροσκοπικά δίνει συγκεκριμένο σχήμα στο φρούτο και του προσδίδει ανθεκτικότητα. Το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων αυτών αποτελείται από σύνθετους πολυσακχαρίτες, κυρίως πηκτίνη, άμυλο, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη[5].

Πίνακας 1.1: Επί τοις εκατό σύσταση διαφόρων φρούτων σε πηκτίνη καθώς και ποσοστό μεθυλίωσης αυτής (Πηγή: [5])

Φρούτο	Πηκτίνη % κατά βάρος (νωπό)	% ποσοστό μεθυλίωσης
Μήλο	0.7-0.8	75-92
Μπανάνα	0.5-0.7	50-60
Κεράσι	0.2-0.3	40
Σταφύλι	0.1-0.4	50-65
Λεμόνι	2.0	65-70
Μάνγκο	0.3-0.4	78-85
Πορτοκάλι	0.6-0.9	65-70
Ροδάκινο	0.3-0.4	60-80
Αχλάδι	0.7-0.9	50-70
Σμέουρο	0.4-0.5	20
Φράουλα	0.4-0.5	20-60

1.2 Πηκτινολυτικά ένζυμα

1.2.1 Ταξινόμηση των πηκτινολυτικών ενζύμων

Στα πηκτινολυτικά ένζυμα ανήκουν τα ένζυμα τα οποία αλληλεπιδρούν με διάφορους τρόπους με τους πηκτινικούς πολυσακχαρίτες (με εξαίρεση τις

πλευρικές αλυσίδες αραβινάνης και γαλακτάνης) καταλύοντας αντιδράσεις αποπολυμερισμού των πολυσακχαριτών ή αποεστεροποίησης μεθυλο- ή αιθυλομάδων εστεροποιημένων στις καρβοξυλικές ομάδες των κύριων αλυσίδων.

Τα πηκτινολυτικά ένζυμα μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις βασικές κατηγορίες [6]:

1. **Υδρολάσες:** Τα ένζυμα αυτά διασπούν με υδρόλυση τους γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ μονάδων μονοσακχαριτών, είναι δηλαδή ένζυμα αποπολυμερισμού των πολυσακχαριτών. Το κυριότερο ένζυμο της κατηγορίας αυτής είναι η πολυγαλακτουρονάση (PG) η οποία υδρολύει α-(1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ μονάδων γαλακτουρονικού οξέος. Η πολυγαλακτουρονάση διακρίνεται σε ενδο- και εξω-πολυγαλακτουρονάση, όπου η μεν πρώτη υδρολύει την πολυγαλακτουρονάνη σε τυχαίες θέσεις, η δε δεύτερη δρα στο μη αναγωγικό άκρο του πολυσακχαρίτη απελευθερώνοντας μονομερή γαλακτουρονικού οξέος.
2. **Λυάσες:** οι λυάσες αποπολυμερίζουν την κύρια αλυσίδα πολυγαλακτουρονάνης απελευθερώνοντας 4,5-ακόρεστες ολιγογαλακτουρονάνες. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις πηκτικές λυάσες (pectate lyases, PL), οι οποίες δρουν σε πολυμερείς αλυσίδες γαλακτουρονικού οξέος απελευθερώνοντας ακόρεστες ολιγογαλακτουρονάνες, και τις πηκτινικές λυάσες (pectin lyases, PNL) οι οποίες δρουν σε πολυμερείς αλυσίδες γαλακτουρονικού οξέος εστεροποιημένων με μεθανόλη και απελευθερώνουν μεθυλιωμένες 4,5-ακόρεστες ολιγογαλακτουρονάνες.
3. **Εστεράσες:** οι εστεράσες υδρολύουν τις εστερομάδες της κύριας αλυσίδας της πηκτίνης. Έχουν περιγραφεί τρία είδη εστερασών: οι πηκτινομεθυλεστεράσες (PME) οι οποίες υδρολύουν τους μεθυλεστερικούς δεσμούς από το O6 των μονάδων γαλακτουρονικού οξέος στο τμήμα ομογαλακτουρονάνης, οι πηκτινακετυλεστεράσες (PAE) και οι ακετυλεστεράσες της ραμνογαλακτουρονάνης, οι οποίες υδρολύουν τον εστερικό δεσμό με ακετυλομάδες στα O3 και/ή O4 των μονάδων γαλακτουρονικού οξέος είτε στο τμήμα ομογαλακτουρονάνης είτε ραμνογαλακτουρονάνης αντίστοιχα.

Άλλη ταξινόμηση των πηκτινολυτικών ενζύμων μπορεί να γίνει με βάση το αν δρουν στα γραμμικά τμήματα της κύριας αλυσίδας ομογαλακτουρονάνης ή στις διακλαδώσεις των πηκτινικών πολυσακχαριτών [6].

Πίνακας 1.2: Κατηγοριοποίηση των πηκτινολυτικών ενζύμων (Πηγή: [3])

Είδη πηκτινολυτικών ενζύμων	Υπόστρωμα	Μηχανισμός δράσης	Προϊόντα
1) Εστεράσες			
• PME	πηκτίνη	υδρόλυση	πηκτ. οξέα + μεθανόλη
• PAE	πηκτίνη	υδρόλυση	πηκτ. Οξέα + αιθανόλη
2) Υδρολάσες			
• Ενδο PG	πηκτινικά οξέα	υδρόλυση	ολιγογαλακτουρονάνες
• Εξω PG	πηκτινικά οξέα	υδρόλυση	μονογαλακτουρονάνες
3) Λυάσες			
• Ενδο PL	πηκτινικά οξέα	απόσπαση	ακόρεστες ολιγογαλακτουρονάνες
• Εξω PL	πηκτινικά οξέα	απόσπαση	ακόρεστες διγαλακτουρονάνες
• Ενδο PNL	πηκτίνη	απόσπαση	ακόρεστες μεθυλο-ολιγογαλακτουρονάνες

1.2.2 Ρόλος των πηκτινολυτικών ενζύμων στην ωρίμανση των φρούτων

Η ωρίμανση των φρούτων είναι μία δυναμική διαδικασία κατά την οποία τα φρούτα υφίστανται χημικές και φυσικές μεταβολές, όπως αλλαγή της υφής, του χρώματος, και της οξύτητας, μεταβολές δηλαδή που γίνονται έντονα αντιληπτές από τους καταναλωτές και συνεισφέρουν στο να καταστήσουν τα φρούτα ελκυστικά. Η ωρίμανση συνοδεύεται και από αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως στην οξύτητα, τη γλυκύτητα και το άρωμα [7].

Εκτός από τις επιθυμητές φυσικοχημικές μεταβολές που επιφέρει η ωρίμανση, κάποιες φορές συνοδεύεται από ανεπιθύμητες όπως τη δημιουργία οσμών (off-odors) και γεύσεων (off-flavors) καθώς και το υπερβολικό μαλάκωμα του φυτικού ιστού του φρούτου. Το μαλάκωμα αυτό αυξάνει τη ροή χυμών προς το εξωτερικό του φρούτου προσφέροντας θρεπτική ύλη για μικροοργανισμούς που το αλλοιώνουν και το καταστρέφουν, οδηγώντας σε μεγάλες μετασυγκομιδικές απώλειες[7].

Το μαλάκωμα που υφίστανται τα φρούτα κατά την ωρίμανση συνδέεται άμεσα με τη δράση των πηκτινολυτικών ενζύμων πάνω στους δομικούς πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το κυτταρικό τοίχωμα που προσφέρει σταθερότητα και ακαμψία στους φυτικούς ιστούς αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, άμυλο και πηκτίνη. Αυτοί οι πολυσακχαρίτες υφίστανται τις κυριότερες μεταβολές κατά την ωρίμανση [7].

Η πηκτίνη αποτελεί το 50% περίπου των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος και κατά την ωρίμανση υφίσταται αποπολυμερισμό και διαλυτοποίηση με αποτέλεσμα το μαλάκωμα του φυτικού ιστού. Τα βασικά ένζυμα που συνεισφέρουν στη διαδικασία είναι η πολυγαλακτουρονάνη, η πηκτική λυάση και η πηκτινομεθυλεστεράση. Αν και η PME δεν παίζει άμεσο ρόλο στη σχάση των πολυσακχαριτών, καθορίζει κατά πόσο οι PG, οι οποίες δρουν σε απομεθυλιωμένη πολυγαλακτουρονάνη, έχουν πρόσβαση στην κύρια αλυσίδα της πηκτίνης. Οι Eriksson et. Al [8] διαπίστωσαν ότι μειωμένη έκφραση γονιδίου PME σε μεταλλαγμένα στελέχη τομάτας συνεισφέρει θετικά στην διατήρηση της ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος. Αυτό δεν είναι πάντοτε απόλυτο καθώς έχει διαπιστωθεί σε φράουλες ότι η ωρίμανση προχωρά κανονικά ακόμη και με χαμηλή ή καθόλου έκφραση του γονιδίου της PME, φανερώνοντας τον κυρίαρχο ρόλο της PG στην ωρίμανση.

Η πηκτική λυάση παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην υφή των φρούτων. Σε πειράματα παρεμπόδισης του γονιδίου της PL σε φράουλες [9] η σταθερότητα του κυτταρικού τοιχώματος εμφανίστηκε αυξημένη και το μαλάκωμα μετά τη συγκομιδή μειωμένο, χωρίς ωστόσο να συνοδεύεται από απώλεια βάρους ή χρώματος του προϊόντος. Αυτό καταδεικνύει τη σημασία της PL στην ωρίμανση των φρούτων.

1.2.3 Χρήση των πηκτινολυτικών ενζύμων στην τεχνολογία τροφίμων

Ως ένζυμα που αποδομούν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων, τα πηκτινολυτικά ένζυμα σε συνδυασμό με κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες βρίσκουν εφαρμογή σε διεργασίες που απαιτείται χαλάρωση ή αποδόμηση φυτικών ιστών. Η μεγαλύτερη εφαρμογή τους στην τεχνολογία τροφίμων είναι στην παραγωγή χυμών φρούτων και λαχανικών. Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία φρουτοχυμών μόλις από τη δεκαετία του 1930 και συμμετέχουν τόσο στη διαύγαση των χυμών όσο και στο να διευκολύνουν την εξαγωγή τους. Παραδείγματα φρούτων είναι τα μήλα, τα αχλάδια, τα σταφύλια κ.α.

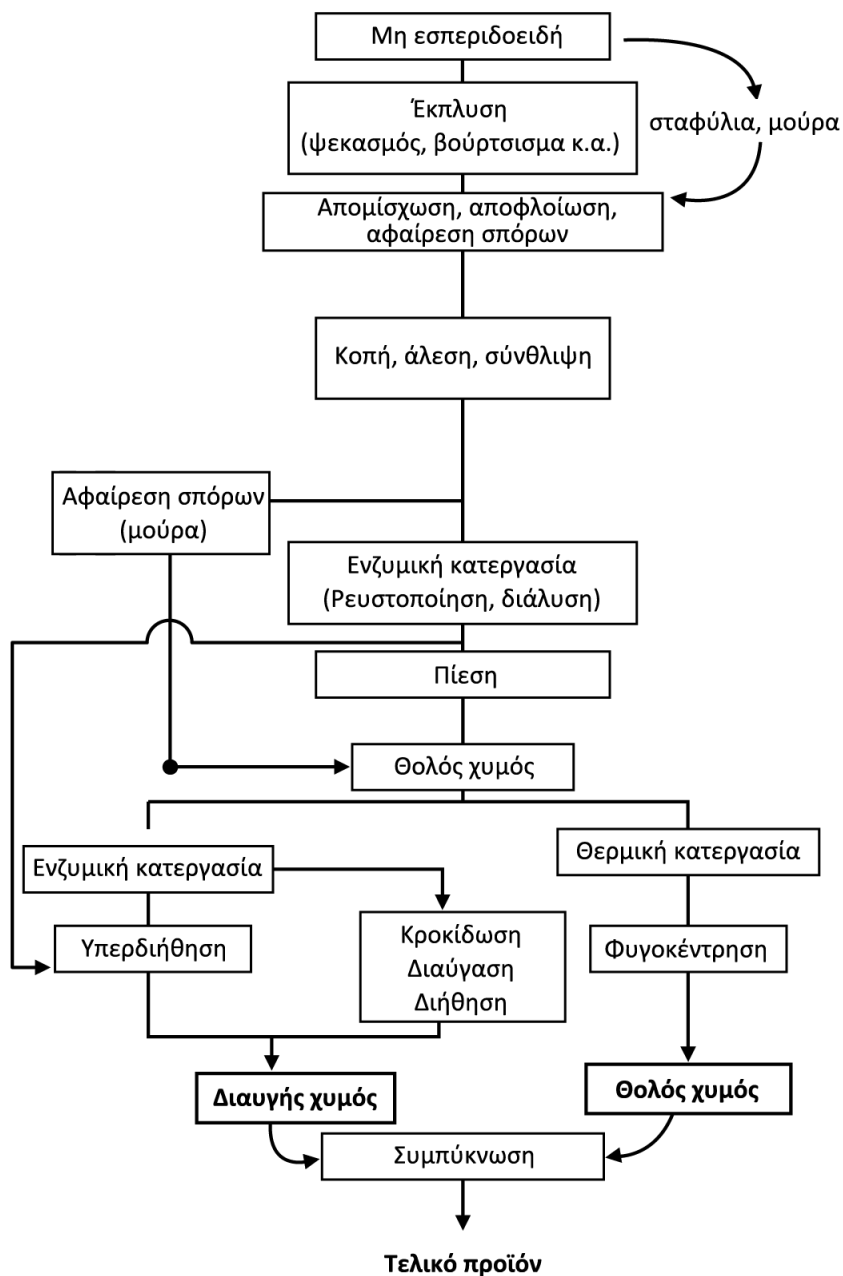
Πίνακας 1.3: Παραδείγματα χρήσης πηκτινολυτικών ενζύμων στην επεξεργασία φρούτων (Πηγή: [5])

Ενζυμική διεργασία	παράδειγμα εφαρμογής
διαύγαση χυμών φρούτων	Χυμός μήλου. Αποπηκτινωμένοι χυμοί μπορούν να συμπυκνωθούν χωρίς να σχηματίσουν πήγμα ή θολότητα.
ενζυμική κατεργασία πολτού	Μαλακά φρούτα, κόκκινα σταφύλια, εσπεριδοειδή, μήλα για καλύτερη εξαγωγή χυμού. Κατεργασία ελαιόμαζας, φοινικόκαρπου και σάρκας καρύδας με σκοπό την αποδοτικότερη εξαγωγή ελαίου.
διάλυση (maceration) φρούτων και αποσύνθεση με διαχωρισμό κυττάρων	Παραλαβή βάσεων για χυμούς τύπου νέκταρ και παιδικές τροφές
ρευστοποίηση φρούτων	Παραλαβή προϊόντων με αυξημένη περιεκτικότητα σε διαλυτά στερεά (συνδυασμός πηκτινασών με κυτταρινάσες)

1.2.3.i Παραγωγή μηλοχυμού και χυμών μη-εσπεριδοειδών φρούτων

Η βιομηχανία παραγωγής χυμών από μη εσπεριδοειδή φρούτα και λαχανικά είναι μια βιομηχανία με σημαντικό μέγεθος, αμέσως μετά την βιομηχανία παραγωγής εσπεριδοειδών. Το μεγαλύτερο ποσό φρούτων που επεξεργάζονται είναι γιγαρτόκαρπα φρούτα (μήλα, αχλάδια) και μούρα (berries: φραγκοστάφυλο, βατόμουρο, σμέουρο, φίγγι, φράουλα).

Η εξαγωγή του χυμού, ειδικά στα γιγαρτόκαρπα, ξεκινά αρχικά με κοπή ή άλεση των φρούτων με σκοπό την ελάττωση μεγέθους. Τα κομμάτια που προκύπτουν πρέπει να έχουν κατάλληλο μέγεθος ώστε να είναι εύκολη η ενζυμική κατεργασία αλλά και να είναι αποδοτική η συμπίεση. Μετά την κοπή και την άλεση, τα κομμάτια κατεργάζονται με ενζυμικά παρασκευάσματα πηκτινικών ενζύμων και κυτταρινασών ώστε να χαλαρώσουν τα κυτταρικά τοιχώματα, επιτρέποντας έτσι την καλύτερη ανάκτηση χυμού κατά την πίεση ή τη φυγοκέντρηση [10].



Σχήμα 1.2: Διάγραμμα ροής παραγωγής χυμών από μη εσπεριδοειδή φρούτα (Πηγή: [10])

Στη βιομηχανία παραγωγής μηλοχυμού ιδιαίτερα, τα πηκτινολυτικά ένζυμα χρησιμοποιούνται κατά κόρον. Προτού ο πολτός κατεργαστεί, παραμένει σε δοχείο παραμονής για μικρό χρονικό διάστημα (20min) ώστε η πολυφαινολική οξειδάση να οξειδώσει τις πολυφαινόλες οι οποίες παρεμποδίζουν τη δράση των πηκτινολυτικών ενζύμων στο μετέπειτα στάδιο. Κατόπιν, μείγματα πολυγαλακτουρονάσης, πηκτινομεθυλεστεράσης και κυτταρινάσης αναμειγνύονται με πολτό μήλων σε θερμοκρασία 30°C με χρόνους παραμονής από 15 λεπτά έως 2 ώρες, ανάλογα με την ποσότητα των ενζύμων και την ποσότητα της πρώτης ύλης. Τα ένζυμα διασπών την πηκτίνη και διευκολύνουν την εξαγωγή του χυμού με δύο τρόπους: αφενός μεν χαλαρώνουν τη δομή του οπού διευκολύνοντας τη συμπίεση και αφετέρου μειώνουν το ιξώδες του χυμού καθιστώντας τον πιο ρευστό και εύκολο στη

συλλογή. Η απόδοση σε παραλαβή χυμού κυμαίνεται στο 75% στη βιομηχανία μηλοχυμού χωρίς τη χρήση ενζύμων, ενώ αυξάνεται σε αξιοσημείωτο ποσοστό της τάξης του 91-96%. Εάν μάλιστα ακολουθήσει και δεύτερο στάδιο ενζυμικής κατεργασίας, η απόδοση μπορεί να αγγίξει και το 99% [10].

Τα πηκτινολυτικά ένζυμα βρίσκουν επίσης εφαρμογή στην διαύγαση των χυμών. Το θόλωμα των φρουτοχυμών οφείλεται σε λεπτά διασπαρμένα σωματίδια πρωτεϊνών που περιβάλλονται από πηκτίνη, η οποία τους προσδίδει αρνητικό φορτίο και τα διατηρεί εν αιωρήσει. Ο συνδυασμός δράσης πηκτινομεθυλεστεράσης-πολυγαλακτουρονάνης απομεθοξυλιώνει και αποπολυμερίζει την πηκτίνη, αφήνοντας εκτεθειμένα τμήματα των θετικά φορτισμένων πρωτεϊνών με αποτέλεσμα τα σωματίδια να συσσωματώνονται και τελικά να καταβυθίζονται. Η καταβύθιση μπορεί να επιταχυνθεί με φυγοκέντρηση του αποπηκτινωμένου χυμού. Συνήθως μετά από το στάδιο της ενζυμικής κατεργασίας, οι χυμοί υφίστανται μία συμπύκνωση σε εξατμιστήρες όπου απομακρύνεται περίπου το 10% του όγκου του χυμού. Αυτό γίνεται για να απομακρυνθούν κατάλοιπα μεθανόλης που παράγονται κατά τη δράση της PME [5],[10].

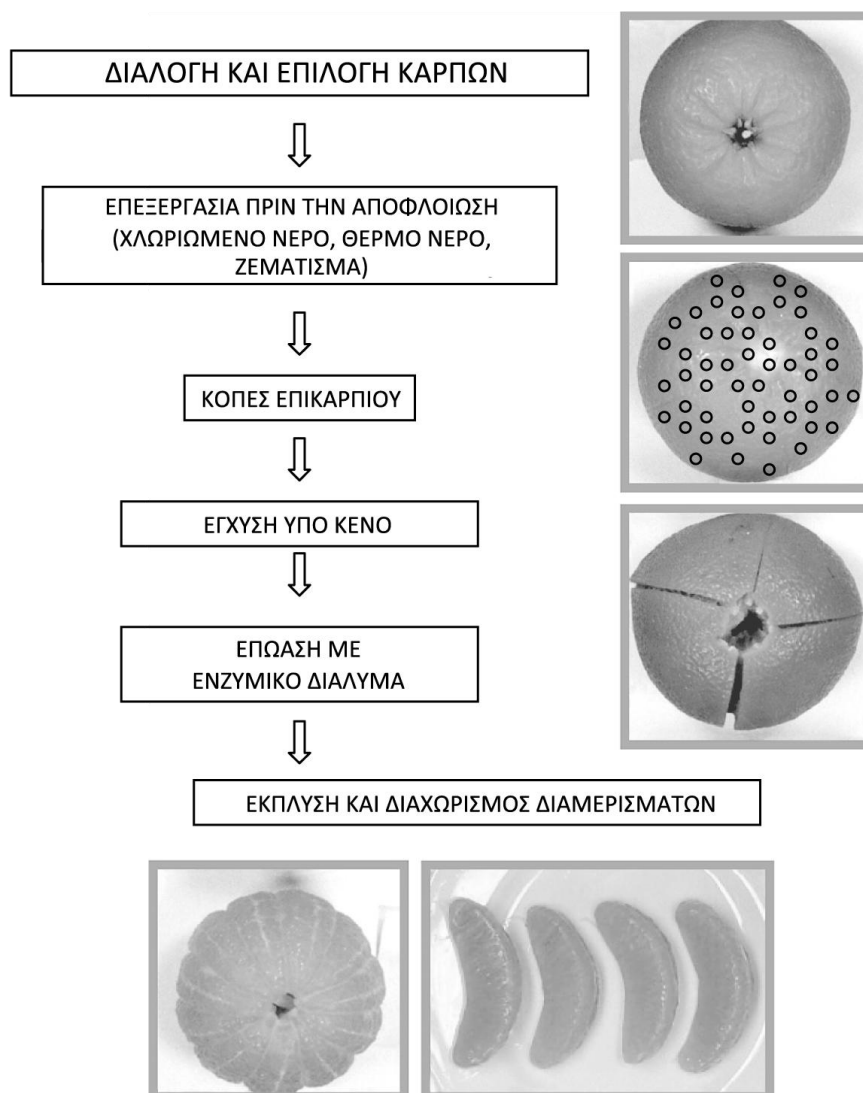
1.2.3.ii Ενζυμική αποφλοίωση εσπεριδοειδών

Η αποφλοίωση των εσπεριδοειδών γίνεται συνήθως αρχικά με κοπή του φλοιού με μηχανικά μέσα και ύστερα διάλυση του μεσοκαρπίου με χημικά μέσα. Η μέθοδος αυτή καταναλώνει μεγάλους όγκους νερού και προκαλεί περιβαλλοντικά προβλήματα, λόγω των καυστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την αποφλοίωση. Εναλλακτικά χρησιμοποιούνται πηκτινολυτικά ένζυμα και κυτταρινάσες για την αποφλοίωση, τα οποία είναι ασφαλή στη χρήση, απαιτούν μικρότερους όγκους νερού και δε δημιουργούν προβλήματα διάθεσης αποβλήτων [11].

Τα βήματα που ακολουθούνται συνοψίζονται στο Σχήμα 1.3. Η επιλογή των φρούτων γίνεται με βάση το σχήμα τους και πλένονται με θερμό χλωριωμένο νερό ή υφίστανται ζεμάτισμα ώστε κατά την κοπή να μην εισέλθουν μικροοργανισμοί στο εσωτερικό. Στη συνέχεια γίνονται εγκοπές στο περικάρπιο ώστε να μπορέσει να έρθει σε επαφή το μεσοκάρπιο με το ενζυμικό διάλυμα. Ο αριθμός και το είδος των κοπών που γίνονται εξαρτάται από τη μορφολογία του φρούτου και από το πάχος του μεσοκαρπίου, το οποίο πρέπει να είναι γνωστό εκ των προτέρων ώστε να εξασφαλιστεί η βέλτιστη αποδόμησή του. Τα φρούτα εμβαπτίζονται στο ενζυμικό διάλυμα και εφαρμόζεται κενό στο δοχείο ώστε να εισέλθουν τα ένζυμα στο μεσοκάρπιο. Ακολουθεί ένας χρόνος επώασης και κατόπιν τα φρούτα εκπλένονται με νερό υπό πίεση ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα φλοιού.

Η προκατεργασία (ζεμάτισμα) και η εμβάπτιση σε ενζυμικό διάλυμα υπό κενό αποτελούν τα βήματα-κλειδιά της διεργασίας. Το ζεμάτισμα μειώνει το ιξώδες της

πηκτίνης και οδηγεί την κυτταρίνη σε μετάπτωση από κρυσταλλική σε άμορφη κατάσταση με αποτέλεσμα τα ένζυμα να μπορούν ευκολότερα να έρθουν σε επαφή με το μεσοκάρπιο. Τα ενζυμικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιούνται προέρχονται από μύκητες (*Aspergillus niger*, *Trichoderma reesi*) και είναι μείγματα πολυγαλακτουρονάσης, πηκτινομεθυλεστεράσης, κυτταρινάσης και γλυκοζιδασών [11].

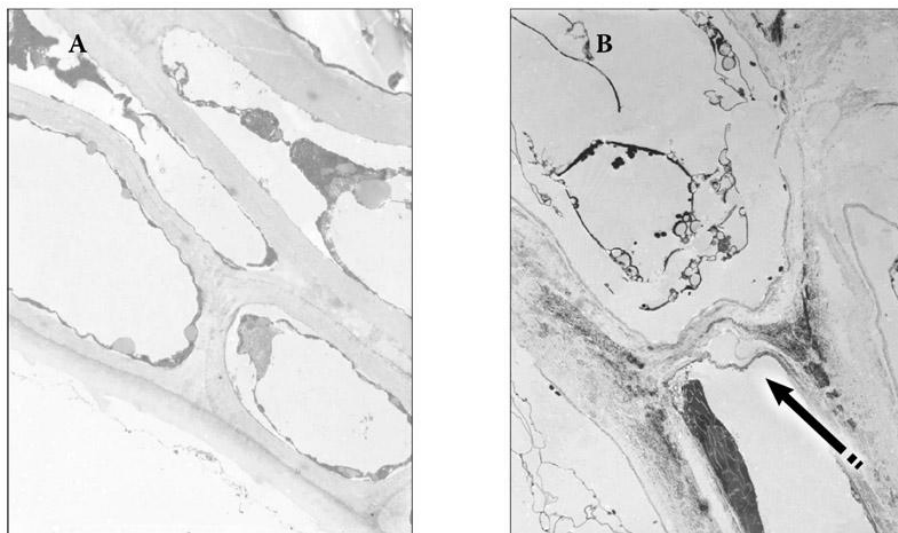


Σχήμα 1.3: Διάγραμμα ροής διεργασίας ενζυμικής αποφλοιώσης εσπεριδοειδών με χρήση πηκτινολυτικών ενζύμων. Το τελικό προϊόν είναι πλήρως απαλλαγμένο από το μεσοκάρπιο. (Πηγή: [11])

1.2.3.iii Οινοποίηση

Τα πηκτινολυτικά ένζυμα βρίσκουν εφαρμογή και στην οινοποίηση, όπου χρησιμοποιούνται για να αποδομήσουν τα κυτταρικά τοιχώματα των πατημένων

σταφυλιών του μούστου και να αυξήσουν την απόδοση σε χυμό. Όπως και στη βιομηχανία χυμών, έτσι και στην οινοποιία απαιτείται διαύγαση του μούστου πριν τη ζύμωση, αν και όχι πλήρης. Η ενζυμική διαύγαση μπορεί να γίνει και μετά τη ζύμωση στο έτοιμο κρασί πριν την εμφιάλωση.



Σχήμα 1.4: Αποδόμηση κυτταρικού τοιχώματος σταφυλιού από εμπορικά διαθέσιμο ενζυμικό παρασκεύασμα (*Eozym Vintage, Agronin, Sprain*). A: δείγμα ελέγχου, B: επεξεργασμένο δείγμα (Πηγή:[12])

1.2.3.ιν Εξαγωγή ελαίων από ελαιούχους σπόρους και καρπούς

Πηκτινολυτικά ένζυμα και κυτταρινάσες χρησιμοποιούνται στη ελαιουργία και στην εξαγωγή κραμβελαίου. Κατά τη μάλαξη της ελαιομάζας πριν την πίεση προστίθενται ενζυμικά παρασκευάσματα τα οποία διευκολύνουν τη ροή του ελαιολάδου και αυξάνουν τις αποδόσεις σε παρθένο ελαιόλαδο. Αντίστοιχα, οι σπόροι της ελαιοκράμβης κατεργάζονται με ένζυμα σε υδατικό διάλυμα πριν την εκχύλιση του ελαίου με οργανικό διαλύτη. Η κατεργασία αυτή οδηγεί σε ανάκτηση ελαίου μέχρι και 80%. Η ποιότητα και η σύσταση του εξαγόμενου ελαίου δεν επηρεάζεται από τη χρήση των ενζύμων [13].

1.3 Πηκτινομεθυλεστεράσες

Οι πηκτινομεθυλεστεράσες ανήκουν στα πηκτινολυτικά ένζυμα και συγκεκριμένα στις πηκτινικές εστεράσες. Δρουν πάνω στο γραμμικό κομμάτι των μορίων της πηκτίνης (γραμμική ομογαλακτουρονάνη) υδρολύοντας τους εστερικούς δεσμούς των μεθοξυ-ομάδων ενωμένων στο O6 των μονάδων γαλακτουρονικού οξέος.

Οι ΠΜΕ έχουν εντοπισθεί και μελετηθεί σε αρκετά ανώτερα φυτά και ειδικότερα στο μήλο, στη μπανάνα, στα σαρκώδη φρούτα, στα εσπεριδοειδή, στα κεράσια, στα σταφύλια, στο μάγκο, στην παπάγια, στο αχλάδι, στο δαμάσκηνο, στα φασόλια, στο κουνουπίδι, στο αγγούρι, στο πράσσο, στο κρεμμύδι, στον αρακά, στο ραπανάκι και στην τομάτα. Συναντώνται σε διάφορους ιστούς και ανήκουν στα ένζυμα του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Αν και ο ακριβής ρόλος τους δεν είναι ξεκάθαρος, το γεγονός ότι απομεθοξυλιώνουν την πηκτίνη οδηγεί στο συμπέρασμα ότι λαμβάνουν μέρος στις τροποποιήσεις της πηκτίνης[6].

Πέρα από τα φυτά, οι ΠΜΕ παράγονται και από διάφορα βακτήρια και μύκητες. Ειδικά τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία τροφίμων προέρχονται από τον *Aspergillus niger*. Οι μικροβιακές ΠΜΕ έχουν διαφορές από τις φυτικές στο ότι απομεθοξυλιώνουν την πηκτίνη με τυχαίο τρόπο και είναι πιο θερμοευαίσθητες[6].

1.3.1 Ρόλος των ΠΜΕ στα φυτά

Γενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν αποκαλύψει μια πληθώρα από λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν οι ΠΜΕ στα φυτά. Γενικά οι περισσότερες από αυτές σχετίζονται με μεταβολές στο κυτταρικό τοίχωμα. Οι βασικότερες περιλαμβάνουν την έκταση και τη σκλήρυνση του κυτταρικού τοιχώματος κατά την ανάπτυξη, τον κυτταρικό διαχωρισμό, τη βλάστηση των σπόρων την επιμήκυνση των ριζών και την ωρίμανση των καρπών. Πρόσφατες μελέτες που διεξήχθησαν σε φυτά του γένους *Arabidopsis* έδειξαν ότι οι ΠΜΕ συμμετέχουν στην δημιουργία του ξυλώδους ιστού πιθανότατα στον πολυμερισμό της λιγνίνης και τη σύζευξή της με την απομεθοξυλιωμένη πηκτίνη. Ακόμη, οι ΠΜΕ φαίνεται να παίζουν ενεργό ρόλο στο σχηματισμό αναπαραγωγικών δομών κατά την ανθοφορία[14].

Συσχέτιση έχει βρεθεί επίσης μεταξύ της αύξησης της έκφρασης γονιδίων ΠΜΕ, την ευαισθησία σε παθογόνους παράγοντες και της καταπόνησης των φυτών, είτε μηχανικά είτε λόγω παθογόνων, γεγονός που αποκαλύπτει τη σημασία των ΠΜΕ στην άμυνα των φυτών. Οι τρεις βασικοί μηχανισμοί άμυνας είναι:

- *Παραγωγή μεθανόλης*: κατά την απομεθοξυλίωση της ομογαλακτουρονάνης παράγεται μεθανόλη η οποία έχει βρεθεί ότι προστατεύει τα φυτά από επιθέσεις κάποιων παρασιτικών εντόμων.
- *Δημιουργία ελεύθερων καρβοξυλικών ομάδων*: η απομεθοξυλίωση της ομογαλακτουρονάνης αφήνει ελεύθερες καρβοξυλικές ομάδες οι οποίες μπορούν να ενωθούν με κατιόντα και να εμποδίσουν ή να επιταχύνουν την ανάπτυξη του φυτού, ανάλογα με τις συνθήκες. Για παράδειγμα βρέθηκε ότι τα ιόντα αλουμινίου αυξάνουν την έκφραση της ΠΜΕ και οι καρβοξυλικές ομάδες της πηκτίνης τα δεσμεύουν. Με τη δέσμευση αυτή τα τοξικά ιόντα αλουμινίου απομακρύνονται από το χλώμα.

- *Παραγωγή ολιγογαλακτουρονικών οξέων:* τη δράση της ΠΜΕ ακολουθεί η πολυγαλακτουρονάση ενώ την μεθοξυλιωμένη πηκτίνη αποπολυμερίζει η λυάση της πηκτίνης. Τα ολιγογαλακτουρονικά οξέα που παράγονται έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούν τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών και η αποδοτικότητα της ενεργοποίησης εξαρτάται από το βαθμό εστεροποίησης. Ακόμη, τα ολιγογαλακτουρονικά οξέα είναι δυνατόν να δράσουν ως παρεμποδιστές σε εξωγενείς ΠΜΕ που προέρχονται από παθογόνους παράγοντες, προστατεύοντας έτσι το φυτό.

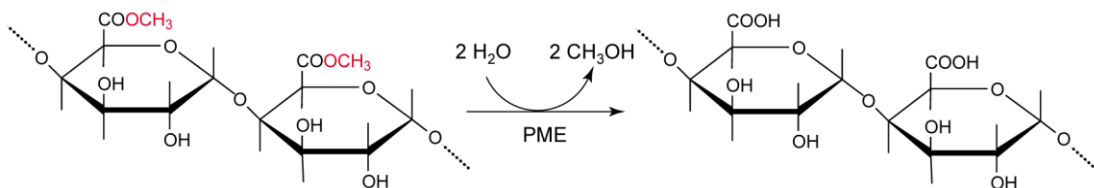
1.3.2 Βιοφυσικές ιδιότητες των ΠΜΕ

Οι πηκτινομεθυλεστεράσες είναι ένζυμα μεσαίου μεγέθους, με μοριακά βάρη που κυμαίνονται μεταξύ 25-54 kDa. Τα ένζυμα αυτά δρουν ως μονομερή. Πολλές ΠΜΕ από ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι γλυκοπρωτεΐνες ενώ έχει αναφερθεί ότι η βακτηριακής προέλευσης ΠΜΕ από τον *Erwinia chrysanthemi* είναι λιποπρωτεΐνη. Τα ισοηλεκτρικά σημεία των ΠΜΕ παρουσιάζουν ευρύ φάσμα τιμών, μεταξύ 3.1 για ΠΜΕ μυκητικής προέλευσης έως 11 για την ΠΜΕ τομάτας. Η σταθερότητα στο pH εξαρτάται από την προέλευση του ενζύμου και είναι, για όλα τα ένζυμα, από pH 1.1 έως pH 10. Η θερμοσταθερότητα είναι μέτρια (40-70°C) και είναι υψηλότερη για ΠΜΕ φυτικής προέλευσης[15].

Έχει βρεθεί ότι οι ΠΜΕ μπορεί να περιέχονται σε διάφορες μορφές (ισοένζυμα) ακόμη και στο ίδιο φυτό. Τα διάφορα ισοένζυμα μπορεί να διαφέρουν στη δραστηριότητα, τη δομή ή το μοριακό βάρος, καθώς και στην ανθεκτικότητα στη θερμική καταστροφή.

1.3.3 Βιοχημικές ιδιότητες της ΠΜΕ

Η δράση της ΠΜΕ πάνω στην πηκτίνη, και συγκεκριμένα στην ομογαλακτουρονάνη, παράγει ως προϊόν μεθανόλη και πηκτινικά οξέα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.5.



Σχήμα 1.5: Αντίδραση που καταλύει η ΠΜΕ πάνω στο πηκτινικό υπόστρωμα (Πηγή:[16])

Γενικά, οι φυτικές ΠΜΕ έχουν βέλτιστο pH δράσης μεταξύ 6 και 8 και συχνά απαιτούν συγκέντρωση 0.1-0.2M NaCl για βέλτιστη κατάλυση. Η δράση οποιασδήποτε ΠΜΕ πάνω σε πηκτίνη υψηλού βαθμού εστεροποίησης δεν οδηγεί σε πλήρη απομεθοξυλίωση, αφήνοντας ένα κατάλοιπο βαθμού μεθυλεστεροποίησης (DM) μεταξύ 20% και 30% που οφείλεται στην ύπαρξη ακετυλομάδων.

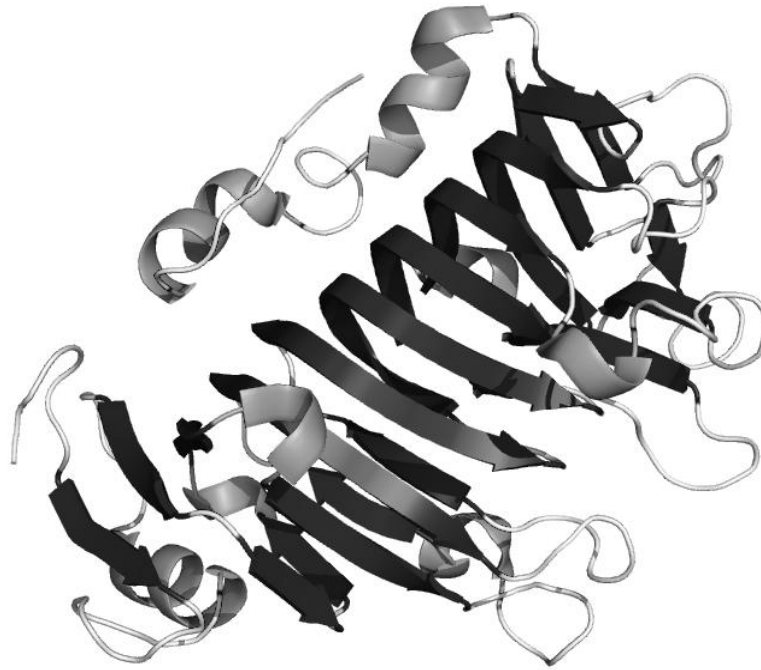
Η βασική ειδοποιός διαφορά στη δράση μεταξύ PME φυτικής και μικροβιακής προέλευσης είναι ότι οι φυτικές PME απομεθοξυλιώνουν την πηκτίνη με τρόπο γραμμικό, δρώντας πάνω σε μία αλυσίδα κάθε φορά, σε αντίθεση με τις μικροβιακές PME που δρουν με τυχαίο τρόπο. Ως αποτέλεσμα, κάθε PME παράγει πηκτικά οξέα με διαφορετικές ιδιότητες.

Η δραστηριότητα της PME εξαρτάται και από εξωγενείς παράγοντες. Για παράδειγμα, υπάρχουν κάποιοι χημικοί παράγοντες (Hg^{2+} , Al^{3+} , NH_4^+ , σάκχαρα, γαλλικό οξύ) που έχει αποδειχθεί ότι παρεμποδίζουν τη δράση κάποιων PME. Πολλές PME παρεμποδίζονται επίσης από την παρουσία των πολυγαλακτουρονικών οξέων που είναι και το προϊόν της δράσης τους. Το χλωριούχο νάτριο και το χλωριούχο κάλιο έχει βρεθεί ότι ενισχύουν την καταλυτική δράση των PME πιθανότατα μειώνοντας την παρεμπόδιση αυτή. Τέλος, πρόσφατα απομονώθηκε μια γλυκοπρωτεΐνη από το ακτινίδιο η οποία έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την PME, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που δεν διασπάται παρά μόνο σε συνθήκες υψηλού pH και ιοντικής ισχύος[15].

1.3.4 Δομή και μηχανισμός δράσης της PME

Η διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης της PME προχώρησε αλματωδώς όταν ελήφθησαν τα πρώτα δεδομένα τρισδιάστατης κρυσταλλογραφίας μικροβιακής και έπειτα φυτικής PME. Η πρώτη PME της οποίας προσδιορίστηκε η τρισδιάστατη δομή ήταν η PME καρότου (*Daucus carota*) (Protein Data Bank (PDB), κωδικός 1GQ8). Η δομή της συγκεκριμένης PME είναι όμοια με αυτή της τομάτας, ενώ εμφανίζει μικρές διαφορές με αυτήν του βακτηρίου *Erwinia chrysanthemi*.

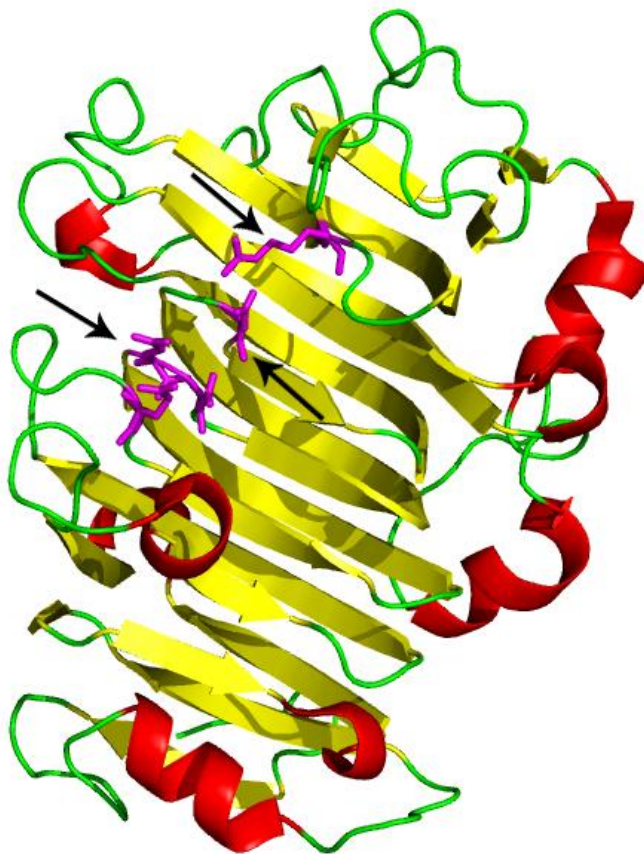
Χαρακτηριστικό της δομής είναι μια μεγάλη σχισμή από παράλληλα β-πτυχωτά φύλλα στο κέντρο του μορίου η οποία φέρει στις εσωτερικές επιφάνειες αρωματικές ομάδες, χαρακτηριστικές δομών που προσδέονται σε υδατάνθρακες. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται από δύο ασπαρτικά (θέσεις D136, D157), δύο γλουταμίνες (Q113, Q135) και μία αργινίνη (R225).



Σχήμα 1.6: απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της ΠΜΕ καρότου (Protein Data Bank (PDB), κωδικός 1GQ8). Είναι εμφανής η κεντρική δομή από παράλληλα β-πτυχωτά φύλλα.



Σχήμα 1.7: όψη της τρισδιάστατης δομής της ΠΜΕ καρότου κατά μήκος της κεντρικής σχισμής όπου προσδέεται στο υπόστρωμα.



Σχήμα 1.8: τρισδιάστατη απεικόνιση της ΠΜΕ καρότου με σημειωμένα τα πέντε αμινοξέα του ενεργού κέντρου (έντονα βέλη).

Σύμφωνα με τη δομή που εξετάστηκε, προτάθηκε μηχανισμός δράσης του ενζύμου. Η αλυσίδα της ομογαλακτουρονάνης συγκρατείται στην σχισμή του ενζύμου μέσω αλληλεπιδράσεων με τις αρωματικές ομάδες. Το ασπαρτικό D157, σταθεροποιούμενο από την αργινίνη R225 με δεσμό υδρογόνου, προσβάλλει πυρηνόφιλα τον εστερικό δεσμό. Το αρνητικά φορτισμένο ενδιάμεσο προϊόν σταθεροποιείται από τις γλουταμίνες και το ασπαρτικό D136, το οποίο δρα ως δότης πρωτονίου και επιτρέπει την απελευθέρωση μεθανόλης. Τέλος, η ισορροπία του ενεργού κέντρου αποκαθίσταται με το ασπαρτικό D136 να αποσπά ένα πρωτόνιο από ένα μόριο νερού[15][14].

1.4 Σημασία της ΠΜΕ στους χυμούς φρούτων

Οι περισσότεροι χυμοί φρούτων, με μερικές εξαιρέσεις (λ.χ. κάποιοι μηλοχυμοί), κυκλοφορούν στο εμπόριο με μια χαρακτηριστική θολότητα που οφείλεται στην παρουσία αιωρήματος σωματιδίων. Η θολότητα αυτή είναι επιθυμητή από τους καταναλωτές επειδή προσδίδει το χαρακτηριστικό άρωμα και την υφή στους χυμούς. Απώλειά της, με παράλληλο σχηματισμό ιζήματος, οδηγεί σε απόρριψη του προϊόντος. Χαρακτηριστικοί χυμοί με αιώρημα είναι οι χυμοί μήλου,

εσπεριδοειδών, μπανάνας, φράουλας, ανανά, ροδάκινου, βερίκοκου, φράουλας κ.α.

Η απώλεια της θολότητας των χυμών φρούτων αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ζητήματα που καλείται να αντιμετωπίσει η βιομηχανία φρουτοχυμών. Αποδίδεται στη δράση της PME σε συνδυασμό με την πολυγαλακτουρονάση (ΠΓ), ωστόσο έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι μπορεί να οφείλεται μόνο στην PME [17]. Η PME είναι ένζυμο άφθονο σε όλους τους ιστούς των φρούτων και είναι επομένως αδύνατο να αποφευχθεί η παρουσία της στους χυμούς κατά την εξαγωγή τους.

Σε εμπορικούς χυμούς και πολτούς φρούτων που έχει διερευνηθεί η υπολειπόμενη δραστικότητα PME, δείγματα πουρέ βερίκοκου και μήλου βρέθηκαν να έχουν τη μεγαλύτερη υπολειπόμενη δραστικότητα PME (θερμική παστερίωση στους 108-116°C για χρόνους 2min) 10^{-3} U/mL. Νέκταρ και χυμοί φρούτων δεν βρέθηκαν να έχουν μετρήσιμη δραστικότητα. Γενικά, τιμές δραστικότητας πάνω από 10^{-3} U/mL προκαλούν απώλεια θολότητας στους χυμούς, ενώ μικρότερες τιμές δεν επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στο αιώρημα. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως, παρατηρείται απώλεια θολότητας μετά την παστερίωση χωρίς να υπάρχει μετρήσιμη ενεργότητα PME. Αυτό αποδίδεται στη δράση της PME που ξεκινά αμέσως μετά την εξαγωγή του χυμού και απομεθοξυλιώνει την πηκτίνη μέχρι ο χυμός να παστεριωθεί[18].

1.4.1 Δομή και σύσταση του αιωρήματος

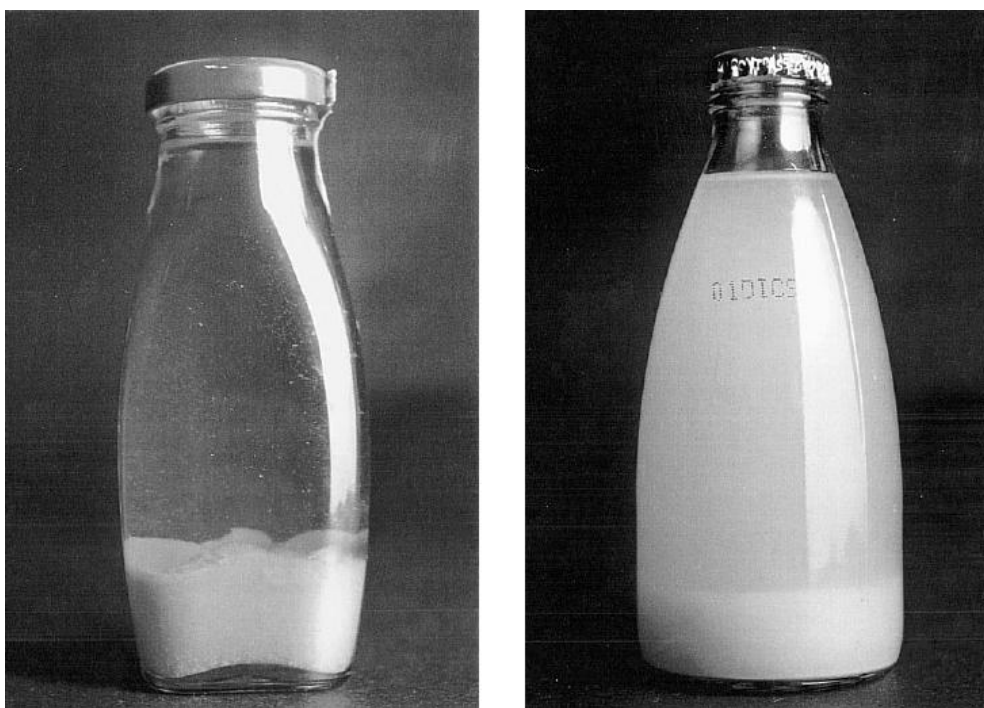
Το αιώρημα των φρουτοχυμών που προκαλεί τη θολότητα αποτελείται από σωματίδια κολλοειδών διαστάσεων περίπου 100-10000nm τα οποία είναι πολύ μικρά για να καταβυθιστούν αλλά αρκετά μεγάλα για να σκεδάζουν το φως. Τα σωματίδια αυτά αποτελούνται από πρωτεΐνες, λιπίδια, πηκτίνη, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη και προέρχονται από θραύσματα των κυτταρικών τοιχωμάτων του φρούτου. Σε κάποιους χυμούς (λ.χ. χυμός μήλου) θολότητα προσδίδει επίσης το περιεχόμενο άμυλο [10]. Η σκέδαση του φωτός οφείλεται σε σύνθετα σωματίδια που αποτελούνται από έναν πρωτεϊνικό πυρήνα ο οποίος περιβάλλεται από πηκτίνη ενωμένη με την πρωτεΐνη μέσω ηλεκτροστατικών ή υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Η πηκτίνη είναι αρνητικά φορτισμένη, προκαλώντας έτσι την άπωση των σωματιδίων μεταξύ τους, διατηρώντας τα εν αιωρήσει[19].

Τα αιωρήματα των διαφόρων φρουτοχυμών διαφέρουν στη σύσταση και τη δομή, ανάλογα με την προέλευση. Στον πορτοκαλοχυμό, τα αιωρούμενα σωματίδια έχουν διαμέτρους μικρότερες του 1μm και αποτελούνται από 4.5-32% πηκτίνη, 1.5% κυτταρίνη, 2% ημικυτταρίνη, 34-52% πρωτεΐνες και 25% λιπίδια. Αντίστοιχα, τα σωματίδια στο χυμό μήλου έχουν διαμέτρους μικρότερες από 0.5μm με σύσταση 2% πηκτίνη, 40% πρωτεΐνες, 30% λιπίδια και 5% ουδέτερους πολυσακχαρίτες[20],[21].

1.4.2 Μηχανισμός απώλειας θολότητας χυμών

Η απώλεια της θολότητας των χυμών παρατηρείται όταν τα αιωρούμενα στο σωματίδια καταβυθίζονται σχηματίζοντας ένα ίζημα και αφήνοντας έναν διαυγή υπερκείμενο ορό.

Το φαινόμενο οφείλεται στη συνδυασμένη δράση της πηκτινομεθυλεστεράσης (ΠΜΕ) και της πολυγαλακτουρονάσης (ΠΓ).



Σχήμα 1.9: Αριστερά: εμπορικός χυμός ανανά όπου η απώλεια θολότητας και ο σχηματισμός ιζήματος είναι πολύ εμφανείς (υπολειπόμενη ενεργότητα ενζύμου 7.1×10^{-3} U/mL). Δεξιά: Εμπορικός χυμός ανανά με πολύ υψηλότερη θολότητα (υπολειπόμενη ενεργότητα 4.1×10^{-4} U/mL) (Πηγή:[18])

Ο μηχανισμός απώλειας θολότητας που οφείλεται στην πηκτινομεθυλεστεράση είναι πιθανότατα ο ακόλουθος: η πηκτινομεθυλεστεράση απομεθοξυλιώνει την πηκτίνη που περιβάλλει τα σωματίδια του αιωρήματος καθιστώντας τα αρνητικά φορτισμένα. Οι καρβοξυλικές ομάδες που προκύπτουν είναι εκτεθειμένες σε δισθενή μεταλλικά κατιόντα, όπως Ca^{++} , τα οποία αντιδρούν με αυτές διασταυρώνοντας τα σωματίδια μεταξύ τους. Αυτό δημιουργεί συσσωματώματα τα οποία δεν μπορούν να παραμείνουν εν αιωρήσει και καθιζάνουν. Έχει αποδειχθεί ωστόσο, ότι η ΠΜΕ προκαλεί απώλεια θολότητας και σε περιβάλλον όπου δεν υπάρχουν κατιόντα ασβεστίου, αλλά ο μηχανισμός της δράσης αυτής δεν είναι γνωστός[19].

Ο μηχανισμός απώλειας θολότητας που οφείλεται στην πολυγαλακτουρονάση είναι διαφορετικός. Η πολυγαλακτουρονάση αποπολυμερίζει την πηκτίνη που περιβάλλει τα σωματίδια του αιωρήματος, αφήνοντας εκτεθειμένο τον θετικά φορτισμένο πρωτεϊνικό πυρήνα. Το γεγονός αυτό προκαλεί ηλεκτροστατικές έλξεις μεταξύ των

σωματιδίων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό συσσωματωμάτων τα οποία τελικά καθιζάνουν. Η δράση της ενδο-πολυγαλακτουρονάσης απαιτεί πρώτα τη δράση της ΠΜΕ πάνω στην πηκτίνη. Οι εμπορικοί φρουτοχυμοί ωστόσο είναι παστεριωμένοι σε συνθήκες που δεν αφήνουν σημαντική ενεργότητα πολυγαλακτουρονάσης[22]. Η απώλεια θολότητας επομένως οφείλεται κυρίως στην ΠΜΕ[19].

Κεφάλαιο 2 : Η διεργασία της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης

2.1 Μέθοδοι επεξεργασίας τροφίμων

Οι διεργασίες επεξεργασίας τροφίμων έχουν σαν στόχο την παραγωγή ασφαλών στην κατανάλωση τροφίμων τα οποία να διατηρούν παράλληλα υψηλή οργανοληπτική ποιότητα και θρεπτική αξία.

Οι βασικές επιδιώξεις των διεργασιών αυτών είναι η καταστροφή (ή μείωση σε αποδεκτά επίπεδα) παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών που βρίσκονται στα τρόφιμα ή η απενεργοποίηση ενζύμων που μπορεί να προκαλέσουν ανεπιθύμητες μεταβολές στις ιδιότητες τους (λ.χ. χρώμα, υφή, άρωμα).

2.1.1 Θερμικές μέθοδοι

Οι θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας είναι ίσως οι πιο διαδεδομένες στη βιομηχανία τροφίμων. Ο σχεδιασμός τους είναι σχετικά απλός, χρησιμοποιούν απλό και ευρέως διαθέσιμο εξοπλισμό με χαμηλό πάγιο κόστος και τα αποτελέσματά τους είναι εγγυημένα. Επίσης, τα κινητικά μοντέλα καταστροφής μικροοργανισμών δεν είναι σύνθετα και ως αποτέλεσμα οι θερμικές διεργασίες μπορούν εύκολα να προσαρμοστούν στην καταστροφή οποιουδήποτε επιθυμητού μικροοργανισμού. Βασικά τους μειονεκτήματα ωστόσο είναι η μεγάλη τους ενεργειακή κατανάλωση και σε αρκετές περιπτώσεις η αλλοίωση των οργανοληπτικών και θρεπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων, ο ρυθμός της οποίας αυξάνεται αυξανόμενης της θερμοκρασίας.

Όλες οι θερμικές μέθοδοι έχουν σαν βασικές παραμέτρους λειτουργίας τη θερμοκρασία λειτουργίας και το χρόνο παραμονής του τροφίμου. Και τα δύο υπαγορεύονται από το επιθυμητό τελικό αποτέλεσμα και είναι συνάρτηση της θερμικής αντοχής και της κινητικής καταστροφής των μικροοργανισμών (ή των ενζύμων) που πρόκειται να καταστραφούν, καθώς και τη σύσταση, τις θερμικές και χημικές (pH, ενεργότητα νερού) ιδιότητες του τροφίμου. [23]

Η παστερίωση είναι ίσως η πιο καλά μελετημένη και διαδεδομένη θερμική διεργασία επεξεργασίας τροφίμων. Εφαρμόζεται σε υγρά τρόφιμα για την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών και σε κάποιες περιπτώσεις για την

καταστροφή αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Ο βασικός εξοπλισμός της παστερίωσης είναι ένας εναλλάκτης θερμότητας ο οποίος θερμαίνει το υγρό τρόφιμο χρησιμοποιώντας ως μέσο θέρμανσης νερό ή ατμό.

Όταν στο τελικό τρόφιμο δεν πρέπει να υπάρχει κανένας μικροοργανισμός ή σπόριο (μηδενική ανοχή) τότε χρησιμοποιείται η αποστείρωση, η οποία πραγματοποιείται τυπικά σε υψηλότερες θερμοκρασίες από την παστερίωση. Κλασική διεργασία αποστείρωσης είναι αυτή της αποστείρωσης κονσερβοποιημένων τροφίμων ο σχεδιασμός της οποίας πρωτοπαρουσιάστηκε από τον Ball το 1923 [24] και βασίζεται σε απλούς μαθηματικούς υπολογισμούς.

Τέλος, ως ζεμάτισμα αναφέρεται η θερμική επεξεργασία που υφίστανται τα φρούτα και τα λαχανικά με στόχο την απενεργοποίηση ενζύμων που προκαλούν υποβάθμιση της ποιότητάς τους (λ.χ. περοξειδάση, καταλάση). Ζεμάτισμα εφαρμόζεται επίσης για τη συρρίκνωση του φλοιού και το μαλάκωμα της σάρκας ώστε να διευκολυνθεί η συσκευασία.

