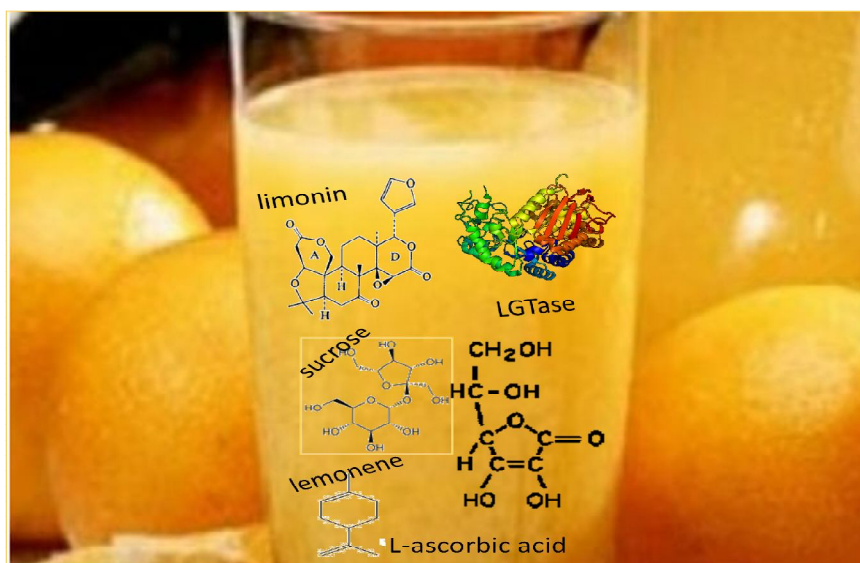


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



Μελέτη της επίδρασης των διεργασιών παστερίωσης και αποπύκνωσης στις φυσικοχημικές παραμέτρους χυμού πορτοκαλιού Navel και διερεύνηση της ενζυμικής αποπύκνωσης του



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΣΑΡΙΔΑΚΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

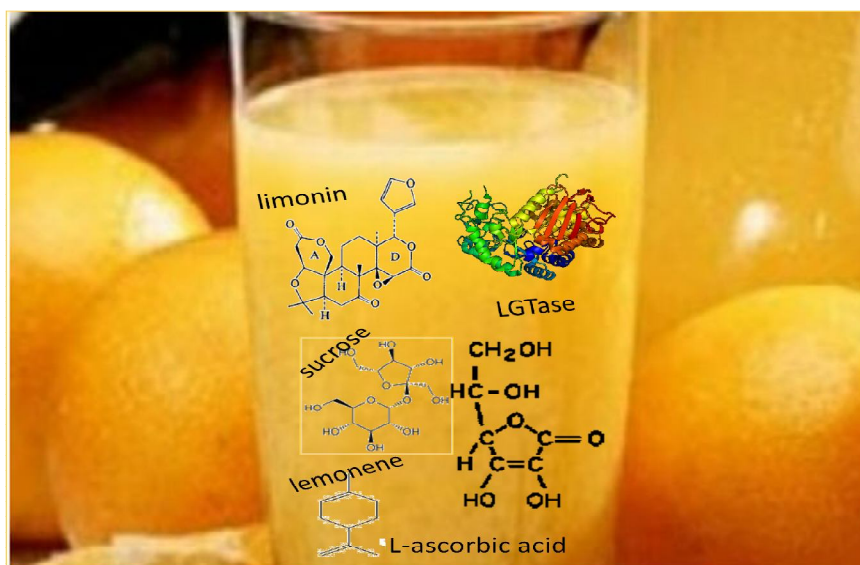
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΤΑΟΥΚΗΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2013

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



Μελέτη της επίδρασης των διεργασιών παστερίωσης και αποπύκνωσης στις φυσικοχημικές παραμέτρους χυμού πορτοκαλιού Navel και διερεύνηση της ενζυμικής αποπύκνωσης του



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΣΑΡΙΔΑΚΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΤΑΟΥΚΗΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2013

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Πέτρο Ταούκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με τον τομέα της χημείας και τεχνολογίας των τροφίμων με την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγησή του σε όλη τη διάρκεια αυτής.

Επίσης, θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τη Διδάκτορα Ελένη Γώγου για την αμέριστη βοήθεια, τις συμβουλές της και την ενθάρρυνση που μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Οφείλω ακόμα να ευχαριστήσω την Ματίνα Μπαβέλα, μέλος του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ε.Μ.Π., για τη βοήθεια που μου πρόσφερε στη μέτρηση των αρωματικών συστατικών των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού και στη διαδικασία παραλαβής του ακατέργαστου ενζύμου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Διδάκτορες Έφη Δερμεσονλούδου για την εκμάθηση χειρισμού και τις συμβουλές της σχετικά με τη συσκευή HPLC και τον Δημήτρη Τσιμογιάννη για την πολύτιμη βοήθεια του πάνω στα τεχνικά προβλήματα που παρουσίασε η συσκευή κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Ευχαριστώ, ακόμα τους Καθηγητές, τους Υποψήφιους Διδάκτορες και τους συμφοιτητές μου στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ε.Μ.Π. για τη συνεργασία μας και το φιλικό κλίμα σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ πάρα πολύ τους γονείς και τους φίλους μου για τη συμπαράσταση και την υπομονή που έδειξαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας και ιδιαίτερα το τελευταίο διάστημα της συγγραφής της.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση των διεργασιών παστερίωσης και αποπίκρασης στις φυσικοχημικές παραμέτρους ποιότητας σε μη συμπυκνωμένο χυμό από πορτοκάλια Navel και η διακύμανση τους σε σχέση με την περίοδο συγκομιδής και το χρόνο μεταποίησης. Μελετήθηκε, επίσης, η ένταση της πικρής γεύσης του χυμού Navel μέσω της ποσοτικοποίησης της περιεχόμενης λιμονίνης. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια συσχέτισης της συγκέντρωσης της λιμονίνης του χυμού με τις φυσικοχημικές παραμέτρους του. Επίσης, παράχθηκε και απομονώθηκε το ένζυμο γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών (LGTase) από το μεσοκάρπιο φράπας και διερευνήθηκε η ενζυμική αποπίκραση του χυμού από αυτό σε συνθήκες ΥΥΠ στο περιβάλλον του χυμού και σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης σε ρυθμιζόμενο pH.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μη συμπυκνωμένου χυμού Navel, τα οποία παραλήφθηκαν από τη βιομηχανία Ασπίς που εδρεύει στο Άργος. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε τρία διαφορετικά στάδια της γραμμής παραγωγής, πριν και μετά την παστερίωση και μετά την αποπίκραση, κατά την παραγωγική χρονιά 2011-2012 σε 14 διαφορετικές ημερομηνίες.

Κατά τη μελέτη των φυσικοχημικών παραμέτρων διαπιστώθηκε ότι οι τιμές pH των δειγμάτων κυμαίνονται μεταξύ 2,99-3,59 και παραμένουν ανεπηρέαστες από την εφαρμογή των διεργασιών παστερίωσης και αποπίκρασης. Μικρή επίδραση των διεργασιών παστερίωσης και αποπίκρασης παρατηρήθηκε και κατά τη μέτρηση των ολικών διαλυτών στερεών ($^{\circ}\text{Brix}$), της οξύτητας (A) και της απορρόφησης των καροτενοειδών και των πολυφαινολών στα δείγματα από τα τρία στάδια παραγωγής, που ανήκαν στην ίδια ημερομηνία παραγωγής. Πιο συγκεκριμένα οι τιμές των ολικών διαλυτών στερεών κυμάνθηκαν από 8,13-14,17 $^{\circ}\text{Brix}$ για τα απαστερίωτα δείγματα, 9,80-12,77 $^{\circ}\text{Brix}$ για τα παστεριωμένα και 9,80-13,00 $^{\circ}\text{Brix}$ για τα μετά την αποπίκραση δείγματα. Αντίστοιχα, η οξύτητα των απαστερίωτων δειγμάτων είχε τιμές από 2,82-5,80 g κιτρικού οξέος/100 mL χυμού, 3,05-5,90 g κιτρικού οξέος/100 mL χυμού τα παστεριωμένα δείγματα και 3,17-6,03 g κιτρικού οξέος/100 mL χυμού τα δείγματα μετά την αποπίκραση. Ενώ, οι απορροφήσεις των καροτενοειδών και των πολυφαινολών παρουσίασαν μικρές μεταβολές μετά τα στάδια παστερίωσης και αποπίκρασης, οι απορροφήσεις των φλαβονοειδών παρουσίασαν μικρή μείωση στα δείγματα μετά την αποπίκραση. Βάση βιβλιογραφικών δεδομένων η μείωση της

απορρόφησης των φλαβονοειδών μετά την αποπίκραση οφείλεται στην απομάκρυνση των φλαβονοειδών, όπως η ναριγκίνη και η νεοεσπεριδίνη, τα οποία συμβάλουν στην πικρή γεύση του χυμού. Το χρώμα των δειγμάτων, το οποίο εκφράστηκε σύμφωνα με την παράμετρο ολικού χρώματος (E) παρουσίασε μεταβολές ανάμεσα στα τρία δείγματα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αρωματικών ενώσεων του χυμού πραγματοποιήθηκε με χρήση του συστήματος GC-MS σε συνδυασμό με τη μέθοδο Purge & Trap και δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στη συγκέντρωση του λεμονένιου. Παρατηρήθηκε ότι οι διεργασίες παστερίωσης και αποπίκρασης επιδρούν στη συγκέντρωση του λεμονένιου, με αποτέλεσμα τα παστεριωμένα και τα μετά την αποπίκραση δείγματα να εμφανίζουν μειωμένη συγκέντρωση σε σχέση με τα απαστερίωτα δείγματα. Το L-ασκορβικό οξύ, το σημαντικότερο συστατικό του χυμού, μετρήθηκε με υγρή χρωματογραφική μέθοδο υψηλής απόδοσης και διαπιστώθηκε ότι σε ορισμένα δείγματα μειώνεται κατά τα στάδια της παστερίωσης και της αποπίκρασης, γιατί η αυξημένη θερμοκρασία επιφέρει αύξηση του ρυθμού οξειδωσης του. Στα υπόλοιπα δείγματα παρατηρήθηκαν παρόμοιες συγκεντρώσεις L-ασκορβικού οξέος και στα τρία δείγματα της ίδιας ημερομηνίας παραγωγής, ενώ σε ορισμένα παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση στα παστεριωμένα και σε άλλα στα μετά την αποπίκραση δείγματα. Η συγκέντρωση της λιμονίνης μετρήθηκε, επίσης με υγρή χρωματογραφική μέθοδο υψηλής απόδοσης και διαπιστώθηκε ότι επηρεάζεται από την παστερίωση του χυμού, καθώς στα παστεριωμένα δείγματα εμφανίζεται αύξηση αυτής. Γενικά, οι τιμές της συγκέντρωσης της λιμονίνης κυμάνθηκαν από 8,96-15,22 ppm για τα απαστερίωτα δείγματα και 11,24-17,45 ppm για τα παστεριωμένα. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της λιμονίνης μειώθηκε με την πάροδο του χρόνου συγκομιδής και την ωρίμανση του πορτοκαλιού, λόγω της αύξησης του ρυθμού γλυκοζυλίωσης των λιμονοειδών. Με βάση τα αποτελέσματα η συγκέντρωση της λιμονίνης εξαρτάται από το χρόνο συγκομιδής και διαπιστώθηκε ότι συσχετίζεται ικανοποιητικά με τη συγκέντρωση των ολικών οργανικών οξέων.

Η λιμονίνη προσδιορίστηκε ποσοτικά και σε δείγματα απαστερίωτου χυμού αρχικής συγκέντρωσης 7,5 ppm σε συνθήκες ΥΥΠ. Στα δείγματα εφαρμόστηκαν πιέσεις 300, 500 και 700 MPa για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, όπου διαπιστώθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της λιμονίνης στα 11,71 ppm σε πίεση 300 MPa, σταθερή συγκέντρωση στα 500 MPa και μικρή μείωση στα 700 MPa.

Τέλος, η ενζυμική προκατεργασία του χυμού με το ένζυμο LGTase οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η δράση του ενζύμου μειώνει την περιεκτικότητα του χυμού σε λιμονίνη. Η δράση της LGTase σε δείγματα παστεριωμένου χυμού σε συνθήκες ΥΥΠ (300 MPa, 10 min, θερμοκρασία περιβάλλοντος) οδήγησε σε μείωση της λιμονίνης κατά 50%, ενώ σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και pH ρυθμιζόμενο στο 3,2, 5, 7,5 διαπιστώθηκε μέγιστη μείωση της λιμονίνης στο 65% της αρχικής στο δείγμα με pH 7,5.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1 ΤΟ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ ΚΑΙ Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΧΥΜΟΥ ΤΟΥ	3
1.1 ΤΟ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ.....	3
1.1.1 Προέλευση.....	3
1.1.2 Ποικιλίες πορτοκαλιών.....	3
1.1.3 Δομή του πορτοκαλιού.....	5
1.1.4 Βιοχημεία του πορτοκαλιού.....	7
1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΡΤΟΚΑΛΟΧΥΜΟΥ	9
1.2.1 Στάδια παραγωγής.....	9
1.2.2 Είδη πορτοκαλοχυμών.....	18
1.2.3 Συστατικά πορτοκαλοχυμού.....	19
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 1 ^{ΟΥ} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ	27
2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΟΡΤΟΚΑΛΟΧΥΜΟΥ	29
2.1 ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ	30
2.1.1 Θερμική Παστερίωση.....	30
2.1.2 Ωμική θέρμανση.....	30
2.2 ΜΗ ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	31
2.2.1 Παλλόμενο Ηλεκτρικό Πεδίο	31
2.2.2 Υπερυψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΥΠ).....	32
2.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗΣ, ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΑΛΛΟΜΕΝΩΝ ΗΛΕΚΤΡΙΚΩΝ ΠΕΔΙΩΝ (PEF) ΣΕ ΧΗΜΙΚΕΣ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΧΥΜΟΥ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΟΥ	44
2.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΧΥΜΟΥ ΑΠΟ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙΑ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ NAVEL	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 2 ^{ΟΥ} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ	51
3 ΕΝΖΥΜΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΧΥΜΟΥ ΤΟΥ	55
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	55
3.2 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ	56
3.2.1 Επίδραση pH.....	58
3.2.2 Επίδραση της θερμοκρασίας.....	59
3.2.3 Επίδραση της πίεσης.....	61
3.3 ΕΝΖΥΜΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΛΙΜΟΝΙΝΗΣ.....	63
3.3.1 Γλυκοζυλοτρανσφεράση λιμονοειδών (<i>Limonoid glucosyltransferase, LGTase</i>).....	64
3.3.2 Υδρολάση της D-λακτόνης (<i>Limonin D-ring Lactone Hydrolase</i>).....	68
3.3.3 Λιμονική αφυδρογονάση (<i>Limonate Dehydrogenase</i>).....	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 3 ^{ΟΥ} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ	70
4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	73
4.1 ΣΚΟΠΟΣ	73
4.2 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΧΥΜΟΥ	73

4.3	ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΟΙΟΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ	74
4.3.1	Μέτρηση pH.....	75
4.3.2	Μέτρηση ολικών διαλυτών στερεών.....	75
4.3.3	Μέτρηση χρώματος.....	76
4.3.4	Προσδιορισμός ολικής οξύτητας.....	77
4.3.5	Προσδιορισμός των απορροφήσεων καροτενοειδών, φλαβονοειδών και πολυφαινόλων	78
4.3.6	Ποσοτικός προσδιορισμός L-ασκορβικού οξέος (Βιταμίνη C).....	79
4.3.7	Ποσοτικός προσδιορισμός λιμονίνης.....	81
4.3.8	Μέτρηση αρωματικών ουσιών.....	85
4.4	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΗΣ LGTASE ΑΠΟ ΤΟ ΜΕΣΟΚΑΡΠΙΟ ΦΡΑΠΑΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΟΝ ΠΟΡΤΟΚΑΛΟΧΥΜΟ	91
4.4.1	Υλικά.....	91
4.4.2	Παραλαβή ακατέργαστου εκχυλίσματος ενζύμου.....	91
4.4.3	Καθαρισμός του ενζύμου.....	94
4.5	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΟΡΤΟΚΑΛΟΧΥΜΟΥ ΜΕ ΥΥΠ.....	96
4.5.1	Μονάδα της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης.....	96
4.5.2	Επεξεργασία του πορτοκαλοχυμού με ΥΥΠ.....	99
4.5.3	Εφαρμογή της LGTase στον πορτοκαλοχυμό.....	100
5	ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	101
5.1	ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΟΙΟΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΠΟΡΤΟΚΑΛΟΧΥΜΟΥ	101
5.1.1	Παρουσίαση αποτελεσμάτων μέτρησης pH.....	101
5.1.2	Παρουσίαση αποτελεσμάτων μέτρησης των ολικών διαλυτών στερεών (<i>Brix</i>).....	102
5.1.3	Παρουσίαση αποτελεσμάτων μέτρησης ολικών οξέων του πορτοκαλοχυμού.....	106
5.1.4	Παρουσίαση αποτελεσμάτων απορρόφησης καροτενοειδών, πολυφαινόλων και φλαβονοειδών.....	109
5.1.5	Παρουσίαση αποτελεσμάτων μέτρησης χρώματος.....	114
5.1.6	Παρουσίαση αποτελεσμάτων μέτρησης L-ασκορβικού οξέος.....	116
5.1.7	Ποσοτικός προσδιορισμός λεμονένιου.....	119
5.1.8	Ποσοτικός προσδιορισμός της λιμονίνης.....	120
5.2	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΛΙΜΟΝΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΟΡΤΟΚΑΛΟΧΥΜΟΥ ...	122
5.3	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΥΥΠ ΣΤΟΝ ΠΟΡΤΟΚΑΛΟΧΥΜΟ NAVEL	125
5.4	ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ.....	126
5.4.1	Παραλαβή και καθαρισμός του ακατέργαστου εκχυλίσματος της LGTase.....	126
5.4.2	Εφαρμογή της LGTase στον πορτοκαλοχυμό.....	128
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 5 ^{ΟΥ} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ	131
6	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	133

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πορτοκάλι και ο χυμός του είναι ιδιαίτερα δημοφιλής και αποτελεί τον πρώτο σε κατανάλωση χυμό παγκοσμίως λόγω των υψηλών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του και της υψηλής θρεπτικής του αξίας. Ο πορτοκαλοχυμός αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής, καθώς περιέχει σημαντικά συστατικά για την υγεία, όπως η βιταμίνη C, τα φλαβονοειδή και τα καροτενοειδή, η σύσταση των οποίων διαφοροποιείται ανάλογα με την ποικιλία που ανήκει το πορτοκάλι. Κατά τη βιομηχανική παραγωγή του πορτοκαλοχυμού εφαρμόζεται θερμική παστερίωση, ώστε το προϊόν να είναι ασφαλές με αυξημένη διάρκεια ζωής. Κατά τη διάρκεια της παστερίωσης καταστρέφονται οι μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την καταστροφή και την αλλοίωση του χυμού και απενεργοποιούνται τα ενδογενή μη επιθυμητά ένζυμα των οποίων η δράση επηρεάζει την ποιότητα του χυμού. Έχει διαπιστωθεί, όμως ότι κατά τη θερμική παστερίωση ταυτόχρονα καταστρέφονται οι πτητικές αρωματικές ουσίες και μειώνεται η συγκέντρωση ωφέλιμων συστατικών, όπως η βιταμίνη C. Το παραπάνω μειονέκτημα της θερμικής παστερίωσης σε συνδυασμό με την αυξανόμενη καταναλωτική απαίτηση για τρόφιμα με τη μικρότερη δυνατή επεξεργασία, έχουν οδηγήσει τα τελευταία χρόνια τη βιομηχανία στην έρευνα και την ανάπτυξη νέων μη θερμικών μεθόδων επεξεργασίας. Από αυτές ξεχωρίζει η διεργασία της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης (ΥΥΠ), η οποία έχει ήδη εφαρμοστεί παγκοσμίως για αρκετά τρόφιμα όπως χυμοί φρούτων, προϊόντα κρέατος και θαλασσινά. Με την εφαρμογή ΥΥΠ επιτυγχάνονται τα αποτελέσματα της θερμικής παστερίωσης όσον αφορά το μικροβιακό φορτίο και τη δράση των ενζύμων, ενώ ταυτόχρονα διατηρούνται σχεδόν αναλλοίωτα τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του χυμού, όπως το χρώμα, το άρωμα, οι βιταμίνες και τα θρεπτικά συστατικά. Για αυτό το λόγο, η ΥΥΠ μπορεί να θεωρηθεί ως μια τεχνολογία με την οποία επιτυγχάνεται ψυχρή παστερίωση των τροφίμων, ενώ ταυτόχρονα τα προϊόντα που έχουν υποστεί επεξεργασία με εφαρμογή ΥΥΠ χαρακτηρίζονται ως «φρέσκα» και υψηλής ποιότητας.

Οι ελληνικές βιομηχανίες παραγωγής πορτοκαλοχυμού που χρησιμοποιούν κυρίως πορτοκάλια ποικιλίας Navel καλούνται να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα της πικρής γεύσης, που οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα λιμονίνης. Η εφαρμοζόμενη μέθοδος αποπίκρασης περιλαμβάνει τη χρήση απορροφητικών ρητίνων, οι οποίες προσροφούν τη λιμονίνη και άλλες ουσίες που δίνουν την πικρή γεύση στο χυμό. Το

στάδιο της αποπίκρασης πέρα από την οικονομική επιβάρυνση που επιφέρει στις βιομηχανίες έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση σημαντικών συστατικών του χυμού. Για όλους τους παραπάνω λόγους γίνονται έρευνες εύρεσης εναλλακτικών μεθόδων αποπίκρασης. Η έρευνα πάνω στην αποπίκραση των χυμών εσπεριδοειδών έχει επικεντρωθεί στη χρήση ενζύμων. Η ενζυμική αποπίκραση των χυμών με στόχο τη μείωση της συγκέντρωσης λιμονίνης μπορεί να γίνει με την δράση δύο διαφορετικών ενζύμων, της γλυκοζυλοτρανσφεράσης και της λιμονικής αφυδρογονάσης. Η δράση και των δύο ενζύμων έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή της πικρής λιμονίνης σε μη πικρές ουσίες. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των εσπεριδοειδών η αντίδραση της γλυκοζυλίωσης της λιμονίνης για την παραγωγή λιμονοειδών γλυκοζιτών καταλύεται από το ένζυμο γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών. Σε πολλές ποικιλίες όμως η συγκέντρωση του ενζύμου είναι πολύ χαμηλή για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί αυτή η φυσική αποπίκραση στους φυτικούς ιστούς. Το ένζυμο έχει απομονωθεί από Navel πορτοκάλια όπου αποδείχτηκε ότι η γλυκοζυλοτρανσφεράση καταλύει την γλυκοζυλίωση όλων των λιμονοειδών και όχι μόνο της λιμονίνης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν οι ποιοτικές παράμετροι του ελληνικού χυμού από πορτοκάλια Navel σε διαφορετικούς χρόνους συγκομιδής και μεταποίησης και έγινε προσπάθεια συσχέτισης αυτών με τη συγκέντρωση της πικρής λιμονίνης. Ταυτόχρονα, απομονώθηκε και καθαρίστηκε το ένζυμο γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών από το μεσοκάρπιο φράπας, έτσι ώστε να διερευνηθεί η δυνατότητα ενζυμικής προκατεργασίας του πορτοκαλοχυμού με στόχο την αποικοδόμηση της λιμονίνης και τη δυνατότητα ανάπτυξης μιας εναλλακτικής ενζυμικής αποπίκρασης πορτοκαλοχυμού Navel. Η ενζυμική προκατεργασία μελετήθηκε σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης αλλά και σε διεργασίες ΥΥΠ λαμβάνοντας υπόψη προηγούμενες εργασίες του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων όπου έχει διαπιστωθεί ότι η εφαρμογή ΥΥΠ σε χυμούς πορτοκαλιού Navel έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή χυμών Navel με ηπιότερη πικρή γεύση σε σχέση με αυτή των θερμικά παστεριωμένων χυμών.

1 ΤΟ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ ΚΑΙ Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΧΥΜΟΥ ΤΟΥ

1.1 Το πορτοκάλι

1.1.1 Προέλευση

Το πορτοκάλι ανήκει στην οικογένεια των εσπεριδοειδών. Το δέντρο του πορτοκαλιού, όπως και όλων των εσπεριδοειδών, πρωτοεμφανίστηκε στην Ασία. Συγκεκριμένα, στην ανατολική Ασία σε περιοχές που σήμερα ανήκουν στην Ινδία, την Κίνα και την Μαλαισία.

1.1.2 Ποικιλίες πορτοκαλιών

Τα πορτοκάλια ταξινομούνται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα γλυκά (*sweet oranges*) και τα ξινά (*sour oranges*). Στη συνέχεια, τα γλυκά πορτοκάλια μπορούν να ταξινομηθούν σε κοινά πορτοκάλια, σαγκουίνια, πορτοκάλια navel και πορτοκάλια ζάχαρη (*sugar oranges*).

1.1.2.1 Γλυκά Πορτοκάλια (*sweet oranges*)

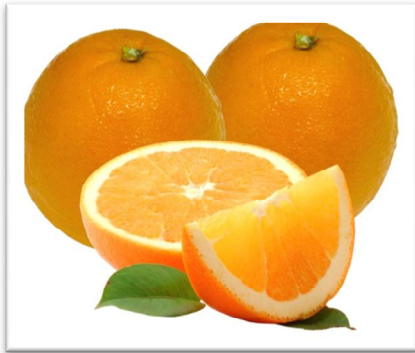
Τα γλυκά πορτοκάλια είναι η πιο σημαντική κατηγορία εμπορεύσιμων εσπεριδοειδών στον κόσμο. Τα 2/3 περίπου των παραγόμενων εσπεριδοειδών ανά τον κόσμο ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία.

– Κοινά πορτοκάλια:

Τα πορτοκάλια αυτής της κατηγορίας συχνά αναφέρονται και ως «λευκά» ή «ξανθά» πορτοκάλια και περιλαμβάνουν τα 2/3 των γλυκών πορτοκαλιών. Τα πορτοκάλια Valencia είναι τα πλέον γνωστά αυτής της κατηγορίας, τα οποία μάλιστα αποτελούν το 50% της συνολικής παραγωγής πορτοκαλιών των Η.Π.Α.. Η κατηγορία αυτή έχει μακρά καλλιεργητική περίοδο και προσαρμόζεται σε οποιεσδήποτε καιρικές συνθήκες. Επιπλέον, τα δέντρα από τα οποία προέρχονται είναι ανθεκτικά στην παγωνιά ακόμα και σε θερμοκρασίες κάτω των -5° C.

– **Πορτοκάλια Navel:**

Τα πορτοκάλια Navel είναι τα πιο γνωστά φαγώσιμα πορτοκάλια στον κόσμο. Αυτό οφείλεται στο ότι είναι λιγότερο ζουμερά, έχουν πλούσια γεύση, δεν έχουν κουκούτσια και είναι εύκολα στο ξεφλούδισμα.



Εικόνα 1-1: Πορτοκάλι ποικιλίας Navel.

Το μειονέκτημα τους είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε λιμονίνη, μια ουσία η οποία είναι υπεύθυνη για την πικρή γεύση του χυμού, και για αυτό το λόγο παλαιότερα δεν προτιμούνταν για την παραγωγή χυμού. Η πιο γνωστή ποικιλία πορτοκαλιών Navel είναι η ποικιλία Washington.

– **Σαγκουίνια (Blood oranges) :**

Τα σαγκουίνια ξεχωρίζουν λόγω του έντονου κόκκινου χρώματος, το οποίο οφείλεται στις ανθοκυάνες, οργανικές ενώσεις που υπάρχουν στη σάρκα του φρούτου.



Εικόνα 1-2: Σαγκουίνι.

Όμως οι ανθοκυάνες έχουν την τάση να χάνουν το χρώμα τους κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση του χυμού με αποτέλεσμα ο χυμός των

σαγκουινιών να αποκτά ένα θολό, μη αρεστό χρώμα. Η επεξεργασία του χυμού με σκοπό την απομάκρυνση των ανθοκυανών για τη βελτίωση του χρώματος του επιφέρει παράλληλα μείωση της βιταμίνης C και της λιμονίνης, οι οποίες είναι απαραίτητες στην ανθρώπινη διατροφή. Έτσι, η διεργασία αυτή αποφεύγεται.

– **Πορτοκάλια ζάγαρη (*Acidless or sugar oranges*)** :

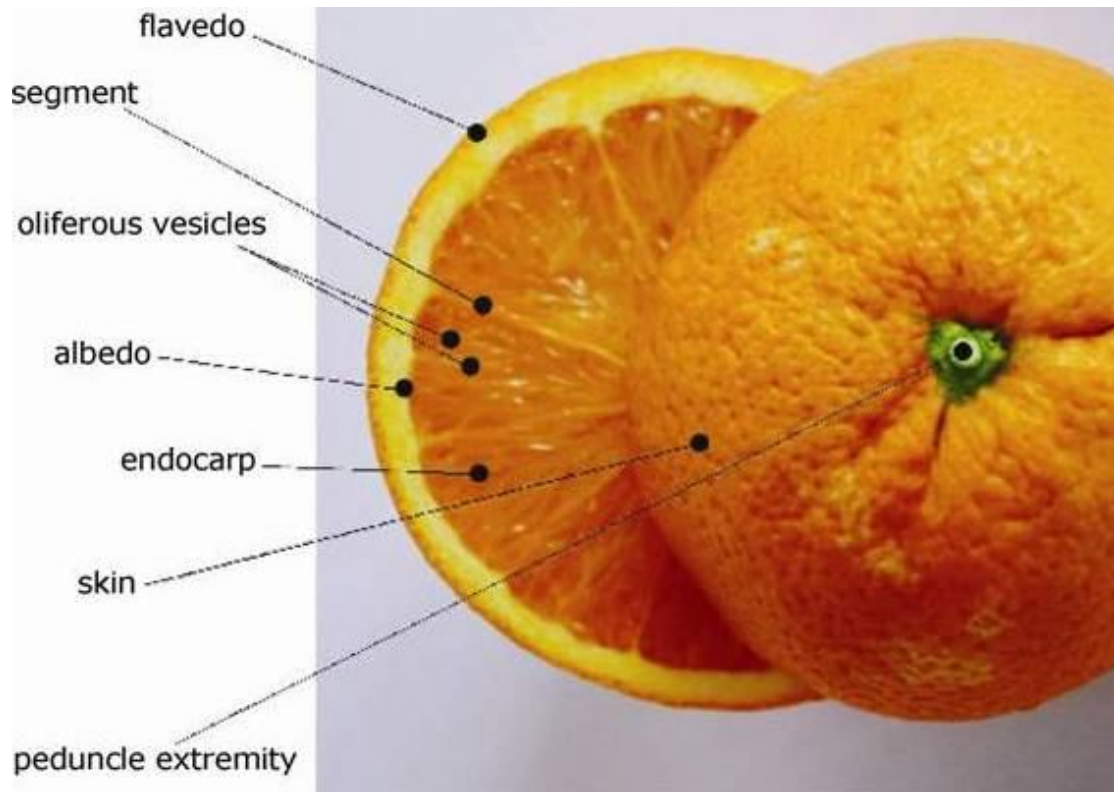
Αυτό το είδος πορτοκαλιών χαρακτηρίζεται από τη μικρή έως ανύπαρκτη περιεκτικότητα σε οξέα. Εξαιτίας, της χαμηλής τους οξύτητας, η επεξεργασία τους ενέχει τον κίνδυνο ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών.

1.1.2.2 Ξινά Πορτοκάλια (*sour oranges*)

Τα ξινά πορτοκάλια είναι επίσης γνωστά σαν πικρά πορτοκάλια ή πορτοκάλια Σεβίλλης. Από τα πορτοκάλια αυτής της κατηγορίας δεν παρασκευάζεται χυμός, επειδή είναι αρκετά πικρά και ξινά και τα έλαια τους είναι ανεπιθύμητα. Η κατηγορία αυτή είναι κατάλληλη για την παραγωγή μαρμελάδων, οι οποίες κατά τους Βρετανούς είναι ανώτερες ποιοτικά από τις μαρμελάδες που παράγονται από τα γλυκά πορτοκάλια (*Kimball, 1999*).

1.1.3 Δομή του πορτοκαλιού

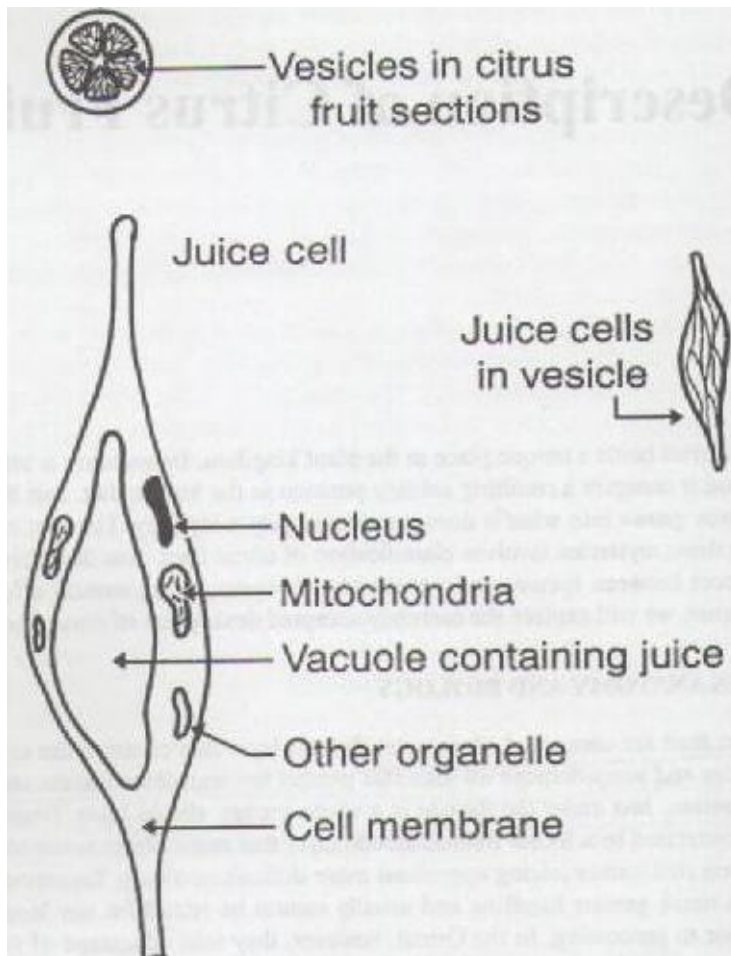
Το πορτοκάλι αποτελεί σημαντικό μέρος στη διατροφή των ανθρώπων λόγω της μεγάλης διατροφικής του αξίας, του αρώματος, της γεύσης και άλλων χαρακτηριστικών του, όπως το χρώμα και η υφή. Αυτοί οι ποιοτικοί παράγοντες εξαρτώνται άμεσα από τη δομή και τη χημική σύσταση του φρούτου.



