



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ**
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΣΤΗΝ
ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΗΞΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ
ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΑΓΙΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΥΤΟΛΥΣΗ**

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ - ΜΑΡΙΝΟΣ ΑΕΡΑΚΗΣ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπων:
ΠΕΤΡΟΣ ΤΑΟΥΚΗΣ
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2020

*Στους γονείς μου
Δημήτρη και Μαρία
και στην αδερφή μου
Έλενα*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου από τον προπτυχιακό φοιτητή Ευάγγελο – Μαρίνο Αεράκη, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Πέτρου Ταούκη.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Ε.Μ.Π. Πέτρο Ταούκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όταν μου ανέθεσε αυτή τη διπλωματική εργασία και για την καθοδήγησή του. Επίσης, θέλω να τον ευχαριστήσω, όπως και τις καθηγήτριες Κωνσταντίνα Τζια και Βασιλική Ωραιοπούλου, για τις γνώσεις που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου και για τη συμβολή τους στην ανάπτυξη του ενδιαφέροντός μου προς την τεχνολογία τροφίμων. Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους Υποψήφιους Διδάκτορες Γεώργιο Δημόπουλο και Αθανάσιο Λημναίο για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων για την εξαιρετική συνεργασία και το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον που δημιούργησαν.

Τέλος, τίποτα από τα παραπάνω δε θα ήταν δυνατό χωρίς την υποστήριξη από την οικογένειά μου αλλά και από τους κοντινούς μου φίλους. Ευχαριστώ, λοιπόν, με όλη μου την καρδιά όλα τα κοντινά μου άτομα, που μου συμπαραστάθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ευάγγελος – Μαρίνος Αεράκης,
Φεβρουάριος 2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μια από τις βασικότερες εφαρμογές προϊόντων μαγιάς (*Saccharomyces cerevisiae*) στη βιομηχανία τροφίμων είναι το εκχύλισμα μαγιάς, το οποίο χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό γεύσης. Το εκχύλισμα μαγιάς μπορεί να προστεθεί σε διάφορα τρόφιμα και να βελτιώσει τη γεύση τους, με χαρακτηριστικά παραδείγματα να είναι οι σούπες και οι σάλτσες.

Η παρασκευή του εκχυλίσματος μαγιάς μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις τρόπους, την αυτόλυση, την πλασμόλυση και την υδρόλυση. Η παραγωγή εκχυλισμάτων μαγιάς με αυτόλυση έχει διάφορα πλεονεκτήματα σε σχέση με την παραγωγή με πλασμόλυση και με υδρόλυση. Κυριότερα από αυτά είναι ότι δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό ή χρήση διαλυτών, των οποίων η απομάκρυνση είναι απαραίτητη μετά το πέρας της διεργασίας. Επίσης, τα προϊόντα που προκύπτουν με αυτή τη διαδικασία έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο. Ένα μειονέκτημα της παρασκευής εκχυλισμάτων μαγιάς με αυτόλυση είναι ο μεγάλος χρόνος διεργασίας (> 20 h) που απαιτείται για να προκύψει ένα ικανοποιητικό προϊόν για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων.

Συγκεκριμένα, για την παρασκευή εκχυλίσματος μαγιάς με αυτόλυση, το αιώρημα μαγιάς επωάζεται σε σταθερή θερμοκρασία, συνήθως στους 52°C. Στις συνθήκες της επώασης, πραγματοποιείται ενεργοποίηση των υδρολυτικών ενζύμων των κυττάρων της μαγιάς, τα οποία προκαλούν τη λύση του κυττάρου, απελευθερώνοντας έτσι διάφορα ενδοκυτταρικά συστατικά στο περιβάλλον υγρό. Τα συστατικά αυτά είναι διάφοροι υδατάνθρακες, νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες, η παρουσία των οποίων καθιστά το εκχύλισμα μαγιάς ικανοποιητικό ενισχυτικό γεύσης.

Οι μη θερμικές διεργασίες ερευνώνται και εφαρμόζονται τα τελευταία χρόνια, λόγω της ικανότητας διατήρησης των περισσότερων θρεπτικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων μετά την επεξεργασία τους. Η υπερυψηλή πίεση, η οποία ανήκει στις μη θερμικές μεθόδους επεξεργασίας τροφίμων, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τα ένζυμα που περιέχονται σε αυτά, προκαλώντας την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίησή τους ανάλογα με τις συνθήκες επεξεργασίας. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα της μαγιάς έχουν κυρίαρχο ρόλο στην πραγματοποίηση της αυτόλυσης, γι' αυτό στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η επίδραση της υπερυψηλής πίεσης και της θερμοκρασίας στην οποία πραγματοποιείται η αυτόλυση στην ενεργότητα των ενζύμων αυτών.

Στη γαλακτοβιομηχανία, ο βασικότερος τρόπος παραγωγής τυροκομικών προϊόντων είναι με τη χρήση πυτιάς, η οποία απομονώνεται από το στομάχι νεαρών μηρυκαστικών θηλαστικών, συνηθέστερα μόσχου, και αποτελείται κυρίως από τα ένζυμα χυμοσίνη και

πεψίνη. Λόγω της μεγάλης ζήτησης τυροκομικών και της πολύ περιορισμένης παραγωγής τυτιάς, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες για την εύρεση υποκατάστατων τυτιάς. Ήδη σήμερα, η τυτιά στη γαλακτοβιομηχανία χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα για να μπορούν να καλυφθούν οι ανάγκες της αγοράς. Με βάση τα παραπάνω, δεύτερο σκέλος της παρούσας έρευνας αποτέλεσε η μελέτη της πηκτικής ικανότητας των πρωτεολυτικών ενζύμων του εκχυλίσματος μαγιάς, για να εξεταστεί η δυνατότητα χρησιμοποίησής τους ως υποκατάστατα τυτιάς ή σε συνδυασμό με αυτή.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε αρχικά η επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στην ενεργότητα των ολικών πρωτεολυτικών ενζύμων του αιωρήματος μαγιάς, αλλά και στην ενεργότητα δύο συγκεκριμένων ενζύμων της μαγιάς, γνωστά για την πρωτεολυτική τους δράση, της πρωτεΐνάσης Α και της πρωτεΐνάσης Β. Μελετήθηκαν πιέσεις από 200 έως 600 MPa και χρόνοι επεξεργασίας από 0 έως 30 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα του αιωρήματος μαγιάς ενεργοποιήθηκαν σε συνθήκες πίεσης 200 και 400 MPa, ενώ απενεργοποιήθηκαν σε πίεση 600 MPa. Η μέγιστη αύξηση της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας ήταν 220% και παρουσιάστηκε κατά την επεξεργασία με πίεση 200 MPa για 30 min. Για την πρωτεΐνάση Α, όλες οι συνθήκες που μελετήθηκαν είχαν αρνητική επίδραση στην ενεργότητα. Συγκεκριμένα για επεξεργασία στα 200, 400 και 600 MPa υπήρξε μείωση της ενεργότητας κατά 31, 44 και 86% αντίστοιχα. Η πρωτεΐνάση Β παρουσίασε παρόμοια συμπεριφορά με το σύνολο των πρωτεολυτικών ενζύμων, δηλαδή ενεργοποιήθηκε με επεξεργασία στα 200 και 400 MPa ενώ απενεργοποιήθηκε στα 600 MPa. Επεξεργασία σε πίεση 400 MPa για 10 min οδήγησε σε 451% αύξηση στην ενεργότητά της.

Στη συνέχεια, τα επεξεργασμένα με πίεση δείγματα επώαστηκαν στις θερμοκρασίες 32, 42 και 52°C αντίστοιχα, με στόχο να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου επώασης καθώς και η επίδραση της επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση στην ενεργότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων. Έχει βρεθεί ότι τόσο ο χρόνος όσο και η θερμοκρασία επώασης οδηγούν σε διαφορετική συμπεριφορά ως προς την ενεργοποίηση και την απενεργοποίηση των ενζύμων. Και στις τρεις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν, η επεξεργασία στα 600 MPa δεν προκάλεσε αύξηση της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας σε κανέναν από τους χρόνους επεξεργασίας που μελετήθηκαν. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς, όπως προαναφέρθηκε, η επεξεργασία σε αυτή την πίεση προκάλεσε έντονη απενεργοποίηση των πρωτεολυτικών ενζύμων της μαγιάς. Η μέγιστη ενζυμική ενεργότητα επιτυγχάνεται από ανεπεξέργαστο αιώρημα μαγιάς μετά από 23 h επώαση στους 32°C και είναι ίση με 114.82 ± 1.19 U/mL, ενώ με προεπεξεργασία σε πίεση 200 MPa για 10 min επιτυγχάνεται ενεργότητα 112.38 ± 0.81 U/mL στις 8 h, δηλαδή 15 ώρες νωρίτερα από το ανεπεξέργαστο δείγμα. Στους 42°C, το ανεπεξέργαστο δείγμα παρουσιάζει μέγιστη ολική πρωτεολυτική ενεργότητα ίση με 98.12 ± 0.40 U/mL μετά από 8 h επώασης, ενώ τα επεξεργασμένα δείγματα φτάνουν στην ίδια ενεργότητα με μόλις 4 h επώασης. Επίσης, η μέγιστη ολική πρωτεολυτική ενεργότητα που επιτεύχθηκε στις συνθήκες που μελετήθηκαν είναι 123.14 ± 3.03 U/mL και παρατηρήθηκε μετά από στιγμιαία επεξεργασία σε πίεση 400 MPa και αυτόλυση στους 42°C για 8 h. Και στους 52°C παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας μετά από επεξεργασία σε συγκεκριμένες συνθήκες υπερυψηλής πίεσης, όμως

συνολικά, η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα στους 52°C ήταν πολύ χαμηλότερη από τις άλλες δύο θερμοκρασίες. Η πρωτεΐνάση A έχει ενεργότητα 25.98 ± 0.15 U/mL σε ανεπεξέργαστο αιώρημα χωρίς επώαση. Οι περισσότερες συνθήκες πίεσης και χρόνου επεξεργασίας είτε μειώνουν την ενεργότητα αυτή, είτε προκαλούν μικρή αύξηση αλλά μετά από αρκετές ώρες επώασης. Συγκεκριμένα, η μέγιστη ενεργότητα που επιτυγχάνεται είναι 32.10 ± 1.41 U/mL και παρατηρείται μετά από 15 h επώασης στους 42°C αφού προηγηθεί επεξεργασία στα 400 MPa για 2.5 min. Η μέγιστη ενεργότητα της πρωτεΐνάσης B που επιτυγχάνεται χωρίς επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση είναι 15.67 ± 0.06 U/mL μετά από 23h επώασης στους 32°C, ενώ με στιγμιαία εφαρμογή πίεσης 200 MPa και επώαση στους 42°C για 8 h επιτυγχάνεται ενεργότητα 15.04 ± 0.45 U/mL, συνεπώς επιτυγχάνεται παραπλήσια ενεργότητα 15 h νωρίτερα.

Στη συνέχεια, για επιλεγμένα δείγματα, μελετήθηκε η ικανότητα πήξης του γάλακτος σε θερμοκρασίες από 40 έως 75°C με δύο υποστρώματα γάλακτος με διαφορετική συγκέντρωση σε χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2), 10 mM και 20mM. Παρατηρήθηκε ότι η υψηλότερη συγκέντρωση του υποστρώματος σε ιόντα ασβεστίου οδήγησε σε ταχύτερη πήξη. Η αύξηση της θερμοκρασίας στην οποία πραγματοποιήθηκε η διαδικασία είχε θετική επίδραση στο χρόνο πήξης, εμφανίζοντας βέλτιστη θερμοκρασία 60°C για το υπόστρωμα με 10 mM CaCl_2 . Σε θερμοκρασίες 65-75°C παρατηρήθηκε μερική απενεργοποίηση των ενζύμων. Έτσι, κυρίως κατά την πήξη υποστρώματος με μικρότερη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου υπήρχε αύξηση του χρόνου πήξης στις θερμοκρασίες πάνω από 60°C, ενώ η πήξη του υποστρώματος με μεγαλύτερη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου ήταν γενικά ταχύτερη στις ψηλότερες θερμοκρασίες εκτός από κάποιες εξαιρέσεις στις οποίες η γρήγορη απενεργοποίηση των ενζύμων δεν επέτρεπε την πήξη του υποστρώματος.

Συγκρίνοντας τα παρασκευασμένα εκχυλίσματα μαγιάς ως προς τον χρόνο πήξης που πετυχαίνουν, λαμβάνοντας υπόψη και την επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση που έπρεπε να υποστεί το κάθε δείγμα για να πετύχει τον αντίστοιχο χρόνο πήξης, προέκυψε ότι το καλύτερο δείγμα από αυτά που μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα πήξης του γάλακτος, είναι αυτό στο οποίο εφαρμόστηκε πίεση 400 MPa για 2.5 min και στη συνέχεια επώαστηκε για 6 h στους 42°C. Το δείγμα αυτό πέτυχε χρόνο πήξης 2.9 ± 0.2 min στους 60°C για υπόστρωμα με 20 mM CaCl_2 , και χρειάστηκε τουλάχιστον 7 h λιγότερη επώαση από τα υπόλοιπα δείγματα που έδωσαν τον ίδιο χρόνο πήξης. Η ενεργότητα της πρωτεΐνάσης A, της πρωτεΐνάσης B και η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα για το δείγμα αυτό είναι 20.68 ± 0.85 , 12.71 ± 0.10 και 96.20 ± 1.24 U/mL αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, η επεξεργασία του αιωρήματος μαγιάς με υπερυψηλή πίεση μπορεί να μειώσει τον απαιτούμενο χρόνο αυτόλυσης και να αυξήσει την ενεργότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων κατά την αυτόλυση, ενώ μπορεί να βελτιώσει και την πηκτική ικανότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων της μαγιάς, καθιστώντας τα πιθανούς υποψήφιους για χρήση στη γαλακτοβιομηχανία σε συνδυασμό με την πυτιά. Το γεγονός ότι η μαγιά αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανίας ζυθοποιίας, εξασφαλίζει την πολύ οικονομική παραλαβή της και τη μεγάλη αφθονία της σε σχέση με την πυτιά. Επίσης, το εκχύλισμα μαγιάς, ως ενισχυτικό γεύσης, μπορεί εκτός από την πήξη του γάλακτος να πετυχαίνει και τη

βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος. Γι' αυτό και ως συνέχεια της παρούσας έρευνας μπορεί να πραγματοποιηθεί μελέτη της ποιότητας των προϊόντων που προκύπτουν από την πήξη του γάλακτος με ένζυμα εκχυλίσματος μαγιάς. Τέλος, άλλη πρόταση για μελλοντική έρευνα είναι η μελέτη της επίδρασης άλλων μη θερμικών διεργασιών, όπως τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF), στο αιώρημα μαγιάς ώστε να μπορέσει να γίνει σύγκριση των μεθόδων.

STUDY OF THE PROTEOLYTIC ACTIVITY AND MILK CLOTTING CAPACITY OF CRUDE YEAST AUTOLYSATES

One of the major applications of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) products in the food industry is yeast extracts, which are used as flavor enhancers. Yeast extracts can be added to various foods and improve their taste, with typical examples being soups and sauces.

Yeast extracts can be produced by three ways, autolysis, plasmolysis and hydrolysis. Production of yeast extracts by autolysis has several advantages over production by plasmolysis and hydrolysis. Most importantly, it does not require special equipment or the use of solvents whose removal is necessary after the process is completed. Also, products obtained by this process have a low sodium content. A disadvantage of the production of yeast extracts by autolysis is the long processing time (> 20 h) required to produce a satisfactory product for use in the food industry.

In particular, for the preparation of yeast extract by autolysis, the yeast suspension is incubated at a constant temperature, usually at 52°C. Under incubation conditions, hydrolytic enzymes of the yeast cells are activated, which cause cell lysis, thereby releasing various intracellular components into the surrounding fluid. These ingredients are various carbohydrates, nucleic acids and proteins, the presence of which makes yeast extracts good flavor enhancers.

Non-thermal processes are being studied and applied in recent years due to the ability to preserve most of the nutrient and organoleptic characteristics of foods after processing. High hydrostatic pressure, which is a non-thermal food processing method, has been shown to affect the enzymes contained in food products, causing them to be activated or deactivated depending on the processing conditions. Due to the fact that yeast proteolytic enzymes have a major role during autolysis, the effect of the high pressure and temperature at which autolysis is exerted on the activity of these enzymes was investigated in the present study.

In the dairy industry, the main way of producing dairy products is by the use of rennet, which is isolated from the stomach of young ruminant mammals, most commonly calf, and consists mainly of the enzymes chymosin and pepsin. Due to the high demand for cheese and the very limited production of rennet, many studies have been carried out to find rennet substitutes. Nowadays, rennet is being used in combination with other enzymes to satisfy the market needs. Based on the above, the second part of the present study was to investigate the coagulating capacity of proteolytic enzymes in yeast extract and to examine whether they can be used as rennet substitutes or in combination with rennet in cheese making.

In the present study, the effect of high pressure on the total proteolytic activity of yeast enzymes as well as the activity of two specific yeast enzymes, proteinase A and proteinase B, were studied. Pressures from 200 up to 600 MPa and processing times from 0 to 30 min at ambient temperature were used. The proteolytic enzymes of the yeast suspension were activated at pressures of 200 and 400 MPa, and inactivated at pressures of 600 MPa. The maximum increase in total proteolytic activity was 220% and occurred after treatment at 200 MPa for 30 min. For proteinase A, all conditions studied had a negative effect on activity. Specifically, for treatment at 200, 400 and 600 MPa there was a decrease in activity by 31, 44 and 86%, respectively. Proteinase B behaved similar to the total proteolytic enzymes, that is, it was activated by treatment at 200 and 400 MPa while inactivated at 600 MPa. Treatment at 400 MPa for 10 min resulted in a 451% increase in protease B activity.

Subsequently, the pressure treated samples were incubated at 32, 42 and 52°C, in order to study the effect of temperature and incubation time as well as the effect of high pressure treatment on the activity of proteolytic enzymes. It has been found that both incubation time and temperature lead to different enzyme activation and deactivation behaviors. Treatment at 600 MPa did not increase the total proteolytic activity for any of the treatment times and incubation temperatures studied. This was expected since, as mentioned above, treatment at this pressure has caused inactivation of the yeast proteolytic enzymes. Maximum enzyme activity for unprocessed yeast suspension is achieved after 23h of incubation at 32°C and is equal to 114.82 ± 1.19 U/mL, while samples pretreated at 200 MPa for 10 min achieve activity of 112.38 ± 0.81 U/mL after 8 h of incubation, i.e. 15 hours earlier than the untreated sample. At 42°C, the unprocessed sample showed a maximum total proteolytic activity equal to 98.12 ± 0.40 U/mL after 8 h of incubation, whereas the treated samples reached the same activity after only 4 h of incubation.

Also, the maximum total proteolytic activity achieved under the conditions studied was 123.14 ± 3.03 U/mL and was observed after instantaneous treatment at 400 MPa and autolysis at 42°C for 8 h. At 52°C, there was an increase in activity after treatment under certain high-pressure conditions, but overall, the total proteolytic activity at 52°C was much lower than that which was achieved at the other two incubation temperatures. Proteinase A activity was 25.98 ± 0.15 U/mL in untreated yeast suspension. Most pressures and processing times studied either decrease this activity or cause a slight increase but after several hours of incubation. Specifically, the maximum activity of proteinase A achieved is 32.10 ± 1.41 U/mL and is observed after 15 h of incubation at 42°C after treatment at 400 MPa for 2.5 min. The maximum activity of proteinase B obtained without high pressure treatment is 15.67 ± 0.06 U/mL after 23 h of incubation at 32°C, while instant treatment at 200 MPa and incubation at 42°C for 8 h results in an activity of 15.04 ± 0.45 U/mL.

Subsequently, for selected samples, the ability to coagulate milk was studied in temperatures from 40 to 75°C on two milk substrates with different concentrations of calcium chloride (CaCl₂), 10 mM and 20 mM. The substrate with the highest concentration of calcium ions resulted in faster coagulation. Increasing the temperature at which the process was

carried out had a positive effect on coagulation time, exhibiting an optimum temperature of 60°C for the substrate with 10 mM CaCl₂. At temperatures of 65-75°C partial inactivation of the enzymes was observed. Thus, mainly during coagulation of the substrate with a lower concentration of calcium ions, there was an increase in the coagulation time at temperatures above 60°C, whereas coagulation of the substrate with a higher calcium ion concentration was generally faster at higher temperatures, except for some exceptions where rapid inactivation did not allow the substrate to coagulate.

Comparing the prepared yeast extracts with regard to the coagulation time, taking into account the high pressure treatment that each sample had to undergo to achieve the corresponding coagulation time, the best sample from those that were studied for their milk coagulating capacity, is the one that was processed at 400 MPa for 2.5 min and then incubated for 6 h at 42°C. This sample achieved a coagulation time of 2.9 ± 0.2 min at 60°C for the substrate with 20 mM CaCl₂, and was incubated for at least 7 h less than the other samples which resulted in the same coagulation time. The activity of proteinase A, B and the total proteolytic activity for this sample are 20.68 ± 0.85 , 12.71 ± 0.10 and 96.20 ± 1.24 U/mL, respectively.

In conclusion, treatment of the yeast suspension with high pressure may reduce the time required for autolysis and increase the activity of proteolytic enzymes during autolysis, while it may also improve the coagulating ability of the yeast proteolytic enzymes, thereby making their use in dairy industry, in combination with rennet, a possibility. The fact that yeast is a by-product of the brewing industry ensures its very economical reception and its abundance in relation to rennet. Also, since yeast extract is a flavor enhancer, it can improve the sensory characteristics of the final product. Therefore, as a follow-up to the present study, a study of the quality of milk-derived products produced by yeast extract enzymes can be carried out. Finally, another suggestion for future research is to study the effect of other non-thermal processes, such as pulse electric fields (PEF), on the yeast suspension so that the methods can be compared.

Περιεχόμενα

1. Η ΜΑΓΙΑ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	2
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.2. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	3
1.3. ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	4
1.4. ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ	5
1.4.1. Κύκλος ζωής του κυττάρου	5
1.4.2. Δομή του κυττάρου	7
1.4.2.1. Πλασματική μεμβράνη	7
1.4.2.2. Κυτταρικό τοίχωμα.....	8
1.4.2.3. Πυρήνας	8
1.4.2.4. Μιτοχόνδρια.....	9
1.4.2.5. Κενοτόπιο	9
1.4.2.6. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα του κενοτοπίου της μαγιάς.....	10
1.5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	11
1.5.1. Ζυθοποιία	11
1.5.2. Αρτοποιία	12
1.5.3. Εκχυλίσματα μαγιάς.....	14
1.5.3.1. Η διαδικασία της αυτόλυσης	14
1.5.3.2. Η διαδικασία της πλασμόλυσης.....	15
1.5.3.3. Η διαδικασία της υδρόλυσης.....	15
2. ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ	18
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	18
2.2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ	20
2.2.1 Εφαρμογές στα τρόφιμα	20
2.2.2. Άλλες εφαρμογές	22
2.3. ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΤΟΥ ΚΕΝΟΤΟΠΙΟΥ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ	22
2.3.1. Πρωτεΐνάση Α.....	23
2.3.2. Πρωτεΐνάση Β.....	24
2.3.3. Καρβοξυπεπτιδάση Υ	24
2.4. ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΑΥΤΟΛΥΣΗΣ.....	24
2.5. ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΠΗΞΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ (MILK CLOTTING ENZYMES)	26

2.5.1. Δομή και σύσταση του γάλακτος.....	26
2.5.2. Πήξη γάλακτος.....	28
2.5.3. Πυτιά.....	29
2.5.4. Πρωτεολυτικά ένζυμα μικροβιακής προέλευσης.....	29
2.5.5. Πρωτεολυτικά ένζυμα φυτικής προέλευσης.....	30
3. Η ΥΠΕΡΥΨΗΛΗ ΠΙΕΣΗ.....	32
3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	32
3.2. ΜΗ ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	32
3.3. ΥΠΕΡΥΨΗΛΗ ΠΙΕΣΗ.....	33
3.3.1. Ιστορικά στοιχεία.....	33
3.3.2. Αρχές της μεθόδου και εξοπλισμός.....	35
3.4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΜΕ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗ ΠΙΕΣΗ.....	36
3.4.1. Επίδραση της υπερυψηλής πίεσης σε μικροοργανισμούς.....	37
3.4.2. Επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στα ένζυμα.....	37
3.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΥΤΟΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ.....	39
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	42
4.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΜΑΓΙΑΣ 15% w/w.....	42
4.3. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΜΑΓΙΑΣ 15% w/w.....	42
4.4. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗ ΠΙΕΣΗ.....	43
4.5. ΕΠΩΑΣΗ.....	45
4.6. ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΖΟΚΑΖΕΪΝΗΣ.....	46
4.6.1. Παρασκευή υποστρώματος αζοκαζεΐνης 1% w/v.....	46
4.6.2. Μεθοδολογία.....	46
4.7. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗΣ Β ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ ΜΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΖΟΖΕΛΑΤΙΝΗΣ.....	47
4.7.1. Παρασκευή διαλύματος αζοζελατίνης 2.4% w/v.....	47
4.7.2. Μεθοδολογία.....	48
4.8. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗΣ Α ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ ΜΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΕΤΟΥΣΙΩΜΕΝΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ.....	49
4.8.1. Παρασκευή διαλύματος μετουσιωμένης αιμοσφαιρίνης 1% w/v.....	49
4.8.2. Μεθοδολογία.....	49
4.9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΗΞΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BERRIDGE.....	50

4.9.1. Παρασκευή υποστρώματος γάλακτος	50
4.9.2. Μέτρηση του χρόνου πήξης.....	51
4.10. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ	52
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ	54
5.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΟΥ ΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΜΑΓΙΑΣ	54
5.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΥΤΟΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΟΥ ΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΜΑΓΙΑΣ	56
5.2.1 Επίδραση στην ολική πρωτεολυτική ενεργότητα	57
5.2.2 Επίδραση στην ενεργότητα της πρωτεΐνης Α	62
5.2.3 Επίδραση στην ενεργότητα της πρωτεΐνης Β	66
5.3 ΠΗΞΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΑΓΙΑΣ	70
5.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	79
5.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΗΞΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ	80
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	84
6.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ	84
6.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΥΤΟΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ..	84
6.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΥΤΟΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ	85
6.4. ΠΗΞΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΑΓΙΑΣ	86
6.5. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	90



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΜΑΓΙΑ (*Saccharomyces cerevisiae*)

1. Η ΜΑΓΙΑ (*Saccharomyces cerevisiae*)

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μαγιά είναι ένας μονοκύτταρος ζυμομύκητας που διαφοροποιείται από τα περισσότερα είδη μυκήτων χάρη στην ιδιότητά της να αφομοιώνει σάκχαρα με ταυτόχρονη παραγωγή αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα, μια ιδιότητα γνωστή ως ζύμωση. Ο όρος “μαγιά” πολύ συχνά χρησιμοποιείται για την περιγραφή του *Saccharomyces cerevisiae*, που στην πραγματικότητα αποτελεί ένα είδος μαγιάς, ενώ συνολικά έχουν περιγραφεί πάνω από 700 είδη μαγιάς που συναντώνται στο περιβάλλον (Walker, 1998). Η σύγχυση των παραπάνω όρων δεν είναι αδικαιολόγητη, καθώς ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* αποτελεί ίσως το σημαντικότερο είδος μαγιάς λόγω των πολυάριθμων εφαρμογών του τόσο στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών, όσο και στη βιοτεχνολογία, γι’ αυτό κι επισημαίνεται ότι παρακάτω, με τον όρο μαγιά θα εννοείται το είδος *S. cerevisiae* εκτός αν δηλώνεται ρητά το αντίθετο.

Ο *S. cerevisiae* έχει χαρακτηριστεί ως ασκομύκητας τουλάχιστον έναν αιώνα τώρα και μέχρι τότε θεωρούταν ότι όλα τα είδη μαγιάς είναι ασκομύκητες. Πολύ αργότερα (Banno, 1967), αποδείχθηκε ότι κάποιες ζύμες ανήκουν στην κατηγορία των βασιδιομυκήτων (Kurtzman, 1994).



Εικόνα 1: Κύτταρα μαγιάς (*S. cerevisiae*) σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης

1.2. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Από την αρχαιότητα, προϊόντα ζύμωσης, όπως διάφορα τρόφιμα και ροφήματα, έχουν συμβάλει στην ανάπτυξη και διατήρηση των ανθρώπινων κοινωνιών. Κομβικό σημείο μπορεί να θεωρηθεί η εξημέρωση του *S. cerevisiae* στην ανθρώπινη ιστορία. Αρχαιολόγοι έχουν βρει αποδείξεις για την παραγωγή προϊόντων ζύμωσης σε χώρες όπως η Αίγυπτος, η Κίνα και το Ιράν από τη Νεολιθική εποχή (8,500-4,000 π.Χ.) (Johnson & Echavarri-Erasun, 2011). Έχουν βρεθεί, ακόμη, συνταγές μπίρας και κρασιού σε πέτρινες Βαβυλωνιακές πλάκες 6,000 χρόνων. Θεωρείται ότι οι γνώσεις αυτών των λαών για τη ζύμωση διαδόθηκαν αρχικά στη Μεσοποταμία κι έπειτα, μέσω της Μεσόγειου θάλασσας, στον υπόλοιπο κόσμο. Παραδείγματος χάριν, οι αμπελοκαλλιέργειες και η μέθοδος παραγωγής κρασιού διαδόθηκαν από τη Μεσόγειο θάλασσα στην Ελλάδα (2,000 π.Χ.) και την Ιταλία (1,000 π.Χ.), φτάνοντας τελικά τη βόρεια Ευρώπη (100 μ.Χ.) και πολύ αργότερα την Αμερική (1500 μ.Χ.) (Legras et al., 2007). Άλλα προϊόντα ζύμωσης που προέρχονται από τη Νεολιθική εποχή περιλαμβάνουν την Αφρικανική μπίρα από σόργο, το παραδοσιακό μεξικάνικο αλκοολούχο ποτό *ruique*, καθώς και αρκετά ζυμωμένα φαγητά και ποτά από σόγια, ρύζι και λαχανικά σε διάφορες περιοχές.



Εικόνα 2: Παρασκευή μπίρας στην αρχαία Αίγυπτο

Σύμφωνα με ιστορικά στοιχεία, η δυνατότητα παραγωγής τροφίμων και ποτών από δημητριακά και άλλες πρώτες ύλες με ζύμωση, υπήρξε κίνητρο για την εγκατάσταση των ανθρώπων σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές και την ενασχόλησή τους με τη γεωργία. Με αυτόν τον τρόπο μπόρεσε να εξασφαλιστεί η παραγωγή της αναγκαίας ποσότητας τροφίμων για την επιβίωση του σχηματιζόμενου οικισμού, πράγμα που δεν ίσχυε για τον νομαδικό τρόπο ζωής.

Οι πρακτικές για την πιο αποδοτική ζύμωση τροφίμων και αλκοολούχων ποτών υφίστανται μια συνεχή βελτίωση για χιλιάδες χρόνια, καθώς οι γνώσεις μεταφέρονται από γενιά σε γενιά, χωρίς όμως να είναι γνωστές οι επιστημονικές αρχές πίσω από τη διεργασία. Η επιστημονική και τεχνολογική κατανόηση της ζύμωσης ξεκίνησε με την έρευνα του επιστήμονα Louis Pasteur (1822-1895), ο οποίος μελέτησε τη ζύμωση στο κρασί και τη μύρα. Το 1864 διαπιστώθηκε ότι η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται από μια ουσία που περιέχει άζωτο και έχει την ιδιότητα να μετατρέπει τα σάκχαρα σε αλκοόλ ενώ το 1866, ο Louis Pasteur ανέφερε ότι μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για τη ζύμωση και συνεπώς η προαναφερθείσα ουσία που μετατρέπει τα σάκχαρα σε αλκοόλ παράγεται από μικροοργανισμούς. Αυτό οδήγησε στην ανακάλυψη των ενζύμων, η ονομασία των οποίων προέκυψε από την εύρεσή τους “μέσα στις ζύμες”. Από τον Pasteur, επίσης, πρωτοαναφέρθηκε η ιδέα των ασηπτικών συνθηκών και των αγνών καλλιιεργειών κι έγινε η διάκριση μεταξύ της αναερόβιας ζύμωσης και της αερόβιας ανάπτυξης (Johnson & Echavarrri-Erasun, 2011).

Το 1996 προσδιορίστηκε πλήρως η αλληλουχία βάσεων DNA του *S. cerevisiae*, καθιστώντας τον μικροοργανισμό μοντέλο για τη μελέτη θεμελιωδών βιολογικών διεργασιών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Πρέπει, βέβαια, να τονιστεί ότι παρόλο που πολλά βιοχημικά και γενετικά χαρακτηριστικά του ζυμομύκητα συναντώνται και σε κύτταρα ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών, το ίδιο δεν ισχύει για κάποια κυτταρολογικά και αναπτυξιακά του χαρακτηριστικά (π.χ. ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση, ύπαρξη κυτταρικού τοιχώματος). Το γονιδίωμα του *S. cerevisiae* είναι μέχρι και σήμερα το πιο εκτενώς χαρακτηρισμένο κι έχει συμβάλει στην ανάπτυξη της μοντέρνας βιοτεχνολογίας (Walker, 1998; Johnson & Echavarrri-Erasun, 2011; Saranraj *et al.*, 2017).

1.3. ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η ταξινόμηση των διάφορων μορφών ζωής περιλαμβάνει τους όρους κατηγοριοποίηση, ταυτοποίηση και ονοματολογία. Η κατηγοριοποίηση αποτελεί την ομαδοποίηση των μορφών ζωής με βάση τις σχέσεις μεταξύ τους. Με μια σωστή

κατηγοριοποίηση των ήδη γνωστών μορφών ζωής μπορεί να επιτευχθεί η ταυτοποίηση άγνωστων ειδών με σύγκριση των χαρακτηριστικών τους με τα χαρακτηριστικά των γνωστών και κατηγοριοποιημένων ειδών. Η ονοματολογία αποτελεί την ονομασία των ταξινομικών ομάδων οργανισμών.

Το 1680, ο van Leeuwenhoek περιέγραψε για πρώτη φορά τη μαγιά στη μύρα, όμως στα χρόνια που ακολούθησαν δεν παρουσιάστηκαν πολλές περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με τη μαγιά, κυρίως λόγω της έλλειψης μικροσκοπίων καλής ποιότητας και απουσίας ενός οργανωμένου συστήματος ονοματολογίας των μορφών ζωής. Αυτό άλλαξε το 1735 με το σχηματισμό του πρώτου αναγνωρισμένου συστήματος ομαδοποίησης και ονοματολογίας φυτών και ζώων από τον Σουηδό βοτανολόγο Κάρολο Λινναίο (Carl von Linné, 1707-1778). Αυτό είναι το σύστημα διωνυμικής ονοματολογίας που χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα, σύμφωνα με το οποίο περιγράφεται στα λατινικά το γένος του οργανισμού με την πρώτη λέξη και το είδος του με τη δεύτερη.

Η ταξινόμηση των ζυμών άρχισε με την ανάθεση του ονόματος *Saccharomyces*, από τις λέξεις “σάκχαρο” και “μύκητας”, στη μαγιά από τον Meyer το 1837 και συνεχίστηκε μισό αιώνα αργότερα από την έρευνα του Emil Christian Hansen. Ο Hansen, στα εργαστήρια του Carlsberg, απομόνωσε και στη συνέχεια κατηγοριοποίησε διαφορετικές καλλιέργειες μαγιάς με βάση τα χαρακτηριστικά αφομοίωσης και ζύμωσης σακχάρων, την κυτταρική και ασκοσποριακή μορφολογία και την αντοχή σε διάφορες θερμοκρασίες. Από αυτή την έρευνα ανακαλύφθηκαν διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους, γεγονός που αποκάλυψε ότι ο ως τότε τρόπος κατηγοριοποίησης δεν ήταν κατάλληλος για τη διάκριση των διαφορετικών υποειδών. Αυτό οδήγησε στην αύξηση των εξεταζόμενων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών κατά την κατηγοριοποίηση έτσι ώστε να επιτευχθεί η διάκριση των διαφορετικών στελεχών ενός είδους.

Το σύστημα ταξινόμησης ζυμών που χρησιμοποιείται σήμερα δημοσιεύτηκε το 1984 από τον Kreger-van Rij και περιέχει 60 γένη και 500 είδη (Reed & Nagodawithana, 1990).

1.4. ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ

1.4.1. Κύκλος ζωής του κυττάρου

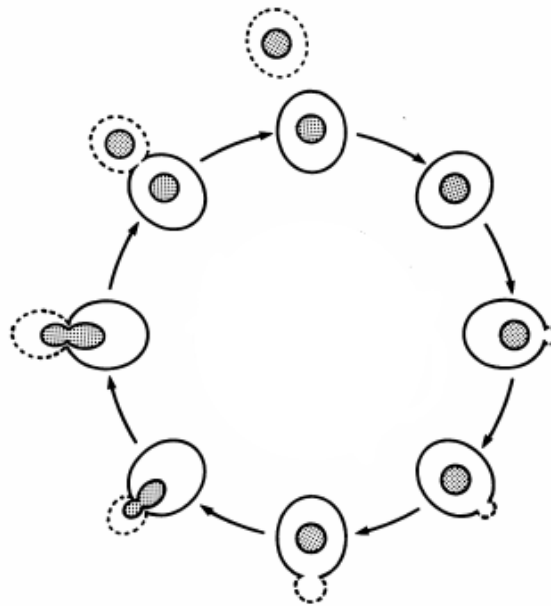
Οι μελέτες του Winge στο εργαστήριο του Carlsberg το 1935 στον ζυμομύκητα *Saccharomyces ellipsoideus* οδήγησαν στην ανακάλυψη της απλοειδούς και της διπλοειδούς φάσης του κύκλου ζωής της μαγιάς. Στην απλοειδή φάση το κύτταρο περιέχει ένα σετ χρωμοσωμάτων ενώ στη διπλοειδή περιέχει δύο σετ και μπορεί να αλλάζει από την

απλοειδή στη διπλοειδή φάση και αντιστρόφως. Δύο απλοειδή κύτταρα μπορούν να συντηχθούν και να προκύψει ένα διπλοειδές, ενώ ένα διπλοειδές μπορεί, με τη διαδικασία της μείωσης, να χωριστεί σε απλοειδή.

Παρουσία θρεπτικών συστατικών, τα κύτταρα της μαγιάς πολλαπλασιάζονται με μια διαδικασία γνωστή ως εκβλάστηση (budding), με χρόνο διπλασιασμού περίπου 100 min. Με αυτή τη διαδικασία, ο πυρήνας υφίσταται μιτωτική διαίρεση, κατά την οποία τα 17 χρωμοσώματα του απλοειδούς κυττάρου αντιγράφονται και τελικά προκύπτουν δύο νέα κύτταρα, το καθένα με ένα από τα αντίγραφα των χρωμοσωμάτων. Ο πολλαπλασιασμός με εκβλάστηση γίνεται με τη δημιουργία του θυγατρικού κυττάρου, το οποίο ονομάζεται εκβλάστημα (bud), πάνω στην επιφάνεια του μητρικού. Μόλις μεγαλώσει αρκετά το εκβλάστημα, γίνεται η αντιγραφή των χρωμοσωμάτων και το ένα αντίγραφο περνάει σε αυτό, το οποίο έπειτα αποκολλάται από το μητρικό κύτταρο. Έτσι, τελικά με την εκβλάστηση προκύπτει ένα θυγατρικό κύτταρο με εντελώς καινούργιο κυτταρικό υλικό να περιβάλλει τον πυρήνα του κι ένα δεύτερο που αποτελείται από το κυτταρικό υλικό του μητρικού. Μια αναπαράσταση του κυτταρικού κύκλου του *S. cerevisiae* φαίνεται στην Εικόνα 4 (Herskowitz, 1988; Reed & Nagodawithana, 1990).