2.1.2 Επίδραση των θερμικών μεθόδων στην ποιότητα των τροφίμων

Γενικά σε τρόφιμα που υφίστανται ήπια θερμική κατεργασία (παστερίωση) ώστε να διατηρούνται αναλλοίωτα μερικές μέρες υπό ψύξη, δεν παρατηρούνται σημαντικές επιπτώσεις στην ποιότητα που να οφείλονται στην κατεργασία. Ωστόσο τρόφιμα που απαιτείται να έχουν μεγαλύτερη διατηρησιμότητα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υφίστανται επεξεργασία σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες και για μεγαλύτερους χρόνους. Το γεγονός αυτό επηρεάζει ενεργά τις οργανοληπτικές και τις θρεπτικές ιδιότητες του τροφίμου, καταστρέφοντας το χρώμα και το άρωμα και μειώνοντας την περιεκτικότητα σε βιταμίνες. [23]

Η θερμική καταστροφή των βιταμινών κατά την επεξεργασία είναι σύνθετη, εξαρτώμενη από πολλούς παράγοντες όπως την παρουσία οξυγόνου, φωτός, χημικών παραγόντων (π.χ. μέταλλα) και την υδατοδιαλυτότητα της εκάστοτε βιταμίνης. Οι θερμοευαίσθητες βιταμίνες είναι οι λιποδιαλυτές A, D, E και β-καροτένιο, καθώς και οι υδατοδιαλυτές βιταμίνη C, B1, B2 σε όξινο περιβάλλον. Η βιταμίνη C σε χυμούς φρούτων εμφανίζει την ταχύτερη καταστροφή κατά τη θέρμανση. Αντίθετα, η πιο θερμοσταθερή βιταμίνη φαίνεται να είναι η θειαμίνη (B1).

Οι αντιδράσεις μη ενζυμικού μαυρίσματος (αντιδράσεις Maillard) μπορεί να λάβουν χώρα ακόμη και όταν η θερμική επεξεργασία είναι ήπια. Παρόλο που σε κάποια τρόφιμα η εξέλιξή τους είναι σημαντική, καθώς προσδίδουν χαρακτηριστικό άρωμα ψημένου και καστανό χρώμα, δεν παύουν να υποβιβάζουν τη θρεπτική αξία των τροφίμων καταστρέφοντας πρωτεΐνες και δεσμεύοντας απαραίτητα αμινοξέα όπως λυσίνη, L-αργινίνη και L-ιστιδίνη. [23]

Οι πρωτεΐνες μπορεί να ξεδιπλωθούν, να χάσουν δηλαδή την τεταρτοταγή και την τριτοταγή τους δομή, με αποτέλεσμα να γίνονται πιο εύπεπτες. Καταστροφή όμως την πρωτοταγούς τους δομής μπορεί να μειώσει την ευπεπτότητά τους ή να δημιουργήσει μικρότερες πρωτεΐνες που δε μπορούν να απορροφηθούν από τον οργανισμό. [23]

Το χρώμα των επεξεργασμένων τροφίμων παίζει μεγάλο ρόλο στην αποδοχή του καταναλωτή. Οι φυσικές χρωστικές ουσίες στα τρόφιμα υφίστανται μεταβολές κατά την επεξεργασία. Τέτοιες ουσίες είναι οι χλωροφύλλες, οι ανθοκυανίνες, τα καροτενοειδή και οι βετανίνες. Οι χλωροφύλλες μετατρέπονται σε πυροφαινοφυτίνη μέσω φαινοφυτίνης ενώ τα καροτενοειδή ισομερίζονται από 5,6-εποξειδία σε 5,8-εποξειδία τα οποία έχουν μικρότερη χρωματική ένταση. Τέλος οι ανθοκυανίνες μετατρέπονται σε καφέ χρωστικές. [23]

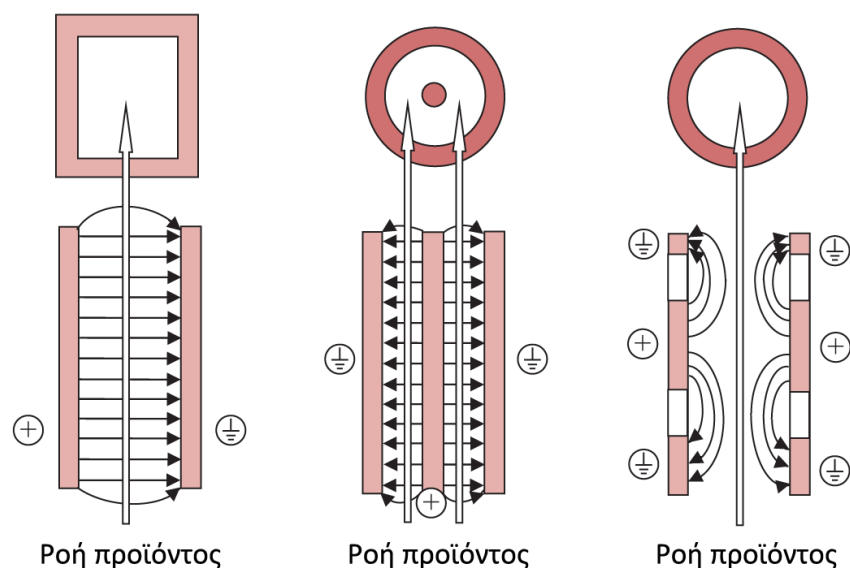
2.1.3 Μη θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας

Οι αυξανόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών για υψηλότερης ποιότητας επεξεργασμένα τρόφιμα με φυσικό άρωμα και γεύση, χωρίς πρόσθετα και συντηρητικά, δημιούργησαν την ανάγκη για την ανάπτυξη μεθόδων επεξεργασίας απαλλαγμένες από τα μειονεκτήματα της θερμικής επεξεργασίας. Η ανάπτυξη νέων μεθόδων επεξεργασίας και ο συνδυασμός τους με ήδη υπάρχουσες είναι μια συνεχής επιδίωξη της βιομηχανίας με στόχο την παραγωγή υψηλής ποιότητας τροφίμων με χαμηλό κόστος. Δυστυχώς όμως οι νέες τεχνολογίες τείνουν να έχουν πολύ υψηλό κόστος επένδυσης. [25]

2.1.3.i Παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία

Η τεχνολογία αυτή στηρίζεται στην τοποθέτηση τροφίμων ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια μεταξύ των οποίων αναπτύσσεται ηλεκτρικό πεδίο υψηλής έντασης. Το πεδίο πάλλεται με παλμούς μικρής διάρκειας με αποτέλεσμα το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων να καταστρέφεται και αυτά να θανατώνονται χωρίς να παρατηρείται σημαντική θέρμανση του τροφίμου. Το αποτέλεσμα είναι το επεξεργασμένο τρόφιμο να διατηρεί πρακτικά αναλλοίωτα τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά και τη φρεσκάδα του. [24],[25]

Μιας και η επεξεργασία με παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία (PEF, pulsating electric fields) γίνεται σε θερμοκρασίες δωματίου ή και λίγο υψηλότερες οι ενεργειακές ανάγκες τις διεργασίας είναι σχετικά χαμηλές. [25]



Σχήμα 2.1: Διαγράμματα διατάξεων PEF για διεργασίες συνεχούς ροής (Πηγή: [24])

2.1.3.ii Επεξεργασία με υπέρηχους

Η επεξεργασία με υπέρηχους στηρίζεται στη διαβίβαση ηχητικών κυμάτων πολύ υψηλής συχνότητας (20kHz) μέσα από τα τρόφιμα. Σε μεγάλη ένταση κύματος, οι υπέρηχοι δημιουργούν φυσαλίδες σπηλαιώσης οι οποίες καταρρέουν απότομα δημιουργώντας τοπικές αυξήσεις της θερμοκρασίας και της πίεσης της τάξης των 4000K και 1000atm. Οι τοπικές «εκρήξεις» αυτές δημιουργούν μεγάλες διατμητικές τάσεις και παράγουν ελεύθερες ρίζες θανατώνοντας έτσι τους μικροοργανισμούς και προκαλώντας μετουσίωση στα ένζυμα. [25]

2.1.3.iii Επεξεργασία με ακτινοβολίες

Η ακτινοβολία τροφίμων είναι μια μέθοδος ψυχρής επεξεργασίας τροφίμων που στηρίζεται στην θανάτωση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα με ακτίνες X και ακτίνες γάμμα και έχει μελετηθεί εκτενώς για πάνω από 45 χρόνια. Σε πάνω από 40 χώρες η ακτινοβολία χρησιμοποιείται για την επεξεργασία φρούτων, ριζωδών λαχανικών, καρυκευμάτων και δημητριακών. Οι πηγές ακτίνων γάμμα είναι συνήθως ισότοπα του καισίου ή του κοβαλτίου που έχουν χαμηλό κόστος και είναι διαθέσιμα στο εμπόριο.

2.2 Η διεργασία της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης

2.2.1 Εισαγωγή

Ιστορικά, η επίδραση που έχει η ΥΥΠ στους μικροοργανισμούς ανακαλύφθηκε το 1899 από τον Hite [26], ο οποίος μελέτησε την επίδρασή της στην επεξεργασία γάλακτος. Η βιομηχανική σημασία όμως της διεργασίας έγινε αντιληπτή την δεκαετία του 1980. Τα πρώτα προϊόντα επεξεργασμένα με ΥΥΠ εισήλθαν στην αγορά το 1990 από την ιαπωνική εταιρία Meidi-ya® (Meidi-Ya Co., Ltd., Tokyo, Kanto) η οποία εισήγαγε μία σειρά από μαρμελάδες και σάλτσες. Αργότερα ακολούθησαν αμερικανικές εταιρίες και τελικά η τεχνολογία εξαπλώθηκε και στην Ευρώπη. [25]

Η διεργασία βασίζεται στην εφαρμογή πιέσεων από 100 έως 1000MPa σε συσκευασμένα τρόφιμα μέσω ενός ρευστού πίεσης (νερό ή γλυκόλη). Πιέσεις αυτής της κλίμακας και συνδυασμός με ήπιες θερμοκρασίες μπορούν αποτελεσματικά να απενεργοποιήσουν ένζυμα και να θανατώσουν μικροοργανισμούς που σχετίζονται με την ποιότητα των τροφίμων. Υπάρχουν βέβαια και κάποια ένζυμα και σπορογόνα βακτήρια που είναι ανθεκτικά και σε πιέσεις μέχρι 1200MPa [27]. Τα τρόφιμα που μπορούν να επεξεργαστούν είναι χυμοί και αναψυκτικά, γάλα, φρούτα, λαχανικά, προϊόντα κρέατος και ιχθυρών, ακόμη και προμαγειρεμένα γεύματα. [25]



Σχήμα 2.2: Το «φάσμα» της υπερυψηλής πίεσης. Σε όρους υπερυψηλής πίεσης, χαμηλές θεωρούνται συνήθως πιέσεις κάτω από 150MPa, μέσες μεταξύ 200 και 500MPa και υψηλές από 550 μέχρι 1000.

Το γεγονός ότι η διεργασία μπορεί να χρησιμοποιήσει ήπια ή και καθόλου θέρμανση της προσδίδει δύο μεγάλα πλεονεκτήματα. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά παραμένουν κατά κανόνα αναλλοίωτα και τα τρόφιμα διατηρούν τη φρεσκάδα τους ενώ παράλληλα διατηρούν και τη θρεπτική τους αξία. Ακόμη, το λειτουργικό κόστος της διεργασίας είναι σημαντικά χαμηλότερο από αυτό μιας αμιγώς θερμικής διεργασίας σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Τέλος, σε τρόφιμα με μεγάλο μέγεθος και δομική ανομοιομορφία η άσκηση της πίεσης είναι ομοιόμορφη σε αντίθεση με την ανομοιόμορφη θερμοκρασιακή κατανομή με αποτέλεσμα η επεξεργασία να είναι ομοιογενής. [28]

Παρά τα πλεονεκτήματα της διεργασίας υπάρχουν ακόμη βασικά μειονεκτήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν. Το κόστος επένδυσης της διεργασίας παραμένει υψηλό και η υιοθέτησή της αποτελεί τολμηρή κίνηση για μια βιομηχανία τροφίμων.

Πρόκληση αποτελεί επίσης ο θερμοκρασιακός έλεγχος της διεργασίας, μιας και σε υψηλές πιέσεις η θερμοκρασία αυξάνεται αρκετά (κατά κανόνα 3°C για κάθε 100MPa) και σε τρόφιμα που είναι ανομοιογενή ο θερμοκρασιακός έλεγχος είναι αρκετά δύσκολος. Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι σε στερεά τρόφιμα μεγάλου μεγέθους η άσκηση της πίεσης μπορεί να μην είναι απόλυτα ομοιόμορφη σε όλη την έκταση του τροφίμου, γεγονός που προκαλεί δυσκολίες στο σχεδιασμό της διεργασίας. [25]

2.2.2 Μηχανολογικός εξοπλισμός της ΥΥΠ

Ο εξοπλισμός της ΥΥΠ αποτελείται από τα εξής βασικά μέρη:

- Ένα θάλαμο πίεσης και το σύστημα σφράγισής του
- Ένα σύστημα παραγωγής πίεσης
- Ένα σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας
- Ένα σύστημα διαχείρισης υλών

Οι περισσότεροι θάλαμοι κατασκευάζονται από υλικά με μεγάλη αντοχή σε εφελκυσμό, συνήθως μονομηματικά (monoblocs, κομμένα από ένα ενιαίο κομμάτι μετάλλου) κομμάτια κραμάτων του χάλυβα. Οι θάλαμοι αυτοί αντέχουν πιέσεις 400 με 600 MPa. Για μεγαλύτερες πιέσεις οι θάλαμοι κατασκευάζονται από πολυστρωματικά, προτεταμένα υλικά. Τα συστήματα φραγής είναι συνήθως χαλύβδινα πώματα που φέρουν σπείρωμα ή, για μείωση του χρόνου ανοίγματος και κλεισίματος, σφραγισμένα πλαίσια που τοποθετούνται πάνω από τους θαλάμους.

Ο έλεγχος της θερμοκρασίας γίνεται με μανδύες γύρω από τους θαλάμους ΥΥΠ. Στους μανδύες κυκλοφορεί ψυκτικό/θερμαντικό μέσο, ανάλογα με τις ανάγκες. Σημαντικό μειονέκτημα ωστόσο σε μεγάλους θαλάμους είναι η αργή θερμοκρασιακή απόκριση, στην οποία περίπτωση χρησιμοποιούνται εσωτερικές σπείρες εναλλαγής θερμότητας. [29]

2.2.2.i Τρόποι άσκησης πίεσης

Η πίεση σε ένα δοχείο ΥΥΠ μπορεί να ασκηθεί με διαφορετικούς τρόπους. Στην **άμεση συμπίεση**, ένα ρευστό τρόφιμο συμπιέζεται κατευθείαν από την μικρότερη πλευρά ενός εμβόλου. Η μεγαλύτερη πλευρά του εμβόλου είναι συνδεδεμένη με μια αντλία χαμηλής πίεσης, επιτρέποντας έτσι τον πολλαπλασιασμό της πίεσης. Η άμεση συμπίεση επιτρέπει πολύ γρήγορη συμπίεση αλλά δε μπορεί να εφαρμοστεί σε δοχεία μεγάλης κλίμακας λόγω ενδεχόμενης ανεπάρκειας της στεγανότητας του εμβόλου.

Κατά την **έμμεση συμπίεση**, ένα ρευστό άσκησης πίεσης (νερό ή γλυκόλη) αντλείται σε έναν ερμητικά κλειστό θάλαμο από έναν ενισχυτή πίεσης. Τα περισσότερα συστήματα ισοστατικής συμπίεσης χρησιμοποιούν την έμμεση συμπίεση.

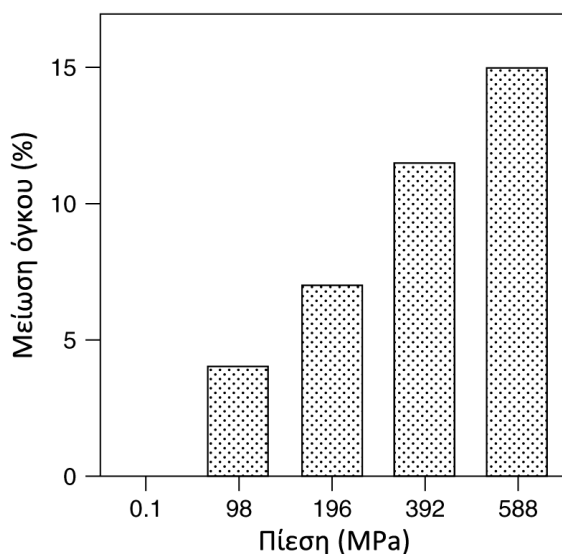
Τέλος, συμπύεση μπορεί να επιτευχθεί με θέρμανση του ρευστού πίεσης το οποίο διαστέλλεται. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται σε περιπτώσεις όπου απαιτείται συνδυασμός πίεσης και υψηλής θερμοκρασίας και απαιτεί πολύ ακριβή θερμοκρασιακό έλεγχο.

2.2.2.ii Συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας

Τα συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: συστήματα επεξεργασίας συσκευασμένων τροφίμων και συστήματα επεξεργασίας «χύμα» (bulk) τροφίμων. Η επεξεργασία συσκευασμένων τροφίμων περιορίζει την επιλογή συσκευασίας αφού πρέπει να χρησιμοποιούνται ευέλικτες πλαστικές συσκευασίες που να είναι ανθεκτικές σε μικρές μεταβολές του όγκου. Επίσης, τα συστήματα διαχείρισης υλών (φόρτωση/εκφόρτωση θαλάμων) είναι παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται σε δοχεία διαλείποντος έργου. Αντίθετα, η χύμα επεξεργασία δεν απαιτεί τέτοια συστήματα αλλά βασική προϋπόθεση είναι τα τρόφιμα να είναι αντλήσιμα. [29]

Πίνακας 2.1: Πλεονεκτήματα και περιορισμοί επεξεργασίας συσκευασμένων και χύμα τροφίμων με ΥΥΠ (Πηγή:[29])

Επεξεργασία συσκευασμένων τροφίμων		Επεξεργασία «χύμα» (bulk)	
Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί	Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
Εφαρμόσιμη σε όλα τα στερεά και υγρά τρόφιμα	Σύνθετα συστήματα διαχείρισης υλών	Απλά συστήματα διαχείρισης υλών	Κατάλληλη μόνο για αντλήσιμα τρόφιμα
Μικρή πιθανότητα επαναμόλυνσης μετά την επεξεργασία	Μικρή ευελιξία στην επιλογή συσκευασίας	Μεγαλύτερη ευελιξία στην επιλογή συσκευασίας	Απαιτείται ασηπτική συσκευασία-ενδεχόμενη επαναμόλυνση μετά την επεξεργασία
δεν απαιτούνται περαιτέρω τροποποιήσεις για επεξεργασία	Μεγαλύτερος νεκρός χρόνος στη χρήση των θαλάμων (άνοιγμα/κλείσιμο)	Μέγιστη (>90%) εκμετάλλευση όγκου θαλάμου	Όλα τα τμήματα του εξοπλισμού σε επαφή με το τρόφιμο πρέπει να έχουν ασηπτικό σχεδιασμό και σύστημα CIP
Ευχερέστερος καθαρισμός εξοπλισμού		Εξάλειψη νεκρού χρόνου θαλάμων (δεν απαιτείται άνοιγμα/κλείσιμο)	



Σχήμα 2.3: Διάγραμμα μείωσης όγκου του νερού σε συνάρτηση με την πίεση. Οι μεταβολές είναι πολύ μικρότερες σε σχέση με τα αέρια, συνεισφέροντας στην αυξημένη ασφάλεια του συστήματος (Πηγή:0 [28])

Οι παραπάνω τρόποι δημιουργίας υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης εφαρμόζονται σε συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας, όπου τα τρόφιμα επεξεργάζονται σε παρτίδες (batches). Έτσι, σε αντίθεση με τα συστήματα συνεχούς λειτουργίας, μειώνεται σημαντικά η πιθανότητα μεγάλη ποσότητα τροφίμου να έρθει σε επαφή με λιπαντικά ή σωματίδια από τη φθορά του εξοπλισμού. Επίσης, ο σχεδιασμός του εξοπλισμού είναι απλούστερος. Μέχρι στιγμής

στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται μόνο συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας. [28]

Τυπικά, ένα σύστημα ασυνεχούς λειτουργίας επεξεργασίας συσκευασμένων τροφίμων αποτελείται από μεμονωμένους θαλάμους πίεσης. Συσκευασμένα τρόφιμα τοποθετούνται στους θαλάμους, οι οποίοι σφραγίζονται και πληρώνονται με το υγρό πίεσης που είναι συνήθως νερό αναμεμειγμένο με μικρή ποσότητα ελαίου για λόγους προστασίας από τη διάβρωση. Η πίεση ασκείται στα τρόφιμα αυξάνοντας την πίεση του υγρού και είναι ομοιόμορφη (ισοστατική συμπίεση). Το τρόφιμο παραμένει υπό πίεση για συγκεκριμένο χρόνο. Μετά την πάροδο του χρόνου επεξεργασίας, ο θάλαμος εκτονώνεται, αδειάζεται και επαναπληρώνεται με την επόμενη παρτίδα.

Τα περισσότερα βιομηχανικά συστήματα ΥΥΠ είναι ημισυνεχούς λειτουργίας, περιλαμβάνοντας συστοιχίες από θαλάμους ασυνεχούς λειτουργίας. Οι θάλαμοι λειτουργούν εναλλάξ και οι γραμμές φόρτωσης και εκφόρτωσής τους είναι πλήρως αυτοματοποιημένες. [29]

Πρόκληση για τους κατασκευαστές του εξοπλισμού αποτελεί η κατασκευή μηχανημάτων ανθεκτικών σε υψηλές πιέσεις αλλά και σε συνεχείς κύκλους συμπίεσης-εκτόνωσης. Οι κύκλοι πρέπει να είναι σύντομοι ώστε να μην δημιουργούνται καθυστερήσεις μεταξύ παρτίδων, και να είναι πλήρως ελέγξιμοι. Τέλος οι θάλαμοι πίεσης πρέπει να είναι εύκολοι στον καθαρισμό και τη σφράγιση. Η βιομηχανία τροφίμων απαιτεί αντοχή σε πιέσεις μεγαλύτερες από 400MPa και χρόνους παραμονής από 5 έως και 20 λεπτά.

2.2.2.iii Κόστος του εξοπλισμού

Συλλογή δεδομένων από κατασκευαστές εξοπλισμού ΥΥΠ εκτιμά ότι το αρχικό κόστος επένδυσης για ένα βιομηχανικό σύστημα ΥΥΠ κυμαίνεται μεταξύ 0.5 και 2 εκατ. € με κόστος επεξεργασίας στα 400MPa 0.1-0.2€/kg. Ένα σύστημα παστερίωσης χυμών με ΥΥΠ κοστίζει περίπου 20 φορές περισσότερο από το συμβατικό σύστημα θερμικής παστερίωσης με εναλλάκτες. [29]

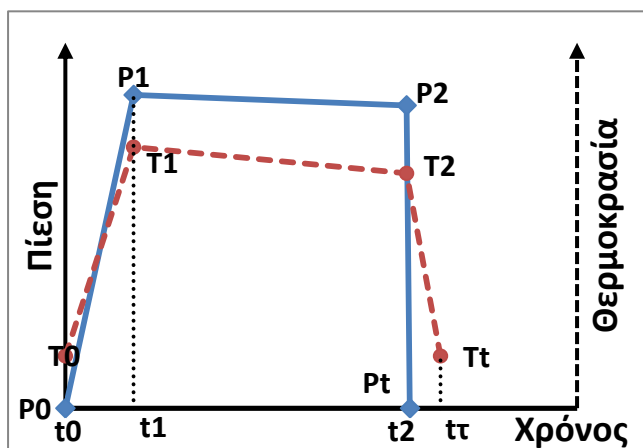
Το κόστος επηρεάζεται από παράγοντες όπως τον όγκο των θαλάμων, τη μέγιστη επιθυμητή πίεση, το χρόνο και τη θερμοκρασία επεξεργασίας και το βαθμό αξιοποίησης της γραμμής. Πλήρωση των θαλάμων στο 50% του όγκου τους έχει διπλάσιο κόστος από ότι η πλήρωση στο 85%, γεγονός που καταδεικνύει τη σημασία της μέγιστης αξιοποίησης μιας γραμμής μεγάλης κλίμακας. [29]

2.2.2.iv Κρίσιμες παράμετροι της διεργασίας της ΥΥΠ

Οι τρεις βασικές παράμετροι της διεργασίας είναι η εφαρμοζόμενη πίεση, η θερμοκρασία συμπεριλαμβανομένης και της αδιαβατικής θέρμανσης και ο χρόνος επεξεργασίας. Οι τρεις αυτές παράμετροι αποτελούν τον πυρήνα της διεργασίας και

ο έλεγχός τους είναι επιβεβλημένος σε οποιοδήποτε τύπου σύστημα ΥΥΠ. Άλλες παράμετροι είναι:

- Οι χρόνοι συμπίεσης και αποσυμπίεσης των θαλάμων
- Τα χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες του τροφίμου (μέγεθος, pH, ενεργότητα νερού)



Σχήμα 2.4: ποιοτικό διάγραμμα των μεταβλητών της διεργασίας ΥΥΠ σε συνάρτηση με το χρόνο

Η διεργασία μπορεί να διακριθεί σε τρεις χαρακτηριστικές φάσεις:

- Χρόνος αύξησης της πίεσης (pressure buildup time), t_0-t_1 : είναι ο χρόνος που απαιτείται μέχρι η πίεση στο θάλαμο να φθάσει την επιθυμητή P_1 . Παράλληλα παρατηρείται και αύξηση της θερμοκρασίας που οφείλεται στην αδιαβατική θέρμανση (βλ. §2.3.1).
- Χρόνος της διεργασίας, t_1-t_2 : ο χρόνος κατά τον οποίο η πίεση παραμένει πρακτικά σταθερή ($P_1 \approx P_2$) και είναι ουσιαστικά το διάστημα στο οποίο γίνεται η επεξεργασία του τροφίμου στην επιθυμητή πίεση. Παράλληλα παρατηρείται μείωση της θερμοκρασίας που οφείλεται σε φαινόμενα μεταφοράς θερμότητας.
- Χρόνος αποσυμπίεσης, t_2-t_t : ο χρόνος που απαιτείται μέχρι να εκτονωθεί η πίεση του θαλάμου.

2.3 Επίδραση της ΥΥΠ στην ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων

2.3.1 Αδιαβατική θέρμανση: Θερμοδυναμική θεώρηση

Κατά τη συμπίεση οποιοδήποτε συμπίεσιμου υλικού υπό ισηντροπικές συνθήκες λαμβάνει χώρα αδιαβατική θέρμανση. Η εντροπία ενός θερμοδυναμικού συστήματος μπορεί να εκφραστεί ως συνάρτηση της θερμοκρασίας και της πίεσης μέσω της εξίσωσης:

$$dS = \left(\frac{\partial S}{\partial T}\right)_P dT + \left(\frac{\partial S}{\partial P}\right)_T dP \quad (2.1)$$

Η θερμοχωρητικότητα υπό σταθερή πίεση ορίζεται από την εξίσωση:

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_p = T \left(\frac{\partial S}{\partial T}\right)_p \quad (2.2)$$

Ενώ ο συντελεστής θερμικής διαστολής από την εξίσωση:

$$\alpha = \frac{1}{v} \left(\frac{\partial v}{\partial T}\right)_p \quad (2.3)$$

Έτσι η σχέση (2.1) μέσω των (2.2) και (2.3) γίνεται:

$$dS = \frac{C_p}{T} dT - \alpha v dP \quad (2.4)$$

Για ισεντροπική μεταβολή $dS=0$ άρα η παραπάνω εξίσωση γίνεται:

$$dT = dP \left(\frac{\alpha \cdot T \cdot v}{C_p}\right) \quad (2.5)$$

Όπως φαίνεται, η μεταβολή της θερμοκρασίας κατά τη συμπίεση εξαρτάται από τις ιδιότητες του εκάστοτε υλικού. Οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται από τη θερμοκρασία και την πίεση. Ο Denys [30] μελετώντας τρία διαφορετικά συστήματα (πουρέ τομάτας, πολτό μήλου και το υγρό μεταφοράς πίεσης: 60% DowcalN, Dow Chemical Company, Switzerland σε απιονισμένο νερό) προσδιόρισε την εξάρτηση των C_p και α , καθώς και της πυκνότητας από την πίεση και τη θερμοκρασία. Η πυκνότητα βρέθηκε να ακολουθεί πολυωνυμική σχέση δευτέρου βαθμού ως προς την πίεση. Η θερμοχωρητικότητα προσεγγίζεται ικανοποιητικά από μια γραμμική σχέση ως προς τη θερμοκρασία ενώ ο συντελεστής θερμικής διαστολής ακολουθεί πολυωνυμική σχέση ως προς την πίεση και τη θερμοκρασία.

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι ανισότροπα και ανομοιογενή υλικά όπως τα τρόφιμα εμφανίζουν σύνθετη απόκριση στην αδιαβατική θέρμανση που εξαρτάται από το είδος και την κατανομή των υλικών που τα απαρτίζουν. Η αύξηση της θερμοκρασίας τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό μπορεί να προσεγγιστεί χρησιμοποιώντας τις ιδιότητες του καθαρού νερού, σε άλλα όμως που αποτελούνται από πολλά συστατικά με ανόμοια συμπεριφορά πρέπει να γίνουν λεπτομερείς υπολογισμοί.

Η αδιαβατική θέρμανση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας με ΥΥΠ μπορεί να είναι σημαντική σε μεγάλες πιέσεις και ανάλογα με το τρόφιμο. Για παράδειγμα, έχει υπολογιστεί ότι για κάθε 100MPa αύξησης της πίεσης η θερμοκρασία του νερού αυξάνεται κατά 3°C, του κοτόπουλου κατά 4.5°C ενώ του σογιέλαιου κατά 9.1°C [31]. Έτσι σε σύνθετα τρόφιμα ο θερμοκρασιακός έλεγχος της διεργασίας είναι δυσχερέστερος. Το φαινόμενο μπορεί να αντιμετωπιστεί με αργή αύξηση της

πίεσης και ταχεία απαγωγή της θερμότητας, ώστε το τρόφιμο να παραμένει σε περίπου σταθερή θερμοκρασία.

2.3.2 Επίδραση της ΥΥΠ στους μικροοργανισμούς

2.3.2.i Κατηγοριοποίηση μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε συνθήκες υψηλής πίεσης σε [28]:

- *Βαρόφιλος (barophiles)*: μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε πιέσεις μεγαλύτερες των 40-50MPa.
- *Βαρόφοβος (barophobes)*: μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται ελάχιστα ή καθόλου σε πιέσεις πάνω από 30-40MPa.
- *Βαροανθεκτικός (baroduric or barotolerant)*: μικροοργανισμοί που επιβιώνουν για μακρές περιόδους σε πιέσεις άνω των 200MPa.

2.3.2.ii Μορφολογικές μεταβολές μικροοργανισμών

Η υπερυψηλή πίεση δημιουργεί μορφολογικές μεταβολές στα βακτήρια. Χαρακτηριστική μεταβολή είναι η δημιουργία νηματίων. Η *E. coli* σχηματίζει νημάτια σε πιέσεις 27-40MPa, ενώ τα *Vibrio* σε πίεση 40MPa σχηματίζουν νημάτια πέντε φορές μεγαλύτερα σε μήκος από τα κανονικά κύτταρα. Βακτήρια που κινούνται χάνουν την κινητικότητά τους σε πιέσεις 20-40MPa. Σε πίεση 10MPa τα *E.coli*, *Vibrio* και *Pseudomonas* χάνουν το μαστίγιό τους [28].

2.3.2.iii Απενεργοποίηση μικροοργανισμών

Μετρίως υψηλές πιέσεις μειώνουν τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών ενώ πολύ υψηλές πιέσεις τους απενεργοποιούν. Η ευαισθησία των μικροοργανισμών στην πίεση εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες:

- *Το είδος του μικροοργανισμού*. Η ευαισθησία των μικροοργανισμών στην πίεση αυξάνει με τη σειρά: gram-θετικά βακτήρια, ζύμες, gram-αρνητικά βακτήρια [28].
- *Το στέλεχος*. Κάποια στελέχη είναι πιο ανθεκτικά από άλλα.
- *Τη μορφολογία*. Οι κόκκοι είναι πιο ανθεκτικοί στην πίεση από τους βάκιλους επειδή υφίστανται μικρότερες μορφολογικές μεταβολές κατά την συμπίεση [28].
- *Τη φάση ανάπτυξης*. Γενικά, μικροοργανισμοί που βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης είναι πιο ευαίσθητοι στην απενεργοποίηση από αυτούς που βρίσκονται στη στατική φάση [28].
- *Την προϊστορία συμπίεσης*. Έκθεση αναπτυσσόμενων κυττάρων σε επαναλαμβανόμενους κύκλους συμπίεσης ενδέχεται να αυξήσει την αντοχή τους στην πίεση [28].

- Το μέσο ανάπτυξης. Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε ρυθμιστικά διαλύματα καταστρέφονται ευκολότερα από μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε σύνθετα τρόφιμα. Το γάλα λ.χ. είναι γνωστό ότι δρα προστατευτικά ως προς την καταστροφή των μικροοργανισμών [32].
- Τη σύσταση και την ενεργότητα νερού του μέσου ανάπτυξης. Η απενεργοποίηση σε υψηλές πιέσεις παρεμποδίζεται από χαμηλές ενεργότητες νερού. Ύπαρξη διαλυμένων στερεών έχει βρεθεί να αρεμποδίζει την απενεργοποίηση των μυκήτων *S. cerevisiae*, *Aspergillus awamori*, *S. bayanus*, *Pichia membranaefaciens* και *Mucor plumbeus*[28].

Μετά τη συμπίεση υπάρχει πιθανότητα μέρος του μικροβιακού πληθυσμού που καταστράφηκε να ανακάμψει. Οι Metrick et al. [33] μελέτησαν την επίδραση της πίεσης σε *Salmonella typhimurium* και *S. senftenberg*. Οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα και σε παιδική τροφή με βάση το κοτόπουλο. Τα κύτταρα στην παιδική τροφή ανέκαμψαν μετά την αποσυμπίεση ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο. Αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι η παιδική τροφή είναι πιο θρεπτική.

2.3.2.iv Καταστροφή βακτηριακών ενδοσπορίων

Τα ενδοσπόρια αποτελούν ανθεκτικές δομές των βακτηρίων και σχηματίζονται από κάποια βακτήρια όταν βρεθούν σε δυσμενείς συνθήκες. Η καταστροφή τους είναι πολύ σημαντική για την ασφάλεια των τροφίμων διότι αν βλαστήσουν δίνουν υγιή βακτήρια που πολλαπλασιάζονται.

Σε υψηλές πιέσεις τα ενδοσπόρια βλαστάνουν σε βακτήρια τα οποία με τη σειρά τους απενεργοποιούνται. Συνδυασμός με θέρμανση αυξάνει την απενεργοποίηση, αν και σε θερμοκρασίες άνω των 65°C η απενεργοποίηση οφείλεται στη θερμοκρασία και όχι στην πίεση. Καλύτερα αποτελέσματα στην καταστροφή των ενδοσπορίων φαίνεται να έχει η εφαρμογή παλμικής ή ταλαντούμενης συμπίεσης[34] σε σχέση με την συνεχή συμπίεση.

2.3.2.v Μηχανισμός καταστροφής μικροοργανισμών

Η υψηλή πίεση δημιουργεί μεταβολές στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων. Οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται και τα φωσφολιπίδια μικραίνουν σε μέγεθος με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ικανότητα του κυττάρου να απορροφήσει απαραίτητα αμινοξέα. Επίσης, η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης αυξάνεται με αποτέλεσμα τα συστατικά του κυτταροπλάσματος να διαρρέουν έξω από το κύτταρο, διακόπτοντας ζωτικές λειτουργίες του. Μεταβολές στα νουκλεϊκά οξέα δεν παρατηρούνται. Η υψηλή πίεση σταθεροποιεί τους δεσμούς υδρογόνου και τα μακρομόρια αυτά γίνονται σταθερότερα. Διαδικασίες όμως όπως η μεταγραφή και η μετάφραση που εξαρτώνται από ένζυμα διακόπτονται, αντιστρεπτά μεν σε χαμηλές πιέσεις, αναντίστρεπτα δε σε υψηλές[28].

2.3.3 Επίδραση της ΥΥΠ στα συστατικά, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη θρεπτική αξία των τροφίμων

2.3.3.i Φαινόμενα που σχετίζονται με την ΥΥΠ

Η επεξεργασία των τροφίμων με ΥΥΠ έχει σαν αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η δομή των φυτικών και ζωικών ιστών καθώς και οι ιδιότητες συστατικών που τα απαρτίζουν, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και οι πολυσακχαρίτες. Σύμφωνα με την αρχή του LeChatelier, φαινόμενα που συνοδεύονται από ελάττωση του όγκου ενισχύονται με αύξηση της πίεσης. Έτσι οι κινητικές των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα τείνουν προς καταστάσεις περισσότερο συμπαγείς προκαλώντας τελικά μακροσκοπικές μεταβολές στις ιδιότητες των συστατικών των τροφίμων. Οι μεταβολές αυτές μπορεί να είναι θετικές ή αρνητικές και δεν παρατηρούνται σε όλα τα τρόφιμα. Υπάρχουν όμως και τρόφιμα τα οποία υφίστανται σημαντικές αλλαγές και ως εκ τούτου να μην μπορούν να επεξεργαστούν με ΥΥΠ.

Κατά την εφαρμογή πίεσης αυξάνεται αντιστρεπτά η θερμοκρασία τήξης των λιπιδίων. Συνεπώς, λιπίδια που βρίσκονται σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασία δωματίου στερεοποιούνται υπό πίεση. Έχει προταθεί ότι η μεταβολή αυτή είναι ο λόγος που διαταράσσεται η κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή τους.

Η επίδραση της πίεσης στις πρωτεΐνες συνοδεύεται από μικρή μείωση του όγκου, της τάξης του 1%. Οι ομοιοπολικοί δεσμοί, και κατά συνέπεια η πρωτοταγής δομή των πρωτεϊνών, δεν επηρεάζεται από την πίεση. Επηρεάζονται ωστόσο οι ιοντικοί δεσμοί και οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, οδηγώντας ενδεχομένως σε αλλαγές της τριτοταγούς δομής. Τέλος, οι δεσμοί υδρογόνου φαίνεται να είναι σταθερότεροι σε χαμηλές πιέσεις, αλλά θραύονται σε πολύ υψηλές [27]. Οι μεταβολές αυτές μπορεί να οδηγήσουν σε μετουσίωση των πρωτεϊνών ή και σε σχηματισμό πήγματος και να μεταβάλλουν τις λειτουργικές τους ιδιότητες[35].

2.3.3.ii Επίδραση στην υφή

Η υφή των τροφίμων μεταβάλλεται με την επεξεργασία ΥΥΠ ανάλογα με το είδος του τροφίμου. Σημαντικές μεταβολές στη σκληρότητα εμφανίζονται στο βοδινό κρέας. Το φρέσκο κρέας είναι πάντα σκληρό και πρέπει να παραμείνει υπό ψύξη για 2 εβδομάδες έως ότου γίνει αρκετά μαλακό, διαδικασία γνωστή και ως «σίτεμα». Με επεξεργασία μόλις 10 λεπτών σε υψηλή πίεση το κρέας μπορεί να μαλακώσει [28]. Αντιθέτως, η επίδραση της πίεσης σε επεξεργασμένο ζαμπόν τείνει να το κάνει ελαφρώς πιο ινώδες, χωρίς να επηρεάζεται αρνητικά η οργανοληπτική του ποιότητα [36].

Η υφή της πατάτας, της γλυκοπατάτας και των ριζωδών λαχανικών γίνεται εύκαμπτη ενώ φρούτα όπως ο λωτός και το αχλάδι μαλακώνουν [28]. Καρότο επεξεργασμένο με ΥΥΠ γίνεται πιο ινώδες σε σχέση με θερμικά επεξεργασμένο και μαγειρεμένο καρότο χωρίς όμως να χάνει σημαντικό μέρος της τραγανότητάς του[37].

2.3.3.iii Επίδραση στο χρώμα

Σημαντική επίδραση στο χρώμα έχει η επεξεργασία με ΥΥΠ σε φρούτα και λαχανικά όπως λ.χ. η πατάτα, το μήλο, το αχλάδι. Με την εφαρμογή της πίεσης τα τρόφιμα αυτά υφίστανται ταχεία ενζυμική αμαύρωση που οφείλεται στη δράση της πολυφαινολικής οξειδάσης (PPO), η ενεργότητα της οποίας πολλαπλασιάζεται κατά τη συμπίεση[28].

Γενικά, η εφαρμογή υψηλής πίεσης δεν έχει σημαντικές επιδράσεις στις χρωστικές ουσίες των φρούτων και των λαχανικών, ειδικά στα καροτενοειδή και τις χλωροφύλλες, ωστόσο μεταβολές μπορεί να συμβούν λόγω ρήξης των φυτικών κυττάρων. Η ρήξη αυτή μπορεί να απελευθερώσει στο κυτταρόπλασμα τις χρωστικές, δίνοντας στο τρόφιμο πιο έντονο χρώμα, αλλά και να τις φέρει σε επαφή με ενδοκυτταρικά ένζυμα που τις καταστρέφουν. Παράδειγμα τέτοιων ουσιών είναι οι ανθοκυανίνες οι οποίες εμφανίζουν ταχεία διάσπαση μετά από επεξεργασία με ΥΥΠ σε κάποια φρούτα. Ακόμη, σε κάποιες περιπτώσεις τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση απενεργοποιούνται και το τρόφιμο διατηρεί αποδεκτό επίπεδο χρώματος μετά από μακρά αποθήκευση[38].

Στο κρέας (βοδινό, χοιρινό, κοτόπουλο, τόνος) πιέσεις στο εύρος 250-350MPa προσδίδουν ένα εντονότερο ροζ χρώμα, ενώ πιέσεις μεταξύ 400-500MPa προσδίδουν ένα γκρίζο-καφέ χρώμα κάνοντάς το να μοιάζει μαγειρεμένο. Ακόμη, φιλέτα κοτόπουλου και λευκών ψαριών χάνουν τη ημιδιαφάνειά τους. Αυτό αποτρέπει την εφαρμογή της διεργασίας σε κρέας που θα πωληθεί ως ωμό, λόγω μη αποδοχής από τον καταναλωτή[39].

2.3.3.iv Επίδραση στη γεύση και το άρωμα

Η επίδραση της επεξεργασίας με ΥΥΠ στη γεύση και το άρωμα είναι μικρή και πολλές φορές αμελητέα, γεγονός που δίνει στη μέθοδο σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των θερμικών μεθόδων. Χυμοί φρούτων που επεξεργάζονται διατηρούν την φρεσκάδα τους και τη θρεπτική τους αξία ενώ παράλληλα έχουν χρόνο διατήρησης μέχρι και 17 μήνες [30]. Επίσης, σε κάποια φρούτα επεξεργασία με ΥΥΠ μπορεί να αυξήσει το περιεχόμενο σε βενζαλδεϋδη συνεισφέροντας θετικά στο άρωμα[28].

2.3.3.v Επίδραση στα θρεπτικά χαρακτηριστικά

Η επίδραση της ΥΥΠ στα θρεπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει βρεθεί ότι η επεξεργασία έχει πολύ μικρή επίδραση στις βιταμίνες.

Οι περισσότεροι ερευνητές αναφέρουν ότι επεξεργασία με ΥΥΠ σε πιέσεις 400-900MPa σε θερμοκρασίες δωματίου ή χαμηλότερες, δεν έχει σημαντική επίδραση στο περιεχόμενο ασκορβικό οξύ. Σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης ωστόσο παρατηρείται μείωση του περιεχόμενου ασκορβικού οξέος. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για τις βιταμίνες Α, β-καροτένιο, Β, Ε και Κ[38],[40],[41].

Όσον αφορά στα λιπαρά, έχει παρατηρηθεί ότι σε κάποια τρόφιμα όπως παρθένο ελαιόλαδο, σπορέλαια, μοσχαρίσιο κρέας και κρέας μπακαλιάρου η ΥΥΠ, σε πιέσεις από 200-800MPa και θερμοκρασίες δωματίου ή χαμηλότερες μπορεί να προκαλέσει υδρόλυση και οξείδωση των λιπαρών με παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων[41],[39].

2.3.4 Άλλες εφαρμογές και νέα προϊόντα

Η επίδραση της υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης σε κάποια συστατικά των τροφίμων ώθησε την έρευνα στην ανάπτυξη νέων εφαρμογών και προϊόντων.

Η επίδραση της ΥΥΠ στο σημείο πήξης των λιπαρών χρησιμοποιήθηκε από κάποιες εταιρίες παραγωγής σοκολάτας. Η κρυστάλλωση των λιπαρών καθιστά δυνατή τη σκλήρυνση της σοκολάτας επιτρέποντας παράλληλα τη μη θερμική της παστερίωση[35].

Την ικανότητα των πρωτεϊνών να σχηματίζουν πήγματα μετά από επεξεργασία με υπερυψηλή υδροστατική πίεση εκμεταλλεύτηκαν κάποιες ιαπωνικές εταιρίες παραγωγής surimi (πρωτεϊνικό υποκατάστατο ιχθυρών). Η πήξη του surimi με ΥΥΠ, σε πιέσεις γύρω στα 400MPa επιτρέπει την παραγωγή ενός προϊόντος με πολύ υψηλότερη οργανοληπτική ποιότητα, σε σχέση με πήγματα που δημιουργούνται με θερμική επεξεργασία. Ταυτόχρονα, πραγματοποιείται και μη θερμική παστερίωση. Ο συνδυασμός των δύο αυτών παραγόντων είναι πολύ ελκυστικός για τη βιομηχανία παραγωγής surimi.

Η ζελατινοποίηση του αμύλου επηρεάζεται από την πίεση. Η θερμοκρασία ζελατινοποίησης αυξάνεται περίπου κατά 3-5°C για κάθε αύξηση της πίεσης ανά 100MPa, γεγονός που οφείλεται στην σταθεροποίηση των δεσμών υδρογόνου υπό πίεση. Η ζελατινοποίηση του αμύλου με υπερυψηλή πίεση οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων με ιδιαίτερες ιδιότητες, διαφορετικές από αυτές του θερμικά ζελατινοποιημένου αμύλου. Οι κόκκοι του αμύλου διατηρούν τη δομή τους και συνεπώς το άμυλο παραμένει αδιαφανές, ενώ παράλληλα ζελατινοποιείται μερικώς[35],[28].

Η επίδραση της ΥΥΠ στο σημείο πήξης του νερού μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κατάψυξη και απόψυξη τροφίμων. Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 0°C, αύξηση της πίεσης οδηγεί σε ταπείνωση του σημείου πήξης του νερού επιτρέποντας την

ταχύτερη απόψυξη ή την αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες χωρίς πήξη του νερού. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι δύο κιλά κατεψυγμένου μοσχαρίσιου κρέατος αποψύχονται εντός 80 λεπτών σε πίεση 200MPa ενώ υπό ατμοσφαιρική πίεση η απόψυξη απαιτεί περίπου 7 ώρες. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του αποψυγμένου προϊόντος είναι ανώτερα σε σχέση με αυτά της απόψυξης σε ατμοσφαιρική πίεση [35].

Άλλες εφαρμογές της ΥΥΠ περιλαμβάνουν την ενίσχυση του αρώματος καρυκευμάτων [28] και τη βελτίωση της υφής προϊόντων κρέατος με αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου μαγειρέματος[35].

Κεφάλαιο 3 : Επίδραση της ΥΥΠ στα ένζυμα

3.1 Επίδραση της πίεσης στις βιοχημικές αντιδράσεις: Θερμοδυναμική θεώρηση

Σύμφωνα με την αρχή του Le Chatelier, η αύξηση της πίεσης σε ένα αντιδρών σύστημα ευνοεί τις αντιδράσεις που συνοδεύονται από μείωση του όγκου και αντίστοιχα μείωση της πίεσης τις αντιδράσεις που συνοδεύονται από αύξηση όγκου. Οι Hermans[42], Van Eldik [43] και Tauscher[44] ανέφεραν ότι σε σταθερή θερμοκρασία η μεταβολή της σταθεράς του ρυθμού των αντιδράσεων σε συνάρτηση με την πίεση εξαρτάται από ένα μέγεθος που ονομάζεται *όγκος ενεργοποίησης*, σύμφωνα με την παρακάτω σχέση (εξίσωση Eyring):

$$\left(\frac{d \ln k}{dP}\right)_T = -\left(\frac{V_a}{RT}\right) \quad (3.1)$$

Όπου k η σταθερά της αντίδρασης, P η πίεση, V_a ο όγκος ενεργοποίησης, R η σταθερά των αερίων και T η θερμοκρασία. Ο όγκος ενεργοποίησης εκφράζει ουσιαστικά την επίδραση της πίεσης στη σταθερά του ρυθμού της αντίδρασης και είναι αντίστοιχος της ενέργειας ενεργοποίησης στη σχέση Arrhenius που εκφράζει την εξάρτηση της σταθεράς της αντίδρασης από τη θερμοκρασία:

$$\left(\frac{d \ln k}{d(T)}\right)_P = \left(\frac{E_a}{RT^2}\right) \quad (3.2)$$

3.2 Επίδραση της πίεσης στις πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι ευαίσθητα μακρομόρια με χαρακτηριστική τρισδιάστατη διαμόρφωση στο χώρο. Η δομή αυτή συγκρατείται με δεσμούς μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που τις αποτελούν καθώς και με αλληλεπιδράσεις με το διαλύτη που τις περιβάλλει. Μεταβολές σε παραμέτρους όπως είναι η πίεση και η θερμοκρασία μπορούν να διαταράξουν τη δομή των πρωτεϊνών και να οδηγήσουν ακόμη και σε «ξετύλιγμα» της πολυπεπτιδικής αλυσίδας[27].

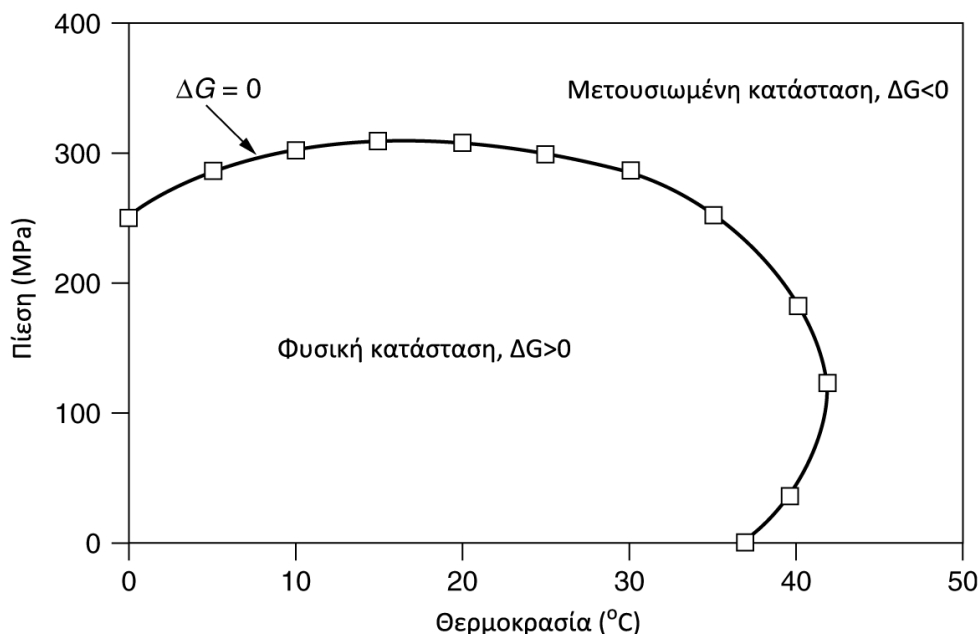
Πίνακας 3.1: Η επίδραση της πίεσης, P , και της θερμοκρασίας, T , στους δεσμούς και τις αλληλεπιδράσεις σχηματισμού των τεσσάρων δομών των πρωτεϊνών (✓: ευνοούνται, ✗: διαταράσσονται) (Πηγή:[45]).

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

Κατά την αύξηση της πίεσης οι πρωτεΐνες μπορούν να υποστούν μετουσίωση. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε φαινόμενα που προκαλούν μείωση του όγκου όπως είναι η σχάση των μη ομοιοπολικών δεσμών και η μεταβολή της χωροθέτησης των μορίων του διαλύτη. Σε χαμηλές θερμοκρασίες οι ομοιοπολικοί δεσμοί παραμένουν σχεδόν ανεπηρέαστοι από την αύξηση της πίεσης με αποτέλεσμα η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης να παραμένει αναλλοίωτη. Η δευτεροταγής δομή καταστρέφεται παρά μόνον σε υψηλές πιέσεις. Αυτό οφείλεται στο ότι οι δεσμοί υδρογόνου που σταθεροποιούν την δευτεροταγή δομή γίνονται σταθερότεροι σε χαμηλές πιέσεις αλλά καταστρέφονται σε πολύ υψηλές[28][27]. Μεταβολές στην τριτοταγή δομή (η οποία διατηρείται λόγω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και ιοντικών δεσμών) εμφανίζονται σε πιέσεις άνω των 200MPa. Η τεταρτοταγής δομή πολυτμηματικών πρωτεϊνών καταστρέφεται σε σχετικά χαμηλές πιέσεις (<150MPa) καθώς μόρια διαλύτη έρχονται σε επαφή με τμήματα της πρωτεΐνης που αρχικά αλληλεπιδρούσαν μεταξύ τους, με αποτέλεσμα ο όγκος του συστήματος να μειώνεται[27][28].

Γενικά, πιέσεις άνω των 200MPa οδηγούν σε μετουσίωση ολιγομερών πρωτεϊνών ενώ πιέσεις άνω των 300MPa απαιτούνται για τη μετουσίωση μονομερικών

πρωτεϊνών. Η μετουσίωση μπορεί να είναι αντιστρεπτή σε χαμηλές πιέσεις αλλά ο χρόνος που απαιτείται για να επανέλθει η δομή μπορεί να είναι μεγάλος. Η πίεση κατωφλίου πάνω από την οποία η μετουσίωση γίνεται αναντίστρεπτη εξαρτάται από το είδος της πρωτεΐνης.



Σχήμα 3.1: Διάγραμμα που απεικονίζει την επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας στη μετουσίωση των πρωτεϊνών (Προσαρμογή από Palou et al. [35])

3.3 Επίδραση της ΥΥΠ στα ένζυμα

Τα ένζυμα, όντας πρωτεΐνες με καταλυτική δράση, επηρεάζονται άμεσα από την πίεση. Η καταλυτική τους ενεργότητα εξαρτάται άμεσα από μια συγκεκριμένη περιοχή της δομής τους (ενεργό κέντρο), η οποία σχετίζεται άμεσα με την τριτοταγή και την τεταρτοταγή δομή. Συνεπώς, ακόμη και μια μικρή διαταραχή της δομής είναι πιθανόν να καταστρέψει το ενεργό κέντρο, απενεργοποιώντας το ένζυμο.

Η επίδραση της πίεσης στα ένζυμα μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες: σχετικά χαμηλές πιέσεις (περίπου 100MPa) είναι δυνατόν να προκαλέσουν ενεργοποίηση κάποιων μονομερικών ενζύμων. Αντίθετα, αρκετά υψηλές πιέσεις προκαλούν κατά κύριο λόγο απενεργοποίηση. Οι Miyagawa et al.[46] διέκριναν την απενεργοποίηση των ενζύμων σε τέσσερις κατηγορίες, ανάλογα με το ποσοστό και την αντιστρεπτότητα της απενεργοποίησης:

1. Πλήρης και αναντίστρεπτη απενεργοποίηση
2. Πλήρης και αντιστρεπτή απενεργοποίηση

3. Ατελής και αναντίστρεπτη απενεργοποίηση
4. Ατελής και αντιστρεπτή απενεργοποίηση

Η ενεργοποίηση κάποιων ενζύμων μπορεί να οφείλεται στη ρήξη των φυτικών ή ζωικών κυττάρων με αποτέλεσμα τα ένζυμα και τα υποστρώματά τους που βρίσκονταν σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα να έρχονται πλέον σε επαφή. Επιπλέον, ανάλογα με το αν η ενζυμική αντίδραση συνοδεύεται από μείωση ή αύξηση του όγκου του συστήματος, επιταχύνεται ή επιβραδύνεται αντίστοιχα από την πίεση[27].

Σχετικά με την απενεργοποίηση των ενζύμων, φαίνεται να υπάρχει μια κατώτατη πίεση κατωφλίου κάτω από την οποία δεν παρατηρείται απενεργοποίηση ή παρατηρείται ελάχιστη. Όταν η πίεση αυτή ξεπεραστεί, η ενζυμική απενεργοποίηση (εντός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος) αυξάνεται, έως ότου ολοκληρωθεί στη συγκεκριμένη πίεση. Το εύρος τιμών πίεσης στο οποίο παρατηρείται απενεργοποίηση εξαρτάται από το είδος του ενζύμου, το pH, το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται και τη θερμοκρασία. Σε κάποια ένζυμα υπάρχει μία ανώτατη τιμή πίεσης πάνω από την οποία αύξηση της πίεσης δεν οδηγεί σε περαιτέρω απενεργοποίηση (τρυψίνη, χυμοτρυψίνη, χυμοτρυψινογόνο). Αυτό έχει αποδοθεί στο γεγονός ότι ένα ποσοστό του ενζύμου μετατρέπεται αναντίστρεπτα στην ανενεργή μορφή του, ενώ ένα άλλο ποσοστό μετατρέπεται σε μία μορφή πολύ ανθεκτική στην πίεση. Με την άρση της επίδρασης της πίεσης, η ανθεκτική μορφή μετατρέπεται ξανά στη μορφή ισορροπίας ενώ η απενεργοποιημένη μορφή παραμένει[27].

3.3.1 Κινητική ενζυμικής απενεργοποίησης

3.3.1.i Μοντέλο νιοστής τάξης

Η απενεργοποίηση ενός ενζύμου σε συνάρτηση με το χρόνο επεξεργασίας, για σταθερή πίεση και θερμοκρασία, μπορεί να εκφραστεί γενικά από την κινητική εξίσωση νιοστής τάξης:

$$\frac{dA}{dt} = -kA^n \quad (3.3)$$

Η παραπάνω εξίσωση μπορεί να ολοκληρωθεί στην:

$$A = (A_0 + (n - 1)kt)^{\frac{1}{1-n}} \quad (3.4)$$

Όπου t ο χρόνος επεξεργασίας, A η ενεργότητα του ενζύμου στο χρόνο t , A_0 η ενεργότητα του ενζύμου στο χρόνο $t=0$, k η σταθερά της αντίδρασης απενεργοποίησης και n η τάξη της αντίδρασης απενεργοποίησης ($n \neq 1$).