Εικόνα 1-3: Τομή πορτοκαλιού.

Μορφολογικά το πορτοκάλι αποτελείται από δύο διακριτά μέρη: το *περικάρπιο* (*φλούδα*) και το *ενδοκάρπιο* (*πούλπα*), το οποίο είναι το εδώδιμο μέρος του.

Το περικάρπιο χωρίζεται περαιτέρω στο *εξωκάρπιο* (*flavedo*) και το *μεσοκάρπιο* (*albedo*) (Iglesias et al., 2007). Στο εξωκάρπιο βρίσκονται οι χρωμοπλάστες και οι ελαιοθύλακες. Στους χρωμοπλάστες περιέχονται ευδιάλυτες χρωστικές ουσίες, όπως τα καροτενοειδή, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το χρώμα του φρούτου. Οι ελαιοθύλακες περιέχουν έλαια τα οποία προστατεύουν το φρούτο από έντομα και μικροοργανισμούς. Το μεσοκάρπιο έχει λευκό χρώμα και σπογγώδη υφή. Σε αυτό υπάρχουν ουσίες, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα του χυμού, πολλές φορές και αρνητικά εάν αναμειχθούν με αυτόν. Τέτοιες ουσίες είναι τα φλαβονοειδή, τα λιμονοειδή και η πηκτίνη. Το ενδοκάρπιο αποτελείται από επιμέρους τμήματα, τα οποία χωρίζονται από μεμβράνες. Μέσα σε αυτά περιέχονται οι θύλακες του χυμού, τα υπόλοιπα οργανίδια του φρούτου, όπως τα μιτοχόνδρια, ο πυρήνας και οι καρποί (*seeds*).



Εικόνα 1-4: Οι θύλακες χυμού και η θέση τους στο φρούτο.

1.1.4 Βιοχημεία του πορτοκαλιού

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το πορτοκάλι κατέχει σημαντική θέση στη διατροφή του ανθρώπου, χάρη στην ευχάριστη γεύση και το άρωμα του, αλλά και στην πληθώρα θρεπτικών συστατικών που περιέχει. Το πορτοκάλι περιέχει τα εξής πολύ σημαντικά συστατικά:

- *Οργανικά οξέα*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την οξύτητα, η οποία αποτελεί σημαντική παράμετρο για τον ποιοτικό έλεγχο του φρούτου. Το κιτρικό οξύ και το μηλικό οξύ είναι τα κυριότερα οξέα του πορτοκαλιού.
- *Υδατάνθρακες*, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στη γεύση, την υφή και το χρώμα του πορτοκαλιού. Οι κυριότεροι υδατάνθρακες που περιέχονται στο πορτοκάλι είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη, των οποίων η συγκέντρωση εξαρτάται από την ποικιλία στην οποία ανήκει το φρούτο, την περιοχή προέλευσης του και τις καιρικές συνθήκες της περιοχής.

- *Βιταμίνες* είναι οργανικές ενώσεις απαραίτητες για τη σωστή διατροφή και την υγεία του ανθρώπου. Η κυριότερη βιταμίνη που περιέχεται στο πορτοκάλι είναι το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), το οποίο αποτελεί σημαντική παράμετρο για την αποδοχή του φρούτου από τους καταναλωτές. Η περιεκτικότητα του ασκορβικού οξέος ποικίλει και εξαρτάται από παράγοντες όπως η γεωγραφική περιοχή από όπου προήλθε το πορτοκάλι, το κλίμα, ο βαθμός ωρίμανσης του φρούτου και η ποικιλία στην οποία ανήκει. Επίσης, το πορτοκάλι περιέχει μικρές, αλλά σημαντικές ποσότητες βιταμινών A και B.
- *Ανόργανα συστατικά*, τα οποία στην πλειοψηφία τους είναι μεταλλικά στοιχεία με το κάλιο (K) να βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση και να αποτελεί το 70% αυτών. Στο πορτοκάλι περιέχονται, επίσης ασβέστιο, φωσφόρος, μαγνήσιο και άλλα στοιχεία, τα οποία είναι εξίσου σημαντικά. Τέλος, στοιχεία όπως ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και το ιώδιο, που περιέχονται στο πορτοκάλι σχετίζονται με ενζυμικά συστήματα που αφορούν το μεταβολισμό του ανθρώπου.
- *Λιπίδια* είναι οργανικές ενώσεις διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες. Τα λιπίδια που περιέχονται στο πορτοκάλι είναι κυρίως στεροειδή και αλειφατικά συστατικά.
- *Αζωτούχες ενώσεις* στις οποίες περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες, τα ένζυμα, τα ελεύθερα αμινοξέα και οι αμίνες. Η περιεκτικότητα των αζωτούχων ενώσεων εξαρτάται από την ποικιλία του πορτοκαλιού, το βαθμό ωρίμανσης και τις συνθήκες καλλιέργειας.
- *Φαινολικές ενώσεις*, οι οποίες συμβάλουν στο χρώμα και τη γεύση του πορτοκαλιού. Στο πορτοκάλι οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις είναι οι φλαβονόνες. Αυτές βρίσκονται στους ιστούς του φρούτου ως γλυκοζίτες και με βάση τη βιβλιογραφία σχετίζονται με την πρόληψη χρόνιων ασθενειών.
- *Αρωματικές ενώσεις*, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό και ευχάριστο άρωμα του πορτοκαλιού και του χυμού του. Οι κυριότερες πτητικές αρωματικές ενώσεις που έχουν βρεθεί στο πορτοκάλι είναι αλδεΐδες, αλκοόλες, εστέρες, κετόνες και τερπένια (Niesperos et al., 1990).

1.2 Παραγωγή πορτοκαλοχυμού

1.2.1 Στάδια παραγωγής

Ο πορτοκαλοχυμός είναι από τους πιο διαδεδομένους χυμούς εσπεριδοειδών στον κόσμο. Για να φτάσει στον καταναλωτή περνά από διάφορα στάδια παραγωγής, αρχικά το πορτοκάλι και στη συνέχεια ο χυμός του προκειμένου το τελικό προϊόν να είναι καταρχάς ασφαλές και ταυτόχρονα άριστο ποιοτικά. Τα στάδια παραγωγής του πορτοκαλοχυμού περιγράφονται παρακάτω.

1.2.1.1 Παραλαβή και αποθήκευση πορτοκαλιών

Η περίοδος συγκομιδής των πορτοκαλιών ξεκινά τον Οκτώβριο και ολοκληρώνεται τον Ιούνιο. Η συγκομιδή γίνεται μηχανικά και στη συνέχεια τα πορτοκάλια μεταφέρονται από το περιβόλι στις εγκαταστάσεις του εργοστασίου, όπου συλλέγονται σε ειδικούς κάδους.



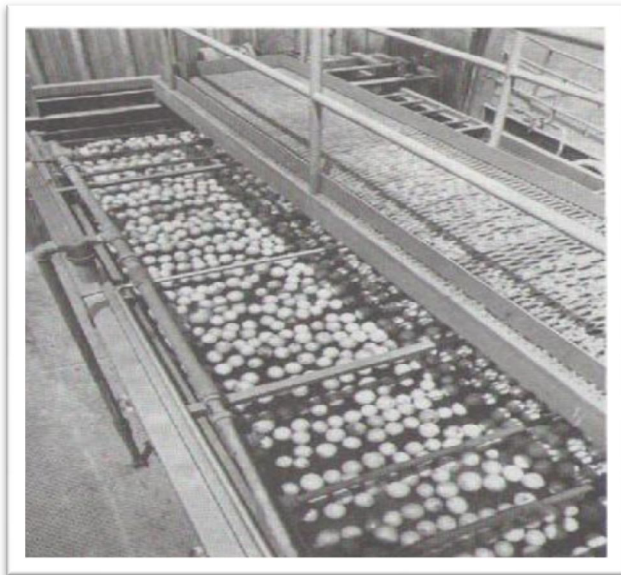
Εικόνα 1-5: Κάδοι συλλογής πορτοκαλιών.

Στο στάδιο αυτό το πρόβλημα που εμφανίζεται είναι η παρουσία «ακαθαρσιών» μαζί με τα πορτοκάλια. Οι «ακαθαρσίες» αυτές είναι φύλλα δέντρων, μίσχοι, σκόνη ακόμα και μικρά κλαδάκια. Το πρόβλημα αυτό προκύπτει λόγω των μηχανικών μέσων που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή των πορτοκαλιών και προκειμένου να επιλυθεί τα φρούτα περνούν από ειδικές συσκευές, οι οποίες συγκρατούν ό,τι μη επιθυμητό πριν το φρούτο καταλήξει στον κάδο αποθήκευσης.

Επιπλέον, κατά τη μεταφορά των φρούτων προς αποθήκευση υπάρχει στη γραμμή παραγωγής δειγματολήπτης, ο οποίος λαμβάνει δείγματα των εισερχόμενων πορτοκαλιών. Τέλος, πριν αποθηκευτούν τα πορτοκάλια περνούν από το στάδιο της αξιολόγησης, όπου απομακρύνονται τα ακατάλληλα προς επεξεργασία φρούτα και τυχόν μίσχοι που πέρασαν μαζί με αυτά (*Ashurst, 1995*).

1.2.1.2 Πλύσιμο των πορτοκαλιών

Τα πορτοκάλια, τα οποία προέρχονται από το περιβάλλον έχουν αρκετή σκόνη και επιπλέον μπορεί να περιέχουν ποσότητες εντομοκτόνων, οι οποίες δεν είναι επιθυμητές. Για αυτό το λόγο κρίνεται απαραίτητο να πλυθεί το πορτοκάλι πριν οδηγηθεί στον εκχυμωτή.



Εικόνα 1-6: Συσκευή πλυσίματος.

Μετά το πλύσιμο ακολουθεί αξιολόγηση των φρούτων από εξειδικευμένο προσωπικό και απορρίπτονται τα ακατάλληλα φρούτα. Στη συνέχεια, τα πορτοκάλια περνούν από ειδικό κύλινδρο, όπου χωρίζονται με βάση το μέγεθος τους.



Εικόνα 1-7: Συσκευή διαχωρισμού των πορτοκαλιών ανάλογα με το μέγεθος.

Αυτό είναι απαραίτητο για τη σωστή λειτουργία των εκχυμωτών, γιατί είναι κατασκευασμένοι να επεξεργάζονται πορτοκάλια συγκεκριμένου μεγέθους (Kimball, 1999).

1.2.1.3 Εκχύμωση και Φινίρισμα

Στη βιομηχανία παραγωγής πορτοκαλοχυμού γενικά χρησιμοποιούνται δύο είδη συσκευών εκχύμωσης, ο εκχυμωτής FMC και ο εκχυμωτής τύπου Brown. Και οι δυο παράγουν χυμό υψηλής ποιότητας.

Ο εκχυμωτής FMC αποτελείται από πέντε έως οχτώ μηχανικά στελέχη. Στην περίπτωση αυτή η διαδικασία εκχύμωσης ξεκινά καθώς το πορτοκάλι οδηγείται στο κάτω στέλεχος του εκχυμωτή και μόλις τοποθετηθεί το πάνω στέλεχος κατεβαίνει και ασκεί πίεση σε αυτό προκειμένου να εισέλθει στο κάτω μέρος του ένας κυλινδρικός σωλήνας. Με αυτόν τον τρόπο συλλέγεται ο χυμός του πορτοκαλιού, καθώς και λίγη πούλπα, λόγω της ασκούμενης πίεσης. Επίσης, λόγω της πίεσης που ασκείται στο πορτοκάλι διαρρηγνύονται οι ελαιοθύλακες της φλούδας και ελευθερώνονται τα

έλαια, τα οποία συλλέγονται στο σύστημα ανάκτησης ελαίου. Τα μεγάλα κομμάτια πούλπας καθώς και τα σπόρια του πορτοκαλιού απορρίπτονται.



Εικόνα 1-8: Εκχυμωτής FMC σε λειτουργία.

Όσον αφορά τους εκχυμωτές Brown υπάρχουν διάφορα μοντέλα, τα οποία χρησιμοποιούν την ίδια αρχή λειτουργίας, αλλά καθένα διαφοροποιείται ως προς τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά.

Ανάμεσα στα δύο είδη εκχυμωτών προτιμάται ο FMC, λαμβάνοντας υπόψη την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Υπερέχει έναντι του εκχυμωτή τύπου Brown, διότι στο χυμό που παρασκευάζεται από αυτόν τον εκχυμωτή είναι πιθανό να βρεθούν κομμάτια φλούδας πριν πραγματοποιηθεί το πρώτο φινίρισμα και μεγαλύτερη πιθανότητα επαφής του χυμού με το εξωτερικό τμήμα του φρούτου.



Εικόνα 1-9: Εκχυμωτής Brown μοντέλο 720 σε λειτουργία.

Μετά την εκχύμωση ακολουθεί η διαδικασία φινιρίσματος του χυμού, όπου απομακρύνεται η πούλπα και τα σπόρια (Ashurst, 1995). Οι συσκευές φινιρίσματος επιτυγχάνουν το διαχωρισμό της πούλπας από το χυμό μέσω της πίεσης που ασκείται από έναν περιστρεφόμενο κοχλία. Η ασκούμενη πίεση καθορίζει τη σύσταση του χυμού, καθώς η εφαρμογή υψηλών πιέσεων κατά τη διάρκεια του φινιρίσματος απομακρύνει τη μεγαλύτερη ποσότητα του υγρού μέρους της πούλπας, το οποίο προστίθεται στο χυμό. Παράλληλα, όμως οι υψηλές πιέσεις έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ανεπιθύμητων οσμών στο χυμό, εξαιτίας της παρουσίας στο χυμό ενώσεων από τη φλούδα του φρούτου και την πούλπα.

Οι συσκευές φινιρίσματος τοποθετούνται στη σειρά αμέσως μετά τους εκχυμωτές και στις βιομηχανίες χρησιμοποιούνται δύο συσκευές φινιρίσματος. Η συσκευή που εκτελεί το πρώτο φινίρισμα του χυμού ονομάζεται βασική (*primary finisher*) και η δεύτερη ονομάζεται δευτερεύουσα συσκευή (*sondary finisher*).

Η τελική συγκέντρωση της πούλπας στο χυμό καθορίζεται από τις ποιοτικές απαιτήσεις της βιομηχανίας, αλλά και από την κρατική νομοθεσία. Ο στόχος είναι να επιτευχθεί περιεκτικότητα 12% w/v ή και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πούλπα. Τέλος, η πούλπα που απομακρύνεται κατά το φινίρισμα επεξεργάζεται από άλλες διεργασίες που πραγματοποιούνται μέσα στη βιομηχανία και τελικά αποθηκεύεται για μελλοντική χρήση.

1.2.1.4 Απομάκρυνση ελαίου

Η απομάκρυνση των ελαίων που περιέχονται στον πορτοκαλοχυμό απομακρύνονται με φυγοκέντρηση. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης το μίγμα διαχωρίζεται σε δύο φάσεις, την υδάτινη και την ελαιώδη, οι οποίες αξιολογούνται και αποθηκεύονται ξεχωριστά για μελλοντική χρήση. Συνήθως, η υδάτινη φάση, η οποία περιέχει πολλές αρωματικές ενώσεις, προστίθεται ξανά στο συμπυκνωμένο χυμό (Kimball, 1999).

1.2.1.5 Απαέρωση

Η απαέρωση πραγματοποιείται πριν τη θερμική επεξεργασία προκειμένου να σταθεροποιήσει την περιεκτικότητα της βιταμίνης C και να μειώσει τις μεταβολές του χρώματος κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης.

Η απαέρωση των χυμών πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες 20-50°C ανάλογα με το φρούτο από το οποίο παράγονται. Η διεργασία της απαέρωσης πραγματοποιείται υπό κενό σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από το σημείο βρασμού του χυμού, επιτυγχάνοντας έτσι μείωση των παραγόμενων ατμών και οσμών.

1.2.1.6 Παστερίωση

Κατά την παστερίωση ο χυμός θερμαίνεται σε κατάλληλη θερμοκρασία για ορισμένο χρονικό διάστημα, ώστε να καταστραφούν οι μικροοργανισμοί (παθογόνοι και αλλοιογόνοι) και να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την ποιοτική του υποβάθμιση. Μέσω της παστερίωσης απενεργοποιείται το ένζυμο πηκτινομεθυλεστεράση και σταθεροποιείται η θολερότητα του χυμού (Kimball, 1999). Η παστερίωση του πορτοκαλοχυμού πραγματοποιείται πριν τη συσκευασία του σε εναλλάκτες θερμότητας συνεχούς λειτουργίας. Οι εναλλάκτες που χρησιμοποιούνται είναι ο πλακοειδής εναλλάκτης θερμότητας, ο σωληνοειδής εναλλάκτης θερμότητας και ο εναλλάκτης θερμότητας αποξεομένης επιφάνειας (Μπλούκας, 2004).



Εικόνα 1-10: Παστεριωτής χυμού που αποτελείται από πιάτα παστερίωσης και πιάτα ψύξης.

1.2.1.7 Αποπίκραση

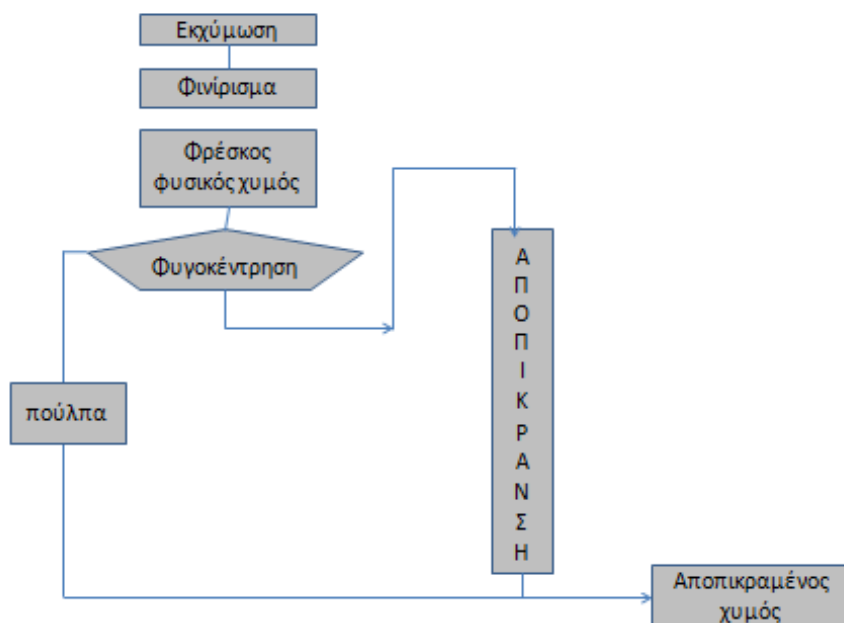
Η γεύση είναι μία πολύ σημαντική οργανοληπτική παράμετρος και μαζί με το χρώμα και το άρωμα είναι καθοριστικές για την οργανοληπτική αποδοχή ενός τροφίμου. Ο πορτοκαλοχυμός που παράγεται από άγουρα ή πρώιμα πορτοκάλια έχει πικρή γεύση και για αυτό υποβάλλεται σε κατάλληλη επεξεργασία προκειμένου να μειωθεί η ένταση της πικρότητας. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *αποπίκραση*.

Η πικρή γεύση οφείλεται σε ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των λιμονοειδών και των φλαβονοειδών, συστατικά του φρούτου τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω. Τα επίπεδα της πικρής γεύσης μπορούν να μειωθούν με χρήση διαφόρων τεχνολογιών, οι οποίες βασίζονται σε χημικές, φυσικές και μικροβιολογικές διεργασίες. Η συνηθέστερη, όμως μέθοδος που χρησιμοποιείται σήμερα στη βιομηχανία βασίζεται στην απορρόφηση των πικρών συστατικών από πορώδεις ρητίνες (οξική κυτταρίνη ή μακροπορώδη σφαιρίδια ρητίνης ή με σταυροειδείς δεσμούς διβενζολικού στυρενίου ρητίνες) (Stinco et al, 2013). Η αποτελεσματικότητα των διάφορων απορροφητικών ρητίνων να απομακρύνουν τα πικρά συστατικά του πορτοκαλοχυμού και κυρίως της λιμονίνης έχει αξιολογηθεί κατά καιρούς από διάφορους συγγραφείς. Αρκετοί έχουν αναφερθεί στην επίδραση της αποπίκρασης και σε άλλα συστατικά του χυμού, η οποία δεν είναι πάντα θετική.

Οι Kola et al. (2010) αναφέρουν ότι ρητίνες, όπως Dowex Optipore L285 μειώνουν παράλληλα την ογκομετρούμενη οξύτητα του χυμού και αυξάνουν την περιεκτικότητά του σε διαλυτά στερεά. Οι Kimball και Norman (1990) αναφέρουν ότι το εμπορικό σύστημα αποπίκρασης (Drow hydrophilic absorbent) μειώνει τη λιμονίνη κατά 71%, αλλά και μη πικρές ουσίες όπως τα φλαβονοειδή, για παράδειγμα την εσπεριδίνη κατά 26% (Kimball et al, 1990). Γενικά, έχει διαπιστωθεί ότι η διεργασία της αποπίκρασης επηρεάζει ελάχιστα την περιεκτικότητα του χυμού σε καροτενοειδή, με αποτέλεσμα η επίδραση στο χρώμα του να είναι αμελητέα και έτσι ο χυμός είναι αποδεκτός από τον καταναλωτή. Από την άλλη πλευρά, η αποπίκραση επηρεάζει αρνητικά την περιεκτικότητα του χυμού σε βιταμίνη C, υποβαθμίζοντας έτσι την θρεπτική του αξία. Κατά την αποπίκραση, για παράδειγμα χυμού από πορτοκάλια ποικιλίας Navel παρατηρήθηκε μείωση της βιταμίνης C κατά 26% με χρήση ρητίνων ιοντοεναλλαγής και 17% με χρήση απορροφητικών ρητίνων. Η διεργασία της αποπίκρασης μειώνει, επίσης την περιεκτικότητα των φαινολικών

ενώσεων κατά 39% περίπου, οι οποίες έχουν σχέση με τη γεύση του χυμού και είναι πολύ σημαντικές για την υγεία του ανθρώπου (Stinco et al., 2013).

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η διεργασία της αποπίκρασης με τη χρήση απορροφητικών ρητίνων έχει αντικρουόμενες συνέπειες στην θρεπτική αξία του χυμού, για αυτό και τα τελευταία χρόνια γίνονται έρευνες για την ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων αποπίκρασης του πορτοκαλοχυμού.



ΣΧΗΜΑ 1-1: Διάγραμμα ροής της βιομηχανικής διεργασίας αποπίκρασης πορτοκαλοχυμού.

1.2.1.8 Συμπύκνωση

Η διεργασία της συμπύκνωσης εφαρμόζεται στον πορτοκαλοχυμό, αλλά και σε άλλους χυμούς εσπεριδοειδών, γιατί με αυτόν τον τρόπο μειώνεται ο όγκος του και γίνεται ευκολότερη η αποθήκευσή του και η μεταφορά του. Επιπλέον, μετά την απομάκρυνση της μεγαλύτερης ποσότητας νερού αυξάνεται η διάρκεια ζωής του χυμού.

Η υψηλή θερμοκρασία επηρεάζει τη γεύση και το άρωμα του πορτοκαλοχυμού, για αυτό και η συμπύκνωση του πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες 85-90°C για 30 s., με χρήση της συσκευής TASTE (Thermally Accelerated Short Time Evaporator). Ο πορτοκαλοχυμός εισέρχεται στον εξατμιστήρα και θερμαίνεται υπό κενό μέχρι τους 92°C περίπου για να εξατμιστεί το περιεχόμενο νερό. Στη συνέχεια, ο χυμός ψύχεται

εισερχόμενος στο σύστημα ψύξης που υπάρχει μετά τη συσκευή εξάτμισης και η τελική θερμοκρασία του προϊόντος φτάνει τους 12-13°C. Τα διαλυτά στερεά των συμπυκνωμένων πορτοκαλοχυμών κυμαίνονται μεταξύ 60-65 °Brix (Ashurst, 1995). Κατά το στάδιο της συμπύκνωσης εξατμίζονται μαζί με το νερό και διάφορα πτητικά αρωματικά με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η γεύση του πορτοκαλοχυμού. Για αυτό το λόγο η βιομηχανία διαθέτει ειδικές στήλες στις οποίες πραγματοποιείται ανάκτηση των αρωματικών ενώσεων από τους ατμούς και προσθήκη αυτών πίσω στο χυμό.



Εικόνα 1-11: Εξατμιστήρας TASTE.

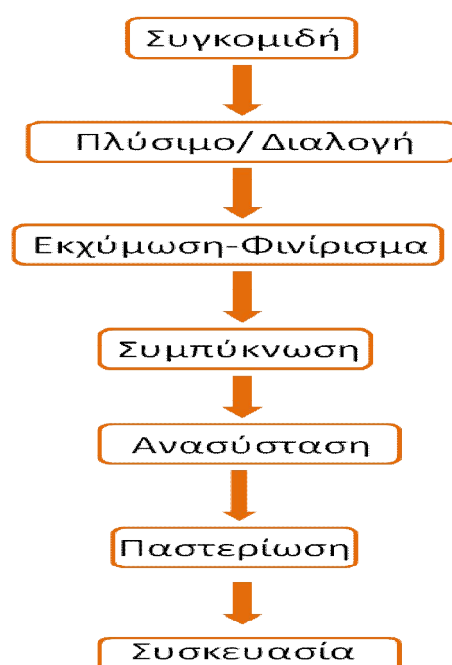
1.2.1.9 Συσκευασία

Ο παστεριωμένος χυμός συσκευάζεται όσο είναι ζεστός σε μεταλλικά κουτιά ή γυάλινα μπουκάλια, προκειμένου να επιτευχθούν συνθήκες αποστείρωσης. Εάν μάλιστα είναι δυνατό, οι περιέκτες προθερμαίνονται πριν τη συσκευασία του προϊόντος. Ο χυμός εισάγεται στους περιέκτες σε θερμοκρασία 90°C και στη συνέχεια οδηγείται προς ψύξη. Ο συσκευασμένος σε μεταλλικά κουτιά χυμός ψύχεται στους 38°C, ενώ για το συσκευασμένο σε γυάλινα μπουκάλια χυμό ακολουθείται διαφορετική διαδικασία. Αυτός ψύχεται αρχικά με ζεστό νερό, ώστε να αποφευχθεί το θερμικό σοκ και στη συνέχεια με παγωμένο νερό θερμοκρασίας 2°C. Το τελικό προϊόν έχει θερμοκρασία 10°C. Τα προϊόντα και των δύο περιπτώσεων αποθηκεύονται σε δροσερό μέρος (Ashurst, 1995).

Ο συμπυκνωμένος πορτοκαλοχυμός συσκευάζεται ασηπτικά και αποθηκεύεται σε θερμοκρασίες από -18°C έως 36°C και κατά τακτά χρονικά διαστήματα υποβάλλεται

σε ελέγχους για να ελεγχθεί το μη ενζυμικό μαύρισμα, η περιεκτικότητα σε L-ασκορβικό οξύ και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του (Kanner et al., 1982).

Σήμερα, οι περισσότερες βιομηχανίες πορτοκαλοχυμών χρησιμοποιούν χάρτινες συσκευασίες Tetra Pak. Οι συσκευασίες αυτές αποτελούνται από πολλαπλά στρώματα, όπου το κάθε ένα έχει το δικό του ρόλο στην προστασία του χυμού από εξωτερικούς παράγοντες, όπως είναι το φως, το οξυγόνο, η υγρασία και οι μικροοργανισμοί. Η χρήση των συσκευασιών Tetra Pak εξασφαλίζει τη διατήρηση της γεύσης, του αρώματος και των θρεπτικών συστατικών του χυμού αναλλοίωτα. Τέλος, η χρήση της ασηπτικής τεχνολογίας εξασφαλίζει την προστασία του προϊόντος, καθώς κανένα επιβλαβές στοιχείο δεν έρχεται σε επαφή με το προϊόν ή τη συσκευασία την ώρα που συσκευάζεται.



ΣΧΗΜΑ 1-2: Διάγραμμα ροής για την παραγωγή συμπυκνωμένου πορτοκαλοχυμού.

1.2.2 Είδη πορτοκαλοχυμών

Μετά τη θερμική επεξεργασία ο χυμός υφίσταται την κατάλληλη επεξεργασία ώστε να παραχθούν τα διάφορα είδη χυμού. Τα διαφορετικά είδη χυμού πορτοκαλιού μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής (Τζουβάρα- Καραγιάννη, 1990):

- *Φυσικός χυμός μη συμπυκνωμένος (NFC, Not From Concentrate)*: είναι οι χυμοί που προέρχονται από την εκχύμωση του πορτοκαλιού και υποβάλλονται σε διήθηση, απαέρωση και παστερίωση.
- *Συμπυκνωμένος φυσικός χυμός*: είναι προϊόντα συμπύκνωσης των έτοιμων φυσικών χυμών. Η συμπύκνωση πραγματοποιείται σε χαμηλή πίεση και ήπια θερμοκρασία (45°C).
- *Χυμοί comminuted ή πλήρους σύνθλιψης*: είναι οι πολτοί που προέρχονται από τη χρησιμοποίηση ολόκληρου του καρπού και θερμαίνονται σε ειδικούς κλιβάνους.
- *Σακχαρούχος φυσικός χυμός*: είναι ο έτοιμος φυσικός χυμός στον οποίο έχει προστεθεί ζάχαρη.
- *Συμπυκνωμένος σακχαρούχος χυμός*: είναι ο συμπυκνωμένος φυσικός χυμός στον οποίο έχει προστεθεί ζάχαρη.

Ο NFC χυμός είναι ποιοτικά ανώτερος του συμπυκνωμένου φυσικού χυμού, γιατί στην παραγωγή του δεν υπεισέρχεται στάδιο συμπύκνωσης-εξάτμισης και έτσι διατηρεί όλες τις πτητικές ουσίες που του προσδίδουν ευχάριστα γευστικά χαρακτηριστικά σε σχέση με το συμπυκνωμένο, ο οποίος λόγω του σταδίου συμπύκνωσης-εξάτμισης χάνει εκτός από το νερό και αυτές τις πτητικές ουσίες. Παρά το γεγονός ότι ο NFC χυμός έχει μικρότερη διάρκεια ζωής από τον συμπυκνωμένο, οι καταναλωτές προτιμούν τον πρώτο, καθώς αυτός διατηρεί ορισμένες σημαντικές φυσικές ουσίες του φρούτου (βιταμίνες, αμινοξέα, ισχυρά αντιοξειδωτικά και καταλύτες) κοντά στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά του φρούτου, ενώ η καθημερινή κατανάλωση βοηθά στη διατήρηση της υγείας των καταναλωτών, στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού τους συστήματος (προστασία από ιώσεις) και παράλληλα ενισχύει την προσπάθεια καταπολέμησης της γήρανσης των κυττάρων και της πρόσληψης ελευθέρων ριζών.

1.2.3 Συστατικά πορτοκαλοχυμού

Θεωρητικά, η σύσταση του φρεσκοστυμένου πορτοκαλοχυμού είναι πανομοιότυπη με αυτή του πορτοκαλιού. Παρόλα αυτά, πρακτικά η σύσταση του βιομηχανικά παρασκευασμένου πορτοκαλοχυμού είναι λίγο διαφορετική. Αυτό οφείλεται στις διεργασίες στις οποίες υπόκειται αμέσως μετά την εκχύμωσή του, όπως η

συμπύκνωση και η θερμική επεξεργασία του. Τα κύρια συστατικά του πορτοκαλοχυμού που είναι και τα κύρια συστατικά του πορτοκαλιού περιγράφονται παρακάτω.

1.2.3.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες αποτελούν περισσότερο από το 80% των διαλυτών στερεών του χυμού. Βέβαια, το ποσοστό αυτό και το είδος των υδατανθράκων παρουσιάζει μια σχετική διαφοροποίηση ανάλογα με την εποχή και την ποικιλία στην οποία ανήκει το πορτοκάλι. Στον πορτοκαλοχυμό το μεγαλύτερο μέρος των υδατανθράκων αποτελεί η σακχαρόζη και σε παρόμοιες συγκεντρώσεις υπάρχουν η γλυκόζη και η φρουκτόζη μαζί (*Ashurst, 1995*).

Η περιεκτικότητα του πορτοκαλοχυμού σε υδατάνθρακες μετράται με τη χρήση της κλίμακας Brix. Οι βαθμοί Brix ($^{\circ}\text{Brix}$) εκφράζουν την περιεκτικότητα των ολικών σακχάρων επί των ολικών διαλυτών στερεών.