Εικόνα 3: Κύτταρο *S. cerevisiae* με εκβλάστημα και τρεις ουλές από προηγούμενα εκβλαστήματα (η εικόνα έχει προκύψει από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης κι έχει εκτυπωθεί σε μορφή αφίσας προς πώληση ως διακοσμητικό από τον J. Forsdyke)



Εικόνα 4: Κυτταρικός κύκλος του *S. cerevisiae* (Herskowitz,1988)

1.4.2. Δομή του κυττάρου

Τα κύτταρα των ζυμομυκήτων παρουσιάζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στο μέγεθος, σχήμα και χρώμα. Ακόμη και κύτταρα του ίδιου στελέχους μπορούν να εμφανίζουν μορφολογική και χρωματική ετερογένεια. Η ποικιλομορφία στο μέγεθος είναι ιδιαίτερα έντονη με κάποιες ζύμες να έχουν μήκος 2-3 μm ενώ άλλες μπορεί να φτάνουν τα 20-50 μm . Το πάχος είναι λιγότερο μεταβλητό, συνήθως μεταξύ 1-10 μm . Χρώματα που συναντώνται σε διαφορετικές ζύμες είναι μπεζ, λευκό, μαύρο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο και ροζ.

Τα κύτταρα του *S. cerevisiae* έχουν συνήθως ελλειψοειδές σχήμα, με μεγάλη διάμετρο 5-10 μm και μικρή διάμετρο 1-7 μm . Το χρώμα του είναι μπεζ και ο μέσος όγκος κυττάρου είναι 29 μm^3 για απλοειδή και 55 μm^3 για διπλοειδή κύτταρα (Walker, 1998).

1.4.2.1. Πλασματική μεμβράνη

Η πλασματική μεμβράνη είναι μια διπλοστιβάδα που περιλαμβάνει κυρίως φωσφολιπίδια και στερόλες καθώς και κάποιες διάσπαρτες σφαιρικές πρωτεΐνες. Ο ρόλος της είναι να απαγορεύει την είσοδο υδρόφιλων μορίων στο εσωτερικό του κυττάρου με συνέπεια να αποτρέπει την ανάμειξη των περιεχομένων της με το εξωκυτταρικό περιβάλλον. Αυτό δε σημαίνει ότι η πλασματική μεμβράνη είναι εντελώς αδιαπέρατη. Με τη χρήση ειδικών μεμβρανικών πρωτεϊνών, ελέγχεται η μεταφορά μορίων από και προς το κύτταρο, δίνοντας έτσι την δυνατότητα πρόσληψης διαφόρων θρεπτικών συστατικών από το κύτταρο. Άλλη μια αρκετά σημαντική λειτουργία της είναι η αναγνώριση εξωτερικών ερεθισμάτων και μεταγωγή του σήματος σε κατάλληλους αποδέκτες στο κύτταρο, ώστε να πραγματοποιηθούν οι απαραίτητες βιοχημικές αντιδράσεις ως αντίδραση στο αρχικό ερέθισμα. Τέλος, η αναλογία στερολών/λιπαρών οξέων στην πλασματική μεμβράνη επηρεάζει άμεσα την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης αλλά και την ανθεκτικότητα του κυττάρου σε αυτή. Επειδή όμως η διαθεσιμότητα οξυγόνου κατά τη ζύμωση επηρεάζει αυτή την αναλογία, είναι απαραίτητη η σωστή οξυγόνωση κατά την ανάπτυξη στελεχών μαγιάς για εμπορική χρήση, ιδιαίτερα στη ζυθοποιία, για να επιτευχθεί η ανοχή τους στην τοξικότητα της αιθανόλης και συνεπώς να αυξηθεί η απόδοσή τους κατά την αναερόβια ζύμωση (Rose, 1993; Walker, 1998).

1.4.2.2. Κυτταρικό τοίχωμα

Το κυτταρικό τοίχωμα είναι χαρακτηριστικό όλων των ειδών μαγιάς και αποτελεί ένα παχύ εξωτερικό στρώμα που περιέχει περίπου το 15-25% της συνολικής ξηρής μάζας του κυττάρου. Αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από πολυσακχαρίτες (80-90%), κυρίως από γλυκάνες και μαννάνες και σε μικρότερη αναλογία από χιτίνη. Άλλα συστατικά που συναντώνται σε μικρότερα ποσοστά στο κυτταρικό τοίχωμα είναι διάφορες πρωτεΐνες, λιπίδια και ανόργανα φωσφορικά άλατα. Οι αναλογίες όλων των παραπάνω συστατικών διαφέρουν ανάλογα με το στέλεχος και τις συνθήκες ανάπτυξης.

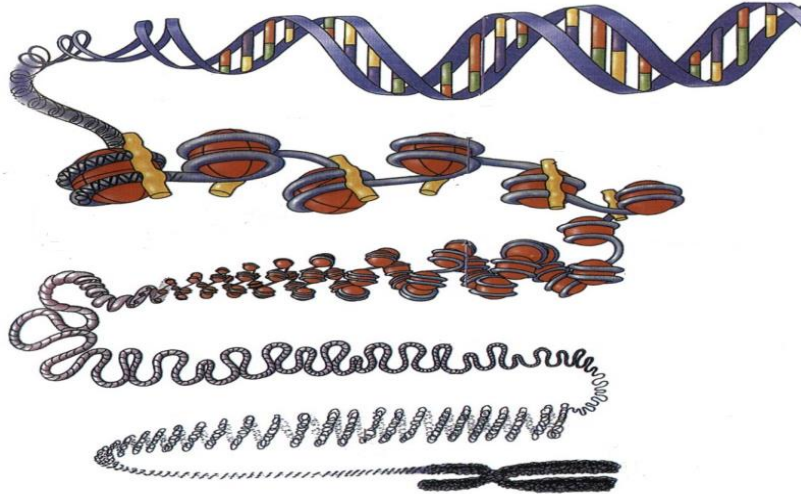
Το κυτταρικό τοίχωμα είναι δομημένο σε στρώματα, το εξωτερικό των οποίων αποτελείται από μαννοπρωτεΐνες συνδεδεμένες με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις ή με δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι μαννοπρωτεΐνες αυτές καθορίζουν το πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος, καθώς ο τρόπος σύνδεσής τους δημιουργεί κενά στα οποία δε χωρούν μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 600 Da. Το επόμενο στρώμα αποτελείται από γλυκάνες που συνδέονται με τις εξωτερικές μαννοπρωτεΐνες με ομοιοπολικούς δεσμούς και κάποιες από αυτές συνδέονται σταυρωτά με μόρια χιτίνης (Brown *et al.*, 1993).

Κάποιες από τις κυριότερες λειτουργίες του κυτταρικού τοιχώματος είναι η προστασία του κυττάρου, η διατήρηση του σχήματός του, η δυνατότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ κυττάρων, η πρόσληψη και απομάκρυνση ουσιών καθώς και η διατήρηση της ωσμωτικής σταθερότητας του κυττάρου (Fleet, 1991).

1.4.2.3. Πυρήνας

Ο πυρήνας ενός κυττάρου μαγιάς είναι σφαιρικός, με ακτίνα περίπου 1.5 μm. Η διπλή μεμβράνη που διαχωρίζει το περιεχόμενό του από το κυτταρόπλασμα έχει πόρους με ανοίγματα 50-100 nm, ο αριθμός των οποίων εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης του κυττάρου και τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται. Επίσης, σε αντίθεση με τους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η πυρηνική μεμβράνη του κυττάρου μαγιάς δε διασπάται κατά τη διάρκεια της μίτωσης.

Το υγρό που περικλείεται από την πυρηνική μεμβράνη ονομάζεται πυρηνόπλασμα και περιέχει DNA, RNA και κάποιες πρωτεΐνες όπως πρωταμίνας και ιστόνες. Το δίκλωνο πυρηνικό DNA είναι τυλιγμένο γύρω από συμπλέγματα ιστονών, σχηματίζοντας σωματίδια γνωστά και ως νουκλεοσώματα, τα οποία αναδιπλώνονται περαιτέρω, σχηματίζοντας ινίδια χρωματίνης, τα οποία με τη σειρά τους οργανώνονται σε δομές που ονομάζονται χρωμοσώματα. Μια αναπαράσταση της αναδίπλωσης του DNA φαίνεται παρακάτω στην Εικόνα 5 (Walker, 1998).



Εικόνα 5: Αναδίπλωση του DNA προς σχηματισμό χρωμοσωμάτων

1.4.2.4. Μιτοχόνδρια

Τα κύτταρα μαγιάς έχουν μιτοχόνδρια με παρόμοια δομή με αυτά υψηλότερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Περιβάλλονται από μια εξωτερική μεμβράνη που περιέχει ένζυμα σχετιζόμενα με το μεταβολισμό λιπιδίων. Στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου υπάρχει μια δεύτερη μεμβράνη, γνωστή και ως εσωτερική μεμβράνη, η οποία περιέχει κυτοχρώματα και άλλα συστήματα ενζύμων που συμβάλλουν στην αναπνευστική αλυσίδα και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Ο χώρος μεταξύ των δύο μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικό διάστημα και αποτελείται από ένα υγρό που επιτρέπει την επικοινωνία τους. Το εσωτερικό της εσωτερικής μεμβράνης καλείται μήτρα και περιέχει ένζυμα που χρησιμεύουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος και στην οξείδωση λιπαρών οξέων, καθώς και μιτοχονδριακό DNA και ριβοσώματα (Guérin, 1991).

1.4.2.5. Κενοτόπιο

Τα κενοτόπια είναι ενδοκυτταρικά κυστίδια τα οποία οριοθετούνται από μια κυταροπλασματική μεμβράνη, η οποία ονομάζεται τονοπλάστης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα κενοτοπίων είναι τα πεπτικά κενοτόπια και τα χυμοτόπια. Τα πρώτα σχηματίζονται στα ζωικά κύτταρα όταν εισέλθουν σε αυτά μικροοργανισμοί ή άλλα σωματίδια που πρέπει να χρησιμοποιηθούν ή να καταστραφούν, ενώ τα δεύτερα συναντώνται στα φυτικά κύτταρα και χρησιμεύουν ως αποθήκες θρεπτικών ουσιών οι οποίες καταλαμβάνουν μεγάλο μέρος των κυττάρων.

Συγκεκριμένα στις ζύμες, το κενοτόπιο καταλαμβάνει περίπου το 20% του όγκου του κυττάρου και έχει ελαφρώς όξινο pH, με τιμή περίπου 6.2. Λειτουργικά είναι παρόμοιο με τα χυμοτόπια των φυτικών κυττάρων και τα λυσοσώματα ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Σημαντικότερες λειτουργίες του είναι η υδρόλυση μακρομορίων, η αποθήκευση θρεπτικών συστατικών, η πρωτεϊνική ομοιόσταση και η κυτταρική αποτοξίνωση, για την πραγματοποίηση των οποίων χρησιμοποιεί διάφορες πρωτεάσες, νουκλεάσες, λιπάσες και μεταγραφάσες (Broach *et al.*, 1991). Οι πρωτεΐνες αυτές παράγονται σε πολυσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου και μεταφέρονται στο κενοτόπιο, ακολουθώντας ένα τμήμα του εκκριτικού μονοπατιού. Συγκεκριμένα, μετά την παραγωγή τους στα πολυσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στο σύμπλεγμα Golgi με τη βοήθεια των κυστιδίων COPII. Εκεί τροποποιούνται οι υδρογονανθρακικές πλευρικές αλυσίδες των πρωτεϊνών (Hecht, 2014). Η μεταφορά τους από το σύμπλεγμα Golgi στο κενοτόπιο γίνεται είτε άμεσα με το συγκρότημα πρωτεϊνών προσαρμογών AP-3, είτε έμμεσα μέσω πολυκυστιδιακών σωματιδίων (Bowers, 2005).

1.4.2.6. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα του κενοτοπίου της μαγιάς

Περίπου 200 από τα 6000 γονίδια του *S. cerevisiae* κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο κενοτόπιο. Το 27% αυτών των πρωτεϊνών έχουν μεταφορικό ρόλο ενώ οι υπόλοιπες έχουν λειτουργίες που σχετίζονται με την υδρόλυση μακρομορίων, τη σύντηξη μεμβρανών και την οξίνιση. Κάποιες από αυτές, όπως η καρβοξυπεπτιδάση Y, προέρχονται από πρόδρομα μόρια που περιέχουν αλληλουχίες ανίχνευσης και προπεπτίδια. Στη διαδρομή προς το κενοτόπιο, οι αλληλουχίες αυτές αποκόπτονται και το υπόλοιπο μόριο μπορεί επιπλέον να υποστεί γλυκοζυλίωση, για να αποκτήσει την τελική, λειτουργική δομή του. Το κενοτόπιο φιλοξενεί διάφορα πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεάσες) που συμβάλλουν στην υδρόλυση πρωτεϊνών, που θεωρείται μια από τις βασικότερες λειτουργίες του (Hecht, 2014).

Οι πρωτεάσες του κενοτοπίου παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του κυττάρου υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών διότι μπορούν να πρωτεολύσουν ως και το 85% των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών σε αμινοξέα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θρεπτικά συστατικά ή για την κατασκευή άλλων πρωτεϊνών που απαιτούνται στις συνθήκες αυτές (Teichert *et al.*, 1989). Ακόμη και υπό φυσιολογικές συνθήκες όμως, οι πρωτεάσες αυτές συμβάλλουν στη σωστή λειτουργία του κυττάρου. Πρωτεΐνες που έχουν υποστεί ζημιά και δε λειτουργούν σωστά ή δε χρειάζονται πλέον μεταφέρονται με ενδοκυττάρωση στο κενοτόπιο για να αποσυντεθούν από τις πρωτεάσες του. Με παρόμοιο τρόπο μπορούν να αποσυντεθούν μικρά οργανίδια του κυττάρου, τα οποία μεταφέρονται στο κενοτόπιο μέσω ενός κυστιδίου που ονομάζεται αυτοφαγόσωμα.

Το κυστίδιο αυτό προσκολλάται στο κενοτόπιο και απελευθερώνει σε αυτό το περιεχόμενό του, για να αποσυντεθεί και να ανακυκλωθούν τα επιμέρους συστατικά (Hecht, 2014).

1.5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

1.5.1. Ζυθοποιία

Η ζυθοποιία είναι μια απ' τις παλιότερες τέχνες που γνωρίζει ο άνθρωπος. Υπάρχουν αναφορές σε αρχαία έγγραφα και Αιγύπτιους τάφους για την παρασκευή μύρας ως και 5000 χρόνια πριν, καθώς κι έχουν βρεθεί ποσότητες βύνης κριθαριού χιλιάδων χρόνων που έχουν διατηρηθεί μέσα σε Αιγύπτιους τάφους. Αργότερα, στην αρχαία Κίνα παρασκευαζόταν μύρα από ρύζι, ενώ υπάρχουν αναφορές για άλλα ροφήματα από βύνη στην Ινδία.

Αρχικά, η ζυθοποιία ήταν οικιακή υπόθεση και γι' αυτό οι μύρες παρασκευάζονταν κυρίως από γυναίκες. Αυτό άρχισε να αλλάζει από τον 9^ο αιώνα μ.Χ. καθώς κάποια μοναστήρια ξεκίνησαν να ασχολούνται με τη ζυθοποιία. Μέσα στους επόμενους δύο αιώνες, η μεγάλη ανάπτυξη του κλάδου οδήγησε στην έξοδο της μύρας από το σπίτι και στην είσοδό της στη βιομηχανία. Από τον 14^ο μέχρι τον 16^ο αιώνα μ.Χ. η βιομηχανία ζυθοποιίας άνθισε στη Γερμανία, με κυριότερο προϊόν την μύρα τύπου lager. Παράλληλα στην Αγγλία είχε επικρατήσει η μύρα τύπου ale. Τον 16^ο αιώνα η μύρα τύπου ale εισάγεται στην Αμερική ενώ αργότερα, τον 18^ο αιώνα, οι Γερμανοί μετανάστες φέρνουν στην Αμερική τη μύρα τύπου lager, η οποία με τον καιρό αντικατέστησε τις περισσότερες αγγλικές μύρες και παρέμεινε η δημοφιλέστερη μύρα στην Αμερική.



Εικόνα 7: Μύρα τύπου lager



Εικόνα 6: Μύρα τύπου ale

Παρόλο που η λέξη 'μπύρα' χρησιμοποιείται για να περιγράψει το ρόφημα που παρασκευάζεται στις μέρες μας από ζυθοποιίες σε όλο τον κόσμο καθώς και το ρόφημα που παρασκευαζόταν από αρχαίους πολιτισμούς χιλιάδες χρόνια πριν, είναι προφανές πως τα δύο αυτά ροφήματα είναι πολύ διαφορετικά μεταξύ τους. Η σημερινή μπύρα είναι προϊόν χιλιάδων χρόνων ανάπτυξης και βελτίωσης, στην οποία έχει συμβάλει και η γνώση των αντιδράσεων και των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την παρασκευή της. Συνοπτικά, τα στάδια που ακολουθούνται σήμερα για την παρασκευή της μπύρας είναι τα εξής: 1) βυνοποίηση του κριθαριού, 2) άλεση της βύνης κριθαριού, 3) ανάμειξη του αλέσματος με ζεστό νερό για να διασπαστεί το άμυλο σε ζυμώσιμα σάκχαρα, 4) βρασμός με προσθήκη λυκίσκου, ο οποίος προσδίδει την πικρή γεύση και το ιδιαίτερο άρωμα στο τελικό προϊόν, 5) ζύμωση, κατά την οποία τα σάκχαρα μετατρέπονται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, 6) ωρίμανση, 7) φιλτράρισμα και 8) συσκευασία και εμφιάλωση.

Ο ρόλος της μαγιάς στη ζυθοποιία είναι πολύ σημαντικός, καθώς τα κύτταρα του ζυμομύκητα καταναλώνουν τα σάκχαρα που περιέχονται στο υγρό σύστημα αλεσμένης βύνης-νερού και παράγουν αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Με τη ζύμωση, δηλαδή, προσδίδονται στη μπύρα δύο από τα πιο βασικά χαρακτηριστικά της, το αλκοόλ και το ανθρακικό. Εκτός από αυτά όμως, τα κύτταρα τις μαγιάς παράγουν και κάποιες άλλες ουσίες σε πολύ μικρές ποσότητες, οι οποίες όμως συνεισφέρουν στη χαρακτηριστική γεύση της μπύρας.

Τα δύο πιο χαρακτηριστικά στελέχη του γένους *Saccharomyces* που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία είναι ο *S. cerevisiae* και ο *S. uvarum* (παλαιότερα γνωστός ως *S. carlsbergensis*). Τα στελέχη αυτά ανήκουν πλέον στο ίδιο στέλεχος με βάση τη μελέτη του Kregen-van Rij με τίτλο "The Yeasts: A Taxonomic Study" (1984), αλλά στη ζυθοποιία θεωρούνται ακόμα ξεχωριστά στελέχη λόγω της διαφορετικής δράσης τους. Ο *S. uvarum* χρησιμοποιείται για την παραγωγή μπύρας τύπου lager και η ζύμωση που πραγματοποιείται με τη χρήση αυτού του στελέχους ονομάζεται ζύμωση πυθμένα, κατά την οποία η μαγιά παραμένει διεσπαρμένη στον κύριο όγκο του υγρού για το μεγαλύτερο μέρος της ζύμωσης και προς το τέλος αρχίζει να σχηματίζει ίζημα στον πυθμένα του δοχείου. Για τις μπύρες τύπου ale χρησιμοποιείται ο *S. cerevisiae* και η ζύμωση που πραγματοποιείται ονομάζεται ζύμωση κορυφής, διότι η μαγιά σχηματίζει μια παχιά αφρώδη στρώση στην κορυφή του υγρού (Reed & Nagodawithana, 1990)

1.5.2. Αρτοποιία

Όπως και στην περίπτωση της ζυθοποιίας, έτσι και στην αρτοποιία φαίνεται ότι η χρήση της μαγιάς είχε ξεκινήσει από την αρχαία Αίγυπτο. Πολύ συχνά στην αρτοποιία χρησιμοποιούταν μαγιά που είχε απομονωθεί από τα παραπροϊόντα ζυθοποιίας λόγω της

μεγάλης διαθεσιμότητάς της. Συγκεκριμένα είχε διαπιστωθεί ότι η μαγιά που χρησιμοποιούταν για την παραγωγή μπίρας τύπου ale ήταν ικανή να δράσει και στη ζύμη, σε αντίθεση με τη μαγιά που χρησιμοποιούταν για τη μπίρα τύπου lager. Με την πάροδο των χρόνων έγινε κατανοητό ότι η μαγιά ζυθοποιίας δεν έχει αρκετά υψηλή απόδοση στην αρτοποιία. Όπως είναι προφανές, οι συνθήκες ανάπτυξης της μαγιάς ζυθοποιίας είναι αυτές που βελτιστοποιούν τη δράση της στην παρασκευή μπίρας και όχι προϊόντων αρτοποιίας. Έτσι λοιπόν, σταμάτησε η χρήση μαγιάς ζυθοποιίας και με τον καιρό ανακαλύφθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης της μαγιάς για χρήση στην αρτοποιία. Έρευνες έχουν δείξει ότι τα στελέχη μαγιάς αρτοποιίας που χρησιμοποιούνται στις μέρες μας διαφέρουν από άλλα εμπορικά στελέχη λόγω της υψηλής μέγιστης θερμοκρασίας ανάπτυξής τους, της αντοχής τους σε χαμηλές τιμές pH και του υψηλού ρυθμού ανάπτυξής τους σε υπόστρωμα γλυκόζης. (Dawson, 1994).

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ως μαγιά αρτοποιίας χρησιμοποιείται κάποιο στέλεχος του *Saccharomyces cerevisiae* και η δράση του είναι παρόμοια με αυτή στη ζυθοποιία. Δηλαδή, μετατρέπει ζυμώσιμα σάκχαρα που περιέχονται στο ζυμάρι σε διοξείδιο του άνθρακα. Αυτό, ως αέριο, σχηματίζει φυσαλίδες στο εσωτερικό της ζύμης προκαλώντας τη διόγκωσή της. Πιο αναλυτικά, η μαγιά μέσα στη ζύμη αρχικά παράγει διοξείδιο του άνθρακα και νερό, ως αποτέλεσμα της κυτταρικής αναπνοής. Μόλις εξαντληθεί το οξυγόνο, αρχίζει η αναερόβια ζύμωση, κατά την οποία, εκτός από διοξείδιο του άνθρακα παράγεται και αιθανόλη. Σε αντίθεση με τη ζυθοποιία, η αιθανόλη στην αρτοποιία δεν είναι επιθυμητό συστατικό αλλά δεν απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία για την απομάκρυνσή της καθώς η μεγάλη πτητικότητά της εξασφαλίζει την εξάτμισή της κατά το ψήσιμο του προϊόντος.

Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένα στέλεχος μαγιάς για τη βελτιστοποίηση της δράσης του στην αρτοποιία είναι τα εξής:

- 1) Υψηλή παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα
- 2) Η ικανότητα να καταναλώνει μαλτόζη όταν εξαντληθεί η γλυκόζη στο αλεύρι
- 3) Η ικανότητα να αποθηκεύει μεγάλες ποσότητες τρεχαλόζης, πράγμα που συμβάλει στην αντοχή του σε χαμηλές θερμοκρασίες
- 4) Η αντοχή στα συντηρητικά που περιέχονται στο ψωμί
- 5) Η ικανότητα να επιβιώνει και να διατηρεί τη δραστηριότητά του στις διάφορες συνθήκες αποθήκευσής του.

Παρόλο που η βασική λειτουργία της μαγιάς στην αρτοποιία είναι η παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, η δράση της δεν τελειώνει εκεί. Όπως και κατά την παρασκευή της μπίρας, έτσι κι εδώ παράγει διάφορους μεταβολίτες, όπως αλκοόλες, εστέρες και καρβονυλικές ενώσεις που συμβάλλουν στη χαρακτηριστική γεύση του ψωμιού (Reed & Nagodawithana, 1990; Saranraj *et al.*, 2017).

1.5.3. Εκχυλίσματα μαγιάς

Τα εκχυλίσματα μαγιάς χρησιμοποιούνται εκτενώς στη βιομηχανία τροφίμων ως αρωματικοί παράγοντες και ενισχυτικά γεύσης και στην αγορά συναντιούνται υπό τη μορφή σκόνης ή πάστας. Η παρασκευή του εκχυλίσματος μαγιάς γίνεται συνήθως με αυτόλυση, με υδρόλυση ή με πλασμόλυση (Tanguler & Erten, 2008). Μεγαλύτερη εμπορική χρήση έχει η αυτόλυση, καθώς τα εκχυλίσματα που παράγονται με αυτή τη διαδικασία έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο, πράγμα που δε συμβαίνει με τις άλλες δύο διαδικασίες. Επίσης, κατά την αυτόλυση δεν χρησιμοποιούνται διαλύτες που θα πρέπει να απομακρυνθούν στο τέλος της διεργασίας ούτε εξειδικευμένος και ακριβός εξοπλισμός.

1.5.3.1. Η διαδικασία της αυτόλυσης

Η αυτόλυση είναι η διαδικασία της διαλυτοποίησης των ενδοκυτταρικών συστατικών με την ενεργοποίηση υδρολυτικών ενζύμων που βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου της μαγιάς (Boonyeun *et al.*, 2011). Η αυτόλυση είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει φυσικά στα κύτταρα της μαγιάς όταν αυτά ολοκληρώνουν τον κύκλο ανάπτυξής τους και εισέρχονται στη φάση θανάτου (Chae *et al.*, 2001). Πειραματικά, η ενεργοποίηση των υδρολυτικών ενζύμων πραγματοποιείται σε συγκεκριμένες συνθήκες pH και θερμοκρασίας στις οποίες προκαλείται θανάτωση των κυττάρων. Στα ζωντανά κύτταρα η διαμερισματοποίηση των ενζύμων αυτών δεν επιτρέπει τη δράση τους στα δομικά συστατικά του κυττάρου και η βασική τους λειτουργία είναι στη διαδικασία του μεταβολισμού. Στα νεκρά κύτταρα, όμως, στα οποία δεν λειτουργούν οι μηχανισμοί ελέγχου των ενζύμων και η εσωτερική δομή τους έχει διαταραχθεί, τα ένζυμα αυτά είναι πλέον ελεύθερα να δράσουν σε διάφορα συστατικά του κυττάρου όπως νουκλεϊκά οξέα, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες και να προκαλέσουν την κατάτμησή τους στις βασικές δομικές μονάδες τους. Το γεγονός ότι το κυτταρικό τοίχωμα και η κυτταρική μεμβράνη χάνουν την ακεραιότητά τους και επιτρέπουν τη διαρροή ουσιών από και προς το κύτταρο εξαιτίας της διαταραχής που συμβαίνει στο εσωτερικό του κυττάρου μετά τη θανάτωσή του, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι βασικές δομικές μονάδες των μακρομορίων που υδρολύθηκαν είναι διαλυτές, οδηγεί στη διαρροή των συστατικών αυτών στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου.

Η αυτόλυση πραγματοποιείται με ικανοποιητικό ρυθμό για αιώρημα μαγιάς συγκέντρωσης 15% w/w με pH 5.5, σε θερμοκρασίες από 40 έως 50°C για 24 – 36 h επώασης. Για την ενίσχυση της διαλυτοποίησης κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης μπορούν να προστεθούν πρωτεάσες, νουκλεάσες, γλυκανάσες ή φωσφοδιεστεράσες (Reed & Nagodawithana, 1990). Επίσης, για τη μείωση του απαιτούμενου χρόνου αυτόλυσης μπορεί να πραγματοποιηθεί προεπεξεργασία του αιωρήματος μαγιάς με μηχανικά μέσα, όπως ομογενοποίηση υψηλής πίεσης (Comuzzo *et al.*, 2015) και υπέρηχοι (Liu *et al.*, 2013).

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 40 πρωτεολυτικά ένζυμα του *S. cerevisiae*, που συμμετέχουν στη διαδικασία της αυτόλυσης, στα οποία περιλαμβάνονται αμινοπεπτιδάσες, καρβοξυπεπτιδάσες και διάφορες ενδοπεπτιδάσες (Béhaloná & Beran, 1979). Τέσσερα από τα παραπάνω ένζυμα που έχουν σημαντικό ρόλο στη λύση του κυττάρου κατά την αυτόλυση είναι η πρωτεΐνάση Α, η πρωτεΐνάση Β, η καρβοξυπεπτιδάση Υ και η καρβοξυπεπτιδάση Σ, που είναι περιορισμένα στο κενοτόπιο του κυττάρου, όσο αυτό είναι ζωντανό. Στο κυτταρόπλασμα υπάρχουν μόρια που παρεμποδίζουν τη δράση των ενζύμων αυτών σχηματίζοντας αδρανή σύμπλοκα με αυτά. Συνεπώς, μετά το θάνατο του κυττάρου, τα ένζυμα αυτά απενεργοποιούνται από τους αντίστοιχους παρεμποδιστές μετά από την έξοδό τους από το κενοτόπιο. Στις συνθήκες της αυτόλυσης, όμως, πραγματοποιείται επανενεργοποίηση των ενζύμων αυτών λόγω απενεργοποίησης των παρεμποδιστών τους.

1.5.3.2. Η διαδικασία της πλασμόλυσης

Η πλασμόλυση είναι μια άλλη διαδικασία που πραγματοποιείται για την παρασκευή εκχυλισμάτων μαγιάς και τα βασικά της πλεονεκτήματα είναι η μεγάλη ταχύτητα αποικοδόμησης του κυττάρου και το χαμηλό κόστος, καθώς ο βασικός παράγοντας που χρησιμοποιείται είναι το κοινό αλάτι (NaCl). Η διεργασία βασίζεται στην προσπάθεια του κυττάρου να εξισορροπήσει την ωσμωτική του πίεση με αυτή του περιβάλλοντος υγρού, το οποίο έχει υψηλή συγκέντρωση αλατιού. Έτσι, το υδατικό περιεχόμενο του κυττάρου διαρρέει προς το εξωτερικό του. Παρατεταμένη πλασμόλυση οδηγεί σε θανάτωση του κυττάρου η οποία σηματοδοτεί την έναρξη της πέψης αυτού.

Το κοινό αλάτι, εκτός από την ενίσχυση της πλασμόλυσης, δρα και ως ενισχυτικό γεύσης αλλά και ως αντιμικροβιακός παράγοντας, με αποτέλεσμα τα εκχυλίσματα μαγιάς που έχουν παραχθεί με πλασμόλυση να έχουν αρκετά χαμηλό μικροβιακό φορτίο σε σχέση με τις άλλες μεθόδους. Η υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι, όμως, περιορίζει τη χρήση τέτοιων προϊόντων από τη βιομηχανία τροφίμων καθώς υπάρχει μεγαλύτερη ζήτηση για εκχυλίσματα χαμηλού νατρίου, όπως αυτά που παράγονται με αυτόλυση.

1.5.3.3. Η διαδικασία της υδρόλυσης

Η παρασκευή εκχυλισμάτων μαγιάς με υδρόλυση περιλαμβάνει τη χρήση ισχυρών οξέων, τα οποία προκαλούν την αποικοδόμηση διαφόρων μακρομορίων στις δομικές τους μονάδες, οι οποίες είναι διαλυτές. Παρόλο που η διαδικασία αυτή παρουσιάζει υψηλότερη απόδοση στην παραγωγή εκχυλισμάτων μαγιάς, είναι η λιγότερο ελκυστική μέθοδος για εμπορική χρήση διότι έχει κάποια σημαντικά μειονεκτήματα. Ένα από αυτά είναι η απαίτηση

εξοπλισμού από αδρανή υλικά ή εξοπλισμού επιστρωμένου με γυαλί, λόγω της διαβρωτικής φύσης των ισχυρών οξέων, το οποίο καθιστά τη διεργασία ιδιαίτερα δαπανηρή. Επίσης, η εξουδετέρωση των χρησιμοποιούμενων οξέων παράγει άλατα σε υψηλές συγκεντρώσεις στο παραγόμενο εκχύλισμα, τα οποία όπως προαναφέρθηκε, δεν είναι επιθυμητά. Εξαιτίας της υδρόλυσης, καταστρέφονται και κάποια αμινοξέα και βιταμίνες, με αποτέλεσμα τη μείωση της θρεπτικής αξίας των εκχυλισμάτων (Reed & Nagodawithana, 1990).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

2. ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ένζυμα χωρίζονται σε έξι βασικές κατηγορίες ανάλογα με τη φύση της χημικής αντίδρασης την οποία καταλύουν. Οι κατηγορίες αυτές είναι οι εξής:

- Οξειδοαναγωγάσες (Οξειδοοξειδοκτάσες): καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις
- Τρανσφεράσες: καταλύουν τη μεταφορά ομάδων όπως μεθύλιο, αμινομάδες, φωσφορικά κλπ., από μια ουσία σε μια άλλη
- Υδρολάσες: καταλύουν την υδρόλυση των δεσμών C-O, C-N, C-C και κάποιων άλλων δεσμών
- Λυάσες: καταλύουν τη διάσπαση των δεσμών C-O, C-N, C-C και κάποιων άλλων δεσμών με αποβολή, αφήνοντας διπλούς δεσμούς ή προσθέτοντας ομάδες σε διπλούς δεσμούς
- Ισομεράσες: καταλύουν τις ισομεριώσεις μέσα σε ένα μόριο
- Λιγάσες: καταλύουν την ένωση δύο μορίων με ταυτόχρονη υδρόλυση ενός πυροφωσφορικού δεσμού στο ATP ή ενός παρόμοιου τριφωσφορικού.

Στην κατηγορία των υδρολασών ανήκουν και τα πρωτεολυτικά ένζυμα, κύριο χαρακτηριστικό των οποίων είναι η υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών των πρωτεϊνών υπό κατάλληλες συνθήκες (Wolfgang, 2007; Belitz, 2009). Τα πρωτεολυτικά ένζυμα χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, τις εξωπεπτιδάσες (πεπτιδάσες), οι οποίες διασπούν τα αμινοξέα σταδιακά από τα τερματικά άκρα των πρωτεϊνών, και οι ενδοπεπτιδάσες (πρωτεϊνάσες) που υδρολύουν τους δεσμούς μέσα στην πεπτιδική αλυσίδα χωρίς να προσβάλλουν τους τερματικούς πεπτιδικούς δεσμούς. Οι κατηγορίες αυτές μπορούν να χωριστούν σε υπό-κατηγορίες με βάση συγκεκριμένα αμινοξέα ή άλλες ομάδες που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο τους, ή με βάση τις ενώσεις που υδρολύουν. Χαρακτηριστικές υπό-κατηγορίες των πρωτεολυτικών ενζύμων δίνονται στον Πίνακα 1.

Οι σημαντικότερες υπό-κατηγορίες πρωτεολυτικών ενζύμων είναι οι ενδοπεπτιδάσες της σερίνης, της κυστεΐνης, του ασπαραγινικού οξέος και οι μεταλλοπεπτιδάσες.

Ενδοπεπτιδάσες της σερίνης (σερινοπρωτεϊνάσες)

Η ομάδα αυτή αποτελείται από αλκαλικές πρωτεΐνες, δηλαδή από ένζυμα με δραστικότητα στην περιοχή pH 7 – 11. Οι σερινοπρωτεάσες παράγονται από ένα μεγάλο αριθμό βακτηρίων και μυκήτων και κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία ενός μορίου σερίνης κι ενός ιστιδίνης στα ενεργά κέντρα τους. Τα κυριότερα ένζυμα αυτής της ομάδας από ζωικές πηγές είναι η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη, η ελαστάση, η πλασμίνη και η θρομβίνη.

Πίνακας 1

Ταξινόμηση προτεολυτικών ενζύμων (H.-D. Belitz, Food Chemistry, 4th ed., 2009)

Ομάδα ενζύμων	Σχόλια	Παραδείγματα
Εξωπεπτιδάσες		
Διασπούν πρωτεΐνες/ πεπτιδία σταδιακά από αμινο- ή καρβοξυ-τερματικά		
Αμινοπεπτιδάσες	Διασπούν αμινοξέα από αμινο-τερματικά	Διάφορες αμινοπεπτιδάσες
Διπεπτιδάσες	Διασπούν διπεπτιδία	Διάφορες διπεπτιδάσες (καρνοσινάση, ανσερινάση)
Διπεπτιδυλο- και Τριπεπτιδυλο- πεπτιδάσες	Διασπούν δι- και τριπεπτιδία από αμινο-τερματικά	Καθεψίνη C
Πεπτιδυλο-διπεπτιδάσες	Διασπούν διπεπτιδία από καρβοξυ-τερματικά	Καρβοξυκαθεψίνη
Καρβοξυπεπτιδάσες της σερίνης	Διασπούν αμινοξέα από καρβοξυ-τερματικά. Η σερίνη είναι το ενεργό κέντρο	Καθεψίνη A
Μεταλλοκαρβοξυπεπτιδάσες	Διασπούν αμινοξέα από καρβοξυ-τερματικά. Στο ενεργό κέντρο υπάρχουν Zn^{2+} ή Co^{2+}	Καρβοξυπεπτιδάσες A και B
Καρβοξυπεπτιδάσες της κυστεΐνης	Διασπούν αμινοξέα από καρβοξυ-τερματικά. Η κυστεΐνη αποτελεί το ενεργό κέντρο	Λυσοσομαλοκαρβοξυπεπτιδάση B
Ενδοπεπτιδάσες		
Διασπούν πρωτεϊνικούς/ πεπτιδικούς δεσμούς άλλους από τους τερματικούς		
Ενδοπεπτιδάση της σερίνης	Η σερίνη είναι το ενεργό κέντρο	Χυμοθρυψίνες A, B και C, α- και β-θρυψίνη, μικροβιακές αλκάνιο-πρωτεΐνάσες
Ενδοπεπτιδάση της κυστεΐνης	Κυστεΐνη υπάρχει στο ενεργό κέντρο	Παπαΐνη, φικίνη, βρομελαΐνη, καθεψίνη B
Ενδοπεπτιδάση του ασπαραγινικού οξέος	Ασπαραγινικό οξύ (2 μόρια) υπάρχει στο ενεργό κέντρο	Πεψίνη, καθεψίνη D, χυμοσίνη (ρεννίνη)
Μεταλλοενδοπεπτιδάση	Ιόντα μετάλλων υπάρχουν στο ενεργό κέντρο	Κολλαγονάση, μικροβιακές ουδέτερες πρωτεΐνάσες

Ενδοπεπτιδάσες της κυστεΐνης (κυστεΐνοπρωτεΐνάσες)

Τα ένζυμα αυτής της ομάδας δρουν σε πιο μεγάλο εύρος pH, που ανάλογα με το υπόστρωμα κυμαίνεται από 4.5 – 10 με βέλτιστη δράση στο pH 6 – 7.5. Το κοινό χαρακτηριστικό των πρωτεΐνασών αυτής της ομάδας είναι η παρουσία ενός μορίου κυστεΐνης στο ενεργό κέντρο. Λόγω της μεγάλης ευαισθησίας τους σε οξειδωτικά μέσα, χρησιμοποιούνται συνήθως παρουσία ενός αναγωγικού σώματος κι ενός που σχηματίζει χηλική ένωση. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι αυτής της υπό-κατηγορίας είναι η παπαΐνη, η βρομελαΐνη και η φικίνη.

Μεταλλοπεπτιδάσες

Χαρακτηριστικό των ενζύμων αυτής της ομάδας είναι η παρουσία ενός μεταλλικού ιόντος στο ενεργό κέντρο τους. Το πιο συχνό ιόν που συναντάται στις μεταλλοπεπτιδάσες είναι το Zn^{2+} . Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται οι καρβοξυπεπτιδάσες Α και Β, διάφορες αμινοπεπτιδάσες και διπεπτιδάσες, η προλιδάση, η προλινάση αλλά και κάποιες ενδοπεπτιδάσες από βακτήρια και μύκητες. Η προλιδάση και η προλινάση, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των μεταλλοπεπτιδασών, έχουν στο ενεργό κέντρο τους ένα ιόν Mn^{2+} .

Ενδοπεπτιδάσες του ασπαραγινικού οξέος (ασπαραγινικές πρωτεΐνάσες)

Στο ενεργό κέντρο των πρωτεασών του ασπαραγινικού οξέος υπάρχουν δύο καρβοξυλικές ομάδες, η μία εκ των οποίων βρίσκεται σε αδιάστατη μορφή. Χαρακτηριστικά ένζυμα αυτής της ομάδας από ζωική προέλευση είναι η πεψίνη και η χυμοσίνη (ρεννίνη) που δρουν σε pH 2 – 4, και η καθεψίνη D, με βέλτιστο pH μεταξύ 3 και 5. Σε pH 6 – 7 η χυμοσίνη διασπά ένα δεσμό της κ-καζεΐνης με μεγάλη εξειδίκευση, προκαλώντας την πήξη του γάλακτος. Οι ασπαραγινικές πρωτεΐνάσες μικροβιακής προέλευσης χωρίζονται σε δύο ομάδες ανάλογα με το αν προσομοιάζουν την πεψίνη ή τη χυμοσίνη (Belitz, 2009).