3.3.1.ii Μοντέλο πρώτης τάξης

Η κινητική πρώτης τάξης περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\frac{dA}{dt} = -kA \quad (3.5)$$

Ολοκλήρωση της οποίας δίνει την εξίσωση που περιγράφει την μεταβολή της ενζυμικής ενεργότητας σαν συνάρτηση του χρόνου επεξεργασίας:

$$A = A_0 e^{-kt} \quad (3.6)$$

Η εξίσωση (3.6) μπορεί να γραμμικοποιηθεί ως εξής:

$$\ln A = \ln A_0 - kt \quad (3.7)$$

Έτσι χαράσσοντας το διάγραμμα του νεπερίου λογαρίθμου της ενζυμικής ενεργότητας με το χρόνο επεξεργασίας προκύπτει ευθεία με κλίση $-k$ και αποτέμνουσα $\ln A_0$.

3.3.1.iii Κλασματικό μοντέλο

Αν στο μοντέλο πρώτης τάξης αντικαταστήσουμε την ενεργότητα A με τη διαφορά $A - A_\infty$ προκύπτει:

$$\frac{d(A - A_\infty)}{dt} = -k(A - A_\infty) \quad (3.8)$$

Και μετά από ολοκλήρωση:

$$\frac{A - A_\infty}{A_0 - A_\infty} = e^{-kt} \quad (3.9)$$

Η ποσότητα A_∞ είναι σταθερά που εκφράζει την ενεργότητα που απομένει μετά από άπειρο χρόνο επεξεργασίας (residual activity). Συνεπώς το μοντέλο αυτό εφαρμόζεται σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν δύο μορφές του ενζύμου, μια ανθεκτική και μία ευαίσθητη, με αποτέλεσμα μετά την επεξεργασία η ευαίσθητη να απενεργοποιείται ενώ η ανθεκτική να μην επηρεάζεται δίνοντας έτσι υπόλειμμα ενεργότητας.

3.3.1.iv Χρόνος υποδεκαπλασιασμού και σταθερά Z_T

Η κινητική απενεργοποίησης 1^{ης} τάξης μπορεί να εκφραστεί και ως:

$$\ln \frac{A}{A_0} = 2.303 \log \left(\frac{A}{A_0} \right) = -kt \quad (3.10)$$

Από όπου λαμβάνεται:

$$\log \left(\frac{A}{A_0} \right) = -\frac{kt}{2.303} = -\frac{t}{D} \quad (3.11)$$

Και άρα:

$$D = \frac{2.303}{k} \quad (3.12)$$

Το μέγεθος D ονομάζεται χρόνος υποδεκαπλασιασμού και εκφράζει το χρόνο που απαιτείται για υποδεκαπλασιαστεί η ενεργότητα του ενζύμου. Όπως φαίνεται από τη σχέση (3.12), ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού μπορεί να υπολογιστεί κατευθείαν από τη σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στο χρόνο υποδεκαπλασιασμού μπορεί να εκφραστεί μέσω της σχέσης:

$$D = D_{T_{ref}} \cdot 10^{\frac{T_{ref}-T}{Z_T}} \quad (3.13)$$

Όπου $D_{T_{ref}}$ ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού στη θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} . Η σταθερά Z_T εκφράζει την αύξηση της θερμοκρασίας που απαιτείται για να υποδεκαπλασιαστεί ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού. Συνεπώς, μικρή τιμή της σταθεράς σημαίνει ότι μικρές μεταβολές της θερμοκρασίας αυξάνουν πολύ το ρυθμό απενεργοποίησης του ενζύμου.

Αντίστοιχα, η επίδραση της πίεσης στο χρόνο υποδεκαπλασιασμού εκφράζεται μέσω της σχέσης:

$$D = D_{P_{ref}} \cdot 10^{\frac{P_{ref}-P}{Z_P}} \quad (3.14)$$

Όπου $D_{P_{ref}}$ ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού στην πίεση αναφοράς P_{ref} . Η σταθερά Z_P εκφράζει την αύξηση της πίεσης που απαιτείται για να υποδεκαπλασιαστεί ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού. Συνεπώς, μικρή τιμή της σταθεράς σημαίνει ότι μικρές μεταβολές της πίεσης αυξάνουν πολύ το ρυθμό απενεργοποίησης του ενζύμου.

Τα μεγέθη D , Z_T και Z_P είναι αντίστοιχα των k , E_a και V_a . Η διαφορά τους έγκειται στην ευχέρεια των πρώτων να καθιστούν πιο αντιληπτή τη μεταβολή της ενζυμικής ενεργότητας καθώς και την επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης σε αυτήν.

Είναι σύνηθες τα μεγέθη αυτά να χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν κινητικές πρώτης τάξης απενεργοποίησης ενζύμων και μικροοργανισμών στις εφαρμογές επεξεργασίας τροφίμων. Τα μεγέθη k , E_a και V_a έχουν περισσότερο θερμοδυναμική χροιά και χρησιμοποιούνται περισσότερο για ερευνητικούς σκοπούς.

3.3.1.v Επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης στην ενζυμική απενεργοποίηση

Η θερμοκρασία και η πίεση επηρεάζουν την κινητική απενεργοποίησης μέσω της σταθεράς k . Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η σταθερά k εξαρτάται από τη θερμοκρασία μέσω της σχέσης Arrhenius (Εξίσωση (3.2)). Ολοκληρώνοντας την εξίσωση μεταξύ μιας θερμοκρασίας αναφοράς T_{ref} και της θερμοκρασίας T προκύπτει:

$$k = k_{ref} \exp \left[-\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (3.15)$$

Όπου k_{ref} η σταθερά της απενεργοποίησης στην θερμοκρασία T_{ref} , E_a η ενέργεια ενεργοποίησης και R η σταθερά των αερίων. Η εξίσωση μπορεί να γραμμικοποιηθεί ως εξής:

$$\ln k = \ln k_{ref} - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \quad (3.16)$$

Έτσι χαράσσοντας το διάγραμμα $\ln k$ ως προς $\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}$ προκύπτει ευθεία με κλίση $-\frac{E_a}{R}$ και αποτέμνουσα $\ln k_{ref}$.

Μεγάλη ενέργεια ενεργοποίησης σημαίνει ότι μικρές μεταβολές στη θερμοκρασία έχουν μεγάλη επίδραση στο ρυθμό απενεργοποίησης.

Αντίστοιχα, η επίδραση της πίεσης στη σταθερά k εκφράζεται μέσω της σχέσης του Eyring (Εξίσωση(3.1)). Ολοκλήρωση της σχέσης από μια πίεση αναφοράς P_{ref} στην πίεση P δίνει:

$$k = k_{ref} \exp \left[-\frac{V_a}{RT} (P - P_{ref}) \right] \quad (3.17)$$

Και αντίστοιχα η σχέση γραμμικοποιείται:

$$\ln k = \ln k_{ref} - \frac{V_a}{RT} (P - P_{ref}) \quad (3.18)$$

Μεγάλος όγκος ενεργοποίησης σημαίνει ότι μικρές μεταβολές στην πίεση οδηγούν σε μεγάλες μεταβολές του ρυθμού απενεργοποίησης. Σημασία έχει επίσης το πρόσημο του όγκου ενεργοποίησης. Αρνητικός όγκος ενεργοποίησης σημαίνει ότι ο ρυθμός απενεργοποίησης αυξάνεται αυξανομένης της πίεσης, ενώ θετικός όγκος

ενεργοποίησης σημαίνει ότι ο ρυθμός απενεργοποίησης μειώνεται αυξανόμενης της πίεσης.

3.3.1.vi Πολυπαραμετρικά κινητικά μοντέλα

Με βάση την εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από την πίεση και τη θερμοκρασία (Εξ. (3.15) και (3.17)) οι Polydera et al. [47] πρότειναν ένα πολυπαραμετρικό μοντέλο για την πηκτινομεθυλεστεράση χυμού πορτοκαλιών *Navel* που συνδυάζει την επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας. Από τα πειράματα που έγιναν βρήκαν ότι η ενέργεια ενεργοποίησης εξαρτάται από την πίεση μέσω εκθετικής σχέσης (Εξ. (3.19)) ενώ ο όγκος ενεργοποίησης εξαρτάται από τη θερμοκρασία μέσω γραμμικής σχέσης (Εξ. (3.20)).

$$E_a = E_{aP} \cdot \exp[-b(P - P_{ref})] \quad (3.19)$$

$$V_a = V_{aT} + a \cdot (T - T_{ref}) \quad (3.20)$$

Συνδυασμός των παραπάνω δίνει το σύνθετο εκθετικό μοντέλο:

$$k = k_{refP,T} \cdot \exp\left\{-\frac{E_{aP}}{R} \cdot \exp[-B \cdot (P - P_{ref})] \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) - \frac{A \cdot (T - T_{ref}) + V_{aT}}{RT} \cdot (P - P_{ref})\right\} \quad (3.21)$$

Όπου T (K) και P (MPa) η απόλυτη θερμοκρασία P_{ref} (MPa) και T_{ref} (K) η πίεση και η θερμοκρασία αναφοράς αντίστοιχα, $k_{refP,T}$ (min^{-1}) η σταθερά του ρυθμού στη θερμοκρασία και την πίεση αναφοράς, E_{aP} ($J mol^{-1}$) η ενέργεια ενεργοποίησης στην πίεση αναφοράς, V_{aT} ($ml mol^{-1}$) ο όγκος ενεργοποίησης στην θερμοκρασία αναφοράς, R ($J mol^{-1} K^{-1}$) η σταθερά των αερίων και A ($ml mol^{-1} K^{-1}$), B (MPa^{-1}) παράμετροι που εκφράζουν την επίδραση της θερμοκρασίας στον όγκο ενεργοποίησης και την επίδραση της πίεσης στην ενέργεια ενεργοποίησης αντίστοιχα. Οι παράμετροι του μοντέλου υπολογίζονται πειραματικά.

Οι Guyanarc'h et al. [48] χρησιμοποίησαν ένα πολυπαραμετρικό πολυωνυμικό μοντέλο για να εκφράσουν την συνδυασμένη επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας στον ρυθμό απενεργοποίησης ΠΜΕ από γκρέιπφρουτ. Το μοντέλο αυτό προέκυψε από το συνδυασμό της εξίσωσης του Eyring με θερμοδυναμικό μοντέλο που ανέπτυξε ο Hawley και περιέχει παραμέτρους με θερμοδυναμική σημασία.

$$\begin{aligned}
 \ln(k) = \ln(k_0) &- \frac{\Delta\kappa}{2RT}(P - P_0)^2 - \frac{2\Delta\zeta}{RT}(P - P_0)(T - T_0) \\
 &+ \frac{\Delta C_p}{RT} \cdot \frac{(T - T_0)^2}{2T_0} - \frac{\Delta V_0}{RT}(P - P_0) \\
 &+ \frac{\Delta S_0}{RT}(T - T_0) + \frac{\Delta\kappa_2}{2RT}(P - P_0)^3 \\
 &+ \frac{\Delta C_{p2}}{2RTT_0}(T - T_0)^3
 \end{aligned} \tag{3.22}$$

Όπου T (K) και P (MPa) η απόλυτη) η σταθερά του ρυθμού στη θερμοκρασία και την πίεση αναφοράς, ΔV_0 , ΔS_0 η μεταβολή του όγκου ($ml\ mol^{-1}$) και της εντροπίας ($J\ mol^{-1}\ K^{-1}$) αντίστοιχα, μεταξύ φυσικής και μετουσιωμένης διαμόρφωσης του ενζύμου, $\Delta\kappa$ ($cm^6\ J^{-1}\ mol^{-1}$) ο παράγοντας συμπιεστότητας, , $\Delta\zeta$ ($cm^3\ K^{-1}\ mol^{-1}$) ο παράγοντας θερμικής διαστολής, ΔC_p ($J\ K^{-1}\ mol^{-1}$) η ειδική θερμοχωρητικότητα, k η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης (min^{-1}) και R ($J\ mol^{-1}\ K^{-1}$) η σταθερά των αερίων. Οι παράμετροι προσδιορίζονται με μη γραμμική παλινδρόμηση σε πειραματικά δεδομένα.

3.4 Επίδραση της ΥΥΠ σε ένζυμα που σχετίζονται με την ποιότητα των τροφίμων

Τα βασικότερα ένζυμα που σχετίζονται με την ποιότητα των τροφίμων είναι τα εξής:

- *Πηκτινομεθυλεστεράση (PME)*: ευθύνεται για την μεταβολή της υφής φρούτων και λαχανικών, την απώλεια θολότητας σε φρουτοχυμούς και την μείωση του ιξώδους ρευστών τροφίμων.
- *Πολυγαλακτουρονάση (PG)*: μαζί με την πηκτινομεθυλεστεράση ευθύνεται για τη μεταβολή της υφής των φρούτων και των λαχανικών
- *Πολυφαινολική οξειδάση (PPO)*: είναι υπεύθυνη για το ενζυμικό μαύρισμα που υφίστανται πολλά φρούτα και λαχανικά όταν κόβονται
- *Περοξειδάση (PO)*: ευθύνεται για την εμφάνιση ανεπιθύμητων οσμών στα λαχανικά κατά την αποθήκευση.
- *Λιποξυγενάση (LOX)*: προκαλεί ανεπιθύμητες οσμές μέσω της οξείδωσης των λιπαρών.

3.4.1 Πολυφαινολική οξειδάση

Η πολυφαινολική οξειδάση είναι υπεύθυνη για το μαύρισμα που υφίστανται κομμένα ή τραυματισμένα φρούτα και λαχανικά. Αυτή η μεταβολή του χρώματος είναι μία από τις σημαντικότερες αιτίες ποιοτικής υποβάθμισης των τροφίμων που συμβαίνει κατά την επεξεργασία και αποθήκευσή τους. Συνεπώς, η

απενεργοποίηση του ενζύμου είναι ιδιαίτερα επιθυμητή. Πληθώρα εργασιών έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στην απενεργοποίηση της ΡΡΟ.

Η σχέση της ενεργότητας της ΠΦΟ με την πίεση είναι κάπως περίπλοκη. Ανάλογα με την προέλευση του ενζύμου, η πίεση μπορεί να απενεργοποιεί το ένζυμο ή να αυξάνει έντονα τη δραστικότητά του. Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης η σύσταση του υλικού στο οποίο βρίσκεται το ένζυμο, για παράδειγμα παράγοντες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά του ενζύμου υπό πίεση είναι η συγκέντρωση αλάτων και σακχάρων[28].

Οι Terefe et al. [49] πραγματοποίησαν πειράματα θερμικής απενεργοποίησης ΠΦΟ και απενεργοποίησης με ΥΥΠ σε πουρέ φράουλας των ποικιλιών Aroma και Festival. Η θερμική απενεργοποίηση της ΠΦΟ μετά από επεξεργασία στους 100°C για 30min δεν οδήγησε σε σημαντική ελάττωση της ενεργότητας του ενζύμου, αποδεικνύοντας τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου από τη συγκεκριμένη πηγή. Συνδυασμένη επεξεργασία με ΥΥΠ και θερμότητα σε πιέσεις από 100 έως 690MPa, θερμοκρασίες από 24 έως 90°C με χρόνους επεξεργασίας μεταξύ 5 και 15min οδήγησε σε μέγιστη απενεργοποίηση κατά 23% (στα 690MPa και 90°C), ποσοστό που δεν είναι επαρκές για να περιορίσει την ποιοτική υποβάθμιση. Σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία που αναφέρει ότι η ΠΦΟ από διάφορες πηγές, μεταξύ των οποίων η φράουλα, είναι πολύ ευαίσθητες στην πίεση, οι ερευνητές απέδειξαν ότι υπάρχουν και ΠΦΟ που είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές.

Οι Buckow et al.[50] ερεύνησαν την επίδραση της επεξεργασίας με ΥΥΠ και θερμότητα στην απενεργοποίηση ΠΦΟ σε χυμό μήλου. Οι ερευνητές βρήκαν ότι επεξεργασία σε πιέσεις 200-500MPa και θερμοκρασία δωματίου η ΠΦΟ παρουσίασε αύξηση δραστικότητας μέχρι και 65%. Για τη συγκεκριμένη εφαρμογή, ένα σύστημα παστερίωσης με ΥΥΠ σε θερμοκρασίες δωματίου θα πρέπει να υπερβαίνει τα 600MPa για να απενεργοποιήσει επιτυχώς την ΠΦΟ.

Παρόμοια αποτελέσματα συναντώνται και στην ΠΦΟ σε κομμάτια αχλαδιού. Συμπίεση στα 400MPa στους 25°C για 10min αυξάνει την ενεργότητα της ΠΦΟ περίπου 5 φορές, οδηγώντας σε ταχεία αμαύρωση[28].

3.4.2 Περοξειδάση

Η περοξειδάση (POD) είναι υπεύθυνη για αλλοιώσεις στη γεύση, το άρωμα και το χρώμα των φρούτων και των λαχανικών κατά την αποθήκευση. Είναι ένζυμο πολύ ανθεκτικό στη θερμοκρασία και στην πίεση και απαιτούνται πολύ υψηλές πιέσεις για την απενεργοποίησή της.

Οι Quaglia et al.[40] εξέτασαν την επίδραση της πίεσης στην απενεργοποίηση POD από πράσινα μπιζέλια. Επεξεργασία στα 900MPa και 5min σε συνδυασμό με

θέρμανση στους 60°C οδήγησε σε υπολειπόμενη ενεργότητα περοξειδάσης 12%. Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με χαμηλή καταστροφή βιταμίνης C και μικρές μόνο μεταβολές στην υφή, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η τεχνολογία της ΥΥΠ είναι πολλά υποσχόμενη ως τεχνική επεξεργασίας αντί του παραδοσιακού ζεματίσματος των λαχανικών.

Η μελέτη των Terefe et al.[49] σε πουρέ φράουλας από δύο ποικιλίες (Aroma και Festival) ως προς την περοξειδάση έδειξε ότι και στις δύο ποικιλίες το ένζυμο εμφανίζει ισοένζυμο τόσο ανθεκτικά όσο και ευαίσθητα στην πίεση. Σε πιέσεις κάτω των 400MPa το ένζυμο φάνηκε να σταθεροποιείται κάπως ως προς τη θερμική καταστροφή, ενώ σε πιέσεις άνω των 400MPa παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση πίεσης και θερμοκρασίας.

Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν και οι Garcia-Palazon et al.[51]. Σε πειράματα ΥΥΠ σε ολόκληρες φράουλες και κόκκινα βατόμουρα. Στις φράουλες η μέγιστη απενεργοποίηση ήταν 35% μετά από επεξεργασία στα 600 και 800MPa για 15min.

3.4.3 Πολυγαλακτουρονάση

Η πολυγαλακτουρονάση (PG) δρα παράλληλα με την πηκτινομεθυλεστεράση αποπολυμερίζοντας την πηκτίνη. Σε προϊόντα τομάτας ευθύνεται για τη μείωση του ιζώδους.

Οι Fachin et al.[52] πραγματοποίησαν πειράματα απενεργοποίησης της PG σε τοματοχυμό. Ενώ η απενεργοποίηση του ενζύμου με θερμική επεξεργασία έδειξε ότι υπάρχει θερμοάντοχο ισοένζυμο, η κινητική απενεργοποίησης με ΥΥΠ ήταν πρώτης τάξης. Για πιέσεις μεταξύ 200 και 550MPa, θερμοκρασίες μεταξύ 5 και 55°C και χρόνους επεξεργασίας μεταξύ 6 και 210min, η απώλεια ενεργότητας PG κυμάνθηκε μεταξύ 30 και 80%, ανάλογα με την πίεση επεξεργασίας. Το ένζυμο δεν επαναενεργοποιήθηκε υπό ψύξη ακόμη και μετά από 4 ημέρες. Παρόλα αυτά, διαπιστώθηκε ανταγωνιστική δράση πίεσης θερμοκρασίας σε πίεση 250MPa και θερμοκρασία 55°C, με αύξηση της πίεσης να μειώνει το ρυθμό απενεργοποίησης.

Αυτή τη σταθερότητα της PG σε χαμηλές πιέσεις την επιβεβαίωσαν και οι Rodrigo et al. [22] που μελέτησαν την επίδραση της πίεσης στην απενεργοποίηση PG που απομονώθηκε από διάφορες ποικιλίες τομάτας. Σε θερμοκρασία 25°C και για πιέσεις μέχρι 300MPa, τόσο το θερμοάντοχο όσο και το θερμοευαίσθητο ισοένζυμο δεν εμφανίζουν σημαντική απενεργοποίηση. Όσο η πίεση αυξάνεται όμως, και τα δύο ισοένζυμα απενεργοποιούνται με την πλήρη απενεργοποίηση να συμβαίνει στα 500MPa για χρόνο επεξεργασίας 15 min.

3.4.4 Λιποξυγενάση

Η λιποξυγενάση (LOX) καταλύει την οξυγόνωση των λιπαρών οξέων που περιέχουν μια ομάδα cis,cis-1,4-πενταδιενίου, προς τα αντίστοιχα υδροϋπεροξειδία. Σε μια

δευτερεύουσα αντίδραση διάσπασης παράγονται δύσοσμα προϊόντα. Η απενεργοποίηση με ΥΥΠ της LOX από σόγια έχει μελετηθεί εκτενώς.

Για την απενεργοποίηση λιποξυγενάσης από σόγια σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH=8.5 έχουν δοκιμασθεί διάφοροι συνδυασμοί πίεσης (μέχρι τα 750MPa) και θερμοκρασίας (0-75°C), και χρόνο επεξεργασίας 5min [27]. Η απενεργοποίηση περιγράφεται επαρκώς από κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης. Η σταθερότητα του ενζύμου στην πίεση είναι μέγιστη σε θερμοκρασία δωματίου ενώ τόσο αύξηση της πίεσης όσο και αύξηση της θερμοκρασίας οδηγούν σε αυξημένους ρυθμούς απενεργοποίησης. Η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από την πίεση είναι αρκετά υψηλή ($-70\text{cm}^3/\text{mol}$) και περίπου σταθερή σε θερμοκρασίες μεταξύ 10-40°C, ενώ σε θερμοκρασίες 40-65°C η επίδραση της πίεσης είναι αρκετά μειωμένη.

3.4.5 Πηκτινομεθυλεστεράση (PME)

Η πηκτινομεθυλεστεράση ανήκει στα ένζυμα του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών αλλά συναντάται και σε μικροοργανισμούς. Καταλύει την αντίδραση της απομεθοξυλίωσης των μορίων της πηκτίνης, επιφέροντας αλλαγές στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Ως προς την ποιότητα των τροφίμων, η PME συμμετέχει στην ωρίμανση των φρούτων και των λαχανικών και είναι υπεύθυνη για την απώλεια θολότητας των φρουτοχυμών. Στην τεχνολογία τροφίμων χρησιμοποιείται ευρέως για να αυξήσει την απόδοση σε χυμούς φρούτων, στη διαύγαση χυμών και κρασιού καθώς και σε εφαρμογές ενζυμικής επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών.

Το ευρύ φάσμα χρήσεων της PME καθιστά τη μελέτη των ιδιοτήτων της ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα. Η επίδραση της υψηλής υδροστατικής πίεσης στην απενεργοποίηση της PME από διάφορες πηγές έχει μελετηθεί διεξοδικά τόσο σε πρότυπα συστήματα όσο και στα ίδια τα φρούτα ή τα λαχανικά. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα μερικών από τις μελέτες αυτές.

3.4.5.i Καρότο

Οι Sila et al. [53] απομόνωσαν και μελέτησαν την επίδραση της ΥΥΠ και της θερμότητας στην απενεργοποίηση PME καρότου. Το ένζυμο παρατηρήθηκε να είναι σταθερό για θερμοκρασίες μέχρι τους 50°C αλλά η ευαισθησία του αυξάνεται απότομα πάνω από αυτή τη θερμοκρασία. Στους 60°C για χρόνο επεξεργασίας 15min το 95% της ενζυμικής ενεργότητας χάθηκε. Σε σχέση με άλλες πηγές η PME καρότου είναι αρκετά θερμοευαίσθητη.

Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της θερμοκρασίας σε εύρος 20-65°C και της πίεσης σε εύρος 0.1-500MPa. Σε ατμοσφαιρική πίεση η ενεργότητα του ενζύμου διπλασιάζεται από τους 20 στους 50°C, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες το ένζυμο απενεργοποιείται. Σε υψηλές πιέσεις η δραστηριότητα επίσης αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 50°C στα 500MPa. Το φαινόμενο αυτό έχει

παρατηρηθεί και σε ΠΜΕ από τομάτα και πορτοκάλι. Στους 55°C η ενεργότητα αυξάνεται αυξανόμενης της πίεσης μέχρι τα 300MPa. Περαιτέρω αύξηση της πίεσης οδηγεί σε μειωμένη ενζυμική ενεργότητα.

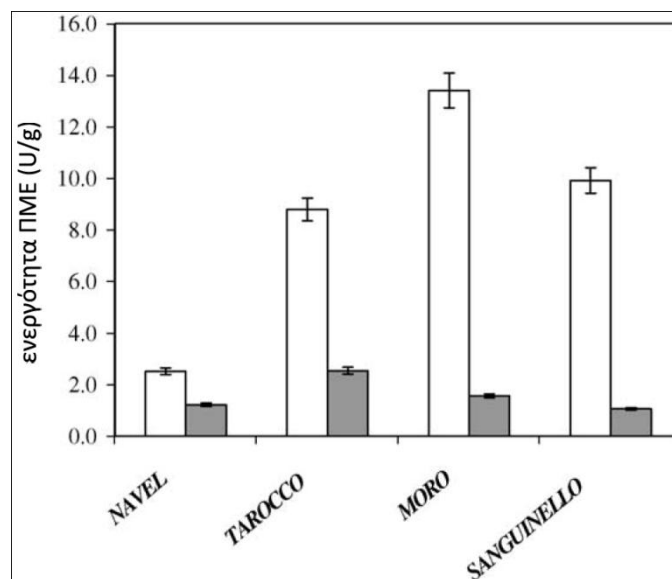
Η εξίσωση Eyring περιγράφει ικανοποιητικά την επίδραση της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης και η εξίσωση Arrhenius την επίδραση της θερμοκρασίας. Η μεταβολή της ενέργειας ενεργοποίησης με την πίεση φαίνεται να διέπεται από κάποια τυχαιότητα η οποία δεν μπόρεσε να ερμηνευθεί.

Πίνακας 3.2: Όγκοι και ενέργειες ενεργοποίησης όπως προέκυψαν από τα πειράματα των Sila et al. για ΠΜΕ καρότου (Πηγή:[53])

Θερμοκρασία (°C)	όγκος ενεργοποίησης (cm ³ /mol)	Πίεση (MPa)	Ενέργεια ενεργοποίησης (kJ/mol)
30	-6.29	0.1	48.92
40	-7.80	200	31.60
45	-7.4	300	60.12
50	-6.98	400	47.20
55	-5.73	500	81.43

3.4.5.ii Χυμός πορτοκαλιού

Οι Ingallinera et al. [54] Πραγματοποίησαν πειράματα θερμικής απενεργοποίησης ΠΜΕ σε πολτό και χυμό κόκκινων πορτοκαλιών των ποικιλιών Sanguinello, Moro, και Tarocco και συνέκριναν τα αποτελέσματά τους με αυτά από πορτοκάλια *Navel*.



Σχήμα 3.2: Ενεργότητα ΠΜΕ όπως προσδιορίστηκε στον πολτό (λευκές ράβδοι) και στο χυμό (γκρίζες ράβδοι) στις διάφορες ποικιλίες πορτοκαλιών. Ο πολτός εμφάνισε μεγαλύτερη ενεργότητα, μαρτυρώντας την πρόσδεση του ενζύμου στα κυτταρικά τοιχώματα των ινών (Πηγή:[54]).

Οι θερμοκρασίες στις οποίες υπεβλήθησαν τα δείγματα χυμού και πολτού ήταν 70-85°C για διάφορα χρονικά διαστήματα. Οι χρόνοι υποδεκαπλασιασμού στους 75°C στις ποικιλίες *Navel* και *Sanguinello* εμφάνισαν μεγάλες διαφορές μεταξύ χυμού και πολτού, με την ΠΜΕ στον πολτό να είναι πιο θερμοευαίσθητη.

Πίνακας 3.3: κινητικές παράμετροι για την απενεργοποίηση ΠΜΕ από διάφορες ποικιλίες πορτοκαλιού, στο χυμό και στον πολτό από τα πειράματα των *Ingallinera et al.* (Προσαρμογή από:[54]).

Παράμετρος	Κλάσμα	<i>Navel</i>	<i>Tarocco</i>	<i>Moro</i>	<i>Sanguinello</i>
D₇₅ (min)	<i>Χυμός</i>	14.0	3.4	2.6	11.7
	<i>Πολτός</i>	1.2	1.7	2.6	0.9
z (°C)	<i>Χυμός</i>	21.5	34.7	17.2	16.7
	<i>Πολτός</i>	6.1	20.0	12.1	5.0

Οι Nienaber et al. [55] πραγματοποίησαν πειράματα απενεργοποίησης ΠΜΕ σε χυμό πορτοκαλιών *Florida* χρησιμοποιώντας ΥΥΠ. Τα πειράματα έγιναν σε πιέσεις 400, 500, και 600MPa, θερμοκρασίες 25, 37.5 και 50°C και χρόνους επεξεργασίας 0 έως 30min. Η απενεργοποίηση της ΠΜΕ βρέθηκε να ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης, ενώ η επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης περιγράφεται ικανοποιητικά από τις εξισώσεις Arrhenius και Eyring αντίστοιχα.

Η κινητική μελέτη έδειξε ότι ο ρυθμός απενεργοποίησης αυξάνεται αυξανόμενης της πίεσης και της θερμοκρασίας. Αύξηση της θερμοκρασίας από 25 σε 37.5°C για σταθερή πίεση αύξησε το ρυθμό απενεργοποίησης για κάθε τιμή πίεσης. Εφαρμογή πίεσης 400MPa για 15min στους 25°C απενεργοποίησε το 25.1% της συνολικής ενεργότητας ΠΜΕ. Σε θερμοκρασία 37.5°C και ατμοσφαιρική πίεση, επεξεργασία για 15min μείωσε την ενεργότητα της ΠΜΕ κατά 10.1%. Συνδυασμός πίεσης 400MPa και θερμοκρασίας 37.5°C οδήγησε σε μείωση ενεργότητας κατά 35.1%. Τα αποτελέσματα αυτά δεν δείχνουν συνεργιστική δράση πίεσης και θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση της ΠΜΕ.

Πίνακας 3.4: Μεταβολή της δραστηριότητας ΠΜΕ για διάφορες πιέσεις και θερμοκρασίες, όπως προκύπτουν από τα πειράματα των Nienaber et al. για χυμό πορτοκαλιού Florida (Πηγή:[55]).

T (°C)	P (MPa)	t (min)	Υπολειπόμενη δραστηριότητα ΠΜΕ (%)	Απενεργοποιημένη ΠΜΕ (%)
37.5	0.1	15	89.9	10.1
25	400	15	74.9	25.1
37.5	400	15	64.9	35.1
50	0.1	12	65.0	35.0
25	400	12	78.3	21.7
50	400	12	50.1	49.9

Πίνακας 3.5: Κινητικά δεδομένα για την απενεργοποίηση ΠΜΕ από χυμό πορτοκαλιού Florida όπως προκύπτουν από τα πειράματα των Nienaber et al. (Πηγή:[55])

P (MPa)	T (°C)	k (min ⁻¹)
400	25	0.0197
	37.5	0.0292
	50	0.0505
500	25	0.0907
	37.5	0.1363
	50	0.1786
600	25	0.3308
	37.5	0.3890
	50	0.5048

Από τα αποτελέσματα (Πίνακας 3.6) φαίνεται ότι η ενέργεια ενεργοποίησης μειώνεται σημαντικά με την πίεση, συνεπώς ο ρυθμός απενεργοποίησης επηρεάζεται λιγότερο από τη θερμοκρασία σε υψηλές πιέσεις. Οι αρνητικοί όγκοι ενεργοποίησης δείχνουν ότι αύξηση της πίεσης αυξάνει το ρυθμό απενεργοποίησης. Μικρή μείωση του (απόλυτου) όγκου ενεργοποίησης παρατηρείται με αύξηση της θερμοκρασίας, η επίδραση δηλαδή της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης σε υψηλές θερμοκρασίες γίνεται μικρότερη.

Πίνακας 3.6: αποτελέσματα κινητικών παραμέτρων για τα πειράματα των Nienaber et al. (προσαρμογή από: [55])

P (MPa)	E _a (kJ/mol)	Z _T (K)	T (°C)	V _a (cm ³ /mol)	Z _P (MPa)
400	30.1	61	25	-35.0	164
500	21.8	85	37.5	-33.3	179
600	13.5	135	50	-30.9	200

Σε πειράματα που έγιναν σε χυμό ποικιλίας Navel [56], εφαρμόστηκαν πιέσεις από 100 έως 700MPa και θερμοκρασίες 30, 40, 50 και 60°C, για διάφορους χρόνους επεξεργασίας.

Πίνακας 3.7: Σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ σε χυμό πορτοκαλιού Navel για επεξεργασία σε διάφορες πιέσεις και θερμοκρασίες (Πηγή: [56])

P (MPa)	30°C	40°C	50°C	60°C
100	0.0014	0.0014	0.0190	0.0825
250	0.0017	0.0083	0.0790	0.1843
400	0.1057	-	0.3341	4.0772
500	0.351	0.3823	1.3503	7.2721
600	0.4096	0.6925	1.8736	8.4041
700	2.2848	-	-	-
750	-	2.2787	6.2623	20.242
800	-	4.952	-	-

Από τις κινητικές σταθερές παρατηρείται η συνεργιστική δράση πίεσης και θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης, αφού τόσο αύξηση της πίεσης όσο και αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρουν αύξηση του ρυθμού απενεργοποίησης.

Η επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης περιγράφεται ικανοποιητικά από την εξίσωση Arrhenius και Eyring αντίστοιχα. Η ενέργεια ενεργοποίησης μειώνεται αυξανόμενης της πίεσης, η επίδραση της θερμοκρασίας, δηλαδή, στο ρυθμό απενεργοποίησης γίνεται ασθενέστερη σε υψηλότερες πιέσεις. Αντίστοιχα, παρατηρείται μείωση του (απόλυτου) όγκου ενεργοποίησης με τη θερμοκρασία, σε υψηλότερες δηλαδή θερμοκρασίες η επίδραση της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης γίνεται ασθενέστερη.

Πίνακας 3.8: Ενέργειες ενεργοποίησης και όγκοι ενεργοποίησης για την ΠΜΕ χυμού πορτοκαλιού Navel ($T_{ref}=30^{\circ}\text{C}$, $P_{ref}=100\text{MPa}$) (Πηγή:[56])

Πίεση επεξεργασίας (MPa)	E_a (kJ/mol)	Θερμοκρασία (°C)	V_a (cm ³ /mol)
100	177.072	30	-36.74
250	134.920	40	-22.41
500	127.395	50	-19.8
600	107.891	60	-14.6
750	94.530		

Σε πειράματα θερμικής απενεργοποίησης ΠΜΕ σε χυμό σαγκουινίου [57], σε θερμοκρασίες από 40 έως 50°C, η απενεργοποίηση της ΠΜΕ ακολουθεί κλασματική κινητική πρώτης τάξης, φανερώνοντας την ύπαρξη δύο ισοενζύμων. Μετά την καταστροφή του θερμοευαίσθητου ισοενζύμου, παρατηρείται μια υπολειπόμενη ενεργότητα ίση με το 13% της αρχικής ενεργότητας.

Πίνακας 3.9: Σταθερές ρυθμού θερμικής απενεργοποίησης ΠΜΕ χυμού σαγκουινίου σε διάφορες θερμοκρασίες και ενέργειες ενεργοποίησης ($T_{ref}=45^{\circ}\text{C}$) (Πηγή: [57])

Θερμοκρασία (°C)	k (min ⁻¹)
40	0.0203
42.5	0.0439
45	0.1020
47.5	0.2657
50	0.4787
$E_a=273.1 \text{ kJ/mol}$	

Πειράματα ΥΥΠ σε πιέσεις 100-500MPa και θερμοκρασίες 20, 30 και 40min έδειξαν μία συνεργιστική σχέση πίεσης-θερμοκρασίας. Οι όγκοι ενεργοποίησης προέκυψαν αρνητικοί, αύξηση της πίεσης δηλαδή αυξάνει το ρυθμό απενεργοποίησης. Η επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης περιγράφεται ικανοποιητικά από την εξίσωση Arrhenius και Eyring αντίστοιχα. Η ενέργεια ενεργοποίησης αυξάνεται αυξανόμενης της πίεσης, η επίδραση της θερμοκρασίας, δηλαδή, στο ρυθμό απενεργοποίησης γίνεται εντονότερη σε υψηλότερες πιέσεις. Αντίστοιχα, παρατηρείται αύξηση του (απόλυτου) όγκου ενεργοποίησης με τη θερμοκρασία, σε υψηλότερες δηλαδή θερμοκρασίες η επίδραση της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης γίνεται εντονότερη.

Πίνακας 3.10: Σταθερές ρυθμού απενεργοποίησης ΠΜΕ χυμού σαγκουινιού για τις διάφορες θερμοκρασίες και πιέσεις του πειράματος. Αναγράφονται επίσης οι όγκοι και οι ενέργειες ενεργοποίησης (Προσαρμογή από [57])

T (°C) P (MPa)	20	30	40	E _a (kJ/mol) (T _{ref} =30°C)
100	0.0047	0.0087	0.0144	42.72
200	0.0126	0.0149	0.0406	44.24
300	0.0272	0.0651	0.1724	70.33
400	0.1099	0.2729	0.812	76.14
500	0.3847	1.3819	0.812	86.95
V_a (cm³/mol) (P_{ref}=300MPa)	-26.8	-32.75	-36.69	-

3.4.5.iii Μπανάνα

Οι Ly Nguyen et al. [58] πραγματοποίησαν πειράματα θερμικής απενεργοποίησης και απενεργοποίησης με ΥΥΠ σε ΠΜΕ από μπανάνα (καθαρή μορφή, σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 20mM pH=7). Οι μελετώμενες θερμοκρασίες ήταν από 35 έως 80°C και ο χρόνος επεξεργασίας 5min για κάθε συνθήκη. Η απενεργοποίηση βρέθηκε να ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης. Στους 70°C, η ενεργότητα μειώθηκε στο 50% ενώ στους 75°C χάθηκε πάνω από το 90% της ενεργότητας. Η εξάρτηση του ρυθμού απενεργοποίησης εκφράστηκε από την εξίσωση Arrhenius και η ενέργεια ενεργοποίησης προέκυψε 379.4 kJ/mol.

Τα πειράματα πίεσης πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία 10°C και σε πιέσεις μεταξύ 600 και 700MPa. Η απενεργοποίηση βρέθηκε ότι ακολουθεί κλασματικό μοντέλο πρώτης τάξης, πιστοποιώντας την ύπαρξη δύο ισοενζύμων, ενός ανθεκτικού και ενός ευαίσθητου στην πίεση.

Πίνακας 3.11: κινητικά δεδομένα απενεργοποίησης ΠΜΕ μπανάνας σε θερμοκρασία 10°C, για διάφορες πιέσεις, όπως προέκυψαν από τα πειράματα των Ly Nguyen et al. (Πηγή:[58])

Πίεση (MPa)	k (min ⁻¹)	A _∞ (%)
600	0.0031	9.4
625	0.0054	6.5
650	0.0103	6.9
700	0.0376	8.1
V _a =-59.2 cm ³ /mol		

3.4.5.iv Φράουλα

Πειράματα των Ly Nguyen et al. [59] Έδειξαν ότι η απενεργοποίηση με ΥΥΠ ΠΜΕ φράουλας (καθαρή μορφή, σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris-HCl, pH=7) ακολουθεί κινητική κλασματικού μοντέλου πρώτης τάξης, με το ανθεκτικό στην πίεση συνένζυμο να συνεισφέρει κατά 10% στη συνολική δραστηριότητα. Οι πιέσεις που εφαρμόστηκαν ήταν από 850-1000MPa σε θερμοκρασία 10°C για διάφορους χρόνους επεξεργασίας.

Πίνακας 3.12: Κινητικές παράμετροι απενεργοποίησης ΠΜΕ φράουλας σε θερμοκρασία 10°C όπως προέκυψαν από τα πειράματα των Nguyen et al. (Πηγή:[59])

Πίεση (MPa)	k (min ⁻¹)	A _∞ (%)
850	0.0131	9.4
925	0.0177	11.6
1000	0.0260	9.2
V _a =-10.77 cm ³ /mol		

Οι ερευνητές πραγματοποίησαν και πειράματα θερμικής απενεργοποίησης σε θερμοκρασίες 54-63°C. Η απενεργοποίηση βρέθηκε να ακολουθεί κλασματικό μοντέλο πρώτης τάξης με το θερμοάντοχο ένζυμο να συνεισφέρει κατά 12% στη συνολική ενεργότητα.

Κεφάλαιο 4 : Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών και ενζύμων

4.1 Εισαγωγή

Οι πηγές των ενζύμων είναι οι σύνθετοι ιστοί των ζωικών και φυτικών οργανισμών καθώς και τα κύτταρα των μικροοργανισμών. Στα πολύπλοκα αυτά συστήματα συναντώνται εκατοντάδες διαφορετικά ένζυμα, καθένα από τα οποία συμμετέχει σε μία ή περισσότερες βιοχημικές αντιδράσεις. Έτσι είναι αδύνατη η μελέτη της δομής και των ιδιοτήτων των ενζύμων όταν αυτά βρίσκονται ανάμεσα σε άλλες δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες. Κρίνεται επομένως απαραίτητη η απομόνωση και ο καθαρισμός τους. Μόνο μετά από μελέτη των ενζύμων σε καθαρή μορφή είναι προσοδοφόρα η μελέτη τους σε πιο σύνθετα συστήματα. Ο καθαρισμός και η απομόνωση μπορεί να αποκαλύψει πληθώρα πληροφοριών σχετικά με το ίδιο το ένζυμο αλλά και με το σύστημα από το οποίο προήλθε.

Ο καθαρισμός των ενζύμων δεν είναι ποτέ απόλυτα τέλειος. Πάντοτε υπάρχουν στο τελικό ενζυμικό συμπύκνωμα προσμίξεις που μπορεί να είναι εκατομμύρια μόρια διαφορετικών ειδών. Αυτό αποτελεί σπανίως πρόβλημα, εκτός εάν οι ουσίες αυτές αλληλεπιδρούν σημαντικά με το ίδιο το ένζυμο.

Η διαδικασία του καθαρισμού αποτελείται από πολλά στάδια κομβικής σημασίας τα οποία καθορίζουν και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Ο σχεδιασμός και η αλληλουχία τους υπαγορεύεται από τις ιδιότητες του προς καθαρισμού ενζύμου και έχει τελικά σαν στόχο την μεγιστοποίηση του λόγου ενζυμικής ενεργότητας προς τη συνολική πρωτεΐνη. Γενικά τα διάφορα στάδια απομόνωσης και καθαρισμού πρωτεϊνών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν παρακάτω:

- *Προκαταρκτικές προετοιμασίες:* περιλαμβάνουν την οργάνωση του εργαστηρίου, τη συλλογή των κατάλληλων σκευών και αντιδραστηρίων, την επιλογή διαλυτών και την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων.

- *Σχεδιασμός απομόνωσης και καθαρισμού:* αρχικά πρέπει να εκτιμηθεί ποια θα είναι η χρήση του τελικού ενζυμικού προϊόντος, ποια είναι η πηγή του, ποια η επιθυμητή τελική καθαρότητα και πως θα ληφθεί το εκχύλισμα από την πηγή.
- *Διαδικασία μέτρησης ενζυμικής ενεργότητας (enzyme assay):* η μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας είναι ίσως το σημαντικότερο βήμα καθώς επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας του καθαρισμού και την ταυτοποίηση του ενζύμου.
- *Διαδικασία προσδιορισμού συνολικής πρωτεΐνης:* επιτρέπει τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε κάθε στάδιο του καθαρισμού. Σε συνδυασμό με την παραπάνω μέθοδο μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας είναι δυνατός ο προσδιορισμός του βαθμού καθαρότητας του ενζύμου.
- *Αρχικά στάδια καθαρισμού:* περιλαμβάνουν μεθόδους καθαρισμού που έχουν ως στόχο την απομάκρυνση μη πρωτεϊνικών προσμίξεων ή και μέρος των πρωτεϊνών που δε σχετίζονται με το ένζυμο.
- *Μέθοδοι συμπύκνωσης και απομάκρυνσης διαλυτών προσμίξεων:* περιλαμβάνουν μεθόδους για την αφαίρεση διαλυτών προσμίξεων και τη συμπύκνωση των πρωτεϊνικών διαλυμάτων που είναι συχνά απαραίτητα βήματα πριν την εφαρμογή χρωματογραφικών μεθόδων διαχωρισμού.
- *Μέθοδοι υψηλής καθαρότητας:* περιλαμβάνουν χρωματογραφικές μεθόδους με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και συχνά αρκετά μικρότερες παραγωγικότητες. Οι μέθοδοι αυτές οδηγούν σε άριστους διαχωρισμούς και προσδίδουν στο τελικό ενζυμικό παρασκεύασμα την επιθυμητή καθαρότητα.

4.2 Προκαταρκτικές προετοιμασίες και σχεδιασμός

Προτού ξεκινήσει ο καθαρισμός ενός ενζύμου, πρέπει πρώτα να απαντηθούν κάποια βασικά ερωτήματα σχετικά με την ποσότητα και την ποιότητα της πρωτεΐνης που απαιτείται καθώς και να ληφθούν υπόψη βασικές ιδιότητες της πρωτεΐνης που θα επηρεάσουν το σχεδιασμό της διαδικασίας καθαρισμού.

4.2.1 Επιλογή της πηγής ενζύμων

Η πηγή από την οποία θα απομονωθεί το ένζυμο πρέπει να επιλεγεί με προσοχή. Οι διάφορες πηγές διαφέρουν ως προς την ποσότητα ενζύμου που περιέχουν και ενδέχεται να περιέχουν ένζυμα που καταλύουν ακριβώς τις ίδιες αντιδράσεις αλλά κατά τα άλλα παρουσιάζουν πολύ μεγάλες διαφορές.

Η πηγή του ενζύμου πρέπει να επιλεγεί έτσι ώστε να περιέχει όσο το δυνατόν περισσότερο ένζυμο σε ενεργή μορφή. Ένα μοναδικό ένζυμο σπανίως αποτελεί

πάνω από το 1% της πηγής από την οποία προέρχεται, από το οποίο χάνεται σημαντικά μεγάλο ποσοστό κατά τον καθαρισμό. Συνεπώς, η επιλογή της βέλτιστης πηγής ως προς την ποσότητα ενζύμου είναι καθοριστική για την παραλαβή επαρκούς ποσότητας αυτού σε καθαρή μορφή.

4.2.2 Ιδιότητες και ευαισθησίες της πρωτεΐνης

Αρχικά θα πρέπει να εκτιμηθεί εάν η πρωτεΐνη είναι διαλυτή, και αν όχι, εάν υπάρχει κάποια ουσία που μπορεί να τη διαλυτοποιήσει. Πρέπει να ελεγχθεί η σταθερότητά της στο pH, τη θερμοκρασία, και στην παρουσία αλάτων και αν είναι ευαίσθητη στην οξείδωση. Βιβλιογραφική ανασκόπηση ή και προκαταρκτικά πειράματα μπορεί να κριθούν απαραίτητα ώστε να προσδιοριστεί ποιες ουσίες είναι απαραίτητες κατά τον καθαρισμό, ποιες πρέπει να αποφευχθούν και υπό ποιες συνθήκες πρέπει να αποθηκεύεται το τελικό προϊόν[60].

4.2.3 Χρήση της καθαρής πρωτεΐνης

Ανάλογα με τη χρήση του τελικού προϊόντος πρέπει να εκτιμηθεί η ποσότητα και η ποιότητα που απαιτείται. Η ποσότητα μπορεί να κυμαίνεται από μερικά μικρογραμμάρια για πειράματα ταυτοποίησης ή μερικά κιλά για φαρμακευτικές εφαρμογές μεγαλύτερης κλίμακας.

Στην περίπτωση μελέτης ενζύμων ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται στο να διατηρηθεί το ένζυμο ενεργό καθ' όλη τη διαδικασία ώστε να μπορέσει να μελετηθεί η καταλυτική του δράση. Σημαντικό ρόλο παίζει η συγκέντρωση του ενζύμου στο τελικό παρασκεύασμα. Πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ενζύμων ενδέχεται να μην μπορούν να ανιχνευθούν με κάποια μέθοδο μέτρησης ενεργότητας (enzyme assay)[60].

4.2.4 Πρόσθετες ουσίες

Πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε πρόσθετες ουσίες που αναμειγνύονται στα ρυθμιστικά διαλύματα εκχύλισης, αποθήκευσης και μέτρησης ενεργότητας της πρωτεΐνης. Πολλές φορές επιβάλλεται η χρήση κάποιων ουσιών που είναι γνωστό ότι θα βελτιώσουν τη σταθερότητα της πρωτεΐνης ή θα εμποδίσουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών στο διάλυμα αποθήκευσης. Τέλος, μπορεί στα πρωτεϊνικά διαλύματα να προϋπάρχουν ουσίες που είτε θα καταστρέψουν τη δομή της πρωτεΐνης ή θα παρεμποδίσουν κάποιο από τα στάδια καθαρισμού. Τέτοιες ουσίες όπως είναι τα βαρέα μέταλλα και το οξυγόνο πρέπει να απομακρυνθούν από το διάλυμα άμεσα.

Πίνακας 4.1: Πρόσθετες ουσίες σε διαλύματα πρωτεϊνών (Προσαρμογή από [60])

Είδος ουσίας	Παραδείγματα	Σκοπός
Ρυθμιστικό διάλυμα	Tris-HCl, HEPES-NaOH, οξικό νάτριο, φωσφορικό κάλιο	Σταθερότητα
Άλας	KCl, NaCl, (NH ₄) ₂ SO ₄	Σταθερότητα
ιονικά απορρυπαντικά	Sodium deoxycholate, sodium cholate	Σταθερότητα, διαλυτότητα
μη ιονικά απορρυπαντικά	Triton X-100, Tween 20	Σταθερότητα
γλυκερόλη, σακχαρόζη		Σταθερότητα, αποθήκευση κάτω από 0°C χωρίς πήξη
αζίδιο του νατρίου (NaN ₃)		βακτηριοστατικό
χηλειωτές μετάλλων	EDTA, EGTA	Σταθερότητα
αναγωγικοί παράγοντες	β-μερκαπτοαιθανόλη, TCEP	Σταθερότητα, μείωση δισουλφιδικών δεσμών
παρεμποδιστές πρωτεασών	PMSF, TPCK, TLCK	Σταθερότητα

4.2.5 Ο πίνακας προόδου του καθαρισμού

Κατά τη διάρκεια του καθαρισμού ιδιαίτερα χρήσιμος είναι ο πίνακας προόδου, ο οποίος συνοψίζει τα βασικά στάδια της διαδικασίας και επιτρέπει τη συγκεντρωτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων κάθε σταδίου. Ο αναγνώστης του πίνακα μπορεί να διακρίνει ποια στάδια ήταν αποδοτικά και ποια όχι καθώς και να παρακολουθήσει την ποσοτική πορεία του καθαρισμού. Ο πίνακας πρέπει να περιέχει πληροφορίες όπως:

- *Κύρια βήματα του καθαρισμού:* αναγράφονται βήματα όπως το ανεπεξέργαστο εκχύλισμα, η φυγοκέντρωση, η καταβύθιση, η υπερδιήθηση, και οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί
- *Ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης (mg):* αυτή μετράται συνήθως με τη φασματομετρική μέθοδο της χρώσης Bradford.
- *Συνολική ενεργότητα (Units ή mg):* στην περίπτωση ενεργών πρωτεϊνών όπως είναι τα ένζυμα πρέπει μετά από κάθε στάδιο να προσδιορίζεται η ενεργότητα που παρελήφθη με κάποια μέθοδο μέτρησης ενεργότητας (enzyme assay). Σε μη ενεργές πρωτεΐνες, η ποσότητα της επιθυμητής πρωτεΐνης προσδιορίζεται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και χρώση με Coomassie blue.
- *Ειδική ενεργότητα (U/mg):* υπολογίζεται διαιρώντας τη συνολική ενεργότητα με την συνολική ποσότητα πρωτεΐνης.
- *Συνολική απόδοση (%):* προσδιορίζεται διαιρώντας την ενεργότητα κάθε βήματος με την ενεργότητα του πρώτου βήματος καθαρισμού και εκφράζει ουσιαστικά την ενεργότητα που ανακτήθηκε σε κάθε βήμα.
- *Καθαρότητα της επιθυμητής πρωτεΐνης (%):* προσδιορίζεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και χρώση Coomassie blue. Υπολογίζεται από το κλάσμα ποσού χρώσης της επιθυμητής πρωτεΐνης προς τα κλάσματα ποσού χρώσης των υπόλοιπων πρωτεϊνών-προσμίξεων. Αν η μέθοδος προσδιορισμού της ενεργότητας είναι αξιόπιστη και είναι βέβαιο ότι η τελική πρωτεΐνη είναι καθαρή, μπορεί να προσδιοριστεί η % καθαρότητα για όλα τα προηγούμενα βήματα[61].

4.3 Αρχικά στάδια καθαρισμού

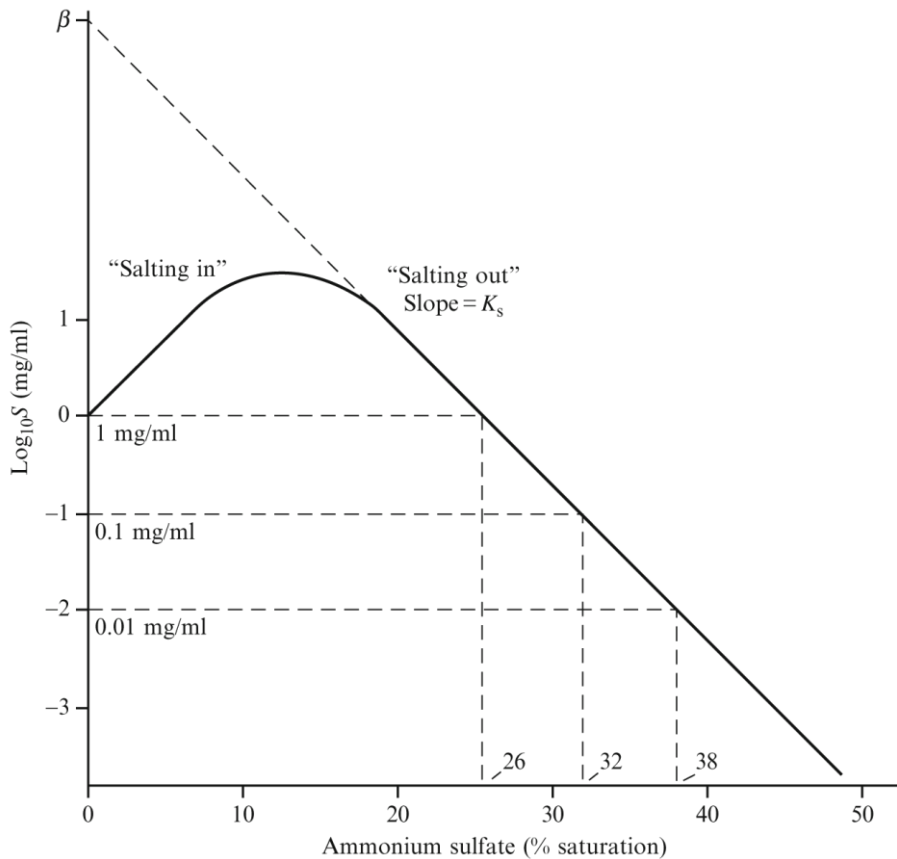
Οι μέθοδοι αυτές έχουν ως στόχο αρχικά να απομακρύνουν μεγάλα αδιάλυτα σωματίδια από τα εκχυλίσματα ιστών, να απομακρύνουν διαλυτές προσμίξεις (όπως άλατα) αλλά και να πραγματοποιήσουν μία πρώτη κλασμάτωση ως προς τις διάφορες πρωτεΐνες που περιέχονται στο μείγμα.

4.3.1 Καταβύθιση πρωτεϊνών

Η καταβύθιση ή κατακρήμνιση (precipitation) ή εξαλάτωση (salting out) πρωτεϊνών εφαρμόζεται μετά τη λύση των κυττάρων με σκοπό μία πρώτη κλασμάτωση και συμπύκνωση των επιθυμητών πρωτεϊνών. Η μέθοδος στηρίζεται στη μείωση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης με διάλυση κάποιου συστατικού στο εκχύλισμα, με αποτέλεσμα την καταβύθιση της. Οι τρεις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι η καταβύθιση με θειικό αμμώνιο, η καταβύθιση με οργανικούς διαλύτες και η καταβύθιση με πολυαιθυλενιμίνη (PEI)[62].

4.3.1.i Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο

Η χρήση του θειικού αμμωνίου ((NH₄)₂SO₄) για την καταβύθιση είναι πολύ συνήθης, κυρίως επειδή το συγκεκριμένο άλας έχει μεγάλη διαλυτότητα στο νερό, προσφέρει σταθερότητα στην πρωτεϊνική δομή και διατίθεται εμπορικά σε μεγάλη καθαρότητα και σχετικά χαμηλό κόστος.



Διάγραμμα 4.1: Τυπική καμπύλη μεταβολής του λογαρίθμου της διαλυτότητας πρωτεΐνης με τη συγκέντρωση θειικού αμμωνίου (Πηγή:[62]).

Στο Διάγραμμα 4.1 φαίνεται μια καμπύλη διαλυτότητας για μια υποθετική πρωτεΐνη. Στον κατακόρυφο άξονα αναγράφεται ο δεκαδικός λογάριθμος της διαλυτότητας της πρωτεΐνης ενώ στον οριζόντιο η περιεκτικότητα σε θειικό αμμώνιο (% του κορεσμού). Διακρίνονται δύο περιοχές: μία σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος, όπου ο λογάριθμος της διαλυτότητας αυξάνεται (salting in), και μία για υψηλές συγκεντρώσεις όπου ο λογάριθμος της διαλυτότητας μειώνεται (salting out). Το γραμμικό τμήμα της καμπύλης περιγράφεται από την εξίσωση $\log S = \beta - K_s \left(\frac{r}{2}\right)$, όπου S η διαλυτότητα της πρωτεΐνης (mg/mL), β και K_s σταθερές που εξαρτώνται από την πρωτεΐνη και Γ/2 η ιοντική ισχύς. Η σταθερά K_s εκφράζει το γραμμικό τμήμα της καμπύλης ενώ η σταθερά β την αποτέμνουσα για μηδενική ιοντική ισχύ. Οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν παρόμοιες τιμές K_s, διαφέρουν ωστόσο σημαντικά στις τιμές β.

Για ένα εκχύλισμα με περιεχόμενη πρωτεΐνη 1mg/mL, η οποία ακολουθεί την παραπάνω υποθετική καμπύλη, αύξηση της συγκέντρωσης του θειικού αμμωνίου στο 26% του κορεσμού θα διατηρήσει την πρωτεΐνη εν διαλύσει. Εάν ωστόσο αυξηθεί η συγκέντρωση στο 32% του κορεσμού, 90% της πρωτεΐνης θα καταβυθιστεί. Θα ήταν επομένως απαραίτητο να αυξηθεί αρχικά η συγκέντρωση στο 26%, ώστε να απομακρυνθούν με φυγοκέντρωση τα συστατικά που καταβυθίζονται στη συγκέντρωση αυτή και κατόπιν να αυξηθεί η συγκέντρωση σε 32% και να καταβυθιστεί η επιθυμητή πρωτεΐνη.