Πίνακας 1-1 : Περιεκτικότητα υδατανθράκων (g/ 100 g) σε διάφορους χυμούς φρούτων (Ashurst, 1995).

Είδος χυμού	Είδος συσκευασίας	Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Σακχαρόζη	Ολικά σάκχαρα
Μήλο, άγλυκος	Μπουκάλι, χάρτινο κουτί	2,6	6,3	1,1	9,9
Σταφύλι, άγλυκος	Χάρτινο κουτί	5,5	6,2	Έχνη	11,7
Γκρέιπφρουτ, άγλυκος	Χάρτινο κουτί - κονσερβοποιημένο, παγωμένος σε μπουκάλι	3,0	3,3	2,0	8,3
Λεμόνι	Φρέσκος	0,5	0,9	0,2	1,6
Μοσχολέμονο	Φρέσκος	0,6	0,6	0,4	1,6
Πορτοκάλι	Φρεσκοστυμένος	2,0	2,2	4,0	8,2
Πορτοκάλι, άγλυκος	Χάρτινο κουτί - κονσερβοποιημένο, παγωμένος σε μπουκάλι	2,8	2,9	3,1	8,8
Πορτοκάλι, συμπυκνωμένος άγλυκος	Κονσερβοποιημένος	11,7	12,3	20,9	44,9
Ανανάς, άγλυκος	Χάρτινο κουτί	2,9	2,9	4,7	10,5

1.2.3.2 Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα και τα άλατα αυτών είναι το δεύτερο σημαντικότερο συστατικό των πορτοκαλοχυμών μετά τους υδατάνθρακες και αποτελούν το 10% των ολικών διαλυτών στερεών. Το κυριότερο οργανικό οξύ του πορτοκαλιού είναι το κιτρικό οξύ και δευτερευόντως το μηλικό και το κινικό. Η παρουσία των οργανικών οξέων εξαρτάται από την ωριμότητα του φρούτου και το χρόνο αποθήκευσης του πριν από

την επεξεργασία. Η περιεκτικότητα σε οργανικά οξέα στον πορτοκαλοχυμό είναι περίπου 1 g/100 mL.

Η οξύτητα του πορτοκαλοχυμού, η οποία οφείλεται στην παρουσία των οξέων μετράται είτε με μέτρηση του pH του χυμού, είτε με τιτλοδότηση με NaOH.

1.2.3.3 Βιταμίνες

Ο πορτοκαλοχυμός περιέχει γενικά πολλές βιταμίνες σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Η περιεκτικότητά του, όμως σε βιταμίνη C (*L-ascorbic acid*) είναι ιδιαίτερα υψηλή δίνοντας στον πορτοκαλοχυμό το χαρακτηριστικό της ιδιαίτερα μεγάλης θρεπτικής αξίας. Η περιεκτικότητά του πορτοκαλιού σε βιταμίνη C και κατά συνέπεια και του χυμού εξαρτάται από το βαθμό ωρίμανσης του φρούτου και τις καιρικές συνθήκες. Η βιταμίνη C οξειδώνεται πολύ γρήγορα και η οξείδωσή της επιταχύνεται κατά την αποθήκευσή του και την επαφή του με την ατμόσφαιρα.

1.2.3.4 Ανόργανα συστατικά

Ο πορτοκαλοχυμός είναι ιδιαίτερα πλούσιος σε κάλιο (*K*) και περιέχει μικρότερες ποσότητες άλλων ανόργανων συστατικών, όπως νάτριο (*Na*), ασβέστιο (*Ca*), μαγνήσιο (*Mg*), φωσφόρος (*P*), σίδηρος (*Fe*), χαλκός (*Cu*) και ψευδάργυρος (*Zn*). Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα η υψηλή περιεκτικότητα καλίου (*K*) εντοπίζεται και σε άλλου χυμούς φρούτων με τη συγκέντρωσή του να κυμαίνεται στο εύρος 120-180 mg/100 mL.

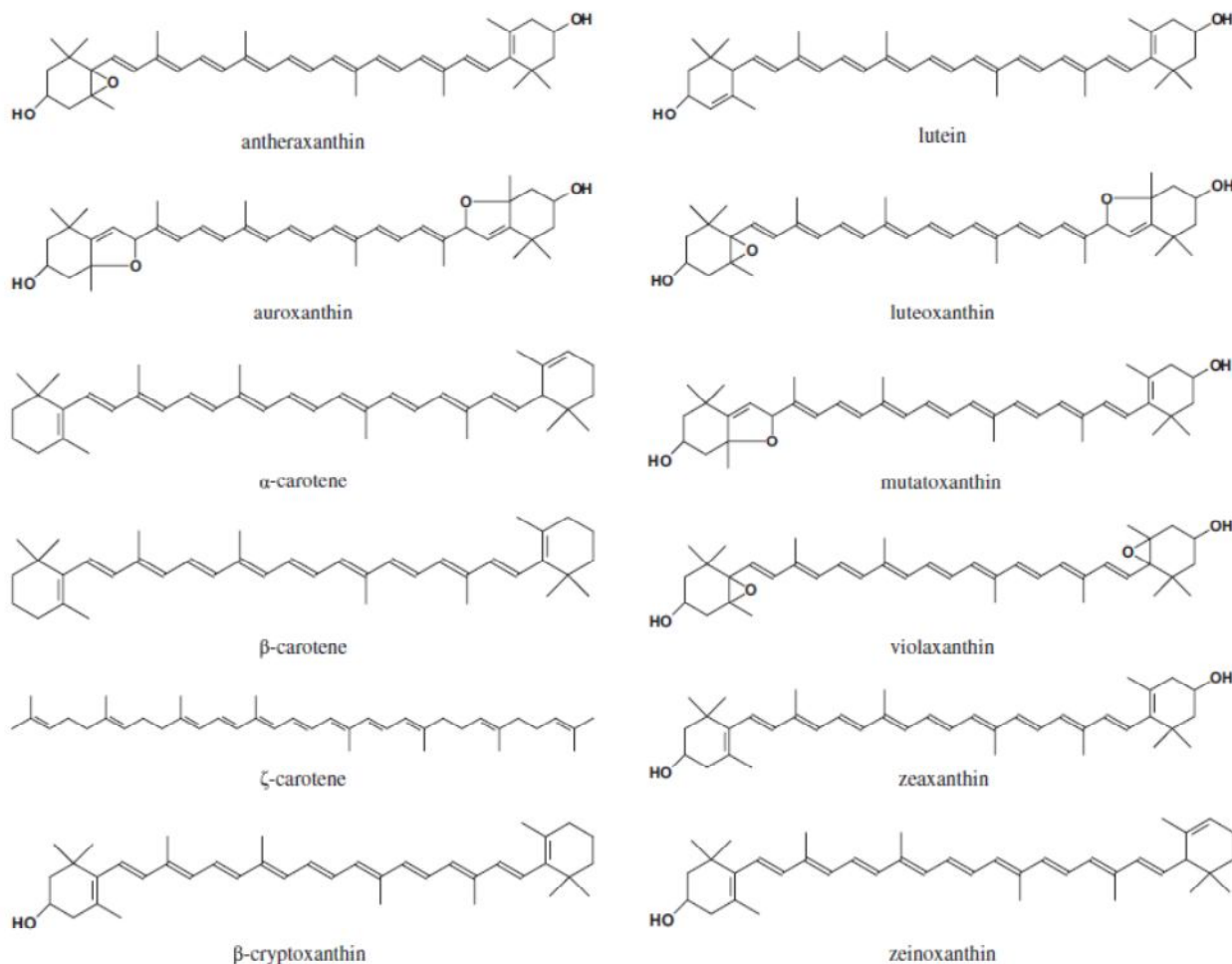
Πίνακας 1-2: Τιμές ανόργανων συστατικών mg/100 mL (Ashurst, 1995).

Φρούτο	Είδος χυμού	Na	K	Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn
Πορτοκάλι	φρεσκοστυμμένος	2	180	12	12	22	0,3	0,05	0,2
	Κονσερβοποιημένος, άγλυκος	4	130	9	9	15	0,5	-	0,3
Γκρέιπφρουτ	Φρέσκος	1	162	9	12	15	0,2	-	0,05
	Κονσερβοποιημένος	4	129	14	10	10	0,4	-	0,05
Λεμόνι	Φρέσκος	1	124	7	7	6	0,4	-	0,05
	Κονσερβοποιημένος	21	102	11	8	9	0,1	-	-
Σταφύλι	Κονσερβοποιημένος	3	132	9	10	11	0,2	-	0,05
Μήλο	Κονσερβοποιημένος	3	119	7	5	7	0,4	-	0,04
Βερίκοκο	Κονσερβοποιημένο νέκταρ	1	82	7	5	9	0,4	-	0,09
Ροδάκινο	Κονσερβοποιημένο νέκταρ	7	40	5	4	6	0,2	-	0,08
Αχλάδι	Νέκταρ	4	33	5	3	3	0,3	-	0,07
Ανανάς	Κονσερβοποιημένος	1	140	12	12	10	0,7	0,09	-

1.2.3.5 Καροτενοειδή

Ο πορτοκαλοχυμός είναι μια πηγή πλούσια σε καροτενοειδή. Περιέχει καροτενοειδή πλούσια σε προβιταμίνη Α (α-καροτένιο, β-καροτένιο, α-κρυπτοξανθάνη, β-κρυπτοξανθάνη) και αντιοξειδωτικά καροτενοειδή (α-καροτένιο, λουτένη) (Plaza et al., 2011). Στα καροτενοειδή οφείλεται το χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα του χυμού, καθώς και το χρώμα της φλούδας και της πούλπας του πορτοκαλιού. Πέρα, όμως από το χρώμα που προσδίδουν στο χυμό τα καροτενοειδή έχουν και μεγάλη θρεπτική αξία, λόγω της προβιταμίνης Α που περιέχουν αρκετά από αυτά. Έρευνες δείχνουν ότι τα καροτενοειδή είναι ευεργετικά για την υγεία του ανθρώπου, γιατί αναστέλλουν καρδιαγγειακές δυσλειτουργίες, διάφορες μορφές καρκίνου και παθήσεις των ματιών που σχετίζονται με την ηλικία, όπως ο καταρράκτης (Melendez-

Martinez et al, 2007). Στο χυμό από πορτοκάλια ποικιλίας Navel η συγκέντρωση του β-καροτένιου είναι αρκετά μικρότερη σε σχέση με τη συγκέντρωση του χυμού από πορτοκάλια Valencia (Bull et al., 2004).



Εικόνα 1-12: Χημικές δομές των συνηθέστερων καροτενοειδών του πορτοκαλοχυμού.

1.2.3.6 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια σημαντική κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών, τα οποία σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την υγεία του ανθρώπου, καθώς τον προστατεύουν από διάφορες μορφές καρκίνου (Berhow et al, 1996).

Ο χυμός του πορτοκαλιού είναι πλούσιος σε φλαβονοειδή και ειδικότερα σε φλαβανόνες, οι οποίες έχουν πολλές φυσιολογικές ιδιότητες. Τα φλαβονοειδή περιέχουν ποικίλους γλυκοζίτες των τριών κύριων αγλυκόνων: εσπερετίνη (4'-

μεθόξυ-3',5,7- τριυδροξύφλαβανόνη), ναριντζίνη (5,7,4'-τριυδροξύφλαβανόνη) και εριοδικτυόλη (5,7,3',4'-τετραυδροξύφλαβανόνη). Οι συνηθέστεροι γλυκοζίτες που περιέχονται στα εσπεριδοειδή είναι η εσπεριδίνη, η ναριγκινίνη, της οποίας η γεύση είναι πικρή και ανακαλύφθηκε πρώτη φορά στο χυμό του γκρέιπφρουτ, η πονκιρίνη και η ναριρουτίνη. Οι ιδιότητες τους οφείλονται στην ικανότητα τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, να προωθούν την διαφοροποίηση δρώντας ως αντιοξειδωτικά και είναι ρυθμιστές των κινασών της τυροσίνης.

Όσον αφορά τη δομή, τα φλαβονοειδή μοιάζουν με το ATP (5'-τριφωσφορική αδενοσίνη) μόριο το οποίο περιέχεται στα κύτταρα και υδρολύεται για να προσφέρει ενέργεια (Vanamala et al 2006).

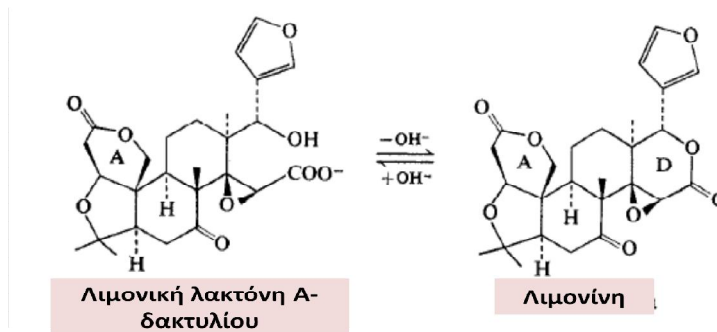
1.2.3.7 Λιμονοειδή

Τα λιμονοειδή έχουν χημική συγγένεια με τα υψηλά οξυγονωμένα τετρακυκλικά τριτερπενοειδή, προέρχονται από τα παράγωγα των τριτερπενίων και βρίσκονται κυρίως στη σάρκα και στους σπόρους των φρούτων (Karim et al., 2002; Berhow, 1996). Τα λιμονοειδή παράγονται από μια σειρά αντιδράσεων, οι οποίες πραγματοποιούνται στον κορμό του δέντρου του εσπεριδοειδούς. Στον κορμό του δέντρου παράγεται η νομιλίνη, η οποία μεταφέρεται στο φρούτο και εκεί μετατρέπεται σε διάφορα λιμονοειδή μεταξύ αυτών και στην άγευστη λιμονική λακτόνη Α-δακτυλίου, η οποία αποτελεί την πρόδρομη ένωση της λιμονίνης.

Η λιμονίνη είναι το λιμονοειδές που περιέχεται στον πορτοκαλοχυμό σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με άλλα λιμονοειδή και είναι η κύρια υπεύθυνη ένωση που προκαλεί την πικρή γεύση στους πορτοκαλοχυμούς (Kimball, 1999).

1.2.3.7.1 Λιμονίνη

Η λιμονίνη είναι μία έντονα πικρή τετρακυκλική τριτερπενοειδής διλακτόνη και ευθύνεται για τη χαρακτηριστική πικρή γεύση του πορτοκαλοχυμού και γενικά των χυμών των εσπεριδοειδών. Η λιμονίνη παράγεται από τη λιμονική λακτόνη Α-δακτυλίου. Σε όξινο περιβάλλον ευνοείται το κλείσιμο του Α-δακτυλίου μετατρέποντας τη λιμονική λακτόνη Α-δακτυλίου σε λιμονίνη (Σχήμα 1-3).



Σχήμα 1-3: Σχηματική παράσταση μετατροπής της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου σε λιμονίνη στο όξινο περιβάλλον του πορτοκαλοχυμού (Kimball, 1999).

Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται κατά την εκχύμωση του πορτοκαλιού, καθώς διαρρηγνύονται οι μεμβράνες της σάρκας του και επιταχύνεται λόγω του όξινου περιβάλλοντος του χυμού. Το ένζυμο υδρολάση της D-λακτόνης καταλύει αυτή την αντιστρεπτή μετατροπή της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου σε λιμονίνη και βρίσκεται στους φυτικούς ιστούς των εσπεριδοειδών. Πρόκειται για ένα εξαιρετικά θερμοάαντοχο ένζυμο, αφού η θερμική διεργασία στους 100°C για 5 min είναι ικανή να απενεργοποιήσει το 70% της αρχικής του ενεργότητας. Αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου, η οποία παρατηρείται κατά τη διεργασία της παστερίωσης, όπου η θερμοκρασία είναι υψηλή, έχει σαν αποτέλεσμα τη ραγδαία αύξηση της λιμονίνης. Για αυτό το λόγο, η συγκέντρωση της λιμονίνης είναι υψηλότερη στον παστεριωμένο χυμό σε σχέση με τον απαστερίωτο. Η πρόδρομη ένωση της λιμονίνης η λιμονική λακτόνη Α-δακτυλίου συντίθεται στα φύλλα των δέντρων των εσπεριδοειδών και στη συνέχεια μεταφέρεται στο φρούτο και τα σπόρια (Pichaiyongvongdee et al, 2009). Τα επίπεδα συγκέντρωσης της εξαρτώνται από το μέγεθος και την ηλικία του φύλλου. Γενικά, η συγκέντρωση της είναι μεγαλύτερη στα μικρά σε μέγεθος και ηλικία φύλλα σε σχέση με τα μεγαλύτερα και είναι χαρακτηριστικό ότι μετά το δεύτερο χρόνο ζωής τα φύλλα του δέντρου περιέχουν ίχνη λιμονοειδών. Αντίθετα, στον καρπό, όπως για παράδειγμα στα πορτοκάλια Navel, όπου υπάρχει η λιμονική λακτόνη Α-δακτυλίου αμέσως μετά την άνθηση, η συγκέντρωση της αυξάνει καθώς το πορτοκάλι μεγαλώνει (Hasegawa et al, 1977).

Βιβλιογραφία 1^{ου} κεφαλαίου

- Berhow A. M., Fong H. Ch., Hasegawa S., 1996, *Limonoid and flavonoid composition in varieties of Papeda and Papedocitrus, Biochemical Systematics and Ecology*, 24, 237-242.
- Iglesias J.D., Cercós M., Colmenero-Flores M. J., Naranjo A. M., Ríos G., Carrera E., Ruiz-Rivero O., Lliso I., Morillon R., Tadeo R. F., Talon M., 2007, *Physiology of citrus fruiting (review)*.
- Karim R. M., Hashinaga F., 2002, *Isolation and characterization of limonoid glucosyltransferase from pummelo albedo tissue, Food Chemistry*, 76, 431–436.
- Kanner J., Fishbein J., Shalom P., Harel S., Ben-Gera I., 1982, *Storage stability of orange juice concentrate packaged aseptically, Journal of food science*, 47, 429-431.
- Kimball A. D., 1999, *Description of citrus fruit, Citrus Processing a complete guide, Ed. Aspen, USA, pp. 7-19*.
- Kimball D.A., Norman S. A., 1990, *Processing effects during commercial debittering of California Navel oranges, Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1396-1400.
- Kola O., Kaya C., Duran H., Altan A., 2010, *Removal of limonin bitterness by treatment of ion exchange and absorbent resin, Food Science and Biotechnology*, 19, 411-416.
- Melendez-Martinez J. A., Vicario M. I., Heredia J. F., 2007, *Review: Analysis of carotenoids in orange juice, Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 638–649.
- Μπλούκας Ι., 2004, «Υψηλές Υδροστατικές Πιέσεις», *Επεξεργασία & Συντήρηση Τροφίμων, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα, σελ. 94-96*.
- Nisperos-Carriedo M.O., Shaw P.E., 1990, *Volatile flavor components of fresh and processed orange juices, Food Technology*, 44, 134–138.
- Pichaiyongvongdee S., Haruenkit R., 2009, *Comparative Studies of Limonin and Naringin Distribution in Different Parts of Pummelo [Citrus grandis (L.) Osbeck] Cultivars Grown in Thailand, Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 43, 28 – 36.
- Plaza L., Sánchez-Moreno C., De Ancos B., Elez-Martínez P., Martín-Belloso O., Pilar Cano M., 2011, *Carotenoid and flavanone content during refrigerated*

- storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization, LWT - Food Science and Technology, 44, 834-839.*
- Rebeck M. H., 1995, Processing of citrus juices, Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages, ed. Ashurst R. P., Great Britain, pp 221-251.*
- Stinco M. C., Fernandez-Vazquez R., Hernanz D., Heredia J. F., Melindez-Martinez J. A., Vicario M. I., 2013, Industrial orange juice debittering: Impact on bioactive compounds and nutritional value, Journal of Food Engineering, 116,155-161.*
- Vanamala J., Reddivari L., Kil Sun Yoo, Pike M. L., Patil S. B., 2006, Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices Journal of Food Composition and Analysis,19, 157–166.*
- Τζουβάρα-Καραγιάννη Σ., 1990, Χυμοί Φρούτων, Σύσταση, Χημική ανάλυση και προδιαγραφές βασικών τροφίμων, Εκδόσεις Ε.Μ.Π., Ιωάννινα, σελ. 224-225.*

2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΟΡΤΟΚΑΛΟΧΥΜΟΥ

Ο πορτοκαλοχυμός χάρη στο μοναδικό συνδυασμό οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, όπως το χρώμα, το άρωμα και η γεύση, αλλά και την υψηλή θρεπτική του αξία είναι ο πιο δημοφιλής φρουτοχυμός στον κόσμο. Σύμφωνα, μάλιστα με έρευνες αποτελεί το 60% των φρουτοχυμών που καταναλώνονται στη Δυτική Ευρώπη και υπολογίζεται ότι στην Ευρωπαϊκή Ένωση καταναλώνονται ετησίως 5 δισεκατομμύρια λίτρα πορτοκαλοχυμού (*Vervoot et al., 2011*). Το 2007 η ετήσια κατανάλωση χυμών φρούτων στην Ελλάδα υπολογίστηκε να είναι ίση με 16,24 L/άτομο και από αυτά τα 7,46 L/άτομο αντιστοιχούν σε κατανάλωση φρέσκου χυμού πορτοκαλιού. Παγκοσμίως, η βιομηχανία πορτοκαλοχυμού επικεντρώνεται όλο και περισσότερο στην παραγωγή μη συμπυκνωμένου χυμού. Ο μη συμπυκνωμένος χυμός κερδίζει όλο και περισσότερο τους καταναλωτές και υψηλό μερίδιο της αγοράς λόγω της υψηλής του ποιότητας.

Παρά το όξινο περιβάλλον του πορτοκαλοχυμού, η ανάπτυξη μικροοργανισμών και η δράση ενζύμων συντελούν στη γρήγορη αλλοίωση του. Για αυτό το λόγο υπόκειται αμέσως μετά την εκχύμωση σε θερμικές διεργασίες προκειμένου να καταστραφούν οι μικροοργανισμοί (παθογόνοι και αλλοιογόνοι) και να απενεργοποιηθούν τα ένζυμα που προκαλούν αλλοίωση. Αυτές, όμως οι θερμικές διεργασίες συμβάλλουν και στην ποιοτική υποβάθμιση του χυμού, γιατί καταστρέφουν θρεπτικά συστατικά, όπως η βιταμίνη C, καθώς και σημαντικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως αρωματικές ενώσεις. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την αυξανόμενη καταναλωτική ζήτηση ελάχιστα επεξεργασμένων, φυσικών, θρεπτικών και υγιεινών χυμών έχει οδηγήσει την παγκόσμια βιομηχανία τροφίμων να στραφεί προς την εξερεύνηση και τη χρήση εναλλακτικών, μη θερμικών μεθόδων επεξεργασίας του πορτοκαλοχυμού, έτσι ώστε να παραταθεί ο χρόνος ζωής του και παράλληλα να διατηρηθεί η άριστη ποιότητά του (*Vervoort et al, 2011*).

2.1 Θερμικές Μέθοδοι Επεξεργασίας

Στις βιομηχανίες τροφίμων οι θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας εφαρμόζονται στις διεργασίες παραγωγής ως ένα σημαντικό μέρος της παραγωγής και της συντήρησης τους.

2.1.1 Θερμική Παστερίωση

Στη βιομηχανία παραγωγής πορτοκαλοχυμού η συνηθέστερη θερμική διεργασία που πραγματοποιείται για τη συντήρησή του είναι η παστερίωση (*pasteurization*). Παστερίωση είναι η ήπια θερμική επεξεργασία που εφαρμόζεται στα τρόφιμα, σε θερμοκρασίες κατά κανόνα χαμηλότερες από 100°C με σκοπό να καταστρέψει τα ενδογενή ένζυμα, τις βλαστικές μορφές όλων των παθογόνων μικροοργανισμών και τις βλαστικές μορφές των βακτηρίων, τις ζύμες και τους μύκητες που θα μπορούσαν να αλλοιώσουν το προϊόν κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες διατήρησης του (Μπλούκας, 2004).

Στον πορτοκαλοχυμό το ένζυμο πηκτινομεθυλεστεράση είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνο για την ποιοτική υποβάθμιση του και επειδή είναι ιδιαίτερα θερμοανθεκτικό, η ένταση της θερμικής επεξεργασίας σχεδιάζεται με βάση αυτό. Η παστερίωση του χυμού στη βιομηχανία γίνεται σε θερμοκρασία 92°C και η διάρκεια της είναι 30 s.

2.1.2 Ωμική Θέρμανση

Οι συνθήκες παστερίωσης, που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, επιδρούν στα οργανοληπτικά και θρεπτικά συστατικά του χυμού υποβαθμίζοντας την ποιότητά του. Για αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια οι βιομηχανίες έχουν υιοθετήσει τη μέθοδο της ωμικής θέρμανσης. Κατά την ωμική θέρμανση, εναλλασσόμενο ρεύμα διέρχεται μέσα από το τρόφιμο και λόγω της ηλεκτρικής του αντίστασης παράγεται εσωτερικά σε αυτό θερμότητα. Το ποσό της παραγόμενης θερμότητας εξαρτάται άμεσα από την ένταση του εισερχόμενου ρεύματος και την ηλεκτρική αγωγιμότητα του τροφίμου. Τα τρόφιμα που έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό και άλατα είναι

τα πιο κατάλληλα για να επεξεργαστούν με τη μέθοδο της ωμικής θέρμανσης (*Jakob et al, 2010*).

Η παστερίωση με ωμική θέρμανση υπερτερεί έναντι της συμβατικής, γιατί είναι πιο αποτελεσματική όσον αφορά την καταστροφή των μικροβίων και την απενεργοποίηση των ενζύμων και μάλιστα σε πολύ μικρότερο χρόνο. Επιπλέον, λόγω του μικρού χρόνου επεξεργασίας τα θρεπτικά συστατικά των τροφίμων διατηρούνται σχεδόν αναλλοίωτα παράγοντας καλύτερης ποιότητας προϊόντα. Τέλος, επειδή η παροχή θερμότητας στο τρόφιμο είναι πολύ γρήγορη και ομοιόμορφη, υπάρχει ενεργειακή οικονομία γεγονός που καθιστά την ωμική θέρμανση μια τεχνολογία αρκετά φιλική προς το περιβάλλον (*Darvishi et al, 2012; Jakob et al, 2010*).

2.2 Μη θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η απαίτηση των καταναλωτών για υψηλής ποιότητας τρόφιμα πλούσια σε θρεπτικά χαρακτηριστικά με όσο το δυνατόν λιγότερη επεξεργασία οδήγησε στη διερεύνηση εναλλακτικών μη θερμικών μεθόδων επεξεργασίας. Ορισμένες από αυτές είναι:

- Παλλόμενο Ηλεκτρικό Πεδίο (*Pulsed electric field*)
- Υψηλή Υδροστατική Πίεση (*High Hydrostatic Pressure*)
- Ιονίζουσα Ακτινοβολία (*Ionizing Irradiation*)
- Υπεριώδης Ακτινοβολία (*Ultraviolet Radiation*)
- Μη θερμικό πλάσμα (*Non-thermal plasma*)
- Υψηλής έντασης ηλεκτρικό πεδίο (*Concentrated high intensity electric field*) (*Chen et al., 2010*)

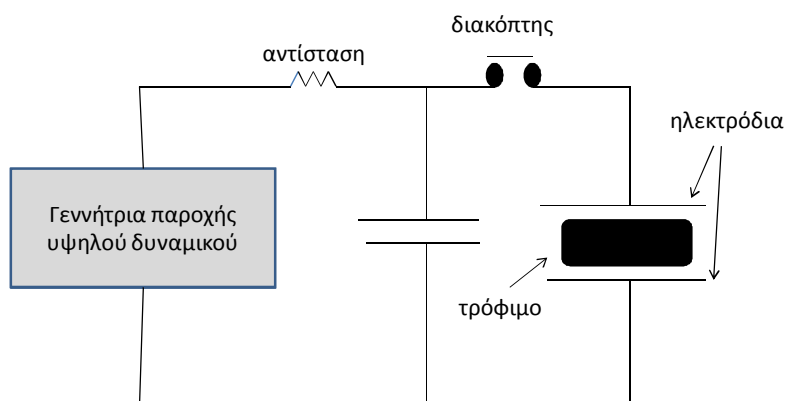
Από τις παραπάνω μη θερμικές μεθόδους, στον πορτοκαλοχυμό έχουν εφαρμοστεί το παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο και η υψηλή υδροστατική πίεση.

2.2.1 Παλλόμενο Ηλεκτρικό Πεδίο

Η επεξεργασία του πορτοκαλοχυμού με παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο έναντι της θερμικής παστερίωσης του έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενός σταθερότερου

προϊόντος, το οποίο διατηρεί παράλληλα αναλλοίωτες τις βιταμίνες του και τα αρωματικά συστατικά του (Elez-Martinez et al., 2012).

Η τεχνολογία των παλλόμενων ηλεκτρικών πεδίων περιλαμβάνει την εφαρμογή παλμών υψηλής τάσης (περίπου 20-80 kV/ cm) για μικρό χρονικό διάστημα (1-10 μ s) στο τρόφιμο το οποίο βρίσκεται μεταξύ δύο μεταλλικών ηλεκτροδίων με στόχο την καταστροφή των μικροοργανισμών.



ΣΧΗΜΑ 2-1: Σχηματικό διάγραμμα της διεργασίας παλμικού ηλεκτρικού πεδίου.

Καθώς το τρόφιμο έρχεται σε επαφή με το υψηλής τάσης πεδίο η κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων των μικροοργανισμών διαρρηγνύεται ή μετουσιώνονται οι πρωτεΐνες της με αποτέλεσμα να περιορίζεται η εκλεκτικότητα της και να επιτρέπεται η είσοδος νερού στο κύτταρο. Λόγω αυτού ο όγκος του κυτταρικού υγρού αυξάνεται και τελικά το κύτταρο διαρρηγνύεται.

Η εφαρμογή του παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου έναντι της συμβατικής παστερίωσης πλεονεκτεί στο ότι οδηγεί σε ένα υψηλής ποιότητας χυμό, ασφαλή για τον καταναλωτή διατηρώντας παράλληλα σχεδόν σταθερή τη βιταμίνη C, το άρωμα και το χρώμα του.

2.2.2 Υπερυψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΥΠ)

Η Υπερυψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΥΠ) είναι μια από τις νεότερες τεχνολογίες επεξεργασίας τροφίμων, η οποία στηρίζεται στην άσκηση υδροστατικών πιέσεων. Η

χρήση της περιλαμβάνει την εφαρμογή πιέσεων από 100-800 MPa σε υγρά ή στερεά τρόφιμα, συσκευασμένα ή μη με σκοπό την καταστροφή των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών και την απενεργοποίηση των ενδογενών ενζύμων, ενώ παράλληλα διατηρούνται η θρεπτική αξία και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων (Sangronis et al., 1997; Spilimbergo et al., 2002; Smelt, 1998). Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες, οι οποίες αποδεικνύουν τα πλεονεκτήματα της χρήσης της ΥΥΠ έναντι της θερμικής παστερίωσης των φρουτοχυμών. Από τη διεθνή βιβλιογραφία έχει αποδειχθεί ότι η εφαρμογή ΥΥΠ επιτρέπει την καταστροφή των αλλοιογόνων μικροοργανισμών, καθώς και των μικροοργανισμών που έχουν αναφερθεί να είναι ανθεκτικοί σε περιβάλλον με χαμηλό pH. Παράλληλα η ΥΥΠ έχει αποδειχθεί ότι επιτρέπει την απενεργοποίηση ενζύμων, ενώ ταυτόχρονα διατηρούνται τα βιοενεργά συστατικά, όπως οι βιταμίνες και τα αντιοξειδωτικά. Όπως προκύπτει μετά από οργανοληπτικούς ελέγχους από καταναλωτές, οι χυμοί φρούτων που έχουν υποστεί ΥΥΠ παρουσιάζουν ανώτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και είναι γευστικά αποδεκτοί. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με τη βελτίωση του εξοπλισμού που απαιτείται για την ΥΥΠ και των οικονομικών απαιτήσεων οδήγησαν στην αύξηση της παραγωγής φρουτοχυμών επεξεργασμένων με ΥΥΠ με ιδιαίτερα ανταγωνιστική τιμή, που συνεχώς κερδίζουν μεγάλο μερίδιο στις αγορές, ειδικότερα της Αυστραλίας και της Ευρώπης (Sampedro et al., 2010).

2.2.2.1 Ιστορική αναδρομή

Η εφαρμογή υψηλών υδροστατικών πιέσεων στα τρόφιμα πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά από τον χημικό Bert Hite στο Γεωργικό Πειραματιστικό Σταθμό του Πανεπιστημίου West Virginia των ΗΠΑ. Ο Hite και οι συνεργάτες του τη δεκαετία του 1890 κατασκεύασαν μηχανή για την ανάπτυξη ΥΥΠ έως 680 MPa και μελέτησε την επίδραση των πιέσεων στη συντήρηση του γάλακτος, των φρούτων, των χυμών και άλλων προϊόντων. Το 1914 δημοσιεύθηκε εργασία του στην οποία αναφέρεται ότι ροδάκινα και αγλάδια στα οποία εφαρμόστηκε πίεση 400 MPa για 30 min διατηρήθηκαν αναλλοίωτα για πέντε χρόνια. Το ίδιο έτος σε εργασία άλλου ερευνητή αναφέρθηκε ότι η ΥΥΠ προκαλεί μεταβολές στη δομή των πρωτεϊνών του αυγού και

τη θρόμβωσή του. Από τότε έγιναν πολύ λίγες αναφορές στην επίδραση των ΥΥΠ στους μικροοργανισμούς και τα τρόφιμα, χωρίς να υπάρχει επιτυχής εφαρμογή. Η τεχνολογία των ΥΥΠ στην παραγωγή τροφίμων εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία το 1986 και στις αρχές του 1990 κυκλοφόρησαν στην αγορά τα πρώτα νέα προϊόντα.