2.2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

2.2.1 Εφαρμογές στα τρόφιμα

Υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στις πρωτεΐνες, λόγω των 20 διαφορετικών αμινοξέων από τα οποία προκύπτουν, γι' αυτό και υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία στα διάφορα πρωτεολυτικά ένζυμα που μπορούν να υδρολύσουν μια πρωτεΐνη (Aehle, 2007). Για παράδειγμα, στο ζυμάρι, ανάλογα με το ένζυμο που θα χρησιμοποιηθεί μπορεί να προκύψει

μερική υδρόλυση, καθιστώντας τη ζύμη πιο εύπλαστη, ή μπορεί να προκύψει έντονη υδρόλυση της γλουτένης, κάνοντας τη ζύμη να χάσει τις ιξωδοελαστικές της ιδιότητες (Johnson *et al.*, 1956; Ward *et al.*, 1985). Τα πρωτεολυτικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων είναι ως επί το πλείστον ενδοπεπτιδάσες απομονωμένες από ζωικά όργανα και ανώτερα φυτά ή από μικροοργανισμούς (Belitz, 2009).

Όπως έγινε προφανές και από το παράδειγμα της προηγούμενης παραγράφου, μια από τις εφαρμογές των πρωτεολυτικών ενζύμων στα τρόφιμα είναι στην αρτοποιία. Σε προϊόντα στα οποία ο σκοπός είναι η διόγκωση του ζυμαριού, το πολύ σκληρό ζυμάρι δεν μπορεί να δώσει τον επιθυμητό όγκο στο τελικό προϊόν. Με χρήση ενζύμων μέτριας εξειδίκευσης στη γλουτένη, μπορεί να επιτευχθεί μερική τροποποίησή της, κάνοντας πιο εύπλαστο το ζυμάρι και δίνοντας καλύτερη δομή και όγκο στο τελικό προϊόν (Ward *et al.*, 1985). Στην παρασκευή μπισκότων, παξιμαδιών, γκοφρέτας και ζύμης για πίτσα απαιτείται ακόμη πιο μαλακό ζυμάρι για να μπορεί να δοθεί το κατάλληλο σχήμα και υφή στο τελικό προϊόν (Oliver & Wheeler, 1996). Έτσι, χρησιμοποιούνται πρωτεολυτικά ένζυμα με πολύ μικρή εξειδίκευση, για να υδρολύσουν τη γλουτένη σε μεγάλο βαθμό. Η δράση των πρωτεασών μπορεί να επηρεάσει τη γεύση και το χρώμα του προϊόντος. Τα πεπτίδια που παράγονται από την υδρόλυση μπορούν να δράσουν ως οξειδωτικά, γλυκαντικά αλλά μπορούν να προσφέρουν και πικρή γεύση στο τρόφιμο, ενώ τα αμινοξέα που απελευθερώνονται από τη γλουτένη μπορούν να αντιδράσουν με σάκχαρα μέσω της αντίδρασης Maillard, συμβάλλοντας στη γεύση και στο χρώμα της κρούστας του ψωμιού (Aehle, 2007).

Στη βιομηχανία γαλακτοκομικών, η πήξη του γάλακτος είναι υψίστης σημασίας καθώς και είναι απαραίτητο βήμα για την παρασκευή πληθώρας γαλακτοκομικών προϊόντων. Η πήξη αυτή μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση χυμοσίνης, η οποία προκαλεί πολύ στοχευμένη πρωτεόλυση στην καζεΐνη του γάλακτος, προκαλώντας την καταβύθισή της και τη δημιουργία πήγματος. Η καταβύθιση μπορεί να επιτευχθεί και από άλλες πρωτεϊνάσες, όμως η μη στοχευμένη δράση τους ελαχιστοποιεί την παραγωγή πήγματος και κάνει το πήγμα πιο ασθενές.

Φυτικές πρωτεϊνάσες καθώς και πρωτεϊνάσες από μικροοργανισμούς χρησιμοποιούνται για να κάνουν το κρέας πιο τρυφερό. Για να επιτευχθεί αυτός ο σκοπός πρέπει τα ένζυμα να είναι ομοιόμορφα καταναμημένα στο μυϊκό ιστό. Ένας τρόπος είναι η έγχυση πρωτεϊνάσης στην κυκλοφορία του αίματος του ζώου αμέσως πριν τη σφαγή. Αλλιώς μπορεί να γίνει επανυδάτωση του λυοφυλιωμένου κρέατος σε ενζυμικό διάλυμα (Belitz, 2009).

Άλλη εφαρμογή των πρωτεολυτικών ενζύμων είναι στην απολέπιση ψαριών όπως ο τόνος, που είναι δύσκολο να γίνει με μηχανικά μέσα. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη βύθιση του ψαριού σε ζεστό υδατόλουτρο που περιέχει πρωτεολυτικά ένζυμα για 10 – 90 min, κάνοντας την απολέπιση πολύ πιο εύκολη (Aehle, 2007).

Με χρήση φυτικών πρωτεϊνάσών μπορεί, επίσης, να αποφευχθεί η καταβύθιση πρωτεϊνών στη μπύρα, που προκαλούν το εν ψυχρώ θόλωμά της (Belitz, 2009).

2.2.2. Άλλες εφαρμογές

Πρωτεάσες αποτελούν συστατικά σε πληθώρα απορρυπαντικών, δίνοντας τη δυνατότητα διάλυσης πρωτεϊνικών λεκέδων είτε από υφάσματα είτε από επιφάνειες μαγειρικών σκευών. Κύριο χαρακτηριστικό που πρέπει να έχουν οι πρωτεάσες που χρησιμοποιούνται στα απορρυπαντικά είναι η πολύ μικρή εξειδίκευση, ώστε να μπορούν να δράσουν σε πολλά διαφορετικά υποστρώματα. Συνήθως χρησιμοποιούνται σερινοπρωτεάσες με μοριακό βάρος 20,000 – 30,000 Da (Siezen, 1996; Bott, 1997; Egmond, 1997).

Πρωτεάσες φυτικής προέλευσης, όπως η παπαΐνη και η βρομελαΐνη, βρίσκουν εφαρμογή και σε προϊόντα περιποίησης προσώπου. Συγκεκριμένα συμβάλλουν στην απολέπιση, κάνοντας πολύ περιορισμένη πρωτεόλυση στις πρωτεΐνες των κυττάρων της επιδερμίδας (Aehle, 2007).

Ακόμη και στην υγεία μπορούν να συμβάλλουν τα πρωτεολυτικά ένζυμα, χρησιμεύοντας ως αντιθρομβωτικά για το αίμα ή και ως βοηθήματα πέψης (Dembowsky & Stadler, 2001).

2.3. ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΤΟΥ ΚΕΝΟΤΟΠΙΟΥ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ

Στο κενοτόπιο της μαγιάς υπάρχουν επτά χαρακτηρισμένα πρωτεολυτικά ένζυμα, στα οποία περιλαμβάνονται τρεις αμινοπεπτιδάσες, δύο καρβοξυπεπτιδάσες και δύο ενδοπεπτιδάσες, ή με άλλη κατηγοριοποίηση, τρεις μεταλλοπρωτεάσες, τρεις σερινικές και μία ασπαραγινική πρωτεάση. Οι σερινικές πρωτεάσες οφείλουν τη δράση τους σε μια καταλυτική τριάδα αμινοξέων Asp, Ser και His, οι μεταλλοπρωτεάσες σε ιόντα μετάλλων (συνήθως Zn^{+2}) και οι ασπαραγινικές πρωτεάσες σε δυο καταλυτικές ομάδες Asp. Στον Πίνακα 2 δίνονται οι επτά προαναφερθείσες πρωτεάσες του κενοτοπίου της μαγιάς με επιπλέον πληροφορίες για τα γονίδια που τις κωδικοποιούν και τις βασικές τους λειτουργίες.

2.3.1. Πρωτεΐνάση A

Η πρωτεΐνάση A είναι μια ασπαραγινική ενδοπεπτιδάση που κωδικοποιείται από το γονίδιο PEP4 και έχει μοριακό βάρος 42 kDa. Η πρωτεΐνάση A, καθώς και πολλές άλλες υδρολάσες του κενοτοπίου, προέρχεται από ανενεργά πρόδρομα μόρια, γνωστά ως ζυμογόνα. Η ενεργοποίηση των ζυμογόνων γίνεται με την αφαίρεση ενός προπεπτιδίου-παρεμποδιστή με πρωτεόλυση, μόλις φτάσουν στο κενοτόπιο. Άλλες πρωτεάσες, όπως η πρωτεΐνάση B, η καρβοξυπεπτιδάση Y και η αμινοπεπτιδάση I, ενεργοποιούνται από την πρωτεΐνάση A.

Πίνακας 2

Πρωτεάσες του κενοτοπίου του S. cerevisiae (Hecht, 2014)

Πρωτεάση	Ομάδα	Γονίδιο	Λειτουργία
Πρωτεΐνάση A	Ασπαραγινική πρωτεΐνάση	PEP4	Εκκινητής αλληλουχίας ενεργοποίησης πρωτεασών, υδρόλυση πρωτεϊνών
Πρωτεΐνάση B	Σερινική ενδοπρωτεάση	PRB1	Ενεργοποίηση και υδρόλυση πρωτεασών
Καρβοξυπεπτιδάση Y	Σερινική καρβοξυπεπτιδάση	PRC1	Υδρόλυση πρωτεϊνών
Καρβοξυπεπτιδάση S	Μεταλλοπρωτεάση	CPS1	Υδρόλυση πρωτεϊνών
Αμινοπεπτιδάση I	Μεταλλοπρωτεάση	APE1	Υδρόλυση γλουταθειόνης
Αμινοπεπτιδάση Y	Μεταλλοπρωτεάση	APE3	Άγνωστη
Διπεπτυλαμινοπεπτιδάση B	Σερινική διπεπτιδάση	DAP2	Άγνωστη

Το ανενεργό πρόδρομο μόριο της πρωτεΐνάσης A, γνωστό ως PreproPrA, αποτελείται από 405 αμινοξέα κι έχει μοριακό βάρος 52 kDa. Με την απομάκρυνση μιας αλληλουχίας ανίχνευσης, το PreproPrA γίνεται proPrA το οποίο μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi. Στη συνέχεια, αφού μεταφερθεί στο κενοτόπιο, μπορεί να ενεργοποιηθεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος είναι η αυτοκαταλυτική ενεργοποίηση με απομάκρυνση του παρεμποδιστικού

προπεπτιδίου και ο δεύτερος περιλαμβάνει την άμεση ενεργοποίηση με παρέμβαση της πρωτεΐνάσης B (Parr *et al.*, 2007; Hecht, 2014).

2.3.2. Πρωτεΐνάση B

Η πρωτεΐνάση B είναι μια σερινική ενδοπεπτιδάση που κωδικοποιείται από το γονίδιο PRB1. Το ζυμογόνο από το οποίο προέρχεται είναι ένα πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 76 kDa, γνωστό ως proPrB. Στο ενδοπλασματικό δίκτυο απομακρύνεται το πεπτίδιο ανίχνευσης και το ζυμογόνο τροποποιείται με αυτοκαταλυόμενη αποκοπή ενός προπεπτιδίου μήκους 260 αμινοξέων. Στο σύμπλεγμα Golgi το παραγόμενο proPrB υφίσταται περαιτέρω τροποποίηση και στο κενοτόπιο απομακρύνεται ένα τελευταίο προπεπτίδιο-παρεμποδιστής με τη δράση της πρωτεΐνάσης A προκαλώντας την ενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης B. Στην τελική και ενεργή μορφή της έχει μοριακό βάρος 31 kDa. Η πρωτεάση αυτή μπορεί να δράσει σε ευρύ φάσμα υποστρωμάτων.

2.3.3. Καρβοξυπεπτιδάση Y

Η καρβοξυπεπτιδάση Y (πολλές φορές αναφέρεται και ως πρωτεάση C) είναι μια σερινική καρβοξυπεπτιδάση και κωδικοποιείται από το γονίδιο PRC1. Από το πρόδρομο μόριό της, με μοριακό βάρος 60 kDa, αποκόπτεται μια αλληλουχία ανίχνευσης ενώ προστίθενται τέσσερις ομάδες γλυκανών. Σε αυτή τη μορφή το μόριο ονομάζεται p1-CPY και έχει μοριακό βάρος 67 kDa. Το μόριο μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi, όπου με τροποποίηση των γλυκανών, παίρνει τη μορφή p2-CPY με μοριακό βάρος 69 kDa. Μόλις μεταφερθεί στο κενοτόπιο, αφαιρείται το προπεπτίδιο με τη συνδυαστική δράση της πρωτεΐνάσης A και της πρωτεΐνάσης B και προκύπτει η ενεργή μορφή της καρβοξυπεπτιδάσης Y. Το ένζυμο παραμένει ενεργό σε χαμηλές τιμές pH και σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, που είναι χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος του κενοτοπίου (Hecht, 2014).

2.4. ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΑΥΤΟΛΥΣΗΣ

Έχει παρατηρηθεί ότι σε εκχυλίσματα μαγιάς και σε pH 7, οι τρεις πρωτεάσες που αναλύθηκαν παραπάνω βρίσκονται σε μια μη ενεργή μορφή αλλά μπορούν να

ενεργοποιηθούν με επώαση σε χαμηλότερο pH (Hata *et al.*, 1967). Μια εξήγηση για το λόγο που συμβαίνει αυτό δίνεται παρακάτω. Στο ζωντανό κύτταρο οι πρωτεάσες αυτές βρίσκονται στο κενοτόπιο και δεν έρχονται σε επαφή με το κυτταρόπλασμα λόγω του τονοπλάστη του κενοτοπίου (βλ. ενότητες 1.4.2.5. & 1.4.2.6.) (Lenney, 1974; Pringle, 1975). Το κυτταρόπλασμα, όμως, περιέχει κάποια πολυπεπίδια που δρουν ως παρεμποδιστές για τις πρωτεάσες (Saheki *et al.*, 1974). Κατά την αυτόλυση της μαγιάς, όπου πραγματοποιείται λύση του κυττάρου, παύει να υπάρχει διαμερισματοποίηση των ουσιών και οι παρεμποδιστές έρχονται σε επαφή με τις πρωτεάσες, παράγοντας πρωτεϊνικά σύμπλοκα που είναι αρκετά σταθερά σε pH 7 (Lenney, 1975).

Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνάση A συμμετέχει στην απενεργοποίηση των παρεμποδιστών των πρωτεασών B και C, η πρωτεΐνάση B συμμετέχει στην απενεργοποίηση των παρεμποδιστών των άλλων δύο πρωτεασών αλλά και του δικού της, ενώ η C συμμετέχει στην απενεργοποίηση μόνο του παρεμποδιστή της B (Hata *et al.*, 1967; Saheki, 1974; Lenney, 1975). Οι παρεμποδιστές των πρωτεϊνικών A και B παραμένουν σταθεροί σε υψηλές θερμοκρασίες και κατά την κατακρήμνιση με τριχλωροοξικό οξύ (TCA), σε αντίθεση με τον παρεμποδιστή της πρωτεάσης C που είναι αρκετά ασταθής (Saheki, 1974; Lenney, 1975; Pringle, 1975).

Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τη συμπεριφορά των τριών αυτών πρωτεασών σε διάφορες συνθήκες αυτόλυσης, έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση των πρωτεολυτικών ενζύμων είναι μέγιστη σε θερμοκρασίες 40 – 50°C και σε pH 5.5. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι η προσθήκη κοινού αλατιού (NaCl) κατά την αυτόλυση προκαλεί αύξηση της ενεργότητας των πρωτεασών της μαγιάς στους 53°C, αλλά στους 40°C η δράση του είναι αρνητική. Στους 40°C η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα βασίζεται κυρίως στην πρωτεΐνάση B και την καρβοξυπεπτιδάση Y, ενώ στο διάστημα 50 – 60°C κυρίαρχο ρόλο έχει η καρβοξυπεπτιδάση Y. Γενικά, υποστηρίζεται ότι η πρωτεΐνάση A συμβάλλει περισσότερο στην ενεργοποίηση των άλλων δύο πρωτεασών κατά την αυτόλυση και όχι τόσο στην ολική πρωτεολυτική ενεργότητα (Běhalová & Beran, 1979). Έχει παρατηρηθεί, επίσης, ότι η προσθήκη πεπστατίνης σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (10^{-7} M) προκαλεί πλήρη απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης A αλλά όχι των άλλων δύο πρωτεασών, ενώ η χυμοστατίνη και η αντυπαΐνη παρεμποδίζουν μόνο την πρωτεΐνάση B (Saheki, 1974; Lenney, 1975). Στον Πίνακα 3 δίνονται στοιχεία για κάποια χαρακτηριστικά, τους βασικότερους παρεμποδιστές και τις συνθήκες που βελτιστοποιούν τη δράση τους. Τα δεδομένα του Πίνακα έχουν συλλεχθεί από τα αποτελέσματα των ερευνών των Hata *et al.*, Běhalová & Beran, Lenney και Hecht *et al.*

Τέλος, έχει συζητηθεί η δυνατότητα της χρήσης των πρωτεϊνικών A και B για την πήξη του γάλακτος (Hata *et al.*, 1967; Běhalová & Beran, 1979), όμως δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμη μια εκτενής μελέτη πάνω στο συγκεκριμένο θέμα.

Πίνακας 3
Ιδιότητες των πρωτεϊνών Α, Β και της καρβοξυπεπτιδάσης Υ

Ιδιότητες	Πρωτεΐνωση Α	Πρωτεΐνωση Β	Καρβοξυπεπτιδάση Υ
Μοριακό βάρος	42 kDa	31 kDa	61 kDa
Ισοηλεκτρικό σημείο	3.8	5.8	3.4
Βέλτιστο pH	2 – 6	6 – 7	4 – 7
Βέλτιστη θερμοκρασία	33 – 40 °C	45 – 55 °C	45 – 55 °C
Παρεμποδιστές	πρωτεΐνη I ₃ ^A , πεπσατίνη	πρωτεΐνη I ₂ ¹³ , χυμοστατίνη, αντιπαΐνη, Hg ²⁺	πρωτεΐνη I ^e , Hg ²⁺ , DFP, PCMB

2.5. ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΠΗΞΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ (MILK CLOTTING ENZYMES)

2.5.1. Δομή και σύσταση του γάλακτος

Το γάλα είναι το λευκό ή κιτρινόλευκο υγρό που εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες των θηλυκών θηλαστικών. Η σύστασή του ποικίλει σημαντικά ανάλογα με το θηλαστικό από το οποίο προέρχεται αλλά και από τη διατροφή του. Σε κάθε περίπτωση το νερό είναι το κύριο συστατικό του γάλακτος με ποσοστό 63 – 87 %. Στοιχεία για τη σύσταση του γάλακτος διαφόρων θηλαστικών δίνονται στον Πίνακα 4.

Το λίπος στο γάλα έχει τη μορφή λιποσφαιρίων, τα οποία σχηματίζουν γαλακτώματα στον ορό του γάλακτος. Μετά από παρατεταμένη αποθήκευση τα λιποσφαίρια διαχωρίζονται από την υδατική φάση, αλλά με ομογενοποίηση διασπείρονται και γαλακτωματοποιούνται σε τέτοιο βαθμό, που δεν παρατηρείται διαχωρισμός ακόμη και μετά από παρατεταμένη αποθήκευση.

Οι πρωτεΐνες που συναντώνται στο γάλα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες με βάση τον Hammarsten (1877), τις καζεΐνες, τις λακταλβουμίνες και τις λακτογλοβουλίνες. Οι δύο τελευταίες κατηγορίες είναι υδατοδιαλυτές και μαζί ονομάζονται πρωτεΐνες ορού ή οροπρωτεΐνες. Το καζεϊνικό κλάσμα αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό των γαλακτοπρωτεϊνών και περιλαμβάνει τις α_s-, β-, γ-, κ- και λ-καζεΐνες. Οι καζεΐνες είναι φωσφοπρωτεΐνες και κατακρημνίζονται σε όξινο pH (κάτω από pH 4.6 σε θερμοκρασία 20°C). Λόγω της υδροφοβικότητάς τους και της κατανομής φορτίου στα μόριά τους, οι καζεΐνες συνδέονται με ηλεκτροστατικές και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και παρουσία φωσφορικού ασβεστίου σχηματίζουν μικκύλια. Η διάμετρος των μικκυλίων στο

αποβουτυρωμένο γάλα κυμαίνεται από 50 ως 300 nm. Περίπου το 90% του καζεϊνικού κλάσματος είναι οργανωμένο σε μικκύλια και το υπόλοιπο 10% βρίσκεται σε μορφή μονομερών.

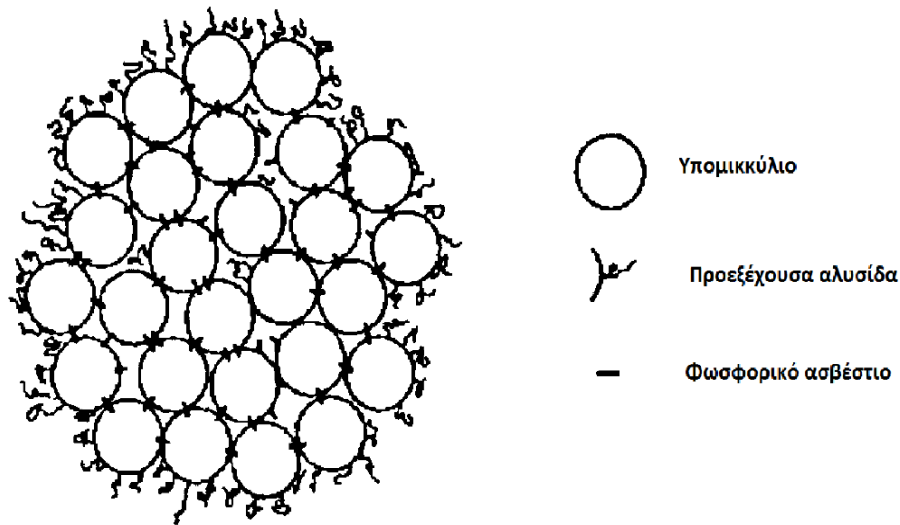
Πίνακας 4

Σύσταση γάλακτος διαφόρων θηλαστικών (%) (Πηγή: Belitz, 2009)

Γάλα	Πρωτεΐνες	Καζεΐνη	Πρωτεΐνες ορού	Σάκχαρα	Λίπη	Τέφρα
Ανθρώπου	0.9	0.4	0.5	7.1	4.5	0.2
Αγελάδας	3.2	2.6	0.6	4.6	3.9	0.7
Όνου	2.0	1.0	1.0	7.4	1.4	0.5
Αλόγου	2.5	1.3	1.2	6.2	1.9	0.5
Καμήλας	3.6	2.7	0.9	5.0	4.0	0.8
Ζεβού	3.2	2.6	0.6	4.7	4.7	0.7
Γιακ	5.8			4.6	6.5	0.9
Βουβάλου	3.8	3.2	0.6	4.8	7.4	0.8
Κατσίκας	3.2	2.6	0.6	4.3	4.5	0.8
Προβάτου	4.6	3.9	0.7	4.8	7.2	0.9
Ταράνδου	10.1	8.6	1.5	2.8	18.0	1.5
Γάτας	7.0	3.8	3.2	4.8	4.8	0.6
Σκύλου	7.4	4.8	2.6			
Κουνελιού	10.4					

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για το σχηματισμό μικκυλίων σε μοριακό επίπεδο, από τα οποία το πιο πιθανό μιλάει για υπομικκύλια, τα οποία αποτελούνται από 30 περίπου μονομερή καζεϊνών και ενώνονται μεταξύ τους με γέφυρες φωσφορικού ασβεστίου προς σχηματισμό μεγάλων μικκυλίων. Στην επιφάνεια των υπομικκυλίων συναντώνται μόρια κ-καζεΐνης, που περιέχουν υδρόφιλα καρβοξυτεματικά άκρα. Η συσσωμάτωση των υπομικκυλίων συνεχίζεται μέχρι όλη η εξωτερική επιφάνεια του μικκυλίου να καλυφθεί με

υδρόφιλα τμήματα κ-καζεΐνης, προστατεύοντας τα υδρόφοβα τμήματα στο εσωτερικό. Το μοντέλο αυτό παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 8 (Rehm *et al.*, 1995; Belitz, 2009).



Εικόνα 8: Μοντέλο μικκυλίου καζεΐνης (πηγή: Rehm, Reed & Nagodawithana, *Biotechnology vol 9: Enzymes, biomass, food and feed*, 1995)

2.5.2. Πήξη γάλακτος

Το σύστημα μικκυλίου μπορεί να αποσταθεροποιηθεί είτε με οξίνιση είτε με πρωτεολυτική δράση. Με οξίνιση προκαλείται θρόμβωση της καζεΐνης που με τη σειρά της προκαλεί διόγκωση των μικκυλίων. Κατά τη θρόμβωση η διαλυμένη καζεΐνη επανασυνδέεται με τα μικκύλια, σχηματίζοντας πλέγμα πηκτής.

Με χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων πραγματοποιείται υδρόλυση του δεσμού Phe₁₀₅ – Met₁₀₆ στο υδρόφιλο άκρο της κ-καζεΐνης που προεξέχει από το μικκύλιο. Έτσι, τα μικκύλια σχηματίζουν συσσωματώματα ακανόνιστης μορφής, τα οποία στη συνέχεια συναθροίζονται δημιουργώντας ένα τρισδιάστατο πλέγμα πηκτής. Κινητήρια δύναμη για το σχηματισμό πηκτής αποτελούν οι υδροφοβικές αντιδράσεις, όμως σημαντικό ρόλο παίζουν και άλλες, θερμοεξαρτώμενες αντιδράσεις, όπως η ένωση ιόντων Ca²⁺ με τη β-καζεΐνη και η αλλαγή στη διαλυτότητα του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου. Συγκεκριμένα, τα ιόντα Ca²⁺ συμβάλλουν στη συνένωση των μικκυλίων καζεΐνης αφού έχει πρώτα απομακρυνθεί το 80 – 90 % των υδρόφιλων άκρων της κ-καζεΐνης με ενζυμική δράση (Rehm *et al.*, 1995; Belitz, 2009).

Η ενεργότητα πήξης γάλακτος είναι η ικανότητα στοχευμένης υδρόλυσης της κ-καζεΐνης και αποτελεί τη σημαντικότερη ιδιότητα που πρέπει να έχουν τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή τυριού. Σύμφωνα με τη μέθοδο Soxhlet, που χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα για τον καθορισμό της ολικής ενεργότητας πήξης

γάλακτος, η πηκτική ισχύς σε μονάδες Soxhlet ορίζεται ως ο όγκος γάλακτος που μπορεί να πήξει από μία μονάδα όγκου ενζύμου, σε 40 min στους 35°C (Jacob, 2011).

Τα περισσότερα πρωτεολυτικά ένζυμα μπορούν να πήξουν το γάλα, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις δε σχηματίζεται σταθερό τυρόπηγμα ή παράγονται πεπτίδια με πικρή γεύση, λόγω της συνεχιζόμενης πρωτεόλυσης του πήγματος (Murray & Baker, 1952). Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος παράγοντας πήξης γάλακτος είναι η πυτιά, που πραγματοποιεί πολύ εξειδικευμένη πρωτεόλυση με αποτέλεσμα την παραγωγή σταθερού τυροπήγματος. Η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση τυροκομικών προϊόντων σε σχέση με την περιορισμένη παραγωγή πυτιάς καθιστά αναγκαία τη χρήση κι άλλων ενζύμων για την πήξη του γάλακτος. Σήμερα χρησιμοποιούνται πηκτικά φυτικής και μικροβιακής προέλευσης σε συνδυασμό με την πυτιά ή και απουσία πυτιάς (Hany, 1969).

2.5.3. Πυτιά

Η πυτιά είναι μια ουσία που απομονώνεται από το στομάχι μηρυκαστικών θηλαστικών, κυρίως από μοσχάρια. Αποτελείται από τις πρωτεάσες χυμοσίνη και πεψίνη σε αναλογίες που διαφέρουν ανάλογα με την ηλικία του ζώου και τη διατροφή του. Στην πυτιά του εμπορίου, η χυμοσίνη βρίσκεται σε ποσοστά μεταξύ 50% και 95%. Η χυμοσίνη παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση στην υδρόλυση του υδρόφιλου άκρου της κ-καζεΐνης, που αποσταθεροποιεί τα μικκύλια καζεΐνης και προκαλεί την πήξη του γάλακτος, σε αντίθεση με την πεψίνη, που έχει πολύ μικρότερη εξειδίκευση και υδρολύει δεσμούς μεταξύ αμινοξέων Phe, Leu, Tyr και Val.

Κατά την παραγωγή πυτιάς, το στομάχι του ζώου καταψύχεται αμέσως μετά τη σφαγή και ακολουθεί άλεση, εξαγωγή των ενζύμων και ενεργοποίησή τους σε χαμηλό pH, εξουδετέρωση, διαύγαση και συμπύκνωση. Το 1991 οι Kim και Zayas πρότειναν μια μέθοδο εξαγωγής των ενζύμων από το στομάχι του ζώου με χρήση υπερήχων, κατά την οποία παρατηρήθηκε αύξηση στην ενεργότητα της χυμοσίνης. Από τον Santillo (2007) δείχθηκε ότι η προσθήκη προβιοτικών μικροοργανισμών στη διατροφή θηλαζόντων αρνιών, οδηγεί σε αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας της πυτιάς. Η προσθήκη προβιοτικών απευθείας στην πυτιά επίσης έδειξε βελτίωση στην πρωτεολυτική ενεργότητα.

2.5.4. Πρωτεολυτικά ένζυμα μικροβιακής προέλευσης

Πολλές εξωκυτταρικές πρωτεάσες μικροβιακής προέλευσης έχουν παρόμοια δράση με τη χυμοσίνη και μπορούν, μερικώς, να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή τυριού. Τέτοια ένζυμα μπορούν να παραχθούν εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες με ζύμωση, σε αντίθεση

με την πυτιά που παράγεται σε πολύ περιορισμένες ποσότητες. Η υψηλή πρωτεολυτική ενεργότητα των ενζύμων αυτών, όμως, μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω πρωτεόλυση του τυροπήγματος που συνεπάγεται μείωση της απόδοσης σε τυρί. Μύκητες που παράγουν ένζυμα πήξης του γάλακτος υπάρχουν σε αφθονία στη φύση και μπορούν να απομονωθούν με μεγάλη ευκολία.

Τρία είδη μυκήτων που χρησιμοποιούνται για τη μαζική παραγωγή ενζύμων πήξης του γάλακτος είναι τα *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, και *Cryphonectria parasitica*. Η ασπαραγινική πρωτεάση του *R. miehei* παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τη χυμοσίνη στην τριτοταγή δομή και αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μικροβιακή πρωτεάση στην παραγωγή τυριού (Chitprinityol & Crabbe, 1998). Η πρωτεάση του *R. pusillus* έχει ευαισθησία στο pH και στη συγκέντρωση του CaCl₂ παρόμοια με την πυτιά από μοσχάρι (Nouani *et al.*, 2009). Λιγότερο χαρακτηρισμένη είναι η πρωτεάση του *C. parasitica* αλλά είναι γνωστό ότι έχει υψηλότερη πρωτεολυτική ενεργότητα από τις άλλες δύο (Vanderporten & Weckx, 1972) και υδρολύει κυρίως β-καζεΐνες (Ustunol & Zeckzer, 1996).

Πέρα τη βελτίωση των ιδιοτήτων των εμπορικών χρησιμοποιούμενων ενζύμων μικροβιακής προέλευσης, γίνονται μελέτες πάνω σε νέες πρωτεάσες από διάφορες πηγές, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε ένζυμα βακτηριακής προέλευσης (Jacob, 2011).

2.5.5. Πρωτεολυτικά ένζυμα φυτικής προέλευσης

Πρωτεάσες φυτικής προέλευσης έχουν μελετηθεί εκτενώς ως πιθανοί πηκτικοί παράγοντες για την παρασκευή τυριού. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η παπαΐνη, που περιέχεται στα φύλλα του φυτού *Carica papaya*, η βρομελαΐνη, που περιέχεται στον ανανά (*Ananas comosus*), καθώς και η φικίνη, που περιέχεται στο σύκο (*Ficus carica*). Τυριά που παράγονται με ένζυμα φυτικής προέλευσης έχουν συνήθως απαλή υφή και μερικώς ακανόνιστο σχήμα. Διάφορες έρευνες (Llorente *et al.*, 2004; Low *et al.*, 2006; Egito *et al.*, 2007; Raposo and Domingos, 2008; Duarte *et al.*, 2009 κ.α.) έχουν δείξει ότι στις φυτικές πρωτεάσες, ο λόγος της ενεργότητας πήξης γάλακτος προς την πρωτεολυτική ενεργότητα δεν είναι αρκετά μεγάλος ώστε να συμφέρει η εμπορικοποίησή τους. Εξαιρεση αποτελεί το εκχύλισμα αγριαγκινάρας (*Cynara cardunculus* L.), το οποίο χρησιμοποιείται εδώ κι εκατοντάδες χρόνια για την παρασκευή τυριών από γάλα προβατίνας στην Ισπανία και την Πορτογαλία. Έχουν ταυτοποιηθεί τρεις ασπαραγινικές πρωτεάσες του εκχυλίσματος αγριαγκινάρας, το καθαρό μίγμα των οποίων παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με την κ-καζεΐνη απ' ότι η πυτιά (Jacob, 2011).

A decorative graphic on the left side of the page consists of a thick, dark red vertical bar. A bright red arrow points horizontally from the right side of this bar towards the text.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Η ΥΠΕΡΥΨΗΛΗ ΠΙΕΣΗ

3. Η ΥΠΕΡΥΨΗΛΗ ΠΙΕΣΗ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι παραδοσιακές μέθοδοι επεξεργασίας τροφίμων συνήθως χρησιμοποιούν υψηλές θερμοκρασίες για την εξόντωση παθογόνων μικροοργανισμών και την αύξηση της διατηρησιμότητας και της ασφάλειας των τροφίμων. Η επεξεργασία με υψηλές θερμοκρασίες, όμως, συνήθως επηρεάζει αρνητικά τα θρεπτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η υποβάθμιση βιταμινών και ουσιών που συμβάλλουν στη γεύση και το χρώμα του τροφίμου. Επίσης, μπορεί να επηρεαστεί η υφή, όπως συμβαίνει στα λαχανικά, των οποίων οι ιστοί μαλακώνουν και συνήθως απαιτείται προσθήκη χημικών ουσιών για την σταθεροποίηση της δομής τους. Άμεση συνέπεια των παραπάνω είναι ότι τα επεξεργασμένα με αυτό τον τρόπο τρόφιμα δεν παρουσιάζουν σχεδόν καμία ομοιότητα με τα αντίστοιχα φρέσκα τρόφιμα. Έτσι λοιπόν, έχει δημιουργηθεί η απαίτηση από τους καταναλωτές για πιο φυσική γεύση, άρωμα και χρώμα σε επεξεργασμένα τρόφιμα, καθώς και χρόνο ζωής τέτοιο, ώστε να μπορούν να διατηρηθούν στα καταστήματα για το απαιτούμενο χρονικό διάστημα μέχρι την πώλησή τους κι έπειτα να μπορούν να μείνουν αποθηκευμένα για ικανοποιητικό διάστημα πριν την κατανάλωσή τους. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού γίνονται ασταμάτητες προσπάθειες για τη βελτίωση των ήδη υπαρχόντων διεργασιών και για την ανάπτυξη καινούργιων μεθόδων μη θερμικής επεξεργασίας. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων τεχνολογιών είναι η υπερυψηλή πίεση ή υψηλή υδροστατική πίεση, τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία, οι υπέρηχοι, η ακτινοβολία και οι παλμοί φωτός υψηλής έντασης (Fellows, 2000; San Martin *et al.*, 2002; Katsaros & Taoukis, 2015)

3.2. ΜΗ ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο όρος “μη θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας” αναφέρεται σε διεργασίες που λειτουργούν σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από αυτές που χρησιμοποιούνται στις θερμικές επεξεργασίες για πλήρη θανάτωση των μικροοργανισμών, ή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στις διεργασίες αυτές, η θέρμανση δεν αποτελεί το βασικό παράγοντα απενεργοποίησης των μικροοργανισμών. Η αντικατάσταση της θερμικής παστερίωσης είναι

ίσως η βασικότερη εφαρμογή μη θερμικών διεργασιών, όμως έχει ερευνηθεί η δυνατότητα εφαρμογής τους και σε άλλα στάδια παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων όπως η τροποποίηση της υφής των πρώτων υλών και των τελικών προϊόντων και η βιοτεχνολογία υψηλής πίεσης. Κατά την επεξεργασία τροφίμων με μη θερμικές μεθόδους καταστρέφονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί και σε μερικές περιπτώσεις κάποια ένζυμα, ενώ δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας του τροφίμου. Συνεπώς ελαττώνεται σε μεγάλο βαθμό η ζημιά στο χρώμα, στη γεύση και στις βιταμίνες και συνολικά δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στα ποιοτικά χαρακτηριστικά και τη θρεπτική αξία του κυττάρου.

Η υπερυψηλή πίεση και τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικό επίπεδο. Οι υπέρηχοι βρίσκουν χρήση στην ομογενοποίηση τροφίμων και στον καθαρισμό μονάδων παραγωγής και τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με θερμική επεξεργασία υπό πίεση, έτσι ώστε να επιτευχθεί η θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών και η απενεργοποίηση των ενζύμων σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Η χρήση παλμικού φωτός, παρόλο που δεν έχει μελετηθεί όσο οι προαναφερθείσες μέθοδοι, δείχνει να έχει καλές προοπτικές στην επεξεργασία νερού και υλικών συσκευασίας.

Τρεις είναι οι κύριες κατηγορίες στις οποίες χωρίζονται οι μη θερμικές διεργασίες:

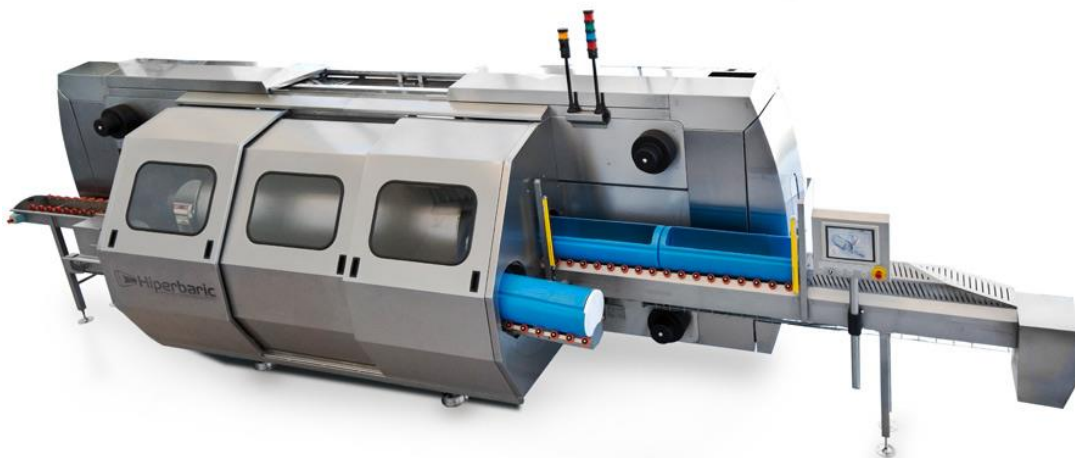
1. Τεχνολογίες που έχουν μελετηθεί εκτενώς για αρκετά χρόνια και έχουν βρεθεί πιθανές χρήσεις τους σε διάφορους τομείς της επεξεργασίας τροφίμων αλλά δεν έχουν βρει ακόμη εφαρμογή σε βιομηχανικό επίπεδο
2. Πρόσφατες τεχνολογίες που είτε δεν έχουν μελετηθεί αρκετά ώστε να είναι πλήρως γνωστή η δράση τους στα τρόφιμα, είτε δεν είναι διαθέσιμος ο βιομηχανικής κλίμακας εξοπλισμός τους, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εφαρμοστούν σε βιομηχανικό επίπεδο.
3. Τεχνολογίες που έχουν ήδη βρει εφαρμογή σε βιομηχανίες τροφίμων ή που θα μπορούσαν, αλλά δεν έχουν βρει εφαρμογή λόγω της διστακτικότητας των βιομηχανιών να ενσωματώσουν τέτοιες τεχνολογίες στην παραγωγική τους διαδικασία. Η υπερυψηλή πίεση ανήκει σε αυτή την κατηγορία.