Η παραπάνω καμπύλη συνήθως δεν είναι γνωστή. Εάν δεν υπάρχουν δεδομένα για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη από προηγούμενα πειράματα, θα πρέπει να διεξαχθούν δοκιμές για να προσδιοριστεί η κατάλληλη συγκέντρωση θειικού αμμωνίου που καταβυθίζει τουλάχιστον το 90% της πρωτεΐνης. Οι δοκιμές γίνονται σε δείγματα μικρού όγκου, καθένα από τα οποία περιέχει διαφορετική συγκέντρωση θειικού αμμωνίου. Μετά από φυγοκέντρωση των δειγμάτων, προσδιορίζεται ποια συγκέντρωση έχει τη μικρότερη περιεκτικότητα (ή ενεργότητα) επιθυμητής πρωτεΐνης στο υπερκείμενο υγρό[62].

4.3.1.ii Καταβύθιση με οργανικούς διαλύτες

Προσθήκη οργανικών διαλυτών σε χαμηλές θερμοκρασίες (κάτω από 0°C) μπορεί να καταβυθίσει τις πρωτεΐνες. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως ακετόνη και αιθανόλη. Η μέθοδος στηρίζεται στη μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς του διαλύματος. Η διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης συναρτήσσει της διηλεκτρικής σταθεράς ακολουθεί τη σχέση:

$$\log\left(\frac{S}{S_0}\right) = -\frac{K}{D_s^2} \quad (4.1)$$

Όπου S η διαλυτότητα της πρωτεΐνης και D_s η διηλεκτρική σταθερά. Μείωση της σταθεράς αυτής προκαλεί αύξηση στην ένταση των ηλεκτροστατικών δυνάμεων που ασκούνται μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων διευκολύνοντας την καταβύθισή τους. Ακόμη, οι οργανικοί διαλύτες ελαττώνουν τις αλληλεπιδράσεις των μορίων του νερού με την πρωτεΐνη μειώνοντας τη διαλυτότητά της[62][63].

Τα περισσότερα ένζυμα μετουσιώνονται τάχιστα παρουσία οργανικών διαλυτών σε θερμοκρασία δωματίου. Η θερμοκρασία της διαδικασίας πρέπει επομένως να διατηρείται πάντα χαμηλή και οι διαλύτες να προστίθενται σταδιακά [63].

4.3.1.iii Καταβύθιση με πολυαιθυλενιμίνη

Η πολυαιθυλενιμίνη (PEI) είναι ένα κατιοντικό πολυμερές που προκύπτει από τον πολυμερισμό της αιθυλενιμίνης και έχει μοριακό βάρος μεταξύ 30-90kDa. Η PEI είναι θετικά φορτισμένη σε διαλύματα με ουδέτερο pH. Έχει την ιδιότητα να προσδένεται στοιχειομετρικά σε αρνητικά φορτισμένα μακρομόρια, όπως τα

νουκλεϊκά οξέα, σχηματίζοντας ένα πλέγμα το οποίο καταβυθίζεται και μπορεί να διαχωριστεί με φυγοκέντρηση.

Η πρόσδεση όξινων πρωτεϊνών στην PEI εξαρτάται από τη συγκέντρωση άλατος. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl (κοντά στο 0.1M) μια ελαφρά όξινη πρωτεΐνη θα προσδεθεί στο πολυμερές, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (0.4M NaCl) η πρωτεΐνη θα παραμείνει διαλυμένη στο υπερκείμενο υγρό. Αντίθετα, μία έντονα όξινη πρωτεΐνη θα προσδεθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος και θα διαλυθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος. Διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης συνοδεύεται από παράλληλη διαλυτοποίηση της PEI, καθιστώντας απαραίτητη την απομάκρυνσή της.

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για την καταβύθιση νουκλεϊκών οξέων, αφήνοντας εν διαλύσει όλες τις πρωτεΐνες, ή για την καταβύθιση νουκλεϊκών οξέων και όξινων πρωτεϊνών, αφήνοντας εν διαλύσει μόνο τις αλκαλικές πρωτεΐνες[62].

4.3.2 Συμπύκνωση πρωτεϊνικών διαλυμάτων και αφαίρεση διαλυτών συστατικών

Προτού ο καθαρισμός προχωρήσει στα στάδια υψηλής καθαρότητας (χρωματογραφικοί διαχωρισμοί) είναι απαραίτητο να αφαιρεθούν από το πρωτεϊνικό διάλυμα διαλυτές προσμίξεις όπως τα άλατα και οι χρωστικές που ενδέχεται να βλάψουν τον εξοπλισμό. Επιλέον, οι όγκοι των διαλυμάτων πρέπει να μειωθούν γιατί οι ογκομετρικοί ρυθμοί των χρωματογραφικών διαχωρισμών είναι συνήθως χαμηλοί.

4.3.2.i Διαπίδυση

Διαπίδυση ονομάζεται ο διαχωρισμός μορίων με βάση το μέγεθος με επιλεκτική διάχυση μέσω ημιπερατής μεμβράνης. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για να απομακρύνει διαλυμένες ουσίες μικρού μοριακού βάρους ($100 < MB < 500$) από πρωτεϊνικά διαλύματα. Η καταλληλότητά της οφείλεται στις ήπιες συνθήκες επεξεργασίας της.

Το δείγμα τοποθετείται σε κυψέλη και έρχεται σε επαφή με την μία επιφάνεια της ημιπερατής μεμβράνης διαπίδυσης. Η άλλη επιφάνεια είναι σε επαφή με ρυθμιστικό διάλυμα, ο όγκος του οποίου είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν του δείγματος. Η μεμβράνη διαθέτει πόρους με συγκεκριμένο μέγεθος, επιτρέποντας τη διέλευση μόνο των μορίων που έχουν μέγεθος μικρότερο από των πόρων. Η διαφορά συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος κατά μήκος της μεμβράνης λειτουργεί ως η κινητήρια δύναμη με αποτέλεσμα οι διαλυμένες ουσίες του δείγματος, πλην των μακρομορίων, να διαχέονται διαμέσου της μεμβράνης προς χαμηλότερες συγκεντρώσεις, δηλαδή από το δείγμα στο διάλυμα. Η μεταφορά μάζας περιγράφεται από το νόμο του Fick:

$$J = -D \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right) \quad (4.2)$$

Όπου J η ροή της διαπίδυσης [(ποσό ουσίας)L²T⁻¹], D ο συντελεστής διάχυσης [L²T⁻¹], C η συγκέντρωση διάχυσης [(ποσό ουσίας)L⁻³] και x η απόσταση κατά μήκος της μεμβράνης [L].

Η διαπίδυση είναι ιδιαίτερα αποδοτική όταν ο όγκος του διαλύματος διαπίδυσης είναι πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με το δείγμα. Αυτό εξασφαλίζει ότι οι διαλυτές ουσίες που διαπερνούν τη μεμβράνη αραιώνονται πολύ και η κινητήριος διαφορά συγκέντρωσης παραμένει περίπου σταθερή. Το διάλυμα αυτό μπορεί επίσης να ανανεώνεται περιοδικά για τον ίδιο λόγο.

Η απόδοση της διεργασίας εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως τη μορφολογία, την επιφάνεια της μεμβράνης και τη θερμοκρασία. Η ροή μάζας κατά μήκος της μεμβράνης μπορεί να αυξηθεί αυξάνοντας την επιφάνεια, ωστόσο για μικρούς όγκους δείγματος υπάρχει κίνδυνος να προσροφηθεί μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης στη μεμβράνη. Αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει το ρυθμό μεταφοράς μάζας, αλλά πολύ υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να μετουσιώσουν την πρωτεΐνη[64].

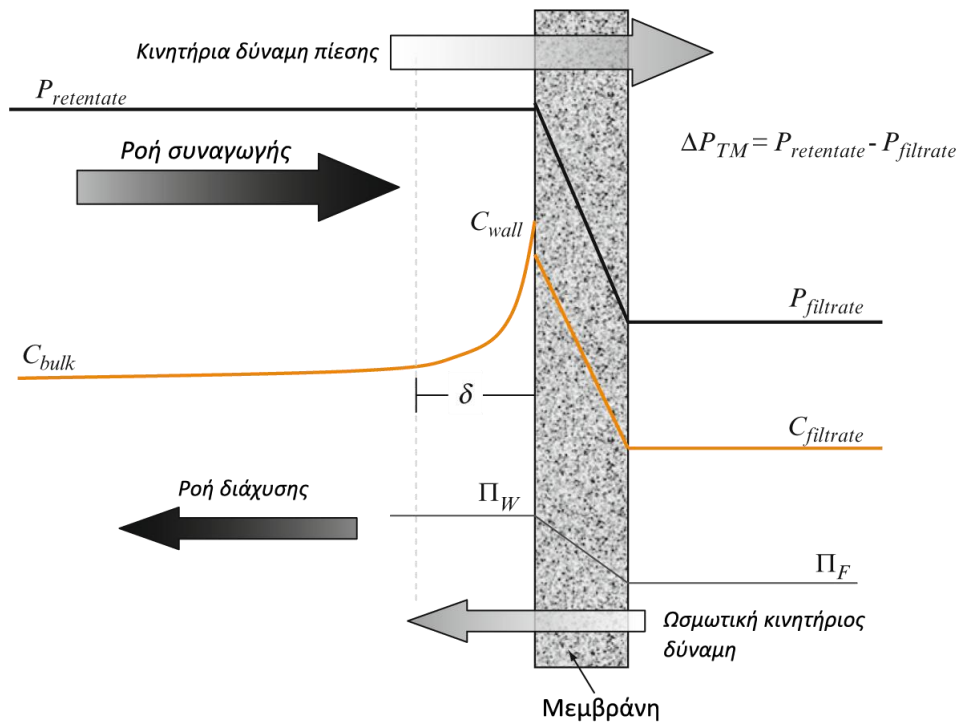
4.3.2.ii Υπερδιήθηση

Η υπερδιήθηση λειτουργεί με μηχανισμό κατά βάση αντίστοιχο με αυτόν της διαπίδυσης, διαχωρίζοντας το δείγμα από το διάλυμα με ημιπερατή μεμβράνη. Η μεμβράνη επιτρέπει τη διέλευση ουσιών μικρού μοριακού βάρους αποτρέποντας τη διέλευση μακρομορίων. Η μέθοδος ενδείκνυται για τη συμπύκνωση ενζυμικών διαλυμάτων επειδή μπορεί να λειτουργήσει σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και δεν προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών. Οι τρεις βασικές διαφορές από τη διαπίδυση είναι:

- *Η εφαρμογή:* η διαπίδυση χρησιμοποιείται για την ανταλλαγή διαλυτών και την αφαίρεση διαλυμένων ουσιών. Η υπερδιήθηση επιπροσθέτως χρησιμοποιείται και για συμπύκνωση δειγμάτων.
- *Η αρχή λειτουργίας:* ενώ στη διαπίδυση η μεταφορά μάζας γίνεται με απλή διάχυση, στην υπερδιήθηση κινητήριος δύναμη είναι η εφαρμογή πίεσης.
- *Η κατασκευή της μεμβράνης:* οι μεμβράνες της υπερδιήθησης είναι πιο ανθεκτικές ώστε να μπορούν να αντέχουν αυξημένες πιέσεις. Συνήθως κατασκευάζονται από κυτταρίνη ή σύνθετα πολυμερικά υλικά.

Η εφαρμογή πίεσης στη μία πλευρά της μεμβράνης προκαλεί εξαναγκασμένη συναγωγή μάζας, μεταφέροντας διαλύτη και διαλυμένες ουσίες διαμέσου της μεμβράνης. Εάν το μέγεθος των μακρομορίων είναι μεγαλύτερο από τους πόρους της μεμβράνης, τότε αυτά δεν διαπερνούν τη μεμβράνη και σχηματίζουν ένα

στρώμα πήγματος στην επιφάνειά της. Η συγκέντρωση στην επιφάνεια της μεμβράνης αυξάνεται, μειώνοντας τη ροή του διηθήματος. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται πόλωση συγκέντρωσης. Η τοπική αύξηση της συγκέντρωσης μειώνει τη ροή διηθήματος με δύο μηχανισμούς. Η αυξημένη συγκέντρωση στην πλευρά της τροφοδοσίας προκαλεί διαφορά ωσμωτικής πίεσης, μεταφέροντας διαλύτη από το διήθημα στην τροφοδοσία (παρακράτημα) και μειώνοντας τη ροή διηθήματος. Επίσης, διαλυμένη ουσία διαχέεται από την επιφάνεια της μεμβράνης πίσω στον κύριο όγκο του διαλύματος. Τέλος, το πήγμα που σχηματίζεται προσθέτει μια υδραυλική αντίσταση στη ροή μειώνοντας τη ροή του διηθήματος[65][64].



Σχήμα 4.1: Σχηματική αναπαράσταση των φαινομένων μεταφοράς μάζας κατά την υπερδιήθηση (Προσαρμογή από [64]).

Η ογκομετρική ροή του διηθήματος διαμέσου της μεμβράνης μπορεί να εκφραστεί από μια τροποποιημένη σχέση Hagen-Poiseuille:

$$J = \frac{D^2 \varepsilon}{32L\tau\mu} (\Delta P_{TM} - \Delta \Pi) \quad (4.3)$$

Όπου J η ογκομετρική ροή του διηθήματος ανά μονάδα επιφάνειας της μεμβράνης ($\text{m}^3/\text{m}^2\text{s}$), D η μέση ισοδύναμη διάμετρος των πόρων (m), ε το κλάσμα των πόρων ανά μονάδα επιφάνειας, L το πάχος της μεμβράνης, ο διορθωτικός παράγοντας του πάχους της μεμβράνης και μ το ιξώδες του διηθήματος (Pa s)[65].

Επειδή τα μεγέθη αυτά είναι δύσκολο να μετρηθούν, ενσωματώνονται σε ένα μέγεθος που ονομάζεται υδροδυναμική αντίσταση της μεμβράνης, R_M , ή το

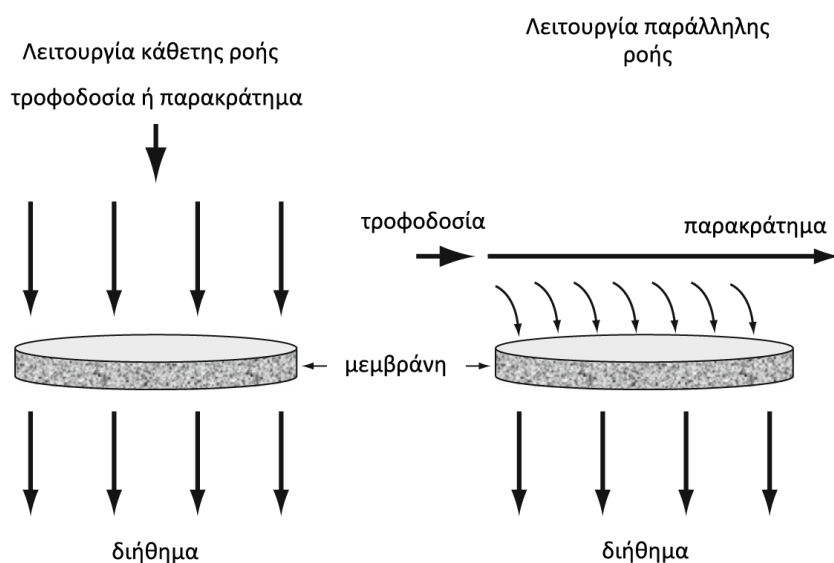
αντίστροφο που καλείται διαπερατότητα, Q_M . Η υδροδυναμική αντίσταση προσδιορίζεται πειραματικά με τη διέλευση καθαρού νερού, οπότε ισχύει:

$$J = \frac{\Delta P_{TM}}{R_M} = \Delta P_{TM} \cdot Q_M \quad (4.4)$$

Εφόσον είναι γνωστή η ροή του διηθήματος κατά την υπερδιήθηση ενός διαλύματος, μπορεί να υπολογιστεί μέσω της υδροδυναμικής αντίστασης η κινητήρια δύναμη $\Delta P_{TM} - \Delta \Pi$:

$$J = Q_M \cdot \frac{\mu_{νεροϋ}}{\mu} (\Delta P_{TM} - \Delta \Pi) = \frac{1}{R_M} \cdot \frac{\mu_{νεροϋ}}{\mu} (\Delta P_{TM} - \Delta \Pi) \quad (4.5)$$

Για την αποφυγή ή τη μείωση σχηματισμού πηγματος στην επιφάνεια της μεμβράνης, η τροφοδοσία μπορεί να διαβιβαστεί παράλληλα στη μεμβράνη (λειτουργία παράλληλης ροής), όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Η λειτουργία αυτή επιτρέπει επίσης τη συμπύκνωση των πρωτεϊνικών διαλυμάτων, αν το παρακράτημα ανακυκλώνεται ως τροφοδοσία.



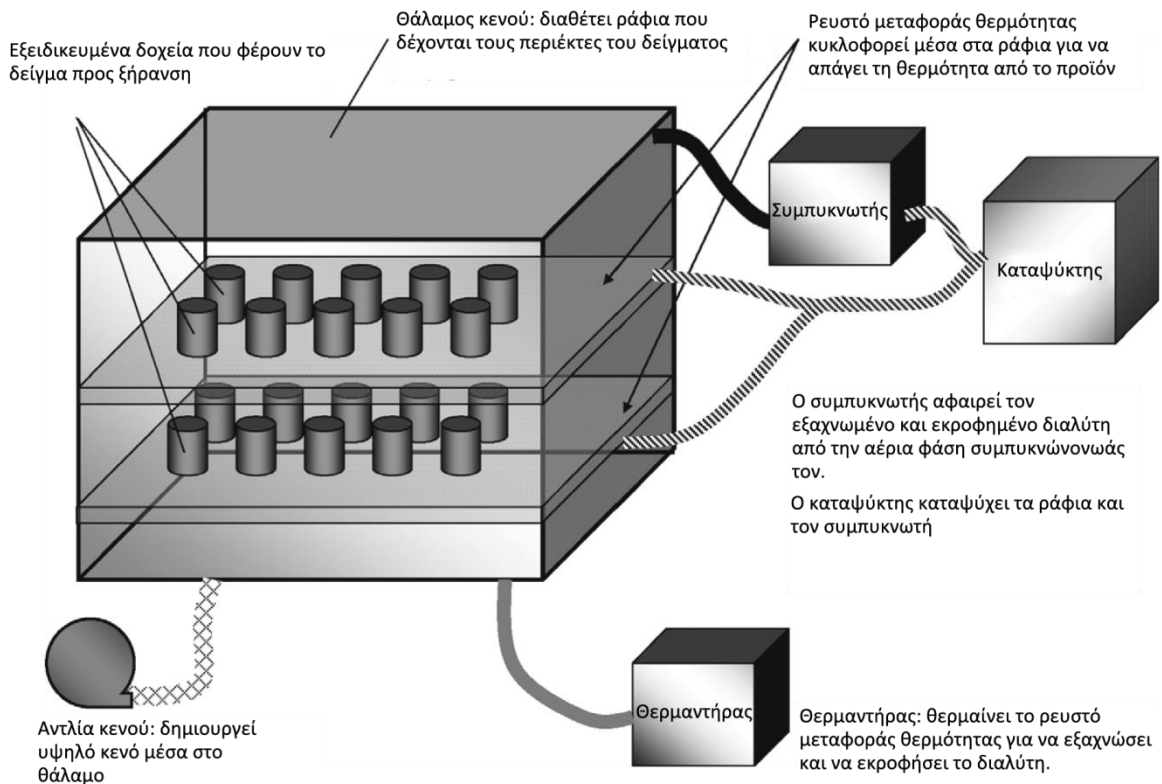
Σχήμα 4.2: Σχηματική απεικόνιση των δύο διατάξεων μεμβράνης υπερδιήθησης (Προσαρμογή από [64])

4.3.2.iii Λυοφιλίωση

Η λυοφιλίωση χρησιμοποιείται συχνά για τη συμπύκνωση ή την ξήρανση πρωτεϊνών που είναι ευαίσθητες στη θερμική αποδιάταξη. Η μέθοδος στηρίζεται στην

εξάχνωση του διαλύτη σε χαμηλή θερμοκρασία και συνθήκες κενού. Στα πρωτεϊνικά διαλύματα προστίθενται σταθεροποιητικές ουσίες που εξασφαλίζουν τη διατήρηση της δομής μετά την ξήρανση[64][63]. Η μέθοδος αποτελείται από τρία στάδια:

- *κατάψυξη*: το δείγμα τοποθετείται στο θάλαμο του ξηραντήρα και η θερμοκρασία μειώνεται μέχρι την πήξη του διαλύτη. Ο ρυθμός κατάψυξης μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα της περιεχόμενης πρωτεΐνης. Αργός ρυθμός κατάψυξης ευνοεί το σχηματισμό μεγάλων κρυστάλλων πάγου, γεγονός που διευκολύνει τη διεργασία αλλά αυξάνει την πιθανότητα μετουσίωσης της πρωτεΐνης.
- *Πρωτογενής ξήρανση*: στο στάδιο αυτό αφαιρείται περίπου το 80% του διαλύτη. Αυτό επιτυγχάνεται με μείωση της πίεσης του θαλάμου σε σημείο ώστε ο διαλύτης να μεταβαίνει απευθείας από τη στερεά στην αέρια κατάσταση. Ο υπόλοιπος διαλύτης παραμένει ροφημένος στο προϊόν ως υγρασία.
- *Δευτερογενής ξήρανση*: ο υπόλοιπος διαλύτης εκροφάται από το δείγμα και η υγρασία του μειώνεται σε τέτοιο βαθμό ώστε να αποτραπεί η μικροβιακή ανάπτυξη. Οι πρωτεΐνες συνήθως απαιτούν την παρουσία υγρασίας για τη διατήρηση της δομής και της ενεργότητάς τους.



Σχήμα 4.3: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών μερών του εξοπλισμού λιοφίλλωσης (Προσαρμογή από [64]).

4.4 Χρωματογραφικές μέθοδοι

Ως χρωματογραφικές μεθόδους ορίζει η IUPAC το σύνολο των τεχνικών που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των συστατικών ενός δείγματος, στις οποίες τα συστατικά κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, η μία από τις οποίες είναι στατική και η άλλη κινείται (κινητή φάση). Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή ή υγρή υποστηριζόμενη από ένα στερεό ή ένα πήγμα και μπορεί να είναι πακτωμένη σε στήλη ή τοποθετημένη ως στιβάδα ή υμένιο.

Ανάλογα με την επιλογή των δύο φάσεων και τη φύση των δυνάμεων που καθορίζουν την κατανομή των συστατικών ανάμεσα στις φάσεις, διακρίνονται διάφορα είδη χρωματογραφίας όπως η χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής, η χρωματογραφία μοριακής διήθησης, η χρωματογραφία συγγένειας και άλλες.

Το σύνολο των τεχνικών αυτών χρησιμοποιείται ευρέως στον καθαρισμό πρωτεϊνών, επειδή μπορεί να επιτευχθεί διαχωρισμός με μεγάλη διακριτική ικανότητα, ανάλογα με εγγενείς ιδιότητές τους.

4.4.1 Χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής

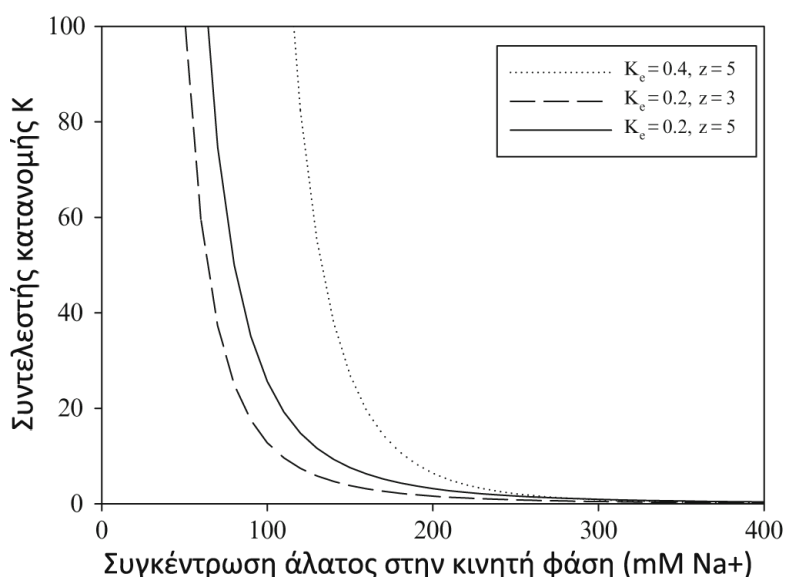
Η χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής είναι η πιο διαδεδομένη χρωματογραφική τεχνική για το διαχωρισμό πρωτεϊνών. Επιτυγχάνει διαχωρισμούς πολύ υψηλής διακριτικής ικανότητας και προσφέρει παράλληλα μεγάλη συμπύκνωση των δειγμάτων. Οι συνθήκες της μεθόδου (θερμοκρασία, συγκέντρωση αλάτων, pH) είναι σχετικά ήπιες, επιτρέποντας την ανάκτηση πρωτεϊνών στην φυσιολογική τους διαμόρφωση[63][66].

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην έλξη αντίθετα φορτισμένων μορίων. Η πρωτεΐνη φέρει επιφανειακό φορτίο ανάλογα με το ισοηλεκτρικό της σημείο και με το pH του περιβάλλοντος. Η ουσία ιοντοεναλλαγής αποτελείται από μία μήτρα, συνήθως από πορώδη σωματίδια. Στη μήτρα αυτή ακινητοποιείται κάποια ουσία, είτε θετικά είτε αρνητικά φορτισμένη. Για βελτίωση της απόδοσης η ουσία μπορεί να είναι ένα φορτισμένο πολυμερές ενοφθαλισμένο στη μήτρα. Ανάλογα με το φορτίο της ουσίας ιοντοεναλλαγής η μέθοδος διακρίνεται σε χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής ή ανιοντοεναλλαγής. Μια πρωτεΐνη είναι αρνητικά φορτισμένη πάνω από το ισοηλεκτρικό της σημείο και προσδένεται σε θετικά φορτισμένη στατική φάση ενώ είναι θετικά φορτισμένη κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο και προσδένεται σε μια αρνητικά φορτισμένη στατική φάση. Συνεπώς, μια πρωτεΐνη με υψηλό ισοηλεκτρικό σημείο θα διαχωριστεί με χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής. Η ουσία ιοντοεναλλαγής μπορεί να συμπεριφέρεται ως βάση ή οξύ. Μία ισχυρά βασική ή όξινη ουσία ιοντοεναλλαγής δε μεταβάλλει το φορτίο της για ένα ευρύ φάσμα τιμών pH[66].

Η πρόσδεση μιας πρωτεΐνης στην ουσία ιοντοεναλλαγής συμβαίνει σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος ενώ η έκλυση σε υψηλές. Αν K είναι ο συντελεστής κατανομής της πρωτεΐνης μεταξύ στατικής και κινητής φάσης και z ο αριθμός των θέσεων που μπορεί να συνδεθεί η πρωτεΐνη στη στατική φάση, η εξάρτησή του από τη συγκέντρωση άλατος εκφράζεται από τη σχέση:

$$\log K = \log(K_e q_0^z) - z \cdot \log(Na^+) \quad (4.6)$$

Όπου η σταθερά K_e εκφράζει τη συγγένεια της πρωτεΐνης στη στατική φάση, και q_0 η ικανότητα ιοντοεναλλαγής (εκφράζει τα γραμμοισοδύναμα ιόντος που μπορούν να ανταλλάξουν ανά μονάδα μάζας στατικής φάσης). Στις πρωτεΐνες, ο αριθμός των θέσεων που μπορούν να προσδεθούν στη στατική φάση είναι πολύ μικρός σε σχέση με αυτόν του υλικού ιοντοεναλλαγής. Μέχρι 10 θέσεις έχουν παρατηρηθεί ως τώρα[66].



Διάγραμμα 4.2: Σχέση μεταξύ κατακράτησης πρωτεΐνης και συγκέντρωσης άλατος για τη χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής. Μεγαλύτερη συγγένεια πρωτεΐνης-στατικής φάσης οδηγεί σε έκλυση για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις άλατος. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται με αύξηση των θέσεων πρόσδεσης της πρωτεΐνης (Προσαρμογή από [66]).

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι για την πρόσδεση των πρωτεϊνών, απαιτείται αρχικά πολύ χαμηλή συγκέντρωση άλατος, οπότε σύνθετα δείγματα που προέρχονται από κυτταρικά εκχυλίσματα πρέπει να αραιώνονται πριν τη διέλευση από τη στήλη. Για να εξασφαλιστεί η πρόσδεση της πρωτεΐνης θα πρέπει:

- Να επιλεγεί κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ανάλογα με το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης
- Το ρυθμιστικό διάλυμα της να έχει pK_a κοντά στο επιλεγμένο pH

- Το ρυθμιστικό διάλυμα να μην προσδέεται στην ουσία ιοντοεναλλαγής. Αποφεύγεται π.χ. η χρήση οξικών σε στήλες ανιοντεναλλαγής γιατί προκαλούνται ασταθείς συνθήκες pH.

Τα βήματα για την λειτουργία μιας στήλης ιοντοεναλλαγής είναι:

- *Φόρτωση με άλας:* γίνεται διαβιβάζοντας από τη στήλη ρυθμιστικό διάλυμα μοριακότητας 10 έως 100mM με 1M NaCl, ώστε οι θέσεις πρόσδεσης της ουσίας ιοντοεναλλαγής να κορεστούν με αντίθετα φορτισμένα ιόντα.
- *Εξισορρόπηση:* γίνεται με διαβίβαση του ρυθμιστικού διαλύματος που έχει επιλεγεί για την πρωτεΐνη, ώστε να εξισορροπήσει το pH της στήλης.
- *Διαβίβαση του δείγματος:* το πρωτεϊνικό διάλυμα προς διαχωρισμό διαβιβάζεται από τη στήλη, κατά προτίμηση στο ίδιο pH με το διάλυμα εξισορρόπησης. Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στη στατική φάση της στήλης.
- *Έκπλυση μη δεσμευμένης ύλης:* οι ουσίες που δεν προσδέονται στη στατική φάση εκπλένονται από τη στήλη με ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο μπορεί να προστεθεί μικρή ποσότητα άλατος ή άλλης ουσίας (π.χ. ουρίας, σακχάρων κ.α.) ανάλογα με την πρωτεΐνη, για να αυξήσει την καθαρότητά της.
- *Έκλυση πρωτεΐνης:* Η έκλυση της δεσμευμένης πρωτεΐνης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη διέλευση διαλύματος άλατος από τη στήλη. Συνήθως διαβιβάζεται στη στήλη διάλυμα άλατος, η συγκέντρωση του οποίου αυξάνεται γραμμικά με το χρόνο (με ανάμειξη διαλύματος φόρτωσης και εξισορρόπησης σε διάφορες αναλογίες). Ανάλογα με τη συγγένεια των πρωτεϊνών και τον αριθμό θέσεων πρόσδεσης, αυτές εξέρχονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος. Το διάλυμα που εξέρχεται από τη στήλη συλλέγεται σε κλάσματα οπότε μπορεί να προσδιοριστεί σε ποια συγκέντρωση εκλύεται η επιθυμητή πρωτεΐνη, αναλύοντας τα διάφορα κλάσματα.
- *Αναγέννηση στήλης:* μετά την έκλυση των πρωτεϊνών διαβιβάζεται ξανά διάλυμα άλατος για να απομακρύνει τυχόν υπολείμματα. Αν το πρωτεϊνικό διάλυμα περιέχει ουσίες όπως λιπίδια, ενδοτοξίνες και άλλες ουσίες που προσδέονται στη στατική φάση, διαβιβάζεται διάλυμα καυστικού νατρίου.

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται ως στατικές φάσεις στο διαχωρισμό βιολογικών μακρομορίων αποτελούνται συνήθως από σφαιρίδια ενός υλικού μήτρας που διαθέτουν πόρους πληρωμένους με υγρό. Τα συνηθέστερα υλικά κατασκευής των μητρών είναι πολυσακχαρίτες (κυτταρίνη, δεξτράνη, αγαρόζη), συνθετικά οργανικά πολυμερή (πολυακρυλαμίδιο, πολυστυρένιο) και ανόργανα υλικά (υδροξυαπατίτης, silica). Για τη δημιουργία μηχανικά ανθεκτικών μητρών τα μόρια των υλικών διασταυρώνονται χημικά και τοποθετείται σε αυτά κάποια δραστική ιοντοεναλλακτική ουσία[66].

Πίνακας 4.2: Μερικά υλικά στατικής φάσης χρωματογραφίας ιοντοεναλλαγής (προσαρμογή από [66])

Όνομασία στατικής φάσης	Προμηθευτής	υλικό μήτρας	μέση διάμετρος σωματιδίων (μm)
UNOsphere rapid S	Bio-Rad	διασταυρωμένο δίκτυο πολυακρυλαμιδίου	80
S-HyperD M	Pall	κεραμικοί φλοιοί πληρωμένοι με μαλακό gel πολυακρυλαμιδίου	80
SP sepharose fast flow	GE Healthcare	διασταυρωμένη αγαρόζη	90

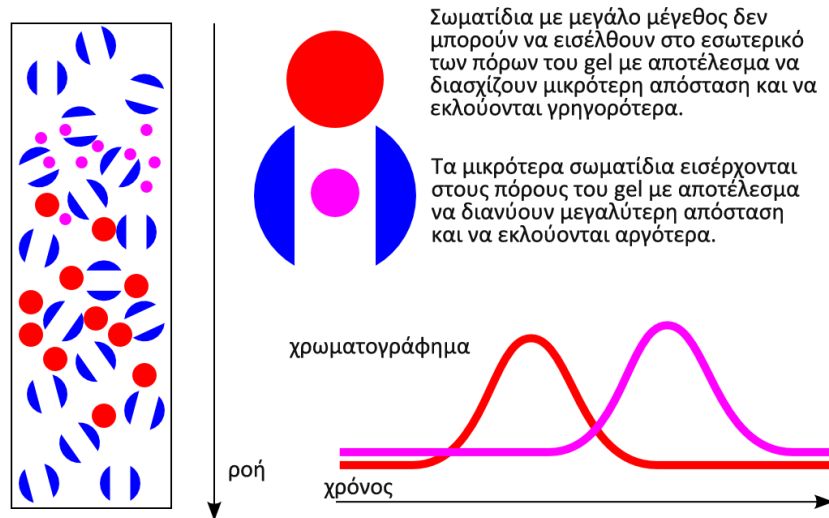
4.4.2 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης ή αποκλεισμού μεγέθους (gel filtration, size exclusion chromatography) είναι μοναδική ανάμεσα στις χρωματογραφικές μεθόδους καθώς η κλασμάτωση των μορίων βασίζεται στο σχετικό μέγεθος των πρωτεϊνικών μορίων[63][67].

Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση πορωδών σφαιριδίων από πηκτή πολυμερούς υλικού. Μια στήλη πληρωμένη με τα σφαιρίδια αυτά διαθέτει δύο διακριτούς όγκους υγρού: τον όγκο που βρίσκεται στα διάκενα μεταξύ των σφαιριδίων (εξωτερικός όγκος) και τον όγκο που βρίσκεται μέσα στους πόρους των σφαιριδίων (εσωτερικός όγκος). Τα μεγάλα μόρια ισορροπούν μόνο με τον εξωτερικό όγκο, ενώ τα μικρά μόρια ισορροπούν τόσο με τον εσωτερικό όσο και τον εξωτερικό όγκο υγρού. Το μείγμα πρωτεϊνών εγχέεται στην κορυφή της στήλης και αφήνεται να διασταλάξει μέσα από αυτήν. Τα μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια αποκλείονται από τον εσωτερικό όγκο με αποτέλεσμα να εξέρχονται πρώτα από τη στήλη, ενώ τα μικρότερα που έχουν πρόσβαση στον εσωτερικό όγκο, εξέρχονται αργότερα[63][67].

Οι διαστάσεις που παίζουν ρόλο στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης είναι η διάμετρος των πόρων των σφαιριδίων και η υδροδυναμική διάμετρος των πρωτεϊνικών μορίων. Πρωτεΐνες των οποίων η υδροδυναμική διάμετρος είναι μικρή σε σχέση με τη μέση διάμετρο των πόρων έχουν πρόσβαση στον εσωτερικό όγκο των σφαιριδίων. Για μόρια με ενδιάμεσες υδροδυναμικές διαμέτρους, ένα ποσοστό

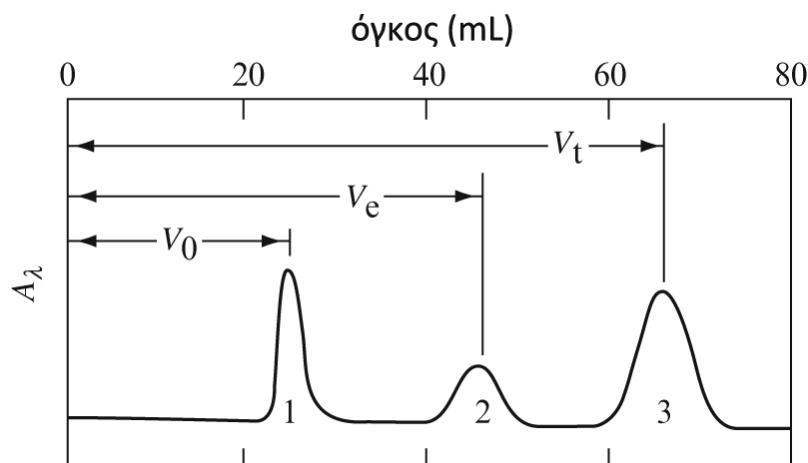
εισέρχεται στους πόρους ενώ ένα άλλο όχι, ενώ μόρια με μεγάλη υδροδυναμική διάμετρο αποκλείονται από τα σωματίδια[67].



Σχήμα 4.4: Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης (Προσαρμογή από Isaac Yonemoto, <http://en.wikipedia.org/wiki/User:Takometer>)

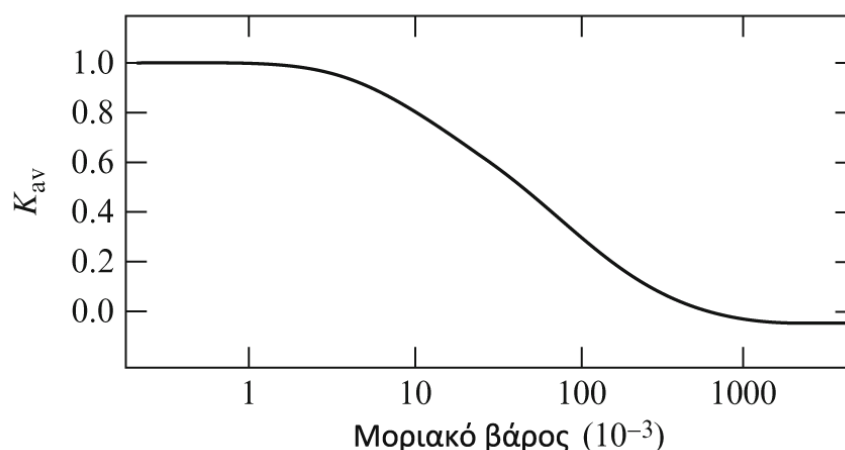
Μια τυπική καμπύλη έκλυσης φαίνεται στο Διάγραμμα 4.3. Ως όγκος μηδέν θεωρείται η στιγμή εισαγωγής του δείγματος στη στήλη. Ο όγκος V_0 αντιπροσωπεύει τον όγκο των διάκενων μεταξύ των σφαιριδίων της στήλης και αντιστοιχεί στον όγκο έκλυσης του συστατικού που αποκλείεται από τα σφαιρίδια. Ο όγκος V_t είναι ίσος με τον εξωτερικό και τον εσωτερικό όγκο υγρού και αντιστοιχεί στον όγκο έκλυσης του συστατικού που εισέρχεται στα σφαιρίδια. Όγκοι έκλυσης μεταξύ των δύο αυτών τιμών ορίζονται ως V_e . Από τα παραπάνω μπορεί να οριστεί ο συντελεστής διαχωρισμού:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (4.7)$$



Διάγραμμα 4.3: Τυπική καμπύλη έκλουσης χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Ο οριζόντιος άξονας εκφράζεται σε όρους όγκου έκλουσης, ή αν η ογκομετρική παροχή στη στήλη είναι σταθερή, σε όρους χρόνου. Ο κατακόρυφος άξονας εκφράζει απορρόφηση σε κάποιο μήκος κύματος λ (προσαρμογή από:[67]).

Ο συντελεστής διαχωρισμού εξαρτάται σιγμοειδώς από το λογάριθμο του μοριακού βάρους (Διάγραμμα 4.4). Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών με βάση το μοριακό βάρος θα είναι βέλτιστος στο ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης, δηλαδή για συντελεστή διαχωρισμού μεταξύ 0.2 και 0.8. Το εύρος αυτό εκφράζει την ικανότητα κλασμάτωσης του υλικού της στατικής φάσης. Μεγαλύτερη κλίση της καμπύλης στο εύρος κλασμάτωσης σημαίνει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα του υλικού. Αντίστοιχα, ο καλύτερος διαχωρισμός μεταξύ πρωτεϊνών παρεμφερούς μοριακού βάρους θα γίνει με ένα υλικό που έχει μικρό εύρος κλασμάτωσης.



Διάγραμμα 4.4: Εξάρτηση του συντελεστή διαχωρισμού από το λογάριθμο του μοριακού βάρους (προσαρμογή από [67])

Η αδυναμία της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης ως προς τον καθαρισμό πρωτεϊνών έγκειται στο ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες αποκλείονται από τη στατική φάση και εκκλούνται γρήγορα, με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός να έχει χαμηλή

διακριτική ικανότητα. Ωστόσο, αν η επιθυμητή πρωτεΐνη έχει σημαντική διαφορά στο μοριακό βάρος από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του μείγματος τότε ο διαχωρισμός είναι επιτυχής. Για μεγαλύτερη επιτυχία, το δείγμα προς διαχωρισμό δεν πρέπει να περιέχει πάνω από 50mg/mL πρωτεΐνης και να είναι διαυγασμένο ώστε να μην παρεμποδιστεί η ροή στη στήλη.

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται ως στατική φάση στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: κοινά υλικά και υλικά υψηλής απόδοσης. Τα κοινά υλικά διατίθενται στο εμπόριο «χύδην»(bulk) και τοποθετούνται στις στήλες από τον ερευνητή. Έχουν χαμηλή τιμή αλλά και χαμηλούς ογκομετρικούς ρυθμούς. Τα υλικά υψηλής απόδοσης έχουν μεγαλύτερους ογκομετρικούς ρυθμούς, υψηλότερο κόστος και διατίθενται στο εμπόριο ως πληρωμένες στήλες. Όπως και τα πληρωτικά υλικά της χρωματογραφίας ιοντοεναλλαγής, έτσι και αυτά της μοριακής διήθησης κατασκευάζονται από πολυσακχαρίτες όπως δεξτράνες και αγαρόζη, οργανικά πολυμερή όπως πολυακρυλαμίδιο και ανόργανα υλικά όπως σίλικα[67].

Πίνακας 4.3: Υλικά που χρησιμοποιούνται ως στατική φάση σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης και κάποιες ιδιότητες αυτών (Προσαρμογή από [67])

Όνομασία	Προμηθευτής	Μορφή διάθεσης	pH λειτουργίας	Θερμοκρασία λειτουργίας (°C)	Διάμετρος σφαιριδίων (μm)
<i>Κοινά υλικά</i>					
Biogel P	Bio-Rad	Σκόνη	2-10	1-80	40-30
Sepharose	Pharmacia	Αιώρημα	4-10	1-40	45-200
Sephadex G	Pharmacia	Σκόνη	2-10	1-100	20-300
<i>Υλικά υψηλής απόδοσης</i>					
Zorbax	DuPont	Πληρωμένη στήλη	3-8.5	1-100	4-6
Protein Pak	Waters	Πληρωμένη στήλη	2-8	1-90	10
Superose	Pharmacia	Πληρωμένη στήλη	1-14	4-40	10-13

4.5 Μέθοδοι μέτρησης και προσδιορισμού καθαρότητας

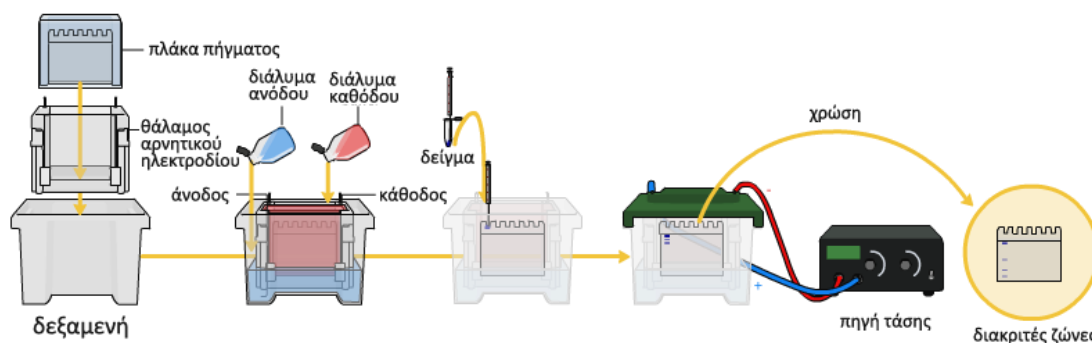
4.5.1 Ηλεκτροφόρηση πήγματος

Η ηλεκτροφόρηση μετά νατρίου άλατος θειικού δωδεκυλίου- πήγματος πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) είναι μία άριστη τεχνική ταυτοποίησης και παρακολούθησης πρωτεϊνών κατά τον καθαρισμό και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ομοιογένειας των καθαρισμένων κλασμάτων. Χρησιμοποιείται κατά κόρον για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών καθώς και για τον προσδιορισμό υπομονάδων σε καθαρισμένες πρωτεΐνες.

Η αρχή της μεθόδου, αν και έχει περίπλοκη θεωρητική θεμελίωση, είναι σχετικά απλή στην κατανόηση. Σε έναν ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό, τα φορτισμένα είδη του μείγματος κινούνται προς ένα ηλεκτρόδιο αντίθετου φορτίου. Η κίνηση επιβραδύνεται από αλληλεπιδράσεις με το πήγμα πολυακρυλαμιδίου, το οποίο

λειτουργεί ως μοριακό κόσκινο. Οι αντίρροπες αλληλεπιδράσεις ηλεκτρικών δυνάμεων και αντίστασης του πήγματος οδηγούν σε διαφορετική χώνηση κάθε πρωτεϊνικού μορίου στο πήγμα. Ο διαχωρισμός αυτός εξαρτάται από το μέγεθος, το σχήμα και το φορτίο των μακρομορίων.

Για να αποκτήσουν όλες οι πρωτεΐνες το ίδιο περίπου φορτίο ανά μονάδα μάζας, και συνεπώς να διαχωρίζονται με βάση το μοριακό βάρος, τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση κατεργάζονται πρώτα με θερμό SDS (μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου), που είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό. Το SDS προσδένεται στην πρωτεΐνη σε αναλογία περίπου 1.4mg SDS/mg πρωτεΐνης, προσδίδοντάς της αρνητικό φορτίο. Παράλληλα το SDS διασπά όλους τους μη ομοιοπολικούς δεσμούς, αποδιατάσσοντας την πρωτεΐνη και διασπώντας την στις επιμέρους υπομονάδες της (εάν διαθέτει). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα όλων των συμπλόκων SDS-πολυπεπτιδίου είναι ομοιογενής και η χώνησή τους στο πήγμα είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού τους βάρους. Μικρά μόρια δηλαδή προχωρούν ταχύτερα στο πήγμα, ενώ μεγάλα μόρια πιο αργά. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος και ο αριθμός των υπομονάδων μιας πρωτεΐνης σε ένα βαθμονομημένο πήγμα. Επίσης, αν μία πρωτεΐνη εμφανίζει μόνο μία ζώνη σε ένα τέτοιο πήγμα, αυτό αποτελεί κριτήριο της καθαρότητάς της [68].



Σχήμα 4.5: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου SDS-PAGE (προσαρμογή από:

Η διαδικασία της μεθόδου φαίνεται στο Σχήμα 4.5. Η πλάκα του πήγματος πολυακρυλαμιδίου παρασκευάζεται στο εργαστήριο ανάμεσα σε δύο γυάλινες πλάκες και φέρει στην κορυφή μικρές εσοχές στις οποίες εγχέεται αργότερα το δείγμα. Μετά την πήξη του πολυμερούς, η πλάκα τοποθετείται σε ειδικό υποδοχέα που φέρνει την άνω πλευρά του πήγματος σε επαφή με ένα διάλυμα καθόδου και την κάτω πλευρά με ένα διάλυμα ανόδου. Το δείγμα, που έχει προηγουμένως κατεργαστεί με SDS, εγχέεται σε μία εσοχή του πήγματος. Σε δεύτερη εσοχή του ίδιου πήγματος εγχέεται συνήθως διάλυμα με πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους (μάρτυρες) οι οποίες θα το βαθμονομήσουν και θα επιτρέψουν τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών του δείγματος. Τέλος, η συσκευή συναρμολογείται και εφαρμόζεται σταθερή τάση (περίπου 20-30V/cm

πήγματος) στα ηλεκτρόδια. Οι πρωτεΐνες, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σχηματίζουν διακριτές ζώνες στο πήγμα.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες των πρωτεϊνών δεν είναι ορατές. Για το λόγο αυτό το πήγμα κατεργάζεται με διάλυμα χρωστικής που προσδένεται στις πρωτεΐνες και τις καθιστά ορατές. Η συνηθέστερη χρωστική ουσία είναι η Coomassie brilliant blue η οποία χρωματίζει μπλε τις πρωτεΐνες, προσδίδοντας καλή ευκρίνεια για ποσότητες 0.1-1μg πρωτεΐνης ανά ζώνη. Για μεγαλύτερη ευαισθησία (ορατές πρωτεΐνες σε ποσότητα 10-100ng ανά ζώνη) χρησιμοποιείται χρώση με άργυρο (silver stain) [68].

Συγκρίνοντας τις ζώνες του δείγματος με τις ζώνες του διαλύματος με τις πρωτεΐνες-μάρτυρες, μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών του δείγματος. Αν το δείγμα εμφανίσει μόνο μία ζώνη τότε σημαίνει ότι περιέχει μόνο μία πρωτεΐνη η οποία μάλιστα είναι μονομερής.

4.5.2 Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεΐνης

Σε πολλά στάδια του καθαρισμού είναι απαραίτητη η μέτρηση της περιεχόμενης πρωτεΐνης στο διάλυμα. Η πληροφορία αυτή βοηθά στην παρακολούθηση της διαδικασίας του καθαρισμού και στην περίπτωση των ενζύμων, σε συνδυασμό με την ενεργότητα του ενζύμου, στον προσδιορισμό της καθαρότητάς τους.

Οι μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεΐνης είναι κυρίως φασματοφωτομετρικές και άρα έχουν χαμηλό κόστος και δεν απαιτείται ακριβός εξοπλισμός. Οι βασικότερες από αυτές περιγράφονται παρακάτω.

4.5.2.1 Απορρόφηση στο υπεριώδες στα 280nm

Οι πρωτεΐνες εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες, γύρω στα 280nm που οφείλεται στην απορρόφηση των αρωματικών αμινοξέων τυροσίνη και τρυπτοφάνη. Αν η αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης δεν περιέχει ή περιέχει μικρό αριθμό από τα αμινοξέα αυτά, η μέθοδος θα δώσει εσφαλμένο αποτέλεσμα [69].

Η μέτρηση γίνεται σε κυψελίδες χαλαζία σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους και μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητα πρωτεΐνης στο εύρος 20-3000μg. Σημεία που χρήζουν προσοχής είναι:

- Η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων που δεν απορροφούν στο υπεριώδες
- Το δείγμα προς μέτρηση να είναι διαυγές. Θολά δείγματα μειώνουν τη διέλευση του φωτός λόγω σκέδασης, δίνοντας εσφαλμένα αποτελέσματα υψηλής απορρόφησης

- Το δείγμα να είναι ελεύθερο από νουκλεϊκά οξέα. Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν έντονα στα 280nm και αποτελούν συχνά προσμίξεις σε πρωτεϊνικά διαλύματα. Ένα διάλυμα καθαρής πρωτεΐνης εκτιμάται ότι έχει λόγο απορρόφησης στα 280nm προς απορρόφηση στα 260nm γύρω στο 2 [69].

4.5.2.ii Απορρόφηση στο υπεριώδες στα 205nm

Ο πεπτιδικός δεσμός απορροφά φωτόνια σε μέγιστο μήκος κύματος κάτω από τα 210nm. Παρόλα αυτά το πλάτος της κορυφής απορρόφησης του πεπτιδικού δεσμού επιτρέπει μετρήσεις σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, γεγονός που μπορεί να έχει σημαντικά πλεονεκτήματα ως προς την ακρίβεια. Λόγω παρεμβολών που οφείλονται στους διαλύτες και στα ρυθμιστικά διαλύματα, συχνά χρησιμοποιούνται οι απορροφήσεις στα 214 και 220nm ως εναλλακτικές τιμές για τη μέτρηση πρωτεϊνών και πεπτιδίων.

Η απορρόφηση στα 205nm χρησιμοποιείται στον ποσοτικό προσδιορισμό αραιών πρωτεϊνικών διαλυμάτων ή σε μετρήσεις σε στήλες χρωματογραφίας συνεχούς λειτουργίας και για την ανάλυση πεπτιδίων με λίγα ή καθόλου αρωματικά αμινοξέα. Το εύρος προσδιορισμού είναι 1-100μg πρωτεΐνης[69].

4.5.2.iii Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιεί τη χρωστική Coomassie brilliant blue που βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη χρώση πρωτεϊνών. Ο βασικός της μηχανισμός είναι η πρόσδεση της χρωστικής σε όξινο pH σε κατάλοιπα αργινίνης, ιστιδίνης, φαινυλαλανίνης, τρυπτοφάνης και τυροσίνης καθώς και σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης. Η πρόσδεση σταθεροποιεί την ανιοντική μορφή της χρωστικής μετατοπίζοντας την απορρόφηση φωτός από τα 465 στα 595nm.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι πολλά. Τα όργανα που χρησιμοποιεί είναι κοινά, τα αντιδραστήρια έχουν χαμηλό κόστος και η ευαισθησία της είναι σημαντικά υψηλή (1-50μg πρωτεΐνης).

4.5.2.iv Μέθοδος Lowry

Η μέθοδος Lowry στηρίζεται σε μια διαδικασία δύο σταδίων. Αρχικά λαμβάνει χώρα η αντίδραση Biuret, κατά την οποία οι πρωτεΐνες ανάγουν ιόντα χαλκού (Cu^{2+} σε Cu^+) και στη συνέχεια ανάγεται το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu δημιουργώντας χαρακτηριστικό μπλε χρώμα που απορροφά έντονα φως σε μήκος κύματος 750nm. Αν και η μέθοδος έχει μεγάλη ευαισθησία (5-100μg), έχει αντικατασταθεί από τη μέθοδο BCA (βλ. §4.5.2.v).

4.5.2.v Μέθοδος BCA

Η μέθοδος BCA βασίζεται στην ίδια αρχή με τη μέθοδο Lowry, με μόνη διαφορά ότι το αντιδραστήριο Folin-Coicalteu αντικαθίσταται με το BCA (bicinchoninic acid) αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου (0.2-50μg) και ελαχιστοποιώντας τις παρεμβολές από άλλες ουσίες του διαλύματος. Η αντίδραση του BCA με τα μονοσθενή κατιόντα χαλκού (Cu^+) που προέρχονται από την αναγωγή των ιόντων Cu^{2+} από τις πρωτεΐνες δίνει ένα έντονα ιώδες σύμπλοκο (μέγιστη απορρόφηση στα 562nm). Η αντίδραση εξαρτάται έντονα από τη θερμοκρασία και σε υψηλότερες θερμοκρασίες (60°C) η ένταση του χρώματος είναι εντονότερη.

Κεφάλαιο 5 : Μελέτη της δομής των πρωτεϊνών με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού

5.1 Εισαγωγή

Η ΥΥΠ έχει μελετηθεί σε αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές σαν μέθοδος εναλλακτική της θερμικής επεξεργασίας για την απενεργοποίηση της ΠΜΕ σε διάφορα φρούτα και λαχανικά όπως πορτοκάλι, μήλο, μπανάνα, φράουλα, καρότο, τομάτα, grapefruit ([58],[54],[59],[48],[70]). Αντίστοιχες μελέτες είχαν προηγηθεί και στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας τροφίμων του ΕΜΠ, καθώς είχε μελετηθεί η επίδραση της ΥΥΠ στη δραστικότητα της ΠΜΕ προερχόμενης από χυμό πορτοκαλιού ποικιλίας *Navel*[47] και *Valencia* (Katsaros et al., 2010), καθώς και ΠΜΕ προερχόμενης από ροδάκινο (Boulekou et al., 2010) και λωτό (Katsaros et al., 2008). Τα αποτελέσματα όλων των ερευνών συγκλίνουν στο ότι η διαφορετικότητα στην προέλευση του ενζύμου, διαφορετικό φρούτο, ακόμα και διαφορετική ποικιλία του ίδιου φρούτου απαιτεί διαφορετικές συνθήκες απενεργοποίησης της ΠΜΕ. Η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε κίνητρο για τη συνέχιση της έρευνας, όσον αφορά την επίδραση της επεξεργασίας με ΥΥΠ στην ΠΜΕ. Πιθανή αιτία που θα μπορούσε να εξηγήσει αυτή την ιδιαίτερη συμπεριφορά του ενζύμου είναι μεταβολές στη δομή του. Για αυτό το λόγο μετά τη μελέτη της επίδρασης της συνδυασμένης εφαρμογής της ΥΥΠ και της θερμοκρασίας στη δραστικότητα των ΠΜΕ από διαφορετική πηγή προέλευσης ακολούθησε η απομόνωση και ο καθαρισμός της πηκτινομεθυλεστεράσης από φλούδα πορτοκαλιού ποικιλίας *Valencia* για τον έλεγχο πιθανών μόνιμων αλλαγών της δευτεροταγούς και τριτοταγούς της δομής μετά από επεξεργασία με ΥΥΠ.

Η μελέτη της μεταβολής της δομής έγινε με την μέθοδο της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού. Ανάμεσα στις διάφορες μεθόδους εξέτασης της δομής των πρωτεϊνών, η τεχνική αυτή επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη δευτεροταγή και την τριτοταγή δομή, χρησιμοποιώντας ως δείγματα πρωτεϊνικά διαλύματα υψηλής καθαρότητας.