Πίνακας 2-1: Τα πρώτα προϊόντα της τεχνολογίας ΥΥΠ (Μπλούκας, 2004).

ΠΡΟΪΟΝ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
Μαρμελάδα, φρουτοσαλάτα, ζελέ φρούτων, γιαούρτι φρούτων	400 MPa, 10-30 min, 20°C	Meidi-Ya
Χυμός γκρέιπφρουτ	120-400 MPa, 2-20 min, 20°C	Pokka Corp
Τροπικά φρούτα διατηρημένα χωρίς κατάψυξη στους -18°C	50-200 MPa	Nishin Oil Mills
Χυμός μανταρινιού	300-400 MPa, 2-3 min, 20°C	Wakayana Industries
Τρυφεροποίηση βοδινού κρέατος	100-120 MPa, 30-40 min, 20°C	Fuji Ciku Mutteham

Την Ιαπωνία ακολούθησαν οι ΗΠΑ και η Ευρώπη, όπου το 1995 κυκλοφόρησε στη Γαλλία επεξεργασμένος χυμός πορτοκάλι με ΥΥΠ (Ταούκης, Ωραιοπούλου, 2009) και αργότερα ακολούθησε η Αυστραλία.

Πίνακας 2-2: Εμπορικά Διαθέσιμα προϊόντα ΥΥΠ μετά το 2000 (NC Hyperbaric, <http://www.nchyperbaric.com/index.htm>).

Χώρα (έτος)	Προϊόν	Συνθήκες διεργασίας ΥΠ
Ιαπωνία (2000)	Προμαγειρεμένο ρύζι Υποαλλεργικό ρύζι	400 MPa
Ιταλία (2001)	Επιδόρπια φρούτων Μήλο, αχλάδι και φράουλα	600 MPa / 17°C / 3-5 min
ΗΠΑ (2001)	Στρείδια	240 MPa / 90 s
Πορτογαλία (2001)	Χυμός μήλου και εσπεριδοειδών	450 MPa / 12°C / 20-90 s
Ιταλία (2001)	Χυμός φρούτων	600 MPa/ 17°C/ 3-5 min
ΗΠΑ (2002)	Προϊόντα αβοκάντο	
Ισπανία (2002)	Τεμαχισμένο ζαμπόν, προϊόντα κοτόπουλου και γαλοπούλας	500 MPa/ 8°C/ 4-10 min
Μεξικό (2002)	Προϊόντα αβοκάντο	
ΗΠΑ (2003)	Τεμαχισμένα κρεμμύδια	
Ιταλία (2003)	Προσούτο, σαλάμι, μορταδέλα	600 MPa/ 7°C/ 10 min
Ισπανία (2004)	Σολομός, μπακαλιάρος (RTE ¹)	500 MPa
Ιταλία (2004)	Μπακαλιάρος	600 MPa
Τσεχία (2004)	Χυμός μπρόκολου-μήλου ²	
Ισπανία (2005)	Πιάτα φρούτων (RTE ¹)	500 MPa
Ιαπωνία (2005)	Ζαμπόν, λουκάνικα, μπέικον	600 MPa/ 5°C / 5 min
Γερμανία (2005)	Καπνιστό ζαμπόν	600 MPa/ 5°C / 2 min
N. Κορέα (2006)	Στρείδια	
Αυστραλία (2007)	Χυμός φρούτων	
Ελλάδα (2009)	Αλλαντικά	600 MPa/ 22,8°C / 180 s
Ελλάδα (2011)	Αλλαντικά	

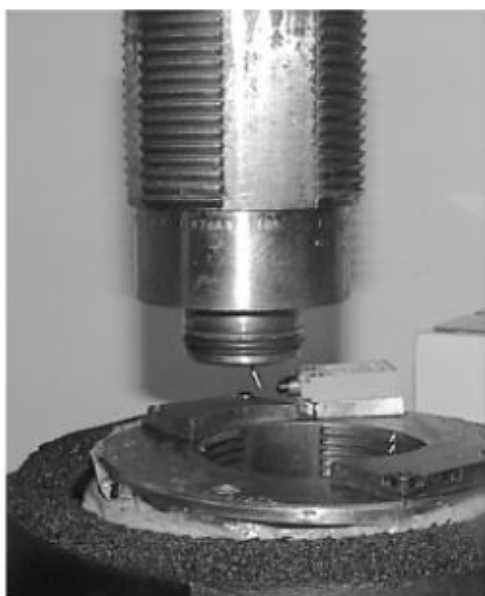
¹RTE: Ready- to- eat

²Το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο λειτουργικό τρόφιμο επεξεργασμένο με ΥΠ

2.2.2.2 Εξοπλισμός

Ένα τυπικό σύστημα ΥΥΠ περιλαμβάνει το κυλινδρικό δοχείο υψηλών πιέσεων με το κάλυμμά του, το σύστημα δημιουργίας των υψηλών πιέσεων, τα όργανα ελέγχου της θερμοκρασίας και το υγρό μέσο μεταβίβασης των πιέσεων στο προϊόν (Μπλούκας, 2004). Αυτά τα μέρη του εξοπλισμού ΥΥΠ μπορούν να διευθετηθούν ανάλογα για τη μεταχείριση συσκευασμένων τροφίμων σε ένα σύστημα ασυνεχούς λειτουργίας ή μη συσκευασμένων υγρών τροφίμων σε ένα ημισυνεχές ή συνεχές σύστημα.

Το δοχείο υψηλών πιέσεων είναι κατασκευασμένο από ατσάλινο κράμα υψηλής αντοχής σε εφελκυσμό.



Εικόνα 2-1: Δοχείο ΥΥΠ με στεγανοποιημένο κάλυμμα.

Το πάχος των τοιχωμάτων εξαρτάται από τη μέγιστη εφαρμοζόμενη πίεση, τη διάμετρο του δοχείου και τον αριθμό κύκλων συμπίεσης για τους οποίους προορίζεται το δοχείο. Τα δοχεία υπερυψηλής πίεσης, τα οποία είναι κατάλληλα για λειτουργία σε πιέσεις πάνω από 400 MPa κατασκευάζονται από δύο ή περισσότερους ομόκεντρους κύκλους. Οι εξωτερικοί κύλινδροι συμπιέζουν τους εσωτερικούς, ώστε τα τοιχώματα του θαλάμου πίεσης να μπορούν πάντα να δεχτούν μια επιπλέον συμπίεση λόγω της πίεσης λειτουργίας του συστήματος. Σύμφωνα με τις προδιαγραφές ασφαλείας (ASME Stion 8, Division 3 of the Boiler and Pressure

Vessel Code) απαιτείται η δυνατότητα θραύσης των εσωτερικών κυλίνδρων για την εκτόνωση της πίεσης μέσω διαρροής έτσι ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή του δοχείου πίεσης (leak before break). Ο εξωτερικός κύλινδρος του δοχείου πίεσης μπορεί να περιβάλλεται από σύρμα ή να είναι ενσωματωμένος σε έναν κύλινδρο γεμάτο με υγρό, υπό μόνιμη συμπίεση, προκειμένου να διασφαλιστεί ένας κύκλος ζωής μεγαλύτερος από 100.000 κύκλους συμπίεσης στα 680 MPa ή περισσότερο. Ο εσωτερικός κύλινδρος και όλα τα μέρη του εξοπλισμού που είναι εκτεθειμένα στο νερό ή το τρόφιμο πρέπει να είναι κατασκευασμένα από ανοξείδωτο χάλυβα για την αποφυγή διάβρωσης. Συστήματα που χρησιμοποιούν μη ανοξείδωτο χάλυβα υψηλής αντοχής σε εφελκυσμό πρέπει να χρησιμοποιούν ως υγρό μεταφοράς της πίεσης ένα συμβατό με το τρόφιμο έλαιο ή νερό που να περιέχει λειαντικές, αντιδιαβρωτικές και αντιμικροβιακές ουσίες. Για την καλύτερη προστασία συσκευασμένων τροφίμων που επεξεργάζονται σε συστήματα που χρησιμοποιούν λειαντικές ουσίες προτείνεται η τοποθέτησή τους σε σφραγισμένες σακούλες.

Τα δοχεία πίεσης που είναι διαθέσιμα για εργαστηριακές μονάδες έχουν όγκο από 0.1-2 L. Τα πιλοτικής κλίμακας δοχεία μπορούν να έχουν χωρητικότητα από 10-25 L μέχρι μερικές εκατοντάδες, για συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας βιομηχανικής κλίμακας. Τέλος δυο ή περισσότερα δοχεία μπορούν να τροφοδοτούνται από τον ίδιο ενισχυτή πίεσης.

2.2.2.3 Αρχές Λειτουργίας της διεργασίας ΥΥΠ

Όλα σχεδόν τα τρόφιμα πριν την επεξεργασία τους με ΥΥΠ συσκευάζονται κατάλληλα υπό κενό. Αφού τοποθετηθούν σε ειδικά κάνιστρα εισάγονται στο δοχείο υψηλών πιέσεων. Στη συνέχεια το δοχείο γεμίζεται με το υγρό μέσο διάδοσης της πίεσης. Το υγρό μέσο διάδοσης της πίεσης μπορεί να είναι ορυκτέλαιο χαμηλού ιξώδους, φυτικό έλαιο ή νερό στο οποίο έχει προστεθεί μικρή ποσότητα λιπαντικού ελαίου και αντιδιαβρωτικού μέσου. Συνήθως, προτιμάται η γλυκόλη, η οποία παρουσιάζει μικρότερη συμπιεστότητα, πράγμα που είναι απαραίτητο για την καλύτερη διάδοση της πίεσης. Το προϊόν παραμένει κάτω από την επίδραση ΥΥΠ για ορισμένο χρονικό διάστημα. Ο χρόνος παραμονής εξαρτάται από το είδος του τροφίμου και τη θερμοκρασία στην οποία γίνεται η επεξεργασία του. Όταν

ολοκληρωθεί ο χρόνος άσκησης των ΥΥΠ το δοχείο υψηλών πιέσεων αποσυμπιέζεται, το προϊόν εξέρχεται από το δοχείο, στεγνώνει με θερμό αέρα και συσκευάζεται σε παλέτες για να οδηγηθεί στον αποθηκευτικό χώρο ή να διατεθεί προς κατανάλωση (Ταούκης, Ωραιοπούλου, 2009; Μπλούκας, 2004).

2.2.2.4 Επίδραση των ΥΥΠ στους μικροοργανισμούς και τα συστατικά των τροφίμων

2.2.2.4.1 Επίδραση στους μικροοργανισμούς

Η επίδραση των ΥΥΠ στις βλαστικές μορφές των βακτηρίων επηρεάζεται από τη διάρκεια εφαρμογής της πίεσης, το στάδιο ανάπτυξης των μικροοργανισμών, τη σύνθεση του μέσου ανάπτυξης, τη θερμοκρασία, το pH και την ενεργότητα του νερού (a_w). Γενικά, τα gram-θετικά βακτήρια είναι περισσότερο ανθεκτικά στις πιέσεις από τα gram-αρνητικά. Ανάμεσα, στα παθογόνα gram-θετικά βακτήρια πιο σημαντικά είναι τα *Listeria monocytogens* και *Staphylococcus aureus*. Αυτά έχει βρεθεί ότι αδρανοποιούνται με εφαρμογή πίεσης 600 MPa για 5 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και 345 MPa για 5 min σε θερμοκρασία 50°C κατά 5 λογαριθμικούς κύκλους. Ειδικότερα, τα *Listeria monocytogens* μελετώνται, γιατί είναι ψυχρόφιλα και έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται ακόμα και κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του τροφίμου στο ψυγείο (Sampedro et al., 2010). Τα gram-αρνητικά βακτήρια παρουσιάζουν μεγάλο εύρος ευαισθησίας στις πιέσεις, το οποίο αποδεικνύεται από μελέτες σε *E.coli* O157:H7 και σε *Salmonella*. Σε αντίθεση με τα βλαστικά κύτταρα τα σπόρια των βακτηρίων είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά και επιζούν ακόμα και σε πιέσεις άνω των 1.200 MPa. Για αυτό το λόγο η ΥΥΠ ως μέθοδος συντήρησης επιλέγεται για τρόφιμα με χαμηλό pH, όπου οι συνθήκες δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη των σπορίων. Η μεγάλη αντοχή που παρουσιάζουν τα σπόρια οφείλεται στη δομή και τη σκληρότητα του φλοιού τους. Η εφαρμογή υδροστατικών πιέσεων 400 MPa σταδιακά αυξανόμενες με ήπια θέρμανση προκαλούν την καταστροφή των σπορίων, γιατί στις συνθήκες αυτές οι υψηλές πιέσεις προκαλούν τη βλάστηση των σπορίων και η θέρμανση την καταστροφή των βλαστικών κυττάρων που προκύπτουν. Ο πιο

ανθεκτικός και επικίνδυνος σε μορφή σπορίου μικροοργανισμός που καλείται να αντιμετωπίσει η ΥΥΠ είναι ο *Cl. Botulinum*. Αυτός αδρανοποιείται σε πίεση 500-700 MPa σε συνδυασμό με ήπια θέρμανση στους 90-110°C (Ταούκης, Ωραιοπούλου, 2009; Μπλούκας, 2004).

Πολύ σημαντική είναι, επίσης η επίδραση της ΥΥΠ στις ζύμες που αποτελούν βασικούς αλλοιογόνους μικροοργανισμούς στα τρόφιμα. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε μύκητες σε πιέσεις 300-800 MPa και θερμοκρασία 10-70 °C απέδειξαν ότι όλα τα βλαστικά κύτταρα αυτών απενεργοποιήθηκαν με επιβολή πίεσης 300 MPa μέσα σε λίγα λεπτά. Αντίθετα, για τα σπόρια απαιτούνταν εντονότερες συνθήκες 600-800 MPa στους 60-70°C για 10-60 min, ανάλογα με το είδος. Τέλος, όσον αφορά τους ιούς, λόγω της πολυπλοκότητας που εμφανίζουν ως προς τη δομή τους, απενεργοποιούνται σε μεγάλο εύρος πιέσεων.

2.2.2.4.2 Επίδραση στα ένζυμα

Οι πρωτεΐνες είναι ευμετάβλητες δομές που εξαρτώνται από τις αλληλεπιδράσεις μέσα στην πρωτεϊνική αλυσίδα και από τις αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Αλλαγές σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και η πίεση, επηρεάζουν τη ισορροπία των ενδομοριακών και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων προκαλώντας το ξετύλιγμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (μετουσίωση) (Hendrickx et al., 1998).

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες δρουν ως καταλύτες σε βιολογικές αντιδράσεις και παρουσιάζουν μεγάλη εκλεκτικότητα ως προς την αντίδραση στην οποία συμμετέχουν. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση θα πρέπει το υπόστρωμα να προσδεθεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Shuler et al., 2005). Μικρές αλλαγές στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου του ενζύμου είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε μεταβολή της ενζυμικής δραστηριότητας. Η επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας μπορεί να μεταβάλει τη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου των ενζύμων προκαλώντας αντιστρεπτή ή μη αντιστρεπτή ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση.

Οι δομικές αλλαγές που πραγματοποιούνται κατά την εφαρμογή πίεσης διέπονται από την αρχή του «Le Chatelier» σύμφωνα με την οποία κάθε φαινόμενο που βρίσκεται

σε ισορροπία και συνοδεύεται από μείωση του όγκου (χημική αντίδραση, αλλαγή φάσης, μεταβολή στη διαμόρφωση του μορίου) ευνοείται από την πίεση, ενώ φαινόμενα που οδηγούν σε αύξηση του όγκου παρεμποδίζονται από την αύξηση της πίεσης.

Η ΥΥΠ δεν επηρεάζει τους ομοιοπολικούς δεσμούς, οπότε η πρωτοταγής δομή του ενζύμου παραμένει αμετάβλητη. Οι α-έλικες και τα β-πτυχωτά φύλλα, τα οποία αποτελούν τη δευτεροταγή δομή των ενζύμων και σχηματίζονται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων ενός τμήματος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας είναι ανθεκτικά στην πίεση. Οι δεσμοί υδρογόνου και κατά συνέπεια η δευτεροταγής δομή καταστρέφονται σε πιέσεις μεγαλύτερες από 700 MPa. Η τριτοταγής δομή επηρεάζεται από την εφαρμογή πίεσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η τροποποίηση των υδρόφοβων και ιοντικών αλληλεπιδράσεων που διατηρούν την τριτοταγή δομή οδηγεί στην ενυδάτωση του ενζυμικού μορίου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα το ξεδίπλωμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (*Boonyaratanakornkit et al., 2002*). Στην τεταρτοταγή δομή των ενζύμων (καθορίζεται από τον τρόπο που οι υπομονάδες που αποτελούν την πρωτεΐνη συνδυάζονται μεταξύ τους) οι αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί είναι ίδιοι με αυτούς της τριτοταγούς δομής και εξαρτώνται από την εφαρμογή της πίεσης. Οι υπομονάδες των ενζύμων διαχωρίζονται σε πιέσεις έως 200 MPa, ενώ σε μεγαλύτερες πιέσεις ξεδιπλώνονται και η τεταρτοταγής δομή των ενζύμων καταστρέφεται (*Mozhaev et al., 1994*).

Ανάμεσα στα ένζυμα που συνδέονται με την ποιότητα των τροφίμων τα σημαντικότερα για τους φρουτοχυμούς είναι:

- ✓ η πολυφαινολοξειδάση (PPO), η οποία είναι υπεύθυνη για το ενζυμικό μαύρισμα,
- ✓ η πηκτινομεθυλεστεράση (PME), η οποία επηρεάζει την υφή των χυμών, γιατί αποσταθεροποιεί την αιώρηση των σωματιδίων που σχηματίζουν τα μικκύλια της πηκτίνης στο χυμό με αποτέλεσμα να διαχωρίζεται η πούλπα από το καθαρό υγρό,
- ✓ η περοξειδάση (POD), η οποία αυξάνει την παραγωγή μη επιθυμητών οσμών.

Έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικές με την ανθεκτικότητα των παραπάνω ενζύμων στις υψηλές υδροστατικές πιέσεις.

Για την πηκτινομεθυλεστεράση βρέθηκε ότι η επεξεργασία της σε πίεση μικρότερη των 500 MPa και θερμοκρασία περιβάλλοντος δεν επηρεάζει την ενεργότητα της (Cano et al., 1997; Nienaber and Shellhammer, 2001). Αντίθετα, σε πιέσεις 600-700 MPa σε συνδυασμό με ήπια θέρμανση (50-60°C) το ένζυμο απενεργοποιείται (Nienaber and Shellhammer, 2001; Polydera et al., 2004, Sampedro et al., 2008). Μάλιστα, οι Igual et al. (2013) σε έρευνα που αφορούσε την ωσμωαφυδατωμένη μαρμελάδα από γκρέιπφρουτ διαπίστωσαν ότι η ενεργότητα της PME μειώνεται κατά 80% μετά από επεξεργασία με ΥΥΠ στα 700 MPa και θερμοκρασία 65°C και 75°C σε χρόνους 20 min και 12,5 min, αντίστοιχα. Γενικά, βέβαια η σταθερότητα της PME εξαρτάται από το είδος του επεξεργαζόμενου φρούτου, από την ποικιλία στην οποία ανήκει και την περίοδο συγκομιδής του (Igual et al., 2013).

Για την απενεργοποίηση της περοξειδάσης, η οποία είναι υπεύθυνη για την οξείδωση πολλών ουσιών που βρίσκονται στα τρόφιμα κυρίως αρωματικών ενώσεων αλλοιώνοντας τη γεύση, έχουν επίσης γίνει αρκετές έρευνες. Έχει αποδειχτεί ότι είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στην πίεση και απενεργοποιείται πιο δύσκολα από την PME, αφού με εφαρμογή πίεσης 400 MPa παρατηρείται αυξημένος ρυθμός δράσης. Όμως, με εφαρμογή ΥΥΠ και παράλληλη ήπια θέρμανση απενεργοποιείται μερικώς. Οι Cano et al. (1997), για παράδειγμα πέτυχαν 25% απενεργοποίηση του ενζύμου στη φράουλα με συνθήκες 230 MPa για 15 min στους 43°C και 50% απενεργοποίηση στο χυμό πορτοκαλιού με πίεση 400 MPa για 15 min στους 32°C. Γενικά, η ενεργότητα της POD εξαρτάται από το pH και σε υψηλές τιμές pH εμφανίζει αυξημένη ενεργότητα.

Η πολυφαινολοξειδάση είναι υπεύθυνη για το ενζυμικό μαύρισμα, τις ανεπιθύμητες οσμές και την αλλοίωση θρεπτικών συστατικών. Έρευνες έχουν δείξει ότι η PPO που περιέχεται στο σταφύλι, τη φράουλα και το βερίκοκο απενεργοποιείται με εφαρμογή πιέσεων που ξεπερνούν τα 100, 400 και 600 MPa, αντίστοιχα (Gomes et al., 1996; Eshtiaghi, 1994; Weemaes, 1997). Σε μελέτη των Eisenmenger et al. (2009) η ενεργότητα της PPO του μανιταριού αυξήθηκε κατά 140% με επεξεργασία στα 400 MPa για 10 min, ενώ για τον ίδιο χρόνο και πίεση 800 MPa η σχετική της ενεργότητα ήταν 60%. Η PPO που περιέχεται στο μήλο απενεργοποιείται σε πιέσεις 100-700 MPa και έχει αποδειχτεί ότι εξαρτάται από το pH. Πέρα από το pH, η απενεργοποίηση της PPO εξαρτάται από την παρουσία αλάτων, σακχάρων και άλλων

συστατικών. Για παράδειγμα, η απενεργοποίηση της στο μήλο με εφαρμογή ΥΥΠ ενισχύεται εάν προστεθεί χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2) (Jolibert et al., 1994). Τέλος, έρευνα που έγινε στο αβοκάντο απέδειξε ότι η PPO απενεργοποιείται σε πίεση 800-900 MPa και θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ αντίθετα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν η πίεση ήταν κοντά στα 250 MPa και η θερμοκρασία ξεπερνούσε τους $62,5^\circ\text{C}$, γιατί οι ενέργειες ενεργοποίησης αυξήθηκαν λόγω αύξησης της πίεσης (Weemaes, 1997).

2.2.2.4.3 Επίδραση στα θρεπτικά συστατικά και την ποιότητα

Η αμελητέα επίδραση της ΥΥΠ στους ομοιοπολικούς δεσμούς έχει σαν αποτέλεσμα τα χαμηλού μοριακού βάρους μόρια, όπως οι παράγοντες που επηρεάζουν το άρωμα, το χρώμα και οι βιταμίνες να διατηρούνται σε σχέση με τη θερμική επεξεργασία.

Οι Baxter et al. (2005) διεξήγαγαν έρευνα για τη μελέτη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και των αρωματικών ενώσεων σε χυμό πορτοκαλιού επεξεργασμένο με ΥΥΠ και θερμική παστερίωση, ο οποίος αποθηκεύτηκε για 12 εβδομάδες στους 4°C και 10°C . Στην έρευνα συμμετείχαν 10 εκπαιδευμένοι δοκιμαστές και 30-40 απλοί καταναλωτές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όσον αφορά το χρώμα οι δοκιμαστές δεν παρατήρησαν καμία διαφορά σε όλη τη διάρκεια αποθήκευσης, ενώ η γλυκύτητα και το άρωμα του χυμού μειώθηκαν. Στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου οι καταναλωτές δεν κατάφεραν να διακρίνουν το ανεπεξέργαστο δείγμα από τα θερμικά επεξεργασμένα και με ΥΥΠ, τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 4°C , ενώ τα θερμικά επεξεργασμένα δείγματα στους 10°C κρίθηκαν μη αποδεκτά και αυτά με ΥΥΠ είχαν πολλή χαμηλή βαθμολογία. Επιπλέον, μετρήσεις των αρωματικών ενώσεων έδειξαν μείωση της συγκέντρωσης αυτών. Αυτό οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως η συσκευασία και οι αντιδράσεις οξειδωσης, υδρόλυσης και όξινης κατάλυσης.

Σχετικά με τη βιταμίνη C, που είναι πολύ σημαντική για το χυμό του πορτοκαλιού παρατηρήθηκε μείωση της κατά 10% με συνδυασμένη θερμική και ΥΥΠ επεξεργασία (400 MPa για 1 min στους 40°C ή 100 MPa για 5 min στους 60°C), ενώ σε θερμοκρασία 30°C δεν υπήρξε μείωση (Sanchez-Moreno et al., 2003b, 2005; Plaza et al., 2006).

Σύμφωνα με μελέτες που έγιναν σε χυμό πορτοκαλιού, ο οποίος είχε υποστεί ΥΥΠ σε διάφορες συνθήκες πίεσης και χρόνους επεξεργασίας δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή των καροτενοειδών μετά από αποθήκευση 15 ημερών στους 4°C. Αντίθετα, μετά από αποθήκευση 30 ημερών στο ανεπεξέργαστο δείγμα παρατηρήθηκε μείωση 17% και στο δείγμα που είχε υποστεί πίεση 50 MPa τα καροτενοειδή μειώθηκαν κατά 42%, ενώ το δείγμα των 350 MPa παρουσίασε αύξηση 72% σε σχέση με το φρεσκοστυμένο χυμό. Για τον ίδιο χρόνο αποθήκευσης αυξάνοντας το χρόνο επεξεργασίας παρατηρήθηκε αύξηση έως και 100% σε χρόνο 15 min. Τέλος, με αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρήθηκε μείωση των καροτενοειδών (*de Ancos et al., 2002; Sanchez-Moreno et al., 2003a*).

Τα φλαβονοειδή και συγκεκριμένα οι φλαβανόνες (εσπεριδίνη, ναριγκινίνη), οι οποίες περιέχονται στον πορτοκαλοχυμό παρατηρήθηκε ότι αυξάνονται κατά 13% η ναριγκινίνη και κατά 34% η εσπεριδίνη με εφαρμογή πίεσης 350 MPa, ενώ 12 και 22% αντίστοιχα με πίεση 400 MPa. Αντίθετα, με εφαρμογή θερμικής παστερίωσης η περιεκτικότητα της ναριγκινίνης μειώνεται κατά 16%, ενώ η εσπεριδίνη παραμένει σταθερή (*Sanchez-Moreno et al., 2003a*).

2.2.2.5 Τα πλεονεκτήματα της ΥΥΠ

- Επειδή οι υψηλές υδροστατικές πιέσεις μεταφέρονται στιγμιαία και ομοιόμορφα προς όλες τις κατευθύνσεις στο συσκευασμένο τρόφιμο, είναι ανεξάρτητες από το μέγεθος και το σχήμα του προϊόντος,
- Ελαχιστοποιούν το χρόνο επεξεργασίας του τροφίμου σε σχέση με τη θέρμανση,
- Δεν καταστρέφονται οι ομοιοπολικοί δεσμοί των χημικών ενώσεων, οπότε δεν πραγματοποιούνται αντιδράσεις Maillard, δεν καταστρέφονται τα μικρού μοριακού βάρους μόρια και το τρόφιμο διατηρεί τα θρεπτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του,
- Εξοικονομείται ενέργεια, διότι η ΥΥΠ πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή ψύξη ή σε συνδυασμό με ήπια θέρμανση,
- Δεν είναι απαραίτητη η χρήση συντηρητικών για τη συντήρηση του τροφίμου (*Μπλούκας, 2004*).

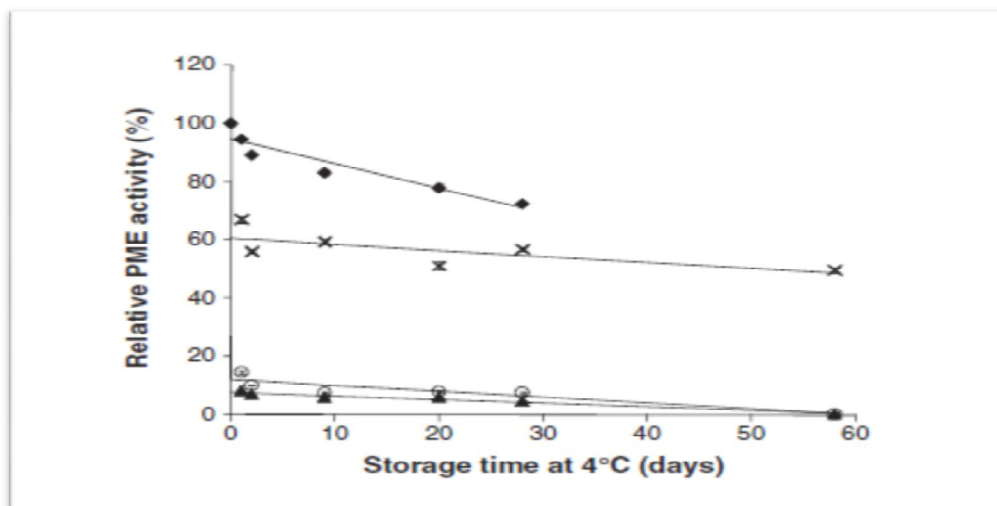
2.3 Σύγκριση της επίδρασης της θερμικής παστερίωσης, της Υπερυψηλής Πίεσης και των παλλόμενων ηλεκτρικών πεδίων (PEF) σε χημικές, βιοχημικές και ποιοτικές παραμέτρους του χυμού πορτοκαλιού

Παραδοσιακά στη βιομηχανία παραγωγής πορτοκαλοχυμού πραγματοποιείται παστερίωση μέσω θερμικών μεθόδων, οι οποίες είναι πολύ αποτελεσματικές, γιατί επιτυγχάνουν ταυτόχρονη μείωση του μικροβιακού φορτίου και απενεργοποίηση της πηκτινομεθυλεστεράσης (PME), η οποία ευθύνεται για τη θολερότητα του χυμού και χαρακτηρίζεται από υψηλή θερμοανθεκτικότητα. Τα τελευταία χρόνια, όμως αναζητούνται νέες μη θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας, ώστε να παράγεται προϊόν καλύτερης ποιότητας σε σχέση με αυτό που παρέχουν οι θερμικές μέθοδοι, το οποίο να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις των καταναλωτών για φρέσκα και υγιεινά τρόφιμα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η τεχνολογία της ΥΥΠ και των PEF έχει εφαρμοστεί στο χυμό του πορτοκαλιού και στην παράγραφο αυτή θα δοθούν συγκριτικά αποτελέσματα των τριών διεργασιών σχετικά με την επίδραση τους στα συστατικά του χυμού.

Όσον αφορά την πηκτινομεθυλεστεράση (PME), η απενεργοποίηση της οποίας είναι ενδεικτική για τη σωστή παστερίωση του πορτοκαλοχυμού είναι γνωστό ότι απενεργοποιείται πλήρως κάτω από τις συνθήκες θερμικής παστερίωσης που εφαρμόζονται στη βιομηχανία (92°C για 30 s). Εξαιτίας, όμως των αρνητικών επιπτώσεων στα θρεπτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά έγιναν έρευνες για τη θερμική παστερίωση του πορτοκαλοχυμού και σε λιγότερο έντονες συνθήκες. Με θέρμανση στους 72°C για 2 s η ενεργότητα της PME μειώθηκε στο 85% της αρχικής (Vervoot *et al.*, 2011), ενώ σε θερμοκρασία 80°C για 60 s παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας κατά 95% (Polydera C. A., *et al.*, 2005). Η επεξεργασία πορτοκαλοχυμού με ΥΥΠ απαιτεί αρκετά υψηλές πιέσεις, λόγω της ανθεκτικότητας του ενζύμου στην πίεση. Εφαρμογή πίεσης 600 MPa για 1 min (αρχική θερμοκρασία χυμού 5°C) επιφέρει μείωση της ενεργότητας στο 92% της αρχικής, η οποία δεν είναι εμπορικά αποδεκτή (Vervoot *et al.*, 2011). Αντίθετα, με εφαρμογή της ίδιας πίεσης και παράλληλη αύξηση του χρόνου επεξεργασίας στα 4 min και της θερμοκρασίας στους 40°C η PME απενεργοποιείται πλήρως (σχετική ενεργότητα 7%) (Polydera C. A., *et*

al., 2005). Το παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο δεν απενεργοποιεί πλήρως την PME, εφόσον σύμφωνα με τους Vervoot et al. (2011), οι οποίοι εφάρμοσαν μονοπολικό παλμό τάσης 23 kV/cm για 2 μs και η ενεργότητα μειώθηκε μόνο κατά 34%, ενώ κατά τους Van Loey et al., (2002) δε μειώνεται περισσότερο από 10%.

Η σχετική ενεργότητα της PME στα ανεπεξέργαστα και επεξεργασμένα δείγματα με θερμική παστερίωση, ΥΥΠ (600 MPa για 1 min) και PEF (μονοπολικός παλμός τάσης 23 kV/cm για 2 μs) φαίνεται στο Διάγραμμα 2-1.



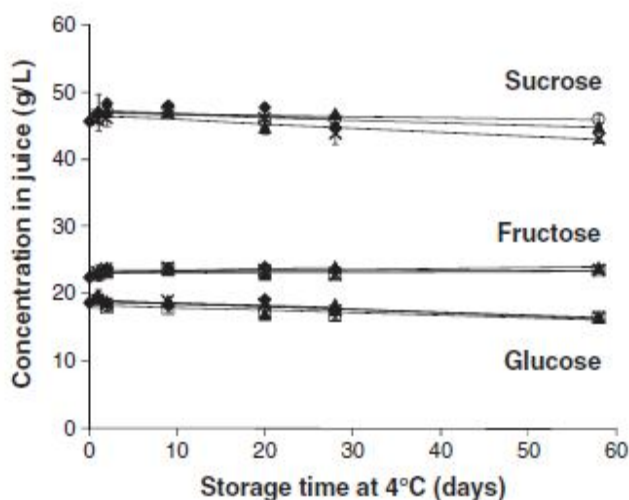
Διάγραμμα 2-1: Σχετική ενεργότητα της PME σε ανεπεξέργαστα (♦), θερμικά (○), ΥΥΠ (▲), PEF(x) παστεριωμένα δείγματα πορτοκαλοχυμού κατά την αποθήκευση τους στους 4 °C (Vervoot et al., 2011).