3.3. ΥΠΕΡΥΨΗΛΗ ΠΙΕΣΗ

3.3.1. Ιστορικά στοιχεία

Η πρώτη επεξεργασία τροφίμων με υπερυψηλή πίεση πραγματοποιήθηκε στο West Virginia University των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής το 1899. Τα πειράματα

πραγματοποιήθηκαν σε γάλα, χυμό φρούτων, κρέας και διάφορα φρούτα κι έδειξαν ότι οι μικροοργανισμοί στα προϊόντα αυτά μπορούν να καταστραφούν με χρήση πιέσεων 658 MPa (6500 atm) για 10 min. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, έρευνες έδειξαν ότι η εφαρμογή υψηλών πιέσεων στο ασπράδι του αυγού μπορεί να προκαλέσει τροποποίηση της πρωτεϊνικής του δομής. Παρόλα αυτά, η εφαρμογή της μεθόδου ήταν πολύ περιορισμένη καθώς είχε διαπιστωθεί ότι δεν επηρέαζε σημαντικά τα ένζυμα, ιδιαίτερα στο γάλα, ενώ οι δυσκολίες στην κατασκευή μονάδων υπερυψηλής πίεσης σε συνδυασμό με την ανεπάρκεια υλικών συσκευασίας για να περιέχουν τα τρόφιμα κατά την επεξεργασία, οδήγησαν σε διακοπή των ερευνών. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970, που υπήρξε ραγδαία ανάπτυξη τόσο στο σχεδιασμό διεργασιών όσο και στα υλικά συσκευασίας, έγινε εφικτή η συνέχεια των ερευνών πάνω στην τεχνολογία της υπερυψηλής πίεσης. Στα τέλη της δεκαετίας του 1980 πραγματοποιήθηκαν διάφορες μελέτες κυρίως στην Ιαπωνία και το 1990 κυκλοφόρησαν για πρώτη φορά προϊόντα επεξεργασμένα με υπερυψηλή πίεση στην ιαπωνική αγορά. Στα προϊόντα αυτά περιλαμβάνονται μαρμελάδες διάφορων γεύσεων συσκευασμένες σε εύκαμπτες σφραγισμένες πλαστικές συσκευασίες οι οποίες έχουν χρόνο ζωής δύο μήνες, κατά τους οποίους πρέπει να είναι αποθηκευμένες υπό ψύξη για να αποφευχθεί η ενζυμική δράση. Κυκλοφόρησαν επίσης χυμοί πορτοκαλιού και γκρέιπφρουτ, ζελέ φρούτων, σάλτσες, dressings για σαλάτες και γιαούρτια φρούτων. Το κόστος αυτών των προϊόντων είναι αρκετά υψηλότερο από το κόστος συμβατικών προϊόντων, όμως η αρκετά καλύτερη ποιότητά τους έχει εξασφαλίσει ικανοποιητική ζήτηση από τους καταναλωτές ώστε να είναι εμπορικά βιώσιμα (Fellows, 2000).



Εικόνα 9: Βιομηχανικό σύστημα υπερυψηλής πίεσης (www.hpp.com.tw)

3.3.2. Αρχές της μεθόδου και εξοπλισμός

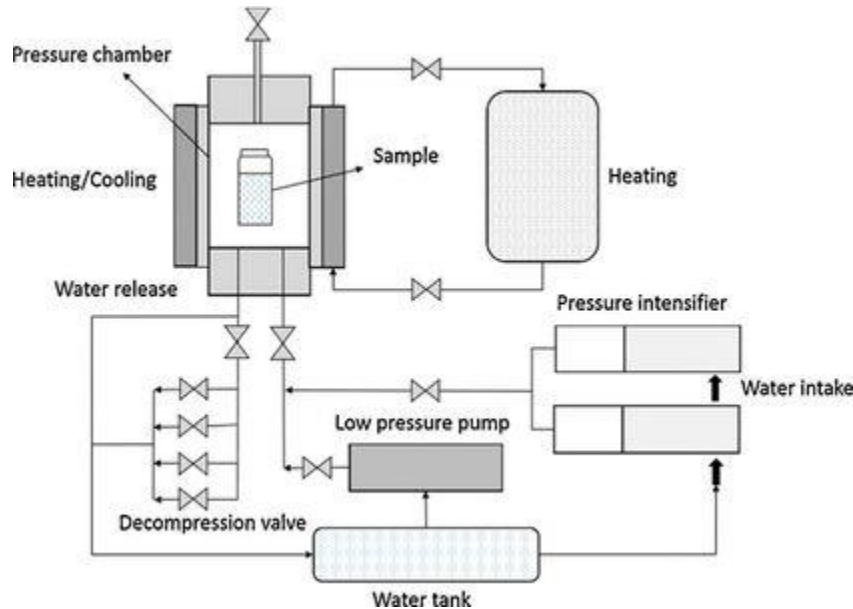
Η τεχνολογία της υπερυψηλής πίεσης έχει υιοθετηθεί και προσαρμόσεται από τη βιομηχανία τροφίμων από την επεξεργασία με ισοστατική πίεση που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία κεραμικών. Η μέθοδος διαφοροποιείται μερικώς ανάλογα με το είδος του προϊόντος, τη θερμοκρασία, και το μέσο μετάδοσης της πίεσης (υγρό ή αέριο). Η βάση της μεθόδου είναι η έκθεση του τροφίμου σε πιέσεις από 100 MPa ως 900 MPa, συνήθως μεταξύ 400 και 700 MPa σε εμπορικά συστήματα.

Η επιβολή της πίεσης γίνεται σε έναν περιορισμένο χώρο (δοχείο πίεσης), που περιέχει ένα ρευστό (συνήθως νερό), το οποίο έχει το ρόλο του μέσου μετάδοσης της πίεσης. Η πίεση εφαρμόζεται ισοστατικά, δηλαδή ασκείται προς όλες τις κατευθύνσεις, επιτρέποντας στα στερεά τρόφιμα να διατηρούν το σχήμα τους. Η εφαρμοσμένη πίεση και ο χρόνος κατεργασίας εξαρτώνται από το είδος του τροφίμου και από το επιθυμητό αποτέλεσμα. Αν το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι η απενεργοποίηση ενζύμων, απαιτούνται υψηλότερες πιέσεις σε σχέση με τη θανάτωση μικροοργανισμών. Σημαντικό πλεονέκτημα της ισοστατικής συμπίεσης έναντι συμβατικών θερμικών κατεργασιών είναι ότι η επεξεργασία είναι ανεξάρτητη από το σχήμα και το μέγεθος του τροφίμου, που αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες σε θερμικές διεργασίες.

Ένα σύστημα επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση αποτελείται από ένα δοχείο πίεσης, ένα σύστημα ανάπτυξης πίεσης, ένα σύστημα θέρμανσης/ψύξης κι ένα πρόγραμμα διαχείρισης των υλικών. Τα πιο κοινά δοχεία πίεσης είναι κατασκευασμένα από 'μονοκόμματα' (monoblocs) κράματα χάλυβα υψηλής αντοχής που μπορούν να αντέξουν πιέσεις μέχρι 600 MPa. Για επεξεργασία σε υψηλότερες πιέσεις, χρησιμοποιούνται προεντεταμένα πολυστρωματικά δοχεία. Η σφράγιση του δοχείου γίνεται με χαλύβδινο πώμα που φέρει συσπείρωμα και μπορεί να αφαιρεθεί με ευκολία, η με πλαίσιο σφράγισης που τοποθετείται πάνω απ' το δοχείο. Η ανάπτυξη πίεσης στο δοχείο μπορεί να επιτευχθεί με έναν από τους παρακάτω τρόπους:

1. Άμεση συμπίεση: Ο όγκος του δοχείου μειώνεται με τη χρήση πιστονιού στο οποίο εφαρμόζεται υδραυλική πίεση
2. Έμμεση συμπίεση: Σε τέτοια συστήματα χρησιμοποιείται ένας ενισχυτής ή μια αντλία υψηλής πίεσης για την άντληση του μέσου μετάδοσης απευθείας στο δοχείο για να αυξηθεί η πίεση στην επιθυμητή τιμή. Και σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται πιστόνι για την αύξηση της πίεσης, όμως η μετατόπιση του πιστονιού επιτυγχάνεται με άντληση νερού με αντλία υψηλής πίεσης
3. Ο τρίτος τρόπος δεν χρησιμοποιείται ακόμα στη βιομηχανία τροφίμων και περιλαμβάνει τη θέρμανση του μέσου μετάδοσης της πίεσης μέσα στο δοχείο για να αυξηθεί ο όγκος του, προκαλώντας αύξηση της πίεσης.

Οι θερμοκρασίες λειτουργίας εξαρτώνται από το είδος του συστήματος θέρμανσης/ψύξης που χρησιμοποιείται αλλά γενικά κυμαίνονται μεταξύ -20 και 80°C. Τα συστήματα διαχείρισης συνήθως περιλαμβάνουν καλάθια για την αποθήκευση των συσκευασμένων τροφίμων πριν εισέλθουν στη μονάδα υπερυψηλής πίεσης. Η επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση είναι διεργασία διαλείποντος έργου αλλά μπορούν να κατασκευαστούν μονάδες ημισυνεχούς λειτουργίας τοποθετώντας τρία ή περισσότερα δοχεία πίεσης στη σειρά.



Εικόνα 10: Σύστημα επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση (www.pmg.engineering)

3.4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΜΕ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗ ΠΙΕΣΗ

Παρόλο που η χρήση της μεθόδου υπερυψηλής πίεσης στα τρόφιμα συμβάλλει στη διατήρηση των θρεπτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του προϊόντος, οι κύριες εφαρμογές της σχετίζονται με θέματα ασφάλειας των τροφίμων. Έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες σε αυτόν τον τομέα και η έρευνα συνεχίζεται μέχρι και σήμερα. Οι περισσότεροι ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί και ένζυμα μπορούν να απενεργοποιηθούν με επεξεργασία του τροφίμου αποκλειστικά με υπερυψηλή πίεση, σε κάποιες περιπτώσεις όμως, απαιτείται ο συνδυασμός αυτής της μεθόδου με ήπια θέρμανση.

3.4.1. Επίδραση της υπερυψηλής πίεσης σε μικροοργανισμούς

Οι υψηλές πιέσεις έχουν την ιδιότητα να απενεργοποιούν πολλά είδη βλαστικών κυττάρων, όμως τα σπόρια είναι πολύ πιο ανθεκτικά και μπορούν να υποστούν πιέσεις έως και 1200 MPa. Γι' αυτό ερευνάται ο συνδυασμός της υπερυψηλής πίεσης με άλλες μεθόδους σε τρόφιμα στα οποία μπορεί να σχηματιστούν σπόρια (San Martin *et al.*, 2002). Η βλάστηση σπορίων υπό υψηλή πίεση εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Σε θερμοκρασίες κοντά στους 0°C, τα σπόρια δε βλαστάνουν ακόμα και σε πιέσεις των 1000 MPa ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες μπορεί να επιτευχθεί βλάστηση στα 100 MPa. Η βλάστηση σπορίων κατά την επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση είναι επιθυμητή διότι έπειτα μπορούν να απενεργοποιηθούν σε πίεση 600 MPa και θερμοκρασία 50 – 70°C. Εκτός από απενεργοποίηση, η υπερυψηλή πίεση μπορεί να προκαλέσει και μορφολογικές αλλαγές στους μικροοργανισμούς. Αυτές είναι είτε αναστρέψιμες, όπως η επιμήκυνση και η παύση της κίνησης των κυττάρων λόγω δομικών τροποποιήσεων, είτε μη αναστρέψιμες, όπως ο διαχωρισμός του κυτταρικού τοιχώματος από την κυτταρική μεμβράνη και η μείωση του αριθμού ριβοσωμάτων. Παρακάτω αναφέρονται κάποιες έρευνες που έχουν γίνει στην απενεργοποίηση μικροοργανισμών και σπορίων με υπερυψηλή πίεση.

Οι Hayert *et al.* (1997) μελέτησαν την επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στον *S. cerevisiae* και παρατήρησαν ότι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην απενεργοποίηση σε σταθερή πίεση είναι το μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού, η ενεργότητα νερού (a_w) και η θερμοκρασία. Οι Iwahashi *et al.* (1996) παρατήρησαν ότι υπάρχει διαφορά στην ανθεκτικότητα στην πίεση για διαφορετικά στελέχη του *S. cerevisiae*. Από τους Ponce *et al.* (1998) δείχθηκε ότι η υπερυψηλή πίεση σε συνδυασμό με βακτηριοσίνες (πρωτεΐνες παραγόμενες από βακτήρια και είναι θανατηφόρες για άλλα βακτήρια), έχουν συνεργιστική δράση στην απενεργοποίηση μικροοργανισμών. Με πειράματα πάνω στον *Bacillus subtilis*, οι Wuytack *et al.* (1998) παρατήρησαν ότι η βλάστηση των σπόρων στα 100 MPa, έκανε το μικροοργανισμό πιο ευαίσθητο σε επεξεργασία με πίεση, υπεριώδη ακτινοβολία και με υπεροξειδίο του υδρογόνου σε σχέση με τη βλάστηση στα 500 MPa. Πρέπει να σημειωθεί βέβαια, ότι οι χρόνοι που απαιτήθηκαν για να επιτευχθεί βλάστηση των σπόρων ήταν μεγάλοι, της τάξης των 30 min.

3.4.2. Επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στα ένζυμα

Η επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση προκαλεί μεταβολές στην πρωτεϊνική δομή, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο την ενζυμική ενεργότητα. Η πίεση επηρεάζει τους δεσμούς υδρογόνου, προκαλώντας την αλλαγή της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Παράγοντες που επηρεάζουν την επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στα ένζυμα είναι ο χρόνος

επεξεργασίας, το pH, η θερμοκρασία, το μέσο στο οποίο βρίσκονται τα ένζυμα αλλά και η φύση των ενζύμων (Katsaros & Taoukis, 2015).

Η κύρια, έως τώρα, εφαρμογή της υπερυψηλής πίεσης είναι η επεξεργασία φρούτων, η ποιότητα των οποίων επηρεάζεται σημαντικά από τη δράση ενζύμων. Γι' αυτό και είναι απαραίτητη η συνέχιση των ερευνών της επίδρασης της υπερυψηλής πίεσης στα ένζυμα. Η επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στα ένζυμα διαφέρει ανάλογα με το υπόστρωμα, τη θερμοκρασία, την πίεση και το χρόνο άσκησης της πίεσης. Ο Knorr (1993), έδειξε ότι η πολυφαινολοξειδάση αντέχει μέχρι και 10 min στα 1200 MPa πριν απενεργοποιηθεί, η αντοχή της όμως μειώνεται σε υψηλότερες τιμές pH. Οι Hendrickx *et al.* (1998) μελέτησαν την επίδραση της προέλευσης του ενζύμου αυτού στην αντοχή του στην πίεση και απέδειξαν ότι οι πολυφαινολοξειδάσες από πατάτα και μανιτάρι απαιτούν 800 – 900 MPa για την απενεργοποίησή τους, ενώ τα αντίστοιχα ένζυμα από βερίκοκο, φράουλα και σταφύλι απενεργοποιούνται στα 100, 400 και 600 MPa αντίστοιχα. Η ηκτηνιστεράση, που προκαλεί τη ζελατινοποίηση συμπυκνωμάτων χυμών και αποσταθεροποίηση προϊόντων τομάτας, είναι λιγότερο ανθεκτική από την πολυφαινολοξειδάση, με μείωση της ενεργότητάς της σε πιέσεις πάνω από 300 MPa και πλήρη απενεργοποίηση πάνω από 700 MPa στους 45°C για 10 min (Fellows, 2000).

Συνήθως, η επεξεργασία των τροφίμων με υπερυψηλή πίεση έχει σκοπό την απενεργοποίηση ενζύμων, καθώς διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις συμβάλλουν στην αλλοίωση των τροφίμων. Υπάρχουν, όμως, περιπτώσεις στις οποίες είναι επιθυμητή η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας, όπως στην πήξη τυριού, όπου επιτυγχάνεται επιτάχυνση της πήξης και της ωρίμανσης του τυριού με την αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων της αρχικής καλλιέργειας. Η επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση έχει θετική επίδραση στην ενεργότητα πολλών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων και πρωτεασών (Eisenmenger & Reyes-De-Corcuera, 2009). Οι Giannoglou *et al.* (2016) μελέτησαν την επίδραση της υπερυψηλής πίεσης σε οξυγαλακτικές καλλιέργειες εκκίνησης (*Str. thermophilus: L. lactis: L. bugaricus* 2:1:1) που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή λευκού τυριού τύπου φέτας και απέδειξαν ότι η επεξεργασία τους στα 200 MPa για 20 min προκαλεί ενεργοποίηση των πρωτεασών τους, συμβάλλοντας στη μείωση του απαιτούμενου χρόνου ωρίμανσης και στη βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των τελικών προϊόντων. Άλλο παράδειγμα ενζύμου που ενεργοποιείται κατά την επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση αποτελεί η πολυφαινολοξειδάση μανιταριού, με επεξεργασία στα 400 MPa. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρήθηκε από τους Gomes *et al.* στις α- και β- αμυλάσες από βύνη κριθαριού κατά την επεξεργασία πολτών αλευριού σίτου και κριθαριού στα 400 – 600 MPa. Στο εύρος αυτό παρουσιάστηκε αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας, όμως μετά από 20 min στα 600 MPa η ενεργότητα μειώθηκε, υποδηλώνοντας ότι η απενεργοποίηση εξαρτάται από την πίεση και το χρόνο κατεργασίας. Η υπόθεση των ερευνητών είναι ότι στο εύρος 400 – 600 MPa πραγματοποιείται ζελατινοποίηση του αμύλου και το ενεργό κέντρο του ενζύμου τροποποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε να ευνοείται η υδρόλυση (Fellows, 2000; San Martin *et al.*, 2002).

3.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΥΤΟΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ

Συνοψίζοντας, διάφορες μελέτες έχουν δείξει το σημαντικό ρόλο των πρωτεολυτικών ενζύμων στην αυτόλυση της μαγιάς (Běhalová & Beran, 1979; Reed & Nagodawithana, 1990), καθώς και έχει γίνει λόγος για την αύξηση της ενεργότητας διάφορων πρωτεολυτικών ενζύμων κατά την επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση (Eisenmenger & Reyes-De-Corcuera, 2009; Giannoglou, *et al.*, 2016). Υπάρχουν επίσης, αναφορές για την αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης ουσιών από φυτικούς ιστούς κατά την επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση (Jun, 2009; Andreou, *et al.*, 2017). Από τα παραπάνω αναμένεται ότι η επεξεργασία της μαγιάς με υπερυψηλή πίεση μπορεί να ενισχύσει την ενεργότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων της και συνεπώς να αυξήσει την απόδοση της αυτόλυσης και την ποιότητα των παραγόμενων εκχυλισμάτων. Ωστόσο, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικές με την επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στην αυτόλυση της μαγιάς.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση τυροκομικών προϊόντων σε σχέση με την περιορισμένη παραγωγή τυριάς, καθιστά αναγκαία τη χρήση κι άλλων ενζύμων για την πήξη του γάλακτος. Έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες για την πηκτική ικανότητα πρωτεολυτικών ενζύμων μικροβιακής (Awad *et al.*, 1999; Cavalcanti *et al.*, 2005), και φυτικής (Chazarra *et al.*, 2007; Raposo & Domingos, 2008) προέλευσης, αλλά δεν έχει εξετασθεί ακόμη η πηκτική ικανότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων της μαγιάς. Σε αντίθεση με την τυριά, η μαγιά υπάρχει σε αφθονία στην αγορά και μάλιστα είναι πολύ οικονομική καθώς αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανίας ζυθοποιίας. Επίσης, ο *S. cerevisiae*, είναι αποδεδειγμένα ασφαλής μικροοργανισμός (Generally Recognized As Safe, GRAS) και δεν υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω μελέτη της καταλληλότητάς του για χρήση στα τρόφιμα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα εκχυλίσματα μαγιάς χρησιμεύουν ως ενισχυτικά γεύσης οπότε με τη χρήση τους για την πήξη του γάλακτος αντί για τη χρήση μεμονωμένων πρωτεολυτικών ενζύμων της μαγιάς μπορεί να επιτευχθεί η παρασκευή προϊόντων με καλύτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τη χρήση άλλων πηγών ενζύμων. Είναι προφανές λοιπόν, ότι αν τα πρωτεολυτικά ένζυμα του εκχυλίσματος μαγιάς έχουν ικανοποιητική πηκτική ικανότητα, η χρήση τους για την παρασκευή τυροκομικών προϊόντων συνοδεύεται από πολλά πλεονεκτήματα.

Με βάση όλα τα παραπάνω και ως συνέχεια της έρευνας των Λημναίος *et al.* (2018) στην επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στη διεργασία της αυτόλυσης, στην παρούσα εργασία μελετάται η επίδραση των διαφορετικών συνθηκών υπερυψηλής πίεσης αλλά και των διαφορετικών συνθηκών επώασης στην αυτόλυση της μαγιάς και ερευνάται η μεταβολή της ενεργότητας της πρωτεΐνάσης Α, της πρωτεΐνάσης Β και της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας του αιωρήματος μαγιάς στις συνθήκες αυτές. Στη συνέχεια ερευνάται η

ικανότητα των παραγόμενων εκχυλισμάτων μαγιάς στην πήξη του γάλακτος. Οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν και τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής, παρουσιάζονται στα επόμενα κεφάλαια.

A decorative graphic on the left side of the page consists of a thick, dark red vertical bar. A bright red arrow points horizontally from the right side of this bar towards the text.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία μπορεί να χωριστεί σε δύο σκέλη. Το πρώτο περιλαμβάνει τη μελέτη της επίδρασης της υπερυψηλής πίεσης, του χρόνου επώασης και της θερμοκρασίας επώασης στην ενεργότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων της μαγιάς. Στο δεύτερο σκέλος ερευνάται η πηκτική ικανότητα των ενζύμων αυτών σε υπόστρωμα γάλακτος.

Οι πειραματικές διαδικασίες που θα αναλυθούν παρακάτω πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Η επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού «Δήμητρα».

4.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΜΑΓΙΑΣ 15% w/w

Για την πραγματοποίηση της μελέτης των πρωτεολυτικών ενζύμων της μαγιάς χρησιμοποιήθηκε αιώρημα μαγιάς 15% w/w. Για την παρασκευή του αιωρήματος αρχικά προστίθεται γνωστή ποσότητα απιονισμένου νερού σε κωνική φιάλη, η οποία τίθεται υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια, προστίθεται σταδιακά στη φιάλη ποσότητα ξηρής μαγιάς (*S. cerevisiae*, Angel Yeast co. Ltd., Hubei, China, Lot no. 201503 CG), ίση με το 15% της μάζας του νερού, υπό συνεχή ανάδευση. Μόλις ολοκληρωθεί η προσθήκη της μαγιάς, η κωνική φιάλη αφήνεται να αναδευτεί για 20 min με στόχο την πλήρη ενυδάτωση των κυττάρων.

4.3. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΜΑΓΙΑΣ 15% w/w

Η διεργασία αυτή αποσκοπεί στη διάρρηξη των κυττάρων της μαγιάς έτσι ώστε να απελευθερωθεί το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο που περιέχει τα πρωτεολυτικά ένζυμα προς μελέτη. Για τον παραπάνω σκοπό χρησιμοποιήθηκε ο ομογενοποιητής υψηλής πίεσης SPX

APV 1000 (SPX Corporation, Charlotte, North Carolina, United States of America). Το αιώρημα μαγιάς εισάχθηκε στον ομογενοποιητή, ο οποίος είχε ρυθμιστεί σε πίεση λειτουργίας 800 bar, και συλλέχθηκε σε κωνική φιάλη από την έξοδο του μηχανήματος. Η διέλευση του αιωρήματος από τον ομογενοποιητή πραγματοποιήθηκε συνολικά τέσσερις φορές για να είναι ικανοποιητική η διάρρηξη των κυττάρων μαγιάς. Η συνθήκη αυτή επιλέχθηκε με βάση προηγούμενα πειράματα που έδειξαν ότι επεξεργασία του αιωρήματος στις συνθήκες αυτές οδηγεί στο μέγιστο βαθμό κυτταρικής διάρρηξης. Το επεξεργασμένο αιώρημα αποθηκεύτηκε στους -26 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω πειράματα.



Εικόνα 11: Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης SPX APV 1000. (SPX APV Lab Series Homogenisers, 2012)



Εικόνα 12: Παρασκευή αιωρήματος μαγιάς 15% w/w

4.4. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗ ΠΙΕΣΗ

Η μονάδα υπερυψηλής πίεσης που χρησιμοποιήθηκε είναι η Resato Food Pressure Unit FPU 1.01 (Resato International B.V., Assen, Netherlands), η οποία αποτελείται από ένα σύστημα υπερυψηλής πίεσης και δύο θαλάμους δοχείων πίεσης. Ο ένας θάλαμος περιέχει ένα κυλινδρικό δοχείο όγκου 1.5 L, ενώ ο άλλος περιέχει έξι δοχεία όγκου 42 mL. Όλα τα δοχεία πίεσης (το 1 μεγάλο και τα 6 μικρά), περιβάλλονται από μανδύα νερού θέρμανσης

και φέρουν πνευματικές βαλβίδες στα σημεία σύνδεσής τους με το σύστημα υπερυψηλής πίεσης. Επίσης, κάθε δοχείο πίεσης έχει το δικό του πώμα, το οποίο φέρει θερμοστοιχείο.

Το εύρος θερμοκρασιών στο οποίο μπορεί να λειτουργήσει το σύστημα υπερυψηλής πίεσης είναι από -40°C έως και 100°C και μπορεί να δημιουργήσει πίεση μέχρι και 1000 MPa, χρησιμοποιώντας ως μέσο μεταφοράς πίεσης πολυαιθυλενογλυκόλη. Η πίεση του συστήματος ρυθμίζεται από τον πίνακα ελέγχου, ο οποίος είναι εγκατεστημένος στο ίδιο το σύστημα, ενώ η καταγραφή της πίεσης καθ' όλη τη διάρκεια της επεξεργασίας γίνεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού που συνοδεύει τη μονάδα. Με το λογισμικό αυτό καταγράφεται και η θερμοκρασία που μετράει το θερμοστοιχείο στο πώμα του κάθε δοχείου, η οποία ρυθμίζεται με την κυκλοφορία θερμού νερού στους μανδύες των δοχείων πίεσης. Το νερό αυτό θερμαίνεται σε υδατόλουτρο και η κυκλοφορία του στο σύστημα γίνεται μέσω φυγοκεντρικής αντλίας. Για κάθε συνθήκη επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση, 200 mL ομογενοποιημένου κυτταρικού αιωρήματος συσκευάστηκαν σε συσκευασίες από διστρωματικό υλικό πολυαιθυλενίου-πολυπροπυλενίου. Μετά από αφαίρεση του αέρα, οι συσκευασίες σφραγίζονται και τοποθετούνται στο δοχείο επεξεργασίας. Μετά την επεξεργασία τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -26°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Οι συνθήκες πίεσης και χρόνου κατεργασίας που εφαρμόστηκαν δίνονται στον Πίνακα 5. Οι συνθήκες αυτές επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενα πειράματα από τα οποία διαπιστώθηκε επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στα πρωτεολυτικά ένζυμα της μαγιάς (Λημναίος, 2018). Όταν ο επιθυμητός χρόνος πίεσης είναι 0 min, το δείγμα παραμένει στο δοχείο μέχρι η πίεση να φτάσει την επιθυμητή τιμή κι ακολουθεί ακαριαία εκτόνωση του δοχείου.

Πίνακας 5

Συνθήκες πίεσης και χρόνου επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων

P [MPa]	t_p [min]
200	0
	10
	30
400	0
	2.5
	10
600	0
	2.5
	10



Εικόνα 13: Η μονάδα υπερυψηλής πίεσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα

A: Ο θάλαμος με το μεγάλο δοχείο πίεσης

B: Η συνολική μονάδα, με το σύστημα υπερυψηλής πίεσης αριστερά, τον θάλαμο με το μεγάλο δοχείο πίεσης στο κέντρο και το θάλαμο με τη συστοιχία των μικρών δοχείων πίεσης δεξιά

C: Η συστοιχία των 6 μικρών δοχείων πίεσης

4.5. ΕΠΩΑΣΗ

Για να διαπιστωθεί η επίδραση της αυτόλυσης στην ενεργότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων της μαγιάς, τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με υπερυψηλή πίεση τοποθετήθηκαν σε γυάλινα δοχεία όγκου 300 mL και επώαστηκαν σε θερμαινόμενο λουτρό υπό ήπια ανάδευση (170 rpm). Οι θερμοκρασιακές συνθήκες που επιλέχθηκαν για την επώαση ήταν 32, 42 και 52°C. Τα δοχεία πληρώθηκαν με 200 mL κυτταρικού αιωρήματος και στη συνέχεια πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενο λουτρό στην επιθυμητή θερμοκρασία. Ανά διαστήματα 2 h, από κάθε δοχείο επώασης λαμβάνονταν δείγματα με την εξής

διαδικασία: 2 mL κυτταρικού αιωρήματος τοποθετήθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρησης και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 12,000 g. Κατόπιν, το υπερκείμενο υγρό αποθηκεύτηκε σε σωληνάρια Eppendorf και καταψύχθηκε στους -26°C. Το υγρό αυτό θα αναφέρεται στο εξής ως “εκχύλισμα μαγιάς” ή “ενζυμικό διάλυμα”.

4.6. ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΖΟΚΑΖΕΪΝΗΣ

Η μέτρηση της συνολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας σε εκχυλίσματα μαγιάς πραγματοποιείται με υπόστρωμα αζοκαζεΐνης σύμφωνα με τους Bēhalonά και Beran (1979).

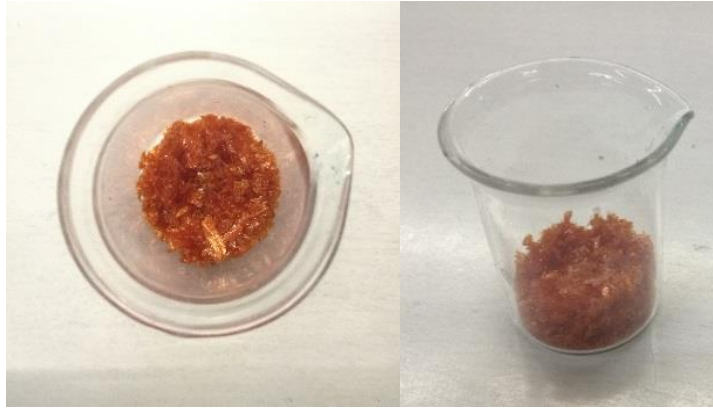
4.6.1. Παρασκευή υποστρώματος αζοκαζεΐνης 1% w/v

Σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – κιτρικού νατρίου 0.1 M και pH 6 προστέθηκε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε περιεκτικότητα 10% v/v. Στο διάλυμα που προέκυψε, προστέθηκε ποσότητα αζοκαζεΐνης, ίση με το 1% του όγκου του διαλύματος κιτρικού οξέος/DMSO και ακολούθησε ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυση της αζοκαζεΐνης.

4.6.2. Μεθοδολογία

Σε κωνικό σωληνάριο φυγοκέντρησης (Falcon®) προστέθηκαν 100 μL από το ενζυμικό διάλυμα προς μελέτη. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400 μL διαλύματος αζοκαζεΐνης 1% w/v, και το διάλυμα αναδεύτηκε με χρήση vortex. Το σωληνάριο, έπειτα, τοποθετήθηκε σε λουτρό θερμοκρασίας 40°C για 1h. Μετά την επώαση στους 40°C, προστέθηκαν στο σωληνάριο 500 μL τριχλωροξικού οξέος (TCA) 10% w/v ώστε να σταματήσει η ενζυμική δράση και να καταβυθιστεί η ποσότητα του υποστρώματος που δεν υδρολύθηκε. Το τελικό διάλυμα αναδεύτηκε με vortex και επώαστηκε στους 0°C για 30 min. Για την παρασκευή του τυφλού δείγματος τοποθετήθηκαν στο σωληνάριο 100 μL δείγματος, 500 μL TCA και 400 μL διαλύματος αζοκαζεΐνης, με αυτή τη σειρά, κι έπειτα ακολούθησε ανάδευση και επώαση στους 0°C για 30 min. Η συγκεκριμένη αλληλουχία προσθήκης των αντιδραστηρίων εξασφαλίζει ότι δεν θα πραγματοποιηθεί ενζυμική αντίδραση, καθώς το ένζυμο μετουσιώνεται από το τριχλωροξικό οξύ. Η συνέχεια ήταν κοινή, τόσο για το δείγμα προς

μελέτη όσο και για το τυφλό δείγμα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των σωληνάριων για 10 min στα 12,000 g. Μετά τη φυγοκέντρηση, 200 μ L υπερκείμενου υγρού μεταφέρθηκαν σε πλάκα μικροτιλοδότησης (microplate) με 96 φρέατα, και προσδιορίστηκε η απορρόφηση των φρεάτων στα 340 nm σε συσκευή μέτρησης πλακών μικροτιλοδότησης (Microplate reader). 1 Unit συνολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας ορίστηκε ως η ποσότητα του ενζύμου που δίνει μεταβολή στην απορρόφηση του υποστρώματος κατά μία μονάδα, στις συνθήκες της μεθόδου (1 h, 40°C).



Εικόνα 14: Αζοκαζεΐνη σε σκόνη, μέσα σε ποτήρι ζέσεως

4.7. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗΣ Β ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ ΜΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΑΖΟΖΕΛΑΤΙΝΗΣ

Η μέτρηση της ενεργότητας της πρωτεάσης Β σε κυτταρικά προϊόντα μαγιάς πραγματοποιείται με τη χρήση υποστρώματος αζοζελατίνης. Η χρήση του συγκεκριμένου υποστρώματος δικαιολογείται με βάση την επιλεκτική δράση της πρωτεάσης Β προς αυτό (Juni & Heym, 1968; Lenney, 1974; Beynon & Bond, 1989).

4.7.1. Παρασκευή διαλύματος αζοζελατίνης 2.4% w/v

Σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος – βορικού νατρίου 0.1 M με pH 9 προστέθηκε αζοζελατίνη σε ποσότητα ίση με το 2.4% του όγκου του διαλύματος. Ακολούθησε ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυση της αζοζελατίνης.

4.7.2. Μεθοδολογία

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν παρόμοια με αυτή της αζοκαζεΐνης. Συγκεκριμένα, 150 μL ενζυμικού διαλύματος προς μελέτη τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο φυγοκέντρησης, ακολουθούμενα από 250 μL διαλύματος αζοζελατίνης 2.4% w/v. Ακολούθησε ανάδευση με vortex και επώαση για 1 h σε υδατόλουτρο στους 40°C. Μετά την επώαση προστέθηκαν 600 μL TCA 40% w/v και το διάλυμα επώαστηκε στους 0°C για 30 min, αφού πρώτα αναδεύτηκε με vortex. Για την παρασκευή του τυφλού δείγματος, τα αντιδραστήρια τοποθετούνται και εδώ με την ίδια σειρά όπως και στη μέθοδο με υπόστρωμα αζοκαζεΐνης, δηλαδή πρώτα το δείγμα, μετά το TCA και τέλος το υπόστρωμα αζοζελατίνης. Έπειτα, οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 12,000 g και 600 μL από το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 700 μL NaOH 3.2 M. Το τελικό διάλυμα αναδεύτηκε και 200 μL από αυτό μεταφέρθηκαν σε πλάκα μικροτιτλοδότησης (microplate) για μέτρηση της απορρόφησης στα 520 nm. 1 Unit ενεργότητας πρωτεάσης B ορίστηκε ως η ποσότητα του ενζύμου που δίνει μεταβολή της απορρόφησης του υποστρώματος κατά μία μονάδα στα 520 nm στις συνθήκες της μεθόδου (1 h, 40°C).

Έχει αναφερθεί ότι τα ιόντα υδραργύρου (Hg^{2+}) δρουν ως παρεμποδιστές στην πρωτεΐνάση B και την καρβοξυπεπτιδάση Y αλλά όχι στην πρωτεΐνάση A (Hata *et al.*, 1967). Αυτό μελετήθηκε και στην παρούσα έρευνα με προσθήκη χλωριούχου υδραργύρου ($HgCl_2$) στο ενζυμικό διάλυμα και μέτρηση της ενεργότητας με τη μέθοδο της αζοζελατίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πλήρη απενεργοποίηση, πράγμα που επιβεβαιώνει την παρεμποδιστική δράση των ιόντων υδραργύρου στην πρωτεΐνάση B.



Εικόνα 15: Αζοζελατίνη σε σκόνη, μέσα σε ποτήρι ζέσεως

4.8. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗΣ Α ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ ΜΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΕΤΟΥΣΙΩΜΕΝΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Η ενεργότητα της πρωτεάσης Α στα δείγματα μετρήθηκε σε υπόστρωμα μετουσιωμένης αιμοσφαιρίνης. Η χρήση του συγκεκριμένου υποστρώματος δικαιολογείται με βάση την επιλεκτική δράση της πρωτεάσης Α προς αυτό (Hata *et al.*, 1967; Lenney, 1974; Běhalová & Beran, 1979).

4.8.1. Παρασκευή διαλύματος μετουσιωμένης αιμοσφαιρίνης 1% w/v

Σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε 0.5 g βόειας αιμοσφαιρίνης προστέθηκαν 10mL νερού και το μίγμα αναδεύτηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι την πλήρη διάλυση της αιμοσφαιρίνης. Έπειτα, προστέθηκαν 3 mL HCl 0.3 M και έγινε έλεγχος του pH. Εάν το pH δεν βρισκόταν μεταξύ 1 και 2, τότε προστίθεται επιπλέον ποσότητα του ίδιου διαλύματος HCl μέχρι το pH να είναι εντός των παραπάνω ορίων. Το υπόστρωμα αφέθηκε για 1 h να διαλυτοποιηθεί πλήρως υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια προστέθηκαν 1.05 g κιτρικού οξέος και 0.5 mL αζιδίου του νατρίου (NaN_3) 1% και το τελικό διάλυμα αραιώθηκε σε τελικό όγκο 25 mL με νερό σε ογκομετρική φιάλη. Το υπόστρωμα σε αυτή τη μορφή μπορεί να διατηρηθεί για αρκετούς μήνες στους 4°C. Πριν τη χρήση, το σύνολο της ποσότητας (25 mL) αραιώθηκε περαιτέρω σε τελικό όγκο περίπου 35-40 mL και ακολούθησε ρύθμιση του pH στην τιμή 3.4 με διάλυμα KOH 2 M. Τέλος, το υπόστρωμα αραιώθηκε με νερό σε τελικό όγκο 50 mL σε ογκομετρική φιάλη.