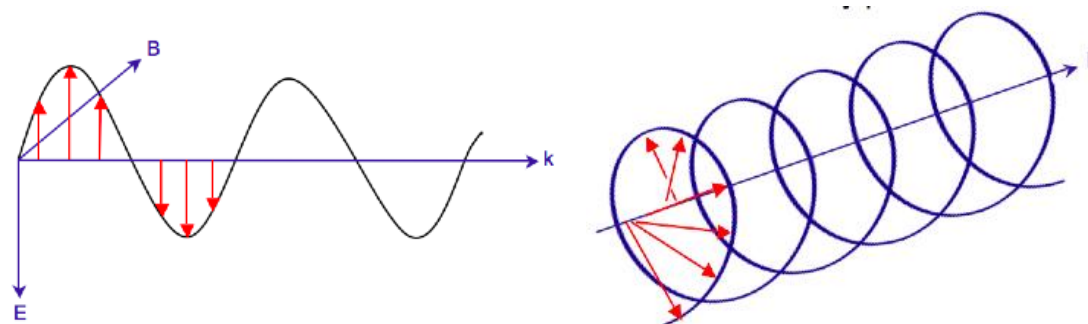
5.2 Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού

Η μελέτη και καταγραφή της δομής των πρωτεϊνών τα τελευταία χρόνια οφείλεται κυρίως στις καινοτομίες στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA που επιτρέπουν την έκφραση και παραγωγή πρωτεϊνών σε μεγάλες ποσότητες αλλά και στις προόδους που έχει σημειώσει η βιοπληροφορική. Οι δομές πρωτεϊνών που καταχωρούνται στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων PDB (protein data bank) ετησίως ξεπερνούν πλέον τις 2000. Ωστόσο οι τεχνικές διαλεύκανσης της πρωτεϊνικής δομής είναι συνήθως καταστρεπτικές, καταργώντας δηλαδή τη βιολογική ενεργότητά τους. Ο κυκλικός διχρωισμός (CD: circular dichroism) επιτρέπει τη μελέτη της δομής των πρωτεϊνών υπό συνθήκες που παραμένουν βιολογικά ενεργές, αλλά και τη μελέτη της μεταβολής της δομής με το χρόνο. Ειδικά στην περίπτωση των ενζύμων αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό.

Σε σχέση με άλλες τεχνικές μελέτης της δομής των πρωτεϊνών, όπως είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, ο κυκλικός διχρωισμός είναι μια τεχνική χαμηλής ανάλυσης που δίνει γενικές πληροφορίες δομής. Είναι ωστόσο μια πολύ λιγότερο απαιτητική τεχνική όσον αφορά στο χρόνο και την προετοιμασία των δειγμάτων που απαιτείται. Επίσης, μπορεί να διερευνήσει τη δομή μιας πρωτεΐνης σε μεγάλο εύρος συνθηκών και να μετρήσει το ρυθμό με τον οποίο παρατηρούνται δομικές αλλαγές.

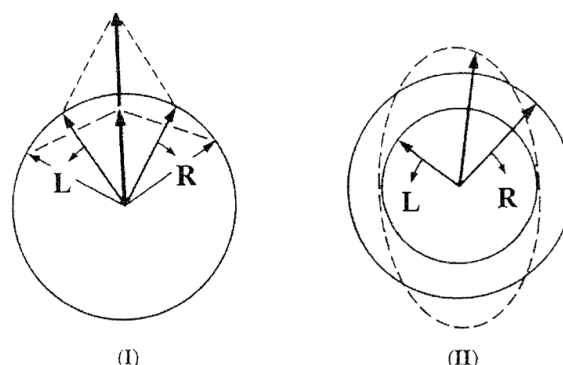
5.2.1 Αρχή της μεθόδου

Ως γνωστόν το φως είναι ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα που αποτελείται από την ταλάντωση μιας συνιστώσας ηλεκτρικού και μιας συνιστώσας μαγνητικού πεδίου, κάθετες μεταξύ τους στο χώρο. Το φως είναι γραμμικά πολωμένο όταν οι δύο συνιστώσες είναι σε φάση και έχουν ίσα πλάτη. Σε αυτή την περίπτωση το κύμα διαδίδεται σε ένα επίπεδο. Αντιθέτως, όταν οι δύο συνιστώσες έχουν διαφορά φάσης $\pm 90^\circ$ και ίσα πλάτη, η κορυφή του συνισταμένου διανύσματος διαδίδεται ελικοειδώς στο χώρο και το φως θεωρείται κυκλικά πολωμένο. Ανάλογα με το ποια συνιστώσα προηγείται κατά 90° το φως μπορεί να είναι δεξιόστροφα ή αριστερόστροφα πολωμένο. Τέλος, όταν οι δύο συνιστώσες έχουν διαφορετικά πλάτη ή διαφορά φάσης διάφορη των 90° , η κορυφή του συνισταμένου διανύσματος διαδίδεται ελλειψοειδώς, και το φως ονομάζεται ελλειπτικά πολωμένο.



Σχήμα 5.1: Σχηματική αναπαράσταση γραμμικά πολωμένου φωτός (αριστερά) και κυκλικά πολωμένου φωτός (δεξιά).

Το γραμμικά πολωμένο φως μπορεί να αναλυθεί σε δύο αντίρροπες συνιστώσες κυκλικά πολωμένου φωτός. Ο κυκλικός διχρωισμός αναφέρεται στη διαφορετική απορρόφηση των δύο αυτών συνιστωσών από τα βιολογικά δείγματα. Αν οι δύο συνιστώσες δεν απορροφώνται από το δείγμα ή απορροφώνται εξίσου, ο ανασυνδυασμός τους θα δώσει γραμμικά πολωμένο φως. Αντίθετα, αν η απορρόφηση της κάθε συνιστώσας διαφέρει, τότε ανασυνδυασμός των συνιστωσών θα δώσει ελλειπτικά πολωμένο φως [71],[72].



Σχήμα 5.2: Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωισμού. (A) Η αριστερόστροφη (L) και η δεξιόστροφη (R) συνιστώσα του κυκλικά πολωμένου φωτός έχουν ίσο πλάτος (i) και ο συνδυασμός τους δίνει γραμμικά πολωμένο φως. Αντίθετα στην περίπτωση (ii) οι συνιστώσες έχουν διαφορετικό πλάτος και ο συνδυασμός τους δίνει ελλειπτικά πολωμένο φως (Πηγή:[71]).

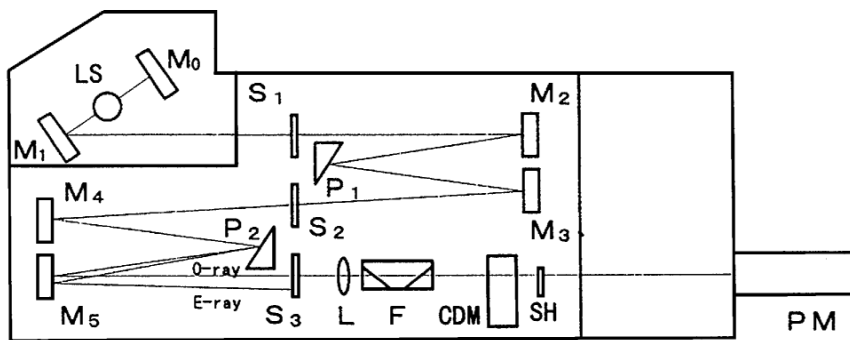
Ένα σήμα CD παρατηρείται όταν ένα μόριο είναι οπτικά ενεργό (χειρόμορφο) δηλαδή στις παρακάτω περιπτώσεις:

- Όταν είναι ενδογενώς χειρόμορφο, για παράδειγμα ένα άτομο άνθρακα με 4 διαφορετικούς υποκαταστάτες ή ένας δισουλφιδικός δεσμός λόγω της διεδρικής δομής των δεσμών C-S-S-C
- Όταν είναι ομοιοπολικά προσδεμένο σε ένα οπτικά ενεργό κέντρο

- Τοποθετείται σε ασυμμετρικό περιβάλλον λόγω της τρισδιάστατης δομής του μορίου[71].

5.2.2 Όργανα του κυκλικού διχρωισμού

Τα όργανα του CD (γνωστά και ως φασματοπολαρόμετρα) μετρούν τη διαφορά της απορρόφησης μεταξύ δεξιόστροφα και αριστερόστροφα πολωμένου φωτός ($\Delta A = A_L - A_R$). Το μέγεθος αυτό συχνά αναφέρεται μέσω της ελλειπτικότητας θ που ορίζεται ως $\theta = \tan^{-1}(\frac{b}{a})$ όπου b και a οι άξονες της έλλειψης του ελλειπτικά πολωμένου φωτός που προκύπτει. Τα δύο μεγέθη σχετίζονται μέσω της σχέσης $\theta = 32.98\Delta A$. Το φάσμα του κυκλικού διχρωισμού λαμβάνεται όταν η ελλειπτικότητα μετράται ως συνάρτηση του μήκους κύματος[72],[71].



Σχήμα 5.3: Σχηματική αναπαράσταση ενός φασματοπολαρομέτρου με διαμόρφωση δέσμης. Η δέσμη παράγεται από μια φωτεινή πηγή (LS), ανακλάται και διαθλάται από μια σειρά κατόπτρων (M_0 - M_5) και πρισμάτων (P_1 - P_2) και διέρχεται από μια σειρά σχισμών (S_1 - S_3). Η κύρια δέσμη (O-ray) εστιάζεται από ένα φακό (L) και διέρχεται μέσω ενός φίλτρου (F) μέσα από τον διαμορφωτή (CDM). Τέλος, η δέσμη που περιέχει πλέον τις δύο συνιστώσες κυκλικά πολωμένου φωτός διέρχεται μέσα από ένα κλείστρο (SH), από το χώρο του δείγματος για να ανιχνευτεί τελικά από τον φωτοπολλαπλασιαστή (PM) (Πηγή:[71]).

Η συνηθέστερη μέθοδος με την οποία μετρά ένα φασματοπολαρόμετρο τον κυκλικό διχρωισμό είναι η διαμόρφωση δέσμης (modulation)[72]. Σε ένα τέτοιο όργανο, το γραμμικά πολωμένο φως διαχωρίζεται στην αριστερόστροφη και δεξιόστροφη συνιστώσα περνώντας μέσα από έναν διαμορφωτή. Ο διαμορφωτής αποτελείται συνήθως από έναν πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο χαλαζία στον οποίο επιβάλλεται παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (συχνότητα 50kHz). Μια λεπτή πλάκα ισότροπου υλικού (λχ. Silica) είναι προσδεμένη στον κρύσταλλο. Καθώς ο κρύσταλλος πάλλεται, προκαλεί δομικές αλλαγές στην πλάκα του υλικού η οποία μεταδίδει κυκλικά πολωμένο φως. Καθώς το φως μεταδίδεται σε εναλλασσόμενη αριστερόστροφη και δεξιόστροφη συνιστώσα, ανιχνεύεται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή.

Τα σήματα που προκύπτουν είναι πολύ μικρά και κυμαίνονται τυπικά σε ελλειπτικότητες της τάξης των 10mdeg, που αντιστοιχούν σε διαφορά απορρόφησης της τάξης του 3×10^{-4} . Είναι σημαντικό επομένως να δίνεται προσοχή

στις πειραματικές συνθήκες ώστε να λαμβάνονται όσο το δυνατόν ακριβέστερες μετρήσεις[71].

5.2.2.i Παράμετροι λειτουργίας του φασματοπολαρομέτρου

Για τη λήψη ακριβών φασμάτων κυκλικού διχρωισμού, πρέπει να ρυθμιστούν στο όργανο οι παρακάτω παράμετροι:

- *Εύρος ζώνης (bandwidth)*: εκφράζει την ακρίβεια με την οποία ο μονοχρωμάτορας του φασματοφωτομέτρου επιλέγει το φως ενός δεδομένου μήκους κύματος. Μεγάλο εύρος αυξάνει το φως που διέρχεται από το δείγμα και φτάνει στον φωτοπολλαπλασιαστή αλλά μειώνει την ικανότητα του οργάνου να διακρίνει με λεπτομέρεια διακριτές κορυφές στο φάσμα. Το εύρος πρέπει να είναι μικρότερο από 1nm για αναλύσεις ρουτίνας, αλλά τιμές της τάξης των 0.1nm επιλέγονται για τη λεπτομερέστερη καταγραφή φασμάτων.
- *Σταθερά χρόνου*: η σταθερά χρόνου μετράει το χρόνο στον οποίο λαμβάνονται μέσοι όροι των δεδομένων του CD.
- *Ρυθμός σάρωσης*: εκφράζει το εύρος μήκους κύματος που σαρώνεται στη μονάδα το χρόνου. Για ακριβείς μετρήσεις η σχέση μεταξύ σταθεράς χρόνου και ρυθμού σάρωσης πρέπει να είναι :
$$\text{ρυθμός σάρωσης} \times \text{σταθερά χρόνου} < \text{εύρος ζώνης} < \frac{W}{10}$$

Όπου W το πλάτος στο μισό του ύψους της κορυφής υπό εξέταση.
- *Αριθμός σαρώσεων*: αυξάνοντας τον αριθμό σαρώσεων αυξάνεται ο λόγος σήματος προς θόρυβο (signal-to-noise ratio) ο οποίος εξαρτάται από την τετραγωνική ρίζα του αριθμού σαρώσεων.

Ο αριθμός σαρώσεων και ο ρυθμός σάρωσης πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε ο χρόνος του πειράματος να μη θέτει σε κίνδυνο τη σταθερότητα του δείγματος ή του οργάνου[71].

5.2.3 Πληροφορίες που λαμβάνονται από τον CD σχετικά με τη δομή των πρωτεϊνών

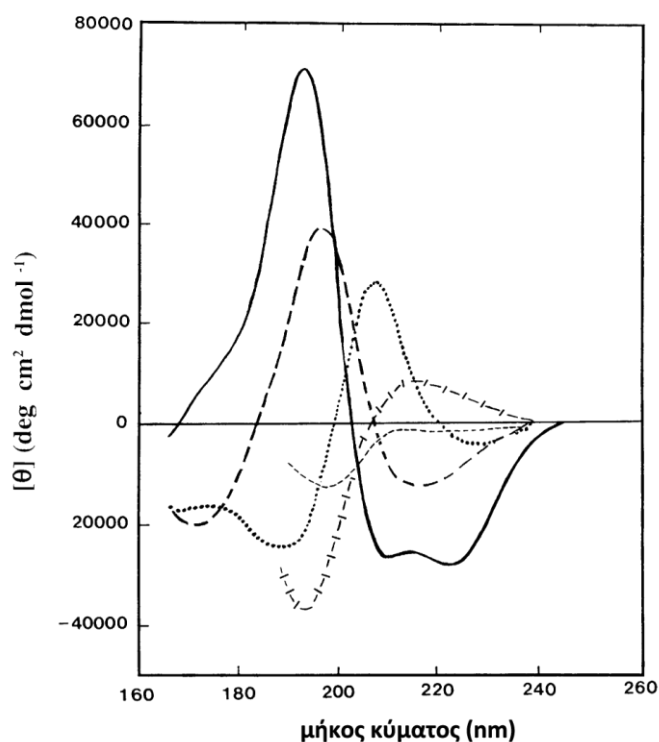
Τα σήματα του κυκλικού διχρωισμού προκύπτουν μόνο όταν υπάρχει απορρόφηση ακτινοβολίας και συνεπώς διάφορες περιοχές του φάσματος μπορούν να αντιστοιχιστούν σε συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά των μορίων. Επίσης, συμπληρωματικά δεδομένα σχετικά με τη δομή μπορούν να προκύψουν από διαφορετικές περιοχές του φάσματος.

Στις πρωτεΐνες, οι χρωμοφόρες δομές που ενδιαφέρουν είναι ο πεπτιδικός δεσμός (απορρόφηση κάτω από τα 240nm), τα αρωματικά αμινοξέα (απορρόφηση μεταξύ

260 και 320nm) και οι δισουλφιδικοί δεσμοί (ασθενής απορρόφηση γύρω στα 260nm). Επίσης, μη πρωτεϊνικοί συμπαράγοντες έχουν απορροφήσεις σε μεγάλο εύρος μηκών κύματος όπως λ.χ. η ομάδα αίμης (έντονη απορρόφηση στα 410nm) και οι φλαβίνες (απορρόφηση μεταξύ 300 και 500nm)[73]. Τέλος, σήματα κυκλικού διχρωισμού μπορεί να οφείλονται σε μη χειρόμορφους υποκαταστάτες οι οποίοι αποκτούν οπτική ενεργότητα όταν δεσμεύονται στο ασυμμετρικό περιβάλλον μιας πρωτεΐνης[71].

5.2.3.i Ποσοστό δευτεροταγούς δομής (% έλικες, πτυχωτά φύλλα κ.α.)

Οι διάφοροι τύποι συνήθους δευτεροταγούς δομής όπως είναι τα β-πτυχωτά φύλλα και οι α-έλικες, δίνουν σήματα κυκλικού διχρωισμού στην περιοχή του άπω υπεριώδους (far UV) (Σχήμα 5.4).



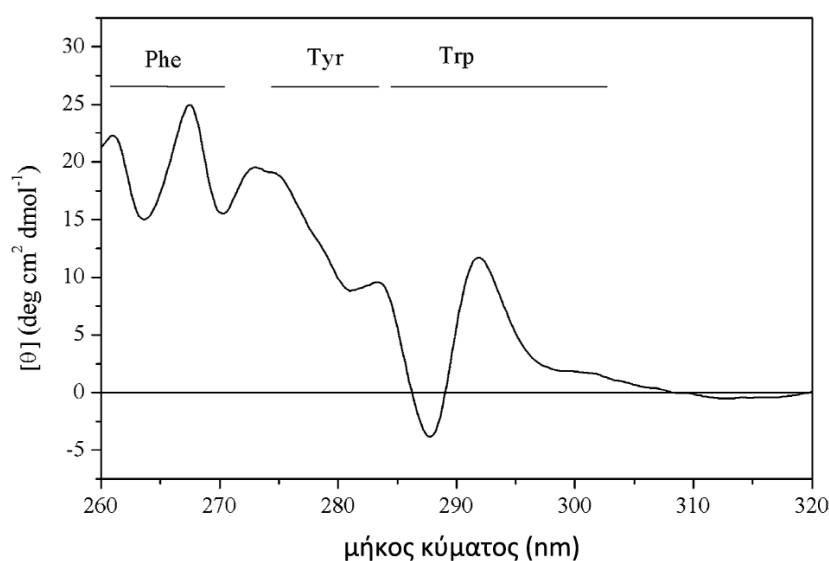
Σχήμα 5.4: Φάσματα άπω-υπεριώδους που σχετίζονται με διάφορους τύπους δευτεροταγούς δομής. Συνεχής γραμμή: α-έλικα, διακεκομμένη γραμμή: αντιπαράλληλο β-πτυχωτό φύλλο, εστιγμένη γραμμή: β-στροφή τύπου I, κάθετα διακεκομμένη γραμμή: εκτεταμένη 3_1 -έλικα, βραχέως διακεκομμένη γραμμή: ακανόνιστη δομή (Προσαρμογή από:[71]).

Για την εύρεση του ποσοστού που συμμετέχει κάθε τύπος στη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης, τα φάσματα επεξεργάζονται με ειδικούς αλγορίθμους που τα συγκρίνουν με αυτά από πρωτεΐνες των οποίων η δομή έχει ήδη διαλευκανθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Τα δεδομένα προέρχονται από βάσεις δεδομένων οι οποίες μέχρι στιγμής δεν περιέχουν πληροφορίες για ολιγοπεπτίδια[71].

Για την αξιόπιστη ανάλυση δευτεροταγούς δομής είναι απαραίτητο να είναι γνωστή με ακρίβεια η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα και το όργανο να είναι σωστά βαθμονομημένο.

5.2.3.ii Πληροφορίες τριτοταγούς δομής

Τα φάσματα στην περιοχή 260-320nm προκύπτουν από τα αρωματικά αμινοξέα τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη. Η τρυπτοφάνη απορροφά έντονα κοντά στα 290nm, η τυροσίνη μεταξύ 275 και 282nm με μικρή κορυφή σε μεγαλύτερα μήκη κύματος που επικαλύπτεται από την τρυπτοφάνη και η φαινυλαλανίνη εμφανίζει οξείες κορυφές μεταξύ 255 και 270nm[74].



Σχήμα 5.5: Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού εγγύς υπεριώδους για την αφυδρογονοκινάση τύπου II από τον *Streptomyces coelicolor*. Αναγράφονται οι περιοχές του φάσματος που οφείλονται στα αμινοξέα φαινυλαλανίνη (Phe), τυροσίνη (Tyr) και τρυπτοφάνη (Trp).

Η ακριβής μορφή και η ένταση των φασμάτων του εγγύς υπεριώδους (near UV) εξαρτάται από τον αριθμό, τη θέση και τη φύση του περιβάλλοντος κάθε αρωματικού αμινοξέος στην πρωτεΐνη. Αν και η θεωρητική ερμηνεία των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού στο εγγύς υπεριώδες δεν είναι επαρκής για την εξαγωγή ακριβών συμπερασμάτων τριτοταγούς δομής, πρόοδοι στην κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση δίνουν τη δυνατότητα διαδοχικής αφαίρεσης αρωματικών αμινοξέων από τις πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η αντιστοίχιση των φασμάτων σε χαρακτηριστικά τριτοταγούς δομής. Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στην βόεια ριβονουκλεάση και την ανθρώπινη καρβονική ανυδράση. Παρόλα αυτά, τα φάσματα CD εγγύς υπεριώδους δίνουν ένα πολύ χρήσιμο δομικό αποτύπωμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση μεταξύ φυσιολογικής και μεταλλαγμένης μορφής μιας πρωτεΐνης ή την επίδραση θερμικής μετουσίωσης στη δομή της[71],[73].

5.2.3.iii Συμπεράσματα σχετικά με τη συνολική δομή των πρωτεϊνών

Τα φάσματα στο άπω υπεριώδες μπορούν να δώσουν ποσοτικές εκτιμήσεις της δευτεροταγούς δομής που μπορούν να συγκριθούν με αυτά που προκύπτουν από κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ ή φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Τα φάσματα CD στις διάφορες περιοχές του υπεριώδους είναι πολύτιμα στη μελέτη της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών μετά την έκφραση και συνήθως είναι απαραίτητα πριν τη μελέτη μιας πρωτεΐνης με ακτίνες-Χ ή NMR.

Ο κυκλικός διχρωισμός είναι επίσης χρήσιμη τεχνική στην μελέτη δομικών μεταβολών που προκύπτουν από την πρόσδεση υποκαταστατών που σχετίζονται με την πρωτεΐνη, όπως είναι παρεμποδιστές ενζύμων ή υποστρώματα[71],[75].

5.2.4 Προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων για δομική μελέτη με κυκλικό διχρωισμό

Προτού η δομή μιας πρωτεΐνης μελετηθεί με τον κυκλικό διχρωισμό, είναι απαραίτητη κάποια προετοιμασία που θα εξασφαλίσει ακριβή αποτελέσματα.

5.2.4.i Απαιτήσεις ως προς την καθαρότητα

Η μελέτη με κυκλικό διχρωισμό απαιτεί τα δείγματα των πρωτεϊνών να είναι καθαρά. Απαιτείται τουλάχιστον 95% καθαρότητα σε πήγμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE με χρώση Coomassie brilliant blue ή χρώση αργύρου. Το διάλυμα πρέπει να είναι διαυγασμένο με υπερδιήθηση ή διαπίδυση και πλήρως απαλλαγμένο από νουκλεϊκά οξέα και ουσίες που προέρχονται από ρυθμιστικά διαλύματα έκλουσης. Τέτοιες ουσίες είναι η ιμιδαζόλη, που χρησιμοποιείται στην έκλυση πρωτεϊνών από στήλες ακινητοποιημένου μετάλλου και τα χλωριόντα, που χρησιμοποιούνται για την έκλυση πρωτεϊνών από στήλες χρωματογραφίας ιοντοεναλλαγής[66],[71].

Πολύ συχνά κατά την αποθήκευση πρωτεϊνικών διαλυμάτων χρησιμοποιούνται πρόσθετες ουσίες με στόχο να σταθεροποιήσουν τη δομή τους ή να προσδώσουν κάποιες επιθυμητές ιδιότητες στο διάλυμα. Τέτοιες ουσίες είναι λ.χ. το θειικό αμμώνιο που προσδίδει σταθερότητα, η γλυκερόλη που δρα ως αντιπηκτικό σε χαμηλές θερμοκρασίες και το EDTA που συμπλοκοποιεί βαρέα μέταλλα. Οι ουσίες αυτές πρέπει να αφαιρεθούν με υπερδιήθηση πριν τον κυκλικό διχρωισμό, καθότι απορροφούν έντονα στο υπεριώδες, και να αντικατασταθούν από ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα [76],[77].

Τέλος, για την παραλαβή φασμάτων κυκλικού διχρωισμού πρέπει να είναι γνωστή η συγκέντρωση της καθαρής πρωτεΐνης στο εξεταζόμενο διάλυμα, που μετράται συνήθως με κάποια φασματομετρική μέθοδο (βλ. §4.5.2)[71][69].

5.2.4.ii Επιλογή κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος

Το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο θα διαλυθεί η πρωτεΐνη πρέπει να επιλεγεί με προσοχή. Αφενός μεν πρέπει το διάλυμα να εξασφαλίζει κατάλληλες συνθήκες για τη διατήρηση της δομής της πρωτεΐνης και αφετέρου δεν πρέπει να παρουσιάζει παρεμβολές απορρόφησης. Κάποια ρυθμιστικά διαλύματα εμφανίζουν απορρόφηση σε μικρά μήκη κύματος. Εάν είναι επιτακτική η ανάγκη χρήσης κάποιου συγκεκριμένου διαλύματος, προτεραιότητα δίνεται στη διατήρηση της δομής της πρωτεΐνης και η απορρόφηση που οφείλεται σε αυτό μπορεί να ελαχιστοποιηθεί μικραίνοντας το μήκος της κυψελίδας[71].

Κατάλληλα διαλύματα για μελέτη στο άπω υπεριώδες σε pH 6 έως 10 είναι το φωσφορικό, το Tris και το βορικό. Σε pH 1 έως 3 κατάλληλο είναι το φωσφορικό. Πρόβλημα προκύπτει σε pH μεταξύ 4 και 6, όπου τα περισσότερα ρυθμιστικά διαλύματα στηρίζονται στον ιονισμό των καρβοξυλομάδων που απορροφούν έντονα στα 200nm. Επίσης, τα χλωριόντα που προέρχονται από HCl σε διαλύματα Tris-HCl απορροφούν έντονα κάτω από τα 200nm. Αν η ιοντική ισχύς του διαλύματος πρέπει να παραμείνει υψηλή, είναι προτιμότερη η χρήση ανιόντων όπως το θειικό και το φθόριο που δεν απορροφούν σημαντικά σε αυτά τα μήκη κύματος. Έντονα απορροφούν στα 200nm και τα ρυθμιστικά διαλύματα που βασίζονται στα δισιοντικά σουλφονικά οξέα, όπως τα HEPES, MOPS και PIPES[71].

5.2.5 Μελέτη της μεταβολής της δομής πηκτινομεθυλεστεράσης από φλοιό πορτοκαλιού *Valencia* μετά από επεξεργασία με ΥΥΠ

Στο εργαστήριο χημείας και τεχνολογίας τροφίμων μελετήθηκε η δομή της καθαρής ΠΜΕ από φλοιό πορτοκαλιού ποικιλίας *Valencia* [78]. Σκοπός της μελέτης ήταν να εξεταστούν με τη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού οι δομικές αλλαγές που επιφέρει στο ένζυμο η θερμική επεξεργασία και η επεξεργασία με υπερυψηλή υδροστατική πίεση.

Η ΠΜΕ απομονώθηκε από φλοιό πορτοκαλιού ποικιλίας *Valencia* χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που περιέγραψαν οι Cameron et al. [70]. Μέσα από μια σειρά πολλών σταδίων καθαρισμού και χρωματογραφικών διαχωρισμών, επιτεύχθηκε η επιθυμητή καθαρότητα (πάνω από 95%). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου Bradford και η ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο των Cameron et al.[70].

Η θερμική επεξεργασία έγινε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασίες 50, 60, 65 και 70°C.

Η επεξεργασία με υπερυψηλή υδροστατική πίεση πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακή συσκευή ΥΥΠ (Food Pressure Unit FPU 1.01, Resato International BV,

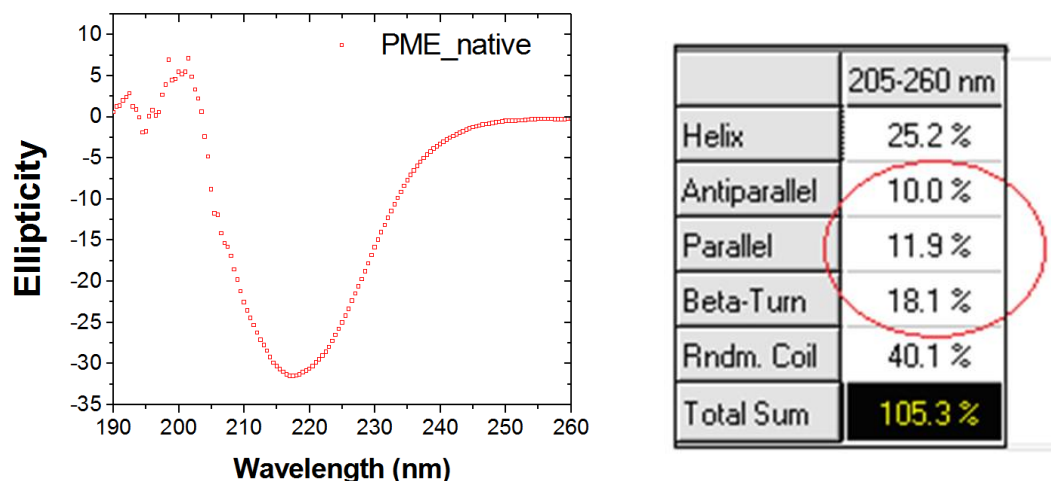
Roden, Holland) σε πιέσεις μεταξύ 200 και 700MPa και θερμοκρασίες μεταξύ 40 και 55°C, σε ενζυμικό διάλυμα παρουσία 20mM Tris-HCl pH=7.5.

Για τη μελέτη των δομικών μεταβολών του ενζύμου μετά τη θερμική επεξεργασία και την επεξεργασία με ΥΥΠ πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού σε φασματοπολαρόμετρο JASCO-715 (Εικόνα 5.1) (Welltech Enterprises Inc., USA) με υποδοχέα δείγματος Peltier που επιτρέπει τον έλεγχο της θερμοκρασίας. Τα φάσματα που ελήφθησαν ήταν στο άπω υπεριώδες (190-260nm), για τη μελέτη της δευτεροταγούς δομής, καθώς και στο εγγύς υπεριώδες (260-340nm), για τη μελέτη της τριτοταγούς δομής. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των φασμάτων ήταν το ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation, USA) ενώ για τον υπολογισμό του ποσοστού συνεισφοράς κάθε τύπου δομής στη δευτεροταγή δομή χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CDNN (Institut für Biotechnologie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg).



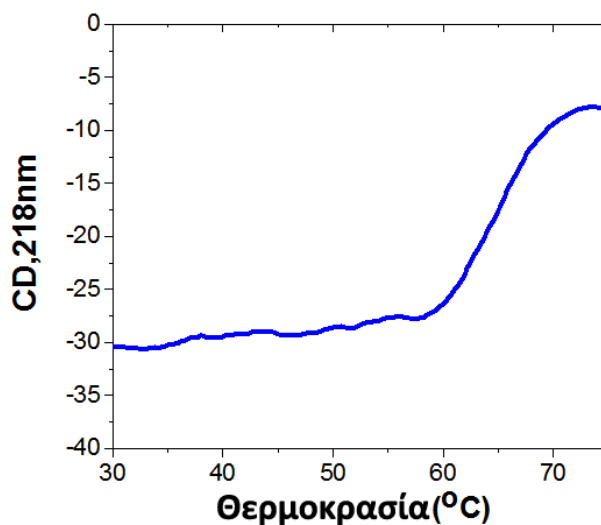
Εικόνα 5.1: Φασματοπολαρόμετρο που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη της δομής ΠΜΕ από πορτοκάλι Valencia μετά από επεξεργασία με ΥΥΠ (Πηγή:[78])

Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες για τη φυσιολογική διαμόρφωση της ΠΜΕ αποκαλύπτει θετική ελλειπτικότητα σε μήκος κύματος 196nm και αρνητική ελλειπτικότητα στα 218nm. Τα στοιχεία αυτά είναι χαρακτηριστικά της δομής πτυχωτού φύλλου. Ανάλυση του φάσματος με το πρόγραμμα ORIGIN 8.0 αποκαλύπτει ότι περίπου το 40% της δευτεροταγούς δομής της ΠΜΕ αποτελείται από β-πτυχωτά φύλλα.



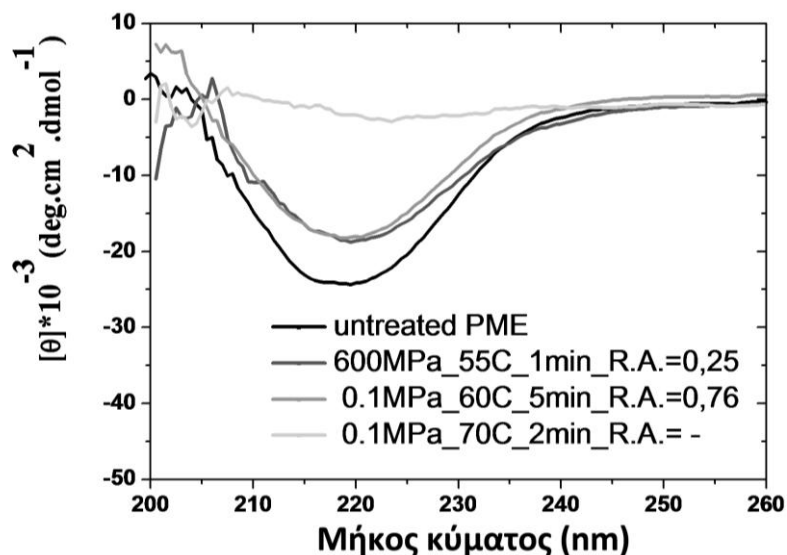
Σχήμα 5.6: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες της φυσιολογικής διαμόρφωσης της καθαρής PME από φλοιό πορτοκαλιού ποικιλίας Valencia (αριστερά). Δεξιά: ανάλυση δευτεροταγούς δομής μέσω του προγράμματος ORIGIN8.0

Η μέγιστη ελλειπτικότητα παρατηρήθηκε σε μήκος κύματος 218nm. Για τον προσδιορισμό της θερμικής αποδιάταξης, καταγράφηκε η ελλειπτικότητα στα 218nm ως συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Η προκύπτουσα καμπύλη δείχνει ότι η PME αποδιάσσεται σε θερμοκρασία 65°C (Διάγραμμα 5.1)

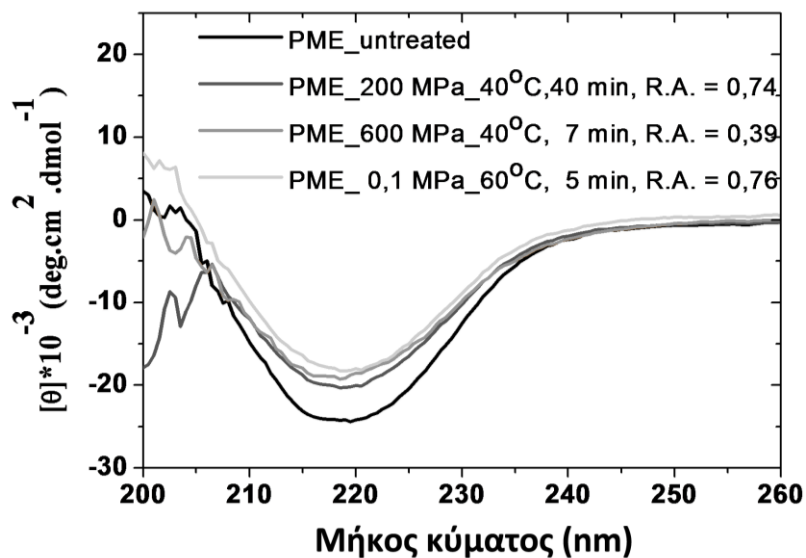


Διάγραμμα 5.1: Διάγραμμα ελλειπτικότητας ως προς τη θερμοκρασία για την καθνή PME φλοιού πορτοκαλιού Valencia. Η θερμική αποδιάταξη παρατηρείται στους 65°C

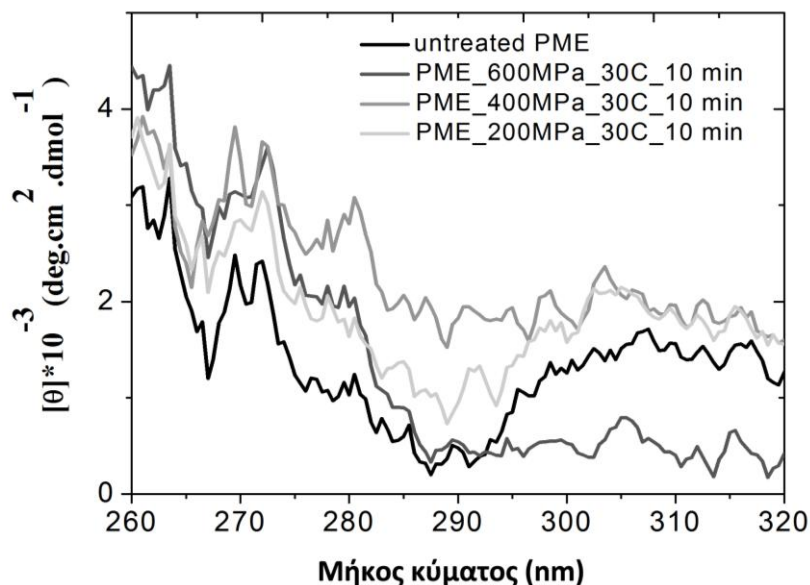
Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού της PME μετά από τη θερμική επεξεργασία και την επεξεργασία με ΥΠ φαίνονται παρακάτω (Διάγραμμα 5.2, Διάγραμμα 5.3, Διάγραμμα 5.4).



Διάγραμμα 5.2: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες για την ανεπεξέργαστη, καθαρή PME από φλοιό πορτοκαλιού Valencia και για διάφορες συνθήκες επεξεργασίας.



Διάγραμμα 5.3: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού άπω υπεριώδους της ανεπεξέργαστης, καθαρής PME από φλοιό πορτοκαλιού Valencia και για διάφορες συνθήκες επεξεργασίας.



Διάγραμμα 5.4: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού εγγύς υπεριώδους της ανεπεξέργαστης, καθαρής PME από φλοιό πορτοκαλιού Valencia και για διάφορες συνθήκες επεξεργασίας.

Από τα παραπάνω φάσματα είναι εμφανής η μεταβολή της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής της επεξεργασμένης PME σε σχέση με την ανεπεξέργαστη. Αυτό γίνεται αντιληπτό από τη διαφορετική διαμόρφωση που εμφανίζουν τα φάσματα του επεξεργασμένου ενζύμου σε σχέση με το ανεπεξέργαστο. Η αναντίστροφη μεταβολή της δομής συνοδεύτηκε και από απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας. Τα φάσματα εγγύς υπεριώδους δείχνουν μία έντονη μεταβολή της τριτοταγούς δομής για πιέσεις επεξεργασίας μεγαλύτερες από 200MPa. Η ένταση της ελλειπτικότητας στα φάσματα μειώνεται με την αύξηση της πίεσης και του χρόνου επεξεργασίας. Επίσης παρατηρείται διαφορά στη μεταβολή της δομής λόγω θερμικής επεξεργασίας και επεξεργασίας με ΥΠ. Γενικά, για την ίδια εναπομένουσα ενεργότητα, η θερμική επεξεργασία φαίνεται να προκαλεί σημαντικότερες μεταβολές στη δομή σε σχέση με τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν μετά την επεξεργασία με ΥΠ.

Κεφάλαιο 6 : Υλικά και μέθοδοι

6.1 Εισαγωγή

Όπως έγινε αντιληπτό από τα προηγούμενα κεφάλαια, η πηκτίνη αποτελεί κύριο συστατικό των φυτικών ιστών και σχετίζεται με την υφή και τις μηχανικές ιδιότητες των φρούτων και των λαχανικών. Ακόμη, παίζει κυρίαρχο ρόλο στην διατήρηση θολότητας των φρουτοχυμών, χαρακτηριστικό που είναι ιδιαίτερα επιθυμητό από τους καταναλωτές.

Τα πηκτινολυτικά ένζυμα είναι ένζυμα που συνυπάρχουν με την πηκτίνη στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών και καθορίζουν την πορεία βιοχημικών αντιδράσεων που περιλαμβάνουν την τροποποίηση της πηκτίνης. Οι τροποποιήσεις αυτές επιφέρουν άλλοτε επιθυμητά και άλλοτε ανεπιθύμητα αποτελέσματα στα τρόφιμα. Συγκεκριμένα, η πηκτινομεθυλεστεράση είναι υπεύθυνη για τη μεταβολή της υφής των φρούτων και των λαχανικών κατά την ωρίμανση καθώς και για την απώλεια θολότητας των χυμών φρούτων και λαχανικών. Επομένως, η μελέτη των βιοχημικών ιδιοτήτων και των τεχνικών απενεργοποίησης του ενζύμου αυτού είναι υψίστης σημασίας.

Η νέα τεχνολογία επεξεργασίας τροφίμων με υπερυψηλή υδροστατική πίεση (ΥΥΠ) επιτρέπει την «ψυχρή» παστερίωση των τροφίμων και είναι αποτελεσματική στην καταστροφή μικροοργανισμών και ενζύμων που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα. Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η ικανοποιητική παστερίωση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με τη θερμική, γεγονός που εξασφαλίζει την διατήρηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και της διατροφικής αξίας των τροφίμων. Η μελέτη της επίδρασης της ΥΥΠ στην απενεργοποίηση των ενζύμων που σχετίζονται με την ποιότητα των τροφίμων μπορεί να συνεισφέρει στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της διεργασίας και να διευρύνει τις εφαρμογές της σε περισσότερα προϊόντα.

Η απομόνωση και ο καθαρισμός των φυτικών ενζύμων για αναλυτικούς σκοπούς έχει σημαντικά πλεονεκτήματα ως προς τη δυνατότητα μελέτης τους. Τα ένζυμα που λαμβάνονται σε καθαρή μορφή μπορούν να μελετηθούν ως προς την καταλυτική δράση σε διάφορα πρότυπα συστήματα και να προσδιοριστούν οι

φυσικοχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δρασικότητά τους. Ακόμη, καθίσταται δυνατός ο χαρακτηρισμός των ενζύμων και η μελέτη της δομής τους με τεχνικές όπως η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού και η κρυσταλλογραφία ακτινών Χ οι οποίες έχουν υψηλές απαιτήσεις ως προς την καθαρότητα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η απομόνωση και ο καθαρισμός πηκτινομεθυλεστεράσης (ΠΜΕ) από φλοιό πορτοκαλιού ποικιλίας *Navel* και η κινητική μελέτη απενεργοποίησης του συγκεκριμένου ενζύμου με την τεχνολογία της υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης (ΥΥΠ). Ο καθαρισμός επέτρεψε τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του ενζύμου και την κινητική απενεργοποίησής του με ΥΥΠ σε πρότυπο σύστημα, γεγονός που ανοίγει το δρόμο για περαιτέρω κινητική μελέτη παρουσία άλλων ουσιών και σε διαφορετικές συνθήκες αλλά και για μελέτη της δομής του ενζύμου με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού. Τέλος η κινητική μελέτη απενεργοποίησης με ΥΥΠ διαλεύκανε την συμπεριφορά του καθαρού ενζύμου ως προς την απενεργοποίηση σε ένα μεγάλο εύρος πιέσεων και επέτρεψε τη σύγκρισή της με αποτελέσματα από άλλες πηγές. Στις επόμενες ενότητες περιγράφονται τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε.

6.2 Απομόνωση και καθαρισμός ΠΜΕ από φλοιό πορτοκαλιού *Navel*

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση της καθαρής πηκτινομεθυλεστεράσης από το φλοιό πορτοκαλιών τύπου *Navel* βασίζεται στη μέθοδο που χρησιμοποίησαν οι Cameron και Grohmann [70] για τον καθαρισμό ΠΜΕ από χυμό πορτοκαλιού *Valencia*. Είναι ένας συνδυασμός βημάτων εκχύλισης, εξαλάτωσης, διήθησης, υπερδιήθησης, φυγοκέντρησης και χρωματογραφικών διαχωρισμών.

6.2.1 Υλικά και μέθοδοι καθαρισμού και απομόνωσης

6.2.1.i Παραλαβή φλοιού και χυμού

Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν πορτοκάλια ποικιλίας *Navel*, τα οποία παραλήφθηκαν από τη βιομηχανία Ασπίς στο Άργος και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας τροφίμων.

Τα φρέσκα πορτοκάλια κόπηκαν στα δύο και από κάθε μισό παρελήφθη, με ηλεκτρικό εξαγωγέα χειρός, ο χυμός, ο οποίος συσκευάστηκε σε φιάλες πολυαιθυλενίου και αποθηκεύτηκε στους -12°C . Τα τμήματα του εναπομένου φλοιού (περικάρπιο) τεμαχίστηκαν σε οικιακή συσκευή *blender*, συσκευάστηκαν σε συσκευασίες του ενός κιλού και καταψύχθηκαν αμέσως μετά τον τεμαχισμό στους -40°C .

6.2.1.ii Ομογενοποίηση και εξαλάτωση

850g τεμαχισμένου φλοιού αναμείχθηκαν με 1350ml ρυθμιστικού διαλύματος (0.1M Tris-HCl, pH=8, 27°C, 1M NaCl, 0.02%NaN₃) και ομογενοποιήθηκαν ανά παρτίδες για 5' σε οικιακή συσκευή blender. Ο προκύπτων πολτός τοποθετήθηκε σε αναδεύσιμο δοχείο όπου παρέμεινε στους 4°C για 10 ώρες (overnight). Στη συνέχεια ο πολτός διηθήθηκε με πλέγμα και υπό κενό με απλό διηθητικό χαρτί και με προσθήκη θειικού αμμωνίου προέκυψε συγκέντρωση 20% του κορεσμού, σε θερμοκρασία 4°C.

Το προκύπτον μείγμα αναδεύτηκε στους 4°C για 2 ώρες και φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για 30min. Το υπερκείμενο υγρό παραλήφθηκε και προστέθηκε σε αυτό ποσότητα θειικού αμμωνίου ώστε να φθάσει σε συγκέντρωση 75% του κορεσμού, σε θερμοκρασία 4°C. Το μείγμα παρέμεινε υπό ανάδευση στους 4°C για 10 ώρες (overnight) και φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για 30min. Μετά από απόχυση του υπερκείμενου υγρού (μη ανιχνεύσιμη ενεργότητα ενζύμου) το ίζημα αναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (10mM Tris-HCl, pH=7.5, 31°C, 20 mM NaCl, 0.02% NaN₃)

Ακολούθησε μία σειρά τριών διηθήσεων υπό κενό με μεμβράνες κυτταρίνης ξεκινώντας από μέγεθος πόρων 0.8μm, προχωρώντας στα 0.45μm και τέλος στα 0.20μm. Τέλος, το εναπομείναν διάλυμα συμπυκνώθηκε με υπερδιήθηση με μεμβράνη MW 10kDa (Amicon P8400, Milipore USA).

6.2.2 Χρωματογραφικοί διαχωρισμοί

Η χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής (UNO-S, Biorad) και η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (P-30, Biorad) χρησιμοποιήθηκαν για το διαχωρισμό της πηκτινομεθυλεστεράσης του ενζυμικού συμπυκνώματος.

Οι στήλες χρησιμοποιήθηκαν σε σύστημα Biologic LP (Biorad) και η μέτρηση απορρόφησης του ενζυμικού διαλύματος πραγματοποιήθηκε στα 280 nm. Η χρωματογραφία διεξήχθη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και τα κλάσματα τοποθετήθηκαν στους 4° C άμεσα μετά τη συλλογή τους.



Εικόνα 6.1: Διάταξη χρωματογραφίας κατιοντοεναλλαγής. Διακρίνονται οι φιάλες των ρυθμιστικών διαλυμάτων (κέντρο δεξιά) (με άλας και χωρίς), η στήλη κατιοντοεναλλαγής (πάνω δεξιά) και ο αυτόματος συλλέκτης κλασμάτων (αριστερά). Η ίδια διάταξη χρησιμοποιήθηκε και για τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, με αλλαγή της στήλης.

6.2.2.i Χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής

Το ενζυμικό συμπύκνωμα (24 mL) εισήχθη σε στήλη UNO S (2.5x10 cm), σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH=7.5 (κινητή φάση) με ροή 2.5 mL/min. Μετά την απομάκρυνση από τη στήλη των μη δεσμευμένων μορίων, ακολούθησε η έκλουση των δεσμευμένων στη στήλη μορίων που έγινε με διαβαθμισμένη συγκέντρωση άλατος (NaCl) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται έως και 0.5 M. Η ροή ρυθμίστηκε στα 2.5 mL/min και τα κλάσματα συλλέγονταν ανά 2 min. Σε κάθε κλάσμα μετρήθηκε η δραστικότητα της πηκτινομεθυλεστεράσης με τη φασματοσκοπική μέθοδο των Cameron et al [70]. Τα κλάσματα, τα οποία περιείχαν τη ΠΜΕ συλλέχθηκαν, συμπυκνώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -40°C. Η ανωτέρω χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής πραγματοποιήθηκε δύο φορές για την επίτευξη μεγαλύτερου βαθμού καθαρότητας του εξεταζόμενου ενζύμου.

6.2.2.ii Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Το ενζυμικό συμπύκνωμα από τη χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής τροφοδοτήθηκε στη στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης P-30 (2.5x125 cm), η οποία είχε αρχικά ισορροπήσει με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl pH=7.5. Η ροή ρυθμίστηκε στα 0.4 mL/min και τα κλάσματα συλλέγονταν ανά 12 min. Σε κάθε κλάσμα μετρήθηκε η δραστικότητα της πηκτινομεθυλεστεράσης με τη φασματοσκοπική μέθοδο των Cameron et al [70]. Τα κλάσματα, τα οποία περιείχαν τη ΠΜΕ συλλέχθηκαν, συμπυκνώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -40°C.

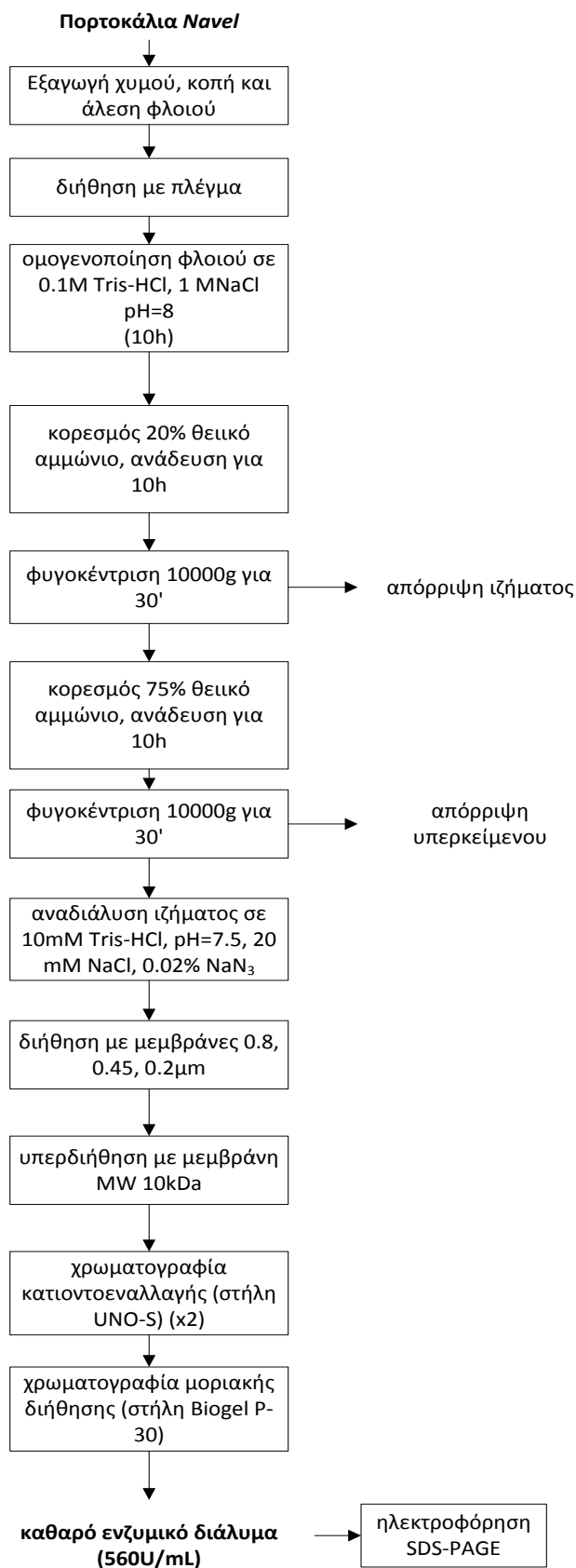
6.2.3 Ηλεκτροφόρηση

Για την ηλεκτροφόρηση των ενζυμικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SDS-PAGE χρησιμοποιώντας PhastGel Gradient 8-25. Για τον προσδιορισμό των μοριακών μεγεθών χρησιμοποιήθηκαν πρωτεΐνες συγκεκριμένου μοριακού βάρους (μάρτυρες). Η αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος. Στο συγκεκριμένο είδος ηλεκτροφόρησης ως αποδιατακτικό μέσο χρησιμοποιείται το ανιονικό απορρυπαντικό SDS, (μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου). Το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και τις αποδιατάσσει. Έτσι, δημιουργούνται επιμήκη μόρια, αρνητικά φορτισμένα, με σαφή και καθορισμένη δομή. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού μεγέθους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, κάτω από αυτές τις συνθήκες, εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό μέγεθος.



Εικόνα 6.2: πειραματική διάταξη ηλεκτροφόρησης πήγματος ακρυλαμιδίου.

Στο παρακάτω διάγραμμα ροής συνοψίζεται η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού της PME από το φλοιό του πορτοκαλιού *Navel* (Διάγραμμα 6.1).



Διάγραμμα 6.1: Διάγραμμα ροής της διαδικασίας απομόνωσης και καθαρισμού PME από φλοιό πορτοκαλιού ποικιλίας Navel

6.3 Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού κινητικών σταθερών της ΠΜΕ

Για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών του μοντέλου Michaelis-Menten για την ΠΜΕ από φλοιό πορτοκαλιού *Navel* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μέτρησης ενεργότητας των Cameron et al. [70] (βλ. §6.5.1.i). Ξεκινώντας με την αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος πηκτίνης 10mg/mL (πηκτίνη από μήλα Fluka Analytical περίπου 75% βαθμού εστεροποίησης, 1%w/v, 0.3M NaCl, διόρθωση σε pH=7.5 με NaOH 0.2N) πραγματοποιήθηκαν 5 διαδοχικές αραιώσεις σε 7, 5, 4, 3 και 1 mg/mL. Για κάθε μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν 50mL από κάθε συγκέντρωση υποστρώματος. Το ενζυμικό διάλυμα κάθε μέτρησης αποτελείτο από 2mL ρυθμιστικού διαλύματος (20mM Tris-HCl, pH=7.5, 31°C, 0.02% NaN₃) και 20μL ενζυμικού συμπυκνώματος.

6.4 Πειραματική διαδικασία θερμικής απενεργοποίησης ΠΜΕ και απενεργοποίησης με ΥΥΠ

6.4.1 Πειραματική διαδικασία θερμικής απενεργοποίησης

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη θερμικής απενεργοποίησης ΠΜΕ πορτοκαλιού *Navel*. Εξετάστηκε η επίδραση 4 θερμοκρασιών: 50, 55, 60, και 65°C. Για κάθε θερμοκρασία προετοιμάστηκαν 6 ενζυμικά δείγματα αραιώνοντας 20μL ενζυμικού συμπυκνώματος σε 2mL ρυθμιστικού διαλύματος (20mM Tris-HCl, pH=7.5, 31°C, 0.02% NaN₃) για κάθε δείγμα. Κάθε δείγμα συσκευάστηκε σε σακουλάκι διστρωματικού υλικού πολυαιθυλενίου-πολυπροπυλενίου με την πλευρά του πολυπροπυλενίου σε επαφή με το δείγμα. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας και αφαιρούνταν ένα-ένα ανά τακτά χρονικά διαστήματα, με τα πρώτα 30'' να θεωρούνται ως η χρονική στιγμή t=0. Μετά το πέρας της θερμικής κατεργασίας, προσδιορίστηκε αμέσως η εναπομείνασα δραστηριότητα της ΠΜΕ.

6.4.2 Περιγραφή της μονάδας ΥΥΠ

Για τη διεξαγωγή των κινητικών πειραμάτων με ΥΥΠ χρησιμοποιήθηκε η μονάδα Food Pressure Unit FPU 1.01 της Resato International BV (Roden, Holland) η οποία αποτελεί συνιδιοκτησία του ΕΜΠ και του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας (ΕΘΙΑΓΕ). Ο εξοπλισμός περιλαμβάνει μία μονάδα ΥΥΠ συνδεδεμένη με δύο τύπους θαλάμων πίεσης (Εικόνα 6.3 και Εικόνα 6.4). Ο πρώτος περιλαμβάνει μία συστοιχία από 6 κυλινδρικούς θαλαμίσκους όγκου 42mL που φέρουν πνευματικές βάννες και μπορούν να λειτουργήσουν ανεξάρτητα. Η συστοιχία αυτή χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή κινητικών πειραμάτων σε συνθήκες ΥΥΠ. Ο δεύτερος τύπος θαλάμου είναι ένας κυλινδρικός θάλαμος όγκου 1.5L και χρησιμοποιείται για την επεξεργασία μεγαλύτερων ποσοτήτων προϊόντων. Όλοι οι θάλαμοι διαθέτουν

μονωτικά δαχτυλίδια και σφραγίζονται με πώματα που φέρουν σπείρωμα και θερμοστοιχείο.



Εικόνα 6.3: Το σύστημα υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα. Αριστερά φαίνεται η μονάδα ΥΥΠ, στο κέντρο ο θάλαμος όγκου 1.5L και δεξιά η συστοιχία των 6 μικρότερων θαλάμων όγκου 42mL.



Εικόνα 6.4: Λεπτομέρεια των μικρών θαλάμων ΥΥΠ. Διακρίνονται οι διακόπτες που ελέγχουν τις πνευματικές θάννες για την απομόνωση του κάθε θαλάμου.

Η συσκευή ΥΥΠ μπορεί να δημιουργήσει πίεση μέχρι και 1000MPa και να λειτουργήσει σε θερμοκρασίες από -40°C έως 100°C . Το μέσο μεταφοράς πίεσης του συστήματος είναι γλυκόλη (polyglycol, ISO viscosity class VG 15). Για να

προστατευθούν τα δείγματα από τυχόν επιμολύνσεις αλλά και για να αποφευχθεί διαρροή των δειγμάτων μέσα στους θαλάμους, είναι απαραίτητο τα δείγματα να συσκευάζονται με δύο υλικά συσκευασίας.