Η περοξειδάση (POD), η οποία είναι υπεύθυνη για την υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών απενεργοποιήθηκε πλήρως μετά τη θερμική επεξεργασία (72°C, 2 s). Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη γενική αντίληψη ότι είναι ένα πολύ θερμοανθεκτικό ένζυμο, αλλά στην περίπτωση του πορτοκαλοχυμού σημαντικό ρόλο στην απενεργοποίηση της παίζει το χαμηλό pH, το οποίο την καθιστά πιο θερμοευαίσθητη. Το PEF (μονοπολικός παλμός τάσης 23 kV/cm για 2 μs) είχε στην POD ανάλογα αποτελέσματα με την PME, καθώς μείωσε την ενεργότητα της κατά 30%. Το αποτέλεσμα αυτό διαφέρει σε σχέση με άλλες μελέτες, όπου επιτυγχάνεται μεγαλύτερη μείωση λόγω των μεγαλύτερων χρόνων επεξεργασίας και των υψηλότερων συχνοτήτων (Elez-Martínez et al., 2006).

Τέλος, η τεχνολογία της ΥΥΠ (600 MPa για 1 min) απέτυχε να απενεργοποιήσει το ένζυμο, εφόσον διατήρησε κατά 90% την αρχική του δραστηριότητα. Αυτό οδηγεί στο

συμπέρασμα ότι απαιτούνταν περισσότερος χρόνος επεξεργασίας, το οποίο αποδεικνύεται στη μελέτη των Hendrickx et al. (1998), που έδειξε ότι με εφαρμογή πίεσης 400 MPa για 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος η POD μειώθηκε σημαντικά, ενώ η μέγιστη απενεργοποίηση (50%) παρατηρήθηκε για την ίδια πίεση και τον ίδιο χρόνο επεξεργασίας σε θερμοκρασία 32°C.

Τα σάκχαρα αποτελούν περίπου το 80% των διαλυτών στερεών του χυμού και του δίνουν τη γλυκιά γεύση που έχει. Τα κυριότερα σάκχαρα που περιέχει ο χυμός του πορτοκαλιού είναι η γλυκόζη, η σακχαρόζη και η φρουκτόζη σε αναλογία 1:2:1. Στη συγκέντρωση των σακχάρων έρευνες έχουν αποδείξει ότι καμία από τις τρεις μεθόδους επεξεργασίας δεν επιφέρει σημαντική επίδραση (Vervoot et al., 2011; Parish E. M., 1998). Οι Vervoot et al. (2011) αναφέρουν μια μικρή μείωση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης στα θερμικά και με PEF επεξεργασμένα δείγματα κατά την αποθήκευση του χυμού, ενώ στα δείγματα και των τριών μεθόδων παρουσιάζεται μείωση της γλυκόζης. Στο διάγραμμα 2-2 απεικονίζονται τα αποτελέσματα των Vervoot et al. (2011).



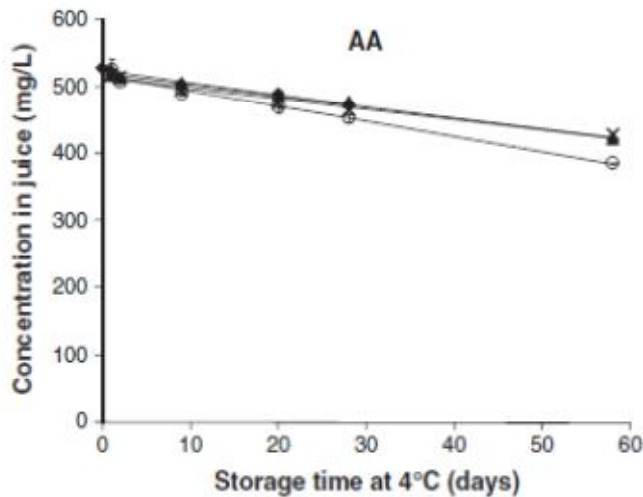
Διάγραμμα 2-2: Συγκέντρωση των σακχάρων σε ανεπεξέργαστα (◆), θερμικά (○), ΥΥΠ (▲), PEF(x) παστεριωμένα δείγματα πορτοκαλοχυμού κατά την αποθήκευση τους στους 4 °C (Vervoot et al., 2011).

Τα οργανικά οξέα, τα οποία είναι εξίσου σημαντικά με τα σάκχαρα συνδέονται άμεσα με τη γεύση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του χυμού και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους μπορεί να προσδιορίσει τις μικροβιολογικές αλλαγές που

πραγματοποιούνται στο χυμό κατά την αποθήκευση. Το κιτρικό και το μηλικό οξύ είναι τα κυριότερα οργανικά οξέα του χυμού. Γενικά, καμία από τις μεθόδους επεξεργασίας δεν επηρεάζει ιδιαίτερα αυτά τα οξέα, πέρα από μια μικρή αύξηση του κιτρικού οξέος που παρατηρείται με την ΥΥΠ.

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο η πικρή γεύση του πορτοκαλοχυμού οφείλεται στα φλαβονοειδή και τα λιμονοειδή. Η θερμική επεξεργασία του πορτοκαλοχυμού δεν επιδρά στη συγκέντρωση των φλαβονοειδών, ενώ αυξάνει τη λιμονίνη (λιμονοειδή) (85°C, 45 s). Αυτό οφείλεται στο ένζυμο υδρολάση της D-λακτόνης, το οποίο λόγω της θερμοανθεκτικότητας του κατά τη θερμική παστερίωση λόγω της υψηλής θερμοκρασίας παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα, αυξάνοντας σημαντικά το ρυθμό παραγωγής της λιμονίνης. Κατά την επεξεργασία με ΥΥΠ (400 MPa, 3 min) δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές των φλαβονοειδών και των λιμονοειδών (*Uckoo et al., 2012*).

Η βιταμίνη C είναι ίσως ο κυριότερος λόγος κατανάλωσης του πορτοκαλοχυμού από τον άνθρωπο, καθώς έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και ενδυναμώνει το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα. Η βιταμίνη C είναι θερμοευαίσθητη και καταστρέφεται κατά τις θερμικές επεξεργασίες. Επιπλέον, κατά την αποθήκευση της οξειδώνεται αντιστρεπτά σε διυδροασκορβικό οξύ (DHAA). Ανάμεσα στις τρεις μεθόδους επεξεργασίας η περισσότερο καταστρεπτική για τη βιταμίνη C είναι η θερμική σε σχέση με την ΥΥΠ και το PEF. Μάλιστα, ο επεξεργασμένος με ΥΥΠ πορτοκαλοχυμός εμφανίζει σημαντική αύξηση της διατηρησιμότητας του λόγω του μειωμένου ρυθμού οξείδωσης της βιταμίνης C που παρουσιάζει. Για παράδειγμα, η διάρκεια διατήρησης χυμού ΥΥΠ στους 0°C αυξήθηκε κατά 112% σε σχέση με τον θερμικά παστεριωμένο χυμό (*Polydera et al., 2005*).



Διάγραμμα 2-3: Συγκέντρωση της βιταμίνης C σε ανεπεξέργαστα (◆), θερμικά (○), ΥΥΠ (▲), PEF(x) παστεριωμένα δείγματα πορτοκαλοχυμού κατά την αποθήκευση τους στους 4 °C (Vervoot et al., 2011).

Τα καροτενοειδή είναι, επίσης πολύ σημαντικά για την ποιότητα του χυμού, εφόσον καθορίζουν το χρώμα του και με δεδομένο ότι το πορτοκάλι ως φρούτο περιέχει τα περισσότερα καροτενοειδή. Κατά την ήπια θέρμανση του πορτοκαλοχυμού στους 72°C για 20 s δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στη συγκέντρωση των καροτενοειδών, ενώ στον ίδιο χρόνο επεξεργασίας και θερμοκρασία 90°C η συγκέντρωσή τους μειώθηκε κατά 12,6% (Vervoot et al., 2011; Cortes et al., 2006). Κατά την επεξεργασία με PEF τάσης 23-25 kV/cm δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στη σύσταση των καροτενοειδών, ενώ αυξάνοντας την τάση στα 35 και 40 kV/cm παρατηρήθηκε μείωση της τάξης του 6-7%. Τέλος, ο πορτοκαλοχυμός που υπέστη ΥΥΠ 600 MPa για 1 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος δεν παρουσίασε μεταβολή της συγκέντρωσης των καροτενοειδών, ενώ για τον ίδιο χρόνο επεξεργασίας με εφαρμογή πίεσης 400 MPa και θερμοκρασία 40°C παρουσιάστηκε αύξηση των καροτενοειδών (Vervoot et al., 2011; Cortes et al., 2006; Plaza et al., 2011).

2.4 Επεξεργασία χυμού από πορτοκάλια ποικιλίας Navel

Τα πορτοκάλια ποικιλίας Navel είναι πολύ διαδεδομένα ως φαγώσιμα πορτοκάλια, κυρίως, γιατί έχουν ευχάριστη γεύση και η λεπτή τους φλούδα τα καθιστά εύκολα στο ξεφλούδισμα. Ο χυμός από τα πορτοκάλια ποικιλίας Navel είναι αρκετά πικρός σε

σχέση με τα πορτοκάλια Valencia, γεγονός που οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα των πορτοκαλιών Navel σε λιμονίνη (1,5 ppm) σε σχέση με τα πορτοκάλια Valencia. Η διαφορά στη συγκέντρωση της λιμονίνης εξαρτάται εκτός από την ποικιλία στην οποία ανήκει το φρούτο και από το βαθμό ωρίμανσης, από την εποχή καλλιέργειας και συγκομιδής. Είναι χαρακτηριστικό ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός ωρίμανσης του πορτοκαλιού, τόσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση της λιμονικής λακτόνης A-δακτυλίου, της ένωσης από την οποία παράγεται η λιμονίνη. Επιπλέον, πολύ σημαντική είναι και η προέλευση των εσπεριδοειδών για τη συγκέντρωση της λιμονίνης στο πορτοκάλι. Περιοχές με ήπιο κλίμα, όπως η Καλιφόρνια, η Ισπανία, η Αυστραλία και η Ελλάδα αντιμετωπίζουν εντονότερα το πρόβλημα της πικρής γεύσης σε σχέση με χώρες που έχουν τροπικό ή υποτροπικό κλίμα, όπως η Βραζιλία και η Φλόριντα. Αυτός είναι και ένας λόγος διαφοράς των πορτοκαλιών Navel από τα πορτοκάλια Valencia, γιατί τα πρώτα ευδοκιμούν σε χώρες με ήπιο κλίμα και τα δεύτερα σε πιο τροπικά κλίματα. Ο δεύτερος λόγος διαφοροποίησης των δύο ποικιλιών είναι η περίοδος συγκομιδής, αφού τα πορτοκάλια Navel συλλέγονται από τον Ιούνιο μέχρι τον Οκτώβριο, ενώ τα πορτοκάλια Valencia από το Μάρτιο μέχρι τον Ιούνιο, όπου οι καιρικές συνθήκες στη δεύτερη περίπτωση είναι πολύ καλύτερες. Παρόλα αυτά, μετά την είσοδο των μεθόδων αποπίκρασης στη βιομηχανία τα πορτοκάλια Navel χρησιμοποιούνται ευρέως στη χυμοποίηση (200.000-300.000 τόνοι ετησίως).

Η κυριότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται σήμερα στη βιομηχανία για την αποπίκραση του πορτοκαλοχυμού είναι οι πορώδεις απορροφητικές ρητίνες στις οποίες απορροφώνται τα πικρά συστατικά του χυμού. Η μέθοδος αυτή είναι αποτελεσματική και οδηγεί στη δημιουργία ενός προϊόντος καταναλωτικά αποδεκτό. Παρόλα αυτά, έρευνες έχουν αποδείξει ότι αυτή η μέθοδος αποπίκρασης οδηγεί στη μείωση βιοενεργών συστατικών (λιμονοειδή, φλαβονοειδή, καροτενοειδή, οργανικά οξέα) τα οποία είναι πολύ σημαντικά για την υγεία του ανθρώπου. Οι Kola et al. (2010) αναφέρουν μείωση της βιταμίνης C κατά 27% με χρήση ρητίνων ιοντοεναλλαγής και 17% με χρήση απορροφητικών ρητίνων. Παράλληλα, παρατηρείται μείωση και των φλαβονοειδών, με αποτέλεσμα τη γενική μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του χυμού. Τα παραπάνω οδήγησαν στην ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών μεθόδων αποπίκρασης. Για αυτό το λόγο έχουν μελετηθεί

χημικές και φυσικές διεργασίες διαχωρισμού, η ανάμιξη του πικρού χυμού με μη πικρό χυμό και σάκχαρα και η χρήση ενζύμων. Η έρευνα της αποπίκρασης των χυμών εσπεριδοειδών έχει επικεντρωθεί στη χρήση ενζύμων και αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα η αποπίκραση του χυμού γκρέιπφρουτ με χρήση του ενζύμου ναριγκινάση.

Η πικρή γεύση του γκρέιπφρουτ και του χυμού του οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα της φλαβονόνης ναριγκινίνη, η οποία διασπάται από το ένζυμο ναριγκινάση. Τα εμπορικά διαθέσιμα ενζυμικά παρασκευάσματα ναριγκινάσης περιέχουν α-ραμνοσιδάση και β-γλουκοζιδάση. Αρχικά, η ναριγκινίνη υδρολύεται σε προυνίνη και ραμνόζη καταλυόμενη από την α-ραμνοσιδάση και στη συνέχεια η προυνίνη μεταβολίζεται σε ναριγκενίνη και γλυκόζη από τη β-γλουκοζιδάση. Η εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα των δύο ενζύμων επιφέρει αμελητέα αλλαγή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του χυμού και για αυτό το λόγο προτιμάται έναντι της αποπίκρασης με χρήση ρητίνων. Συγκριτικά αποτελέσματα, των δύο μεθόδων παρουσιάζουν μείωση της πικρής γεύσης κατά 46,8% με χρήση της ναριγκινάσης έναντι 64,5% με χρήση ρητίνων, ποσοστά τα οποία είναι αποδεκτά από τους καταναλωτές. Επιπλέον, στην ενζυμική αποπίκραση παρουσιάζεται αύξηση των φαινολικών ενώσεων (78%) από ότι στην αποπίκραση με ρητίνες (μείωση 21%) (Cavia-Saiz M. et al., 2011), οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για την ποιότητα του χυμού. Μετά την επίτευξη της ενζυμικής αποπίκρασης του χυμού γκρέιπφρουτ ενισχύεται η έρευνα πάνω στην αποπίκραση των χυμών εσπεριδοειδών με χρήση ενζύμων. Η ενζυμική αποπίκραση των χυμών εσπεριδοειδών με στόχο τη μείωση της συγκέντρωσης λιμονίνης, μεταξύ αυτών και του χυμού από πορτοκάλια ποικιλίας Navel, μπορεί να γίνει με τη δράση των ενζύμων γλυκοζυλοτρανφεράση και λιμονική αφυδρογονάση, τα οποία μετατρέπουν την πικρή λιμονίνη σε μη-πικρές ουσίες. Η μέθοδος αυτή αναλύεται στο επόμενο κεφάλαιο.

Βιβλιογραφία 2^ο κεφαλαίου

- Baxter I. A., Easton K., Schneebeli K., Whitfield F. B., 2005, *High pressure processing of Australian navel orange juices: sensory analysis and volatile flavor profiling*, *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.*, 6, 372-387.
- Cano M. P., Hernandez A., Des Ancos B., 1997, *High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products*, *J. Food Sci*, 62, 85-88.
- Cavia-Saiz M., Mupiz P., Ortega N., Busto D. M., 2011, *Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin*, *Food Chemistry* 125, 158–163.
- Chen P., Deng S., Cheng Y., Lin X., Metzger L., Ruan R., 2010, *Non-thermal food pasteurization processes: an introduction*, *Case studies in novel food processing technologies innovation in processing, packaging and predictive modeling*, ed. Doona J. C., Kustin K., Feeherry F. E., pp 1-13.
- Cortes C., Esteve J. M., Rodrigo D., Torregrosa F., Frigola A., 2006, *Changes of colour and carotenoids contents during high intensity pulsed electric field treatment in orange juices*, *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1932–1939.
- Darvishi H., Hadi Khostaghaza M., Najafi G., 2012, *Ohmic heating of pomegranate juice: Electrical conductivity and pH change*, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.
- Des Ancos B., Sgroppo S., Plaza L., Cano P., 2002, *Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment*, *J. Sci. Food Agric.*, 82, 790-796.
- Eisenmenger J. M., Reyes-De-Corcuera I. J., 2009, *High pressure enhancement of enzymes: A review*, *Enzyme and Microbial Technology* 45, 331–347.
- Elez-Martínez P., Sobrino-López A., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O., 2012, *Pulsed Electric Field Processing of Fluid Foods, Novel Thermal and Non Thermal Technologies for Fluid Foods*, Ed. Steve L. Taylor, USA, pp 63-108.
- Elez-Martínez P., Soliva-Fortuny R. C., Martín-Belloso O. 2006, *Comparative study on shelf life of orange juice processed by high intensity pulsed electric fields or heat treatment*. *European Food Research and Technology*, 222, 321–329.

- Eshtiaghi, M.N., Stute, R., Knorr, D., 1994, *High Pressure and Freezing Pretreatment Effects on Drying, Rehydration, Texture and Color of Green Beans, Carrots and Potatoes*, *J. Food Sci.*, 59, 1168-1169.
- Gomes, M.R.A., Ledward, D.A., 1996, *Effect of High Pressure Treatments on the Activity of Some Polyphenoloxidases*, *Food Chem.* 56, 1-5.
- 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, 197-203.
- Igual M., Sampedro F., Martinez-Navarrete N., Fan X, 2013, *Combined osmodehydration and high pressure processing on the enzyme stability and antioxidant capacity of a grapefruit jam*, *Journal of food engineering*, 114, 514-521.
- Jakob A., Bryjak J., Wojtowicz H., Illeova V., Annus J., Polakovic M., 2010, *Inactivation kinetics of food enzymes during ohmic heating*, *Food Chemistry*, 123, 369-376.
- Jolibert, F., Tonello, C., Sagegh, P., Raymond, J., 1994, *Les Effets des Hautes Pressions sur la Polyphénol Oxydase des Fruits*, *Bios Boissons*, 251, 27-35.
- Μπλούκας Ι., 2004, «Υψηλές Υδροστατικές Πιέσεις», *Επεξεργασία & Συντήρηση Τροφίμων*, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα, σελ. 387-388, 401-402.
- NC Hyperbaric, <http://www.nchyperbaric.com/index.htm>
- Nienaber U., Shellhammer T. H., 2001, *High-pressure processing of orange juice: kinetics of pectinmethylesterase inactivation*, *J. Food Sci*, 66, 328-331.
- Parish E. M., 1998, *Orange Juice Quality After Treatment by Thermal Pasteurization or Isostatic High Pressure*, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 31, 439-442.
- Plaza L., Sánchez-Moreno C., De Ancos B., Elez-Martínez P., Martín-Belloso O., Pilar Cano M., 2011, *Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization*, *LWT - Food Science and Technology*, 44, 834-839.
- Plaza L., Sanchez-Moreno C., Elez-Martinez P., De Ancos B., Martin-Belloso O., Cano M. P., 2006, *Effect of refrigerated storage on vitamin C and antioxidant activity of orange juice processed by high-pressure or pulsed electric fields with regard to low pasteurization*, *Eur. Food Res. Technol.*, 223, 487-493.

- Polydera A. C., Galanou E., Stoforos N. G., Taoukis P. S., 2004, *Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions*, *J Food Eng*, 62, 291-298.
- Polydera C. A., Stoforos G. N., P. S. Taoukis S. P., 2005, *Quality degradation kinetics of pasteurised and high pressure processed fresh Navel orange juice: Nutritional parameters and shelf life*, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6 (2005) 1 – 9.
- Sampedro F., Rodrigo D., Hendrickx M., 2008, *Inactivation kinetics of pectin methylesterase under combined thermal-high pressure treatment in an orange juice-milk beverage*, *J Food Eng*, 86, 133-139.
- Sanchez-Moreno C., Plaza L., De Ancos B., Cano P., 2003a, *Vitamin C, provitamin A, carotenoids, and other carotenoids in high-pressurized orange juice during refrigerated storage*, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 647-653.
- Sanchez-Moreno C., Plaza L., De Ancos B., Cano P., 2003b, *Effect of high-pressure processing on health-promoting attributes of freshly squeezed orange juice (*Citrus sinensis* L.) during chilled storage*, *Eur. Food Res. Technol.*, 216, 18-22.
- Shuler M., Kargi F., 2005, Ένζυμα, Μηχανική Βιοδιεργασιών Βασικές Έννοιες, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα, σελ. 77-78.
- Uckoo M. R., Jayaprakash K. G., Jeremy A. Somerville A. J., Balasubramaniam, Monica Pinarte V.M., Patil S. B., 2013, *High pressure processing controls microbial growth and minimally alters the levels of health promoting compounds in grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad) juice*, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2012.11.010>, In press.
- Van Loey A., Verachtert B., Hendrickx M., 2001, *Effects of high electric pulses on enzymes*, *Trends in food science and technology*, 12, 94-102.
- Vervoot L., Van der Plancken I., Grauwet T., Timmermans R., Mastwijk H., Matser A., Hendrickx M., Loey A., 2011, *Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters*, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12: 466-477.
- Weemaes, C.A., De Cordt, S.V., Ludikhuyze, L.R., Van den Broeck, I., Hendrickx, M.E., Tobback, P.P., 1997, *Influence of pH, Benzoic Acid, EDTA, and Glutathione*

on the Pressure and/or Temperature Inactivation Kinetics of Mushroom Polyphenoloxidase, Biotechnol. Progr., 13, 25-32.

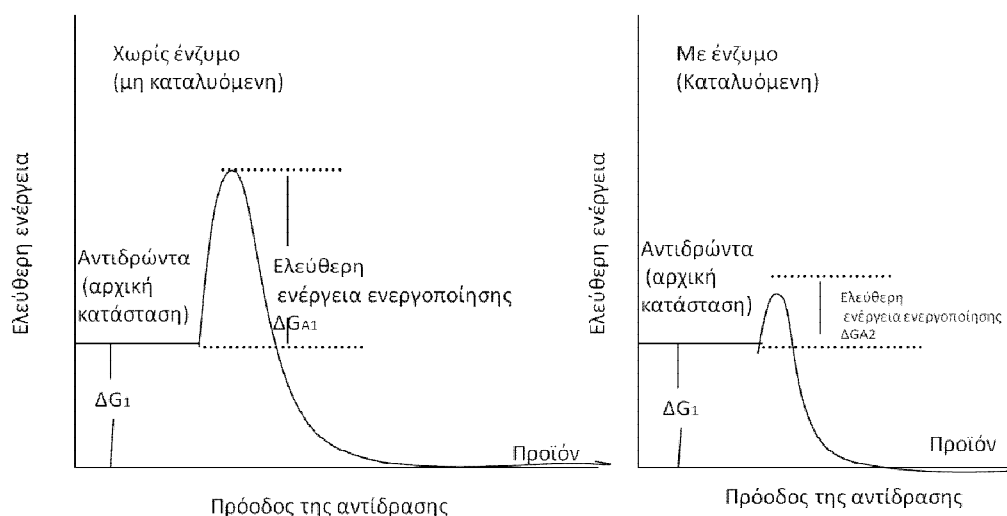
Ταούκης Π., Ωραιοπούλου Β., 2009, *Εναλλακτικές Θερμικές και μη θερμικές Μέθοδοι Επεξεργασίας, Επιστήμη και Μηχανική Διεργασιών Τροφίμων, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα, σελ. 338-350.*

3 ENZYMA ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΧΥΜΟΥ ΤΟΥ

3.1 Εισαγωγή

Τα ένζυμα είναι συνήθως πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους, που κυμαίνεται από 15.000 Da έως και αρκετά δισεκατομμύρια και τα οποία δρουν ως καταλύτες. Έχει αποδειχτεί, επίσης, ότι και κάποια RNA μόρια έχουν καταλυτική δράση, αλλά η πλειονότητα των κυτταρικών δράσεων καταλύεται από πρωτεΐνες. Τα RNA μόρια με καταλυτικές ιδιότητες ονομάζονται ριβοένζυμα (*riboenzymes*).

Τα ένζυμα είναι εξειδικευμένοι, πολύπλευρης χρήσης και πολύ αποτελεσματικοί βιολογικοί καταλύτες, οι οποίοι μάλιστα σε συνθήκες περιβάλλοντος αποδίδουν πολύ μεγαλύτερους ρυθμούς αντίδρασης σε σχέση με τις χημικά καταλυόμενες αντιδράσεις.



Εικόνα 3-1: Οι ενέργειες ενεργοποίησης μιας ενζυμικά καταλυόμενης (δεξιά) και μη καταλυόμενης αντίδρασης (αριστερά) (Shuler L. M., et al.,2005).

Όσον αφορά τη δομή τους, μερικά ένζυμα έχουν απλή δομή, όπως μια διπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα, ενώ πολλά ένζυμα έχουν περισσότερες από μία υπομονάδες. Ορισμένα πρωτεϊνικά ένζυμα για να είναι ενεργά χρειάζονται μια μη πρωτεϊνική ομάδα. Η ομάδα αυτή μπορεί να είναι είτε ένας συμπαράγοντας, για παράδειγμα

κάποιο μεταλλικό ιόν, Mg, Zn, Mn, Fe, είτε κάποιο συνένζυμο, όπως ένα σύνθετο οργανικό μόριο NAD, FAD, CoA, είτε κάποιες βιταμίνες. Το ένζυμο που περιέχει μια μη πρωτεϊνική ομάδα ονομάζεται ολοένζυμο (*holoenzyme*). Το πρωτεϊνικό του μέρος είναι το αποένζυμο (*apoenzyme*). Τα ένζυμα, τα οποία απαντώνται σε αρκετές διαφορετικές μοριακές μορφές, αλλά καταλύουν την ίδια αντίδραση, ονομάζονται ισοένζυμα (*isoenzymes*). Μερικά ένζυμα ομαδοποιούνται και συνθέτουν ενζυμικά σύμπλοκα. Τέλος, τα ένζυμα παρουσιάζουν εξειδίκευση στο υπόστρωμα και ταξινομούνται ανάλογα με το είδος της αντίδρασης που καταλύουν. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι σημαντικότερες ομάδες ενζύμων και οι ιδιότητες τους (Shuler M. et al., 2005).

Πίνακας 3-1: Διεθνής ταξινόμηση των ενζύμων (Shuler M. et al., 2005).

1. Οξειδοαναγωγάσες (οξειδοοξειδοοξειδωτικές αντιδράσεις) (οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις)	3. Υδρολάσες (οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις)
1.1 Δρουν σε $\begin{array}{l} \diagup \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \diagdown \end{array}$	3.1 Εστέρες
1.2 Δρουν σε $\begin{array}{l} \diagup \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagdown \end{array}$	3.2 Γλυκοζιδικόι Δεσμοί
1.3 Δρουν σε $\begin{array}{l} \diagup \\ \text{C}=\text{CH}- \\ \diagdown \end{array}$	3.3 Πεπτιδικόι Δεσμοί
1.4 Δρουν σε $\begin{array}{l} \diagup \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ \diagdown \end{array}$	3.4 Άλλοι C-N δεσμοί
1.5 Δρουν σε $\begin{array}{l} \diagup \\ \text{CH}-\text{NH}- \\ \diagdown \end{array}$	3.5 Όξινοι Ανυδρίτες
1.6 Δρουν σε NADH, NADPH	4. Λυάσες (προσθήκη σε διπλούς δεσμούς)
2. Τρανσφεράσες (Μεταγωγάσες) (Μεταφορά ενεργών ομάδων)	4.1 $\begin{array}{l} \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagdown \end{array}$
2.1 Ομάδες ενός Άνθρακα	4.2 $\begin{array}{l} \diagup \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagdown \end{array}$
2.2 Αλδεϋδομάδες και Κετονομάδες	4.3 $\begin{array}{l} \diagup \\ \text{C}=\text{N}- \\ \diagdown \end{array}$
2.3 Ακυλομάδες	5. Ισομεράσες (αντιδράσεις ισομερισμού)
2.4 Γλυκοζυλομάδες	5.1 Ρακεμάσες
2.5 Φωσφορικές Ομάδες	6. Λιγάσες (σχηματισμός δεσμών με διάσπαση ATP)
2.6 Ομάδες που περιέχουν Θείο	6.1 C-O
	6.2 C-S
	6.3 C-N
	6.4 C-C

3.2 Κινητική των ενζύμων

Η κινητική μιας απλής ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης συχνά αναφέρεται ως κινητική Michaelis-Menten ή κινητική κορεσμού (*saturation kinetics*).

Η γενική εξίσωση της δράσης των ελεύθερων ενζύμων είναι:



όπου: S: υπόστρωμα ενζύμου,

E: ένζυμο,

P: προϊόν ενζυμικής δράσης.

Οι κύριες υποθέσεις είναι:

- i. Υπάρχει μόνο ένα υποστρώμα,
- ii. Το ένζυμο είναι απαλλαγμένο από κάθε άλλη μορφή δραστηριότητας,
- iii. Δεχόμαστε ότι η «συμπληρωματικότητα» της γεωμετρίας ενζύμου και υποστρώματος οδηγεί στο σχηματισμό του ενδιάμεσου συμπλόκου ES με την «πρόσφυση» του υποστρώματος στην αντίστοιχη ενεργό περιοχή του ενζύμου.
- iv. Υπάρχει η παραδοχή ότι η διάσπαση του ES οδηγεί στο σχηματισμό του προϊόντος, χωρίς τη δυνατότητα επανασχηματισμού του ES, γεγονός που εξασφαλίζεται όταν $[P] \ll [S]$.
- v. Δεχόμαστε ότι $[E] \ll [S]$, οπότε και $[ES] \ll [S]$. Δηλαδή, ο σχηματισμός του ES δεν αλλοιώνει σημαντικά τη συγκέντρωση του υποστρώματος S.
- vi. Υπόθεση Briggs-Haldane: Η ταχύτητα σχηματισμού του συμπλόκου ES ισούται με την ταχύτητα εξαφάνισής του. Οπότε,

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \Rightarrow$$

$$[E] = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \frac{[ES]}{[S]} = K_m \frac{[ES]}{[S]} \quad (\text{Εξίσωση 3.1}), \text{ όπου } K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

Και K_m : σταθερά Michaelis-Menten.

Από το ισοζύγιο του ενζύμου και θεωρώντας $[E_T]$ την ολική (αρχική) συγκέντρωση του ενζύμου σε οποιαδήποτε στιγμή της δράσης του θα ισχύει: $[E_T] = [E] + [ES]$.

Λόγω της Εξίσωσης 3.1: $[E_T] = K_m \frac{[ES]}{[S]} + [ES] = [ES] \times \left(\frac{K_m}{[S]} + 1 \right)$

Λύνοντας ως προς $[ES]$: $[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_m + [S]}$ (Εξίσωση 3.2)

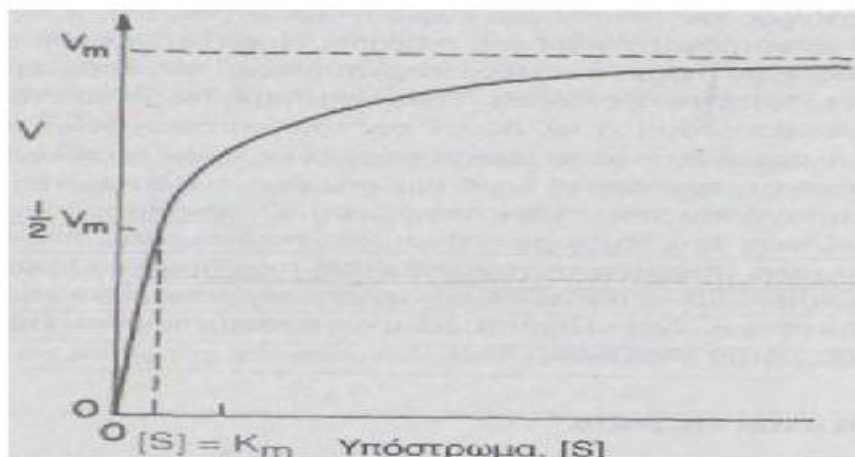
Σύμφωνα με την υπόθεση (iv) η ταχύτητα σχηματισμού του προϊόντος υπολογίζεται: $\frac{dP}{dt} = k_2 \times [ES]$ (Εξίσωση 3.3)

Αντικαθιστώντας την εξίσωση 2 στην 3 προκύπτει: $\frac{dP}{dt} = \frac{k_2[E_T][S]}{K_m + [S]}$ (Εξίσωση 3.4). Το γινόμενο $k_2[E_T]$ αντιπροσωπεύει τη μέγιστη τιμή που μπορεί να πάρει η ταχύτητα σχηματισμού του προϊόντος, V_m .