4.8.2. Μεθοδολογία

Σε σωληνάριο φυγοκέντρησης, προστέθηκαν 100 μL διαλύματος ενζύμων προς μέτρηση. Ακολούθησε προσθήκη 750 μL υποστρώματος μετουσιωμένης αιμοσφαιρίνης 1% w/v και ανάδευση με vortex. Το σωληνάριο τοποθετήθηκε σε λουτρό θερμοκρασίας 40°C για 1 h και αμέσως μετά προστέθηκαν 1.25 mL TCA 0.34 N. Η παρασκευή του τυφλού δείγματος και σε αυτή τη μεθοδολογία ακολουθεί την αλληλουχία προσθήκης αντιδραστηρίων: δείγμα \rightarrow TCA \rightarrow υπόστρωμα. Το διάλυμα αναδεύτηκε με vortex και επώαστηκε στους 0°C για 30 min. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 12,000 g για 10 min και 750 μL υπερκείμενου μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα, προστέθηκε στο δοκιμαστικό σωλήνα 1.5 mL από διάλυμα NaOH 0.3 N με

περιεκτικότητα 2.9% w/v σε Na_2CO_3 και ακολούθησε ανάδευση με ταυτόχρονη προσθήκη 450 μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Το διάλυμα που προέκυψε επωάστηκε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και 200 μL μεταφέρθηκαν σε πλακα μικροτιτλοδότησης για μέτρηση της απορρόφησης στα 650 nm. 1 Unit ενεργότητας πρωτεάσης A ορίστηκε ως η ποσότητα του ενζύμου που έδωσε μεταβολή της απορρόφησης κατά μία μονάδα, στις συνθήκες της μεθόδου (1 h, 40°C).

Με προσθήκη χλωριούχου υδραργύρου στο ενζυμικό διάλυμα και με μέτρηση της ενεργότητας με τη μέθοδο της αζοζελτίνης επιβεβαιώθηκε η παρεμποδιστική δράση των ιόντων υδραργύρου στην πρωτεΐνωση B. Με τη μέτρηση της ενεργότητας του ίδιου δείγματος με τη μέθοδο της μετουσιωμένης αιμοσφαιρίνης επιβεβαιώθηκε ότι τα ιόντα υδραργύρου δεν δρουν παρεμποδιστικά στην ενεργότητα της πρωτεΐνωσης A.



Εικόνα 16: Βόεια αιμοσφαιρίνη σε σκόνη, μέσα σε ποτήρι ζέσεως

4.9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΗΞΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BERRIDGE

Για τον προσδιορισμό του χρόνου πήξης γάλακτος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Berridge (1952), όπως τροποποιήθηκε από τους Arima, Yu και Iwasaki (1970).

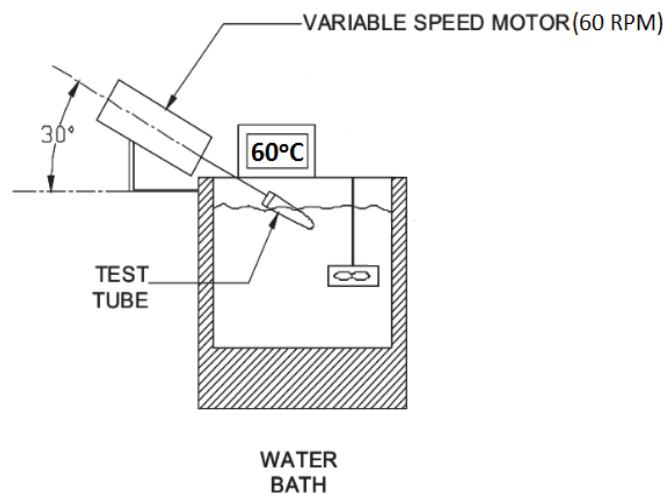
4.9.1. Παρασκευή υποστρώματος γάλακτος

Για την παρασκευή υποστρώματος γάλακτος, 12 g σκόνης γάλακτος (Skim milk powder Epi Ingredients, 1.25% λιπαρά, 34% πρωτεΐνη) αναδιαλύθηκαν σε 100 mL

διαλύματος CaCl_2 . Για τη μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 10 mM και 20 mM. Το υπόστρωμα αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα για 10 min ώστε να αναδιαλυθεί πλήρως η σκόνη γάλακτος.

4.9.2. Μέτρηση του χρόνου πήξης

Για τη μέτρηση του χρόνου πήξης των ενζυμικών εκχυλισμάτων μαγιάς σε διαφορετικές θερμοκρασίες, 10 mL υποστρώματος γάλακτος τοποθετήθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρωσης και προθερμάνθηκαν σε υδατόλουτρο για 5 min. Κατόπιν, 1 mL από κάθε ενζυμικό διάλυμα προστέθηκε στο υπόστρωμα και έγινε εκκίνηση χρονομέτρου. Ο σωλήνας τοποθετήθηκε σε περιστρεφόμενη συσκευή που τον διατηρούσε βυθισμένο υπό γωνία 30° στο υδατόλουτρο. Η ταχύτητα περιστροφής ρυθμίστηκε στα 60 rpm και ακολούθησε οπτική παρατήρηση των τοιχωμάτων του σωλήνα. Ως χρόνος πήξης ορίστηκε η χρονική στιγμή στην οποία εμφανίστηκαν τα πρώτα στερεά σωματίδια στα τοιχώματα του σωλήνα. Η μέτρηση του χρόνου πήξης πραγματοποιήθηκε για τις δύο συγκεντρώσεις χλωριούχου ασβεστίου σε θερμοκρασίες 40, 50, 60, 65, 70 και 75°C .



Εικόνα 17: Αναπαράσταση της διάταξης που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του χρόνου πήξης

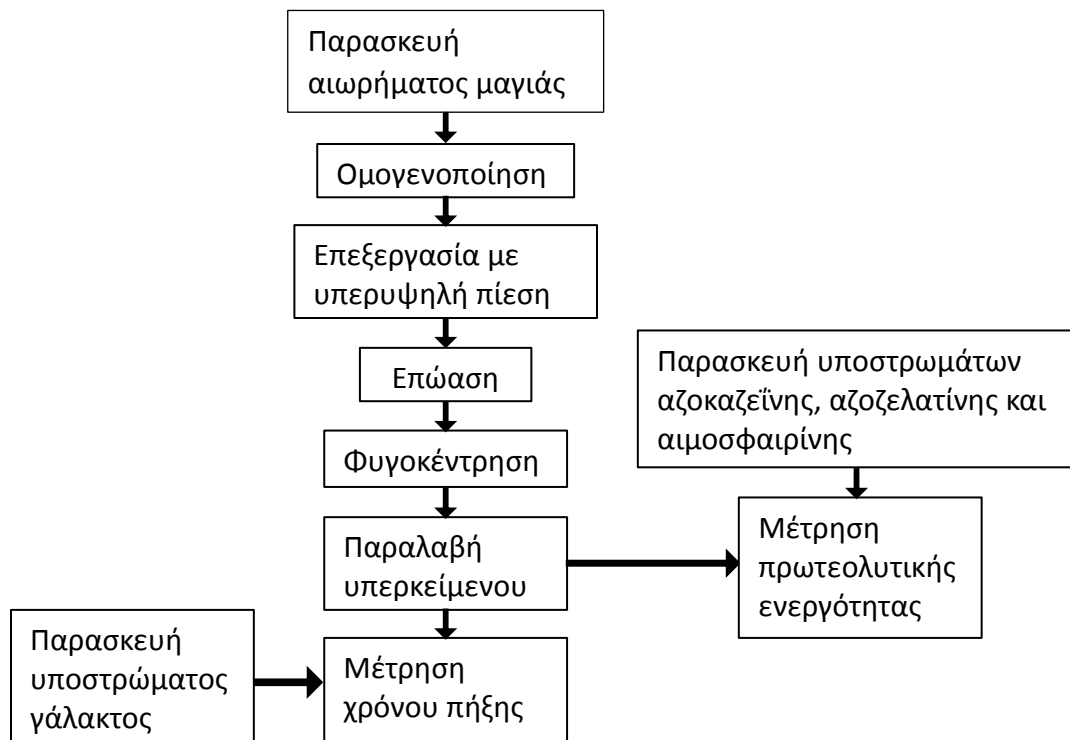
Επειδή η παραπάνω μέθοδος βασίζεται στην οπτική παρατήρηση δημιουργίας στερεών σωματιδίων, εξετάστηκε η επαναληψιμότητά της με χρήση γνωστού διαλύματος πυτιάς πριν αυτή χρησιμοποιηθεί για τα εκχυλίσματα μαγιάς. Τα αποτελέσματα έδειξαν αμελητέα

απόκλιση στους χρόνους πήξης που προέκυψαν και η μέθοδος κρίθηκε κατάλληλη για τη μέτρηση του χρόνου πήξης.

4.10. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ

Για τον προσδιορισμό της απώλειας πήξης του γάλακτος με τη θερμοκρασία, 2 mL ενζυμικού εκχυλίσματος από επιλεγμένη συνθήκη επώασης (ανεπεξέργαστο δείγμα, 23 ώρες επώασης στους 32°C) τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες και κατόπιν σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας για χρονικά διαστήματα 2.5, 5, 10 και 15 min για θερμοκρασίες 50 και 60°C και 0.5, 1, 1.5 και 2 min για θερμοκρασίες 65 και 70°C. Κατόπιν, τα δείγματα ψύχθηκαν σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία δωματίου και προσδιορίστηκε ο χρόνος πήξης με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω, στους 50 °C με υπόστρωμα γάλακτος συγκέντρωσης 20 mM σε χλωριούχο ασβέστιο.

Στην Εικόνα 18 δίνεται ένα διάγραμμα ροής που περιλαμβάνει τις πειραματικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την έρευνα και αναπτύχθηκαν παραπάνω.



Εικόνα 18: Διάγραμμα ροής της παρούσας εργασίας

A decorative graphic on the left side of the page consists of a thick, dark red vertical bar. A bright red arrow points horizontally from the right edge of this bar towards the right, overlapping the text area.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

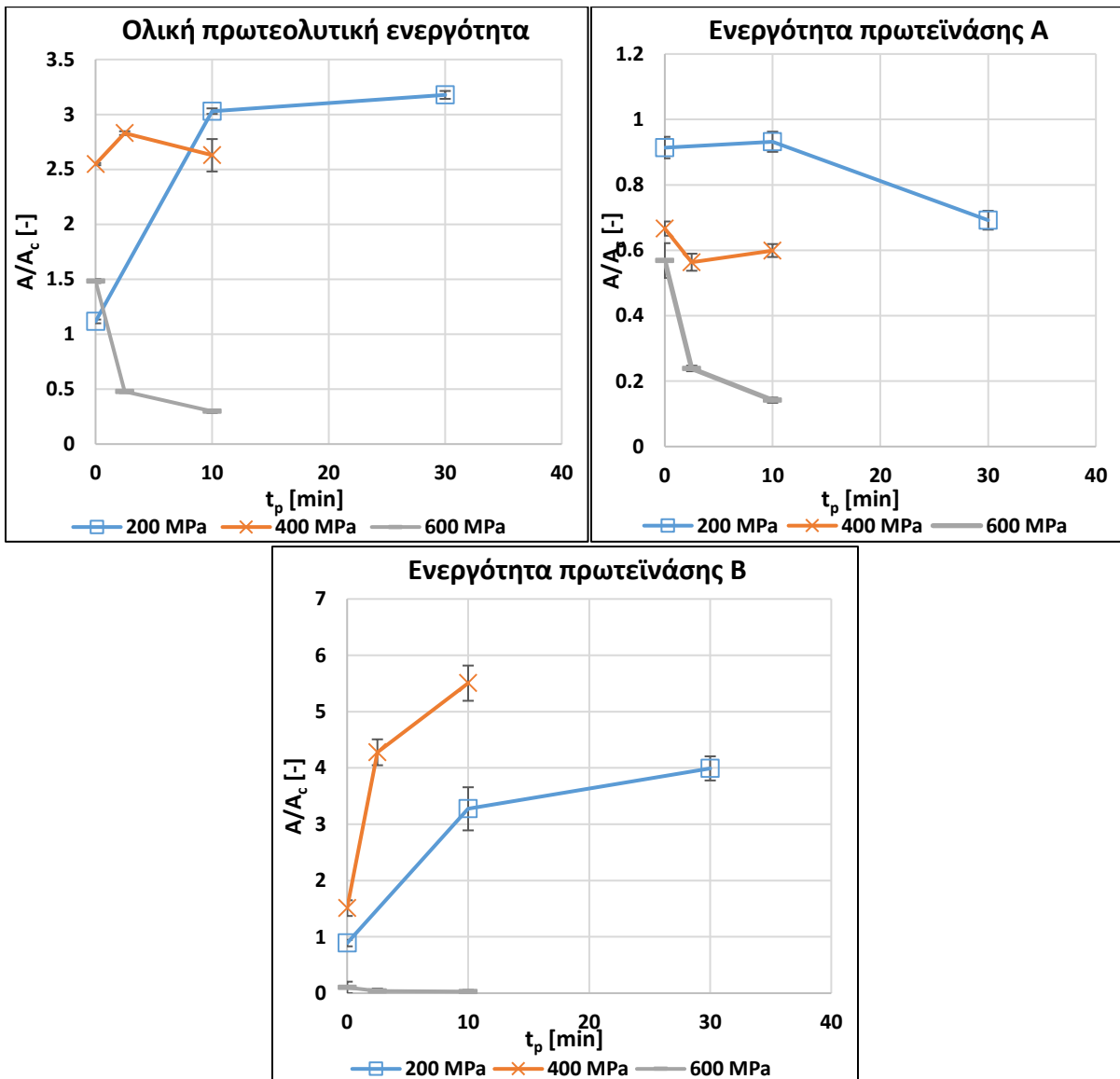
5.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΟΥ ΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΜΑΓΙΑΣ

Τα παρασκευασμένα αιωρήματα μαγιάς υποβλήθηκαν σε τρεις διαφορετικές πιέσεις (200, 400 και 600 MPa) για διάφορα χρονικά διαστήματα για να μελετηθεί η επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στα πρωτεολυτικά ένζυμα που περιέχουν. Η μέτρηση της πρωτεολυτικής ενεργότητας των παραπάνω δειγμάτων έγινε σε τρία υποστρώματα για να εξαχθούν συμπεράσματα τόσο ως προς την συνολική πρωτεολυτική ενεργότητα, όσο και για τη μεμονωμένη ενεργότητα της πρωτεΐνάσης Α και της πρωτεΐνάσης Β. Έχει ήδη αποδειχθεί από τις μελέτες των Běhalová *et al.*, Hata *et al.*, Ilany *et al.* και Lenney *et al.* ότι με χρήση αζοκαζεΐνης ως υπόστρωμα μπορεί να μετρηθεί η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα του αιωρήματος μαγιάς, ενώ η αζοζελατίνη και η μετουσιωμένη αιμοσφαιρίνη είναι πιο επιλεκτικά υποστρώματα και υδρολύονται μόνο από την πρωτεΐνάση Β και Α αντίστοιχα. Στο Σχήμα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων ενζυμικής ενεργότητας στα δείγματα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση με τις μεθόδους αζοκαζεΐνης, αζοζελατίνης και αιμοσφαιρίνης, όπως αυτές περιγράφονται στο κεφάλαιο 4.

Στο πρώτο διάγραμμα του Σχήματος 1 παρατηρείται η επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στην ολική πρωτεολυτική ενεργότητα. Η επεξεργασία στα 200 MPa για 0 min, προκαλεί 12% αύξηση στην ολική πρωτεολυτική ενεργότητα, ενώ με επεξεργασία για 10 min στην ίδια πίεση παρατηρείται τριπλασιασμός της ενεργότητας (200% αύξηση). Με περαιτέρω αύξηση του χρόνου επεξεργασίας η αύξηση στην ενεργότητα είναι πολύ μικρότερη, με τιμή στα 30 min μόνο 20% υψηλότερη από την τιμή στα 10 min. Η στιγμιαία (0 min) υποβολή του δείγματος σε 400 MPa προκαλεί αύξηση της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας κατά 155%, ενώ επεξεργασία για 2.5 min στην ίδια πίεση προκαλεί περαιτέρω αύξηση 28%, δηλαδή συνολική αύξηση 183%. Με επεξεργασία, όμως, στα 400 MPa για περισσότερο από 2.5 min, αρχίζει να παρατηρείται απενεργοποίηση, με την ενεργότητα μετά από 10 min να είναι κατά 20% χαμηλότερη από την ενεργότητα στα 2.5 min. Η επεξεργασία στα 600 MPa, ενώ προκαλεί αύξηση της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας κατά 48% για 0 min επεξεργασίας, μετά από 2.5 min προκαλεί μείωση της ενεργότητας κατά 52% σε σχέση με αυτή του ανεπεξεργαστού δείγματος. Η απενεργοποίηση γίνεται εντονότερη στα 10 min, όπου η τελική ενεργότητα είναι μόλις το 30% της ενεργότητας του ανεπεξεργαστού δείγματος.

Καμία από τις συνθήκες πίεσης και χρόνου επεξεργασίας που μελετήθηκαν δεν προκάλεσε την ενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης Α όπως φαίνεται στο δεύτερο διάγραμμα

του Σχήματος 1. Συγκεκριμένα, εφαρμογή πίεσης 200 MPa στο δείγμα για 0 – 10 min προκαλεί μείωση της ενεργότητας κατά περίπου 8%, ενώ μετά από 30 min επεξεργασίας η ενεργότητα της πρωτεΐνης A έχει μειωθεί συνολικά κατά 31%. Με επεξεργασία στα 400 MPa για 0 min η ενεργότητα μειώνεται κατά 33%, για 2.5 min μειώνεται κατά 44%, ενώ για 10 min μειώνεται κατά 40%, που σημαίνει ότι υπήρξε μια μικρή αύξηση στην ενεργότητα από τα 2.5 min κατεργασίας στα 10 min. Στα 600 MPa η απενεργοποίηση είναι πιο έντονη, με μείωση της ενεργότητας κατά 43% για 0 min κατεργασίας, 76% για 2.5 min, ενώ μετά από 10 min έχει παραμείνει μόνο το 14% της ενεργότητας της πρωτεΐνης A του ανεπεξεργαστου δείγματος.



Σχήμα 1: Διαγράμματα του λόγου της ενεργότητας των επεξεργασμένων με υπερυψηλή πίεση δειγμάτων προς την ενεργότητα του ανεπεξεργαστου δείγματος (A/A_c) σε συνάρτηση με το χρόνο πίεσης (t_p).

Η ενεργότητα της πρωτεΐνάσης Β (τρίτο διάγραμμα του Σχήματος 1), κατά την επεξεργασία του δείγματος στα 200 MPa για 0 min, μειώνεται κατά 11%, όμως παρατηρείται 227% αύξηση με κατεργασία για 10 min και 399% αύξηση για 30 min. Ακόμη μεγαλύτερη ενεργοποίηση παρατηρείται στα 400 MPa όπου η ενεργότητα αυξάνεται κατά 51%, 328% και 451% με επεξεργασία για 0, 2.5 και 10 min αντίστοιχα. Τέλος, παρατηρείται έντονη απενεργοποίηση με την εφαρμογή πίεσης 600 MPa, με 90% μείωση της ενεργότητας για 0 min κατεργασίας και 97% μείωση μετά από 10 min.

Συνοψίζοντας, μεγαλύτερη αύξηση στην ολική πρωτεολυτική ενεργότητα παρατηρείται με εφαρμογή πίεσης 200 MPa για 30 min, η πρωτεΐνάση Α δεν ενεργοποιείται με καμία συνθήκη υπερυψηλής πίεσης, ενώ η πρωτεΐνάση Β εμφανίζει μέγιστη ενεργοποίηση κατά την επεξεργασία με πίεση 400 MPa για 10 min. Οι μεταβολές αυτές επιβεβαιώνουν προηγούμενα πειράματα που έχουν διεξαχθεί στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, στα οποία μελετήθηκε η επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στην συνολική πρωτεολυτική ενεργότητα αμέσως μετά την επεξεργασία. Η ενεργοποίηση των πρωτεολυτικών ενζύμων κατά την επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση οφείλεται είτε στην τροποποίηση της δομής των ενζύμων λόγω της επεξεργασίας, είτε στην επίδραση της πίεσης στον τρόπο αλληλεπίδρασης των ενζύμων με τους αντίστοιχους παρεμποδιστές. Καθώς η ενεργότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων εξαρτάται και από το χρόνο αυτόλυσης, όπως συζητήθηκε παραπάνω, κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί αναλυτικότερα η σχέση αυτή.

5.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΥΤΟΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΟΥ ΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΜΑΓΙΑΣ

Τα αιωρήματα ομογενοποιημένης μαγιάς, αφού επεξεργάστηκαν σε πιέσεις 200, 400 και 600 MPa για χρόνους πίεσης 0, 2.5 10 και 30 min, επώαστηκαν σε θερμοκρασίες 32, 42 και 52°C για χρόνους επώασης 0 – 23 h. Στις παρακάτω παραγράφους παρουσιάζονται σε μορφή διαγραμμάτων τα αποτελέσματα των μετρήσεων ενζυμικής ενεργότητας για όλα τα πιεσμένα και επωασμένα δείγματα, ώστε να μελετηθεί η συνδυαστική δράση της επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση και της αυτόλυσης που λαμβάνει χώρα κατά την επώαση.

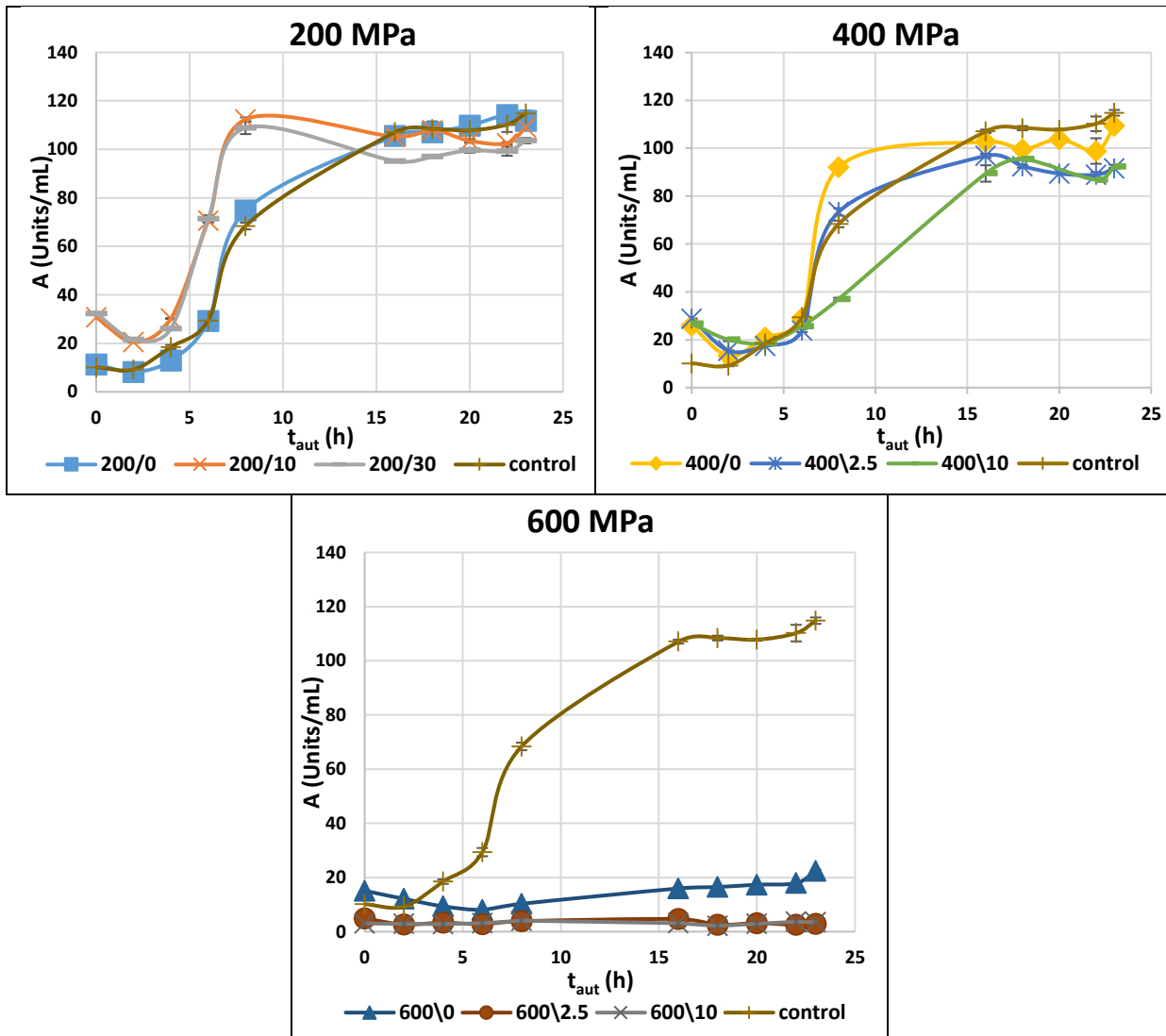
5.2.1 Επίδραση στην ολική πρωτεολυτική ενεργότητα

Στα Σχήματα 2, 3, 4 παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας σε σχέση με το χρόνο επώασης σε θερμοκρασία 32, 42 και 52°C αντίστοιχα. Το κάθε σχήμα περιλαμβάνει 3 διαγράμματα, ένα για κάθε συνθήκη πίεσης. Κάθε καμπύλη του κάθε διαγράμματος προκύπτει από ένα χρόνο επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση. Για παράδειγμα, η καμπύλη στο πρώτο διάγραμμα του Σχήματος 2 στην οποία τα πειραματικά σημεία παρουσιάζονται ως μπλε τετράγωνα, αντιστοιχεί σε πίεση 200 MPa και σε χρόνο επεξεργασίας 0 min. Η καμπύλη αυτή συμβολίζεται 200/0 και γενικότερα ο συμβολισμός όλων των καμπύλων από εδώ και στο εξής θα ακολουθεί τη μορφή P/t_p, όπου P η πίεση επεξεργασίας σε MPa και t_p ο χρόνος επεξεργασίας σε min. Η καμπύλη του ανεπεξέργαστου δείγματος (control) υπάρχει και στα τρία διαγράμματα για ευκολία σύγκρισης των τριών διαγραμμάτων μεταξύ τους. Σημειώνεται ότι η γραμμή που ενώνει τα πειραματικά σημεία σε κάθε καμπύλη έχει προστεθεί για ευκολία ανάγνωσης του διαγράμματος και εξαγωγής συμπερασμάτων και δεν έχει κάποια φυσική σημασία.

Στο πρώτο διάγραμμα του Σχήματος 2 φαίνεται ότι η ενεργότητα του δείγματος που έχει υποστεί επεξεργασία στα 200 MPa για 0 min μεταβάλλεται κατά την επώαση, με παρόμοιο τρόπο με την ενεργότητα του ανεπεξέργαστου δείγματος. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο καθώς η πίεση που ασκήθηκε στο δείγμα θεωρείται χαμηλή σε όρους υπερυψηλής πίεσης και ο χρόνος επεξεργασίας είναι πρακτικά μηδενικός. Παρατηρείται όμως ότι τα δείγματα, επεξεργασμένα για 10 και 30 min παρουσιάζουν υψηλότερη ενεργότητα σε σχέση με το ανεπεξέργαστο δείγμα τις πρώτες 15 h επώασης. Συγκεκριμένα, στα δύο αυτά δείγματα παρατηρείται ίδια συμπεριφορά της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας για τις πρώτες 8 h επώασης, με μια μικρή ελάττωση της ενεργότητας τις πρώτες 2 h και μια συνεχή αύξηση μέχρι τις 8 h. Επίσης, οι μέγιστες ενεργότητες των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε πίεση 200 MPa για 10 και 30 min παρατηρήθηκαν στις 8 h επώασης και είναι ίσες με 112.38 ± 0.81 και 108.87 ± 2.58 U/mL αντίστοιχα, ενώ για το ανεπεξέργαστο δείγμα παρατηρείται στις 23 h και είναι ίση με 114.82 ± 1.19 U/mL. Συνεπώς επιτυγχάνεται επιτάχυνση της ενεργοποίησης κατά την αυτόλυση με προεπεξεργασία των αιωρημάτων στις συνθήκες αυτές.

Στο δεύτερο διάγραμμα του Σχήματος 2 παρατηρείται ότι η επεξεργασία στα 400 MPa αρχικά αυξάνει την ενζυμική ενεργότητα καθώς για χρόνο επώασης 0 h (αμέσως μετά την επεξεργασία) τα δείγματα που επεξεργάστηκαν στα 400 MPa εμφανίζουν κατά 150 – 180% υψηλότερη ενεργότητα από το αντίστοιχο ανεπεξέργαστο. Και για τους τρεις χρόνους επεξεργασίας που μελετήθηκαν, η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα μειώνεται κατά τις 2 πρώτες ώρες της επώασης και στη συνέχεια αυξάνεται απότομα μετά τις 6 h. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ενώ η επεξεργασία στα 400 MPa φαίνεται να αυξάνει την πρωτεολυτική ενεργότητα αμέσως μετά την επεξεργασία (χρόνος 0 της επώασης), η τάση αυτή διαφοροποιείται σημαντικά μετά τις 6 h επώασης με την επεξεργασία για 0 min να

εμφανίζει κατά 35% υψηλότερη ενεργότητα και την επεξεργασία για 10 min κατά 46% χαμηλότερη ενεργότητα σε σχέση με το ανεπεξεργαστο δείγμα στις 8 h επώασης.



Σχήμα 2: Ολική πρωτεολυτική ενεργότητα σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στους 32°C.

Η υποβολή των δειγμάτων σε πίεση 600 MPa προκαλεί απενεργοποίηση των ενζύμων, όπως φαίνεται και στο τρίτο διάγραμμα του Σχήματος 2. Η συνθήκη 600/0 οδηγεί σε αύξηση της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας πριν την επώαση κατά 48% σε σχέση με το ανεπεξεργαστο δείγμα, η οποία όμως παραμένει σταθερή κατά την επώαση, σε αντίθεση με αυτή του ανεπεξεργαστου δείγματος, που αυξάνεται κατά περίπου μια τάξη μεγέθους μετά από 23 h επώασης στους 32°C. Για χρόνους επεξεργασίας 2.5 και 10 min στα 600 MPa

παρατηρείται πλήρης απενεργοποίηση των ενζύμων, όπως φαίνεται και από τις καμπύλες 600/2.5 και 600/10.

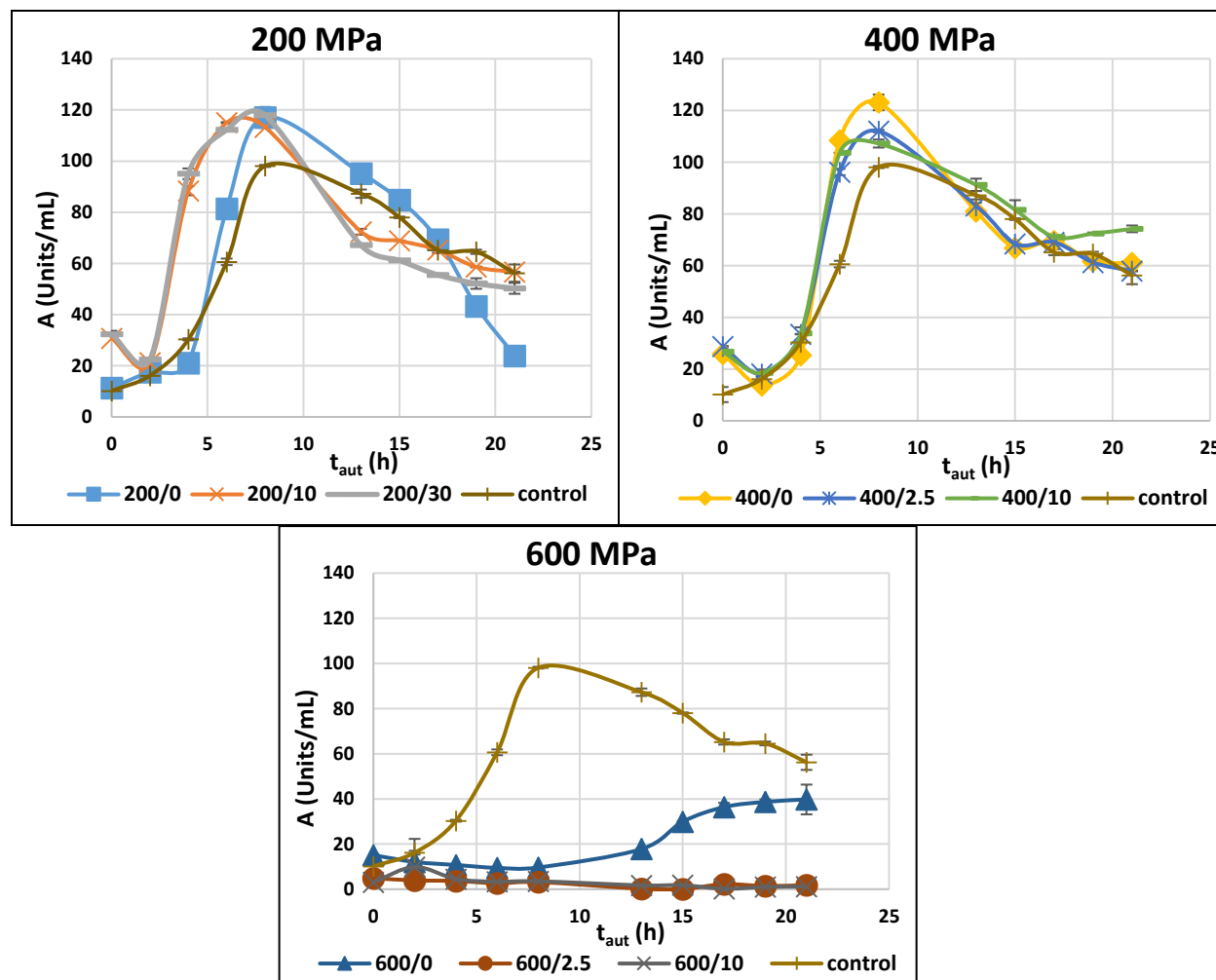
Συνολικά για την επώαση στους 32°C, παρατηρείται αύξηση της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας τόσο του ανεπεξέργαστου δείγματος όσο και των περισσότερων επεξεργασμένων δειγμάτων, με την διαφορά ότι τα περισσότερα επεξεργασμένα δείγματα εμφανίζουν μείωση στην ενεργότητα τις πρώτες 2 h, ενώ στο ανεπεξέργαστο και στο δείγμα 200/0 η ενεργότητα παραμένει σταθερή στο ίδιο διάστημα. Συνοψίζοντας, σε συνδυασμό με την επώαση στους 32°C, η επεξεργασία των δειγμάτων στα 200 MPa για 10 και 30 min καθώς και στα 400 MPa για 0 min επιταχύνουν μεγαλύτερη αύξηση της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας σε σχέση με το ανεπεξέργαστο δείγμα, ενώ η επεξεργασία στα 600 MPa προκαλεί απενεργοποίηση των ενζύμων.

Στο Σχήμα 3 δίνεται η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα των δειγμάτων σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στους 42°C για κάθε συνθήκη πίεσης και χρόνου πίεσης, όπως και στο Σχήμα 2 για τους 32°C. Εδώ παρατηρείται διαφορετική εξέλιξη της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας σε σχέση με την επώαση στους 32°C. Συνολικά παρατηρείται ότι η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα του ανεπεξέργαστου δείγματος καθώς και των δειγμάτων που επεξεργάστηκαν στα 200 και 400 MPa εμφανίζουν μέγιστο στις 8 h επώασης, ενώ μειώνονται μέχρι τις 21 h.

Στο πρώτο διάγραμμα του Σχήματος 3 παρουσιάζεται η εξέλιξη της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας των δειγμάτων επεξεργασμένων στα 200 MPa σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στους 42°C. Όπως και στη θερμοκρασία των 32°C, αμέσως μετά την επεξεργασία (χρόνος 0 της επώασης) παρατηρείται μία αύξηση της ενεργότητας κατά 200 – 220% ακολουθούμενη από μία μείωση μέχρι τις 2 h της επώασης για τα δείγματα με χρόνο πίεσης 10 και 30 min. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα δείγματα αυτά επιτυγχάνουν συνολική πρωτεολυτική ενεργότητα ίση με 95.04 ± 2.09 U/mL στις 4 h, συγκρίσιμη με αυτή του ανεπεξέργαστου δείγματος στις 8 h επώασης (98.12 ± 0.40 U/mL). Η επιτάχυνση αυτή δεν παρατηρείται αντίστοιχα στο δείγμα που επεξεργάστηκε για 0 min. Ωστόσο, μέχρι και τις 8 h επώασης, τα δείγματα που επεξεργάστηκαν στα 200 MPa και για τους τρεις χρόνους επεξεργασίας (0, 10 και 30 min), επιτυγχάνουν ενζυμική ενεργότητα κατά 19% υψηλότερη σε σχέση με το ανεπεξέργαστο δείγμα. Ακολούθως, μετά τις 8 h επώασης, η πρωτεολυτική ενεργότητα μειώνεται μέχρι τις 21 h επώασης. Η εφαρμογή, λοιπόν, πίεσης 200 MPa έχει θετικά αποτελέσματα και κατά την επώαση στους 42°C, καθώς οδηγεί τόσο σε αυξημένη πρωτεολυτική ενεργότητα, όσο και σε επιτάχυνση της ενεργοποίησης των πρωτεολυτικών ενζύμων κατά την επώαση.

Στο δεύτερο διάγραμμα του Σχήματος 3 παρατηρείται ότι τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με υπερυψηλή πίεση και για τους τρεις χρόνους επεξεργασίας (0, 2.5 και 10 min) στα 400 MPa εμφανίζουν, όπως και στην επεξεργασία στα 200 MPa, μια πτώση στην ενεργότητα τις πρώτες 2 h επώασης και στη συνέχεια ραγδαία αύξηση μέχρι τις 6 – 8 h, μετά από τις οποίες ακολουθεί μείωση. Σε αντίθεση με την επώαση στους 32°C, η συνθήκη 400/10 προκαλεί αύξηση της ολικής ενζυμικής ενεργότητας σε σχέση με αυτή του ανεπεξέργαστου

δείγματος κατά την επώαση στους 42°C. Η συνθήκη 400/0 προκαλεί τη μέγιστη ενεργοποίηση των ενζύμων, η οποία επιτυγχάνεται στις 8 h επώασης, δίνοντας ενεργότητα ίση με 123.14 ± 3.03 U/mL. Η τιμή αυτή είναι κατά 25.5% υψηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη ενεργότητα του ανεπεξεργαστου δείγματος στις 8 h επώασης (98.12 ± 0.40 U/mL).

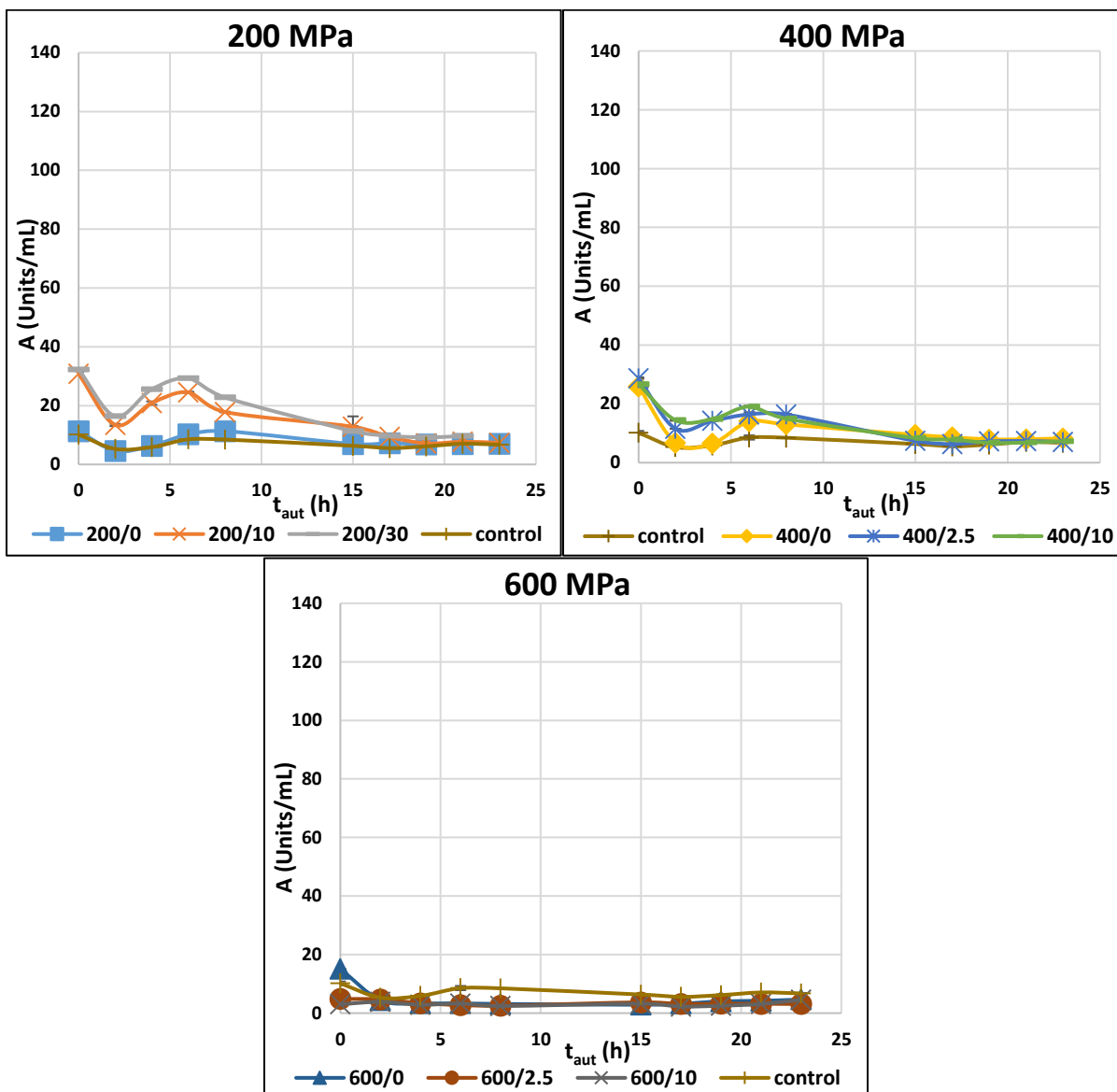


Σχήμα 3: Ολική πρωτεολυτική ενεργότητα σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στους 42°C.