Ο έλεγχος της πίεσης του συστήματος γίνεται από πίνακα ελέγχου ενσωματωμένο στο σύστημα πίεσης, ενώ η πίεση στο συνολικό σύστημα και στον μεγάλο θάλαμο καταγράφεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω κατάλληλου λογισμικού παρεχόμενου από την εταιρεία κατασκευής του εξοπλισμού. Ο ρυθμός αύξησης της πίεσης είναι περίπου 100MPa/7s και ενώ ο χρόνος εκτόνωσης δεν ξεπερνά τα 3s.

Ο θερμοκρασιακός έλεγχος των θαλάμων γίνεται μέσω ανεξάρτητου κυκλώματος θερμού νερού, το οποίο θερμαίνεται σε υδατόλουτρο. Το νερό κυκλοφορεί μέσα σε μανδύες που περιβάλλουν κάθε θάλαμο με τη βοήθεια φυγόκεντρης αντλίας. Το πώμα κάθε θαλάμου φέρει θερμοστοιχείο το οποίο συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η καταγραφή της θερμοκρασίας γίνεται μέσω κατάλληλου λογισμικού παρεχόμενου από την εταιρεία κατασκευής του εξοπλισμού.

6.4.3 Πειραματική διαδικασία απενεργοποίησης με ΥΥΠ

Για την κινητική μελέτη απενεργοποίησης ΠΜΕ με ΥΥΠ έγιναν πειράματα σε 3 θερμοκρασίες και 4 πιέσεις για κάθε θερμοκρασία: 45°C, 50°C, 55°C και 400, 500, 600 και 700MPa. Για κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν 6 δείγματα ενζυμικού διαλύματος. Για την παρασκευή κάθε δείγματος 20μL ενζυμικού συμπυκνώματος αραιώθηκαν σε 2mL ρυθμιστικού διαλύματος (20mM Tris-HCl, pH=7.5, 31°C, 0.02% NaN₃). Κάθε δείγμα συσκευάστηκε πρώτα σε σακουλάκι από διστρωματικό υλικό πολυαιθυλενίου-πολυπροπυλενίου, με το πολυπροπυλένιο σε επαφή με το δείγμα, και κατόπιν σε δεύτερο σακουλάκι πολυπροπυλενίου υπό συνθήκες κενού.

Για κάθε συνθήκη τα δείγματα τοποθετούνται στους μικρούς θαλάμους, που είναι πληρωμένοι με το υγρό μεταφοράς πίεσης, και οι βαλβίδες παραμένουν ανοιχτές. Το σύστημα ΥΥΠ τίθεται σε λειτουργία και μόλις φθάσει στην επιθυμητή πίεση οι βαλβίδες των θαλάμων κλείνουν (πλην ενός θαλάμου που θεωρείται ως στιγμή t=0). Οι θάλαμοι διατηρούν την επιθυμητή πίεση μέχρι οι βαλβίδες να ανοίξουν ξανά και η πίεση να εκτονωθεί. Έτσι, ανά τακτά χρονικά διαστήματα (που καθορίστηκαν κατά εκτονώνεται κι από ένας θάλαμος, με σκοπό να αποκτηθούν δεδομένα εναπομείνουσας δραστηριότητας ενζύμου για διάφορους χρόνους κατεργασίας σε κάθε συνθήκη. Ως χρονική στιγμή t=0 λαμβάνεται το δείγμα που βρίσκεται στο θάλαμο του οποίου η βαλβίδα δεν κλείνει. Ο θάλαμος αυτός παραμένει υπό πίεση για περίπου 15''.

Μετά το πέρας της κατεργασίας, τα δείγματα αφαιρέθηκαν από τους θαλάμους και διατηρήθηκαν υπό ψύξη για μερικές ώρες μέχρι την μέτρηση της δραστηριότητάς τους.

6.5 Μέτρηση ενεργότητας ΠΜΕ (PME assay)

Σε κάθε στάδιο του καθαρισμού του ενζύμου αλλά και μετά από τα κινητικά πειράματα μετρήθηκε η εναπομείνασα ενεργότητα του ενζύμου ώστε να εκτιμηθούν οι απώλειες κατά τον καθαρισμό και η απενεργοποίηση που επετεύχθη με την κατεργασία. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι μια τροποποίηση της μεθόδου που εισήγαγαν οι Rouse και Atkins το 1955 [79]. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος μέτρησης της ενεργότητας των Cameron et al. [70] η οποία είναι κατάλληλη για την μέτρηση σε ενζυμικά συμπυκνώματα καθότι η ποσότητα που απαιτείται για κάθε μέτρηση είναι πολύ μικρή.

6.5.1.i Μέτρηση ενεργότητας με τιτλοδότηση



Εικόνα 6.5: ο αυτόματος τιτλοδότης που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της ενεργότητας ΠΜΕ. Διακρίνεται η κυψελίδα μέτρησης η οποία διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία 30°C μέσω κυκλοφορίας θερμού νερού καθώς και η φιάλη με το διάλυμα NaOH (δεξιά)

Η μέτρηση της ενεργότητας έγινε με αυτόματο τιτλοδότη (TIM 854, TitraLab, Radiometer Titration Manager) και στηρίζεται στην μέτρηση παροχής διαλύματος NaOH 0.02N που απαιτείται ώστε να διατηρηθεί σταθερό το pH ενζυμικού διαλύματος και υποστρώματος πηκτίνης στο 7.5, το οποίο συνεχώς μειώνεται λόγω απελευθέρωσης πηκτινικών οξέων από τη δράση του ενζύμου.

Για κάθε μέτρηση απαιτούνται 50mL διαλύματος πηκτίνης (πηκτίνη από μήλα Fluka Analytical περίπου 75% βαθμού εστεροποίησης, 1%w/v, 0.3M NaCl, διόρθωση σε pH=7.5 με NaOH 0.2N) και 2mL ενζυμικού διαλύματος. Συνδυάζοντας το ένζυμο και το υπόστρωμα, ο τιτλοδότης διοχετεύει για 5' διάλυμα NaOH ενώ καταγράφει την ογκομετρική παροχή του διαλύματος μετά το 3^ο λεπτό, ώστε αυτή να είναι σταθερή. Η θερμοκρασία στην κυψελίδα του τιτλοδότη ήταν για όλες τις μετρήσεις σταθερή στους 30°C.

Από την ογκομετρική παροχή που λαμβάνεται στο τέλος της μέτρησης ως ένδειξη, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η δραστηριότητα του ενζυμικού διαλύματος. Ως 1 unit PME ορίζεται εκείνη η ποσότητα ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol πηκτινικών οξέων ανά min. Εξουδετέρωση 1 μmol πηκτινικών οξέων απαιτεί 1 μmol NaOH. Έτσι η παροχή διαλύματος καυστικού νατρίου εύκολα ανάγεται σε ενεργότητα ενζύμου σύμφωνα με τα παρακάτω:

Αν Q (mL/min) είναι η παροχή NaOH του τιτλοδότη, και το διάλυμα έχει συγκέντρωση $0.02\text{M}=20\mu\text{mol/mL}$, τότε η δραστηριότητα του ενζύμου στα 2mL του δείγματος που μετράται θα είναι:

$$A\left(\frac{U}{mL}\right) = \frac{1}{2mL} Q\left(\frac{mL}{min}\right) \cdot 20\left(\frac{\mu mol}{mL}\right) \quad (6.1)$$

Αν τα 2 mL διαλύματος μέτρησης προέκυψαν από την αραιώση V_1 mL ενζυμικού συμπκνώματος σε V_B mL ρυθμιστικού διαλύματος, τότε η ενεργότητα του ενζύμου στο ενζυμικό συμπύκνωμα θα είναι:

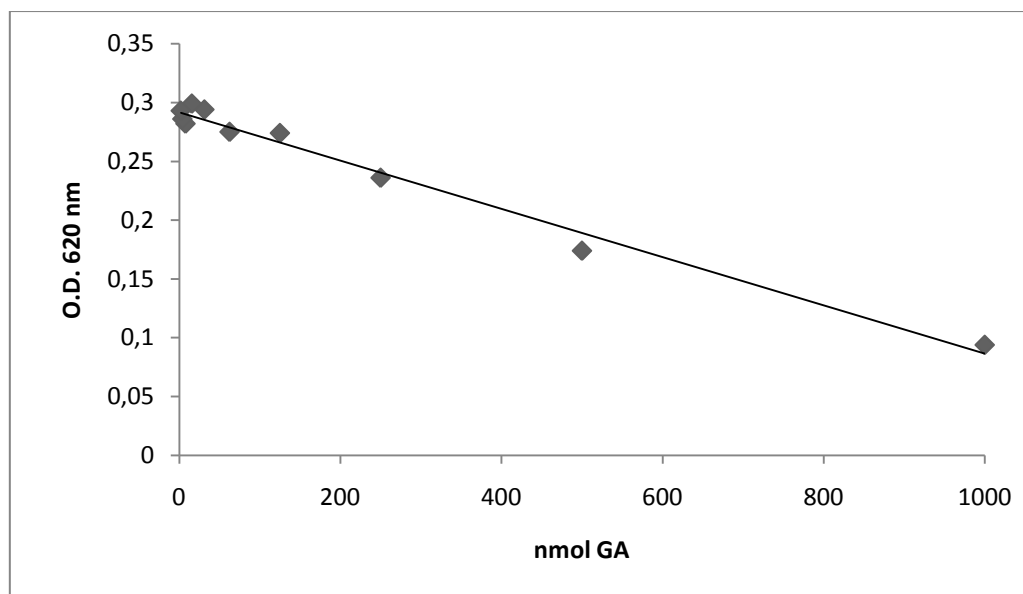
$$A\left(\frac{U}{mL}\right) = \frac{V_B + V_1}{2V_1} \cdot Q\left(\frac{mL}{min}\right) \cdot 20\left(\frac{\mu mol}{mL}\right) \quad (6.2)$$

Η εξίσωση (6.2) είναι απαραίτητη μόνο για τον προσδιορισμό της απόλυτης ενεργότητας του ενζύμου κατά τον καθαρισμό. Στα κινητικά πειράματα, επειδή χρησιμοποιείται λόγος ενεργοτήτων για να εκφράσει τη μεταβολή της ενεργότητας, η εξίσωση ανάγεται απλά σε λόγο ογκομετρικών παροχών Q του τιτλοδότη.

6.5.1.ii Μέτρηση ενεργότητας με φασματοφωτόμετρο

Η φασματοφωτομετρική μέθοδος για τη μέτρηση της ενεργότητας της PME χρησιμοποιήθηκε κατά τον καθαρισμό του ενζύμου και συγκεκριμένα στα κλάσματα που προέκυψαν μετά την χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής. Επειδή κάθε κλάσμα είχε μικρό όγκο (5mL) η μέτρηση της ενεργότητας έπρεπε να καταναλώνει όσο το δυνατόν μικρότερη ποσότητα ενζυμικού διαλύματος.

Η μέθοδος στηρίζεται στην μεταβολή του χρώματος του δείκτη BTB (bromothymol blue) κατά την υδρόλυση των εστερικών ομάδων της πηκτίνης. Ο δείκτης αλλάζει σταδιακά χρώμα από κυανό σε κίτρινο και η μεταβολή αυτή παρακολουθείται με φασματοφωτόμετρο (Microplate readers, Spectramax 250) σε μήκος κύματος 620nm. Η μεταβολή της απορρόφησης δίνει μία ευθεία της οποίας η κλίση μπορεί να μεταφραστεί σε ενεργότητα ενζύμου, μέσω κατάλληλης καμπύλης αναφοράς (Διάγραμμα 6.2).



Διάγραμμα 6.2: Καμπύλη αναφοράς γαλακτουρονικού οξέος. Με βάση αυτή την καμπύλη η μεταβολή της απορρόφησης (σε OD/min) μπορεί να μετατραπεί σε units ΠΜΕ σύμφωνα με τον ορισμό της ενεργότητας.

Το διάλυμα μέτρησης αποτελείται από 0.01M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, 0.5% w/v πηκτίνης και 0.1M NaCl. Το διάλυμα του δείκτη αποτελείται από 0.01M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και 0.025% w/v δείκτη BTB.

Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε πινακίδα (microplate) με κυψελίδες όγκου 200μL. Σε κάθε κυψελίδα αναμείχθηκαν 150μL διαλύματος μέτρησης, 10μL διαλύματος δείκτη BTB και 40μL ενζυμικού διαλύματος. Το μήκος κύματος ρυθμίστηκε στα 620nm και η θερμοκρασία του θαλάμου του φασματοφωτομέτρου στους 37°C. Κάθε σειρά μετρήσεων διήρκεσε συνολικά 10 min για κάθε πινακίδα (5 κυψελίδες πληρωμένες ανά σειρά μετρήσεων) με το φασματοφωτόμετρο να καταγράφει την απορρόφηση κάθε κυψελίδας ανά 5". Τέλος, η κλίση της ευθείας που προέκυψε για κάθε κυψελίδα μετατράπηκε σε ενεργότητα ΠΜΕ μέσω της καμπύλης αναφοράς (Διάγραμμα 6.2).

6.6 Μέτρηση συνολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Για τη μέτρηση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μετά από κάθε στάδιο καθαρισμού του ενζύμου επιστρατεύθηκε η μέθοδος Bradford.

Η αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στην ιδιότητα που έχει η χρωστική ουσία Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 να δεσμεύεται στα μόρια των πρωτεϊνών. Η χρωστική αυτή, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη κατάσταση και σε όξινο περιβάλλον, απορροφά στα 465nm και το χρώμα της είναι καστανό. Η δημιουργία του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κυανού χρώματος και τη μεταβολή του μέγιστου απορρόφησης στα 595nm, όπου και μετράται φωτομετρικά.

Για κάθε μέτρηση παρασκευάστηκαν δύο δείγματα. Για το τυφλό δείγμα αναμείχθηκαν 1mL διαλύματος Bradford και 25μL ρυθμιστικού διαλύματος και για το δείγμα μέτρησης 1mL διαλύματος Bradford και 25μL ενζυμικού συμπυκνώματος. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κυψελίδες χαλαζία και μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV, σε μήκος κύματος 595nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς από αλβουμίνη βόειου ορού, (BSA) ($C_{prot} \left(\frac{mg}{mL} \right) = 1.093 \cdot a$).

Κεφάλαιο 7 : Επεξεργασία μετρήσεων και αποτελέσματα

7.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός της πηκτινομεθυλεστεράσης (ΠΜΕ) από φλοιό πορτοκαλιού ποικιλίας *Navel* ώστε να παραληφθεί το συγκεκριμένο ένζυμο σε καθαρή μορφή με στόχο τον περαιτέρω βιοχημικό, καταλυτικό και δομικό χαρακτηρισμό του. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης (ΥΥΠ) και της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση του ενζύμου στο καθαρό διάλυμα (pH=7.5). Η απενεργοποίηση βρέθηκε ότι ακολουθεί κινητική α' τάξης. Υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές k , E_a , V_a και προσδιορίστηκαν επίσης οι παράμετροι δύο κινητικών μοντέλων (ένα εκθετικό και ένα πολυωνυμικό) που εκφράζουν τη συνδυασμένη επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης του ενζύμου. Μέσω των μοντέλων αυτών είναι δυνατός ο υπολογισμός της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης σε ένα μεγάλο εύρος πιέσεων και θερμοκρασιών.

7.2 Καθαρισμός ΠΜΕ φλοιού πορτοκαλιού *Navel*

7.2.1 Εκχύλιση

Πρώτη φάση του καθαρισμού της ΠΜΕ αποτέλεσε η εκχύλιση της από το φλοιό του πορτοκαλιού *Navel*. Η επιλογή της πηγής στηρίζεται στο γεγονός ότι η συγκέντρωση και η δραστηριότητα του ενζύμου στο φλοιό παρουσιάστηκε σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή του χυμού, μιας και η ΠΜΕ απαντάται κυρίως στα αδιάλυτα στο νερό κυτταρικά συστατικά.

Καθότι η ΠΜΕ είναι ένζυμο προσδεμένο στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών ιστών μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, χρειάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα με υψηλή ιοντική ισχύ για την εκχύλιση της (0.1M Tris-HCl, pH=8, 1M NaCl, 0.02% NaN₃). Η εκχύλιση έδωσε συνολικά 38475 Units ΠΜΕ σε όγκο 2025mL.

7.2.2 Καταβύθιση και διήθηση

Μετά την καταβύθιση σε 20% του κορεσμού $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ δεν παρατηρήθηκε σημαντική απώλεια ενεργότητας, απομακρύνθηκε όμως μεγάλη ποσότητα μεγάλων σωματιδίων. Η καταβύθιση σε 75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ήταν επιτυχής δίνοντας ενεργότητα 83.4% του ανεπεξέργαστου εκχυλίσματος. Το υπερκείμενο υγρό της 2^{ης} φυγοκέντρησης δεν είχε ανιχνεύσιμη ενεργότητα, ενώ μέρος της ενεργότητας (17%) χάθηκε κατά τη σειρά διηθήσεων. Οι διηθήσεις ήταν απαραίτητες, καθώς επέτρεψαν την απομάκρυνση σωματιδίων μεγάλου μεγέθους που θα μπορούσαν να δημιουργήσουν προβλήματα στον εξοπλισμό των μετέπειτα σταδίων.

7.2.3 Υπερδιήθηση

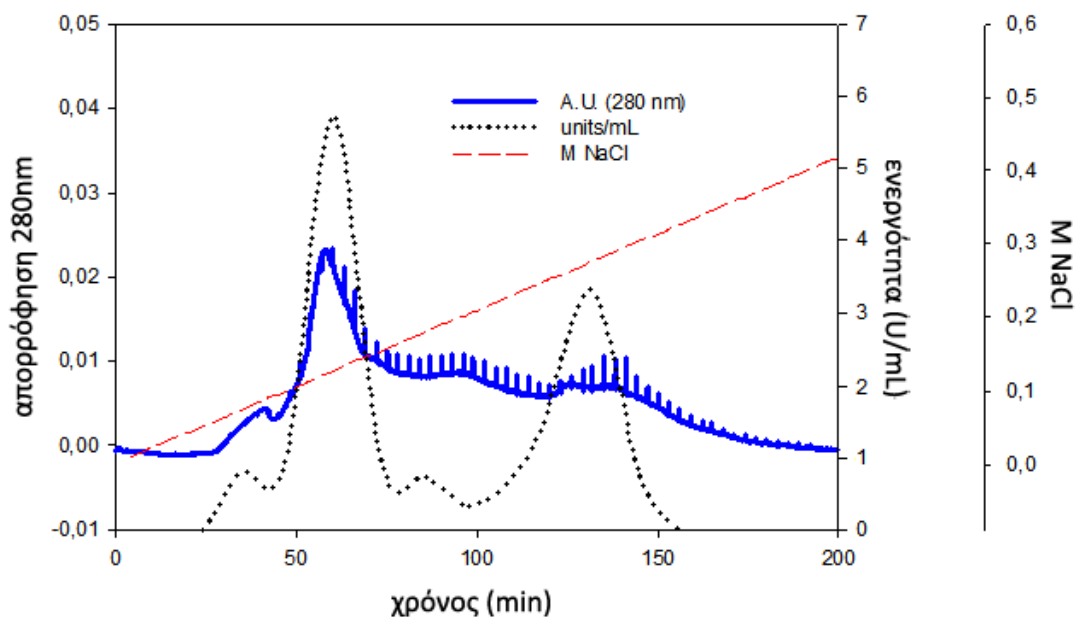
Η υπερδιήθηση του ενζυμικού μείγματος κρίθηκε απαραίτητη αφενός μεν για την απομάκρυνση των αλάτων και αφετέρου για τη συμπύκνωσή του. Και τα δύο βήματα απαιτούνται για τη σωστή λειτουργία των διαδικασιών χρωματογραφικού καθαρισμού.

Μεγάλες απώλειες ενεργότητας παρατηρήθηκαν κατά την υπερδιήθηση και τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς. Μετά την υπερδιήθηση παρατηρήθηκε απώλεια ενεργότητας 30%. Μετά το πέρας των χρωματογραφικών διαχωρισμών, η εναπομείνασα ενεργότητα που ανακτήθηκε ήταν στο 9.5% (σε σχέση με αυτήν του ακατέργαστου εκχυλίσματος φλοιού).

7.2.4 Χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής

Η έκλουση της ΠΜΕ κατά την χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής εμφάνισε δύο κορυφές απορρόφησης, μία έντονη κορυφή στα 58min και μία λιγότερο ευδιάκριτη στα 131min. Η έκλουση της έντονης κορυφής πραγματοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις NaCl μεταξύ 0.16 και 0.22M ενώ η έκλουση της μικρότερης κορυφής μεταξύ 0.25 και 0.35M. Ο ανωτέρω χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε δις για την αύξηση της καθαρότητας του ενζυμικού διαλύματος.

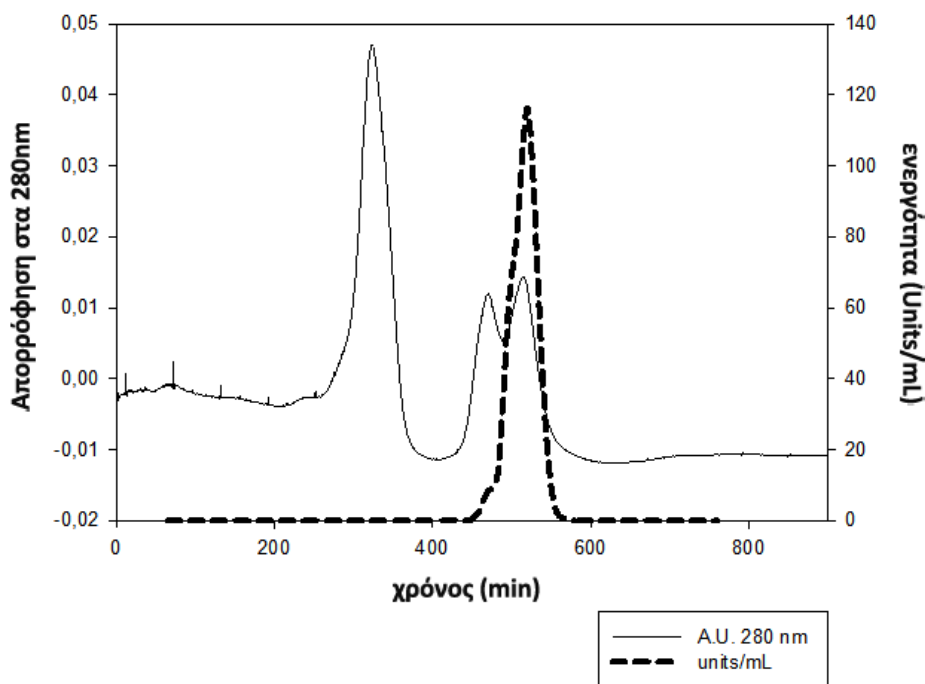
Αντιπαράθεση της καμπύλης έκλουσης με την καμπύλη ενεργότητας ΠΜΕ κάθε κλάσματος αποκαλύπτει ότι η μικρή κορυφή απορρόφησης έχει στην πραγματικότητα σημαντική ενεργότητα ΠΜΕ, γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη δύο ισοενζύμων της ΠΜΕ στο φλοιό του πορτοκαλιού *Navel*. Το κλάσμα που απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα απενεργοποίησης προήλθε από την πρώτη κορυφή της καμπύλης έκλουσης.



Διάγραμμα 7.1: καμπύλη έκλουσης ($1^{οε}$ χρωματογραφικός διαχωρισμός), καμπύλη ενεργότητας και καμπύλη μεταβολής συγκέντρωσης NaCl κατά την χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής. Οι δύο κορυφές που εμφανίζονται μαρτυρούν την παρουσία δύο ισοενζύμων της ΠΜΕ στο φλοιό του πορτοκαλιού Navel.

7.2.5 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Για περαιτέρω καθαρισμό του ενζυμικού κλάσματος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης με στήλη Biogel P-30. Η έκλουση της πηκτινομεθυλεστεράσης παρατηρήθηκε ως μία μονή κορυφή στα 460min (Διάγραμμα 7.2).



Διάγραμμα 7.2: Καμπύλη έκλουσης της πηκτινομεθυλεστεράσης κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Αντιπαράθεση με την καμπύλη ενεργότητας του ενζύμου, αποκαλύπτει την κορυφή έκλουσης.

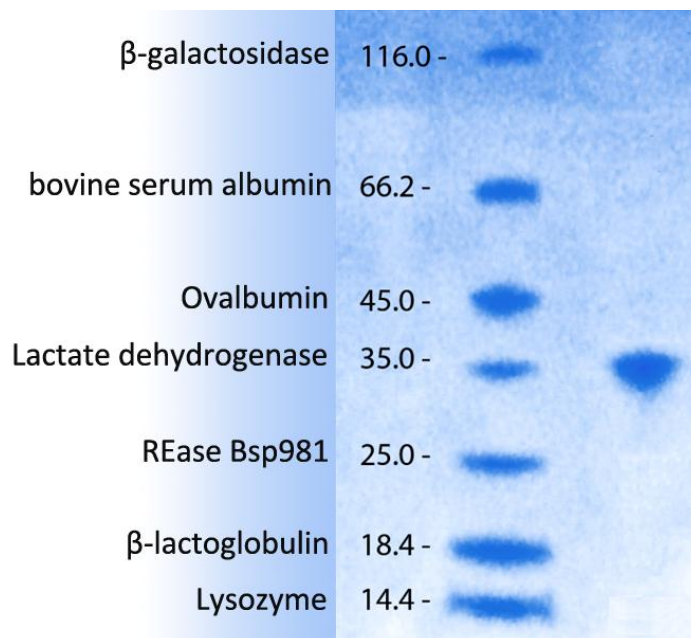
Παρακάτω φαίνεται ο πίνακας προόδου του καθαρισμού (Πίνακας 7.1). Είναι εμφανής η πορεία ανάκτησης ενεργότητας από το ακατέργαστο εκχύλισμα, καθώς και η αύξηση της ανηγμένης ενεργότητας με την πορεία του καθαρισμού. Οι τιμές που αναγράφονται στην τελευταία σειρά αφορούν το ενζυμικό διάλυμα με το οποίο πραγματοποιήθηκαν τα περαιτέρω κινητικά πειράματα.

Πίνακας 7.1: Συγκεντρωτικός πίνακας που καταγράφει την πρόοδο του καθαρισμού του ενζύμου μέσα από μετρήσεις όγκου διαλύματος, ενεργότητας ενζύμου και συνολικής πρωτεΐνης μετά από στάδια κλειδιά. Τα χαρακτηριστικά του τελικού ενζυμικού συμπυκνώματος, με το οποίο έγιναν τα πειράματα απενεργοποίησης, φαίνονται στην τελευταία σειρά του πίνακα. Όπως φαίνεται, ανακτήθηκε το 9.5% της ενεργότητας ενζύμου που βρίσκεται στο φλοιό του πορτοκαλιού.

Στάδιο καθαρισμού	Συνολικός όγκος κλάσματος (mL)	pH	ενεργότητα ενζύμου (units/mL)	Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης (mg/mL)	Ενεργότητα ανά mg πρωτεΐνης units/mg _{prot}	Συνολική ενεργότητα (Units)	Ποσοστό ανάκτησης ενεργότητας (%)	
ακατέργαστο εκχύλισμα (μετά την 1η φυγοκέντρηση)	2025	-	19	-	-	38475	100	
μετά την διήθηση σε μεμβράνη 0.2μm	155	-	207	1	207	32085	83.4	
Υπερδιήθηση 10000MW	45	7.5	450	0.7	642.9	20550	53.4	
UNO S χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής I	<i>κλάσμα i</i>	37	7.5	350	0.6	583.3	12950	33.7
	<i>κλάσμα ii</i>	-	-	-	-	-	-	-
UNO S χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής II	<i>κλάσμα i</i>	6.4	7.5	910	1.3	700	5800	15.1
	<i>κλάσμα ii</i>	6	7.5	250	0.57	438.6	1500	3.9
Χρωματογραφία μοριακής διήθησης Biogel p-30	<i>κλάσμα i</i>	6.5	7.5	560	0.48	1125	3640	9.5

7.2.6 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE έδωσε μία ζώνη σε μοριακό βάρος 36kDa, επιβεβαιώνοντας την καθαρότητα του ενζυμικού συμπυκνώματος και την επιτυχία της μεθόδου καθαρισμού (καθόλου πρωτεϊνικές προσμίξεις, επιλογή μόνο ενός ισοενζύμου PME).



Εικόνα 7.1: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης δείγματος PME από φλοιό πορτοκαλιού Navel. Διαχωρισμός με PhastGel Gradient 8-25 και χρώση με χρωστική Coomassie brilliant blue. Στην αριστερή στήλη φαίνονται οι πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους και στην δεξιά φαίνεται η PME. Τα γνωστά μοριακά βάρη (kDa) και οι πρωτεΐνες-μάρτυρες αναγράφονται αριστερά.

Σύγκριση με PME από άλλες πηγές στη βιβλιογραφία (Πίνακας 7.2) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η PME από το φλοιό πορτοκαλιού ποικιλίας Navel είναι μια PME μέσου μοριακού βάρους[16].

Πίνακας 7.2: Μοριακά βάρη ΠΜΕ από διάφορες πηγές όπως προσδιορίστηκαν με ηλεκτροφόρηση (Δεδομένα από:[58],[53],[59],[48],[80])

Πηγή ΠΜΕ	Μοριακό βάρος (kDa)
Μπανάνα (Ly-Nguyen et al.)	38
Καρότο (Sila et al.)	32
Φράουλα (Ly-Nguyen et al.)	33.5, 43
Πορτοκάλι <i>Valencia</i> (Savary et al.)	34
Λευκό γκρέιπφρουτ (Guiavarc'h et al.)	31.5, 23.7

7.3 Προσδιορισμός κινητικών σταθερών για την αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος

Για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών της ΠΜΕ χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Michaelis-Menten:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad (7.1)$$

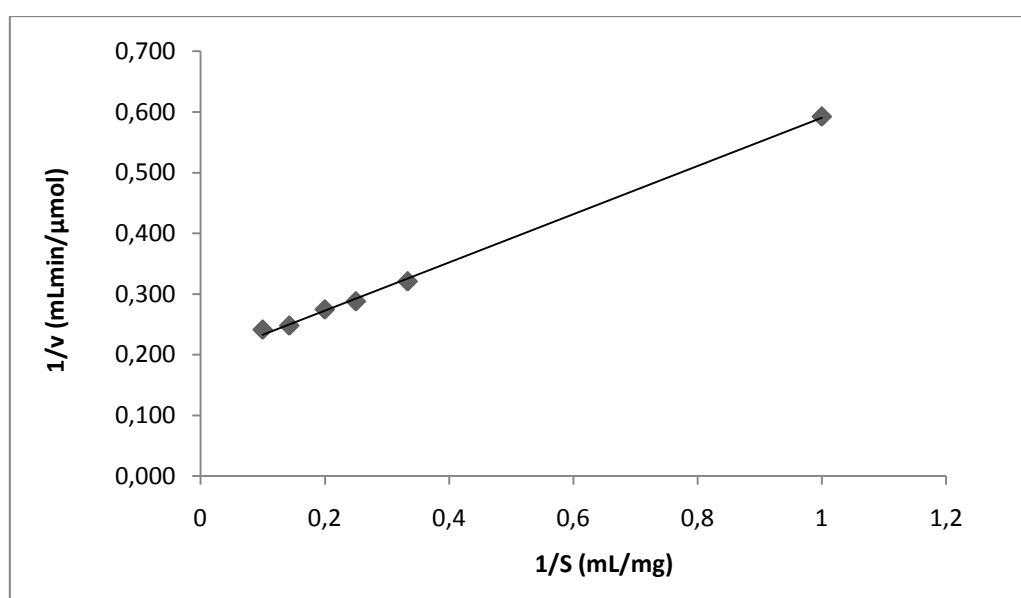
Η εξίσωση γραμμικοποιείται δίνοντας το διπλό-αντίστροφο γράφημα Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (7.2)$$

Έτσι χάραξη του αντίστροφου ρυθμού παραγωγής προϊόντος ως προς την αντίστροφη συγκέντρωση υποστρώματος δίνει ευθεία με κλίση $\frac{K_m}{V_m}$ και αποτέμνουσα $\frac{1}{V_m}$. Με γραμμική παλινδρόμηση στα πειραματικά δεδομένα υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές K_m (mg/mL) και V_m (μmol/mL min).

Πίνακας 7.3: Δεδομένα για τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών της εξίσωσης Michaelis-Menten.

Συγκέντρωση πηκτίνης (mg/mL)	Παροχή τιτλοδότη (mLNaOH/min)	Ρυθμός παραγωγής προϊόντος (μmol/mL min)	1/S (mL/mg)	1/v (mLmin/μmol)
1	0.1688	1.688	1	0.592
3	0.3118	3.118	0.33	0.321
4	0.3475	3.475	0.25	0.288
5	0.3644	3.644	0.20	0.274
7	0.4036	4.036	0.14	0.248
10	0.4147	4.147	0.10	0.241



Διάγραμμα 7.3: διάγραμμα Lineweaver-Burk για τα πειραματικά δεδομένα. Από τη γραμμική παλινδρόμηση μπορούν να υπολογιστούν οι κινητικές σταθερές του ενζύμου.

Από το παραπάνω διάγραμμα υπολογίζονται οι κινητικές σταθερές μέσω της

$$\text{εξίσωσης } \frac{1}{v} = 0.397 \cdot \frac{1}{S} + 0.193:$$

$$K_m \quad 2.06 \text{ mg/mL}$$

$$V_m \quad 5.18 \text{ μmol/mLmin}$$

Η σταθερά V_m εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου μέσω της σχέσης:

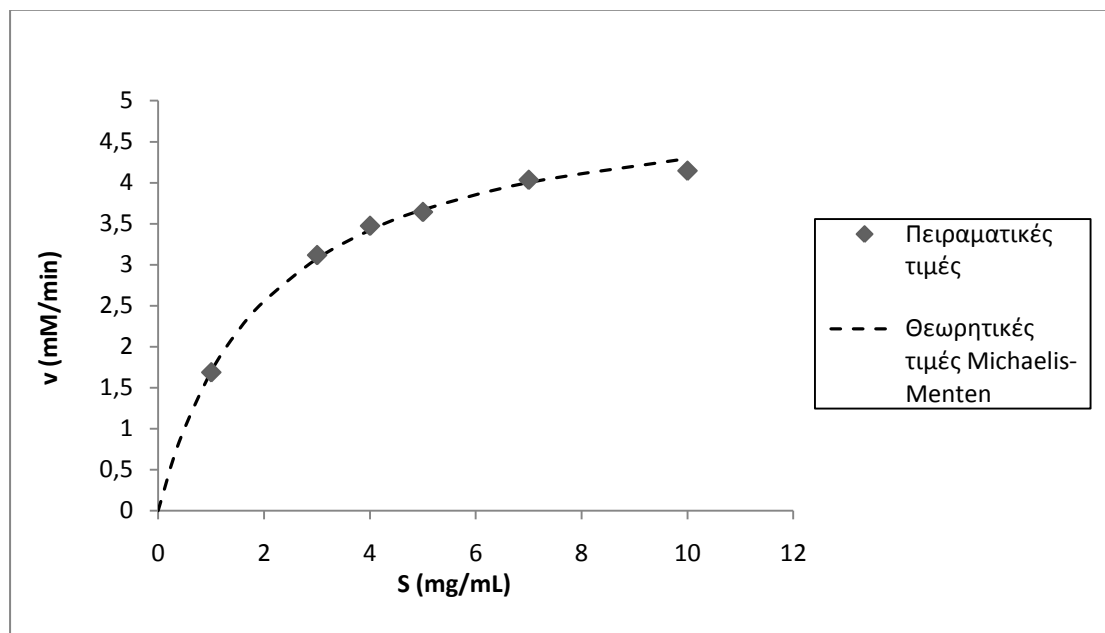
$$V_m = k_2[E_0] \quad (7.3)$$

Η συγκέντρωση του ενζύμου μπορεί εύκολα να υπολογιστεί γνωρίζοντας τη σύσταση του ενζυμικού διαλύματος από τις μετρήσεις πρωτεΐνης κατά Bradford

(0.48mg/mL) καθώς και το μοριακό βάρος του ενζύμου από την ηλεκτροφόρηση (36000g/mol). Από την Εξίσωση (7.3) προκύπτουν:

$$[E_0]= 0.00013 \mu\text{mol/mL}$$

$$k_2= 38819 \text{ min}^{-1}$$



Διάγραμμα 7.4: εξάρτηση του ρυθμού της ενζυμικής δράσης μεταξύ πηκτίνης και ΠΜΕ από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, όπως προσδιορίστηκε πειραματικά και θεωρητικά από την εξίσωση Michaelis-Menten και τις υπολογισμένες σταθερές (Συνθήκες μέτρησης: pH=7.5, 30°C, 0.3M NaCl).

Η σταθερά K_m αποτελεί εγγενή παράμετρο του ενζύμου και εκφράζει τη συγγένειά του με το υπόστρωμα[63]. Σε σχέση με ΠΜΕ από άλλες πηγές στη βιβλιογραφία (Πίνακας 7.4) , η ΠΜΕ από φλοιό πορτοκαλιού ποικιλίας *Navel* φαίνεται να έχει πολύ μικρότερη συγγένεια με το υπόστρωμα.

Πίνακας 7.4: Σύγκριση σταθερών K_m για ΠΜΕ από διαφορετικές πηγές (Δεδομένα από: [58],[53],[59],[48],[80])

Πηγή	K_m (mg/mL)	Συνθήκες μέτρησης			
		Θερμοκρασία (°C)	pH	DE πηκτίνης (%)	συγκέντρωση NaCl (M)
Μπανάνα (Ly-Nguyen et al.)	0.151	35	7	75	0.117
Καρότο (Sila et al.)	0.154	22.5	6.5	70-75	0.117
Φράουλα (Ly-Nguyen et al.)	0.416	35	7	70-75	0.117
Λευκό γκρέιπφρουτ (Guiavarc'h et al.)	0.274	22.5	7	75	0.117

7.4 Θερμική απενεργοποίηση ΠΜΕ

Κατά τη θερμική κατεργασία του ενζυμικού διαλύματος ΠΜΕ προσδιορίστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης του ενζύμου. Με βάση τις πειραματικές μετρήσεις παρατηρήθηκε ότι η απενεργοποίηση ακολουθεί απλή κλασματική κινητική πρώτης τάξης της μορφής:

$$\frac{A}{A_0} = e^{-kt} \quad (7.4)$$

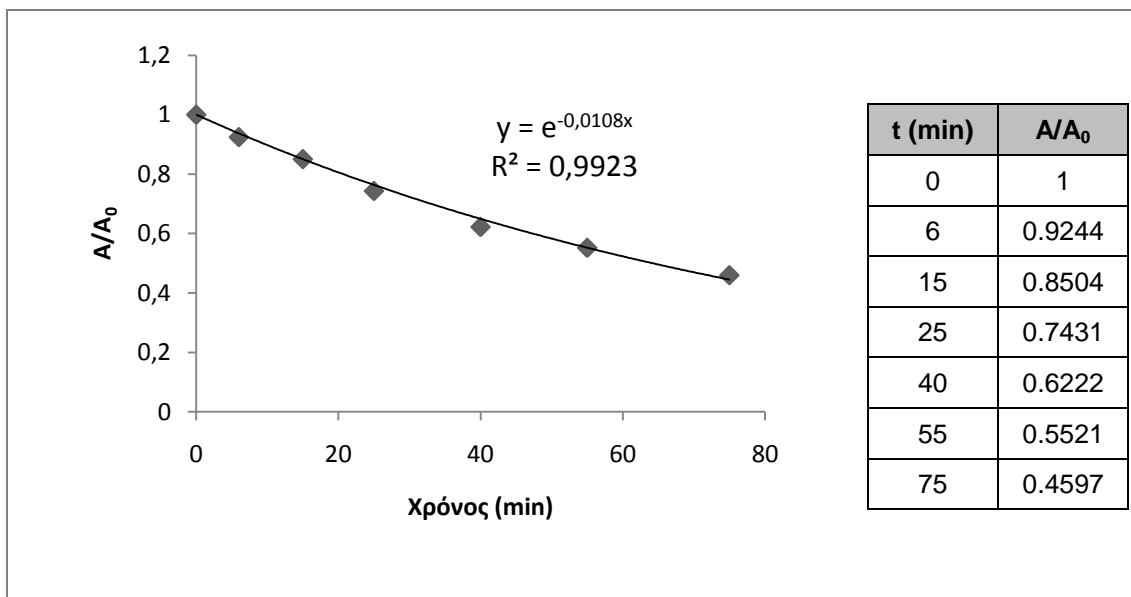
Όπου A η ενεργότητα του ενζύμου στη χρονική στιγμή t , A_0 η ενεργότητα τη χρονική στιγμή $t=0$ και k η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς προσαρμόστηκε εκθετική συνάρτηση στα πειραματικά δεδομένα.

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η απενεργοποίηση του ενζύμου σε συνάρτηση με το χρόνο για τις θερμοκρασίες στις οποίες έγιναν τα πειράματα.

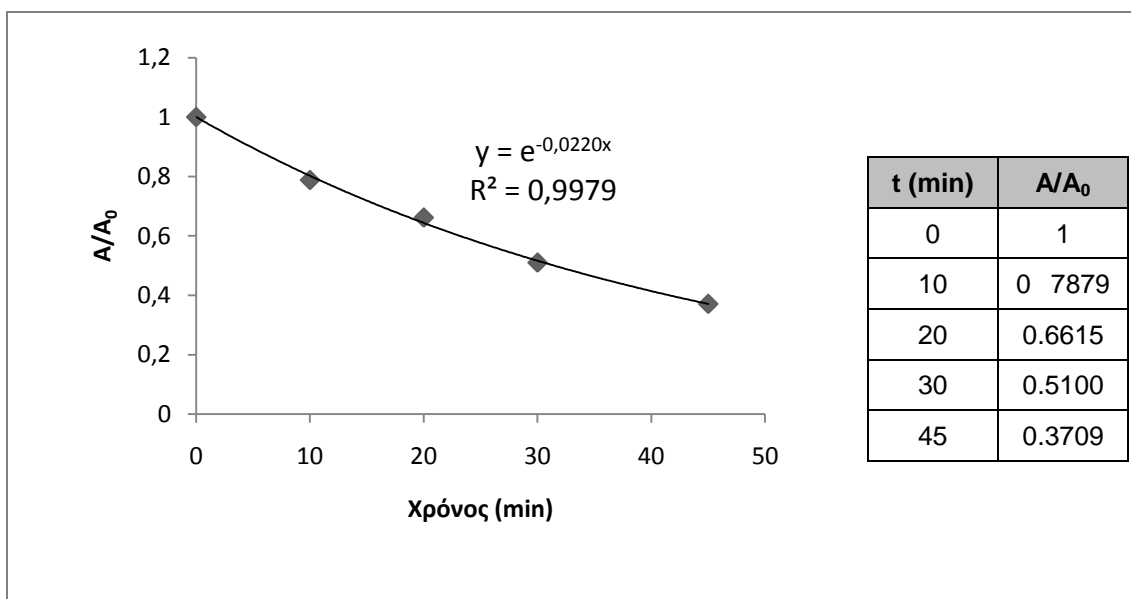
7.4.1 Απενεργοποίηση της ΠΜΕ σε συνάρτηση με το χρόνο

7.4.1.i Θερμοκρασία 50°C



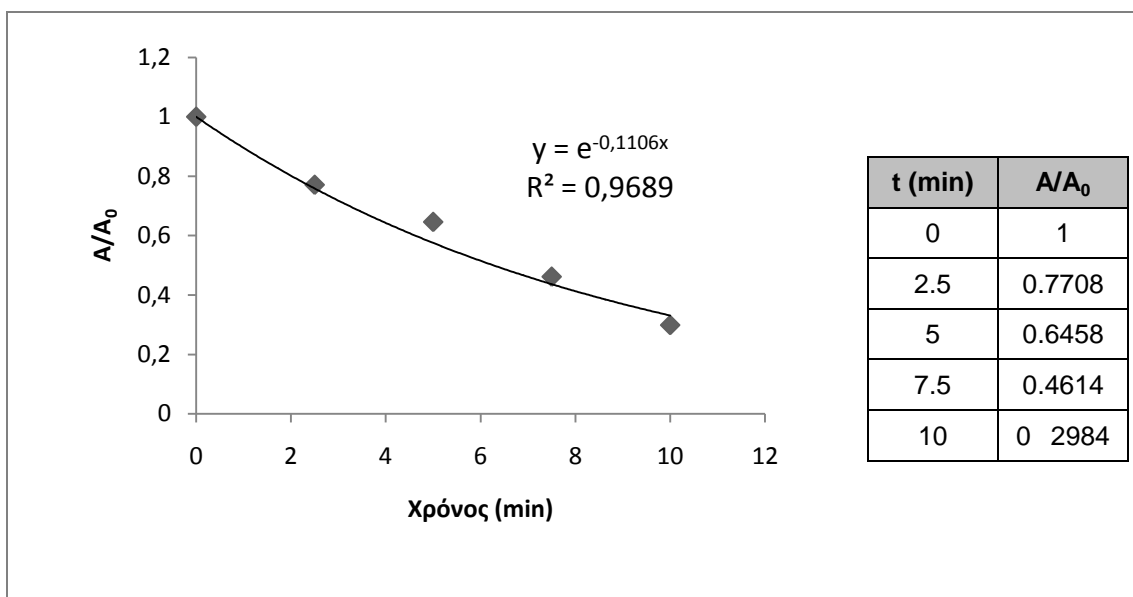
Διάγραμμα 7.5: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ στους 50°C

7.4.1.ii Θερμοκρασία 55°C



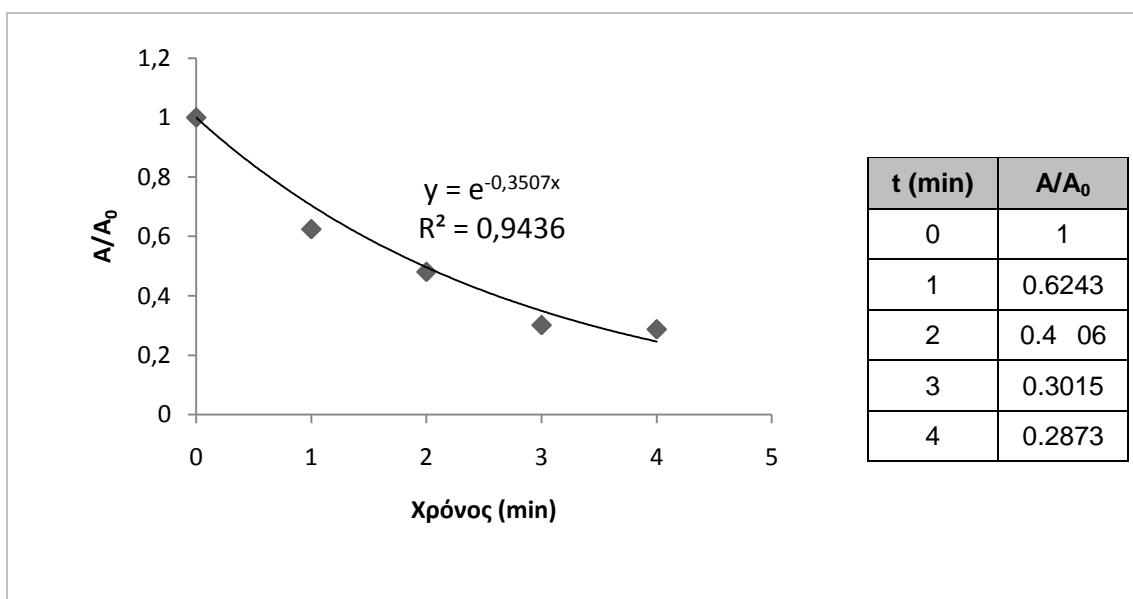
Διάγραμμα 7.6: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ στους 55°C

7.4.1.iii Θερμοκρασία 60°C



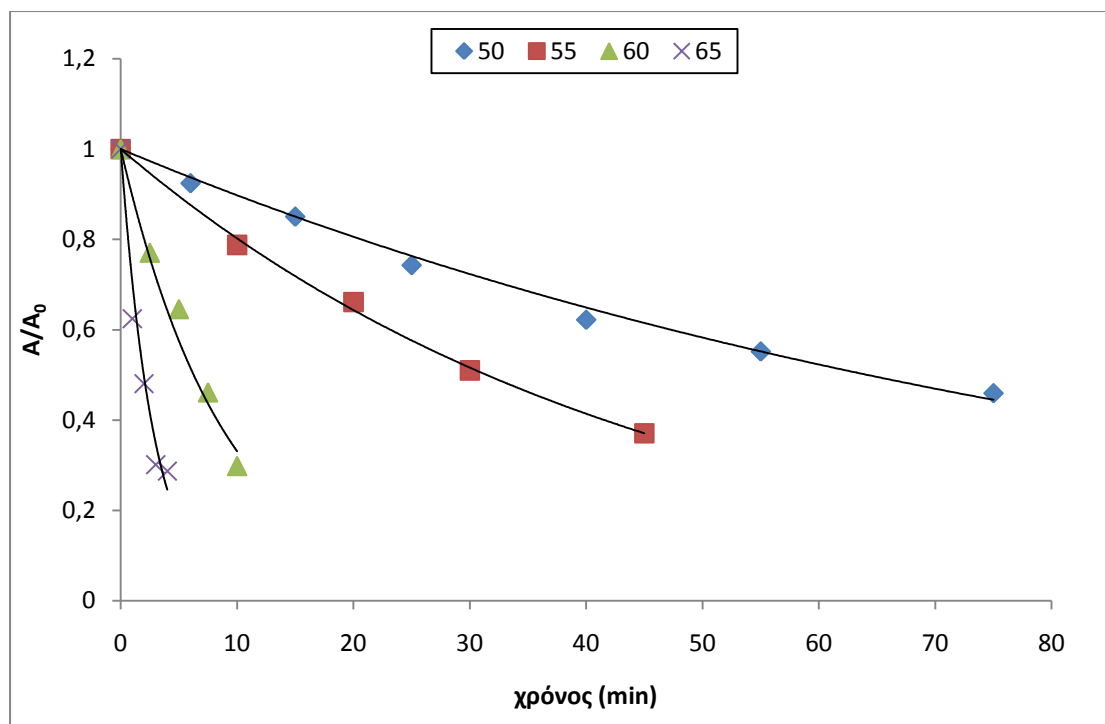
Διάγραμμα 7.7: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ στους 60°C

7.4.1.iv Θερμοκρασία 65°C



Διάγραμμα 7.8: : Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ στους 65°C

Τα παραπάνω διαγράμματα συνοψίζονται στο Διάγραμμα 7.9. Στα πειραματικά δεδομένα κάθε θερμοκρασίας προσαρμόστηκε εκθετική συνάρτηση από την οποία υπολογίστηκε η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης.



Διάγραμμα 7.9: Κινητική απενεργοποίησης για τις τέσσερις θερμοκρασίες του πειράματος

Πίνακας 7.5: Σταθερές ρυθμού θερμικής απενεργοποίησης και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού για την ΠΜΕ πορτοκαλιού Navel όπως προέκυψαν από τα πειραματικά δεδομένα

Θερμοκρασία (°C)	σταθερά ρυθμού απενεργοποίησης (min ⁻¹)	Χρόνος υποδεκαπλασιασμού (min)
50	0.011	213.2
55	0.022	104.7
60	0.111	88.2
65	0.351	20.8

7.4.2 Υπολογισμός ενέργειας ενεργοποίησης

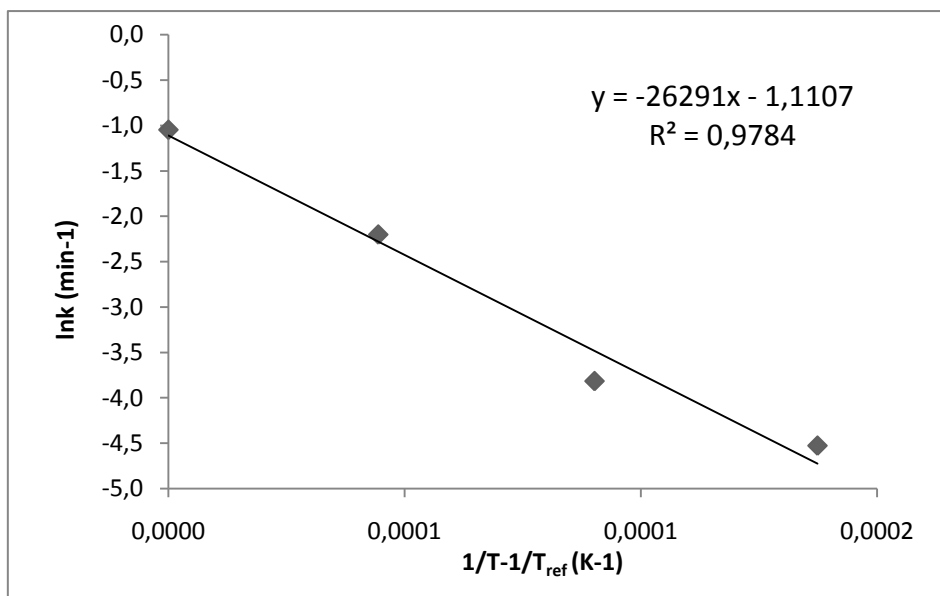
Η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά του ρυθμού θερμικής απενεργοποίησης της ΠΜΕ μπορεί να περιγραφεί από τη σχέση Arrhenius:

$$k = k_{ref} \exp \left[-\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (7.5)$$

Η σχέση αυτή μπορεί να εκφραστεί και ως:

$$\ln k = \ln k_{ref} - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \quad (7.6)$$

Συνεπώς, η χάραξη του λογαρίθμου της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης ως προς την ποσότητα $\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)$ θα δώσει ευθεία με κλίση $-\frac{E_a}{R}$ και αποτέμνουσα $\ln k_{ref}$. Με γραμμική παλινδρόμηση στις πειραματικά υπολογισμένες τιμές της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης υπολογίζεται η ενέργεια ενεργοποίησης. Για θερμοκρασία αναφοράς 65°C, η προσαρμογή φαίνεται στο Διάγραμμα 7.10.

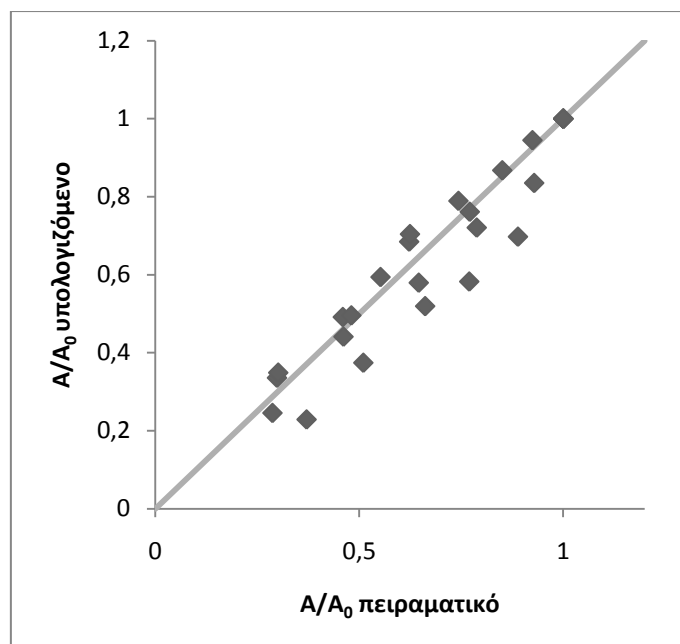


Διάγραμμα 7.10: Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία, μέσω της γραμμικοποιημένης σχέσης Arrhenius.

Η ενέργεια ενεργοποίησης και η σταθερά του ρυθμού σε θερμοκρασία $T_{ref}=65^{\circ}\text{C}$ υπολογίζονται:

$$E_a = 218 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

$$k_{ref} = 0.329 \text{min}^{-1}$$

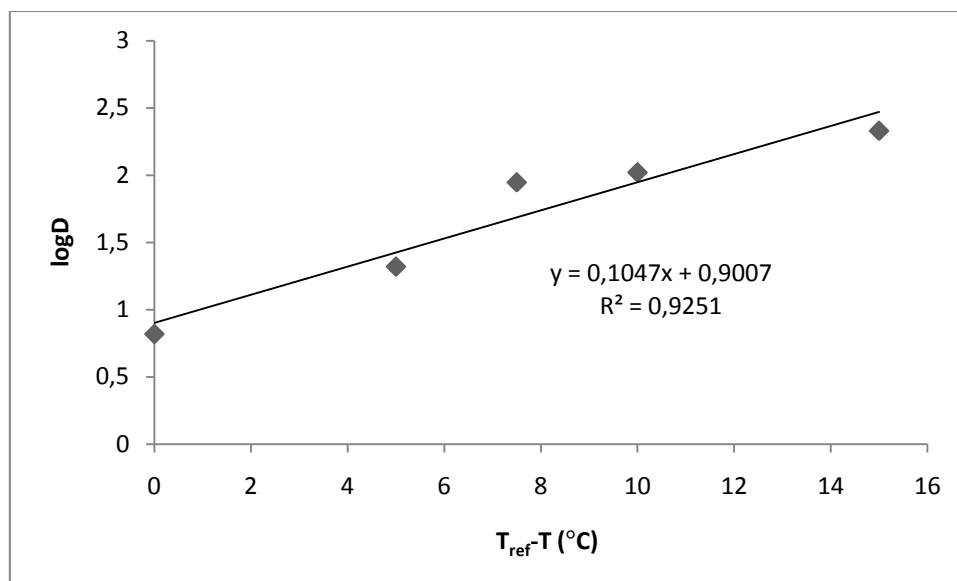


Διάγραμμα 7.11: Πειραματικές τιμές απενεργοποίησης ΠΜΕ προς υπολογισμένες με τη σχέση Arrhenius, σε θερμοκρασίες 50, 55, 60 και 65°C

Το κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης περιγράφει ικανοποιητικά τη θερμική απενεργοποίηση της ΠΜΕ, και η εξίσωση Arrhenius περιγράφει ικανοποιητικά την επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης. Αύξηση της θερμοκρασίας, αυξάνει το ρυθμό απενεργοποίησης του ενζύμου.

7.4.3 Υπολογισμός της σταθεράς Z_T για τη θερμική επεξεργασία της ΠΜΕ

Από τις υπολογισμένες τιμές χρόνου υποδεκαπλασιασμού για τη θερμική απενεργοποίηση μπορεί να υπολογιστεί η τιμή της σταθεράς Z_T . Χάραξη του διαγράμματος $\log D$ ως προς την ποσότητα $T_{ref}-T$ δίνει ευθεία με κλίση $1/Z_T$ και αποτέμνουσα $\log D_{T_{ref}}$. Για θερμοκρασία αναφοράς 65°C έχουμε:



Διάγραμμα 7.12: Εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού από τη θερμοκρασία για τη θερμική επεξεργασία ΠΜΕ

Από το διάγραμμα υπολογίζονται:

$$Z_T = 9.5^\circ\text{C}$$

$$D_{T_{ref}} = 8.0 \text{ min}$$

Η σταθερά Z_T δίνει μια εικόνα σχετικά με τη συμπεριφορά του ρυθμού απενεργοποίησης σχετικά με τη θερμοκρασία. Κάθε αύξηση της θερμοκρασίας κατά 9.5°C οδηγεί σε υποδεκαπλασιασμό του χρόνου υποδεκαπλασιασμού D .