Επομένως, με βάση τα παραπάνω προκύπτει η εξίσωση Michaelis-Menten:

$$\frac{dP}{dt} = V_m \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

(Κέκος Δ., Καλογεράς Ε., 2010)

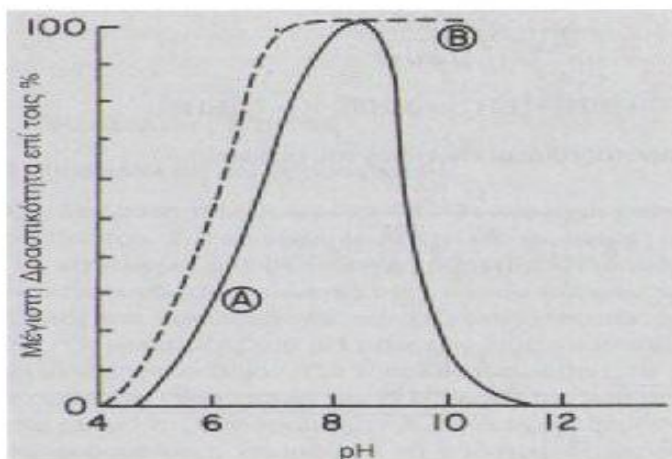


Εικόνα 3-2: Γραφική απεικόνιση Michaelis-Menten (Shuler L. M. et al., 2005).

3.2.1 Επίδραση pH

Ορισμένα ένζυμα περιέχουν ιοντικές ομάδες στα ενεργά τους κέντρα, οι οποίες για να είναι λειτουργικές πρέπει να βρίσκονται σε κατάλληλη μορφή (όξινη ή βασική). Οι μεταβολές του pH του μέσου προκαλούν αλλαγές στην ιοντική μορφή του ενεργού κέντρου και στη δραστηριότητα του ενζύμου, συνεπώς και στο ρυθμό της αντίδρασης. Επιπλέον, οι μεταβολές του pH μεταβάλλουν και την τρισδιάστατη διαμόρφωση του ενζύμου. Τέλος, το pH του μέσου μπορεί να επηρεάσει το μέγιστο ρυθμό της αντίδρασης (V_m), τη σταθερά Michaelis-Menten (K_m) και τη σταθερότητα του ενζύμου. Στην περίπτωση που περιέχει και το υπόστρωμα ιοντικές ομάδες, το pH του μέσου θα επηρεάσει και τη συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος.

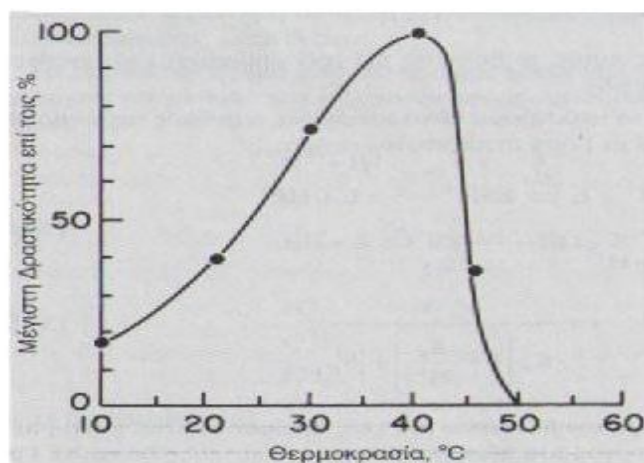
Με βάση τα παραπάνω, κάθε ένζυμο είναι καταλυτικά ενεργό μόνο σε μια στενή περιοχή pH και έχει κατά κανόνα ένα βέλτιστο pH που συχνά βρίσκεται μεταξύ των τιμών pH 5,5 και 7,5 (Belitz H.-D. et al., 2006).



Εικόνα 3-3: Μεταβολή της δραστηκότητας των ενζύμων συναρτήσει του pH (Shuler L. M. et al., 2005).

3.2.2 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά το ρυθμό των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, αυξάνεται και ο ρυθμός της αντίδρασης μέχρι ένα ορισμένο σημείο. Σε θερμοκρασία υψηλότερη από αυτό το σημείο η ενζυμική δραστηκότητα μειώνεται, λόγω μετουσίωσης του ενζύμου. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η μεταβολή του ρυθμού ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσει της θερμοκρασίας.



Εικόνα 3-4: Επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστηκότητα ενός ενζύμου (Shuler L. M. et al., 2005).

Το ανοδικό τμήμα του σχήματος ονομάζεται θερμοκρασιακή ενεργοποίηση (*temperature activation*) και το καθοδικό του τμήμα θερμοκρασιακή απενεργοποίηση ή θερμική μετουσίωση (*temperature inactivation, thermal denaturation*). Στην περιοχή της θερμοκρασιακής ενεργοποίησης ο ρυθμός της αντίδρασης μεταβάλλεται σύμφωνα με την εξίσωση Arrhenius:

$$v = k_2 \times [E] \quad (\text{Εξίσωση 3.5})$$

$$k_2 = k_{2,Tref} \times \exp \left[\frac{-E_a}{R} \times \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (\text{Εξίσωση 3.6})$$

όπου: k_2 : σταθερά της ταχύτητας (min^{-1}) σε θερμοκρασία T (K),

$k_{2,Tref}$: σταθερά της ταχύτητας (min^{-1}) σε θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} (K),

$[E]$: η συγκέντρωση του ενεργού ενζύμου,

E_a : η ενέργεια ενεργοποίησης (J/mol)

R : η παγκόσμια σταθερά των τελείων αερίων (8,314 J/mol K)

Στην περιοχή της θερμικής απενεργοποίησης, η κινητική της θερμικής μετουσίωσης μπορεί να εκφραστεί ως εξής:

$$-\frac{d[E]}{dt} = k_d \times [E]^n \quad (\text{Εξίσωση 3.7})$$

όπου: n η τάξη της αντίδρασης,

k_d η σταθερά μετουσίωσης.

Αν η αντίδραση θεωρηθεί 1^{ης} τάξης ($n=1$), τότε η Εξίσωση 3.7 γίνεται:

$$-\frac{d[E]}{dt} = k_d \times [E] \rightarrow [E] = [E_o] \times \exp(-k_d \times t) \quad (\text{Εξίσωση 3.8})$$

όπου $[E_o]$ η αρχική συγκέντρωση του ενζύμου.

Η σταθερά του ρυθμού μετουσίωσης, k_d μεταβάλλεται με τη θερμοκρασία σύμφωνα με την εξίσωση Arrhenius:

$$k_d = k_{d,Tref} \times \exp \left[\frac{-E_d}{R} \times \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (\text{Εξίσωση 3.9})$$

όπου k_d : η σταθερά του ρυθμού μετουσίωσης (min^{-1}) σε θερμοκρασία T (K),

$k_{d,Tref}$: σταθερά του ρυθμού μετουσίωσης (min^{-1}) σε θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} (K),

E_d : η ενέργεια απενεργοποίησης (J/mol)

Συνήθως, οι ενέργειες ενεργοποίησης κυμαίνονται από 17 έως 83,7 kJ/ g mol και οι ενέργειες απενεργοποίησης από 167 έως 543,9 kJ/g mol. Είναι φανερό, λοιπόν ότι η

ενζυμική απενεργοποίηση είναι πιο γρήγορη από την ενζυμική ενεργοποίηση (Shuler *M. et al.*, 2005).

Οι Polydera *et al.* (2004) μελέτησαν κινητικά την απενεργοποίηση της πηκτινομεθυλεστεράσης (PME) σε χυμό πορτοκαλιού και η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης του ενζύμου εκφράστηκε συναρτήσει της θερμοκρασίας, σε σταθερή πίεση από τη Εξίσωση 3.10.

$$k_T = k_{T_{ref}} \times \exp \left[\frac{-E_a(P)}{R} \times \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (\text{Εξίσωση 3.10})$$

όπου: k_T : σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης (min^{-1}) σε θερμοκρασία T (K),

$k_{T_{ref}}$: σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης (min^{-1}) σε θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} (323 K),

E_a : η ενέργεια ενεργοποίησης (J/mol)

R : η παγκόσμια σταθερά των τελείων αερίων (8,314 J/mol K)

3.2.3 Επίδραση της πίεσης

Γενικά, η επίδραση της πίεσης σε φυσικοχημικές διεργασίες που βρίσκονται σε ισορροπία διέπεται από τη μεταβολή του όγκου της διεργασίας, ΔV . Η σχέση που συνδέει τη μεταβολή του όγκου (ΔV) με τη σταθερά ισορροπίας της διεργασίας (K) δίνεται από την Εξίσωση 3.11 (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2002).

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial P} \right)_T = - \left(\frac{\Delta V}{RT} \right) \quad (\text{Εξίσωση 3.11})$$

όπου: ΔV : η μεταβολή του όγκου,

P : η πίεση (MPa),

R : η παγκόσμια σταθερά των τελείων αερίων (8,314 J/mol K),

T : η θερμοκρασία (K).

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο η εφαρμογή πίεσης στα ένζυμα δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τους ομοιοπολικούς δεσμούς και τους δεσμούς υδρογόνου και έτσι η πρωτοταγής και η δευτεροταγής δομή τους παραμένουν ανεπηρέαστες. Αντίθετα, η τριτοταγής και η τεταρτοταγής δομή του ενζύμου καταστρέφονται με εφαρμογή πιέσεων που ξεπερνούν τα 200 MPa.

Όπως στην περίπτωση της θερμικής μετουσίωσης, έτσι και στην περίπτωση της πίεσης, η οποία προκαλεί μετουσίωση του ενζύμου, ο ρυθμός μεταβολής της

συγκέντρωσης του εκφράζεται σύμφωνα με την Εξίσωση 3.7. Συνήθως, η ενζυμική απενεργοποίηση προσεγγίζεται με κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης, όπως φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_d \cdot [E]$$

Η ενζυμική απενεργοποίηση είναι ένα αρκετά σύνθετο φαινόμενο, που περιλαμβάνει μεταβολές στη φυσική διαμόρφωση του μορίου και ανακατατάξεις, ξεδίπλωμα και διαχωρισμό των υπομονάδων του πρωτεϊνικού μορίου. Στην περίπτωση που το συνολικό φαινόμενο περιγράφεται επαρκώς από την κινητική 1^{ης} τάξης θεωρείται ότι μία από όλες τις δράσεις κυριαρχεί επί των υπολοίπων. Στις περιπτώσεις που πραγματοποιούνται περισσότερα από ένα φαινόμενα με παρόμοιους ρυθμούς αναμένεται πιο σύνθετη κινητική ανώτερης τάξης.

Σε κάθε περίπτωση, η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης, k_d , εκφράζεται από τον όγκο ενεργοποίησης και περιγράφεται από την εξίσωση Eyring (Eyring et al., 1946):

$$k_P = k_{P_{ref}} \times \exp \left[\frac{-V_a}{RT} \times (P - P_{ref}) \right] \quad (\text{Εξίσωση 3.12})$$

όπου: k_P : η σταθερά του ρυθμού μετουσίωσης (min^{-1}) σε σταθερή πίεση P (MPa),

$k_{P_{ref}}$: σταθερά του ρυθμού μετουσίωσης (min^{-1}) σε πίεση αναφοράς P_{ref} (MPa),

V_a : ο όγκος ενεργοποίησης (cm^3/mol),

R : η παγκόσμια σταθερά των τελείων αερίων (8,314 J/mol K).

Συμπερασματικά, με εφαρμογή πίεσης παρατηρείται απενεργοποίηση των ενζύμων στην περίπτωση που αυτή συνοδεύεται από μείωση του όγκου. Αυτό συμβαίνει στις περισσότερες περιπτώσεις, ενώ υπάρχουν και εξαιρέσεις όπου πραγματοποιείται ενζυμική ενεργοποίηση με την εφαρμογή πίεσης, όπως έχει αναφερθεί για την πολυφαινολοξειδάση (ενεργοποίηση σε πιέσεις 400 και 600 MPa) (Eisenmenger, 2009).

Στη μελέτη των Polydera et al. (2004) εκφράστηκε η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης της PME συναρτήσει της πίεσης (Εξίσωση 3.13).

$$k_P = k_{P_{ref}} \times \exp \left[\frac{-V_a(T)}{R} \times \left(\frac{P - P_{ref}}{T} \right) \right] \quad (\text{Εξίσωση 3.13})$$

όπου: k_P : η σταθερά του ρυθμού μετουσίωσης (min^{-1}) σε σταθερή πίεση P (MPa),

$k_{P,ref}$: σταθερά του ρυθμού μετουσίωσης (min^{-1}) σε πίεση αναφοράς P_{ref} (600 MPa),

V_a : ο όγκος ενεργοποίησης (cm^3/mol),

R : η παγκόσμια σταθερά των τελείων αερίων (8,314 J/mol K).

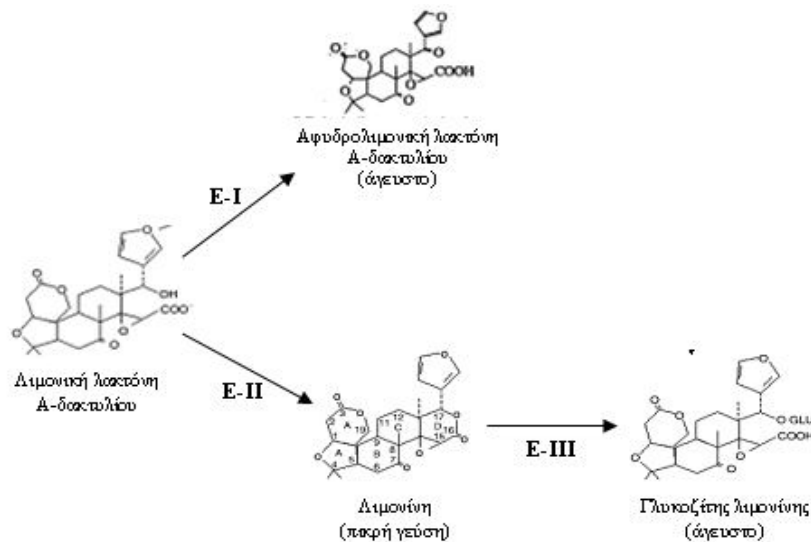
Η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης της PME συναρτήσκει της θερμοκρασίας και της πίεσης εκφράστηκε από την Εξίσωση 3.14.

$$k_{P,T} = k_{ref,P,T} \times \exp \left[\frac{-E_a(P)}{R} \times \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) - \frac{V_a(T)}{RT} \times (P - P_{ref}) \right] \quad (\text{Εξίσωση 3.14})$$

3.3 Ένζυμα που σχετίζονται με την παραγωγή και την αποδόμηση της λιμονίνης

Η αποπίκραση των χυμών έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας. Έχει μελετηθεί η χρήση β-κυκλοδεξτρίνης, φλορισίλης, υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα και διάφοροι μέθοδοι προσρόφησης. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι αν και είναι ικανές να μειώσουν τις συγκεντρώσεις λιμονίνης, είναι οικονομικά ασύμφωρες για να χρησιμοποιηθούν από τη βιομηχανία τροφίμων. Άλλη μία υποσχόμενη μέθοδος αποπίκρασης φαίνεται να είναι η χρήση μικροοργανισμών για τη βιοαποικοδόμηση της λιμονίνης. Για τη βιοαποικοδόμηση της λιμονίνης έχει μελετηθεί κυρίως το βακτήριο *Rhodococcus fascians*.

Η έρευνα πάνω στην αποπίκραση των χυμών εσπεριδοειδών έχει επικεντρωθεί στη χρήση ενζύμων. Τα ένζυμα γλυκοζυλοτρανσφεράση και λιμονική αφυδρογονάση μπορούν να συμβάλουν στην αποπίκραση των χυμών εσπεριδοειδών μειώνοντας τη συγκέντρωση της λιμονίνης, καθώς η δράση και των δύο ενζύμων έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή της πικρής λιμονίνης σε μη-πικρές ουσίες όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3-1.



ΣΧΗΜΑ 3-13: Οι δράσεις των ενζύμων υδρολάση της D-λακτόνης (E-II), λιμονική αφυδρογονάση (E-I) και γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών (E-III) οι οποίες καταλύουν την πίκρανση και φυσική αποπίκρανση των εσπεριδοειδών.

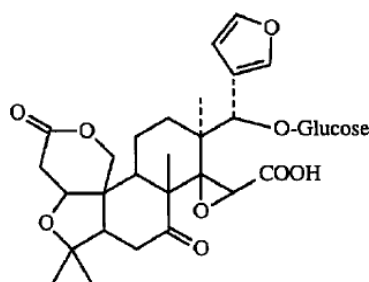
Το ένζυμο **υδρολάση της D-λακτόνης** καταλύει την αντιστρεπτή μεταβολή της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου σε λιμονίνη και βρίσκεται στους φυτικούς ιστούς των εσπεριδοειδών. Το ένζυμο **λιμονική αφυδρογονάση** καταλύει τη μετατροπή της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου, την πρόδρομο ένωση της λιμονίνης, σε 17-αφυδρογονολιμονοειδή τα οποία είναι άγευστα. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των εσπεριδοειδών η αντίδραση της γλυκοζυλίωσης της λιμονίνης για την παραγωγή λιμονοειδών γλυκοζιτών καταλύεται από το ένζυμο **γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών**. Η συγκέντρωση του ενζύμου αυξάνει όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός ωρίμανσης των εσπεριδοειδών κατά τη συγκομιδή.

3.3.1 Γλυκοζυλοτρανσφεράση λιμονοειδών (Limonoid glucosyltransferase, LGTase)

Η λιμονίνη είναι το λιμονοειδές στο οποίο οφείλεται η πικρή γεύση των χυμών των εσπεριδοειδών. Η παραγωγή της λιμονίνης πραγματοποιείται στο όξινο περιβάλλον του χυμού από τη μετατροπή της ένωσης λιμονική λακτόνη Α-δακτυλίου, καταλυόμενη από το ένζυμο υδρολάση της D-λακτόνης. Γενικά, έχουν δοκιμαστεί αρκετές μέθοδοι αφαίρεσης ή μείωσης των πικρών συστατικών του χυμού. Η μέθοδος

της αποπίκρασης μέσω της οποίας τα πικρά συστατικά απορροφώνται από ειδικές ρητίνες αναλύθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο.

Έρευνες, όμως που αποδεικνύουν τις αντικαρκινικές και άλλες ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες των λιμονοειδών και των γλυκοζιτών τους προκαλούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την εύρεση μιας εναλλακτικής μεθόδου, η οποία θα αφαιρεί την πικρή γεύση και παράλληλα θα διατηρούνται σταθερά τα επίπεδα των λιμονοειδών και των μεταβολιτών τους. Αυτό είναι δυνατό με τη χρήση ενζύμων, τα οποία μετατρέπουν τα πικρά συστατικά σε άγευστα. Γενικά, τα λιμονοειδή κατά την ωρίμανση του φρούτου μετατρέπονται στους αντίστοιχους γλυκοζίτες, οι οποίοι δεν έχουν καθόλου γεύση και είναι διαλυτοί στο νερό, για αυτό και οι χυμοί που παράγονται από ώριμα φρούτα δεν είναι πικροί. Το ένζυμο γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών επιτυγχάνει τη μετατροπή της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου στον αντίστοιχο γλυκοζίτη της λιμονίνης όπως το λιμονίνη 17-L-D-glucopyranoside (LG) (Zaare-Nahandi *et al.*, 2008; Hasegawa *et al.*, 1997).



Limonin 17-β-D-glucopyranoside (4)

Εικόνα 3-5: Χημική δομή του 17-β-D-glucopyranoside.

3.3.1.1 Δράση της γλυκοζυλοτρανσφεράσης των λιμονοειδών

Η αντίδραση της μετατροπής των λιμονοειδών στους αντίστοιχους γλυκοζίτες ονομάζεται γλυκοζυλίωση (*glucosylation*). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από ένζυμα, τα οποία ανήκουν στην ομάδα των γλυκοζυλοτρανσφερασών. Τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας είναι εκλεκτικά ως προς την περιοχή που βρίσκεται το υπόστρωμα και δρουν μεταφέροντας ένα μόριο γλυκόζης από την ουριδίνη 5'-διφωσφογλυκόζη (UDPG) σε χαμηλού μοριακού βάρους μόρια (Hall *et al.*, 2012).

Με τον ίδιο τρόπο δρα και η LGTase, η οποία εισάγει ένα μόριο D-γλυκόζης στον άνθρακα 17 της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου και συνδέονται μέσω ενός β-γλυκοζυτικού δεσμού (Zaare-Nahandi et al., 2008; Hasegawa et al., 1997). Τέλος, κινητικές μελέτες έδειξαν ότι οι τιμές των σταθερών είναι K_m 65 μM και V_{max} 2 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ πρωτεΐνης για τη λιμονίνη και για την UDPG είναι 200 μM και V_{max} 0,5 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ πρωτεΐνης (Karim et al., 2002).

3.3.1.2 Χαρακτηριστικά της γλυκοζυλοτρανσφεράσης (LGTase)

3.3.1.2.1 Επίδραση pH και θερμοκρασίας

Με βάση έρευνες που έχουν γίνει στην καθαρή LGTase, που παραλήφθηκε από το μεσοκάρπιο εσπεριδοειδών βρέθηκε ότι αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα και το μοριακό της βάρος είναι 55 kDa. Το ένζυμο έχει βέλτιστο pH 7,8, ενώ παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας του κατά 63% όταν βρέθηκε σε pH 5,5-10,5. Επίσης, κατά την αποθήκευση του σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl και pH 7,5 βρέθηκε ότι η ενεργότητα του μειώθηκε στο 95% της αρχικής μετά από 3 μήνες και στο 73% μετά από 9 μήνες. Όσον αφορά τη θερμοκρασία, εμφανίζει ενεργότητα σε ένα εύρος θερμοκρασιών 30-60°C με βέλτιστη θερμοκρασία τους 37 °C. Πειράματα έδειξαν ότι μέχρι και τους 40°C το ένζυμο δεν επηρεάζεται, ενώ με επώαση 30 min στους 40°C απενεργοποιείται σταδιακά. Τέλος, μετά από επώαση 2 h στην ίδια θερμοκρασία παραμένει μόλις το 56% της αρχικής ενεργότητας (Karim et al., 2002).

3.3.1.2.2 Επίδραση μεταλλικών ιόντων, EDTA

Σε pH 7,8 βρέθηκε ότι η προσθήκη 5mM ιόντων Mn^{2+} αυξάνει την ενεργότητα της LGTase κατά 33%. Παρόμοια αποτελέσματα έχει η προσθήκη Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} και Zn^{2+} . Από την άλλη, η προσθήκη EDTA και ιόντων Cu^{2+} και Hg^{2+} παρεμποδίζουν τη δράση του ενζύμου. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται και στον πίνακα 3-2.

Πίνακας 3-2: Επίδραση μεταλλικών ιόντων και EDTA στη γλυκοζυλοτρανσφεράση της λιμονίνης (Karim et al., 2002).

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

3.3.1.3 Τεχνικές ακινητοποίησης της γλυκοζυλοτρανσφεράσης των λιμονοειδών

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό της LGTase έγιναν προσπάθειες ακινητοποίησης της, προκειμένου να είναι δυνατή η χρησιμοποίηση της για την αποπίκραση των χυμών των εσπεριδοειδών μέσα σε βιοαντιδραστήρες. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν η ακινητοποίηση έγινε ιοντικά και ομοιοπολικά σε διάφορους φορείς. Η ιοντική ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε στον φορέα DEAE-Toyopearl (DE-Tr-LGTase) και η ομοιοπολική σε χιτοζάνη διασταυρωμένη με γλουτεραλδεύδη (chitosan cross-linked with gluteraldehyde) (Chito-Ga-LGTase) και ανθρακική κυτταρίνη (Ce-Ca-LGTase). Λόγω της ακινητοποίησης πραγματοποιούνται αλλαγές στο βέλτιστο pH, τη βέλτιστη θερμοκρασία και τη θερμική σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο, οι οποίες οφείλονται στο φορέα, αλλά και στις συνθήκες ακινητοποίησης.

Κατά την ομοιοπολική ακινητοποίηση της LGTase σε χιτοζάνη διασταυρωμένη με γλουτεραλδεύδη παρατηρήθηκε μείωση του βέλτιστου pH στο 7,4 και βελτιωμένη θερμική σταθερότητα. Η βέλτιστη θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 37°C του ελεύθερου ενζύμου στους 40°C. Επίσης, στην περίπτωση αυτή μετά από 9 κύκλους χρήσης το ένζυμο διατήρησε το 80% της αρχικής του ενεργότητας.

Η ακινητοποιημένη σε ανθρακική κυτταρίνη LGTase διατήρησε το ίδιο βέλτιστο pH με το ελεύθερο ένζυμο, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία αυξήθηκε, όπως και στην παραπάνω περίπτωση ομοιοπολικής ακινητοποίησης. Βέβαια, στην περίπτωση αυτή

το ακινητοποιημένο ένζυμο εμφάνισε καλύτερη λειτουργική σταθερότητα, εφόσον μετά από 15 κύκλους χρήσης η ενεργότητα του διατηρήθηκε στο 80% της αρχικής. Όσον αφορά την ιοντική ακινητοποίηση της LGTase σε DEAE-Toyopearl παρατηρήθηκε αύξηση του βέλτιστου pH στο 8,2 και σταθερή βέλτιστη θερμοκρασία στους 37°C. Η λειτουργική σταθερότητα δεν ήταν τόσο καλή όσο στην ομοιοπολική ακινητοποίηση, καθώς μετά από 6 κύκλους χρήσης η ενεργότητα έφτανε στο 80% της αρχικής. Τελικά, από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι η ομοιοπολική ακινητοποίηση της LGTase είναι περισσότερο αποτελεσματική από την ιοντική.

3.3.2 Υδρολάση της D-λακτόνης (Limonin D-ring Lactone Hydrolase)

Το ένζυμο υδρολάση της D-λακτόνης σε συνδυασμό με το όξινο pH του πορτοκαλοχυμού καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή της λιμονικής λακτόνης A-δακτυλίου σε λιμονίνη. Οι Maier et al., 1969 απομόνωσαν την υδρολάση της D-λακτόνης από καρπούς (seeds) πορτοκαλιών και διαπίστωσαν ότι καταλύει A-λακτόνες και D-λακτόνες. Συγκεκριμένα, με όξινη κατάλυση παράγονται τα δύο είδη λακτόνων, ενώ με βασική κατάλυση πραγματοποιείται υδρόλυση αυτών. Όσον αφορά το pH διαπιστώθηκε ότι σε pH ίσο με 8 ευνοείται η υδρόλυση των λακτόνων. Οι Breksa et al. μελέτησαν την υδρολάση της D-λακτόνης που απομονώθηκε από σπόρους εσπεριδοειδών και διαπίστωσαν ενεργότητα ενζύμου 5,6 nmol/mg h στις φράπες και 34,2 nmol/mg h για τα ξινά πορτοκάλια (Maier et al., 1969; Breksa et al., 2004).

3.3.3 Λιμονική αφυδρογονάση (Limonate Dehydrogenase)

Με βάση έρευνες με αντικείμενο το χυμό από πορτοκάλια ποικιλίας Navel έχει διαπιστωθεί ότι ο χυμός περιέχει την οργανική ένωση 17-αφυδρογονολιμονική λακτόνη A-δακτυλίου (17-dehydrolimonate A-ring), η οποία δεν έχει πικρή γεύση. Η ένωση αυτή παράγεται από τη λιμονική λακτόνη A-δακτυλίου με επίδραση του ενζύμου λιμονική αφυδρογονάση (limonate dehydrogenase). Το ένζυμο αυτό δρα παρουσία NAD και επιδρά αντιστρεπτά στις 17-κετο-υδροξυλομάδες των λιμονοειδών (Hasegawa et al., 1974; Hsu C. A., 1973).

Το ένζυμο λιμονική αφυδρογονάση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αποπίκραση του πορτοκαλοχυμού και γενικά των χυμών των εσπεριδοειδών, με

δεδομένο ότι η 17-αφυδρογονολιμονική λακτόνη Α-δακτυλίου αποτελεί ένα φυσικό, μη πικρό συστατικό του χυμού. Παρόλα αυτά, λόγω της χαμηλής του συγκέντρωσης και του γεγονότος ότι δεν έχει ακόμα απομονωθεί, αυτό δεν είναι εφικτό. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν εργασίες παραγωγής λιμονικής αφυδρογονάσης από διάφορους μικροοργανισμούς όπως τον *Arthrobacter globiformis*, τον *Corynebacterium fascians*, τον *Rhodococcus fascians* και από *Pseudomonas*. Σε μελέτη της λιμονικής αφυδρογονάσης που απομονώθηκε από καλλιέργειες *Pseudomonas* το βέλτιστο pH λειτουργίας ήταν 8 και με δοκιμή σε χυμό από πορτοκάλια Navel (pH 3,5-4) μείωσε τη συγκέντρωση της λιμονίνης (*Bruemmer et al., 1977*).

Βιβλιογραφία 3^{ου} κεφαλαίου

- Barmore, C.R., Fisher, J.F., Fellers, P.J., Rouseff, R.R. 1986. Reduction of bitterness and tartness in grapefruit juice with florisol. *Journal of Food Science*, 51:415-416.
- Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle, 2006, Ένζυμα, Χημεία Τροφίμων, Εκδόσεις Τζιόλα, Αθήνα, σελ. 245-247.
- Boonyaratanakornkit B.B., Park B.C., Clark S. D., 2002, Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins (Review), *Biochimica et Biophysica Acta* 1595, 235-249.
- Breksa P. A., Manners D. G., 2004, Determination of Limonin D-Ring Lactone Hydrolase Activity by Solid Phase Extraction with Indirect Fluorescence Detection, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3772-3775.
- Bruemmer H. J., Baker A. R., ROE B., 1977, Enzymes Affecting Flavor and Appearance of Citrus Products, *Enzymes in Food and beverage processing*, ed. Ory L. R., St. Angelo J. A., AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, pp. 9-10.
- Flavor Chemistry*, 1999, Thirty years of progress: Proceedings of an American Chemical Society symposium, p. 97-105 August 23-27, Boston, Massachusetts.
- Eyring H., Johnson F.H., Gensler R.L., 1946, Pressure and reactivity of proteins with particular interest to invertase, *Journal of physical chemistry*, 50, 453-464.
- Hall D., Yuan X. X., Murata J. , De Luca V., 2012, Molecular cloning and biochemical characterization of the UDP-glucose: Flavonoid 3-O-glucosyltransferase from Concord grape (*Vitis labrusca*), *Phytochemistry*, 90-99.
- Hasegawa S., Maier P. V., Bennett D. R., 1974, Detection of limonoate dehydrogenase activity in albedo tissues of citrus sinensis, *Phytochemistry*, 13, 103-105.
- Hasegawa S., Maier V.P., Border S.N., Bennett R.D, 1974, Metabolism of limonoids: Isolation and characterization of deoxy-limonin hydrolase from *Pseudomonas*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 22, 1093.
- Hasegawa S., Suhayda G. C., Hsu W.-J., Robertson G., 1997, Purification of limonoid glucosyltransferase from Navel orange albedo tissues, *Phytochemistry*, 46,33-37.
- Hasegawa S., Bennett R.D., Maier V.P., 1984, Biosynthesis of limonoids in citrus seedings, *Phytochemistry*, 23, 1601-1603.

- 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*, 197-203.
- Heremans K., 1982, *High pressure effects on proteins and other biomolecules*. *Annual Reviews in Biophys Bioeng*, 11,1-21.
- Hsu C. A., Hasegawa S., Maier P. V., Bennett D. R., 1973, *17-dehydrolimonate A-ring lactone: A possible metabolite of limonate A-ring lactone in citrus*, *Phytochemistry*, 12, 563-567.
- Johnson, R.L., Chandler, B.V. 1988. *Adsorptive removal of bitter principles and titrable acid from citrus juices*. *Food Technology*, 42:130-137.
- Karim M. R., Hashinaga F., 2002, *Isolation and characterization of limonoid glucosyltransferase from pummelo albedo tissue*, *Food Chemistry*, 76, 431-436.
- Karim M. R., Hashinaga F., 2002, *Preparation and properties of immobilized pummelo limonoid Glucosyltransferase*, *Process Biochemistry*, 38, 809_ 814.
- Kimball, D.A. 1987. *Debitting of citrus juices using supercritical CO₂*. *Journal of Food Science*, 52:481-482.
- Konno, A., Miyawaki, M., Toda, J., Wada, T., Yasumatsu, K. 1982. *Bitterness reduction of naringin and limonin by α -cyclodextrin*. *Agricultural Biology Chemistry*, 46:2203-2208.
- Maier P. V., Hasegawa S., Hera E., 1969, *Limonin D-ring-lactone hydrolase: A new enzyme from citrus seeds*, *Phytochemistry*, 8, 405-407.
- Manjon, A., Bastida, J., Romero, C., Jimeno, A., Iborra, J.L. 1985. *Immobilisation of naringinase on glycophase coated porous glass*. *Biotechnology Letters*, 7:477-492.
- Marwaha, S.S., Puri, M.M., Bhullar, K., Kotharit, R.M. 1994. *Optimization of parameters for hydrolysis of limonin for debittering of kinnow mandarin juice by *Rhodococcus fascians**, *Enzyme Microbiology Technology*, 16:72.
- Mozhaev V.V., Heremans K., Frank J., Masson P., Balny C., 1994, *Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications*. *Trends Biotechnol.*, 12, pp. 493-501.
- Polydera C. A., Galanou E., Stoforos G. N., Taoukis S. P., 2004, *Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek Navel orange juice as a function of high*

- hydrostatic pressure and temperature process conditions, Journal of Food Engineering, 62, 291–298.*
- Shuler L. M., Kargi F. 2005, Ένζυμα, Μηχανική Βιοδιεργασιών Βασικές Έννοιες, Εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα, σελ. 75-80, 98-101.
- Suhayda G.C., Mitsuo O., Hasegawa S., 1995, Limonoate dehydrogenase from *arthrobacter globiformis*: The native enzyme and its n-terminal sequence *Phytochemistry, 40, 17-20.*
- Tsen, H.Y., Yu, G.K. 1991. Limonin and naringin removal from grapefruit juice with naringinase entrapped in cellulose triacetate fibres. *Journal of Food Science, 56, 31-34.*
- Zaare-Nahandi F., Hosseinkhani S., Zamani Z., Asadi-Abkenar A., Omidbaigi R., 2008, Delay expression of limonoid UDP-glucosyltransferase makes delayed bitterness in citrus, *Biochemical and Biophysical Research Communications, 371, 59–62.*
- Κέκος Δ., Καλογεράς Ε., 2010, Κινητική ενζυμικών δράσεων, Στοιχεία Βιοχημικής Μηχανικής, Αθήνα, σελ. 2-4.