Η επεξεργασία στα 600 MPa σε συνδυασμό με επώαση στους 42°C (τρίτο διάγραμμα του Σχήματος 3) οδηγεί σε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που παρατηρούνται στους 32°C, με μόνη διαφορά ότι η συνθήκη 600/0 προκαλεί μια αύξηση από τις 13 h επώασης και μετά στους 42°C, καταλήγοντας σε περίπου διπλάσια ενζυμική ενεργότητα σε σχέση με την ίδια συνθήκη στους 32°C. Οι συνθήκες 600/2.5 και 600/10 οδηγούν σε πλήρη απενεργοποίηση των ενζύμων και σε αυτή την περίπτωση.

Συνολικά, η επεξεργασία του αιωρήματος στα 200 κα 400 MPa έχει θετική επίδραση στην ολική πρωτεολυτική ενεργότητα κοντά στην περιοχή που οι καμπύλες παρουσιάζουν μέγιστο (6 – 8 h), ενώ η επεξεργασία στα 600 MPa δεν οδηγεί σε αύξηση της πρωτεολυτικής ενεργότητας.

Στο Σχήμα 4 παρουσιάζεται η εξέλιξη της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας με το χρόνο επώασης σε θερμοκρασία 52°C. Σημειώνεται ότι οι άξονες δεν προσαρμόστηκαν στα πειραματικά σημεία του Σχήματος 4, αλλά διατηρούνται επί τούτου στην ίδια κλίμακα με αυτούς των παραπάνω διαγραμμάτων για ευκολία της σύγκρισής τους. Συνολικά μπορεί



Σχήμα 4: Ολική πρωτεολυτική ενεργότητα σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στους 52°C

να διαπιστωθεί ότι κατά την επώαση στους 52°C δεν παρατηρείται αύξηση της ενεργότητας της κλίμακας που παρατηρείται στους 32 και 42°C, με τη μέγιστη πρωτεολυτική ενεργότητα να φθάνει μόλις τα 29.34 ± 0.04 U/mL. Συνεπώς δεν είναι κατάλληλη συνθήκη για την παραλαβή ενζυμικού διαλύματος με υψηλή πρωτεολυτική ενεργότητα.

Η εξέλιξη της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας κατά την επώαση στους 52°C εμφανίζει διαφορετική συμπεριφορά σε σχέση με αυτήν στους 32 και 42°C. Για το ανεπεξέργαστο δείγμα, ξεκινά στα 10.16 ± 0.64 U/mL, μειώνεται στα 5.29 ± 0.23 U/mL στις 2 ώρες επώασης και κατόπιν εμφανίζει μέγιστο στις 6 h ίσο με 8.56 ± 0.02 U/mL.

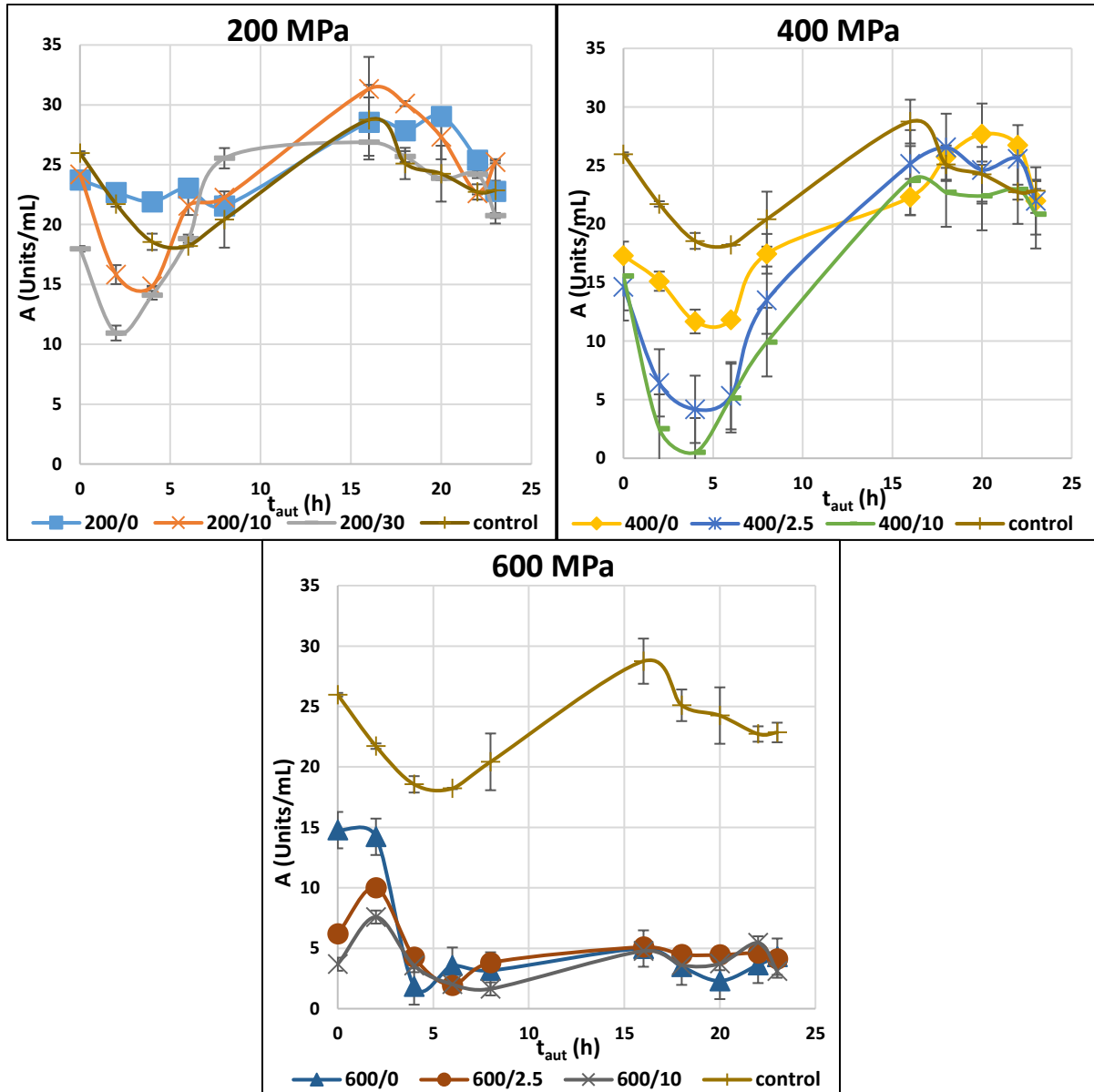
Για θερμοκρασία επώασης 52°C η επεξεργασία του αιωρήματος στα 200 MPa για 0 min δεν επηρέασε σημαντικά την εξέλιξη της πρωτεολυτικής ενεργότητας. Αντιθέτως, επεξεργασία για 10 και 30 min έδωσαν ενεργότητα 30.79 ± 0.66 και 32.29 ± 0.33 U/mL αμέσως μετά την επεξεργασία και τοπικό μέγιστο στην ενεργότητα στις 6 ώρες επώασης 24.55 ± 0.21 και 29.34 ± 0.04 U/mL αντίστοιχα. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και για την επεξεργασία στα 400 MPa. Αντιθέτως, για επεξεργασία στα 600 MPa, εκτός από την επεξεργασία για 0 min, η πρωτεολυτική ενεργότητα χάνεται εντελώς και δεν ανακάμπτει σε καμία χρονική στιγμή.

Συγκρίνοντας συνολικά τα Σχήματα 2, 3, και 4, συμπεραίνεται ότι η επεξεργασία με πίεση στα 600 MPa επηρεάζει αρνητικά τα πρωτεολυτικά ένζυμα της μαγιάς σε όλες τις συνθήκες επώασης. Δείγματα που επώαστηκαν στους 32 και 42°C, παρουσιάζουν συνολικά υψηλότερη ενεργότητα από αυτά που επώαστηκαν στους 52°C. Η μέγιστη ολική πρωτεολυτική ενεργότητα που επιτεύχθηκε ήταν 123.14 ± 3.03 U/mL και παρατηρήθηκε με επεξεργασία στα 400 MPa για 0 min και στη συνέχεια επώαση του δείγματος στους 42°C για 8 h. Επίσης, η επεξεργασία των αιωρημάτων στα 200 MPa για 10 ή 30 min οδήγησε στη μέγιστη επιτάχυνση της αυτόλυσης σε κάθε θερμοκρασία. Ως προς την επίδραση της θερμοκρασίας επώασης, φαίνεται ότι στους 32°C η ενεργότητα σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης συνεχώς αυξάνεται μέχρι ένα σημείο, μετά από το οποίο παραμένει σταθερή, ενώ στους 42°C υπάρχει αύξηση της ενεργότητας μέχρι ένα μέγιστο και μείωση για περισσότερες ώρες επώασης.

5.2.2 Επίδραση στην ενεργότητα της πρωτεΐνάσης A

Όμοια με τα Σχήματα 2, 3, 4 για την ολική πρωτεολυτική ενεργότητα, παρουσιάζονται παρακάτω τα Σχήματα 5, 6, 7 για την ενεργότητα της πρωτεΐνάσης A. Στο Σχήμα 5 παρουσιάζεται η επίδραση της υπερυψηλής πίεσης σε συνδυασμό με την επώαση στους 32°C στην ενεργότητα της πρωτεΐνάσης A. Στο πρώτο διάγραμμα του Σχήματος 5

παρατηρείται ότι για το ανεπεξέργαστο δείγμα, η ενεργότητα της πρωτεΐνης A μειώνεται κατά τις πρώτες ώρες της επώασης, εμφανίζοντας ελάχιστο στις 6 h ίσο με 18.22 ± 0.06 U/mL και στη συνέχεια αυξάνεται μέχρι και τις 16 h επώασης. Επεξεργασία του αιωρήματος στα 200 MPa για 10 και 30 min οδηγεί σε χαμηλότερη ενεργότητα σε σχέση με το ανεπεξέργαστο δείγμα τις πρώτες 6 h επώασης. Συγκεκριμένα, το δείγμα επεξεργασμένο για 10 min παρουσίασε ελάχιστη ενεργότητα 14.84 ± 0.03 U/mL στις 4 h και το δείγμα επεξεργασμένο για 30 min παρουσίασε ελάχιστη ενεργότητα 10.94 ± 0.62 U/mL στις 2 h επώασης.



Σχήμα 5: Ενεργότητα της πρωτεΐνης A σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στους 32°C

Η απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης A κατά τις πρώτες ώρες της επώασης στους 32°C γίνεται εντονότερη για επεξεργασία του αιωρήματος στα 400 MPa (δεύτερο διάγραμμα του Σχήματος 5). Συγκεκριμένα, παρατηρείται ελάχιστη ενεργότητα 11.68 ± 1.02 U/mL, 4.18 ± 0.45 U/mL και 0.50 ± 0.14 U/mL στις 4 h για τα δείγματα που επεξεργάστηκαν για 0, 2.5 και 10 min αντίστοιχα. Για το ανεπεξέργαστο δείγμα η ελάχιστη ενεργότητα της πρωτεΐνάσης A παρατηρείται στις 6 h και είναι ίση με 18.22 ± 0.06 U/mL.

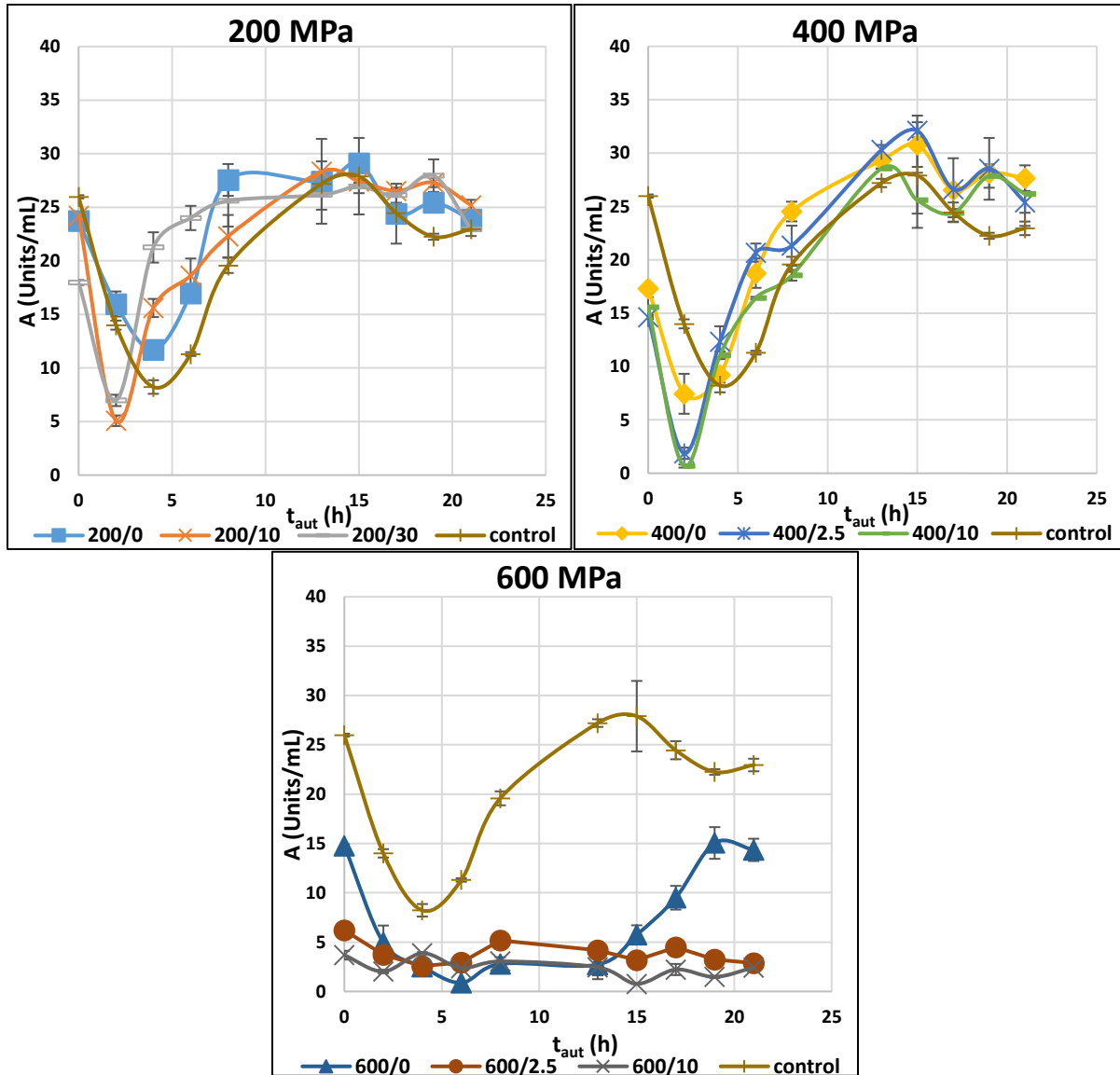
Όπως και για τη συνολική πρωτεολυτική ενεργότητα, έτσι και για την πρωτεΐνάση A παρατηρείται ότι η εφαρμογή πίεσης 600 MPa προκαλεί απενεργοποίηση. Και οι τρεις χρόνοι επεξεργασίας που μελετήθηκαν (0, 2.5 και 10 min) οδήγησαν σε μείωση της ενεργότητας της πρωτεΐνάσης A αμέσως μετά την επεξεργασία, με το βαθμό απενεργοποίησης να αυξάνεται με αύξηση του χρόνου επεξεργασίας (43, 76 και 86%). Επίσης, παρατηρήθηκε πως καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης, η ενεργότητα της πρωτεΐνάσης A δεν έφθασε ξανά σε τιμές συγκρίσιμες με αυτές του ανεπεξέργαστου δείγματος. Συνολικά, στους 32°C, η μέγιστη ενεργότητα της πρωτεΐνάσης A είναι 31.33 ± 2.68 U/mL και επιτεύχθηκε με προεπεξεργασία στα 200 MPa για 10 min και 16 h επώασης.

Στο Σχήμα 6 παρουσιάζεται η μεταβολή της ενεργότητας της πρωτεΐνάσης A σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στους 42°C. Η εξέλιξη της ενεργότητας για πίεση επεξεργασίας 200 MPa εμφανίζει παρόμοια τάση με αυτήν για επώαση στους 32°C. Και πάλι παρατηρείται μείωση της ενεργότητας της πρωτεΐνάσης A κατά τις πρώτες ώρες της επώασης. Συγκεκριμένα, η καμπύλη του ανεπεξέργαστου δείγματος παρουσιάζει ελάχιστο στις 4 h επώασης ίσο με 8.23 ± 0.64 U/mL ενώ τα επεξεργασμένα δείγματα σε πίεση 200 MPa για 10 και 30 min παρουσιάζουν ελάχιστο στις 2 h με τιμές 5.08 ± 0.49 και 6.98 ± 0.53 U/mL αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η ελάχιστη ενεργότητα που παρατηρείται για το δείγμα στο οποίο εφαρμόστηκε πίεση 200 MPa για 0 min μετά από 4 h επώασης (11.70 ± 0.74 U/mL) είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη ενεργότητα του ανεπεξέργαστου δείγματος (8.23 ± 0.64 U/mL). Επίσης, το δείγμα που έχει υποστεί επεξεργασία με πίεση στα 200 MPa για 0 min, έχει μετά από 8 h επώασης ενεργότητα παραπλήσια με αυτή του ανεπεξέργαστου δείγματος μετά από 15 h επώασης. Συνεπώς, η συνθήκη αυτή προκαλεί επιτάχυνση της αυτόλυσης.

Αντίστοιχα συμπεράσματα προκύπτουν και για την επεξεργασία στα 400 MPa (δεύτερο διάγραμμα του Σχήματος 6). Και τα τρία δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε πίεση 400 MPa παρουσίασαν ελάχιστη ενεργότητα μετά από 2 h επώασης στους 42°C, με τιμές 7.45 ± 1.87 , 1.88 ± 0.53 και 0.68 ± 0.14 U/mL για τα δείγματα επεξεργασμένα για 0, 2.5 και 10 min αντίστοιχα.

Όπως παρατηρείται από το τρίτο διάγραμμα του Σχήματος 6, η επεξεργασία με 600 MPa προκάλεσε απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης A καθ' όλη τη διάρκεια της αυτόλυσης. Ενδιαφέρουσα συμπεριφορά παρατηρείται μετά τις 13 h επώασης του δείγματος που υπέστη επεξεργασία στα 600 MPa για 0 min, όπου η ενεργότητα αυξάνεται μέχρι τις 19 h, στις οποίες παρατηρείται μέγιστο με τιμή 15.05 ± 1.61 U/mL.

Καμία συνθήκη πίεσης μαζί με επώαση στους 42°C δε δείχνει να βελτιώνει σημαντικά την ενεργότητα της πρωτεΐνης Α. Παρόλα αυτά, υποβολή του κυτταρικού αιωρήματος σε επεξεργασία με πίεση 200 MPa οδηγεί σε επίτευξη της μέγιστης ενεργότητας σε λιγότερες ώρες επώασης στους 42°C σε σχέση με το ανεπεξέργαστο δείγμα.



Σχήμα 6: Ενεργότητα της πρωτεΐνης Α σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στους 42°C.

Η επώαση στους 52°C οδηγεί συνολικά σε χαμηλότερες τιμές ενεργότητας σε σχέση με την επώαση στους 32 και 42°C, όπως φαίνεται στο Σχήμα 7. Συγκεκριμένα, αν προηγηθεί επεξεργασία με πίεση 200 MPa για 0 min (πρώτο διάγραμμα του Σχήματος 7), τότε κατά τις πρώτες ώρες της επώασης η ενεργότητα της πρωτεΐνης Α είναι συγκρίσιμη με αυτή του

ανεπεξέργαστου δείγματος, ενώ από τις 6 h επώασης και μετά η ενεργότητα για το επεξεργασμένο δείγμα εμφανίζεται έως και 48% υψηλότερη σε σχέση με το ανεπεξέργαστο.

Σε αντίθεση με τις θερμοκρασίες 32 και 42°C, στους 52°C η ενεργοποίηση της πρωτεάσης A γίνεται μέγιστη στις 6 ώρες, με την ενεργότητα να αυξάνεται με αύξηση του χρόνου επεξεργασίας στα 200 MPa (12.24 ± 0.25 , 14.42 ± 0.53 και 16.13 ± 1.06 U/mL για χρόνους επεξεργασίας 0, 2.5 και 10 min αντίστοιχα). Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζει και η εξέλιξη της ενεργότητας της πρωτεάσης A για επεξεργασία στα 400 MPa (δεύτερο διάγραμμα του Σχήματος 6). Εξάιρεση αποτελεί η επεξεργασία για 10 min, η οποία αν και μειώνει την ενεργότητα του ενζύμου αμέσως μετά την επεξεργασία κατά 35%, αυξάνει την ενζυμική ενεργότητα μετά από 2 h επώασης, στις οποίες τα δείγματα με χρόνους επεξεργασίας 0 και 2.5 min παρουσιάζουν ελάχιστο. Κανένα από τα τρία δείγματα, όμως δεν παρουσιάζει κατά την επώαση μεγαλύτερη ενεργότητα από αυτή του ανεπεξέργαστου δείγματος χωρίς επώαση (25.98 ± 0.15 U/mL).

Στο τρίτο διάγραμμα του Σχήματος 7 παρατηρείται ότι τα δείγματα που επεξεργάστηκαν στα 600 MPa παρουσίασαν χαμηλότερη ενεργότητα πρωτεΐνάσης A από το ανεπεξέργαστο δείγμα καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης.

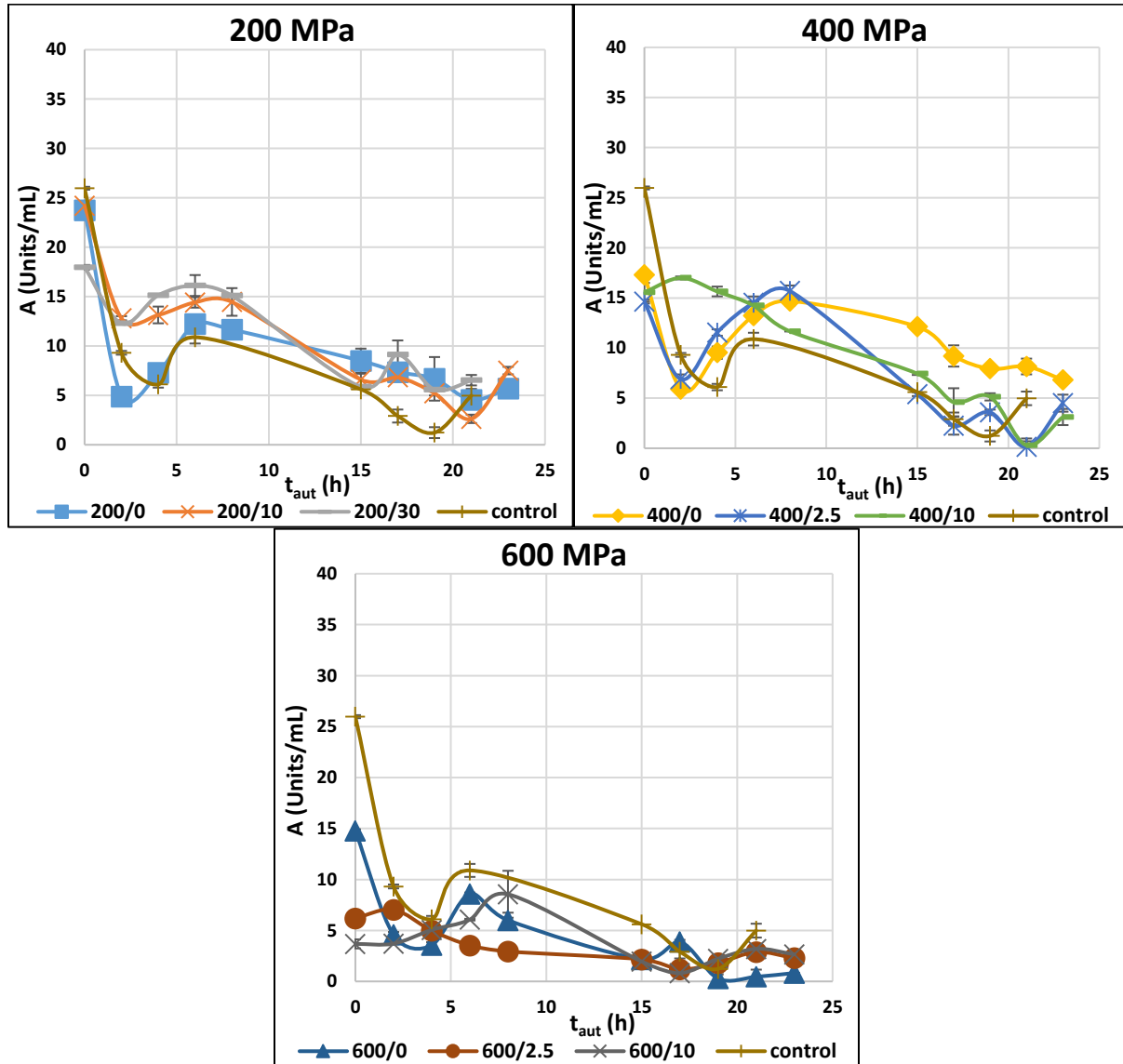
Όπως και στην ολική πρωτεολυτική ενεργότητα, έτσι και για την πρωτεΐνάση A η επώαση στους 52°C δεν συμβάλλει στην αύξηση της ενεργότητας. Γενικά, για κάθε θερμοκρασία επώασης, καμία συνθήκη πίεσης δεν οδηγεί σε ενεργότητα πρωτεΐνάσης A πολύ ψηλότερη από αυτή του ανεπεξέργαστου δείγματος, με τη μέγιστη ενεργότητα επεξεργασμένου δείγματος να είναι 32.10 ± 1.41 Units/mL μετά από 15 h επώαση και τη μέγιστη ενεργότητα του ανεπεξέργαστου να είναι 28.75 ± 1.31 Units/mL σε ίδιο χρόνο. Παρατηρείται επίσης ότι η ενεργότητα της πρωτεΐνάσης A για το ανεπεξέργαστο και χωρίς επώαση δείγμα (0 h στα διαγράμματα) είναι 25.98 ± 0.15 U/mL, συνεπώς είναι πολύ μικρή η αύξηση που προκαλείται τόσο από την επώαση όσο και από την επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση.

5.2.3 Επίδραση στην ενεργότητα της πρωτεΐνάσης B

Η επίδραση της υπερυψηλής πίεσης σε συνδυασμό με την επώαση στην ενεργότητα της πρωτεΐνάσης B δίνεται στα διαγράμματα των Σχημάτων 8, 9 και 10.

Στο πρώτο διάγραμμα του Σχήματος 8 παρουσιάζεται η εξέλιξη της ενεργότητας της πρωτεΐνάσης B για τα δείγματα επεξεργασμένα στα 200 MPa. Για χρόνο επεξεργασίας 0 min, στα 200 MPa η ενεργότητα της πρωτεΐνάσης B ακολουθεί την ίδια τάση με αυτήν του ανεπεξέργαστου δείγματος καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης στους 32°C. Η επεξεργασία στα 200 MPa για χρόνους 10 και 30 min οδηγεί σε αυξημένη ενεργότητα κατά τις πρώτες 12

η της επώασης έως και 100%, η οποία όμως στη συνέχεια είναι χαμηλότερη από την ενεργότητα του ανεπεξεργαστου δείγματος έως και 20%.



Σχήμα 7: Ενεργότητα της πρωτεΐνης A σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στους 52°C.

Με επεξεργασία στα 400 MPa για 2.5 και 10 min παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας κατά 328 και 451% αντίστοιχα σε σχέση με το ανεπεξεργαστο δείγμα πριν την έναρξη της επώασης. Στις πρώτες ώρες της επώασης, όμως, οι ενεργότητες των δειγμάτων αυτών μειώνονται, με ελάχιστο στις 2 h, και στη συνέχεια της επώασης μεταβάλλονται παρόμοια με την ενεργότητα του ανεπεξεργαστου δείγματος.

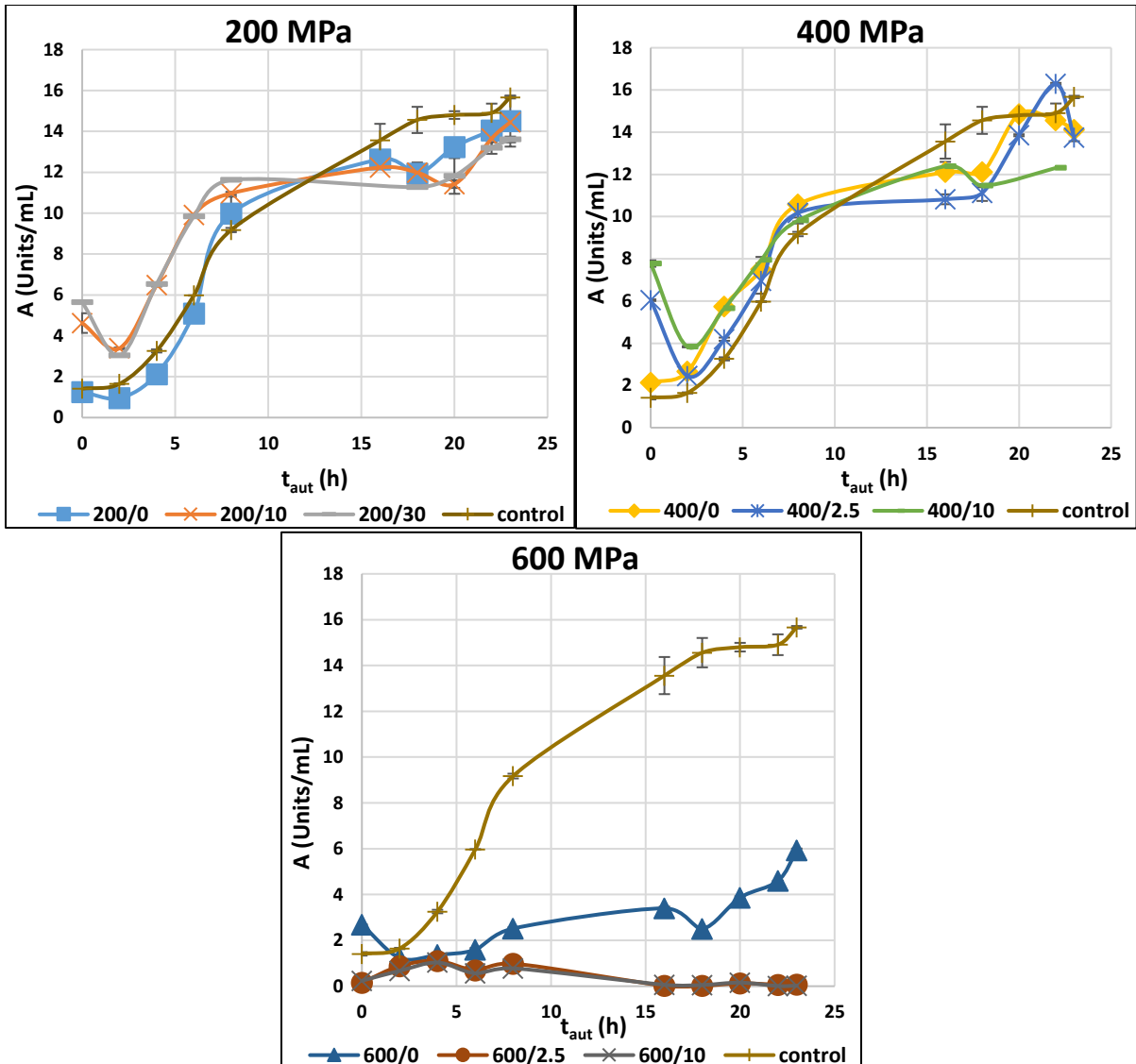
Επεξεργασία σε πίεση 600 MPa προκαλεί έντονη απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης B, όπως φαίνεται στο τρίτο διάγραμμα του Σχήματος 8. Για χρόνο επεξεργασίας 0 min η πρωτεΐνάση B δείχνει να έχει απενεργοποιηθεί μερικώς, ενώ σε χρόνους επεξεργασίας 2.5 και 10 min παρατηρείται πλήρης απενεργοποίησή της.

Συνολικά, η επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση αυξάνει την ενεργότητα της πρωτεΐνάσης B κατά την επώαση στους 32°C στα 200 MPa ενώ στα 600 MPa παρατηρείται έντονη απενεργοποίηση.

Κατά την επώαση στους 42°C, η ενεργότητα της πρωτεΐνάσης B ενός δείγματος που δεν έχει υποστεί επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση μεταβάλλεται με διαφορετικό τρόπο απ' ό,τι κατά την επώαση στους 32°C. Ενώ στους 32°C υπάρχει μια συνεχής αύξηση (Σχήμα 8), στους 42°C η ενεργότητα αρχικά αυξάνεται μέχρι τις 8 h επώασης και στη συνέχεια μειώνεται μέχρι τις 13 h (Σχήμα 9). Η επεξεργασία των δειγμάτων στα 200 και 400 MPa οδήγησε, κατά την επώαση στους 42°C, σε παρόμοια μεταβολή της ενεργότητας με αυτή του ανεπεξέργαστου δείγματος, με μοναδική διαφορά ότι στα επεξεργασμένα δείγματα παρατηρείται μείωση της ενεργότητας στις πρώτες 2 h επώασης. Παρατηρείται επίσης ότι με επεξεργασία στα 200 MPa και επώαση στους 42°C επιτυγχάνεται σε 4 h η ενεργότητα που το ανεπεξέργαστο δείγμα επιτυγχάνει σε 8 h.

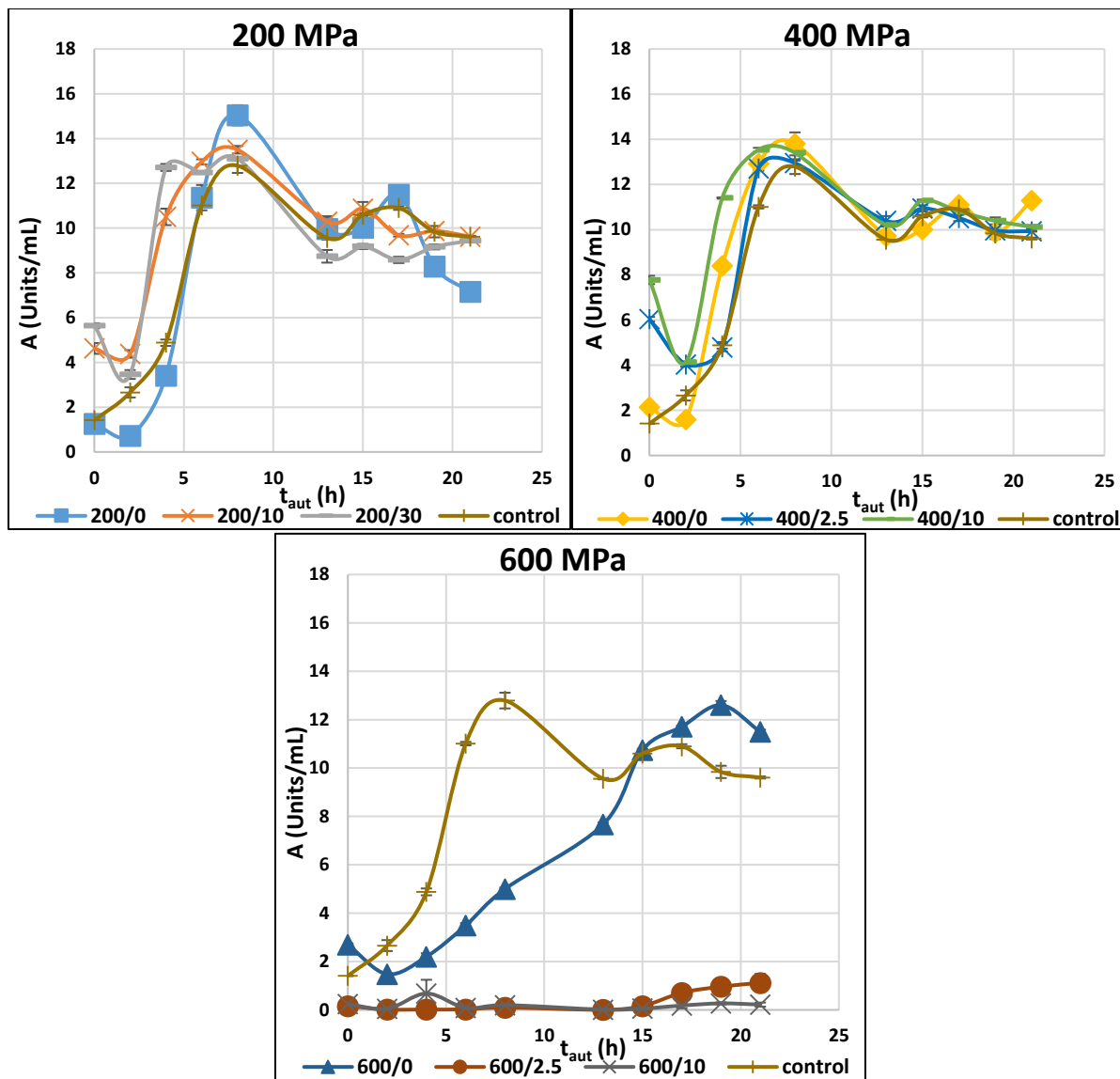
Το δείγμα που έχει υποστεί επεξεργασία στα 600 MPa για 0 min παρουσιάζει αύξηση της ενεργότητας της πρωτεΐνάσης B μετά από τις 2 h επώασης και μετά τις 15 h ξεπερνά την ενεργότητα του ανεπεξέργαστου δείγματος. Αντιθέτως, τα δείγματα με χρόνους επεξεργασίας 2.5 και 10 min στα 600 MPa παρουσιάζουν έντονη απενεργοποίηση καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης.

Η επώαση του ανεπεξέργαστου δείγματος στους 52°C δεν επηρεάζει την ενεργότητα της πρωτεΐνάσης B στις πρώτες 4 h, ενώ από τις 4 μέχρι τις 7 h υπάρχει αύξηση, ακολουθούμενη από μείωση μέχρι τις 17 h, μετά από τις οποίες παρατηρείται πλήρης απενεργοποίηση του ενζύμου. Όλα τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με υπερυψηλή πίεση παρουσιάζουν παρόμοια μεταβολή ενεργότητας με το ανεπεξέργαστο δείγμα κατά την επώαση, εκτός από τις πρώτες 4h. Συγκεκριμένα, η πίεση στα 200 MPa για 10 και 30 min και στα 400 MPa για κάθε χρόνο επεξεργασίας (0, 2.5 και 10 min) προκάλεσαν απευθείας αύξηση της ενεργότητας της πρωτεΐνάσης B κατά τις πρώτες 2 – 4 h επώασης, η οποία στη συνέχεια μειώθηκε με τρόπο παρόμοιο με την ενεργότητα του ανεπεξέργαστου δείγματος. Η ακαριαία επεξεργασία (0 min) στα 200 MPa οδήγησε σε μείωση της ενεργότητας για τις πρώτες 2 h επώασης ενώ στη συνέχεια η μεταβολή της ήταν παρόμοια με αυτή του ανεπεξέργαστου δείγματος. Τα παραπάνω παρουσιάζονται στα δύο πρώτα διαγράμματα του Σχήματος 10. Στο τρίτο διάγραμμα παρατηρείται απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης B κατά την επώαση των δειγμάτων, τα οποία υποβλήθηκαν σε επεξεργασία στα 600 MPa.