7.5 Απενεργοποίηση ΠΜΕ συνδυάζοντας θερμότητα και ΥΥΠ

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της επεξεργασίας με ΥΥΠ σε συνδυασμό με ήπια θέρμανση, στο ρυθμό απενεργοποίησης της ΠΜΕ. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε 3 θερμοκρασίες για κάθε πίεση και 4 πιέσεις για κάθε θερμοκρασία. Το κινητικό μοντέλο που βρέθηκε ότι εφαρμόζει στα πειραματικά δεδομένα είναι το απλό κλασματικό μοντέλο πρώτης τάξης:

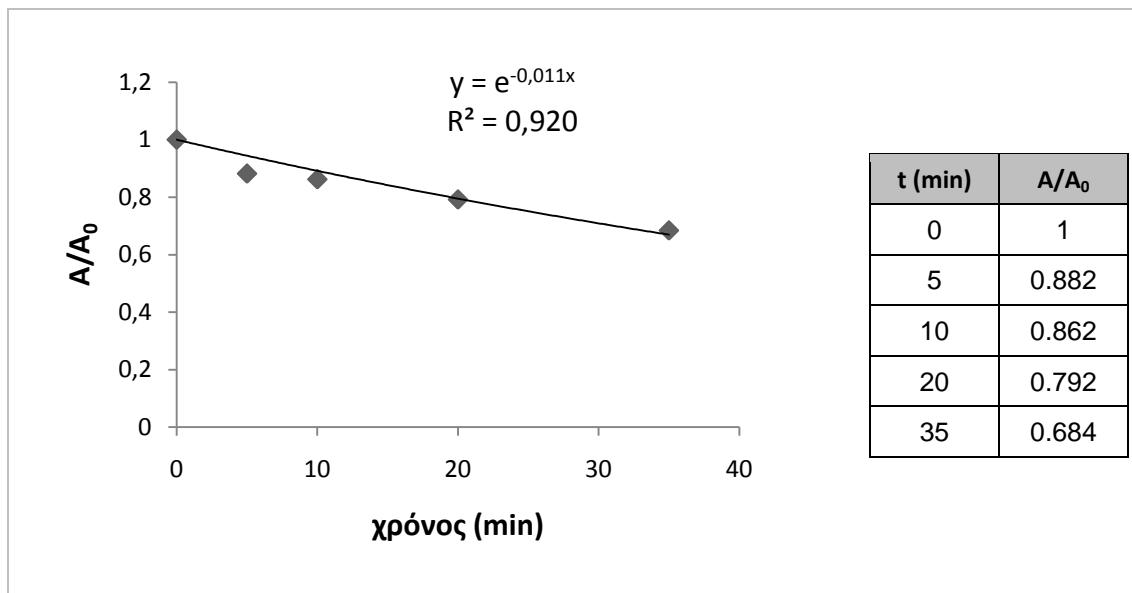
$$\frac{A}{A_0} = e^{-kt} \quad (7.7)$$

Όπου A η ενεργότητα του ενζύμου στη χρονική στιγμή t , A_0 η ενεργότητα τη χρονική στιγμή $t=0$ και k η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς προσαρμόστηκε εκθετική συνάρτηση στα πειραματικά δεδομένα.

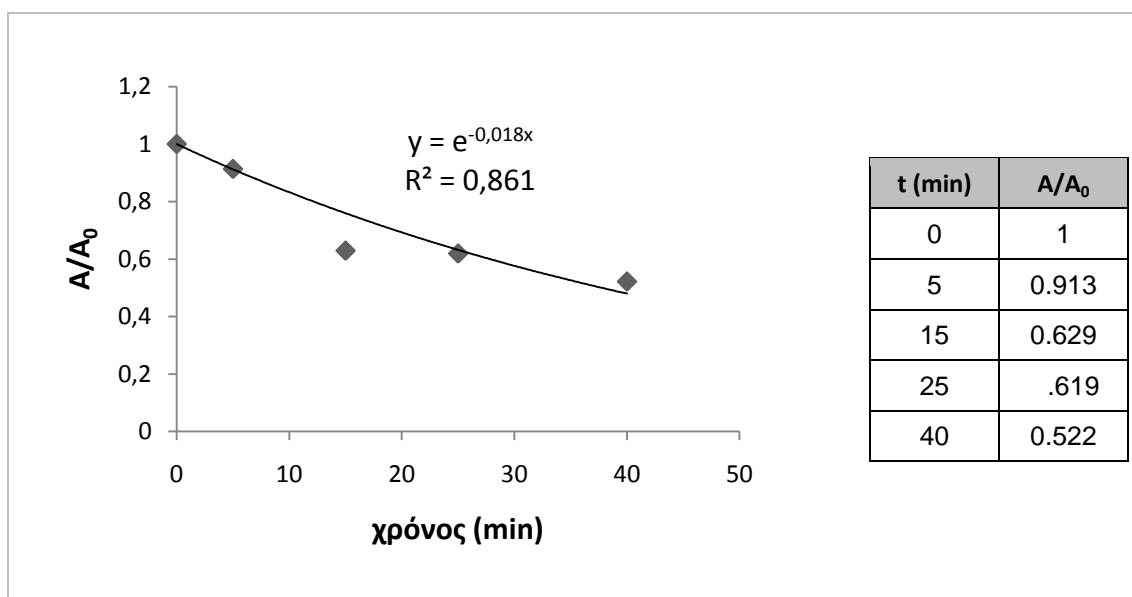
7.5.1 Επεξεργασία ΠΜΕ με ΥΥΠ στους 45°C

7.5.1.i Πίεση 400MPa



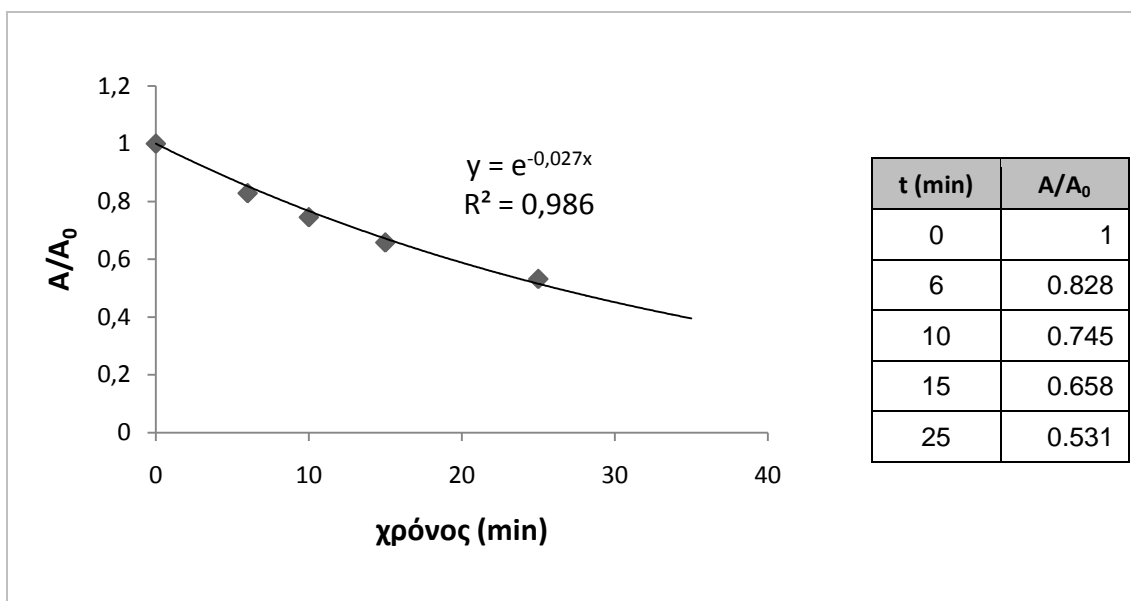
Διάγραμμα 7.13: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 45°C και πίεση 400MPa

7.5.1.ii Πίεση 500MPa



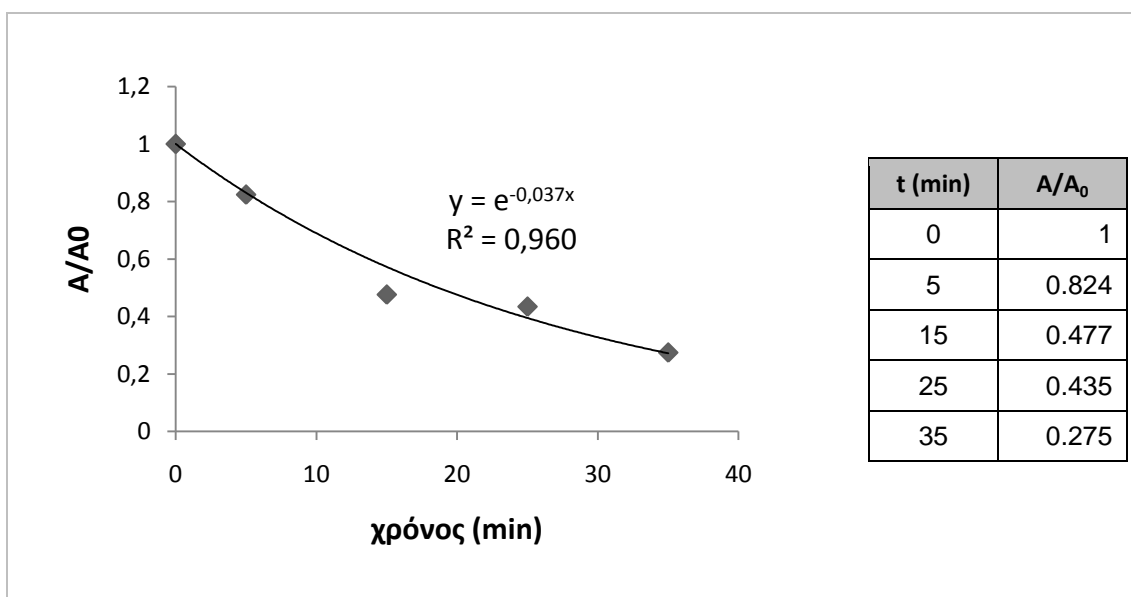
Διάγραμμα 7.14: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 45°C και πίεση 500MPa

7.5.1.iii Πίεση 600MPa



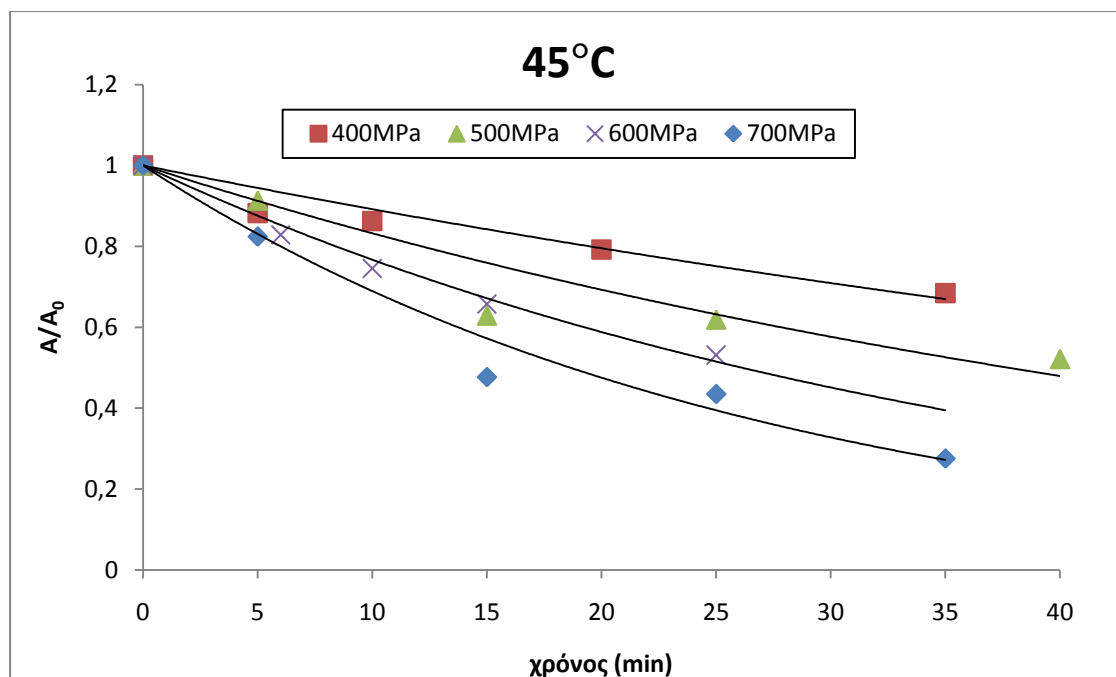
Διάγραμμα 7.15: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 45°C και πίεση 600MPa

7.5.1.iv Πίεση 700MPa



Διάγραμμα 7.16: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 45°C και πίεση 700MPa

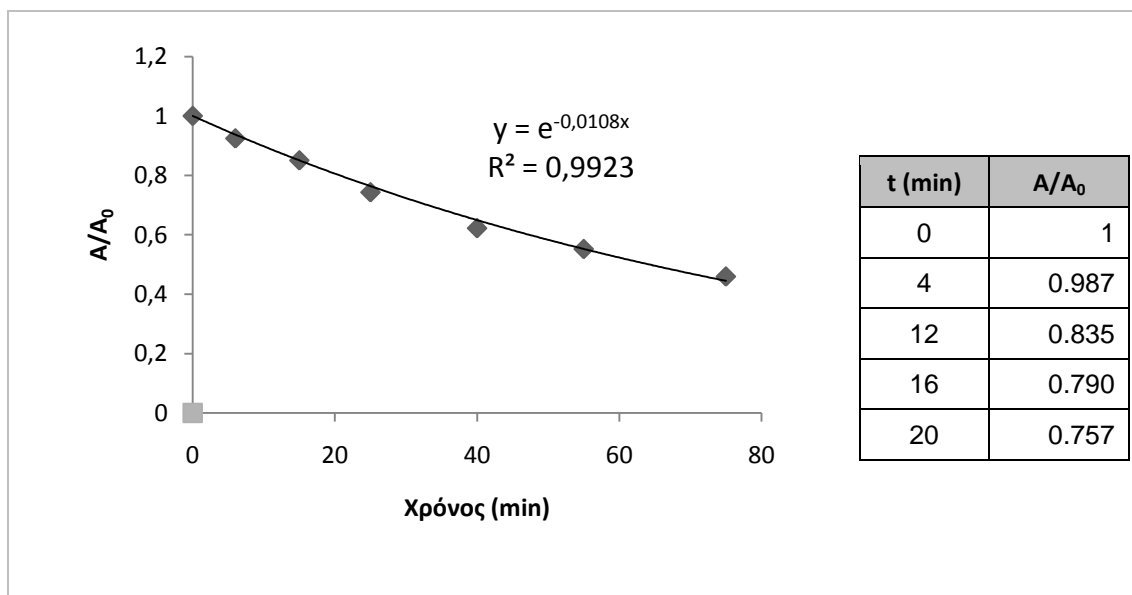
Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα της απενεργοποίησης για κάθε πίεση στους 45°C.



Διάγραμμα 7.17: Επίδραση της πίεσης στην απενεργοποίηση της ΠΜΕ στους 45°C

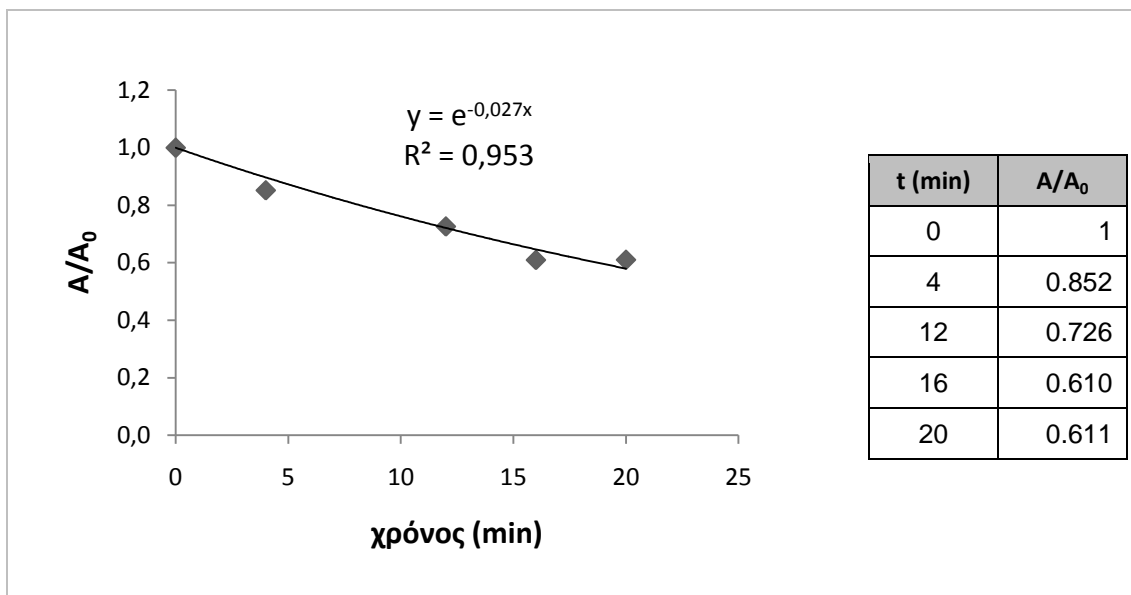
7.5.2 Επεξεργασία ΠΜΕ με ΥΥΠ στους 50°C

7.5.2.i Πίεση 400MPa



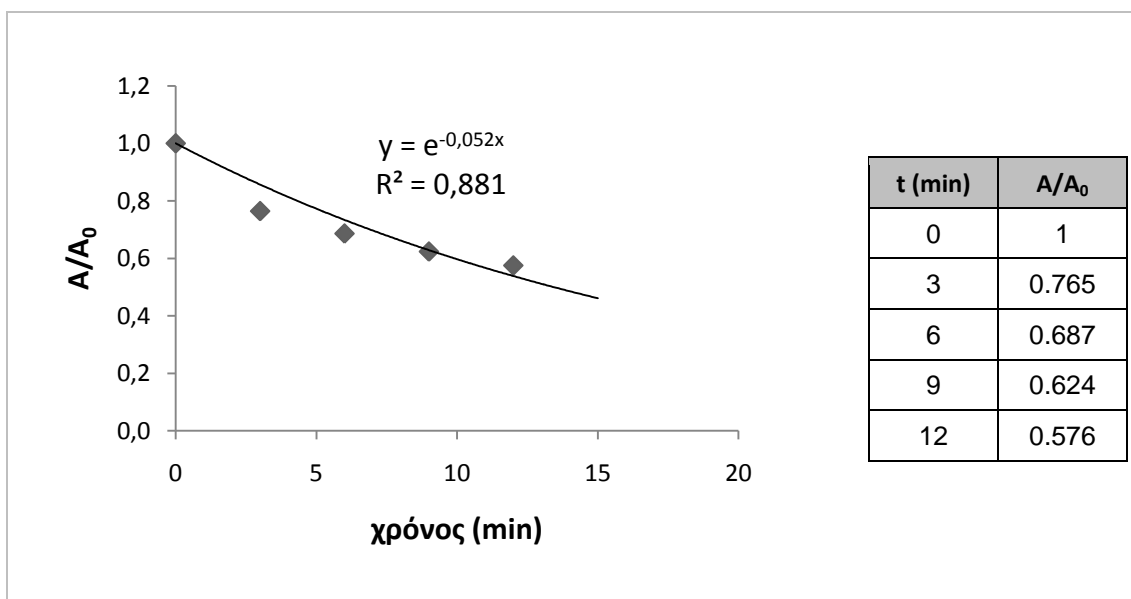
Διάγραμμα 7.18: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 50°C και πίεση 400MPa

7.5.2.ii Πίεση 500MPa



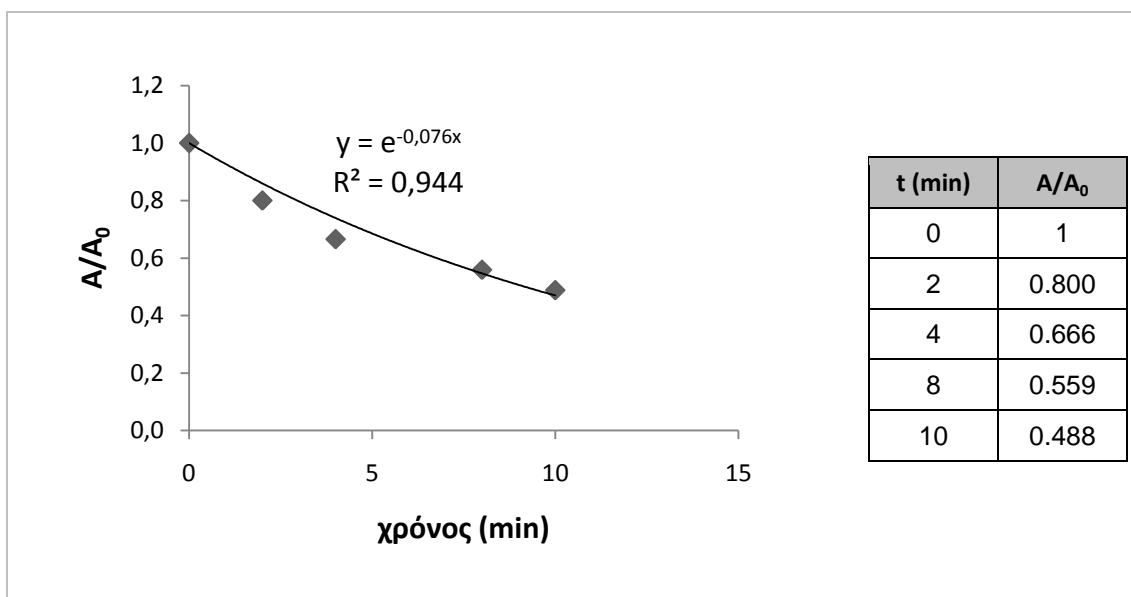
Διάγραμμα 7.19: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 50°C και πίεση 500MPa

7.5.2.iii Πίεση 600MPa



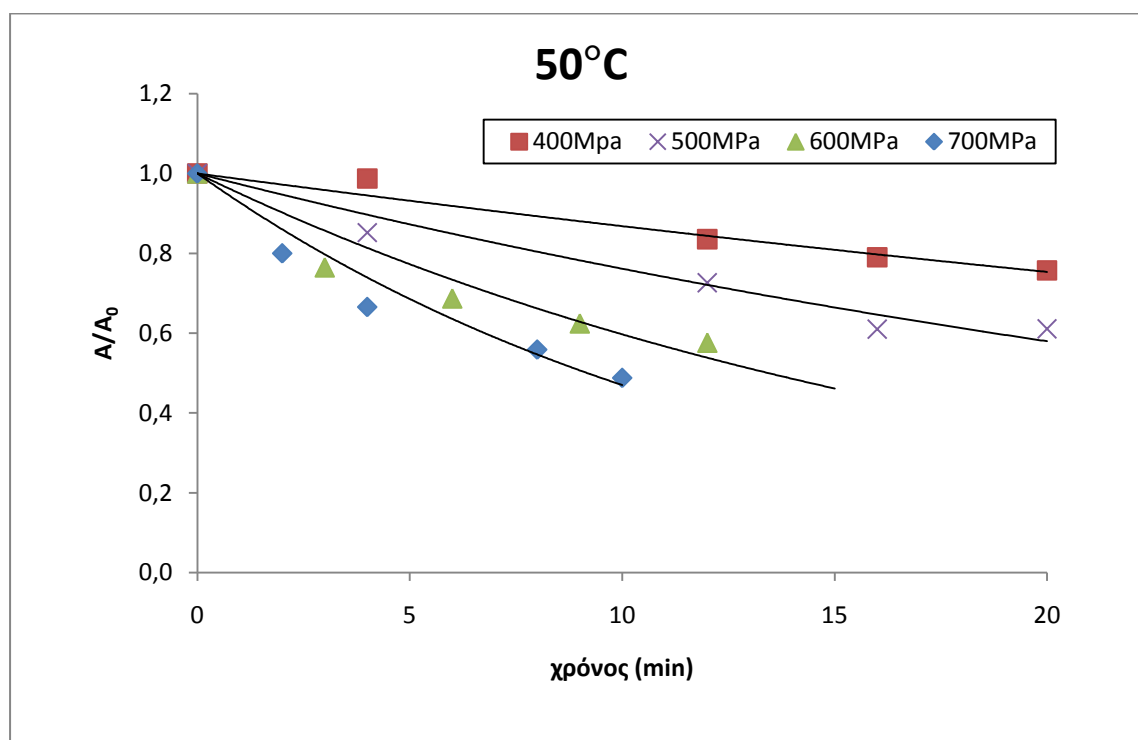
Διάγραμμα 7.20: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 50°C και πίεση 600MPa

7.5.2.iv Πίεση 700MPa



Διάγραμμα 7.21: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 50°C και πίεση 700MPa

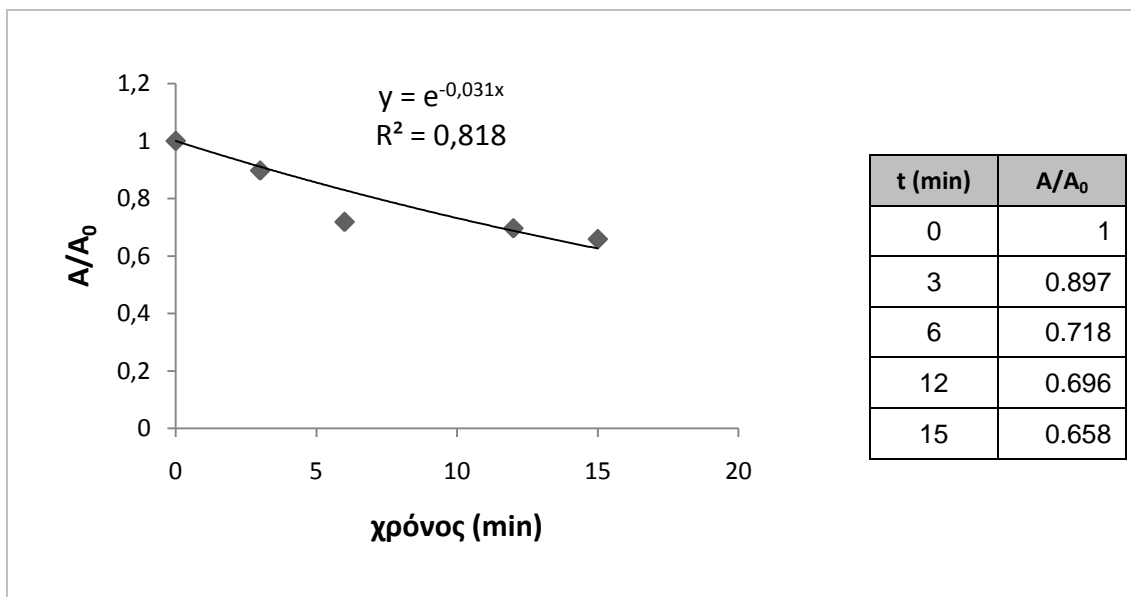
Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα της απενεργοποίησης για κάθε πίεση στους 50°C.



Διάγραμμα 7.22: Επίδραση της πίεσης στην απενεργοποίηση της ΠΜΕ στους 50°C

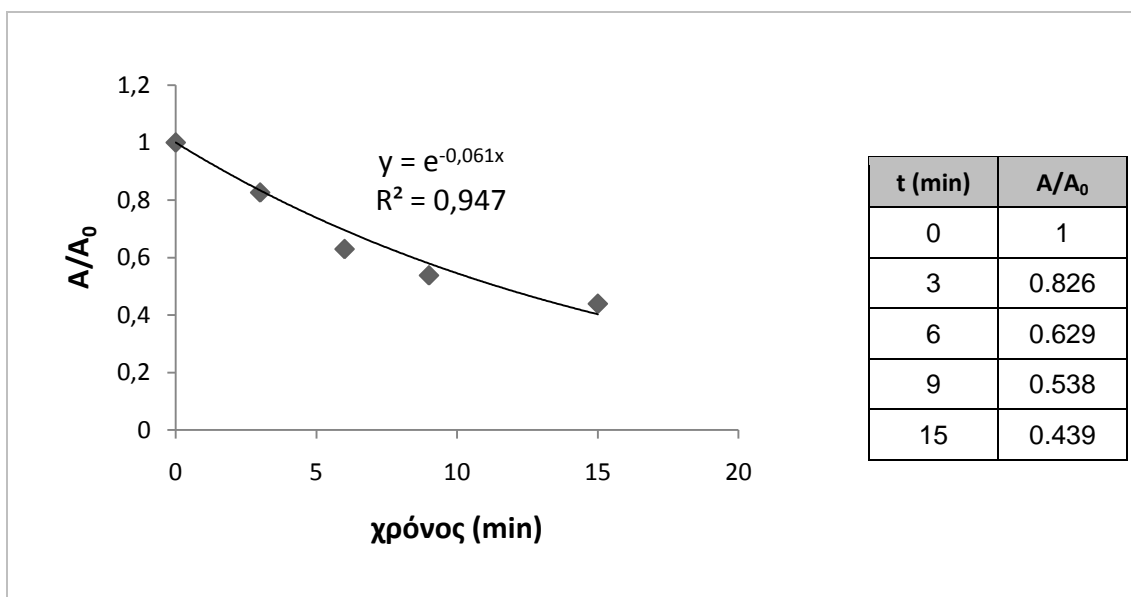
7.5.3 Επεξεργασία ΠΜΕ με ΥΥΠ στους 55°C

7.5.3.i Πίεση 400MPa



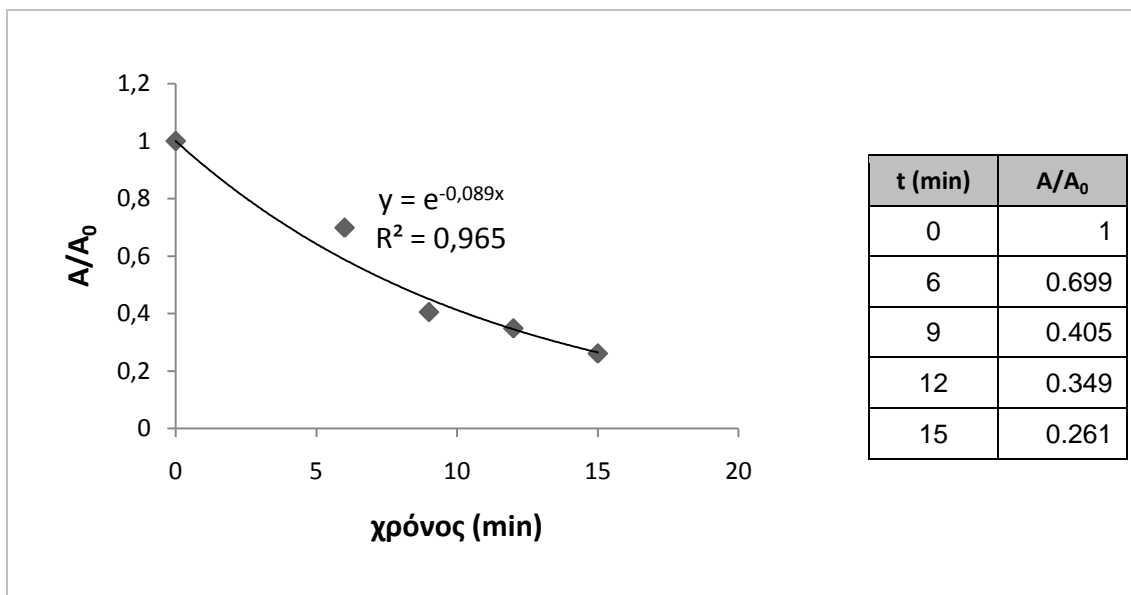
Διάγραμμα 7.23: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 55°C και πίεση 400MPa

7.5.3.ii Πίεση 500MPa



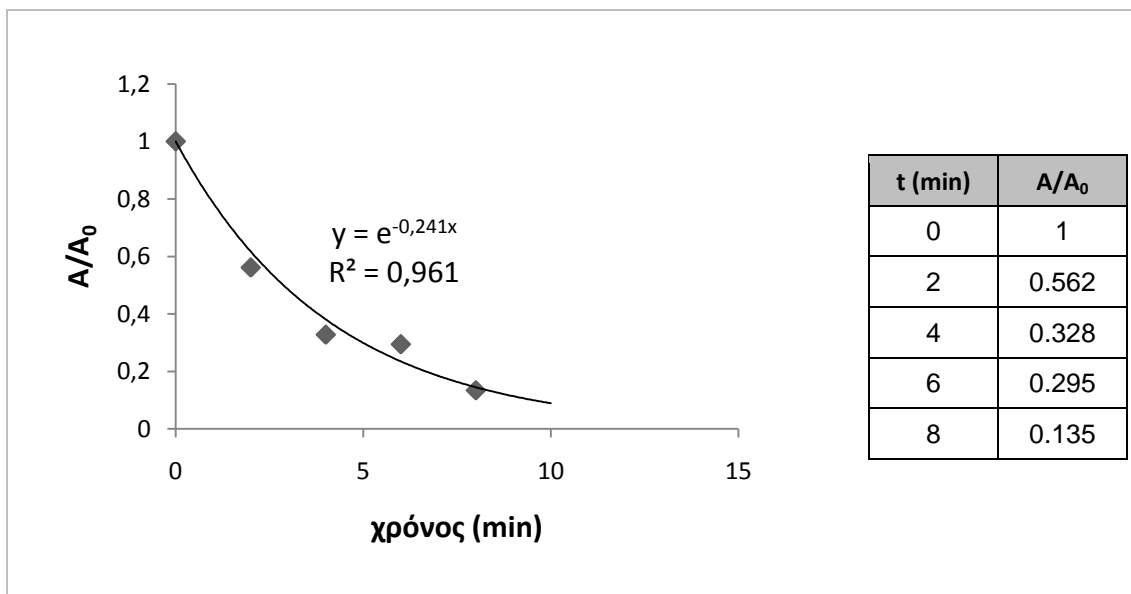
Διάγραμμα 7.24: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 55°C και πίεση 500MPa

7.5.3.iii Πίεση 600MPa



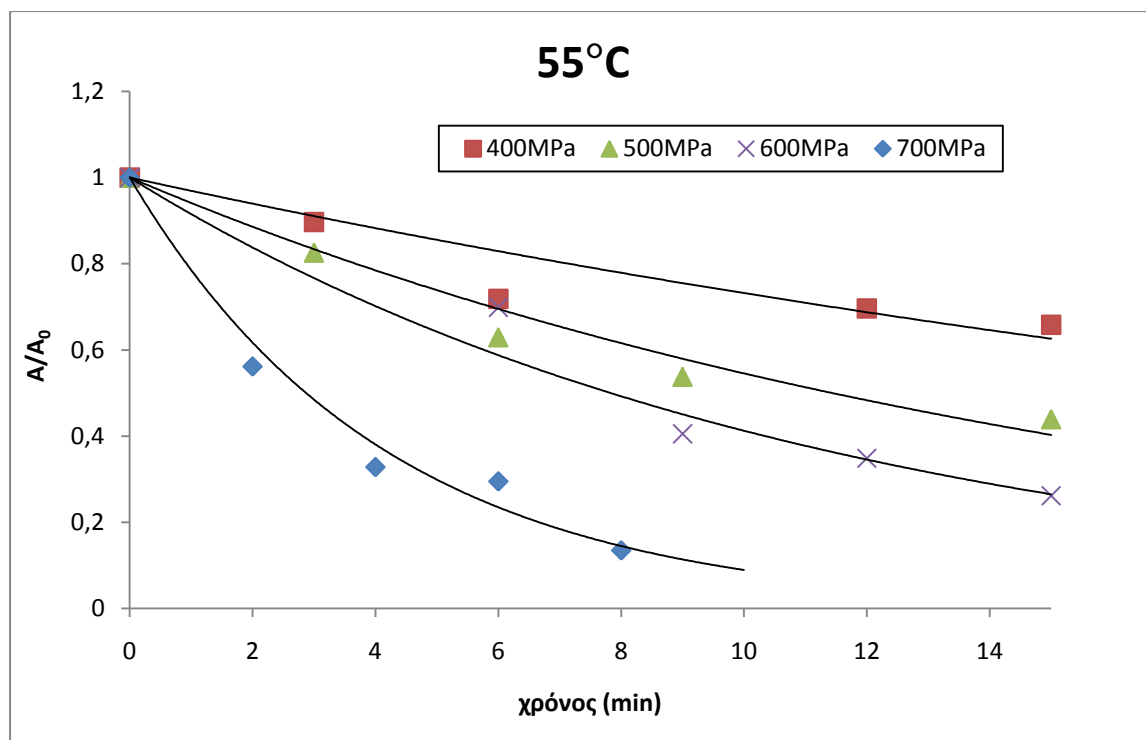
Διάγραμμα 7.25: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 55°C και πίεση 600MPa

7.5.3.iv Πίεση 700MPa



Διάγραμμα 7.26: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 55°C και πίεση 700MPa

Παρακάτω παρουσιάζεται το συνολικό διάγραμμα της απενεργοποίησης για κάθε πίεση στους 55°C.



Διάγραμμα 7.27: Επίδραση της πίεσης στην απενεργοποίηση της ΠΜΕ στους 55°C

Πίνακας 7.6: Σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης (min^{-1}) όπως προκύπτουν από την εκθετική παρεμβολή στα πειραματικά δεδομένα, για κάθε πίεση και θερμοκρασία.

Πίεση (MPa) / Θερμοκρασία (°C)	400	500	600	700
45	0.012	0.018	0.026	0.038
50	0.014	0.027	0.052	0.076
55	0.031	0.061	0.089	0.242

Πίνακας 7.7: Χρόνοι υποδεκαπλασιασμού (min) της ενεργότητας ΠΜΕ για κάθε πίεση και θερμοκρασία όπως προκύπτουν από τις σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης.

Πίεση (MPa) Θερμοκρασία (°C)	400	500	600	700
45	191.9	127.9	88.6	60.6
50	164.5	85.3	44.3	30.3
55	73.8	37.7	26.0	9.5

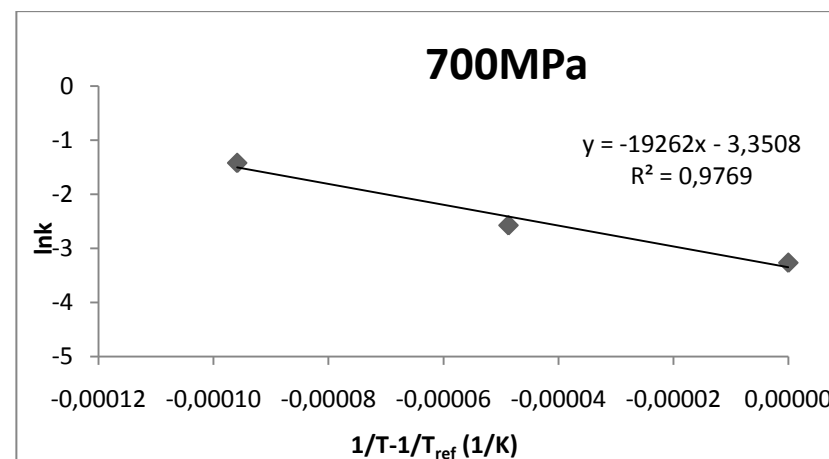
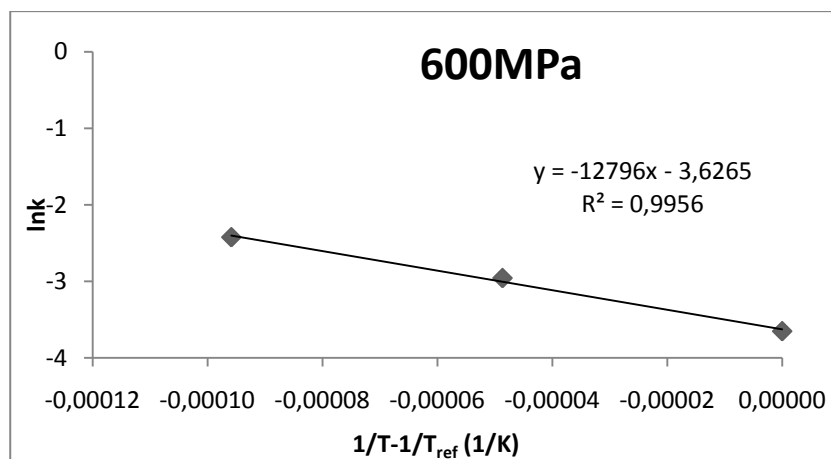
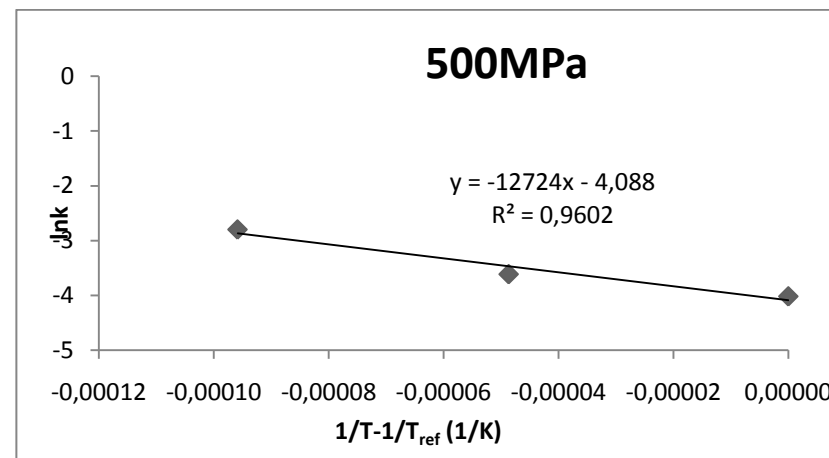
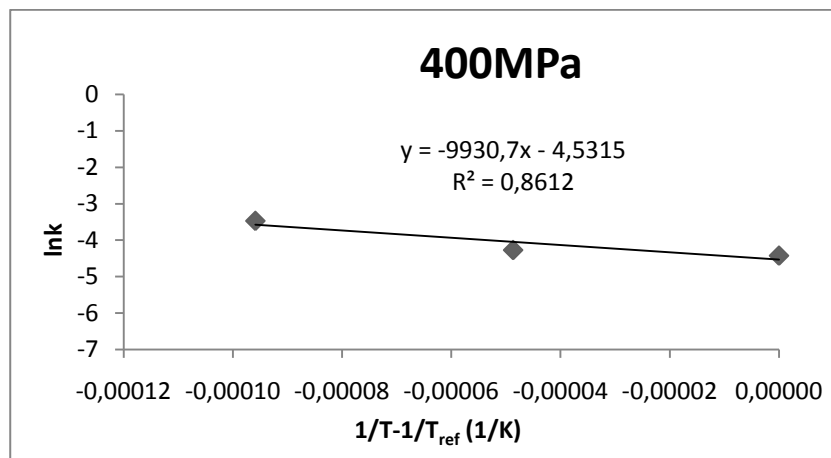
Από τους παραπάνω υπολογισμούς γίνεται εμφανής η συνεργιστική επίδραση πίεσης και θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης της ΠΜΕ. Αύξηση δηλαδή είτε της πίεσης είτε της θερμοκρασίας αυξάνει το ρυθμό απενεργοποίησης και αντίστοιχα μειώνει το χρόνο υποδεκαπλασιασμού, για το εύρος πίεσης και θερμοκρασίας του πειράματος.

7.5.4 Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για σταθερή πίεση

Η εξάρτηση αυτή εκφράζεται μέσω της γραμμικοποιημένης σχέσης Arrhenius:

$$\ln k = \ln k_{ref} - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \quad (7.8)$$

Με χάραξη του γραφήματος $\ln k$ (από τα πειραματικά δεδομένα) σε συνάρτηση με την ποσότητα $\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}$ παίρνουμε για κάθε πίεση και θερμοκρασία αναφοράς 45°C τα παρακάτω διαγράμματα (Διάγραμμα 7.28).



Διάγραμμα 7.28: διαγράμματα εξάρτησης της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ από τη θερμοκρασία για τις τέσσερις πιέσεις του πειράματος. Με γραμμική παρεμβολή είναι δυνατόν να υπολογιστεί η ενέργεια ενεργοποίησης σε κάθε πίεση.

Για κάθε διάγραμμα, από την εξίσωση της ευθείας που προκύπτει από τη γραμμική παρεμβολή μπορούν να υπολογιστούν οι ενέργειες ενεργοποίησης καθώς και οι σταθερές k_{ref} . Προκύπτουν:

Πίνακας 7.8: Υπολογισμένες τιμές ενέργειας ενεργοποίησης E_a (kJ/mol) και σταθεράς k (min^{-1}) σε θερμοκρασία αναφοράς 45°C, για κάθε πίεση επεξεργασίας.

Πίεση επεξεργασίας (MPa)	E_a (kJ/mol)	k_{ref} (min^{-1})
400	82	0.010
500	105	0.017
600	106	0.027
700	160	0.035

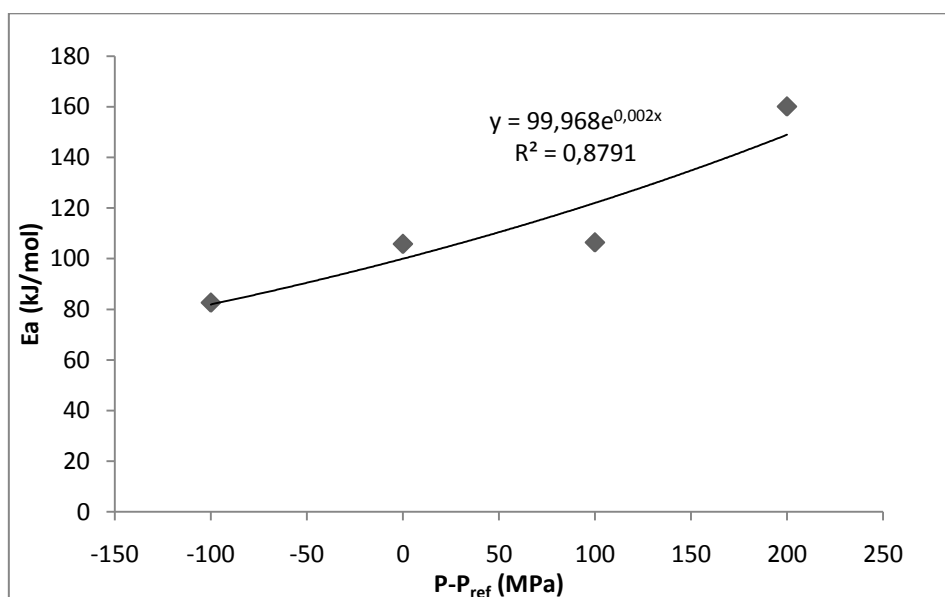
Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η αύξηση της πίεσης καθιστά το ρυθμό απενεργοποίησης της ΠΜΕ πιο ευμετάβλητο με τη θερμοκρασία, αφού αυξάνει την ενέργεια ενεργοποίησης. Αυτό σημαίνει ότι μια αύξηση της θερμοκρασίας σε υψηλότερη πίεση θα αυξήσει περισσότερο το ρυθμό απενεργοποίησης απ' ό,τι η ίδια αύξηση σε χαμηλότερη πίεση. Παρατηρείται ακόμη ότι η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία είναι εντονότερη σε ατμοσφαιρική πίεση (218kJ/mol) απ' ό,τι σε αυξημένη πίεση.

Η εξάρτηση της ενέργειας ενεργοποίησης από την πίεση επεξεργασίας εκφράζεται μέσω της σχέσης:

$$E_a = E_{aP} \cdot \exp[-b(P - P_{ref})] \quad (7.9)$$

Όπου P_{ref} η πίεση αναφοράς και E_{aP} η ενέργεια ενεργοποίησης στην πίεση αναφοράς.

Για πίεση αναφοράς $P_{ref} = 500 \text{ MPa}$ η εξάρτηση της ενέργειας ενεργοποίησης από την ποσότητα $P - P_{ref}$ φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 7.29).



Διάγραμμα 7.29: Εξάρτηση της ενέργειας ενεργοποίησης από την πίεση για πίεση αναφοράς $P_{ref}=500 \text{ MPa}$.

Με παρεμβολή εκθετικής συνάρτησης στα πειραματικά δεδομένα υπολογίζονται οι παράμετροι της σχέσης (3.19):

$$E_{aP} = 99.968 \text{ kJ/mol}$$

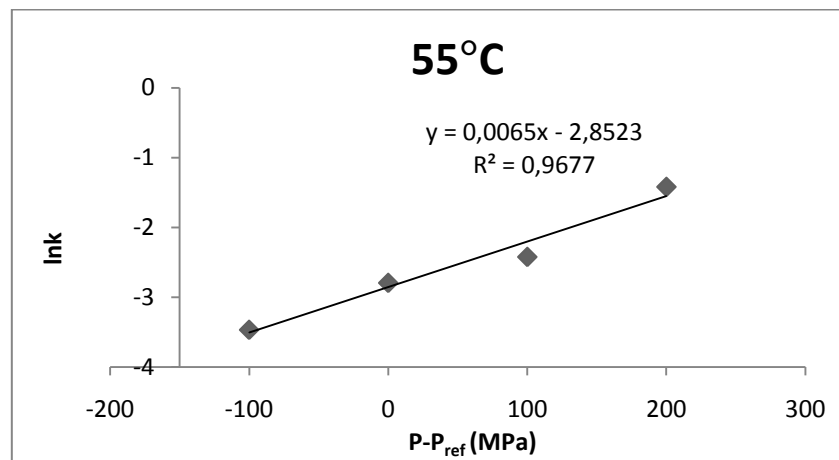
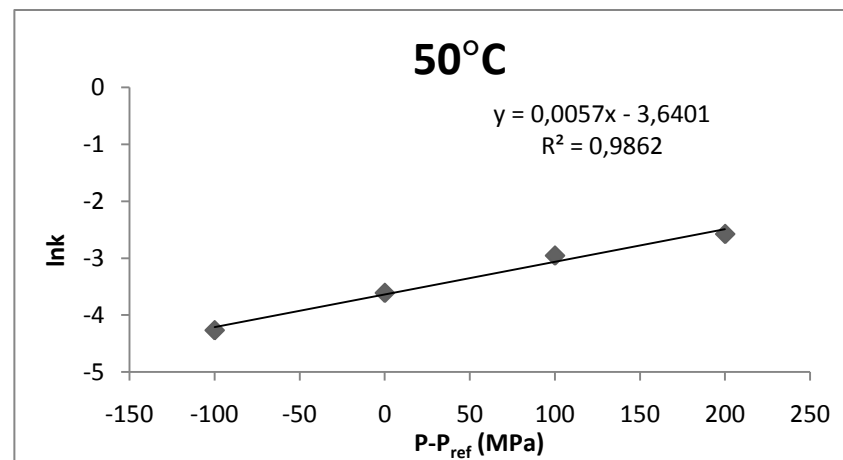
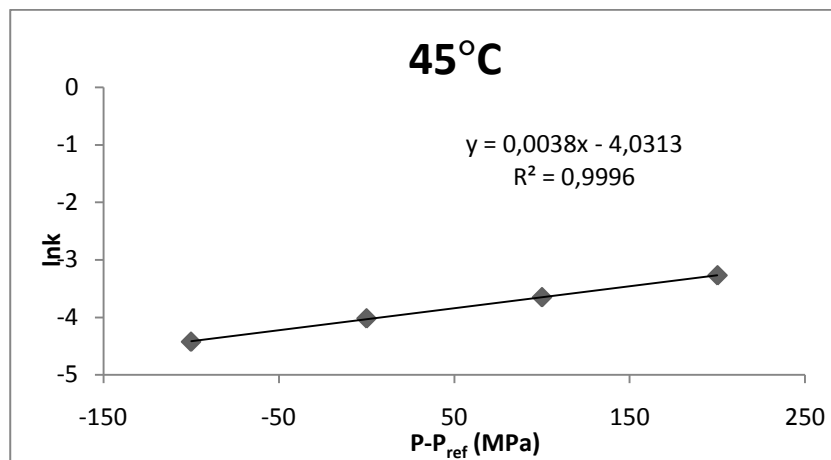
$$b = 0.002 \text{ MPa}^{-1}$$

7.5.5 Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από την πίεση σε σταθερή θερμοκρασία

Η εξάρτηση του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ από την πίεση επεξεργασίας σε σταθερή θερμοκρασία μπορεί να εκφραστεί μέσω της γραμμικοποιημένης εξίσωσης του Eyring:

$$\ln k = \ln k_{ref} - \frac{V_a}{RT} (P - P_{ref}) \quad (7.10)$$

Όπου P_{ref} η πίεση αναφοράς και k_{ref} η σταθερά το ρυθμού στην πίεση αναφοράς. Χάραξη του διαγράμματος $\ln k$ ως προς την ποσότητα $P - P_{ref}$, με πίεση αναφοράς 500MPa δίνει ευθεία με κλίση $-\frac{V_a}{RT}$ και αποτέμνουσα $\ln k_{ref}$, όπως φαίνεται παρακάτω (Διάγραμμα 7.30).



Διάγραμμα 7.30: διαγράμματα εξάρτησης της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ από την πίεση για τις τρεις θερμοκρασίες του πειράματος. Με γραμμική παρεμβολή είναι δυνατόν να υπολογιστεί ο όγκος ενεργοποίησης σε κάθε θερμοκρασία.

Για κάθε διάγραμμα, από την εξίσωση της ευθείας που προκύπτει από τη γραμμική παρεμβολή μπορούν να υπολογιστούν ο όγκος ενεργοποίησης καθώς και οι σταθερές k_{ref} . Προκύπτουν:

Πίνακας 7.9: Υπολογισμένες τιμές όγκου ενεργοποίησης και σταθεράς k σε πίεση αναφοράς 500MPa, για κάθε θερμοκρασία επεξεργασίας.

Θερμοκρασία επεξεργασίας (°C)	V_a (mL/mol)	k_{ref} (min ⁻¹)
45	-10.046	0.018
50	-15.307	0.026
55	-18.543	0.061

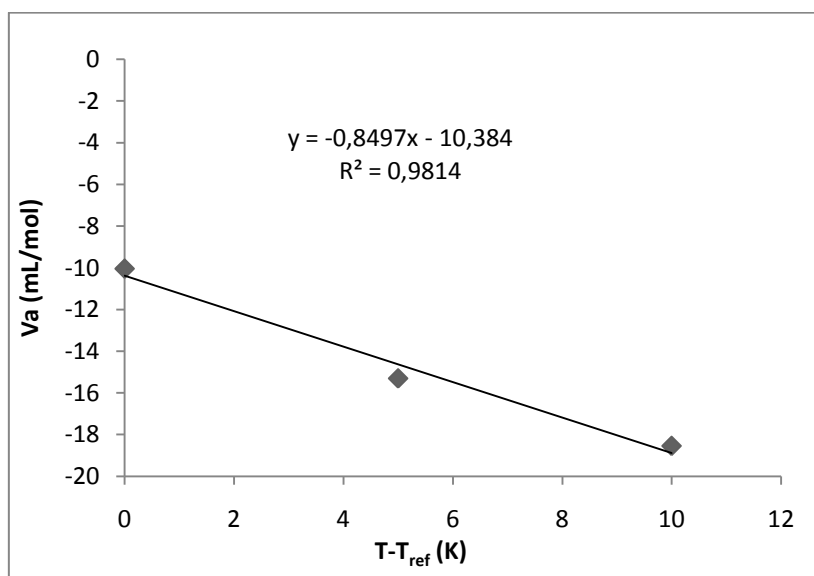
Οι αρνητικοί όγκοι ενεργοποίησης φανερώνουν ότι για σταθερή θερμοκρασία, η αύξηση της πίεσης οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας καθιστά το ρυθμό απενεργοποίησης της ΠΜΕ πιο ευμετάβλητο με την πίεση, αφού μειώνει τον όγκο ενεργοποίησης. Η μείωση του όγκου ενεργοποίησης με τη θερμοκρασία σημαίνει ότι μία αύξηση της πίεσης σε υψηλότερη θερμοκρασία αυξάνει περισσότερο το ρυθμό απενεργοποίησης απ' ό,τι η ίδια αύξηση σε χαμηλότερη θερμοκρασία.

Η εξάρτηση του όγκου ενεργοποίησης από τη θερμοκρασία επεξεργασίας μπορεί να εκφραστεί μέσω της γραμμικής σχέσης:

$$V_a = V_{aT} + a \cdot (T - T_{ref}) \quad (7.11)$$

Όπου T_{ref} η θερμοκρασία αναφοράς και V_{aT} ο όγκος ενεργοποίησης στη θερμοκρασία αναφοράς.

Για θερμοκρασία αναφοράς 45°C η εξάρτηση του όγκου ενεργοποίησης από τη θερμοκρασία φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 7.31).



Διάγραμμα 7.31: Εξάρτηση του όγκου ενεργοποίησης από τη θερμοκρασία, για θερμοκρασία αναφοράς 45°C.