4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

4.1 Σκοπός

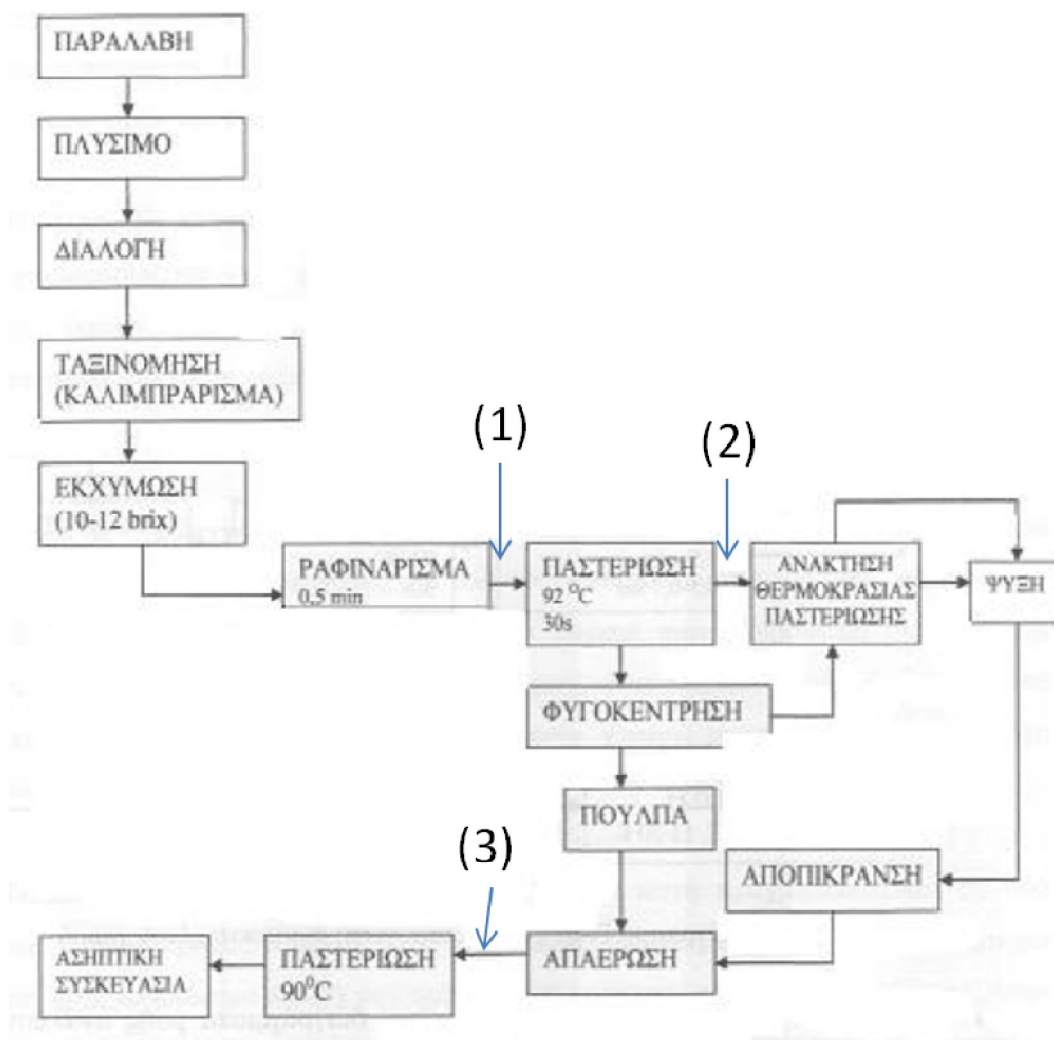
Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι αρχικά η μελέτη των φυσικοχημικών παραμέτρων ποιότητας σε μη συμπυκνωμένο χυμό από πορτοκάλια Navel και η διακύμανση αυτών των παραμέτρων σε σχέση με το χρόνο συγκομιδής και μεταποίησης. Περαιτέρω, μελετήθηκε η εμφάνιση και η ένταση της πικρής γεύσης πορτοκαλοχυμού Navel σε σχέση με τα επίπεδα συγκέντρωσης της λιμονίνης και διερευνήθηκε η δυνατότητα συσχέτισης της λιμονίνης με τις φυσικοχημικές παραμέτρους. Τέλος, παράχθηκε και μελετήθηκε η δράση του ενζύμου γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών (LGTase) σε χυμό Navel και η δυνατότητα ανάπτυξης μεθόδου αποπίκρασης με χρήση του ενζύμου σε συνδυασμό με την τεχνολογία της ΥΥΠ.

4.2 Προέλευση χυμού

Για τη μελέτη των ποιοτικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε ελληνικός, φυσικός χυμός πορτοκαλιού, ποικιλίας Navel. Η δειγματοληψία του χυμού πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της παραγωγικής περιόδου 2011-2012 σε συνεργασία με την βιομηχανία Ασπίς στο Άργος σε τρία διαφορετικά στάδια της γραμμής παραγωγής. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε 14 διαφορετικές ημερομηνίες (από 6/12/11-3/4/12) και τα δείγματα μεταφέρθηκαν υπό ψύξη στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. όπου και αποθηκεύτηκαν υπό κατάψυξη (-40 °C) μέχρι την εκτέλεση των πειραμάτων.

Κάθε δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κατά τα εξής στάδια: (1) πριν την παστερίωση, (2) μετά την παστερίωση και (3) μετά την αποπίκραση (Εικόνα 4-1). Η αποπίκραση πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση της ρητίνης Alimentech P-495. Η ρητίνη αυτή είναι μια πορώδης απορροφητική ουσία με υδρόφοβες ιδιότητες.

Τα συγκεκριμένα αυτά χαρακτηριστικά την καθιστούν ως ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό απορροφητικό μέσο για τη μείωση της συγκέντρωσης των λιμονοειδών στο πορτοκαλοχυμό.



Εικόνα 4-1: Διάγραμμα ροής για την παραγωγή NFC χυμού.

4.3 Μελέτη των ποιοτικών χαρακτηριστικών

Οι ποιοτικές παράμετροι του πορτοκαλοχυμού που μελετήθηκαν ήταν οι εξής:

- pH,
- ολικά διαλυτά στερεά (°Brix),

- χρώμα,
- απορροφήσεις καροτενοειδών, φλαβονοειδών και πολυφαινόλων,
- οξύτητα,
- βιταμίνη C,
- συγκέντρωση λιμονίνης,
- συγκέντρωση αρωματικών ενώσεων.

Τα όργανα και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των παραπάνω ποιοτικών χαρακτηριστικών περιγράφονται παρακάτω.

4.3.1 Μέτρηση pH

Για την μέτρηση του pH χρησιμοποιήθηκε πεχάμετρο (UV Bayern, WTW Bayern, Germany) (Εικόνα 4-2). Για τη βαθμονόμηση της συσκευής χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα σταθερής τιμής pH 4 και 7.



Εικόνα 4-2: Συσκευή μέτρησης pH.

4.3.2 Μέτρηση ολικών διαλυτών στερεών

Για τη μέτρηση των ολικών διαλυτών στερεών (^oBrix) του πορτοκαλοχυμού χρησιμοποιήθηκε η φορητή συσκευή Atago N-1a Refractometer (Εικόνα 4-3). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Εικόνα 4-3: Συσκευή μέτρησης ολικών διαλυτών στερεών.

4.3.3 Μέτρηση χρώματος

Το χρώμα του πορτοκαλοχυμού μετρήθηκε με το χρωματόμετρο Minolta CR-200 (Minolta Co., Chuo-Ku, Osaka, Japan) με επιφάνεια μέτρησης διαμέτρου 8 mm. Πρότυπη άσπρη πλακέτα της Minolta χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμονόμηση του οργάνου σύμφωνα με τις συνθήκες της CIE (Commission International de L'Eclairage).



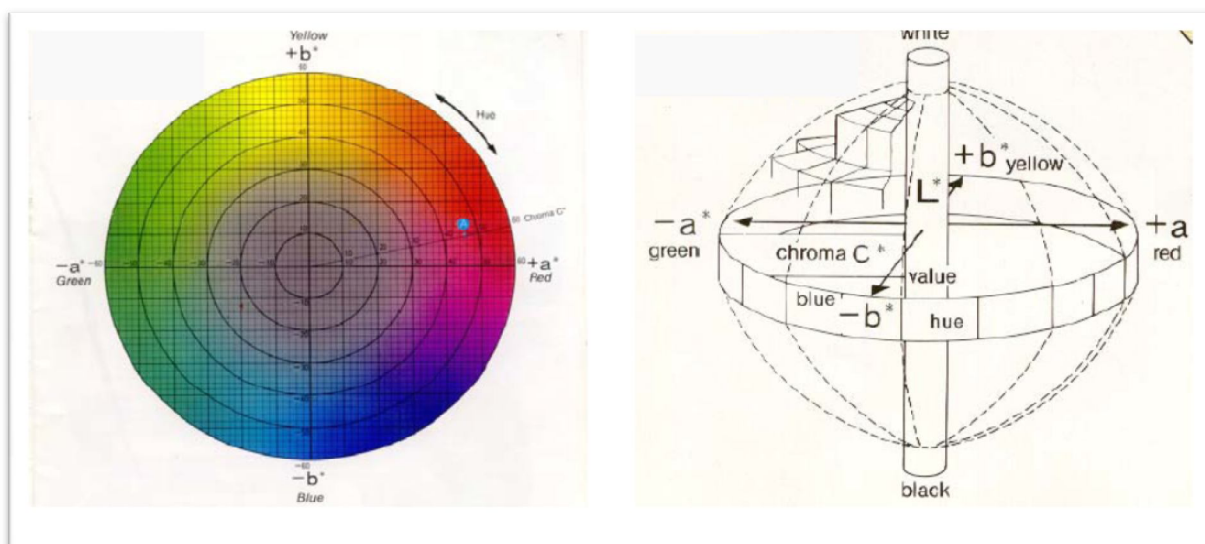
Εικόνα 4-4: Συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του χρώματος.

Για την μέτρηση του χρώματος, 5 mL δείγματος πορτοκαλοχυμού τοποθετήθηκαν σε γυάλινο διαφανές τρυβλίο Petri με καπάκι, διαμέτρου 25 mm και όγκου 5 mL, και στη συνέχεια μετρήθηκε το χρώμα με την εφαρμογή του χρωματόμετρου στην επιφάνεια του τρυβλίου.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν στην κλίμακα CIE (L, a, b). Οι τιμές a και b είναι οι ορθογώνιες συντεταγμένες του χρώματος πάνω στο επίπεδο διατομής του χρώματος, κάθετο στον άξονα μαύρου-άσπρου και εκφράζουν τη χρωματικότητα. Αν ένα δείγμα έχει μηδενικές τιμές για τα a και b τότε πρέπει να βρίσκεται πάνω στον άξονα μαύρου-άσπρου και έχει κάποια απόχρωση του γκρι. Θετική τιμή για το a υποδεικνύει κόκκινο χρώμα (redness), ενώ αρνητική τιμή πράσινο χρώμα (greeness). Μία θετική τιμή για το b υποδεικνύει κίτρινο χρώμα (yellowness), ενώ μία αρνητική τιμή μπλε χρώμα (blueness). Η παράμετρος L εκφράζει την φωτεινότητα του χρώματος (Εικόνα 4-5). Το ολικό χρώμα εκφράστηκε από την παράμετρο E (Εξίσωση 4.1).

$$E = \sqrt{a^2 + b^2 + L^2} \quad (\text{Εξίσωση 4.1})$$

Όπου L, a, b οι συντεταγμένες χρώματος στην κλίμακα CIELab.



Εικόνα 4-5: Σχηματική αναπαράσταση των συντεταγμένων L, a, b του χρώματος σε κλίμακα CIE (L, a, b)

4.3.4 Προσδιορισμός ολικής οξύτητας

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



Εικόνα 4-6: Αλλαγή του χρώματος του πορτοκαλοχυμού κατά την πλήρη εξουδετέρωση των οξέων από τη βάση NaOH.

Η ολική οξύτητα εκφράστηκε σε **g κίτρικού οξέος/ 100 mL χυμού** και υπολογίστηκε από την εξίσωση 4.2:

$$A = 0,3842 \times V \text{ (Εξίσωση 4.2)}$$

Όπου: A:ολική οξύτητα του πορτοκαλοχυμού (g/100 mL)

V: ο όγκος του διαλύματος NaOH 0,1 N (mL)

4.3.5 Προσδιορισμός των απορροφήσεων καροτενοειδών, φλαβονοειδών και πολυφαινολών

Ο προσδιορισμός των απορροφήσεων των καροτενοειδών, των φλαβονοειδών και των πολυφαινολών πραγματοποιήθηκε στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis Hitachi U-2900 (Εικόνα 4-7).

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με την προσθήκη 1,25 mL απιονισμένου νερού σε 1,25 mL πορτοκαλοχυμό και στη συνέχεια το διάλυμα αυτό συμπληρώθηκε με αιθανόλη μέχρι τελικό όγκο 25 mL. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 min με ταχύτητα 5000 rpm και στη συνέχεια τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο μέσα σε γυάλινη κυψελίδα. Το τυφλό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε διάλυμα αιθανόλης 90%.

Από τη φωτομέτρηση λαμβάνεται φασματογράφημα από 200 nm έως 500 nm, το οποίο παρουσιάζει ενδιαφέρον σε τρία σημεία. Στα 280 nm, όπου η απορρόφηση

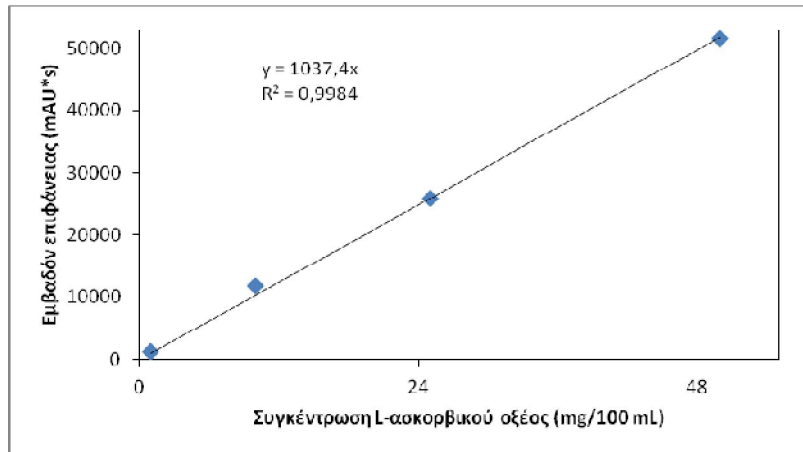
αφορά τα φλαβονοειδή, στα 325 nm, όπου αφορά τις πολυφαινόλες και στα 443 nm, που αφορά τα καροτενοειδή.



Εικόνα 4-7:Φασματοφωτόμετρο UV-Vis που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των απορροφήσεων.

4.3.6 Ποσοτικός προσδιορισμός L-ασκορβικού οξέος (Βιταμίνη C)

Για τη μέτρηση του L-ασκορβικού οξέος χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφική μέθοδος υψηλής απόδοσης HPLC (Oruna-Concha *et al.*, 1998). Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση 1 mL δείγματος πορτοκαλοχυμού σε ίσο όγκο διαλύματος μεταφωσφορικού οξέος 4,5% w/v με ανάδευση 5 min. Τα δείγματα διηθήθηκαν με φίλτρο L.E. Nylon 0,2 μm και μικρή ποσότητα αυτών διοχετεύθηκε με τη βοήθεια ένεσης στη χρωματογραφική στήλη του συστήματος, η οποία ήταν στήλη ανάστροφης φάσης Hypersil ODS C18 με μέγεθος σωματιδίων 5 μm . Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν νερό καθαρότητας HPLC με μεταφωσφορικό οξύ για ρύθμιση του pH στο 2,2. Ο ρυθμός ροής ήταν 0,5 mL/min και η ανίχνευση του L-ασκορβικού οξέος πραγματοποιήθηκε στα 245 nm με χρόνο έκλουσης 8,2 min. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης (Διάγραμμα 4-1) και χρησιμοποιήθηκε η Εξίσωση 4.3.

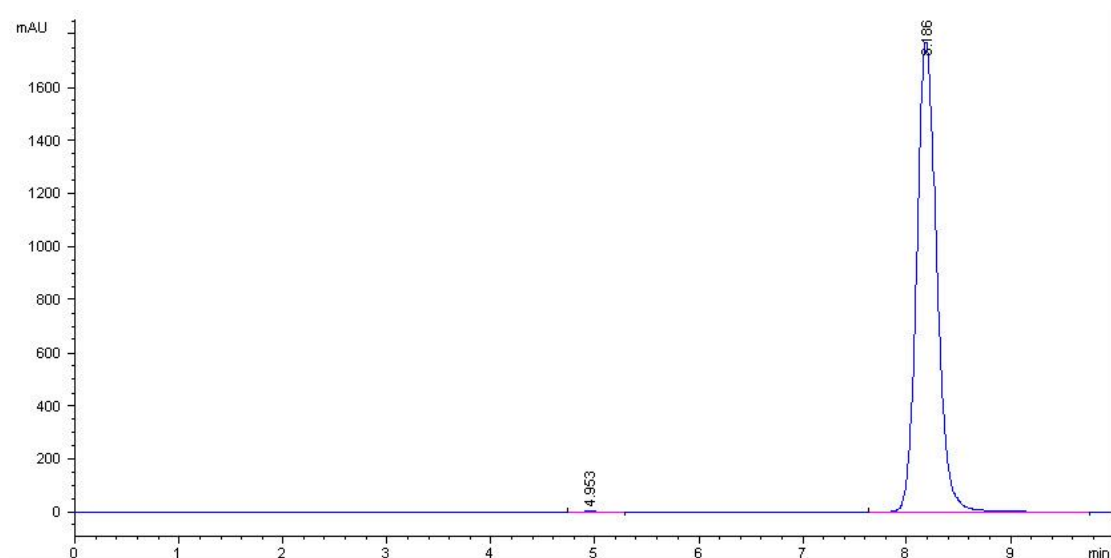


Διάγραμμα 4-1: Καμπύλη αναφοράς ποσοτικού προσδιορισμού συγκέντρωσης L-ασκορβικού οξέος με χρήση υγρής χρωματογραφίας HPLC.

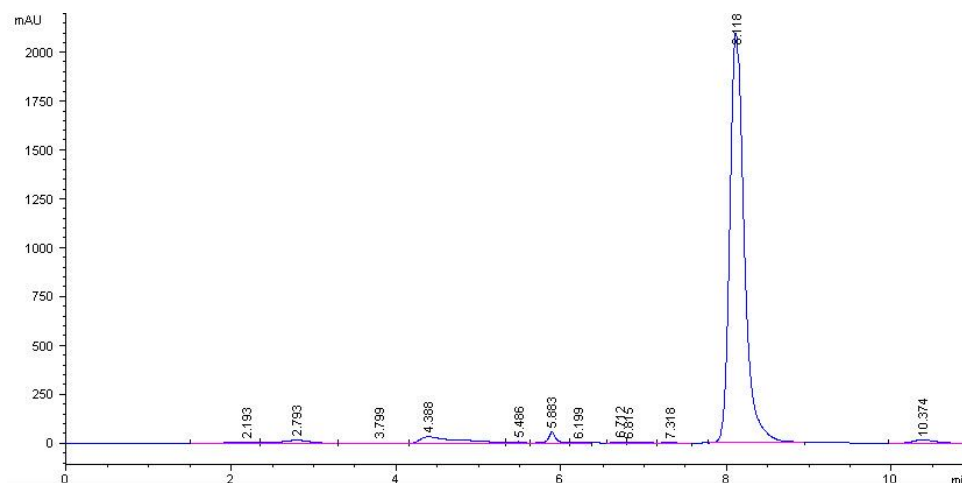
$$C = \frac{E_{\chi\rho}}{1037,4} \text{ (Εξίσωση 4.3)}$$

Όπου: C: συγκέντρωση L-ασκορβικού οξέος (mg/100 mL)

$E_{\chi\rho}$: εμβαδόν επιφάνειας χρωματογραφήματος (mAU*s).



Εικόνα 4-8: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος L-ασκορβικού οξέος.



Εικόνα 4-9: Χρωματογράφημα δείγματος χυμού για τον προσδιορισμό του L-ασκορβικού οξέος.

4.3.7 Ποσοτικός προσδιορισμός λιμονίνης

Για τη μέτρηση της λιμονίνης χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφική μέθοδος υψηλής απόδοσης HPLC, η οποία βασίζεται στη μέθοδο των Vikram et al. (2007).

Το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στη σειρά HP series 1100. Αποτελείται από αντλία βαθμωτής έκλουσης (*gradient pump*) τεσσάρων καναλιών, απαερωτή κενού, βρόγχο εισαγωγής δείγματος (*injection loop*) όγκου 20 μL και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων. Οι μετρήσεις καταγράφονται και επεξεργάζονται από συνδεδεμένο υπολογιστή με χρήση του προγράμματος HP ChemStation.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε στήλη ανάστροφης φάσης Hypersil ODS C-18 με μέγεθος σωματιδίων 5 μm . Η κινητή φάση αποτελούνταν από δύο διαλύτες έκλουσης, νερό καθαρότητας HPLC με φωσφορικό οξύ 3 mM (A) και (B) ακετονιτρίλιο. Η ροή καθορίστηκε στο 1 mL/min, η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 50 min και η ανίχνευση της λιμονίνης πραγματοποιήθηκε στα 210 nm με χρόνο έκλουσης 35-36 min. Η μέθοδος σχεδιάστηκε έτσι ώστε κατά τη διάρκεια της να μειώνεται σταδιακά η παροχή του διαλύτη (A) και να αυξάνεται η παροχή του διαλύτη (B). Συγκεκριμένα, η ανάλυση ξεκινά με παροχή 85% διαλύτη (A), μετά από 5 min η παροχή μειώνεται στο 77%, μετά από 25 min στο 74%, στο 60% μετά από 30 min και ολοκληρώνεται με παροχή 54% στα 45 min. Στη συνέχεια,

η παροχή επανέρχεται στο αρχικό ποσοστό για 5 min ώστε να ισορροπήσει η στήλη πριν την εισαγωγή του επόμενου δείγματος.

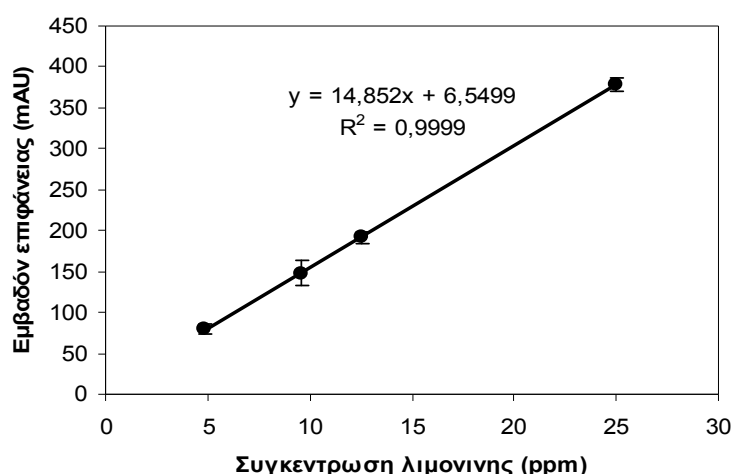


Εικόνα 4-10: Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

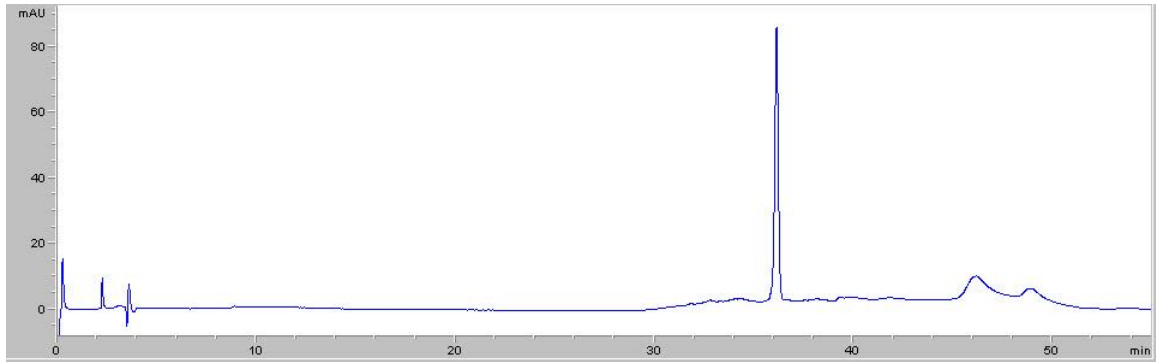
4.3.7.1 Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς παρασκευάστηκε μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων.

Τα πρότυπα διαλύματα περιείχαν καθαρή λιμονίνη αρχικής συγκέντρωσης 1.120 ppm, η οποία αραιώθηκε με διάλυμα νερό:ακετονιτρίλιο (1:1 v/v). Οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων ήταν στο εύρος 5-25 ppm (Διάγραμμα 4-2).



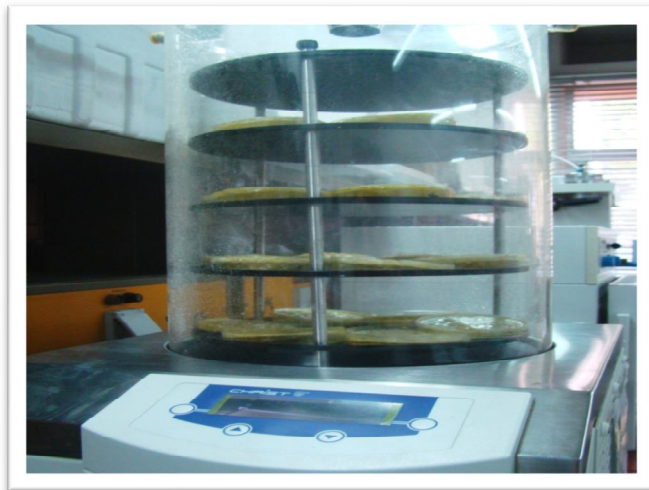
Διάγραμμα 4-2: Καμπύλη αναφοράς ποσοτικού προσδιορισμού συγκέντρωσης λιμονίνης με χρήση υγρής χρωματογραφίας HPLC.



Εικόνα 4-11: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος λιμονίνης.

4.3.7.2 Προετοιμασία δειγμάτων πορτοκαλοχυμού

Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων ογκομετρήθηκαν 30 mL πορτοκαλοχυμού και τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένα τρυβλία, τα οποία τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη στους -40°C . Στη συνέχεια, τα κατεψυγμένα δείγματα οδηγήθηκαν προς λυοφιλίωση στη συσκευή freeze-drying (Εικόνα 4-12) για 48 h.



Εικόνα 4-12: Συσκευή ξήρανσης με κατάψυξη σε λειτουργία.

Μετά την ολοκλήρωση της λυοφιλίωσης τα δείγματα κονιοποιήθηκαν και 500 mg αυτής της σκόνης προστέθηκαν σε 5 mL μεθανόλης καθαρότητας HPLC και αναδεύτηκαν έντονα για 5 min. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιήθηκε εκχύλιση της

λιμονίνης στη μεθανόλη και αφού τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία για 15 min, 1 mL από αυτά διηθήθηκε με φίλτρο L.E. Nylon 0,2 μm και ήταν έτοιμο προς ανάλυση για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της λιμονίνης. Η συγκέντρωση της λιμονίνης υπολογίστηκε αρχικά στο εκχύλισμα του χυμού μέσω της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς (Εξίσωση 4.4) και στη συνέχεια ανάχθηκε συνολικά στο χυμό μέσω της εξίσωσης 4.5.

$$[\text{λιμονίνη}]_{\text{εκχυλίσματος}} = \frac{E_{\text{χρ.}} - 6,5499}{14,852} \quad (\text{Εξίσωση 4.4})$$

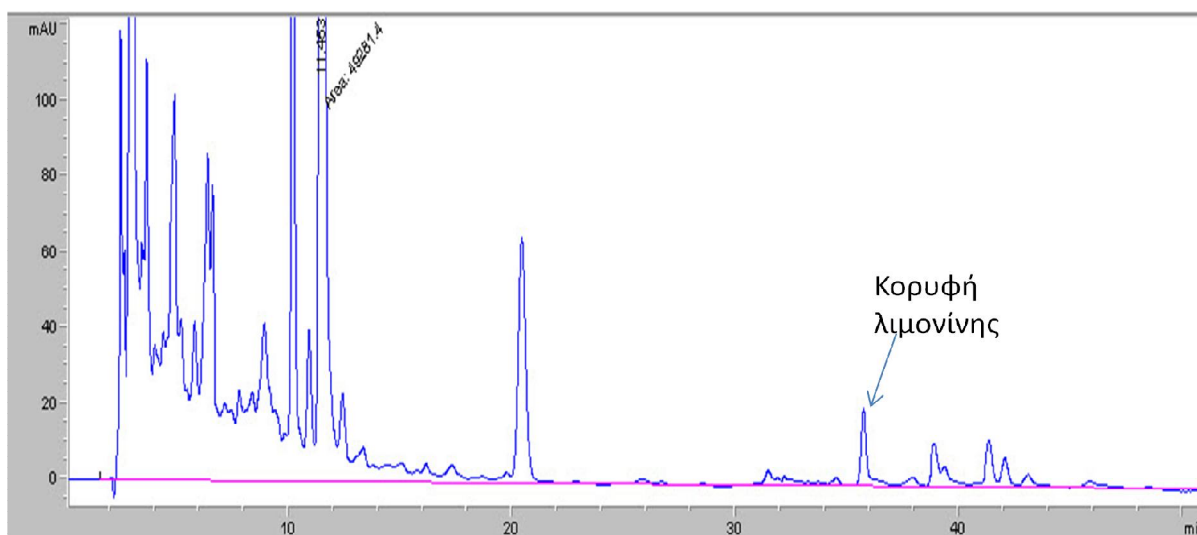
όπου: $[\text{λιμονίνη}]_{\text{εκχυλίσματος}}$: συγκέντρωση της λιμονίνης του εκχυλίσματος (ppm),
 $E_{\text{χρ.}}$: εμβαδόν χρωματογραφήματος (mAU*s)

$$[\text{λιμονίνη}]_{\text{χυμού}} = 10 \times [\text{λιμονίνη}]_{\text{εκχυλίσματος}} \times (1 - H) \times \rho \quad (\text{Εξίσωση 4.5})$$

όπου: $[\text{λιμονίνη}]_{\text{χυμού}}$: συγκέντρωση της λιμονίνης του χυμού (ppm),
 H : η περιεχόμενη υγρασία του χυμού,
 ρ : η πυκνότητα του χυμού (1,064 g/mL).



Εικόνα 4-13: Δείγμα χυμού μετά το τέλος της λυοφιλίωσης.



Εικόνα 4-14: Χρωματογράφημα δείγματος χυμού.

4.3.8 Μέτρηση αρωματικών ουσιών

Η μέτρηση των αρωματικών ουσιών του χυμού πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Αρχικά έγινε ανάκτηση των αρωματικών ουσιών με τη συσκευή Purge and Trap (P&T) και στη συνέχεια οι πτητικές αρωματικές ουσίες αναλύθηκαν με συνδυασμό της αέριας χρωματογραφίας και της φασματογραφίας μάζας (GC-MS).

4.3.8.1 Ανάκτηση αρωματικών ουσιών

Γενικά η μέθοδος P&T GC-MS για υδατικά δείγματα χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις πτητικών συστατικών που βρίσκονται σε χαμηλή περιεκτικότητα (ppb, ppt) στον υδατικό φορέα και ουσιών κατά βάση με χαμηλό σημείο ζέσεως. Όσον αφορά αρωματικές ουσίες με υψηλά σημεία ζέσεως χρησιμοποιούνται διαφορετικές διατάξεις P&T GC-MS, καθώς για να καταστεί δυνατή η απελευθέρωση του αρωματικού συστατικού από τον υδατικό φορέα πρέπει να εφαρμοστεί υψηλή θερμοκρασία, οπότε μοιραία θα περάσει στο σύστημα P&T και μια ποσότητα υδρατμών που κατά περίπτωση αυτοί οι υδρατμοί μπορούν να δράσουν παρεμποδιστικά στη παγίδευση της ουσίας. Για αυτό το λόγο έγινε προσπάθεια εισαγωγής του χυμού σε μορφή σκόνης ώστε να αρθεί αυτός ο περιορισμός. Στην περίπτωση του πορτοκαλοχυμού έχουμε ένα βαρύ πτητικό το λεμονένιο, το οποίο

βάση βιβλιογραφικών δεδομένων βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση. Ο μόνος τρόπος για να είναι δυνατή η ανάλυση στο συγκεκριμένο σύστημα P&T GC-MS θα ήταν η χρήση ενός πολύ μικρού όγκου δείγματος χυμού, οπότε η ποσότητα των υδρατμών που θα περάσει στο σύστημα να είναι κατά το δυνατό μικρότερη.

Το σύστημα παρόλα αυτά, έχει μια ασφαλιστική δικλείδα (water management) που μπορεί να δεσμεύει μικρές ποσότητες υδρατμών.