Σχήμα 8: Ενεργότητα της πρωτεΐνης Β σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στους 32°C.

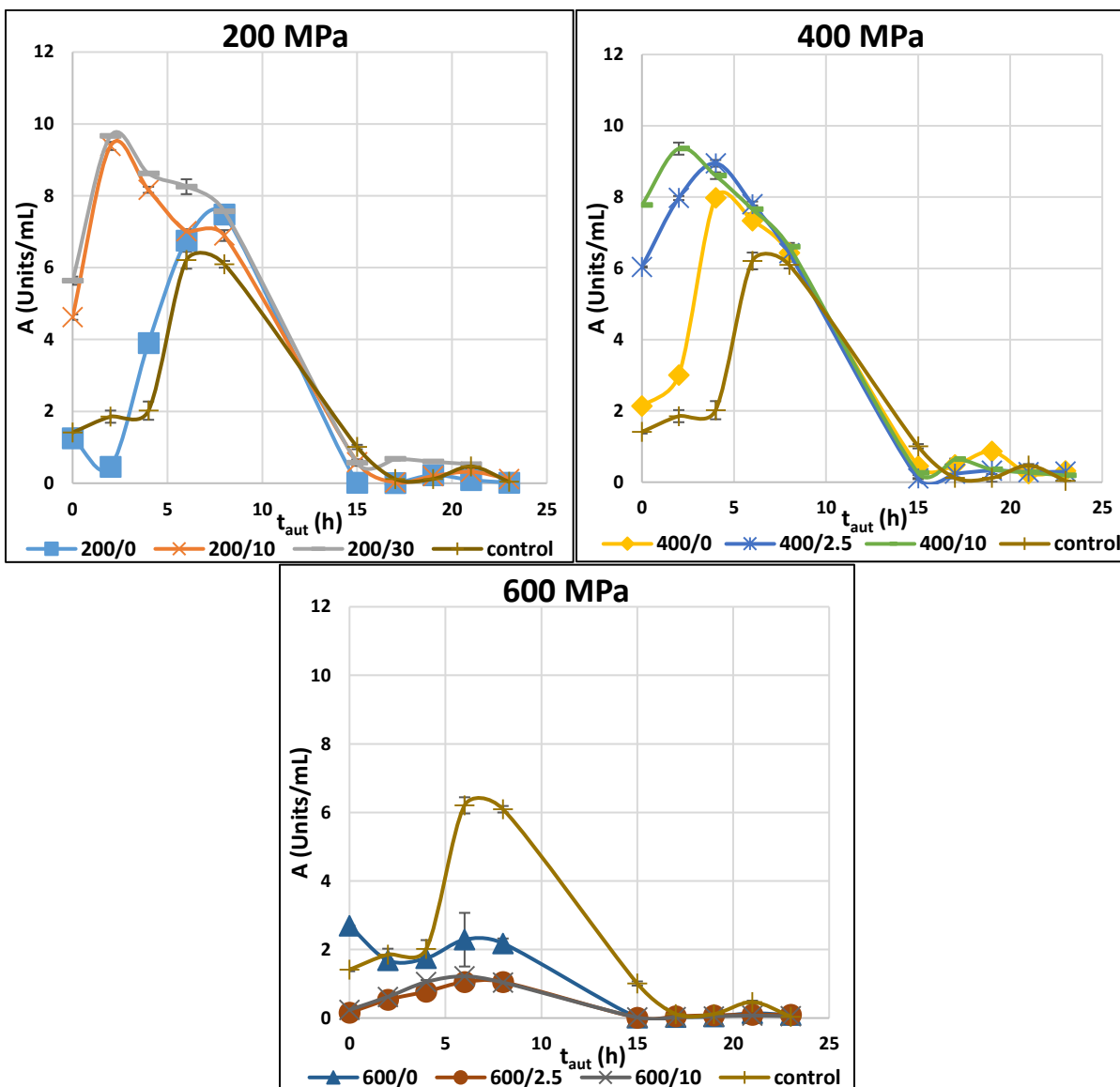
Συνολικά, η μέγιστη ενεργότητα της πρωτεΐνης Β που επιτυγχάνεται για το ανεπεξέργαστο δείγμα είναι 15.67 ± 0.06 U/mL και παρατηρείται μετά από 23 h επώασης στους 32°C, ενώ με επεξεργασία στα 200 MPa για 0 min και επώαση στους 42°C επιτυγχάνεται ενεργότητα ίση με 15.04 ± 0.45 U/mL μετά από 8 h.



Σχήμα 9: Ενεργότητα της πρωτεΐνάσης B σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στους 42°C.

5.3 ΠΗΞΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΑΓΙΑΣ

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκαν κάποια από τα δείγματα για δοκιμή πήξης του γάλακτος. Η επιλογή των δειγμάτων έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να εξεταστεί η πήξη του γάλακτος με ενζυμικά διαλύματα που εμφανίζουν διαφορετικές αναλογίες ενεργότητας πρωτεΐνάσης A και πρωτεΐνάσης B. Υπό αυτή την έννοια, ο συνδυασμός



Σχήμα 10: Ενεργότητα της πρωτεϊνάσης B σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης στους 52°C.

υπερυψηλής πίεσης και επώασης χρησιμοποιήθηκε σαν μέσο ελέγχου για την ενζυμική ενεργότητα. Οι συνθήκες επεξεργασίας που επιλέχθηκαν δίνονται στον Πίνακα 6 και καλύπτουν ένα εύρος ενεργοτήτων πρωτεϊνάσης A και B. Σημειώνεται ότι η καρβοξυπεπτιδάση Υ δεν μελετήθηκε διότι είναι εξωπεπτιδάση, οπότε δεν αναμένεται να συμβάλλει στην πήξη του γάλακτος. Ωστόσο, για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της, θα πρέπει να μελετηθεί ξεχωριστά. Για συντομία κατά την αναφορά του κάθε δείγματος, στη συνέχεια θα χρησιμοποιείται η κωδικοποιημένη ονομασία των δειγμάτων της μορφής P/t_p t_{aut} T_{aut} που δίνεται στην πέμπτη στήλη του Πίνακα 6, όπου P η πίεση επεξεργασίας σε MPa, t_p ο χρόνος επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση σε min, t_{aut} ο χρόνος της αυτόλυσης σε h και T_{aut} η

θερμοκρασία αυτόλυσης σε °C. Για τα δείγματα που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση, αντί για τον όρο P/t_p χρησιμοποιείται το γράμμα C (π.χ. C 15h 52°C).

Πίνακας 6

Συνθήκες επεξεργασίας δειγμάτων που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ως προς την ικανότητα πήξης γάλακτος και οι ενεργότητες πρωτεΐνάσης A, B και ολικών πρωτεολυτικών ενζύμων που προκύπτουν από τις συνθήκες αυτές

P [MPa]	t _p [min]	T _{aut} [°C]	t _{aut} [h]	Κωδικοποιημένη ονομασία δείγματος	Ολική πρωτεολυτική ενεργότητα [U/mL]	Ενεργότητα πρωτεάσης A [U/mL]	Ενεργότητα πρωτεάσης B [U/mL]
400	0	-	0	400/0 0h	25.89 ± 0.04	17.31 ± 0.92	2.13 ± 0.01
		52	15	400/0 15h 52°C	9.46 ± 0.13	12.14 ± 0.13	0.45 ± 0.03
	2.5	-	0	400/2.5 0h	28.76 ± 0.22	14.64 ± 0.71	6.04 ± 0.10
		42	4	400/2.5 4h 42°C	33.51 ± 0.08	12.33 ± 1.45	4.79 ± 0.17
	10	-	0	400/10 0h	26.71 ± 1.50	15.57 ± 0.20	7.77 ± 0.15
		32	4	400/10 4h 32°C	18.69 ± 0.48	0.50 ± 0.14	5.65 ± 0.06
600	0	42	13	600/0 13h 42°C	17.80 ± 0.11	2.73 ± 1.10	7.67 ± 0.07
		32	23	600/0 23h 32°C	22.39 ± 0.51	4.30 ± 0.35	5.93 ± 0.08
-	-	-	0	C 0h	10.16 ± 0.04	25.98 ± 0.79	1.41 ± 0.05
		52	15	C 15h 52°C	6.34 ± 0.07	5.61 ± 0.66	1.01 ± 0.06
		42	4	C 4h 42°C	30.32 ± 0.40	8.23 ± 0.64	4.88 ± 0.14
		32	4	C 4h 32°C	18.48 ± 0.84	18.56 ± 0.68	3.26 ± 0.08
		42	13	C 13h 42°C	87.26 ± 1.64	27.20 ± 0.39	9.56 ± 0.03
		32	23	C 23h 32°C	114.82 ± 1.19	22.85 ± 0.81	15.67 ± 0.06

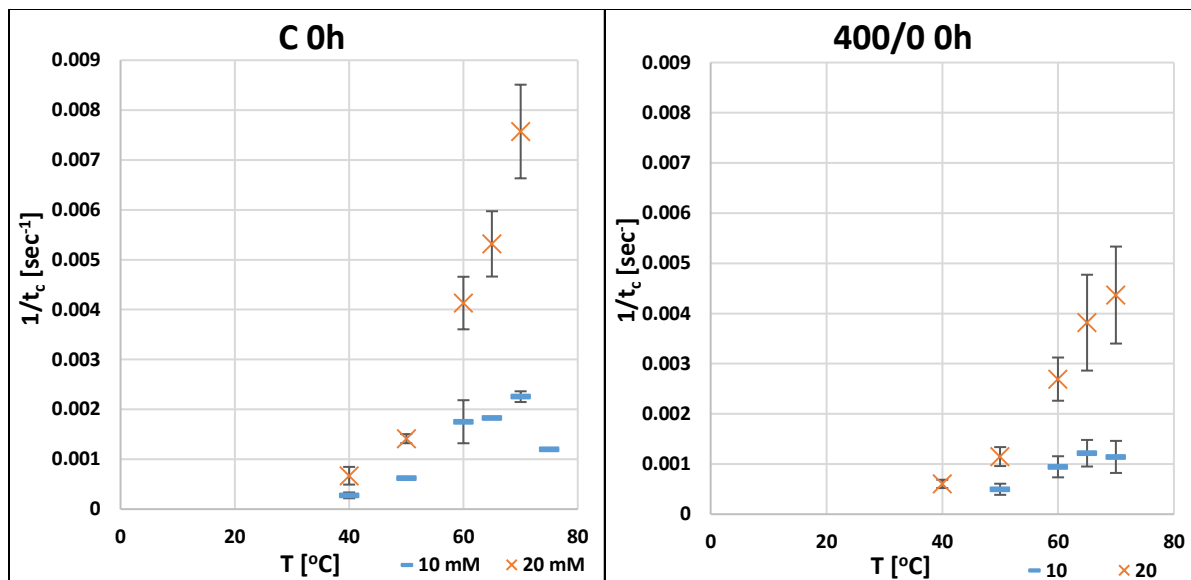
Για τα δείγματα που αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα, μελετήθηκε ο χρόνος πήξης του γάλακτος σε συγκεντρώσεις CaCl₂ 10 και 20 mM σε θερμοκρασιακό εύρος 40-70°C. Η έρευνα αυτή πραγματοποιήθηκε αφενός μεν για τη μελέτη της εξάρτησης της ικανότητας πήξης του γάλακτος από τα ενζυμικά εκχυλίσματα μαγιάς από τη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου και από τη θερμοκρασία, αλλά και για να διαπιστωθεί η συσχέτιση μεταξύ της ενζυμικής ενεργότητας των πρωτεϊνών και την ικανότητα πήξης του γάλακτος.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα του αντίστροφου του χρόνου πήξης (1/t_c) ως προς τη θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκε η πήξη για κάθε δείγμα και το αντίστοιχο ανεπεξέργαστο δείγμα. Στην προκειμένη περίπτωση, ενώ ένας χαμηλός χρόνος πήξης είναι επιθυμητός, τα διαγράμματα εκφράζονται με τον αντίστροφο χρόνο πήξης ώστε να εμφανίζουν αύξουσα τάση. Κάθε διάγραμμα περιλαμβάνει δύο καμπύλες, μία για

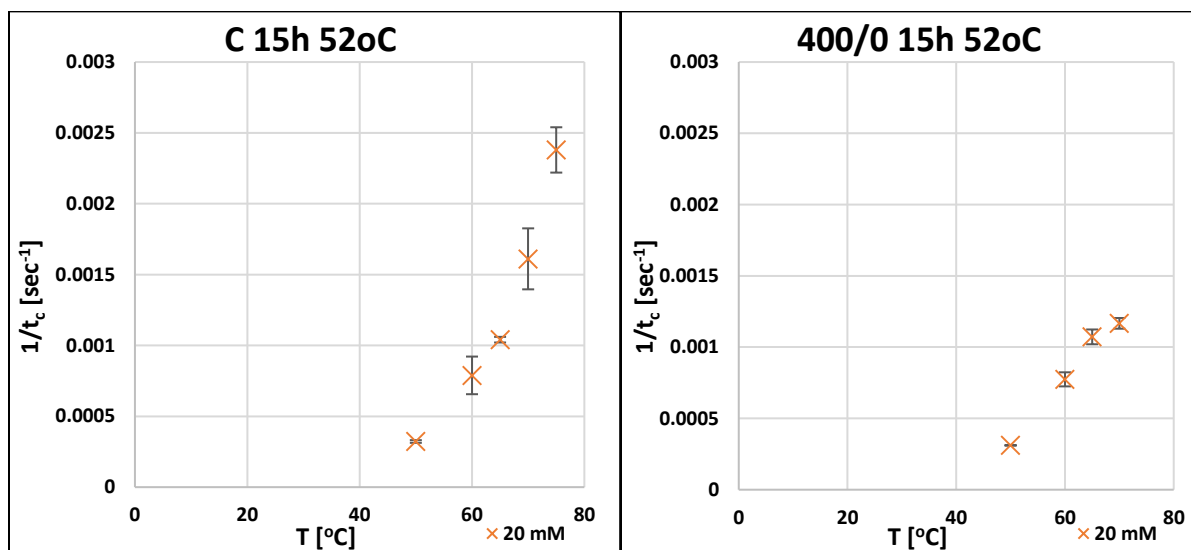
υπόστρωμα με 10 mM CaCl₂ και μία με 20 mM CaCl₂. Σε ορισμένες συνθήκες που επιλέχθηκαν δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός του χρόνου πήξης είτε επειδή ήταν μεγαλύτερος από 1 h (θεωρείται ότι δεν παρατηρείται πήξη), είτε διότι παρατηρήθηκε απενεργοποίηση των ενζύμων, όπως θα συζητηθεί παρακάτω.

Το δείγμα 400/0 0h παρουσίασε βέλτιστο χρόνο πήξης 13.7 ± 2.9 min στους 65°C για το υπόστρωμα με 10 mM CaCl₂ και 3.8 ± 0.8 min στους 70°C για το υπόστρωμα με 20 mM CaCl₂. Το αντίστοιχο ανεπεξέργαστο δείγμα παρουσίασε βέλτιστους χρόνους πήξης στους 70°C και για τα δύο υποστρώματα. Οι χρόνοι αυτοί είναι 7.4 ± 0.4 min και 2.2 ± 0.7 min για το υπόστρωμα με 10 και 20 mM CaCl₂ αντίστοιχα. Η θετική δράση του CaCl₂, που είναι φανερή και στα δύο διαγράμματα, είναι αναμενόμενη καθώς τα ιόντα Ca²⁺ είναι γνωστό ότι συμβάλλουν στη συνένωση των μικκυλίων καζεΐνης προς σχηματισμό πήγματος. Επίσης, και στα δύο διαγράμματα παρατηρήθηκε μείωση του χρόνου πήξης (αύξηση του $1/t_c$) με αύξηση της θερμοκρασίας για το υπόστρωμα με 20 mM CaCl₂, ενώ για το υπόστρωμα με 10 mM CaCl₂ ο χρόνος πήξης αυξήθηκε μετά τους 65°C για το 400/0 0h και μετά τους 70°C για το C 0h. Αυτό είναι πιθανό να βασίζεται στη μερική απενεργοποίηση των ενζύμων. Το γεγονός ότι το φαινόμενο αυτό παρατηρείται μόνο στο υπόστρωμα με 10 mM CaCl₂ οφείλεται πιθανότατα στο ότι ο ρυθμός της απενεργοποίησης στους 70°C είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό πήξης του υποστρώματος αυτού στην ίδια θερμοκρασία ενώ το αντίστροφο ισχύει για το υπόστρωμα με 20 mM CaCl₂.

Στο Σχήμα 12 δεν παρουσιάζονται καμπύλες για το υπόστρωμα με 10 mM CaCl₂ διότι δεν επιτεύχθηκε πήξη σε καμία θερμοκρασία κατά τη διάρκεια μίας ώρας από την προσθήκη ενζυμικού διαλύματος. Με υπόστρωμα με 20 mM CaCl₂, το δείγμα 400/0 15h 52°C και το αντίστοιχο ανεπεξέργαστο είχαν ελάχιστο χρόνο πήξης ίσο με 14.3 ± 0.5 min και 7.0 ± 0.5 min αντίστοιχα. Και για τα δύο δείγματα ο χρόνος πήξης μειώθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας, με τον ελάχιστο χρόνο να επιτυγχάνεται στους 70°C για το 400/0 15h 52°C και στους 75°C για το C 15h 52°C. Στους 75°C δεν επιτεύχθηκε πήξη του γάλακτος από το δείγμα 400/0 15h 52°C. Από τα δύο διαγράμματα του Σχήματος 12 συμπεραίνεται ότι τα δύο δείγματα έχουν παραπλήσιους χρόνους πήξης στους 50, 60, και 65°C όμως σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες το ανεπεξέργαστο παρουσιάζει μεγάλη μείωση του χρόνου πήξης, πετυχαίνοντας στους 75°C μικρότερο από τον μισό χρόνο πήξης που πετυχαίνει στους 65°C, ενώ το 400/0 15h 52°C μειώνει ελάχιστα τον χρόνο πήξης από τους 65 στους 70°C και δεν προκαλεί πήξη στους 75°C. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανότητα στην απενεργοποίηση των ενζύμων στο δείγμα αυτό, η οποία όμως δεν παρουσιάζεται στο C 15h 52°C.



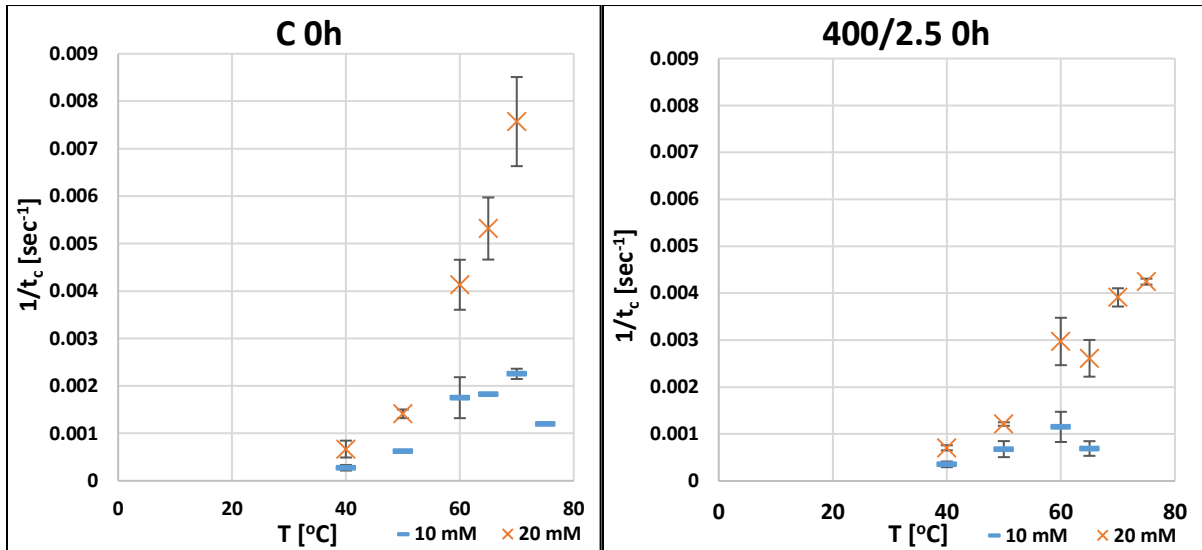
Σχήμα 11: Το αντίστροφο του χρόνου πήξης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία για το δείγμα 400/0 0h και το αντίστοιχο ανεπεξεργαστο δείγμα (C 0h)



Σχήμα 12: Το αντίστροφο του χρόνου πήξης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία για το δείγμα 400/0 15h 52°C και το αντίστοιχο ανεπεξεργαστο δείγμα (C 15h 52°C).

Τα διαγράμματα που δείχνουν το αντίστροφο του χρόνου πήξης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία για το δείγμα 400/2.5 0h και το αντίστοιχο δείγμα που δεν έχει υποστεί επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση, παρουσιάζονται στο Σχήμα 13. Για το υπόστρωμα με 10 mM CaCl₂ η πήξη πραγματοποιήθηκε ταχύτερα στους 60°C από το 400/2.5 0h και στους 70

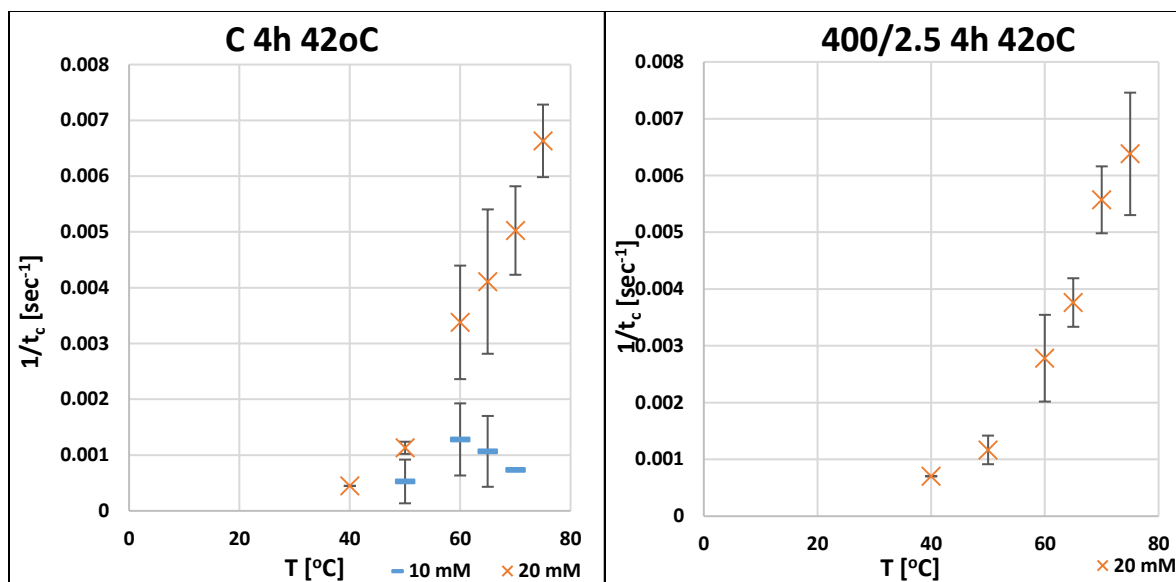
από το C 0h, με χρόνους πήξης 14.5 ± 1.3 και 7.4 ± 0.4 min αντίστοιχα. Και για τα δύο δείγματα, η καμπύλη του υποστρώματος με 10 mM CaCl₂ αυξάνεται μέχρι ένα μέγιστο και στη συνέχεια μειώνεται, όμως η μείωση παρατηρείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία για το δείγμα 400/2.5 0h σε σχέση με το C 0h. Στο υπόστρωμα με 20 mM CaCl₂, παρατηρήθηκε βέλτιστος χρόνος πήξης στους 75°C ίσος με 3.9 ± 0.1 min για το 400/2.5 0h, ενώ για το C 0h παρατηρήθηκε στους 70°C και είναι ίσος με 2.2 ± 0.7 min.



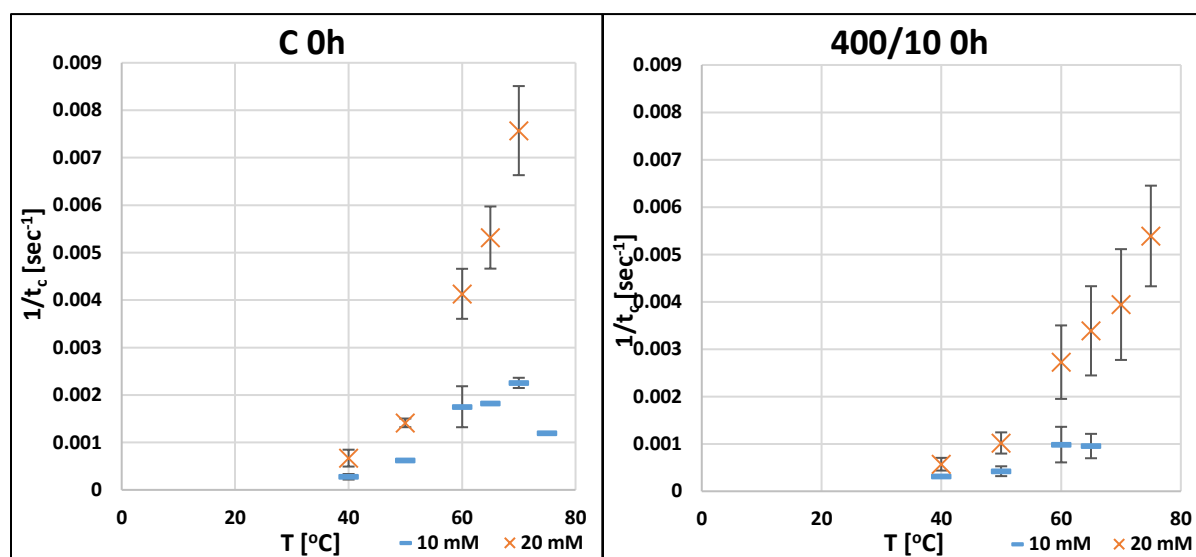
Σχήμα 13: Το αντίστροφο του χρόνου πήξης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία για το δείγμα 400/2.5 0h και το αντίστοιχο ανεπεξέργαστο δείγμα (C 0h).

Από τα διαγράμματα του Σχήματος 14, παρατηρείται ότι το δείγμα 400/2.5 4h 42°C προκαλεί πήξη μόνο στο υπόστρωμα με 20 mM CaCl₂ ενώ το C 4h 42°C προκαλεί πήξη και στα δύο υποστρώματα. Στο υπόστρωμα με τα 20 mM CaCl₂ και τα δύο δείγματα προκαλούν ταχύτερη πήξη στους 75°C και μάλιστα σε παραπλήσιους χρόνους, 2.6 ± 0.4 min για το 400/2.5 4h 42°C και 2.5 ± 0.2 min για το C 4h 42°C. Το ανεπεξέργαστο δείγμα προκάλεσε και την πήξη του υποστρώματος με 10 mM CaCl₂ με βέλτιστο χρόνο πήξης 13.0 ± 2.1 min, ο οποίος προέκυψε στους 60°C.

Το δείγμα 400/10 0h, όπως φαίνεται στο Σχήμα 15, προκαλεί την ταχύτερη πήξη του υποστρώματος με 10 mM CaCl₂ σε χρόνο 16.9 ± 3.5 min στους 60°C και του υποστρώματος με 20 mM CaCl₂ σε χρόνο 3.1 ± 0.9 min στους 75°C. Οι αντίστοιχοι χρόνοι για το μη επεξεργασμένο δείγμα είναι 7.4 ± 0.4 min στους 70°C για το υπόστρωμα με 10 mM CaCl₂ και 2.2 ± 0.7 min στους 70°C για το υπόστρωμα με 20 mM CaCl₂.



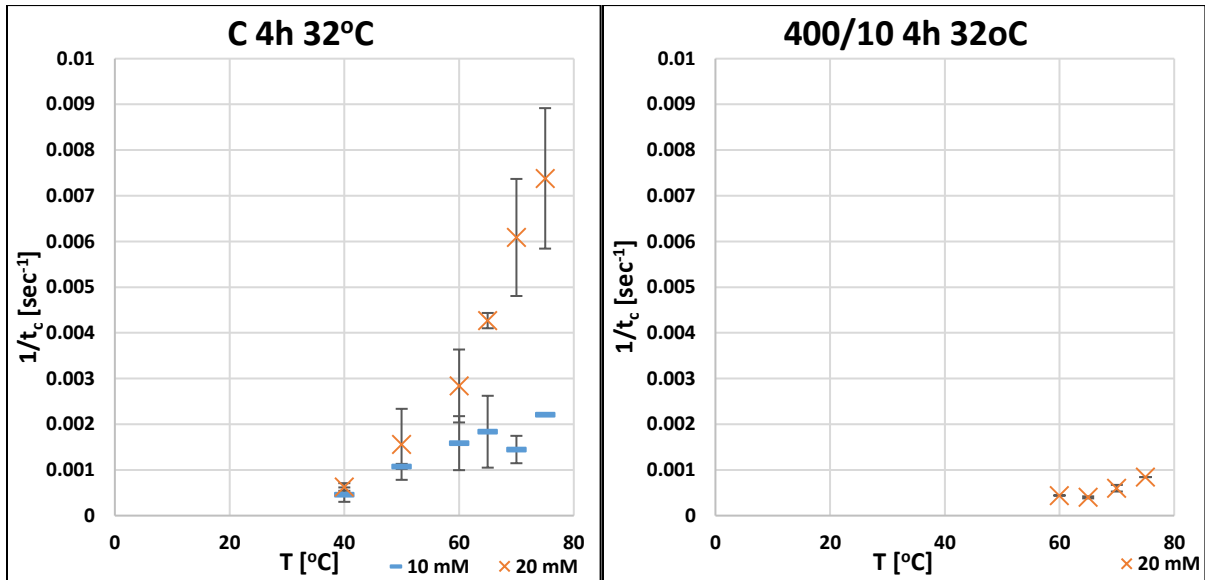
Σχήμα 14: Το αντίστροφο του χρόνου πήξης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία για το δείγμα 400/2.5 4h 42°C και το αντίστοιχο control.



Σχήμα 15: Το αντίστροφο του χρόνου πήξης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία για το δείγμα 400/10 0h και το αντίστοιχο ανεπεξέργαστο δείγμα (C 0h).

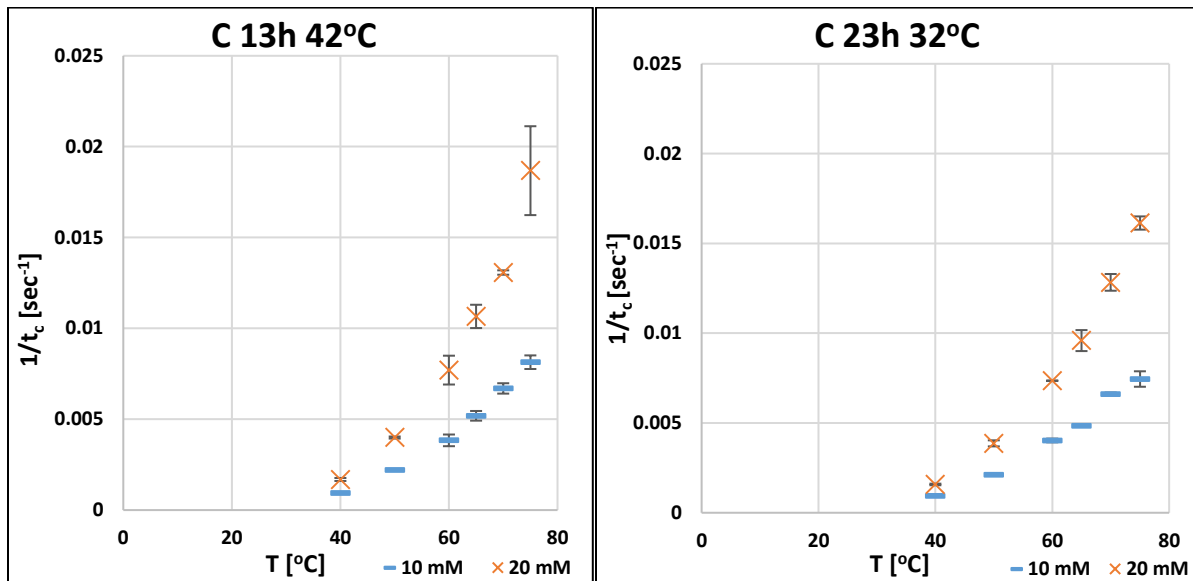
Από το Σχήμα 16 παρατηρείται ότι η πήξη πραγματοποιείται πολύ αργότερα για το δείγμα 400/10 4h 32°C σε σχέση με το αντίστοιχο ανεπεξέργαστο στο υπόστρωμα με 20 mM CaCl₂, ενώ στο υπόστρωμα με 10 mM CaCl₂ δε συμβαίνει πήξη μέσα σε 1h από το 400/10 4h 32°C. Συγκεκριμένα, για το υπόστρωμα με 20 mM CaCl₂, το δείγμα 400/10 4h 32°C έχει ελάχιστο χρόνο πήξης ίσο με 19.8 ± 1.6 min στους 75°C ενώ το C 4h 32°C έχει ελάχιστο χρόνο πήξης 2.3 ± 0.8 min στην ίδια θερμοκρασία. Το ανεπεξέργαστο δείγμα παρουσίασε την ταχύτερη πήξη για το υπόστρωμα με 10 mM επίσης στην ίδια θερμοκρασία, με χρόνο ίσο με

7.6 ± 0.3 min. Αξίζει να σημειωθεί ότι το δείγμα 400/10 4h 32°C παρουσιάζει ενεργότητα πρωτεΐνης A ίση με 0.50 ± 0.14 U/mL σε αντίθεση με το αντίστοιχο ανεπεξέργαστο, που παρουσιάζει ενεργότητα 18.56 ± 0.68 U/mL.



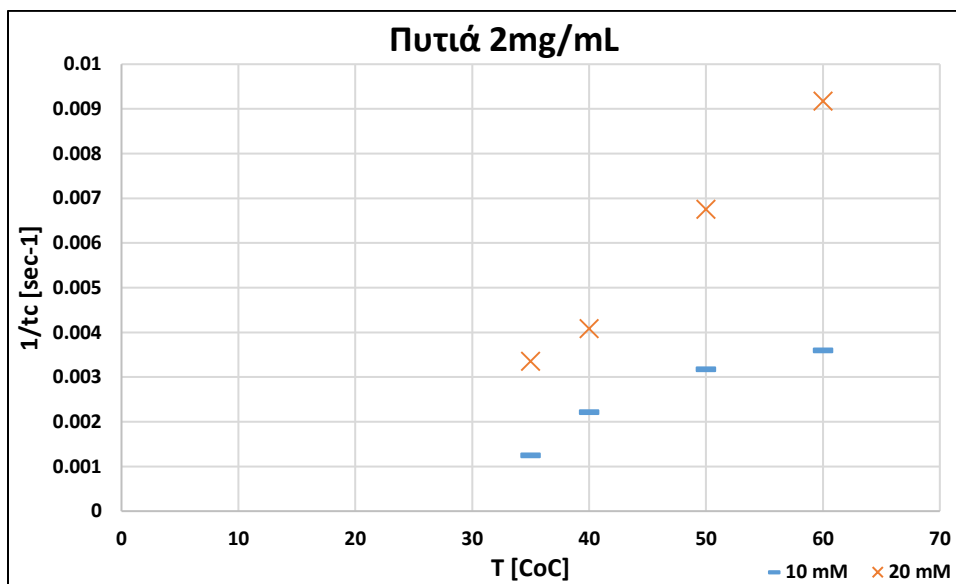
Σχήμα 16: Το αντίστροφο του χρόνου πήξης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία για το δείγμα 400/10 4h 32°C και το αντίστοιχο ανεπεξέργαστο δείγμα (C 4h 32°C).

Για τα δείγματα 600/0 13h 42°C και 600/0 23h 32°C δεν παρατηρήθηκε πήξη σε κανένα από τα δύο υποστρώματα και σε καμία από τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην προκατεργασία με πίεση 600 MPa, η οποία, όπως διαπιστώθηκε από την Ενότητα 5.2 οδηγεί σε απώλεια της πρωτεολυτικής ενεργότητας. Τα ανεπεξέργαστα δείγματα που αντιστοιχούν στα παραπάνω δείγματα έχουν παρόμοια συμπεριφορά ως προς την πήξη των δύο υποστρωμάτων γάλακτος. Και τα δύο δείγματα προκάλεσαν την πήξη και των δύο υποστρωμάτων ταχύτερα σε υψηλότερες θερμοκρασίες, με μικρότερο χρόνο πήξης στους 75°C. Συγκεκριμένα το δείγμα C 13h 42°C εμφανίζει χαμηλότερο χρόνο πήξης 2.1 ± 0.1 min για το υπόστρωμα με 10 mM CaCl₂ και 0.9 ± 0.1 min για το υπόστρωμα με 20 mM CaCl₂. Οι χαμηλότεροι χρόνοι πήξης για το δείγμα C 23h 32°C είναι 2.2 ± 0.1 και 1.0 ± 0.1 min για το υπόστρωμα με 10 και 20 mM CaCl₂ αντίστοιχα.



Σχήμα 17: Το αντίστροφο του χρόνου πήξης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία για τα δείγματα C 13h 42°C και C 23h 32°C.

Ως αναφορά δίνεται το διάγραμμα του αντιστρόφου του χρόνου πήξης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία για τα δύο υποστρώματα με τη χρήση διαλύματος πυτιάς 2 mg/mL (Σχήμα 18), στο οποίο παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά της πυτιάς με τα δείγματα που μελετήθηκαν, ως προς τα δύο υποστρώματα. Ο χρόνος πήξης που επιτυγχάνεται στους 60°C για του υπόστρωμα με 20 mM CaCl₂ είναι 1.8 min και θα χρησιμοποιηθεί στην ενότητα 5.5 ως αναφορά για τη σύγκριση των χρόνων πήξης των δειγμάτων που μελετήθηκαν.



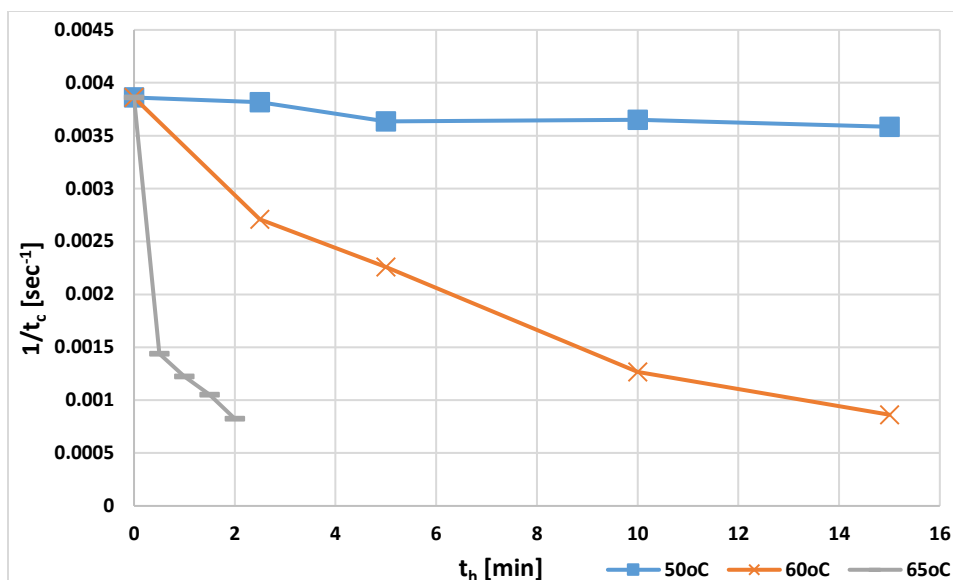
Σχήμα 18: Το αντίστροφο του χρόνου πήξης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία για διάλυμα πυτιάς 2 mg/mL.