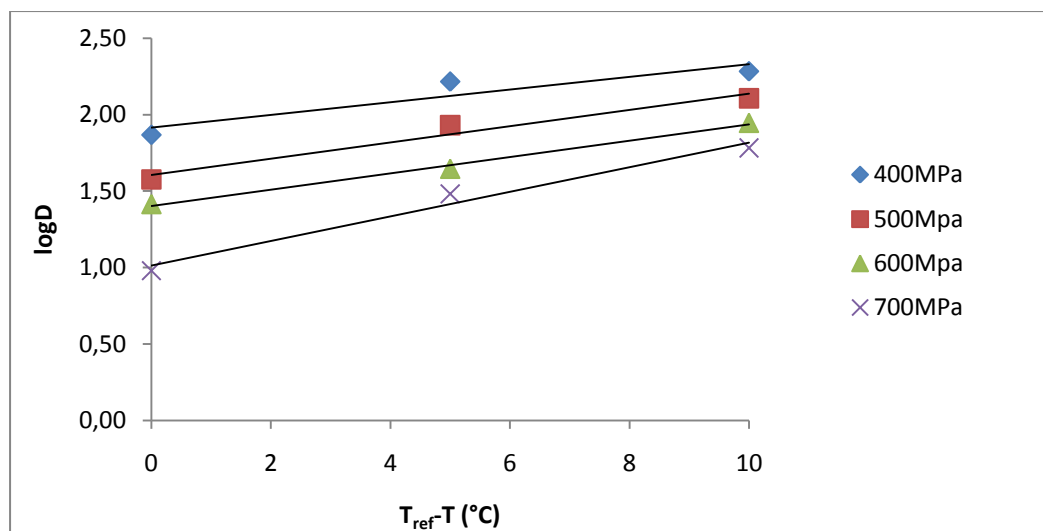
Από τη γραμμική παρεμβολή στα πειραματικά σημεία του διαγράμματος υπολογίζονται οι σταθερές της εξίσωσης (3.20):

$$a = -8.497 \frac{\text{mL}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$$

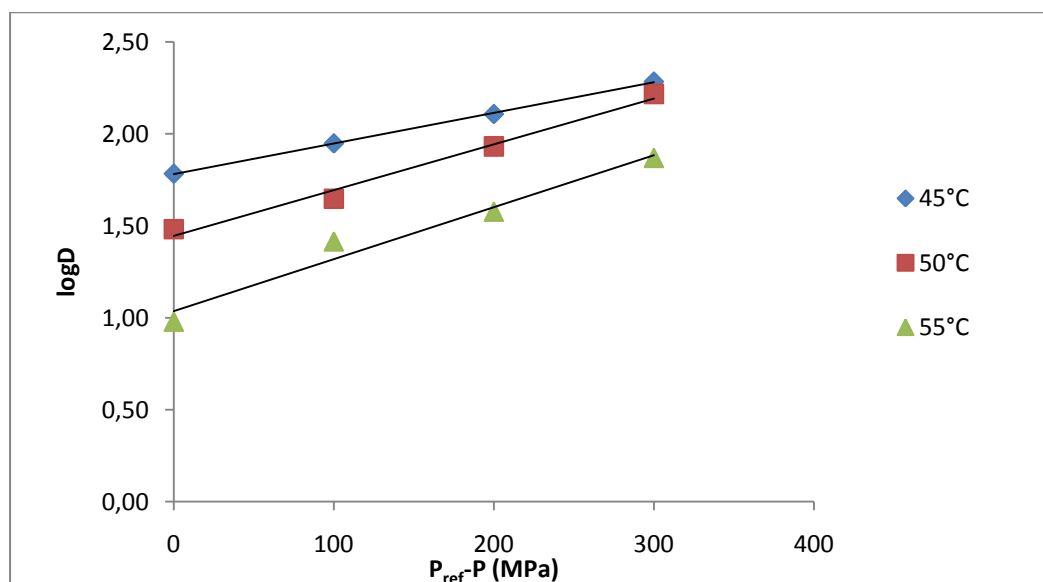
$$V_{aT} = -10.384 \frac{\text{mL}}{\text{mol}}$$

7.5.6 Εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού από τη θερμοκρασία και την πίεση

Από τον υπολογισμό του χρόνου υποδεκαπλασιασμού σε κάθε πίεση και θερμοκρασία, μπορεί να υπολογιστεί η επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης, μέσω των σταθερών Z_T και Z_P . Χάραξη του $\log D$ ως προς $T_{ref} - T$ για σταθερή πίεση, δίνει ευθεία με κλίση $1/Z_T$ και αποτέμνουσα $\log D_{T_{ref}}$. Αντίστοιχα, χάραξη του $\log D$ ως προς $P_{ref} - P$ για σταθερή θερμοκρασία, δίνει ευθεία με κλίση $1/Z_P$ και αποτέμνουσα $\log D_{P_{ref}}$.



Διάγραμμα 7.32: Εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού από τη θερμοκρασία για τις τέσσερις πιέσεις επεξεργασίας του πειράματος. Η θερμοκρασία αναφοράς είναι 55°C.



Διάγραμμα 7.33: Εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού από την πίεση για τις τρεις θερμοκρασίες επεξεργασίας του πειράματος. Η πίεση αναφοράς είναι 700MPa.

Με γραμμική παρεμβολή στα παραπάνω διαγράμματα μπορούν να υπολογιστούν οι σταθερές επίδρασης της θερμοκρασίας και της πίεσης, καθώς και οι χρόνοι υποδεκαπλασιασμού στη θερμοκρασία ή την πίεση αναφοράς αντίστοιχα. Προκύπτουν:

Πίνακας 7.10: Σταθερές Z_T και D_{Tref} για θερμοκρασία αναφοράς 55°C, όπως προκύπτουν από τη γραμμική παρεμβολή

Πίεση (MPa)	Z_T (°C)	D_{Tref} (min)
400	24.1	82.2
500	18.8	40.4
600	18.8	25.3
700	12.5	10.3

Πίνακας 7.11: Σταθερές Z_p και D_{Pref} για πίεση αναφοράς 700MPa, όπως προκύπτουν από τη γραμμική παρεμβολή

Θερμοκρασία (°C)	Z_p (MPa)	D_{Pref} (min)
400	588.2	60.4
500	400.0	27.9
600	357.1	10.9

7.5.7 Σύγκριση κινητικής απενεργοποίησης με ΥΥΠ της ΠΜΕ από πορτοκάλι *Navel* με ΠΜΕ από πορτοκάλι *Valencia*

Στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων (ΕΜΠ) πραγματοποιήθηκε μελέτη θερμικής απενεργοποίησης και απενεργοποίησης με ΥΥΠ σε καθαρή ΠΜΕ από φλοιό πορτοκαλιού ποικιλίας *Valencia* [78] (σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris-HCl, pH=7.5). Οι πιέσεις που μελετήθηκαν ήταν από 200-700MPa και οι θερμοκρασίες από 40-55°C. Η απενεργοποίηση περιγράφηκε ικανοποιητικά από κινητική εξίσωση πρώτης τάξης. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.12).

Πίνακας 7.12: Σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης, k (min^{-1}), ενέργειες ενεργοποίησης E_a (kJ/mol) και όγκοι ενεργοποίησης V_a (mL/mol), για τις διάφορες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας στα πειράματα απενεργοποίησης ΠΜΕ πορτοκαλιού *Valencia* (Πηγή:[78]).

Θερμο- κρασία (°C) Πίεση (MPa)	40	45	55	E_a (kJ/mol)
200	0.018	0.030	0.032	48.3
400	0.037	0.082	0.128	65.9
500	0.085	0.163	0.259	75.6
600	0.113	0.317	0.535	83.8
700	0.169	0.524	1.050	103.9
V_a (mL/mol)	-11.9	-15.6	-19.1	

Η επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης δρουν συνεργιστικά στην απενεργοποίηση της ΠΜΕ του πορτοκαλιού *Valencia*. Αύξηση της πίεσης οδηγεί σε αύξηση της ενέργειας ενεργοποίησης που σημαίνει ότι σε υψηλότερες πιέσεις η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης είναι εντονότερη απ' ότι σε χαμηλές. Αντίστοιχα, αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τον απόλυτο όγκο ενεργοποίησης, που σημαίνει ότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες η επίδραση της πίεσης είναι μεγαλύτερη απ' ότι σε χαμηλές. Η συμπεριφορά της απενεργοποίησης με την πίεση και τη θερμοκρασία συμβαδίζει με αυτή της ΠΜΕ του πορτοκαλιού *Navel* της παρούσας εργασίας.

Σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ενζύμων φαίνεται να είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία της ΠΜΕ του πορτοκαλιού *Valencia* στη θερμοκρασία και την πίεση. Στην πιο έντονη συνθήκη και των δύο μελετών ($P=700\text{MPa}$, $T=55^\circ\text{C}$) η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ από το πορτοκάλι *Valencia* είναι περίπου 4 φορές μεγαλύτερη. Γενικά στους 55°C ισχύει:

$$k_{Valencia} > k_{Navel}$$

Αντίστοιχα, η σταθερά απενεργοποίησης σε πίεση 700MPa και θερμοκρασία 45°C για την ΠΜΕ πορτοκαλιού *Navel* είναι ίση με αυτή του πορτοκαλιού *Valencia* σε συνθήκες 400MPa και θερμοκρασία 40°C .

Οι διαφορές αυτές στη συμπεριφορά ως προς την ευαισθησία στην πίεση και τη θερμοκρασία είναι πολύ πιθανόν να οφείλονται σε διαφορές στη δομή των δύο ενζύμων. Γενικά η δομή και η δραστηκότητα των ενζύμων είναι άρρηκτα συνδεδεμένες. Η μελέτη φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού που

πραγματοποιήθηκε στην ΠΜΕ του πορτοκαλιού *Valencia* μετά από επεξεργασία με ΥΥΠ (βλ. §5.2.5) έδειξε ότι τη μείωση της δραστηριότητας με την επεξεργασία συνοδεύουν αλλαγές στη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή, με την ένταση της ελλειπτικότητας θ να μειώνεται αυξανόμενης της πίεσης και της θερμοκρασίας. Είναι πολύ πιθανό αντίστοιχες μεταβολές να εμφανίσει και η ΠΜΕ από πορτοκάλι *Navel*.

7.5.8 Προσδιορισμός των παραμέτρων των πολυπαραμετρικών κινητικών μοντέλων

Η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού από την πίεση και τη θερμοκρασία μπορεί να εκφραστεί μέσα από κινητικά μοντέλα με δύο μεταβλητές (T,P) και πολλές παραμέτρους. Οι παράμετροι αυτές υπολογίζονται με μη γραμμική παλινδρόμηση από τα πειραματικά δεδομένα.

7.5.8.i Εκθετικό μοντέλο

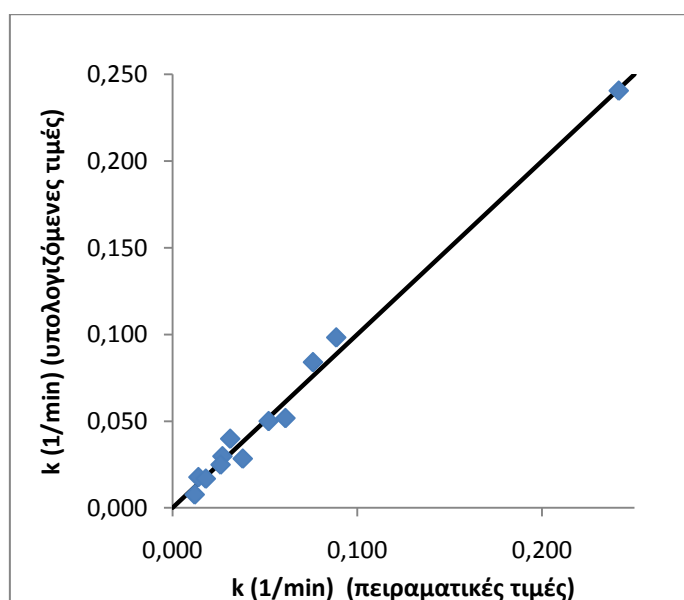
Το εκθετικό μοντέλο συνδυάζει την επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας στη σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης, μέσω των σχέσεων Eyring και Arrhenius, καθώς και την επίδραση της πίεσης στην ενέργεια ενεργοποίησης και την επίδραση της θερμοκρασίας στον όγκο ενεργοποίησης.

$$k = k_{refP,T} \cdot \exp \left\{ -\frac{E_{aP}}{R} \cdot \exp[-B \cdot (P - P_{ref})] \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) - \frac{A \cdot (T - T_{ref}) + V_{aT} \cdot (P - P_{ref})}{RT} \right\} \quad (7.12)$$

Οι παράμετροι της εξίσωσης υπολογίστηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση με το πρόγραμμα SYSTAT 8.0 Statistics (SPCC Inc., Chicago, USA) δίνοντας συντελεστή συσχέτισης $R^2=0.995$. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.13).

Πίνακας 7.13: Εκτίμηση των παραμέτρων του εκθετικού κινητικού μοντέλου απενεργοποίησης της ΠΜΕ για το εύρος θερμοκρασιών 45-55°C και εύρος πίεσης 400-700MPa, και για θερμοκρασία αναφοράς 50°C και πίεση αναφοράς 700MPa

Παράμετρος	Εκτιμώμενη τιμή
$k_{ref,P,T} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	0.084
$E_{aP} \left(\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$	185315
$A \left(\frac{\text{mL}}{\text{mol} \cdot \text{K}} \right)$	-4.919
$B \text{ (MPa}^{-1}\text{)}$	-0.004
$V_{aP} \left(\frac{\text{mL}}{\text{mol}} \right)$	-13.930



Διάγραμμα 7.34: Συσχέτιση μεταξύ σταθερών ρυθμού απενεργοποίησης, όπως προέκυψαν από τα πειραματικά δεδομένα, με τις υπολογισμένες από το εκθετικό μοντέλο τιμές.

Το εκθετικό μοντέλο υπολογίζει ικανοποιητικά τις σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης για το εύρος πιέσεων και θερμοκρασιών του πειράματος, δηλαδή για θερμοκρασίες από 45-55°C και πιέσεις 400-700MPa. Για χαμηλότερες πιέσεις και θερμοκρασίες το μοντέλο προβλέπει ανταγωνιστική σχέση πίεσης-θερμοκρασίας στη σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης. Η πρόβλεψη αυτή ωστόσο δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί λόγω έλλειψης πειραματικών δεδομένων στις συνθήκες αυτές.

7.5.8.ii Πολυωνυμικό μοντέλο

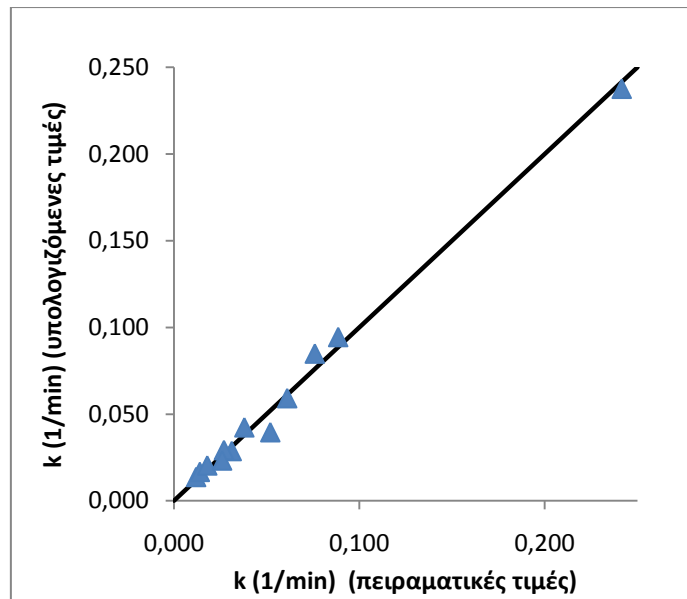
Το πολυωνυμικό μοντέλο συνδυάζει την επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας στη σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης χρησιμοποιώντας παραμέτρους που σχετίζονται με θερμοδυναμικά μεγέθη του ενζύμου.

$$\begin{aligned} \ln(k) = \ln(k_0) &- \frac{\Delta\kappa}{2RT} (P - P_0)^2 - \frac{2\Delta\zeta}{RT} (P - P_0)(T - T_0) \\ &+ \frac{\Delta C_p}{RT} \cdot \frac{(T - T_0)^2}{2T_0} - \frac{\Delta V_0}{RT} (P - P_0) \\ &+ \frac{\Delta S_0}{RT} (T - T_0) + \frac{\Delta\kappa_2}{2RT} (P - P_0)^3 \\ &+ \frac{\Delta C_{p2}}{2RTT_0} (T - T_0)^3 \end{aligned} \quad (7.13)$$

Οι παράμετροι της εξίσωσης υπολογίστηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση με το πρόγραμμα SYSTAT 8.0 Statistics (SPCC Inc., Chicago, USA) δίνοντας συντελεστή συσχέτισης $R^2=0.998$. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.14).

Πίνακας 7.14: Εκτίμηση των παραμέτρων του πολυωνυμικού κινητικού μοντέλου απενεργοποίησης της ΠΜΕ για το εύρος θερμοκρασιών 45-55°C και εύρος πίεσης 400-700MPa, και για θερμοκρασία αναφοράς 50°C και πίεση αναφοράς 700MPa

Παράμετρος	Εκτιμώμενη τιμή
$\Delta\kappa \left(\frac{cm^6}{J \cdot mol} \right)$	-0.318
$\Delta\zeta \left(\frac{cm^3}{K \cdot mol} \right)$	-0.464
$\Delta C_p \left(\frac{J}{mol \cdot K} \right)$	12511.800
$\Delta V_0 \left(\frac{mL}{mol} \right)$	-33.179
$\Delta S_0 \left(\frac{J}{mol \cdot K} \right)$	493.642
$k_0 (min^{-1})$	0.085
$\Delta\kappa_2 \left(\frac{cm^6}{J \cdot mol} \right)$	0.0007
$\Delta C_{p2} \left(\frac{J}{mol \cdot K} \right)$	-758.915



Διάγραμμα 7.35: Συσχέτιση μεταξύ σταθερών ρυθμού απενεργοποίησης, όπως προέκυψαν από τα πειραματικά δεδομένα, με τις υπολογισμένες από το πολυωνυμικό μοντέλο τιμές.

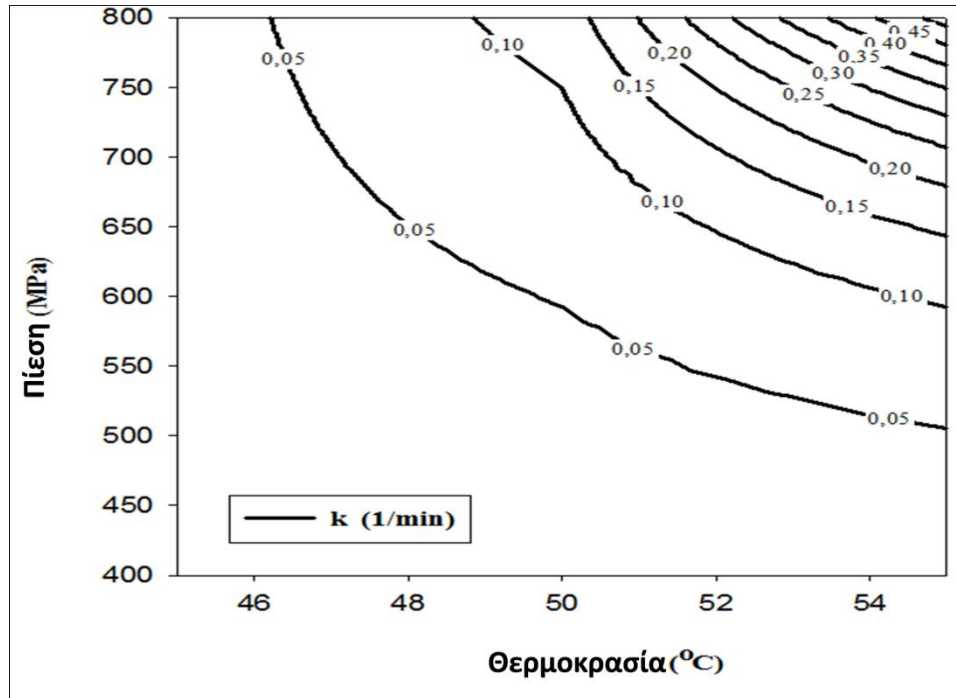
Το πολυωνυμικό μοντέλο υπολογίζει ικανοποιητικά τις σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης για το εύρος πιέσεων και θερμοκρασιών του πειράματος, δηλαδή για θερμοκρασίες από 45-55°C και πιέσεις 400-700MPa. Για χαμηλότερες θερμοκρασίες το μοντέλο προβλέπει ανταγωνιστική σχέση πίεσης-θερμοκρασίας στη σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης. Η πρόβλεψη αυτή ωστόσο δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί λόγω έλλειψης πειραματικών δεδομένων στις συνθήκες αυτές. Τέλος, για μεγαλύτερες θερμοκρασίες παρατηρείται υπερεκτίμηση των σταθερών k σε σχέση με το εκθετικό μοντέλο.

Αδυναμία του μοντέλου αυτού είναι ο μεγάλος αριθμός παραμέτρων καθώς και η περίπλοκη θεωρητική τους θεμελίωση. Μπορεί λόγω της πολυωνυμικής του φύσης να προσαρμόζεται άριστα στα πειραματικά δεδομένα, εντούτοις κρίνεται περιττή η πολυπλοκότητά του, ειδικά εφόσον το εκθετικό μοντέλο είναι επαρκές για την προσέγγιση κινητικών πρώτης τάξης και συνεργιστικών σχέσεων πίεσης-θερμοκρασίας. Το εκθετικό μοντέλο περιλαμβάνει μόνο 5 παραμέτρους οι οποίες απορρέουν από τη σύντηξη της εξίσωσης Arrhenius και της εξίσωσης Eyring και είναι συνεπώς πιο άμεσο στην κατανόηση και τη χρήση.

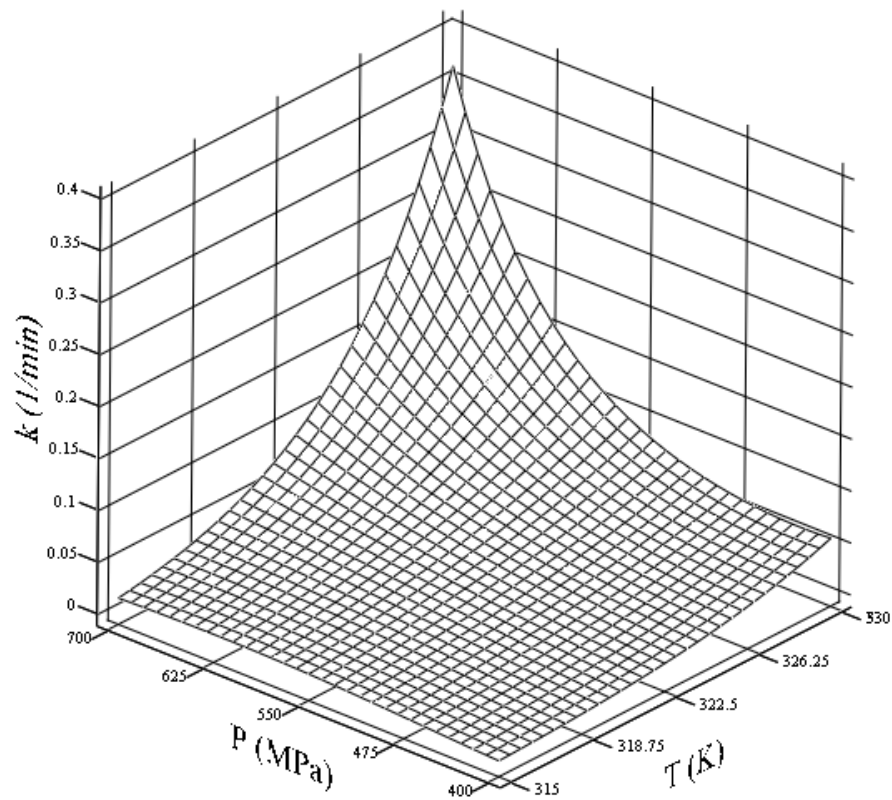
Παρόλα αυτά, το πολυωνυμικό μοντέλο μπορεί (με μικρές τροποποιήσεις) να γενικευθεί και να περιγράψει με ακρίβεια πιο περίπλοκες επιδράσεις πίεσης-θερμοκρασίας στην καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων. Ήδη πολλοί ερευνητές το έχουν εφαρμόσει σε πληθώρα ενζύμων.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα τρισδιάστατα γραφήματα της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης ως συνάρτηση της θερμοκρασίας και της πίεσης, όπως προκύπτουν από το εκθετικό (Διάγραμμα 7.37) και το πολυωνυμικό (Διάγραμμα

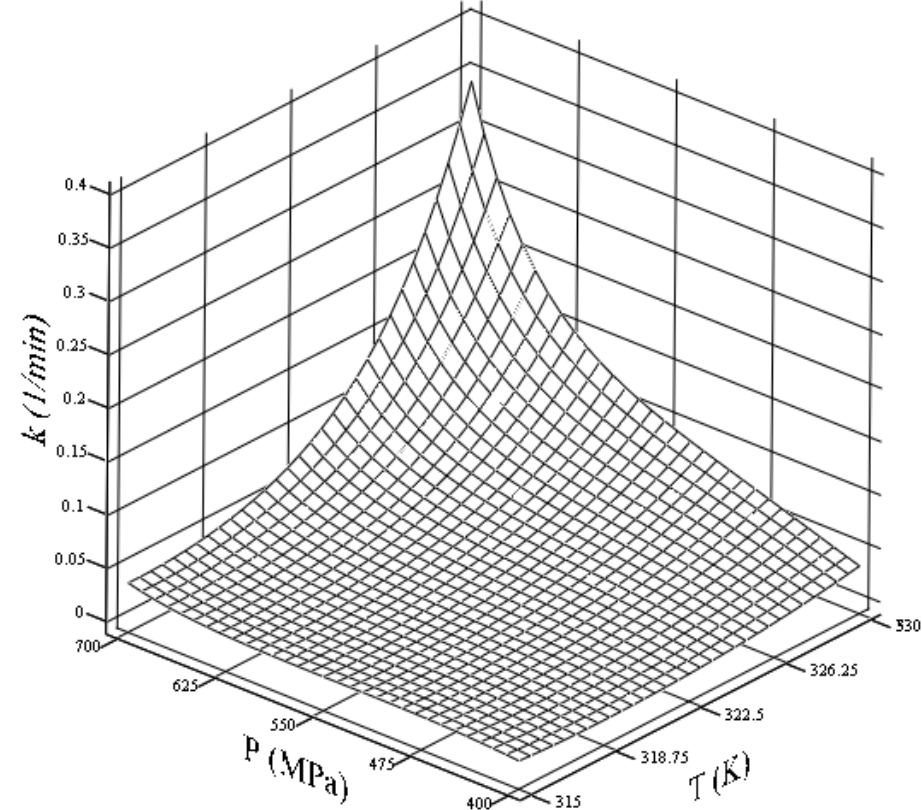
7.38) μοντέλο, καθώς και οι καμπύλες ίσου ρυθμού απενεργοποίησης (contour plot) σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας και της πίεσης, όπως προκύπτουν από το εκθετικό μοντέλο. Οι καμπύλες αυτές απεικονίζουν τις γραμμές πάνω στις οποίες ο ρυθμός απενεργοποίησης είναι ίσος μεταξύ διαφόρων συνθηκών θερμοκρασίας και πίεσης.



Διάγραμμα 7.36: Καμπύλες ίσου ρυθμού απενεργοποίησης για την ΠΜΕ πορτοκαλιού ποικιλίας Navel, όπως προκύπτουν από το εκθετικό μοντέλο.



Διάγραμμα 7.37: τρισδιάστατη απεικόνιση της εξάρτησης της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία και την πίεση σύμφωνα με το εκθετικό μοντέλο.



Διάγραμμα 7.38: τρισδιάστατη απεικόνιση της εξάρτησης της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία και την πίεση σύμφωνα με το πολυωνυμικό μοντέλο.

Κεφάλαιο 8 : Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα τόσο από τη βιβλιογραφία όσο και από πειράματα που έχουν διεξαχθεί στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας τροφίμων (Ε.Μ.Π.) δείχνουν ότι η διαφορετικότητα στην προέλευση της πηκτινομεθυλεστεράσης (ΠΜΕ) (διαφορετικό φρούτο, ακόμα και διαφορετική ποικιλία του ίδιου φρούτου) απαιτεί διαφορετικές συνθήκες απενεργοποίησης του συγκεκριμένου ενζύμου. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης συνδιασμού Υπερψηλής Υδροστατικής Πίεσης με ήπια θερμική επεξεργασία στην δραστηριότητα του καθαρού ενζύμου πηκτινομεθυλεστεράσης (ΠΜΕ) προερχόμενο από φλοιό πορτοκαλιού ποικιλίας *Navel*.

Για τη μελέτη των βιοχημικών χαρακτηριστικών του συγκεκριμένου ενζύμου πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός του με χρήση χρωματογραφίας κατιοντανταλλαγής και χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Η έκλουση της ΠΜΕ κατά την χρωματογραφία κατιοντοεναλλαγής εμφάνισε δύο κορυφές απορρόφησης, μία έντονη κορυφή στα 58min και μία λιγότερο ευδιάκριτη στα 131min. Η έκλουση της έντονης κορυφής πραγματοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις NaCl μεταξύ 0.16 και 0.22M, ενώ η έκλουση της μικρότερης κορυφής μεταξύ 0.25 και 0.35M, μαρτυρώντας την παρουσία δύο ισοενζύμων ΠΜΕ, γεγονός που επιβεβαιώθηκε τόσο από την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE όσο και από τα πειράματα απενεργοποίησης που πραγματοποιήθηκαν. Η ύπαρξη δύο ισοενζύμων ΠΜΕ στο φλοιό πορτοκαλιού ποικιλίας *Navel* αναφέρεται και στη διεθνή βιβλιογραφία. Το ισοένζυμο με τη κορυφή μεγαλύτερης έντασης (μεγαλύτερη δραστηριότητα) καθαρίστηκε περαιτέρω με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Από τη συνολική ενεργότητα των 38475 units (U) του αρχικού ενζυμικού διαλύματος, μπόρεσαν τελικά να ανακτηθούν 3640 units (U) καθαρού ενζύμου (~ 9.5% της αρχικής δραστηριότητας). Η συνολική απώλεια ήταν σημαντική, ωστόσο το τελικό κλάσμα παρουσίασε υψηλή καθαρότητα (<95%) με ανηγμένη ενεργότητα 1125 U/mg πρωτεΐνης. Από την ηλεκτροφόρηση, η καθαρή ΠΜΕ προσδιορίστηκε ως μια μονομερής πρωτεΐνη με σχετική μοριακή μάζα 36kDa.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση του συγκεκριμένου ενζύμου, καθώς μελετήθηκε η κινητική του σε σχέση με το υπόστρωμα και προσδιορίστηκαν οι σταθερές ενζυμικής δράσης από την εξίσωση Michaelis-Menten. Οι σταθερές

προσδιορίστηκαν ίσες με $K_m = 2.06 \text{ mg/mL}$ και $V_m = 5.18 \text{ } \mu\text{mol/mLmin}$. Η σταθερά V_m δεν είναι εγγενής παράμετρος του ενζύμου επειδή εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του. Αντιθέτως, η σταθερά K_m είναι εγγενής παράμετρος και εξαρτάται μόνο από τις συνθήκες όπως pH, θερμοκρασία και συγκέντρωση αλάτων. Μια μεγάλη σταθερά K_m υποδηλώνει μικρή συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα. Σε σχέση με ΠΜΕ από άλλες φυτικές πηγές η ΠΜΕ από πορτοκάλι *Navel* φαίνεται να έχει μικρότερη συγγένεια.

Κατά τη θερμική απενεργοποίηση της ΠΜΕ από πορτοκάλι *Navel* μελετήθηκαν 4 θερμοκρασίες 50, 55, 60 και 65°C σε ατμοσφαιρική πίεση. Η απενεργοποίηση του ενζύμου περιγράφηκε ικανοποιητικά από κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης, υποδεικνύοντας την παρουσία ενός μόνο ισοενζύμου, γεγονός που συμβαδίζει με τα αποτελέσματα του καθαρισμού. Από προσαρμογή του κινητικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα υπολογίστηκαν οι σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης, οι οποίες κυμαίνονται από 0.011 έως 0.351 min^{-1} , για τις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν. Αύξηση της θερμοκρασίας από 50 σε 65°C προκάλεσε αύξηση του ρυθμού απενεργοποίησης, περίπου κατά 30 φορές. Σε θερμοκρασία 50°C για χρόνο κατεργασίας 6min η ενεργότητα μειώθηκε στο 92% της αρχικής, ενώ σε θερμοκρασία 65°C και χρόνο κατεργασίας μόλις 4min, η υπολειπόμενη ενεργότητα ήταν στο 28% της αρχικής. Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης περιγράφηκε ικανοποιητικά από τη σχέση Arrhenius, με ενέργεια ενεργοποίησης 218 kJ/mol.

Στα πειράματα απενεργοποίησης της ΠΜΕ με συνδυασμένη εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης και ήπιας θερμοκρασίας μελετήθηκαν πιέσεις μεταξύ 400 και 700 MPa για θερμοκρασίες 45, 50 και 55°C. Η απενεργοποίηση περιγράφηκε ικανοποιητικά από το κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης. Παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση πίεσης και θερμοκρασίας. Συγκρίνοντας τη θερμική απενεργοποίηση της ΠΜΕ στους 50°C σε ατμοσφαιρική πίεση με την συνδυασμένη απενεργοποίηση στους 45°C σε πίεση 400MPa, παρατηρείται παρόμοια απενεργοποίηση (υπολειπόμενη δραστηριότητα 80% στα 20min επεξεργασίας). Αύξηση της πίεσης και της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού απενεργοποίησης. Οι σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης κυμαίνονται από 0.012 min^{-1} ($T=45^\circ\text{C}$, $P=400\text{MPa}$) έως 0.242 ($T=55^\circ\text{C}$, $P=700\text{MPa}$) που είναι και ο μέγιστος ρυθμός απενεργοποίησης που παρατηρήθηκε στα πειράματα. Η σταθερά αυτή είναι περίπου 11 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με αυτήν της απλής θερμικής απενεργοποίησης στην ίδια θερμοκρασία. Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης σε κάθε πίεση περιγράφηκε ικανοποιητικά από τη σχέση Arrhenius. Οι ενέργειες ενεργοποίησης που υπολογίστηκαν κυμαίνονται από 87 kJ/mol ($P=400\text{MPa}$) έως 160 kJ/mol ($P=700\text{MPa}$). Οι τιμές αυτές είναι σημαντικά μικρότερες από την τιμή που υπολογίστηκε για τη θερμική απενεργοποίηση σε ατμοσφαιρική πίεση (218 kJ/mol) υποδεικνύοντας ότι σε υψηλή πίεση η αύξηση της θερμοκρασίας έχει μικρότερη

επίδραση στο ρυθμό απενεργοποίησης από ότι έχει σε ατμοσφαιρική πίεση. Η αύξηση της ενέργειας ενεργοποίησης αυξανόμενης της πίεσης περιγράφηκε ικανοποιητικά από εκθετική σχέση. Η αύξηση αυτή σημαίνει ότι αύξηση της πίεσης αυξάνει την επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης. Η επίδραση της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης εκφράστηκε ικανοποιητικά από τη σχέση Eyring. Οι όγκοι ενεργοποίησης που προέκυψαν κυμαίνονται από -10.05mL/mol μέχρι -18.54mL/mol. Το αρνητικό πρόσημο υποδηλώνει ότι η αύξηση της πίεσης αυξάνει το ρυθμό απενεργοποίησης για σταθερή θερμοκρασία. Ο απόλυτος όγκος ενεργοποίησης αυξάνεται γραμμικά με τη θερμοκρασία που σημαίνει ότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες η επίδραση της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης γίνεται εντονότερη.

Για την έκφραση της συνδυασμένης επίδρασης πίεσης και θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης χρησιμοποιήθηκαν δύο μαθηματικά μοντέλα, ένα εκθετικό (Εξίσωση Α) και ένα πολυωνυμικό (Εξίσωση Β).

(Εξίσωση Α)

$$k = k_{refP,T} \cdot \exp \left\{ -\frac{E_{aP}}{R} \cdot \exp[-B \cdot (P - P_{ref})] \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) - \frac{A \cdot (T - T_{ref}) + V_{aT}}{RT} \right\} \cdot (P - P_{ref})$$

(Εξίσωση Β)

$$\ln(k) = \ln(k_0) - \frac{\Delta\kappa}{2RT} (P - P_0)^2 - \frac{2\Delta\zeta}{RT} (P - P_0)(T - T_0) + \frac{\Delta C_p}{RT} \cdot \frac{(T - T_0)^2}{2T_0} - \frac{\Delta V_0}{RT} (P - P_0) + \frac{\Delta S_0}{RT} (T - T_0) + \frac{\Delta\kappa_2}{2RT} (P - P_0)^3 + \frac{\Delta C_{p2}}{2RTT_0} (T - T_0)^3$$

Οι παράμετροι των μοντέλων υπολογίστηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση στα πειραματικά δεδομένα. Το εκθετικό μοντέλο έδωσε συντελεστή συσχέτισης $R^2=0.995$ ενώ το πολυωνυμικό $R^2=0.995$. Το εύρος ισχύος και των δύο μοντέλων είναι για πιέσεις 400-700MPa και θερμοκρασίες 45-55°C. Μέσα στο πεδίο αυτό η εκτίμηση των σταθερών ρυθμού απενεργοποίησης κρίνεται ικανοποιητική, αποδεικνύοντας ότι και τα δύο μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Το εκθετικό μοντέλο υπερτερεί σε σχέση με το πολυωνυμικό στο ότι έχει πολύ μικρότερο αριθμό παραμέτρων και είναι συνεπώς πιο εύχρηστο.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη (καθαρή ΠΜΕ από φλοιό πορτοκαλιού, *Navel* cv.) με αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας τροφίμων (Ε.Μ.Π.) για τη καθαρή ΠΜΕ από φλοιό πορτοκαλιού ποικιλίας *Valencia*. Και στις δύο περιπτώσεις, η απενεργοποίηση των καθαρών ενζύμων περιγράφηκε ικανοποιητικά από κινητική εξίσωση πρώτης τάξης. Σημαντική διαφορά μεταξύ των

δύο ενζύμων φαίνεται να είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία της ΠΜΕ του πορτοκαλιού *Valencia* στη θερμοκρασία και την πίεση. Στην πιο έντονη συνθήκη και των δύο μελετών ($P=700\text{MPa}$, $T=55^\circ\text{C}$) η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ από το πορτοκάλι *Valencia* είναι περίπου 4 φορές μεγαλύτερη. Αντίστοιχα, η σταθερά απενεργοποίησης σε πίεση 700MPa και θερμοκρασία 45°C για την ΠΜΕ πορτοκαλιού *Navel* είναι ίση με αυτή του πορτοκαλιού *Valencia* σε συνθήκες 400MPa και θερμοκρασία 40°C . Οι διαφορές αυτές στη συμπεριφορά ως προς την ευαισθησία στην πίεση και τη θερμοκρασία είναι πολύ πιθανόν να οφείλονται σε διαφορές στη δομή των δύο ενζύμων.

Γενικά η δομή και η δραστικότητα των ενζύμων είναι άρρηκτα συνδεδεμένες. Όπως παρατηρήθηκε και στη μελέτη φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού που πραγματοποιήθηκε στην καθαρή ΠΜΕ του πορτοκαλιού *Valencia* μετά από επεξεργασία με ΥΥΠ, οι δομικές μεταβολές που αναμένονται τόσο στη δευτεροταγή όσο και στη τριτοταγή δομή και της καθαρής ΠΜΕ προερχόμενη από φλοιό πορτοκαλιού *Navel* θα είναι μη αντιστρεπτές. Η μείωση της δραστικότητας του ενζύμου με την επεξεργασία ΥΥΠ εκτιμάται ότι θα συνοδεύονται με αλλαγές στη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή. Σε αντίθεση με τη θερμική επεξεργασία, που για πλήρη ή μερική απενεργοποίηση του ενζύμου προκαλείται πλήρης αποδιάταξη αυτού (καταστροφή δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής) μετά από επεξεργασία με ΥΥΠ σημαντικότερες μεταβολές προκαλούνται στη τριτοταγή δομή όπου αυξάνονται προοδευτικά με αύξηση της πίεσης. Αυτές οι μεταβολές συνδέονται σε μεγάλο βαθμό με την εναπομένουσα δραστικότητα της ΠΜΕ. Για καλύτερη κατανόηση των ανωτέρω μεταβολών προτείνεται η μελέτη της τριτοταγούς δομής των καθαρών ενζύμων μετά από επεξεργασία με ΥΥΠ με τη φασματοσκοπία φθορισμού.

Βιβλιογραφία

- [1] Schols H. A., Voragen Alphons G. J., "Pectic Polysaccharides." *in* Voragen Alphons G. J. , Wong Dominic W. S. WhitakerJohn R. *Handbook of Food Enzymology*. New York : Marcel Dekker, Inc., 2003.
- [2] BeMiller, J.N., "An Introduction to Pectins: Structure and Properties." *in* M. Fishman. *Chemistry and function of pectins*. Washington DC : American Chemical Society, 1986.
- [3] Yadav S., Yadav P.K., Yadav D., Yadav K.D.S., "Pectin lyase: A review." *Process Biochemistry*, s.l. : Elsevier, 2009, Issue 1, Vol. 44, pp. 1-10.
- [4] Mohnen D., Etzler M.E., "Viridiplantae." *in* Cummings R.D., Esko J.D. Varki A. *Essentials of Glycobiology*. 2nd Edition. Cold Spring Harobor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- [5] Grassin C., Coutel Y., "Enzymes in fruit and vegetable processing and juice extraction." *in* van Oort M. Whitehurst R.J. *Enzymes in food technology*. 2nd edition. Chichester, West Sussex, UK : Wiley-Blackwell, 2010.
- [6] Benen, Jacques A., Voragen Alphons G. J., "Pectic Enzymes." *in* Voragen Alphons G. J. , Wong Dominic W. S. WhitakerJohn R. *Handbook of Food Enzymology*. New York : Marcel Dekker, Inc., 2003.
- [7] Negi P.S., Handa K.A., "Structural Deterioration of the Produce: The Breakdown of Cell Wall Components." *in* MurrD.P., Handa A.K., Lurie S. Paliyath G. *Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables and Flowers*. Ames, IA : Wiley-Blackwell, 2008.
- [8] Eriksson, E.M., Bovy, A., Manning, K., Harrison, L., Andrews, J., de Silva, J., Tucker, G.A., and Seymour, G.B., "Effect of the colorless non-ripening mutation on cell wall biochemistry and gene expression during tomato fruit development and ripening." *Plant Physiology*, 2004, Vol. 136, pp. 4184–4197.

- [9] Youssef M.S., Jimenez-Bermudez S., Bellido M.L. et al., "Fruit yield and quality of strawberry plants transformed with a fruit specific strawberry pectate lyase gene." s.l. : Elsevier, 2009, Vol. 119, pp. 120–125.
- [10] Ceci, N.L., Lozano J.E., "Use of enzymes for non-citrus fruit juice production." in Alev Bayindirli. *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing: Chemistry and Engineering applications*. Boca Raton, FL : CRC Press, 2010.
- [11] Pretel M.T., Sanchez-Bel P.I, Egea I., Romojaro F., "Enzymatic Peeling of Citrus Fruits." in Alev Bayindirli. *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing: Chemistry and Engineering applications*. Boca Raton, FL : CRC Press, 2010.
- [12] Gómez-Plaza E., Romero-Cascales I., Bautista-Ortín A.B., "Use of Enzymes for Wine Production." in Alev Bayindirli. *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing: Chemistry and Engineering applications*. Boca Raton, FL : CRC Press, 2010.
- [13] H.S., Olsen., "Enzymes in Food Processing." in Reed G. Nagodawithana T.W. *Biotechnology*. 2nd Edition. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1995, Vol. 9 (Enzymes, Biomass, Food and Feed).
- [14] Pelloux J., Rusterucci C., Mellerowicz E.J., "New insights into pectin methylesterase structure and function." *Trends in Plant Science*, s.l. : Elsevier, 2007, Issue 6, Vol. 12.
- [15] Benen J.A.E., van Alebeek G.J.W.M., Voragen G.J., Visser J., "Pectin esterases." in Voragen A.G.J., Wong D.W.S. Whitaker J.R. *Handbook of Food Enzymology*. New York : Marcel Dekker, 2003.
- [16] Micheli, Fabienne., "Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology." *TRENDS in Plant Science*, s.l. : Elsevier, 2001, Issue 9, Vol. 6.
- [17] Whitaker, John R., "Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices." *Enzyme Microb. Technol.*, s.l. : Butterworth & co., 1984, Vol. 6.
- [18] Castaldo D., Laratta B., Loiudice R., Giovane A., Quagliuolo L., Servillo L., "Presence of Residual Pectin Methylesterase Activity in Thermally Stabilized Industrial Fruit Preparations." *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, web publication : Academic Press, 1997, Vol. 30, pp. 479–484.
- [19] Croak S., Corredig M., "The role of pectin in orange juice stabilization: Effect of pectin methylesterase and pectinase activity on the size of cloud particles." *Food Hydrocolloids*, s.l. : Elsevier, 2006, Vol. 20, pp. 961-965.
- [20] Crandall P.G., Matthews R.F., Baker R.A., "Citrus beverage clouding agents-review and status." *Food Technology*, 1983, Issue 2, Vol. 37, pp. 106-109.

- [21] Beveridge, T., "Opalescent and cloudy fruit juices: formation and particle stability." *Critical reviews in food science and nutrition*, 2002, Issue 4, Vol. 42, pp. 317-337.
- [22] Rodrigo D., Cortes C., Clynen E., Schoofs L., Van Loey A., Hendrickx M., "Thermal and high-pressure stability of purified polygalacturonase and pectinmethylesterase from four different tomato processing varieties." *Food Research International*, s.l. : Elsevier, 2006, Vol. 39, pp. 440–448.
- [23] Awuaha G.B., Ramaswamyb H.S., Economides A., "Thermal processing and quality: Principles and overview." *Chemical Engineering and Processing*, s.l. : Elsevier, 2007, Vol. 46, pp. 584–602.
- [24] Singh P.R., Heldman D.R., *Introduction to Food Engineering*. 4th Edition. London : Academic Press (Elsevier), 2009.
- [25] N.K., Rastogi., "Opportunities and Challenges in Nonthermal Processing of Foods." in Ribeiro C.P. Passos M.L. *Innovation in Food Engineering: New techniques and products*. Boca Raton, FL : CRC Press, 2010.
- [26] B.H., Hite., "The effect of pressure in the preservation of milk." s.l. : West Virginia University. Agricultural Experiment Station, 1899, Vol. 58. S127.E1 no.51-75.
- [27] Hendrickx M., Ludikhuyze L., Van den Broeck I., Weemaes C., "Effects of high pressure on enzymes related to food quality." *Trends in Food Science and Technology*, s.l. : Elsevier, 1998, Vol. 9, pp. 197-203.
- [28] G.V., Barbosa-Canovas., *Nonthermal Preservation of Foods*. New York : Marcel Dekker, Inc., 1998.
- [29] Ohlsson T., Bengtsson N., "Minimal processing of Foods with non-thermal methods." *Minimal processing technologies in the food industry*. Cambridge, England : Woodhead Publishing Limited, 2002.
- [30] Denys S., Van Loey A.M., Hendrickx M.E., "A modeling approach for evaluating process uniformity during batch high hydrostatic pressure processing: combination of a numerical heat transfer model and enzyme inactivation kinetics." *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, s.l. : Elsevier, 2000, Issue 1, pp. 5-19.
- [31] Ting E., Balasubramaniam V. M. & Raghubeer E., "Determining thermal effects in high pressure processing." *Journal of Food Technology*, 2002, Issue 56, Vol. 2, pp. 31-35.
- [32] Styles M. F., Hoover D. G., Farkas D. F., "Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure." *Journal of Food Science*, 1991, Issue 56, Vol. 5.

- [33] Metrick C., Hoover D. G., Farkas D. F., "Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of Salmonella." *Journal of Food Science*, 1989, Issue 54, Vol. 6.
- [34] Hayakawa I., Kanno T., Tomita M., Fujio Y., "Application of high pressure for spore inactivation and protein denaturation." *Journal of Food Science*, 1994, Issue 59, Vol. 1.
- [35] Palou E., Aurelio Lopez-Malo, Gustavo V. Barbosa-Canovas, Barry G. Swanson., "High-Pressure Treatment in Food Preservation." in M.S. Rahman. *Handbook of Food Preservation*. 2nd Edition. Boca Raton, FL : CRC Press, 2007.
- [36] Serra X., Grebol N., Guardia M.D., Guerrero L., Gou P., Masoliver P., Gassiot M., Sarraga C., Monfort J.M., Arnau J., "High pressure applied to frozen ham at different process stages. 2. Effect on the sensory attributes and on the colour characteristics of dry-cured ham." *Meat Science*, s.l. : Elsevier, 2007, Issue 75, pp. 21-28.
- [37] Trejo Araya X.I., Smale N., Zabaras D., Winley E., Forde C., Stewart C.M., Mawson A.J., "Sensory perception and quality attributes of high pressure processed carrots in comparison to raw, sous-vide and cooked carrots." *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, s.l. : Elsevier, 2009, Issue 10, pp. 420-433.
- [38] Oey I., Lille M., Van Loey A., Hendrickx M., "Effect of high-pressure processing on color, texture and flavor of fruit and vegetable-based food products: a review." *Trends in Food Science and Technology*, s.l. : Elsevier, 2008, Issue 19, pp. 320-328.
- [39] Cheftel J.C., Culioli J., "Effects of High Pressure on meat: a review." s.l. : Elsevier, 1997, Issue 3, Vol. 46, pp. 211-236.
- [40] Quaglia G.B., Gravina R., Paperi R., Paoletti F., "Effect of High Pressure Treatments on Peroxidase Activity, Ascorbic Acid Content and Texture in Green Peas." *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, s.l. : Academic Press, 1996, Vol. 29, pp. 552-555.
- [41] Indrawati, Van Loey A., Smout C., Hendrickx M., "High hydrostatic pressure technology in food preservation." in Bogh-Sorensen L. Zeuthen P. *Food preservation techniques*. Cambridge : Woodhead Publishing Ltd., 2003.
- [42] K., Hermans., "High pressure effects on biomolecules." in D. E. Johnston, R. G. Earnshaw, A. P. M. Hasting D. A. Ledward. *High Pressure Processing of Foods*. Nottingham : Nottingham University Press, 1995.
- [43] van Eldik R., Asano T., Le Noble W. J., "Activation and reaction volumes in solution." *Chem. Rev.*, 1989, Issue 89, σ. 549.
- [44] B., Tauscher., "Pasteurization of food by hydrostatic pressure: chemical aspects." *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1995, Issue 200, σ. 3.

[45] Γώγου, Ε., "ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (Διδακτορική Διατριβή)." ΕΜΠ : s.n., 2010.

[46] Miyagawa K., Sannoe K., Suzuki K., "Studies on Taka-Amylase A Under High Pressure Treatment ; Part II : Recovery of Enzymic Activity of Pressure Inactivated Taka-Amylase A and its Enhancement by Retreatment at Moderate Pressure." Arch. Biochem. Biophys., 1964, Issue 106, pp. 467-474.

[47] Polydera A.C., Galanou E., Stoforos N.G., Taoukis P.S., "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, s.l. : Elsevier, 2004, Issue 62, pp. 291-298.

[48] Guivarc'h Y., Segovia O., Hendrickx M., Van Loey A., "Purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation of a pectin methylesterase from white grapefruit (*Citrus paradisi*)." Innovative Food Science and Emerging Technologies 6 (2005) 363 – 371, s.l. : Elsevier, 2005, Issue 6, pp. 363-371.

[49] Terefe N.S., Yang Y.H., Knoerzer K., Buckow R., Versteeg C., "High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree." Innovative Food Science and Emerging Technologies , s.l. : Elsevier, 2010, Vol. 11, pp. 52–60.

[50] Buckow R., Weiss U., Knorr D., "Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains." Innovative Food Science and Emerging Technologies , s.l. : Elsevier, 2009, Vol. 10, pp. 441–448.

[51] Garcia-Palazon A., Suthanthangjai W., Kajda P., Zabetakis I., "The effects of high hydrostatic pressure on b-glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria ananassa*)." Food Chemistry, s.l. : Elsevier, 2004, Vol. 88, pp. 7-10.

[52] Fachin D., Van Loey A.M., Nguyenb B.L, Verlent I., Hendrickx M.E., "Inactivation kinetics of polygalacturonase in tomato juice." Innovative Food Science and Emerging Technologies, s.l. : Elsevier, 2003, Vol. 4, pp. 135–142.

[53] Sila D.N., Smout C., Satara Y., Truong V., Van Loey A., Hendrickx M., "Combined thermal and high pressure effect on carrot pectinmethylesterase stability and catalytic activity." Journal of Food Engineering, s.l. : Elsevier, 2007, Vol. 78, pp. 755–764.

[54] Ingallinera B, N. Barbagallo P.N., Spagna G., Palmeri R., Todaro A., "Effects of thermal treatments on pectinesterase activity determined in blood oranges juices." Enzyme and Microbial Technology, s.l. : Elsevier, 2005, Vol. 36 , pp. 258–263.

[55] NIENABER U., . SHELLHAMMER T.H., "High-Pressure Processing of Orange Juice: Kinetics of Pectinmethylesterase Inactivation." *Food Engineering and Physical Properties*, s.l. : Institute of Food Technologists, 2001, Issue 2, Vol. 66.

[56] Γαλανού, Ελένη., "Κινητική μελέτη επίδρασης υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης και θερμοκρασίας στην πηκτινομεθυλεστεράση πορτοκαλοχυμού." Αθήνα : Διπλωματική εργασία Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, 2002.

[57] Σιντόση, Βασιλική., "Επεξεργασία υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης: μελέτη απενεργοποίησης πηκτινομεθυλεστεράσης σε χυμό από σαγκουίνι και βερίκοκο." Αθήνα : Διπλωματική εργασία Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, 2007.

[58] Ly Nguyen B., Van Loey A., Fachin D., Verlent I., Hendrickx M., "Purification, Characterization, Thermal and High-pressure inactivation of pectin methylesterase from Bananas (cv Cavendish)." *Biotechnology and Bioengineering*. June 20, 2002, Vol. 78, 6.

[59] Ly-Nguyen B., Van Loey A., Fachin D., Verlent I., Thomas Duvetter, Son T. Vu, Smout C., Hendrickx M., "Strawberry Pectin Methylesterase (PME): Purification, Characterization, Thermal and High-Pressure Inactivation." web publication : American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers, 2002, Issue 6, Vol. 18.

[60] Linn, Stuart., "Strategies and considerations for protein purification." in Murray P. Deutscher Richard R. Burgess. *Methods in Enzymology Vol. 463: Guide to Protein Purification*. London : Academic Press (Elsevier), 2009.

[61] Burgess, Richard R., "Preparing a purification summary table." in Murray P. Deutscher Richard R. Burgess. *Methods in Enzymology Vol. 463: Guide to Protein Purification*. London : Academic Press (Elsevier), 2009.

[62] Burgess, R.R., "Protein precipitation techniques." in Murray P. Deutscher Richard R. Burgess. *Methods in Enzymology Vol. 463: Guide to Protein Purification*. London : Academic Press (Elsevier), 2009.

[63] Michael L. Shuler, Fikret Kargi., *Bioprocess Engineering, Basic Concepts*. s.l. : Prentice Hall PTR, 2002.

[64] Evans D.R.H., Romero J.K., Westoby M., "Concentration of proteins and removal of solutes." in Murray P. Deutscher Richard R. Burgess. *Methods in Enzymology Vol. 463: Guide to Protein Purification*. London : Academic Press (Elsevier), 2009.

[65] Π. Ταούκης, Β. Ωραιπούλου., *Επιστήμη και Μηχανική Διεργασιών Τροφίμων (σημειώσεις από τις παραδόσεις)*. Αθήνα : Εκδόσεις ΕΜΠ, 2009.

- [66] Jungbauer A., Hahn R., "Ion-exchange chromatography." in Murray P. Deutscher Richard R. Burgess. *Methods in Enzymology Vol. 463: Guide to Protein Purification*. London : Academic Press (Elsevier), 2009.
- [67] Stellwagen, E., "Gel filtration." in Murray P. Deutscher Richard R. Burgess. *Methods in Enzymology Vol. 463: Guide to Protein Purification*. London : Academic Press (Elsevier), 2009.
- [68] Garfin, D.E., "One-dimensional gel electrophoresis." in Murray P. Deutscher Richard R. Burgess. *Methods in Enzymology Vol. 463: Guide to Protein Purification*. London : Academic Press (Elsevier), 2009.
- [69] Noble J.E., Bailey M.J.A., "Quantitation of Protein." in Murray P. Deutscher Richard R. Burgess. *Methods in Enzymology Vol. 463: Guide to Protein Purification*. London : Academic Press (Elsevier), 2009.
- [70] Cameron R.G., Grohmann K., "Purification and Characterization of a Thermally Tolerant pectin methylesterase from a commercial Valencia fresh frozen orange juice." *J. Agric. Food Chem.*, s.l. : American Chemical Society, 1996, Vol. 44, pp. 458-462.
- [71] Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C., "How to study proteins by circular dichroism." web publication : Elsevier, 2005, Vol. 1751, pp. 119-139.
- [72] Fasman, G.D., *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. New York : Plenum Press, 1996.
- [73] Berova N., Nakanishi K., *Circular Dichroism: Principles and applications*. New York : Wiley-VCH, 2000.
- [74] Krittanai C., Johnson W.C., "Correcting the circular dichroism spectra of peptides for contributions of absorbing side chains." *Anal. Biochem.*, 1997, Vol. 253, pp. 57-64.
- [75] Boxer D.H., Zhang H., Gourley D.G., Price N.C., "Sensing of remote oxyanion binding at the DNA binding domain of the molybdate-dependent transcriptional regulator, ModE." *Org. Biomol. Chem.*, 2004, Vol. 2, pp. 2829-2837.
- [76] Price N.C., Stevens L., *Fundamentals of Enzymology*. 2nd Edition. Oxford : Oxford University Press, 1999.
- [77] Scopes, R.K., *Protein Purification: Principles and Practice*. 3rd Edition. New York : Springer, 1994.
- [78] Z. Alexandrakis, G. Dimopoulos, P. Stavros, M. Giannoglou, G. Katsaros, P. Katapodis, G. Nounesis, P. Taoukis., "Comparative structural changes and

inactivation kinetics of pectin methylesterase of various sources after high pressure processing." IFT11 Annual Meeting (poster session) : s.n., 2011.

[79] Rouse A.H., Atkins C.D., "Pectinesterase and pectin in commercial orange juice as determined by methods used at the Citrus Experiment Station." Florida Agricultural Experiment Station Bulletin, Florida : s.n., 1955, Issue 570, pp. 1-19.

[80] Savary B.J., Hotchkins A.T., Cameron R.G., "Characterization of a Salt-independent Pectin Methylesterase purified from Valencia orange Peel." Journal of Agricultural and Food Chemistry, web publication : American Chemical Society, 2002, Vol. 50, pp. 3533-3558.

[81] Stoll V.S., Blanchard J.S., "Buffers: Principles and Practice." in Murray P. Deutscher Richard R. Burgess. *Methods in Enzymology Vol. 463: Guide to Protein Purification*. London : Academic Press (Elsevier), 2009.

[82] Rhodes D.E., Laue T.M., "Determination of protein purity." in Murray P. Deutscher Richard R. Burgess. *Methods in Enzymology Vol. 463: Guide to Protein Purification*. London : Academic Press (Elsevier), 2009.

[83] Harris T.K., Keshwani M.M., "Measurement of Enzyme Activity." in Murray P. Deutscher Richard R. Burgess. *Methods in Enzymology Vol. 463: Guide to Protein Purification*. London : Academic Press (Elsevier), 2009.

[84] Deutscher, Murray P., "Setting up a laboratory." in Murray P. Deutscher Richard R. Burgess. *Methods in Enzymology Vol. 463: Guide to Protein Purification*. London : Academic Press (Elsevier), 2009.

[85] Alkorta I., Garbisu C., Llama M.J., Serra J.L., "Industrial applications of pectic enzymes: a review." Process Biochemistry, s.l. : Elsevier Science Ltd., 1998, Issue 1, Vol. 33, pp. 21-28.

[86] Kelly S.M., Price N.C., "The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function." Curr. Prot. Pept. Sci., 2000, Vol. 1, pp. 349-384.