5.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Στην προηγούμενη ενότητα μελετήθηκε η πηκτική ικανότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων της μαγιάς σε δύο υποστρώματα γάλακτος για διάφορες θερμοκρασίες, με εύρος από 40 ως και 75°C. Καθώς παρατηρήθηκε ότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ορισμένες από τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν δεν οδήγησαν σε πήξη του γάλακτος, ενώ τα δείγματα εμφάνιζαν πρωτεολυτική ενεργότητα σε όλα τα υποστρώματα που μελετήθηκαν, κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί το ενδεχόμενο να παρατηρείται θερμική εζνυμική απενεργοποίηση.

Όπως παρατηρείται από το Σχήμα 19, ο χρόνος πήξης παραμένει πρακτικά σταθερός ακόμη και μετά από 15 min επώασης του δείγματος στους 50°C. Κατά την επώαση στους 60°C παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους $1/t_c$, που υποδηλώνει αύξηση του χρόνου πήξης. Συγκεκριμένα, το δείγμα C 23h 32°C, που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη αυτή, οδήγησε σε πήξη του υποστρώματος με 20 mM CaCl₂ στους 50°C σε χρόνο 4.3 min, ενώ αν προηγηθεί επώαση του δείγματος στους 60°C για 15 min, ο χρόνος πήξης του ίδιου υποστρώματος στην ίδια θερμοκρασία είναι 19.3 min. Η θερμική απενεργοποίηση εμφανίζει αυξημένο ρυθμό με επώαση στους 65°C, καθώς μετά από 2 min επώασης στη θερμοκρασία αυτή, το δείγμα προκαλεί πήξη του υποστρώματος σε χρόνο 20.2 min. Ο χρόνος πήξης που προέκυψε μετά από την επώαση του δείγματος για 0.5 min στους 70°C ήταν μεγαλύτερος από 40 min και συνεπώς δε μελετήθηκε η επώαση για μεγαλύτερους χρόνους στη θερμοκρασία αυτή αλλά ούτε και η επώαση στους 75°C.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι κατά τη διάρκεια της επώασης του μίγματος υποστρώματος – ενζύμου σε θερμοκρασίες από 60°C και άνω, πραγματοποιούνται παράλληλα δύο φαινόμενα, η πήξη του υποστρώματος και η θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου. Οι ρυθμοί των δύο φαινομένων διαφέρουν για κάθε δείγμα και κάθε θερμοκρασία, συνεπώς τα δείγματα που εμφανίζουν μεγαλύτερο ρυθμό πήξης από ρυθμό απενεργοποίησης σε κάποια θερμοκρασία, προλαβαίνουν να πήξουν το υπόστρωμα στη θερμοκρασία αυτή, ενώ αν ο ρυθμός απενεργοποίησης είναι μεγαλύτερος δεν παρατηρείται πήξη. Η παρατήρηση αυτή δικαιολογεί τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν στην Ενότητα 5.3, όπου για συγκεκριμένα δείγματα (400/0 0h, 400/2.5 4h 42°C, 400/10 0h), ενώ εμφανίζουν πρωτεολυτική ενεργότητα, παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των δύο υποστρωμάτων (10 mM και 20 mM CaCl₂).



Σχήμα 19: Το αντίστροφο του χρόνου πήξης του υποστρώματος γάλακτος με 20 mM CaCl₂ στους 50°C από το δείγμα C 23h 32°C σε συνάρτηση με το χρόνο θερμικής επεξεργασίας του δείγματος στις θερμοκρασίες 50, 60 και 65°C.

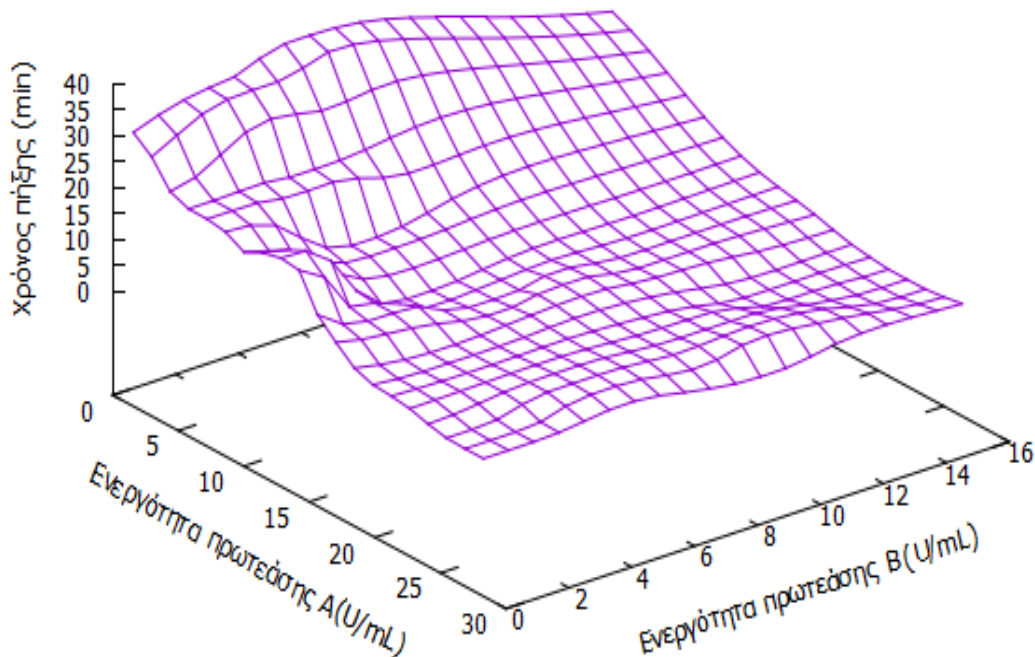
5.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΗΞΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ

Με βάση όλα τα παραπάνω, για να μπορέσει να γίνει η μελέτη της συσχέτισης του χρόνου πήξης με την ενεργότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων των δειγμάτων που μελετήθηκαν, καταστρώθηκε ο Πίνακας 7. Σε αυτόν παρουσιάζονται η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα, η ενεργότητα της πρωτεΐνάσης A και της πρωτεΐνάσης B του κάθε δείγματος, καθώς και ο χρόνος πήξης που επιτυγχάνεται από το κάθε δείγμα. Για να είναι δυνατή η σύγκριση των χρόνων πήξης, στον πίνακα δίνεται για κάθε δείγμα ο χρόνος στον οποίο επιτεύχθηκε η πήξη του υποστρώματος με 20 mM CaCl₂ στους 60°C. Τα δείγματα στα οποία παρατηρήθηκαν οι μικρότεροι χρόνοι πήξης με βάση τον Πίνακα 7 είναι το 400/2.5 6h 42°C, το C 13h 42°C και το C 23h 42°C, με χρόνους πήξης 2.9 ± 0.2 , 2.2 ± 0.2 και 2.3 ± 0.1 min αντίστοιχα. Και τα τρία αυτά δείγματα εμφανίζουν υψηλές τιμές ενεργότητας τόσο για το σύνολο των πρωτεολυτικών τους ενζύμων όσο και για την πρωτεΐνάση A και την πρωτεΐνάση B μεμονωμένα.

Για ευκολότερη παρατήρηση της εξάρτησης του χρόνου πήξης από τις ενεργότητες της πρωτεΐνάσης A και της πρωτεΐνάσης B, καταστρώθηκε τρισδιάστατο διάγραμμα με το πρόγραμμα gnuplot, το οποίο παρουσιάζεται στο Σχήμα 20. Τα σημεία του διαγράμματος προκύπτουν από τις τιμές του Πίνακα 7. Στο διάγραμμα αυτό παρατηρείται ότι με αύξηση της ενεργότητας της πρωτεΐνάσης A μειώνεται ο χρόνος πήξης. Επίσης, παρατηρείται ότι για

σταθερή ενεργότητα της πρωτεΐνης A, παρατηρείται μείωση του χρόνου πήξης με αύξηση της ενεργότητας της πρωτεΐνης B μέχρι περίπου 4 U/mL, ενώ για υψηλότερες τιμές ενεργότητας δεν παρατηρείται διαφορά στο χρόνο πήξης. Βέβαια, με βάση τις συνθήκες υπερυψηλής πίεσης και αυτόλυσης που χρησιμοποιήθηκαν, δεν προέκυψαν δείγματα με υψηλή ενεργότητα της πρωτεΐνης B και χαμηλή ενεργότητα της πρωτεΐνης A έτσι ώστε να μπορέσουν να εξαχθούν περισσότερα συμπεράσματα για τη δράση της πρωτεΐνης B στην πήξη του γάλακτος. Μια πιθανή λύση αυτού του προβλήματος είναι να χρησιμοποιηθεί κάποιος παρεμποδιστής της πρωτεΐνης A, όπως η πεπστατίνη.

Συνολικά, από το διάγραμμα του Σχήματος 20 συμπεραίνεται ότι κυρίαρχο ρόλο στην πήξη του γάλακτος έχει η πρωτεΐνη A. Αυτό είναι αντίθετο με τη βιβλιογραφία (Hata *et al.*, 1967), σύμφωνα με την οποία η πρωτεΐνη B παρουσιάζει δυνατότητα πήξης του γάλακτος. Όμως, όπως παρατηρείται από τον Πίνακα 2 (Ενότητα 2.3) η πρωτεΐνη A είναι ασπαραγινική πρωτεΐνη, όπως και η χυμοσίνη της πυτιάς αλλά και τα περισσότερα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την πήξη του γάλακτος, οπότε αναμένεται να εμφανίζει την απαραίτητη εξειδίκευση που απαιτείται για την ενζυμική πήξη του γάλακτος.



Σχήμα 20: Διάγραμμα του χρόνου πήξης σε συνάρτηση με την ενεργότητα της πρωτεΐνης A και την ενεργότητα της πρωτεΐνης B.

Πίνακας 7

Η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα, η ενεργότητα της πρωτεΐνάσης A και της πρωτεΐνάσης B καθώς και ο χρόνος πήξης της 60°C για το υπόστρωμα με 20 mM CaCl₂ για τα δείγματα που μελετήθηκαν

Δείγμα	Ολική πρωτελυτική ενεργότητα [U/mL]	Ενεργότητα πρωτεΐνάσης A [U/mL]	Ενεργότητα πρωτεΐνάσης B [U/mL]	Χρόνος πήξης [min]
200/10 0h	30.9 ± 0.27	24.20 ± 0.13	4.62 ± 0.24	6.7 ± 0.9
200/10 2h 42 °C	21.18 ± 0.01	5.08 ± 0.49	4.38 ± 0.17	21.0 ± 2.3
200/10 4h 42 °C	88.42 ± 1.78	15.60 ± 0.85	10.50 ± 0.37	6.1 ± 0.7
200/10 6h 52 °C	24.55 ± 0.21	14.42 ± 0.53	7.01 ± 0.06	23.0 ± 1.7
400/0 0h	25.89 ± 0.04	17.31 ± 0.92	2.13 ± 0.01	6.2 ± 1.0
400/0 15h 52 °C	9.46 ± 0.13	12.14 ± 0.13	0.45 ± 0.03	21.6 ± 1.4
400/2.5 0h	28.76 ± 0.22	14.64 ± 0.71	6.04 ± 0.10	6.2 ± 1.3
400/2.5 2h 42 °C	18.20 ± 0.06	1.887 ± 0.53	4.03 ± 0.10	34.0 ± 3.1
400/2.5 4h 42 °C	33.51 ± 0.08	12.33 ± 1.45	4.79 ± 0.17	5.6 ± 1.2
400/2.5 6h 42 °C	96.20 ± 1.24	20.68 ± 0.85	12.71 ± 0.10	2.9 ± 0.2
400/2.5 21h 42 °C	57.95 ± 0.17	25.40 ± 2.23	9.93 ± 0.01	6.7 ± 0.6
400/10 0h	26.71 ± 1.50	15.57 ± 0.20	7.77 ± 0.15	7.7 ± 2.0
400/10 4h 32 °C	18.69 ± 0.48	0.50 ± 0.14	5.65 ± 0.06	37.8 ± 0.4
600/0 13h 42 °C	17.80 ± 0.11	2.73 ± 1.10	7.67 ± 0.07	>60
600/0 23h 32 °C	22.39 ± 0.51	4.30 ± 0.35	5.93 ± 0.08	>60
C 0h	10.16 ± 0.04	25.98 ± 0.79	1.41 ± 0.05	4.1 ± 0.5
C 2h 42 °C	16.16 ± 0.82	14.00 ± 0.42	2.66 ± 0.23	10.0 ± 1.2
C 4h 32 °C	18.48 ± 0.84	18.56 ± 0.68	3.26 ± 0.08	6.1 ± 1.2
C 4h 42 °C	30.32 ± 0.40	8.23 ± 0.64	4.88 ± 0.14	5.2 ± 0.9
C 6h 42 °C	60.62 ± 1.27	11.30 ± 0.18	11.01 ± 0.07	14.9 ± 1.4
C 6h 52 °C	8.56 ± 0.72	10.89 ± 0.64	6.21 ± 0.24	25.7 ± 1.9
C 13h 42 °C	87.26 ± 1.64	27.20 ± 0.39	9.56 ± 0.03	2.2 ± 0.2
C 15h 52 °C	6.34 ± 0.07	5.61 ± 0.66	1.01 ± 0.06	21.4 ± 3.6
C 21h 42 °C	56.21 ± 3.37	22.95 ± 0.64	9.61 ± 0.04	5.5 ± 0.3
C 23h 32 °C	114.82 ± 1.19	22.85 ± 0.81	15.67 ± 0.06	2.3 ± 0.1
Πυτιά 2 mg/mL	-	-	-	1.8



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ

Η επεξεργασία του αιωρήματος μαγιάς με υπερυψηλή πίεση μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση αλλά και απενεργοποίηση των πρωτεολυτικών ενζύμων της μαγιάς, επηρεάζοντας είτε τη δομή των ενζύμων, είτε τον τρόπο αλληλεπίδρασης με τους παρεμποδιστές τους. Οι συνθήκες πίεσης και χρόνου επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν παρουσίασαν διαφορετική επίδραση στην ολική πρωτεολυτική ενεργότητα, στην ενεργότητα της πρωτεΐνάσης A και στην ενεργότητα της πρωτεΐνάσης B. Η μόνη συνθήκη πίεσης στην οποία τα συμπεράσματα είναι κοινά τόσο για το σύνολο των πρωτεολυτικών ενζύμων όσο και για τις πρωτεΐνάσες A και B μεμονωμένα είναι η πίεση 600 MPa, στην οποία παρατηρήθηκε απενεργοποίηση των ενζύμων σε κάθε περίπτωση. Από τις υπόλοιπες συνθήκες, μέγιστη ενεργοποίηση στο σύνολο των πρωτεολυτικών ενζύμων προκάλεσε επεξεργασία στα 200 MPa για 30 min, με 220% αύξηση στην ενεργότητα. Για την πρωτεΐνάση A καμία από τις συνθήκες που μελετήθηκαν δεν προκάλεσε αύξηση στην ενεργότητα, ενώ η επεξεργασία στα 400 MPa για 10 min προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας της πρωτεΐνάσης B κατά 451%.

6.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΥΤΟΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ

Όπως έχει προαναφερθεί, η αυτόλυση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των πρωτεολυτικών ενζύμων του κυττάρου της μαγιάς, τα οποία στη συνέχεια πρωτεολύουν μακρομόρια στο εσωτερικό του κυττάρου στις δομικές μονάδες τους, οι οποίες είναι ευδιάλυτες και διαρρέουν στο εξωτερικό των κυττάρων. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην οποία

πραγματοποιήθηκε η αυτόλυση και του χρόνου επώασης των δειγμάτων στην ενζυμική ενεργότητα.

Η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα σημειώνει μια συνεχή αύξηση κατά την επώαση στους 32°C για τις πρώτες 16 h επώασης, ενώ από τις 16 μέχρι τις 23 h η ενεργότητα παραμένει σταθερή. Μετά από 23 h επώασης η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα είναι 114.82 ± 1.19 U/mL σε σχέση με την ενεργότητα του αιωρήματος μαγιάς χωρίς επώαση που είναι 10.16 ± 0.04 U/mL. Είναι φανερό λοιπόν ότι η διεργασία της αυτόλυσης στους 32°C ευνοεί αρκετά την ολική πρωτεολυτική ενεργότητα. Η ίδια διαδικασία στους 42°C οδηγεί στην αύξηση της ενεργότητας μέχρι τις 8 h επώασης όπου επιτυγχάνεται ενεργότητα 98.12 ± 0.40 U/mL και στη συνέχεια μείωση μέχρι το τέλος της επώασης. Κατά την αυτόλυση στους 42°C λοιπόν, η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα αυξάνεται λιγότερο απ' ό τι στους 32°C, όμως το μέγιστο επιτυγχάνεται 8 h νωρίτερα σε σχέση με τους 32°C. Κατά την επώαση στους 52°C δεν παρατηρείται καμία αύξηση στην ολική πρωτεολυτική ενεργότητα, η οποία μετά από 23 h είναι 6.73 ± 0.04 U/mL.

Στην ενεργότητα της πρωτεΐνάσης A δεν εμφανίζεται σημαντική αύξηση καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης σε καμία από τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, στους 32°C, η μέγιστη ενεργότητα παρουσιάζεται μετά από 16 h και είναι ίση με 28.75 ± 1.87 U/mL ενώ το αιώρημα που δεν έχει υποστεί αυτόλυση έχει ενεργότητα 25.98 ± 0.15 U/mL. Με 15 h επώασης στους 42°C επιτυγχάνεται ενεργότητα 27.90 ± 3.57 U/mL ενώ στους 52°C η ενεργότητα μειώνεται κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι η αυτόλυση δεν αρκεί για ικανοποιητική αύξηση της ενεργότητας της πρωτεΐνάσης A, τουλάχιστον στις συνθήκες που μελετήθηκαν.

Η ενεργότητα της πρωτεΐνάσης B σε αιώρημα μαγιάς που δεν έχει υποστεί αυτόλυση είναι 1.41 ± 0.08 U/mL, όμως με επώαση στους 32°C για 23 h φτάνει την τιμή 15.67 ± 0.06 U/mL. Για επώαση στους 42°C η μέγιστη τιμή είναι 12.79 ± 0.33 U/mL κι επιτυγχάνεται στις 8 h. Σε αντίθεση με την ενεργότητα της πρωτεΐνάσης A και τη συνολική πρωτεολυτική ενεργότητα, η ενεργότητα της πρωτεΐνάσης B αυξάνεται και κατά την επώαση στους 52°C, λιγότερο βέβαια απ' όσο αυξάνεται στις χαμηλότερες θερμοκρασίες, με μέγιστο 6.21 ± 0.24 U/mL στις 6 h επώασης.

6.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΥΤΟΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΑΓΙΑΣ

Ξεκινώντας με την ολική πρωτεολυτική ενεργότητα, ο συνδυασμός συνθηκών που τη μεγιστοποιούν είναι επεξεργασία στα 400 MPa για 0 min και στη συνέχεια επώαση για 8 h

στους 42°C. Με την παραπάνω διαδικασία, το εκχύλισμα που προκύπτει έχει ολική πρωτεολυτική ενεργότητα 123.14 ± 3.03 U/mL.

Η επεξεργασία του αιωρήματος μαγιάς με υπερυψηλή πίεση δεν προκαλεί σημαντική αύξηση της ενεργότητας της πρωτεΐνης A κατά την αυτόλυση σε σχέση αυτή του μη επεξεργασμένου αιωρήματος. Οι βέλτιστες τιμές που επιτυγχάνονται με τη συνδυαστική δράση πίεσης και αυτόλυσης είναι 32.10 ± 1.41 U/mL με επεξεργασία στα 400 MPa για 2.5 min και επώαση στους 42°C για 15 h και 31.33 ± 2.68 U/mL για επεξεργασία στα 200 MPa για 10 min και επώαση στους 32°C για 16 h. Όμως, η μέγιστη τιμή ενεργότητας που επιτυγχάνεται κατά την επώαση του ανεπεξέργαστου δείγματος είναι 28.75 ± 1.87 U/mL, οπότε η μέγιστη αύξηση της ενεργότητας που επιτυγχάνεται με την επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση είναι μόνο 10.3%.

Κανένας συνδυασμός συνθηκών πίεσης και αυτόλυσης δεν οδηγεί σε υψηλότερη ενεργότητα πρωτεΐνης B από το μέγιστο που παρατηρείται κατά την επώαση του μη επεξεργασμένου δείγματος για 23 h στους 32°C (15.67 ± 0.06 U/mL). Υπάρχουν όμως συνθήκες που αυξάνουν την ενεργότητα σε σχέση με αυτή του ανεπεξέργαστου κατά την αυτόλυση στους 42 και τους 52°C. Συγκεκριμένα, η επεξεργασία στα 200 MPa για 0 min μαζί με επώαση στους 42°C για 8 h οδηγεί σε ενεργότητα της πρωτεΐνης B ίση με 15.04 ± 0.45 U/mL ενώ η βέλτιστη ενεργότητα στους 42°C χωρίς επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση είναι 12.79 ± 0.33 U/mL. Αντίστοιχα στους 52°C επιτυγχάνεται ενεργότητα 9.67 ± 0.04 U/mL με επεξεργασία στα 200 MPa για 30 min και επώαση για 2 h, ενώ η μέγιστη τιμή σε αυτή τη θερμοκρασία χωρίς προεπεξεργασία με υπερυψηλή πίεση είναι 6.21 ± 0.24 U/mL.

Εκτός από αύξηση της ενεργότητας κατά την αυτόλυση, η προεπεξεργασία με υπερυψηλή πίεση συμβάλλει και στην επιτάχυνση της αυτόλυσης, δηλαδή στην επίτευξη ενεργότητας ίσης με αυτής του ανεπεξέργαστου δείγματος αλλά με λιγότερες ώρες επώασης. Έτσι, κατά την επώαση στους 32°C, το δείγμα επεξεργασμένο στα 200 MPa για 10 min επιτυγχάνει μετά από 8 h επώασης ίση ολική πρωτεολυτική ενεργότητα με αυτή του ανεπεξέργαστου στις 16 h επώασης. Αντίστοιχα για την πρωτεΐνη A, η ενεργότητα που επιτυγχάνεται από το ανεπεξέργαστο δείγμα μετά από 15 h στους 42°C, επιτυγχάνεται από το δείγμα επεξεργασμένο στα 200 MPa για 0 min 7 h νωρίτερα.

6.4. ΠΗΞΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΑΓΙΑΣ

Η πήξη του γάλακτος με τη χρήση των πρωτεολυτικών ενζύμων της μαγιάς μελετήθηκε σε θερμοκρασίες 40 – 75°C και για συγκεντρώσεις CaCl_2 10 και 20 mM στο υπόστρωμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πήξη ήταν ταχύτερη στο υπόστρωμα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε CaCl_2 . Σχετικά με τη θερμοκρασία, παρατηρήθηκε ότι η πήξη

συμβαίνει γρηγορότερα με την αύξηση της θερμοκρασίας, όμως στις θερμοκρασίες 60 – 75°C συμβαίνει παράλληλα και μερική απενεργοποίηση των ενζύμων. Έτσι, ανάλογα με τη σχέση του ρυθμού πήξης και του ρυθμού ενζυμικής απενεργοποίησης, στις θερμοκρασίες αυτές μπορεί να παρατηρηθεί από αδυναμία πήξης του υποστρώματος ως και ταχύτατη πήξη.

Συγκρίνοντας τους χρόνους πήξης υποστρώματος με συγκέντρωση CaCl_2 20 mM στους 60°C για διάφορα από τα παρασκευασμένα εκχυλίσματα μαγιάς, τρία δείγματα ξεχώρισαν λόγω της ταχύτατης πήξης που προκάλεσαν. Το πρώτο, το οποίο προέκυψε από επεξεργασία στα 400 MPa για 2.5 min και στη συνέχεια επώαση στους 42°C για 6 h, προκάλεσε πήξη του υποστρώματος σε 2.9 ± 0.2 min. Το δεύτερο, το οποίο επώαστηκε στους 42°C για 13 h χωρίς προεπεξεργασία με υπερυψηλή πίεση, έπηξε το υπόστρωμα σε 2.2 ± 0.2 min. Το τρίτο επίσης δεν υποβλήθηκε σε επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση παρά μόνο σε επώαση για 23 h στους 32°C και προκάλεσε πήξη του υποστρώματος σε 2.3 ± 0.1 min. Συνολικά, κρίνοντας με βάση την ολική επεξεργασία των τριών δειγμάτων και αφού οι χρόνοι πήξης διαφέρουν μόνο κατά μερικά δευτερόλεπτα, συμπεραίνεται ότι το επεξεργασμένο δείγμα απαιτεί 6 h επώασης ενώ τα ανεπεξέργαστα δείγματα απαιτούν επώαση για 7 και 17 h περισσότερο, συνεπώς η προεπεξεργασία με υπερυψηλή πίεση οδηγεί σε παραπλήσιο χρόνο πήξης με πολύ μικρότερο απαιτούμενο χρόνο επώασης.

Κυρίαρχο ρόλο στην πήξη του γάλακτος έχει η πρωτεΐνωση Α, με την αύξηση της οποίας παρατηρείται μείωση του χρόνου πήξης, ενώ η αύξηση της ενεργότητας της πρωτεΐνωσης Β πάνω από τα 4 U/mL για σταθερή ενεργότητα της πρωτεΐνωσης Α δεν προκαλεί περαιτέρω μείωση του χρόνου πήξης.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη καταδεικνύουν τη δυνατότητα χρήσης των πρωτεολυτικών ενζύμων της μαγιάς για την πήξη του γάλακτος, ενώ η υπερυψηλή πίεση σε συνδυασμό με την αυτόλυση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία για την τροποποίηση της ενεργότητας των ενζύμων αυτών.

6.5. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Εκτός από την επίδραση της υπερυψηλής πίεσης, που μελετήθηκε στην παρούσα έρευνα, χρήσιμο είναι να πραγματοποιηθεί και η μελέτη της επίδρασης άλλων μη θερμικών διεργασιών στα πρωτεολυτικά ένζυμα της μαγιάς. Έτσι θα μπορεί να γίνει σύγκριση μεταξύ των μεθόδων για να διαπιστωθεί ποια διαδικασία οδηγεί στη μέγιστη ενεργοποίηση των ενζύμων. Μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί ανάλυση υφής και οργανοληπτικός έλεγχος των γαλακτοκομικών προϊόντων που παράγονται με τη χρήση ενζύμων από εκχυλίσματα μαγιάς, ώστε να εξετασθεί η παρουσία ανεπιθύμητων πικρών πεπτιδίων που μπορούν να παραχθούν κατά την παρατεταμένη πρωτεόλυση της καζεΐνης. Τέλος, θα μπορούσε να

πραγματοποιηθεί απομόνωση πρωτεολυτικών ενζύμων της μαγιάς και μελέτη της επίδρασης της υπερυψηλής πίεσης στο καθένα ξεχωριστά, καθώς και χρήση των ενζύμων, είτε απομονωμένα είτε σε συνδυασμούς μεταξύ τους, σε υπόστρωμα γάλακτος για να γίνει αντιληπτή η συνεργιστική τους δράση κατά την πήξη.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aehle, W. (2007). Enzymes in industry: production and applications. *John Wiley & Sons*.
- Andreou, V., Dimopoulos, G., Alexandrakis, Z., Katsaros, G., Oikonomou, D., Toepfl, S., Heinz, V., Taoukis, P. (2017). Shelf-life evaluation of virgin olive oil extracted from olives subjected to nonthermal pretreatments for yield increase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 40, 52-57.
- Arima, K., Yu, J., & Iwasaki, S. (1970). Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt.. In *Methods in enzymology* (pp. 446–459). *New York: Academic Press*.
- Awad, S., Lüthi-Peng, Q. Q. & Puhan, Z. (1999). Proteolytic activities of Suparen and Rennilase on buffalo, cow, and goat whole casein and b-casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3632–3639.
- Banno, I. (1967). Studies on the sexuality of rhodotorula. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 13(2), 167-196.
- Běhalová, B., & Beran, K. (1979). Activation of proteolytic enzymes during autolysis of disintegrated baker's Yeast. *Folia Microbiologica*, 24(6), 455–461.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Food chemistry 4th edn. *Springer, Berlin, Heidelberg*.
- Berridge, N. J. (1952). Some observations on the determination of the activity of rennet. *The Analyst*, 77(911), 57-62.
- Beynon, R., & Bond, J. (1989). Proteolytic enzymes: a practical approach. *Oxford University Press*.
- Boonyeun, P., Shotipruk, A., Prommuak, C., Suphantharika, M., & Muangnapoh, C. (2011). Enhancement of Amino Acid Production by Two-Step Autolysis of Spent Brewer's Yeast. *Chemical Engineering Communications*, 198(12), 1594–1602.
- Bott, R. (1997). Development of new proteases for detergents. *Surfactant science series*, 75-92.
- Bowers, K., & Stevens, T. H. (2005). Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1744(3), 438–454.

- Broach J.R., Pringle, J.R., Jones, E.W. (1991). The Molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. *Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Brown, J.L. Kossaczka, Z., Jiang, B. & Bussey, H. (1993). A mutational analysis of killer toxin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* identifies new genes involved in (1-6)- β -glucan synthesis. *Genetics*, *133*, 837-849.
- Cavalcanti, M. T. H., Martinez, C. R., Furtado, V. C., Neto, B. B., Teixeira, M. F. S., Lima, J. L. & Porto, A. L. F. (2005). Milk-clotting protease production by *Nocardopsis sp.* in an inexpensive medium. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *21*, 151–154.
- Chae, H. J., Joo, H., & In, M. J. (2001). Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresource Technology*, *76*(3), 253-258.
- Chazarra, S., Sidrach, L., Lopez-Molina, D. & Rodriguez- Lopez, J. (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, *17*, 1393– 1400.
- Chitpinyol, S., & Crabbe, M. C. (1998). Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, *61*(4), 395-418.
- Comuzzo, P., Calligaris, S., Iacumin, L., Ginaldi, F., Palacios Paz, A. E., & Zironi, R. (2015). Potential of high pressure homogenization to induce autolysis of wine yeasts. *Food Chemistry*, *185*, 340–348.
- Dawson, M.P. (1994). Classification of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* based on physiological characteristics. Master of Applied Science in Food Microbiology thesis, *University of New South Wales, Sydney*.
- Dembowsky, K., & Stadler, P. (Eds.). (2008). Novel therapeutic proteins: Selected case studies. *John Wiley & Sons*.
- Duarte, A. R., Duarte, M. D. R., Moreira, K. A., Cavalcanti, M. T. H., de Lima, J. L. & Porto, A. L. F. (2009.) *Jacaration corumbensis* O. Kuntze a new vegetable source for milk-clotting enzymes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *52*, 1–9.
- Egito, A. S., Girardet, J. M., Laguna, L. E., Poirson, C., Mollé, D., Miclo, L., Humbert, G. & Gaillard, J. L. (2007) Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. *International Dairy Journal*, *17*, 816–825.
- Egmond, M. R. (1997). Application of proteases in detergents. *Surfactant science series*, 61-74.

- Eisenmenger, M. J., & Reyes-De-Corcuera, J. I. (2009). High pressure enhancement of enzymes: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 331-347.
- Fellows, P. (2000). Food Processing Technology. *Technology Guide: Principles - Applications - Trends*, 34–37.
- Fleet, G.H. (1991). Cell walls. In *The Yeasts*, 2nd edn, Vol. 4: Yeast Organelles, *Academic Press, London*, 199-277.
- Food Preservation Machine. (n.d.). Retrieved February 5, 2020, from www.hpp.com.tw/en/hiperbaric135
- Fukal, L., Káš, J., & Rauch, P. (1986). Properties of yeast proteinases. *Journal of the Institute of Brewing*, 92(4), 357–359.
- Giannoglou, M., Karra, Z., Platakou, E., Katsaros, G., Moatsou, G., & Taoukis, P. (2016). Effect of high pressure treatment applied on starter culture or on semi-ripened cheese in the quality and ripening of cheese in brine. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 28, 312-320.
- Gomes, M. R. A., Clark, R., & Ledward, D. A. (1998). Effects of high pressure on amylases and starch in wheat and barley flours. *Food Chemistry*, 63(3), 363-372.
- Guérin, B. (1991). Mitochondria. In *The Yeasts*, 2nd edn, Vol. 4: Yeast Organelles. *Academic Press, London*, 541-600.
- Hata, T., Hayashi, R., & Doi, E. (1967). Purification of Yeast Proteinases. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31(3), 357–367.
- Hayert, M., Perrier-Cornet, J. M., & Gervais, P. (1997). Why do yeasts die under pressure. *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*. K. Heremans,(editor). *Leuven University Press, Leuven, Belgium*, 205-208.
- Hecht, K. A., O'Donnell, A. F., & Brodsky, J. L. (2014). The proteolytic landscape of the yeast vacuole. *Cellular Logistics*, 4(1), e28023
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., & Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), 197-203.
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 52(4), 536-553.
- History of beer. (n.d.). Retrieved February 5, 2020, from <https://iamthebeersnob.com/history-of-beer>.

- Ilany, J., & Netzer, A. (1969). Milk-Clotting Activity of Proteolytic Enzymes. *Journal of Dairy Science*, 52(1), 43–46.
- Iwahashi, H., Obuchi, K., Fujii, S., Fujita, K., & Komatsu, Y. (1996). The reason why trehalose is more important for barotolerance than hsp104 in *Saccharomyces cerevisiae*. *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*. Leuven University Press, Leuven, Belgium.
- Jacob, M., Jaros, D., & Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14–33.
- Johnson, E. A., & Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast biotechnology. In *The Yeasts* (pp. 21-44). Elsevier.
- Johnson, J. A., Miller, B. S., Boyer, P. D., & Geddes, W. F. (1956). Properties of certain protease systems used in breadmaking. *Cereal Chemistry*, 33(1), 1-17.
- Jun, X. (2009). Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing. *Journal of Food Engineering*, 94, 105-109.
- Katsaros, G. I., & Taoukis, P. S. (2015). New/Innovative Technologies. In T. Varzakas, & C. Tzia, *Food Engineering Handbook* (Vol. II (Food Process Engineering), pp. 595-602). CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Kim, S. M., & Zayas, J. F. (1991). Comparative quality characteristics of chymosin extracts obtained by ultrasound treatment. *Journal of food science*, 56(2), 406-410.
- Knorr, D. (1993). Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food technology (Chicago)*, 47(6), 156-161.
- Kristin Hoffman. (n.d.). What is Yeast and How Yeast Works on Baking. Retrieved February 5, 2020, from <https://bakerbettie.com/what-is-yeast/>.
- Kurtzman, C. P. (1994). Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, 10(13), 1727–1740.
- Legras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J. M., & Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*, 16(10), 2091–2102.
- Lenney, J. F. (1975). Three yeast proteins that specifically inhibit yeast proteases A, B, and C. *Journal of Bacteriology*, 122(3), 1265–1273.
- Lenney, J. F., Matile, P., Wiemken, A., Schellenberg, M., & Meyer, J. (1974). Activities and cellular localization of yeast proteases and their inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 60(4), 1378–1383.

- Liu, D., Zeng, X.-A., Sun, D.-W., & Han, Z. (2013). Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 132–137.
- Llorente, B. E., Brutti, C. B. and Caffini, N. O. (2004). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8182–8198.
- Low, Y. H., Agboola, S., Zhao, H. and Lim, M. Y. (2006). Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. *International Dairy Journal*, 16, 335–343.
- Melissa Hogenboom. (2013, July 11). Scientists building the world's first synthetic yeast. Retrieved February 5, 2020, from <https://www.bbc.com/news/science-environment-23244768>.
- Murray, T. K., & Baker, B. E. (1952). Studies on protein hydrolysis. I.—preliminary observations on the taste of enzymic protein-hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 3(10), 470-475.
- Nouani, A., Belhamiche, N., Slamani, R., Belbraouet, S., Fazouane, F., & Bellal, M. M. (2009). Extracellular protease from *Mucor pusillus*: purification and characterization. *International journal of dairy technology*, 62(1), 112-117.
- Oliver, G., Wheeler, R. J., & Thacker, D. (1996). Semi-Sweet Biscuits: 2. Alternatives to the Use of Sodium Metabisulphite in Semi-Sweet Biscuit Production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71(3), 337-344.
- Pale lager. (n.d.). Retrieved February 5, 2020, from <https://www.internationalbeershop.com.au/pale-lager>.
- Pascalization or High Pressure Processing (HPP). (2019, February 1). Retrieved February 5, 2020, from www.pmg.engineering/2019/02/01/pascalization-or-high-pressure-processing-hpp/.
- Ponce, E., Pla, R., Sendra, E., Guamis, B., & Mor-Mur, M. (1998). Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure on destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in liquid whole egg. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 15–19.
- Prescott, D. M. (2013). Methods in Cell Biology Vol 12: Yeast Cells. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Pringle, J. R. (1975). Methods for Avoiding Proteolytic Artefacts in Studies of Enzymes and Other Proteins from Yeasts. In *Methods in Cell Biology*, Academic Press, 12, 149-184.

- Raposo, S. & Domingos, A. (2008). Purification and characterization of milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitropa* cell suspension cultures. *Process Biochemistry*, *43*, 139–144.
- Reed, G., & Nagodawithana, T. W. (1990). Yeast Technology. In *Yeast Technology*.
- Rehm, H. J., Reed, G., & Nagodawithana, T. W. (1995). *Biotechnology: Enzymes, biomass, food and feed* (Vol. 9). Wiley-VCH.
- Rij, K. V. (1984). *The Yeasts: a taxonomic study*. 3rd edn. Elsevier Science.
- Rose, A.H. (1993). Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, *14*, 110-118.
- San Martin, M. F., Barbosa-Canovas, G. V., & Swanson, B. G. (2002). Food processing by high hydrostatic pressure. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *81(4)*, 672–679.
- Santillo, A., Quinto, M., Dentico, M., Muscio, A., Sevi, A. and Albenzio, M. (2007). Rennet paste from lambs fed a milk substitute supplemented with *Lactobacillus acidophilus*: Effects on lipolysis in ovine cheese. *Journal of Dairy Science*, *90*, 3134–3142.
- Saranraj, P., Sivasakthivelan, P., & Suganthi, K. (2017). Baker's Yeast : Historical Development, Genetic Characteristics, Biochemistry, Fermentation and Downstream Processing. *Journal of Academia and Industrial Research*, *6(7)*, 111–119.
- Shalabi, S. I., & Fox, P. F. (1982). Influence of pH on the rennet coagulation of milk. *Journal of Dairy Research*, *49(1)*, 153-157.
- Siezen, R. J. (1996). Subtilases: subtilisin-like serine proteases. In *Subtilisin enzymes* (pp. 75-93). Springer, Boston, MA.
- Strong ale. (n.d.). Retrieved February 5, 2020, from <https://www.internationalbeershop.com.au/strong-ale>.
- Tangler, H., & Erten, H. (2008). Utilization of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperature. *Food and Bioproducts Processing*, *86(4)*, 317–321.
- Teichert, U., Mechler, B., Müller, H., Wolf, D. H. (1989). Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, *264(27)*, 16037-16045.
- Ustunol, Z., & Zeckzer, T. (1996). Relative Proteolytic Action of Milk-Clotting Enzyme Preparations on Bovine α -, β -and κ -casein. *Journal of food science*, *61(6)*, 1136-1138.

- Vanderpoorten, R., & Weckx, M. (1972). Breakdown of casein by rennet and microbial milk-clotting enzymes. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 26, 47–59.
- Walker, G. M. (1998). Yeast physiology and biotechnology. *John Wiley & Sons*.
- Ward, O. P. (1985). Hydrolytic enzymes. *Comprehensive biotechnology*, 3, 819-836.
- Wuytack, E. Y., Boven, S., & Michiels, C. W. (1998). Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(9), 3220-3224.
- Λημναίος, Α. Γ. (2018). Επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στη μαγιά αρτοποιίας (*Saccharomyces cerevisiae*) και στη διεργασία της αυτόλυσης για την παραλαβή εκχυλίσματος μαγιάς [Διπλωματική Εργασία]. Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.