Στον Πίνακα 4-1 απεικονίζονται οι ρυθμίσεις του συστήματος P&T κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

Πίνακας 4-1: Ρυθμίσεις συστήματος P&T.

Purge Flow	40 mL/min
Purge Gas	Helium
Samle Temperature (°C)	
Sparge Mount	80
Sample	110
Purge Times (min) and Temp. (°C)	
Purge Time	20
Trap Temp.	30
Water Mgmt Temp. (°C)	
Purge	110
Desorb	0
Bake	240
Bake	
Bake Time (min)	10
Trap Temp. (°C)	210
Desorb	
Desorb Time (min)	1,5
Trap Temp. (°C)	200
Desorb Pre Heat	
Trap Temp. (°C)	180

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής: Η θερμοκρασία του δείγματος είναι 110°C. Κατά την διάρκεια του Purge (20 min) η θερμοκρασία της παγίδας παραμένει στους 30°C. Ακολουθεί desorb Pre Heat όπου η παγίδα φτάνει τους 180°C και στην συνέχεια Desorb για 1,5 λεπτά με θερμοκρασία της παγίδας στους 200°C. Τέλος, η παγίδα βρίσκεται στη διαδικασία του Bake για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 210°C. Το φέρον αέριο είναι το Ήλιο (He).



Εικόνα 4-15: Το σύστημα P&T που χρησιμοποιήθηκε.

4.3.8.2 Ανάλυση πτητικών αρωματικών με GC-MS

Μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιείται για τις αναλύσεις και ταυτοποιήσεις των αρωματικών ενώσεων του πορτοκαλοχυμού είναι η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματογραφία μάζας (GC-MS). Η αέρια χρωματογραφία περιλαμβάνει τις μεθόδους διαχωρισμού που βασίζονται στη διαφορά προσρόφησης των πτητικών ουσιών που αναλύονται μεταξύ της κινούμενης φάσης του αερίου και της σταθερής φάσης του στερεού ή ενός ημιστερεού υγρού. Καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των συστατικών των αρωμάτων και των γεύσεων είναι πτητικά οι τεχνικές της αέριας χρωματογραφίας συνιστώνται για το διαχωρισμό τους και την ποσοτικοποίηση τους.

Το GC-MS αποτελείται από σύστημα μεταφοράς αερίου, εισαγωγή/εγχυτήρα δείγματος, στήλη διαχωρισμού, ανιχνευτή και μονάδα εμφάνισης και επεξεργασίας των δεδομένων και των αποτελεσμάτων τους. Ο εγχυτήρας πρέπει να παραδώσει το

ατμοποιημένο δείγμα στην αρχή της στήλης διαχωρισμού με αρχικό εύρος ζώνης όσο το δυνατόν μικρότερο. Συνήθως για την εισαγωγή του δείγματος χρησιμοποιούνται δύο ειδών εγχυτές είτε με τη μορφή σπρέι είτε με την απευθείας εναπόθεση στη στήλη διαχωρισμού (μέσω σύριγγας). Το φέρον αέριο στα πειράματα που ακολούθησαν είναι ένα αδρανές αέριο χωρίς προσροφητική ικανότητα (το ήλιο). Κύρια χαρακτηριστικά του ανιχνευτή είναι η ευαισθησία και η επιλεκτικότητά του. Ο πιο αποτελεσματικός ανιχνευτής είναι ο φασματογράφος μάζας, αφού εκτός από τη μεγάλη ευαισθησία που διαθέτει παρέχει και δυνατότητα ταυτοποίησης. Τα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας είναι ο μικρός χρόνος ανάλυσης, η ακρίβεια των αποτελεσμάτων καθώς και η υψηλή ποιότητα σε ότι αφορά την ποσοτικοποίηση, ενώ μεγάλο μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι δεν μπορεί να παρέχει μία ολοκληρωμένη ανάλυση χωρίς την παρουσία ενός φασματογράφου μάζας. Η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των οργανικών συστατικών λόγω της ευαισθησίας, τη υψηλής επιλεκτικότητας και της ευελιξίας που παρουσιάζει.

Στον Πίνακα 4-2 απεικονίζονται οι ρυθμίσεις του συστήματος GC-MS κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

Πίνακας 4.2 Οι ρυθμίσεις του συστήματος GC-MS κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

Ssl-Front Heater	200°C
Pressure	7,6522 psi
Total Flow	14 mL/min
Septum Purge Flow	3 mL/min
Mode	split
Split ratio	10:1
Gas saver	20 mL/min
Ssl Back	
Pressure	25 psi
Septum Purge Flow	3 mL/min
mode	splitless
Solvent Delay	2,50 min
Start at mass (amu)	32
End at mass (amu)	400
Colum Flow	1 mL/min
Colum	Agilent 190915-433: 325°C: 30 m x 250 μm x 0,25μm

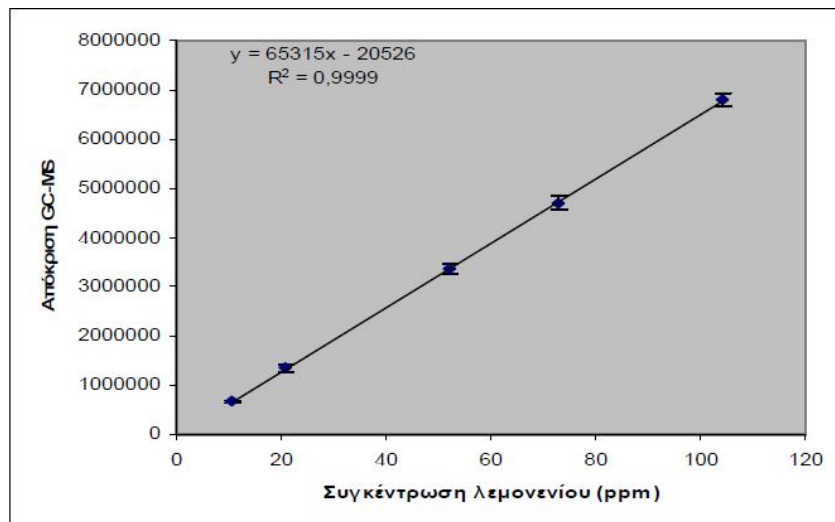
Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής: Αρχικά η θερμοκρασία του φούρνου (oven temperature) είναι 50°C. Παραμένει στους 50°C για 3 min και στη συνέχεια φτάνει στους 200°C με ρυθμό 15°C/min. Η όλη ανάλυση διαρκεί 13 min. Ακολουθεί πρόγραμμα διάσπασης ενώσεων (post run program): η θερμοκρασία του φούρνου αυξάνεται στους 240°C και παραμένει σε αυτή για 5 min. Στην Εικόνα 4-16 απεικονίζεται η συσκευή GC-MS που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 4-16: Η συσκευή GC-MS που χρησιμοποιήθηκε.

Χρησιμοποιήθηκαν 2μL δείγματος χυμού τα οποία με χρήση κατάλληλης αυτόματης πιπέτας τοποθετήθηκαν σε μικρό τεμάχιο αλουμινόχαρτου το οποίο με τη σειρά του προσαρμόστηκε κατάλληλα στο δοχείο δείγματος του P&T, ώστε το ρεύμα του φέροντος αερίου (He) να στοχεύει απευθείας πάνω στη μικρή κηλίδα δείγματος χυμού.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του λεμονένιου κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 4-3).

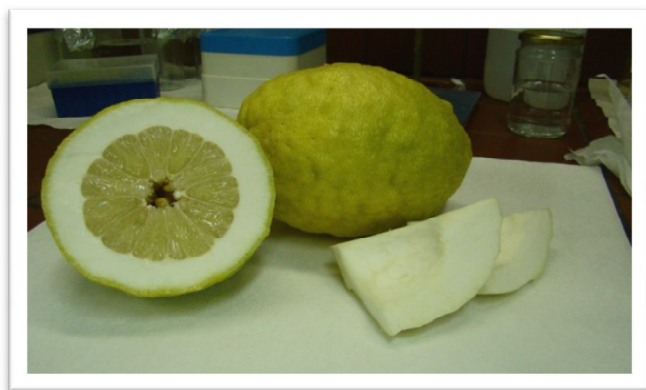


Διάγραμμα 4-3: Καμπύλη αναφοράς λεμονένιου.

4.4 Παραλαβή της LGTase από το μεσοκάρπιο φράπας και εφαρμογή στον πορτοκαλοχυμό

4.4.1 Υλικά

Για την παραλαβή της ακατέργαστης LGTase χρησιμοποιήθηκε το μεσοκάρπιο από φράπες (*Citrus grandis* ή *Citrus maxima*), οι οποίες αγοράστηκαν από την κεντρική λαχαναγορά της Αθήνας προερχόμενες από το Λεωνίδιο. Οι φράπες καθαρίστηκαν και το μεσοκάρπιο που παραλήφθηκε αποθηκεύτηκε υπό κατάψυξη (-30°C).



Εικόνα 4-17: Φράπα Λεωνιδίου που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή του ενζύμου.

4.4.2 Παραλαβή ακατέργαστου εκχυλίσματος ενζύμου

Για την παραλαβή της ακατέργαστης (crude) LGTase από το μεσοκάρπιο (albedo) της φράπας ακολουθήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται από τους Karim et al. (2002). Όλες οι διεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C προκειμένου να αποφευχθεί απώλεια της ενεργότητας του ενζύμου.

Το υδατικό διάλυμα εκχύλισης περιείχε NaCl 0,1M, PVP (polyvinylpyrrolidone) 0,5% w/v και PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 1 mM. Μετά την παρασκευή το διάλυμα ψύχθηκε στους 4°C και χρησιμοποιήθηκε το συντομότερο δυνατό, γιατί το PMSF υφίσταται αυτόλυση σε υδατικό περιβάλλον.

Η ποσότητα του μεσοκαρπίου ζυγίστηκε και ομογενοποιήθηκε με 4 όγκους του προψυγμένου διαλύματος εκχύλισης σε ομογενοποιητή τύπου Stomacher (*Interscience Bagmixer, St. Nom, France*) για 3 min. Ο πολτός που προέκυψε αφέθηκε για 2 h υπό συνεχή ανάδευση και ψύξη για να προχωρήσει η εκχύλιση του

ενζύμου. Στη συνέχεια ο πολτός διήλθε από φίλτρο γάζας και το προκύπτον ίζημα απορρίφθηκε.

Το διήθημα φυγοκεντρήθηκε για 30 min με ταχύτητα 7000 rpm υπό ψύξη και στο τέλος της φυγοκέντρωσης απορρίφθηκε το ίζημα και συλλέχθηκε το διαυγασμένο υπερκείμενο υγρό. Ακολούθως, το υπερκείμενο υγρό κορέσθηκε κατά 75% με σταδιακή προσθήκη $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και αφέθηκε υπό ψύξη και ήπια ανάδευση για 14 h και στη συνέχεια σε ηρεμία για 2 h για να ολοκληρωθεί η καταβύθιση των πρωτεϊνών. Μετά την ολοκλήρωση της καταβύθισης των πρωτεϊνών, οι πρωτεΐνες συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση διάρκειας 30 min και ταχύτητα 7000 rpm υπό ψύξη. Μετά τη φυγοκέντρωση απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό και το προκύπτον ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl και pH 7,8.

Το παραπάνω πρωτεϊνικό διάλυμα αφαλατώθηκε με διαδοχικές συμπυκνώσεις κατά το ήμισυ και αραιώσεις μέχρι τον αρχικό όγκο. Οι συμπυκνώσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση μονάδας υπερδιήθησης αποτελούμενης από μεμβράνη Pellicon XL με μοριακό βάρος αποκοπής 30 kDa και περισταλτική αντλία ρυθμιζόμενης ροής (*Millipore, Billerica, MA, USA*). Η μεμβράνη παρακράτησε το ένζυμο LGTase και απέρριψε τα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος (άλατα, πρωτεΐνες χαμηλότερου μοριακού βάρους). Μετά από 5 επαναλήψεις της παραπάνω διαδικασίας η συγκέντρωση του θειικού αμμωνίου θεωρήθηκε αμελητέα (<25%) και η αφαλάτωση ολοκληρώθηκε. Προκειμένου να συμπυκνωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο το παραπάνω πρωτεϊνικό διάλυμα, το συμπύκνωμα που προέκυψε από την υπερδιήθηση οδηγήθηκε στη συσκευή συμπύκνωσης Amicon, όπου πραγματοποιήθηκε περαιτέρω συμπύκνωση του πρωτεϊνικού διαλύματος με χρήση μεμβράνης με μοριακό βάρος αποκοπής 10 kDa και το ακατέργαστο εκχύλισμα ενζύμου συμπυκνώθηκε μέχρι τον τελικό όγκο 7 mL.



Εικόνα 4-18: Συσκευή Amicon.

Όλα τα στάδια συμπύκνωσης του πρωτεϊνικού διαλύματος πραγματοποιήθηκαν υπό ψύξη.

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



Διάγραμμα 4-4: Διάγραμμα ροής της διαδικασίας παραλαβής της ακατέργαστης LGTase.

4.4.3 Καθαρισμός του ενζύμου

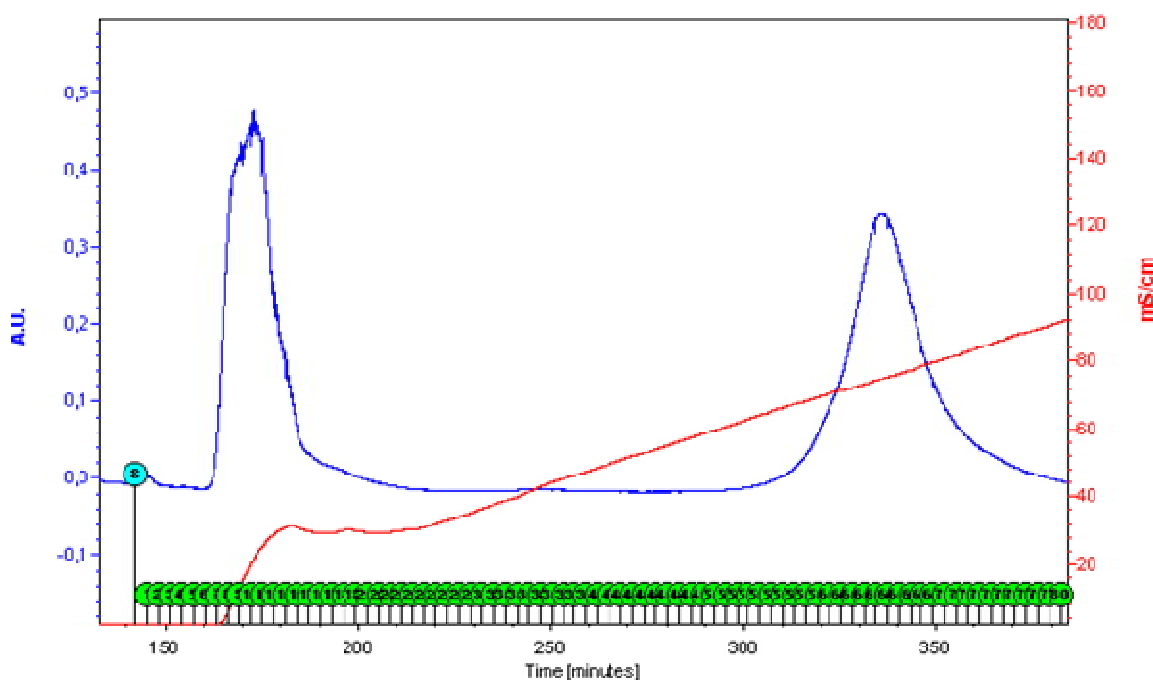
Το ακατέργαστο εκχύλισμα της LGTase που προέκυψε από την εκχύλιση του μεσοκαρπίου των φραπών υπέστη απομόνωση και καθαρισμό με χρήση χρωματογραφίας ανταλλαγής ανιόντων (*anion exchange chromatography*) με βάση τη μέθοδο που προτάθηκε από τους Karim et al. (2002).

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

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός του ενζυμικού εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε σε στήλη πληρωμένη με ρητίνη ανιονικής ανταλλαγής Uno Q (*Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA*) και ισορροπημένη με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 10 mM pH 7,8. Η ροή του διαλύτη παρέμεινε σταθερή στο 1,5 mL/min σε όλη τη διάρκεια του καθαρισμού.

Μετά την εισαγωγή του δείγματος έγινε έκπλυση της στήλης με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, μέχρι η απορρόφηση UV του εκλούσματος να επανέλθει στη γραμμή βάσης, οπότε και ξεκίνησε ο διαχωρισμός. Ο χρόνος αυτός, κατά σύμβαση θεωρήθηκε ο χρόνος 0 min. Η έκλυση του δείγματος έγινε με γραμμική βαθμίδα 0-0,5 M NaCl στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα σε συνολικό χρόνο 300 min. Στο τέλος, συλλέχθηκαν συνολικά 100 κλάσματα (με ρυθμό 1 ανά 3 min), τα οποία ψύχονταν αμέσως.

Τα κλάσματα με αριθμό 21-35, τα οποία αντιστοιχούν σε χρόνους έκλυσης 63-105 min παρουσίασαν αυξημένη απορρόφηση UV και συλλέχθηκαν ως υποψήφια ενεργά κλάσματα LGTase. Τέλος, τα κλάσματα που παρουσίασαν ενεργότητα (με όγκο περίπου 54 mL) ενοποιήθηκαν και συμπυκνώθηκαν με υπερδιήθηση. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Amicon με μεμβράνη με μοριακό βάρος αποκοπής 5 kDa. Το συμπύκνωμα, το οποίο είναι το καθαρό εκχύλισμα της LGTase, αποθηκεύτηκε στους 0°C.



Εικόνα 4-19: Χρωματογράφημα κατά τη διεργασία καθαρισμού του ενζύμου.

Η επιβεβαίωση της παρουσίας του ενζύμου LGTase πραγματοποιήθηκε με την παρακάτω διαδικασία

4.5 Επεξεργασία πορτοκαλοχυμού με ΥΥΠ

4.5.1 Μονάδα της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης

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



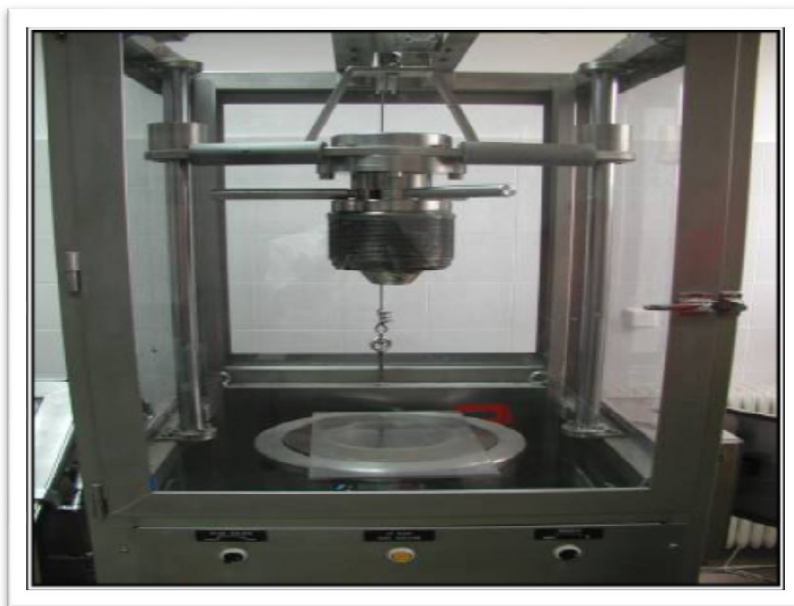
Εικόνα 4-20: Γενική άποψη της μονάδας ΥΥΠ.

Ο πρώτος τύπος (Εικόνα 4-21) περιλαμβάνει μια συστοιχία 6 κυλινδρικών μικροθαλάμων υπερυψηλής πίεσης όγκου 42 mL ο καθένας, με τη δυνατότητα ανεξάρτητου χειρισμού. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται για τη συλλογή κινητικών δεδομένων των αντιδράσεων καταστροφής των παραγόντων αλλοίωσης ή μεταβολής των ποιοτικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών των τροφίμων κατά την επεξεργασία τους με υπερυψηλή πίεση.



Εικόνα 4-21: Λεπτομερής άποψη της μονάδας με τα 6 κελιά ΥΠ των 42 mL.

Ο δεύτερος τύπος (Εικόνα 4-22) περιλαμβάνει ένα θάλαμο υπερυψηλής πίεσης όγκου 1,5 L, ο οποίος χρησιμοποιείται για την παραγωγή και μελέτη μεγαλύτερων ποσοτήτων προϊόντων επεξεργασμένων με την τεχνολογία της υπερυψηλής πίεσης.



Εικόνα 4-22: Λεπτομερής άποψη του θαλάμου ΥΥΠ επεξεργασίας τροφίμων όγκου 1,5 L.

Για τη δημιουργία των υπερυψηλών πιέσεων χρησιμοποιείται ενισχυτής πίεσης (pressure intensifier). Μια σχετικά χαμηλή πίεση λαδιού χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει την επιθυμητή υψηλή πίεση εξόδου. Αυτό επιτυγχάνεται με τη σύνδεση

ενός μικρού εμβόλου με ένα έμβολο λαδιού μεγαλύτερης επιφάνειας. Η πίεση του υγρού μεταφοράς της πίεσης που δρα στη μικρή επιφάνεια αντισταθμίζει την πίεση του λαδιού που δρα στη μεγάλη επιφάνεια. Η πίεση του υγρού μεταφοράς της πίεσης είναι μεγαλύτερη από την πίεση του λαδιού λόγω της αναλογίας των επιφανειών των εμβόλων του λαδιού και του υγρού. Η ρύθμιση έτσι της πίεσης εξόδου του ενισχυτή πίεσης μπορεί να γίνει ρυθμίζοντας την πίεση εισόδου του λαδιού. Ο ενισχυτής πίεσης της συγκεκριμένης μονάδας είναι διπλής δράσης και λειτουργεί με τη βοήθεια μιας υδραυλικής αντλίας (τροφοδοτούμενης από ηλεκτρικό κινητήρα), η οποία διοχετεύει το απαιτούμενο λάδι στον ενισχυτή ισοσταθμίζοντας την πίεση. Μια μικρότερη αντλία χρησιμοποιείται για την κυκλοφορία του λαδιού μέσω ενός συστήματος ψύξης (για τον έλεγχο της θερμοκρασίας του) και ενός φίλτρου λαδιού χαμηλής πίεσης. Ο ενισχυτής πίεσης διαθέτει βαλβίδες ελέγχου εισόδου και εξόδου λειτουργώντας έτσι ως παλινδρομική αντλία. Όταν το υδραυλικό έμβολο του ενισχυτή φτάσει στο τέλος, ενεργοποιεί έναν ηλεκτρονικό διακόπτη και η ροή του λαδιού αντιστρέφεται, καθώς πλέον το έμβολο κινείται στην αντίθετη κατεύθυνση. Νερό ή κάποιο άλλο υγρό χαμηλής πίεσης εισέρχεται στον ενισχυτή. Η πίεση του υγρού αυξάνεται σύμφωνα με την παραπάνω αρχή και μεταβιβάζεται προς τους θαλάμους υπερυψηλής πίεσης μέσω της ροής του υγρού σε σωλήνες από ανοξείδωτο χάλυβα. Χειροκίνητες βαλβίδες ρυθμίζουν την εισαγωγή ή όχι του υγρού σε κάθε έναν από τους θαλάμους. Για λόγους ασφαλείας, το σύστημα περιλαμβάνει ειδικούς δακτυλίους, οι οποίοι διαρρηγνύονται σε περίπτωση προβλήματος για την εκτόνωση της υψηλής πίεσης.

Στα γενικά τεχνικά χαρακτηριστικά της μονάδας ΥΠ αναφέρονται η μέγιστη πίεση λειτουργίας που είναι 1000 MPa και το εύρος της θερμοκρασίας διεργασίας που κυμαίνεται από -40 °C έως +100 °C. Το μέσο μεταφοράς της πίεσης του συστήματος είναι polyglycol ISO viscosity class VG 15 (Resato International BV, Roden, Holland). Για την προστασία και την αποφυγή μόλυνσης του επεξεργαζόμενου τροφίμου, τα δείγματα συσκευάζονται κατάλληλα.

Η χρήση προστατευτικής εξωτερικής συσκευασίας είναι απαραίτητη όχι μόνο για να αποφευχθεί η επαφή της γλυκόλης με το τρόφιμο, αλλά και το φράξιμο της οπής εισόδου/ εξόδου του υγρού μεταφοράς της πίεσης στον πυθμένα των δοχείων πίεσης από τα διάφορα σωματίδια του τροφίμου.

Η πίεση του συστήματος, καθώς και η πίεση στο εσωτερικό του μεγάλου θαλάμου, ελέγχονται και καταγράφονται μέσω δύο μετατροπέων σήματος (transducers), ενώ εμφανίζονται κατά τη διάρκεια λειτουργίας του συστήματος σε PLC οθόνη της μονάδας ΥΠ, καθώς και σε ηλεκτρονικό υπολογιστή συνδεδεμένο με τη μονάδα μέσω κατάλληλου λογισμικού.

Η καταγραφή της θερμοκρασίας στο εσωτερικό καθενός θαλάμου πίεσης του συστήματος γίνεται με τη χρήση θερμοστοιχείων και παρακολουθείται μέσω του ίδιου λογισμικού από την οθόνη του υπολογιστή.

Η πίεση λειτουργίας της μονάδας ρυθμίζεται με τη βοήθεια των πλήκτρων του PLC με βήμα αύξησης ή μείωσης 25 MPa. Για την επίτευξη ταχύτερης ανόδου της πίεσης, υπάρχει δυνατότητα άμεσης συμπίεσης στα 250, 500 και 750 MPa. Ο χρόνος επίτευξης της επιθυμητής πίεσης εξαρτάται από το μέγεθος και την ταχύτητα μεταβολής της πίεσης. Ο ρυθμός αύξησης της πίεσης είναι περίπου 100 MPa/7 s, ενώ ο χρόνος εκτόνωσης της πίεσης είναι μικρότερος από 3 s.

4.5.2 Επεξεργασία του πορτοκαλοχυμού με ΥΥΠ

Για τη μελέτη της επίδρασης της ΥΥΠ στη συγκέντρωση λιμονίνης του χυμού και στη δράση του ενζύμου γλυκοζυλοτρανσφεράση των λιμονοειδών (LGTase) μέσα στον πορτοκαλοχυμό Navel χρησιμοποιήθηκε το σύστημα θαλάμου υπερυψηλής πίεσης 1,5 L. Δείγματα χυμού επεξεργάστηκαν με ΥΥΠ σε πιέσεις εύρους 300-700 MPa για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της ΥΥΠ (300 MPa, 10 min, θερμοκρασία περιβάλλοντος) σε σύστημα χυμού στο οποίο είχε προστεθεί το ένζυμο LGTase. Τα δείγματα συσκευάστηκαν σε πολυστρωματικό (πολυαιθυλένιο-πολυπροπυλένιο) υλικό συσκευασίας κατάλληλο για τρόφιμα και για την αποφυγή διαρροής του δείγματος χρησιμοποιήθηκε και δεύτερη συσκευασία.

Αρχικά, η βαλβίδα εισαγωγής του υγρού πίεσης στο δοχείο ήταν ανοιχτή ώστε η επιθυμητή πίεση του συστήματος να μεταφερθεί σε αυτό. Εφόσον ρυθμίστηκε και επιτεύχθηκε η επιθυμητή πίεση, έκλεισε η βαλβίδα, οπότε ο θάλαμος πίεσης απομονώθηκε και η πίεση διατηρήθηκε σταθερή μέσα σε αυτόν. Η χρονική αυτή στιγμή θεωρήθηκε ως ο χρόνος έναρξης των πειραμάτων ($t=0$), οπότε και εξασφαλίστηκαν οι ισοθερμοκρασιακές και ισοβαρείς συνθήκες του πειράματος. Η βαλβίδα ανοίχτηκε ύστερα από καθορισμένο χρονικό διάστημα που είχε

προσδιοριστεί κατά τον σχεδιασμό του πειράματος. Όλα τα δείγματα μετά την επεξεργασία με ΥΥΠ διατηρήθηκαν υπό κατάψυξη έως τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της λιμονίνης σε κάθε συνθήκη.

4.5.3 Εφαρμογή της LGTase στον πορτοκαλοχυμό

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό του εκχυλίσματος της LGTase έγιναν πειράματα ελέγχου της ικανότητας της να μετατρέψει την πικρή λιμονίνη στον αντίστοιχο άγευστο γλυκοζίτη της. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων.

1^η Σειρά: στην 1^η σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 200 μ L καθαρής LGTase, τα οποία προστέθηκαν σε 30 mL δείγματος παστεριωμένου χυμού και επεξεργάστηκαν με ΥΥΠ στα 300 MPa για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2^η Σειρά: στη 2^η σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 200 μ L καθαρής LGTase, τα οποία προστέθηκαν σε 30 mL δείγματος παστεριωμένου χυμού. Το pH των δειγμάτων χυμού και ενζύμου ρυθμίστηκε σε τιμές 3,2, 5 και 7,5 και στη συνέχεια τα δείγματα αφέθηκαν υπό συνεχή ανάδευση για 40 min στους 37° C.

Η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε με χρήση του αντιδραστηρίου Τρι (υδρόξυμέθυλ)αμινομεθάνιο (*Tris(hydroxymethyl)aminomethane*).

5 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

5.1 Παρουσίαση ποιοτικών χαρακτηριστικών του πορτοκαλοχυμού

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν οι φυσικοχημικές παράμετροι ποιότητας του ελληνικής προέλευσης χυμού από πορτοκάλια Navel σε δείγματα από τρία στάδια της γραμμής παραγωγής. Προσδιορίστηκε, επίσης ποσοτικά η περιεκτικότητα λιμονίνης στο χυμό και έγινε προσπάθεια συσχέτισης της με τις υπόλοιπες φυσικοχημικές παραμέτρους.

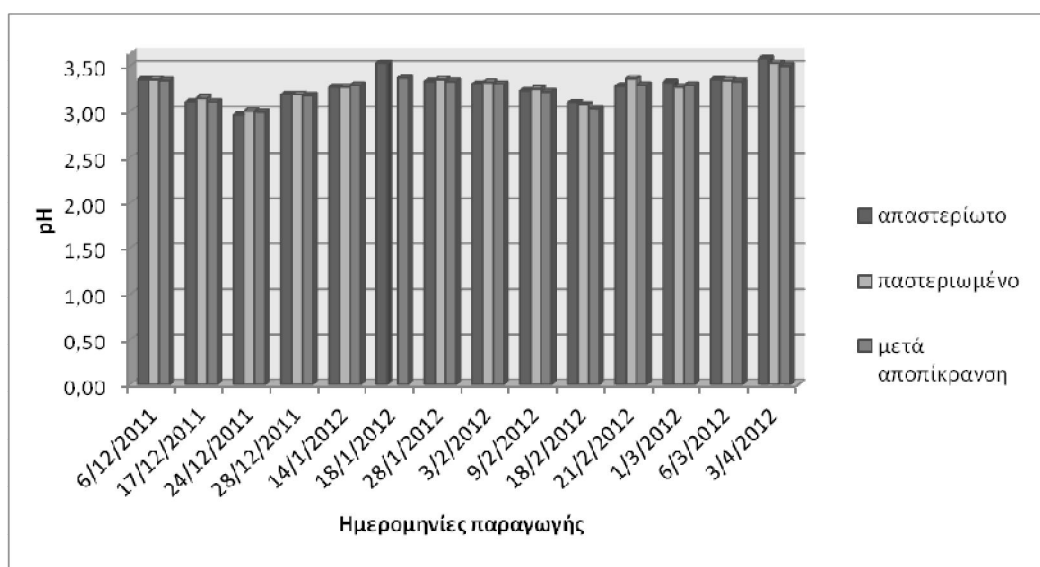
5.1.1 Παρουσίαση αποτελεσμάτων μέτρησης pH

Με βάση τη βιβλιογραφία ο πορτοκαλοχυμός έχει pH μεταξύ 3,5-4. Τα αποτελέσματα των τιμών pH των δειγμάτων που μετρήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 5-1.

Πίνακας 5-1: Αποτελέσματα των τιμών pH των δειγμάτων χυμού πορτοκαλιών ποικιλίας Navel πριν και μετά την παστερίωση και μετά την αποπίκραση κατά τις ημερομηνίες παραγωγής από 6/12/11-3/4/12.

Ημερομηνία παραγωγής	Αpasteρίωτα δείγματα	Πasteριωμένα δείγματα	Δείγματα μετά την αποπίκραση
6/12/11	3,35	3,35	3,34
17/12/11	3,11	3,15	3,11
24/12/11	2,96	3,00	2,99
28/12/11	3,19	3,19	3,18
14/1/12	3,27	3,27	3,29
18/1/12	3,53	-	3,37
28/1/12	3,33	3,35	3,33
3/2/12	3,30	3,32	3,30
9/2/12	3,23	3,25	3,22
18/2/12	3,10	3,08	3,03
21/2/12	3,28	3,36	3,29
1/3/12	3,32	3,27	3,29
6/3/12	3,35	3,34	3,33
3/4/12	3,59	3,53	3,50

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται τα βιβλιογραφικά δεδομένα, εφόσον οι τιμές pH των δειγμάτων κυμαίνονται από 2,99-3,59. Επιπλέον, παρατηρείται ότι η μεταβολή των τιμών pH του χυμού είναι αμελητέα μετά τις διεργασίες παστερίωσης και αποπίκρασης, το οποίο διαπιστώνεται καλύτερα στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 5-1: Παρουσίαση των τιμών pH των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού από τα τρία στάδια παραγωγής ανά ημερομηνία παραγωγής.

Η αμελητέα επίδραση της θερμικής παστερίωσης και της αποπίκρασης στο pH του χυμού έχει διαπιστωθεί και σε έρευνα του Parish (1998).

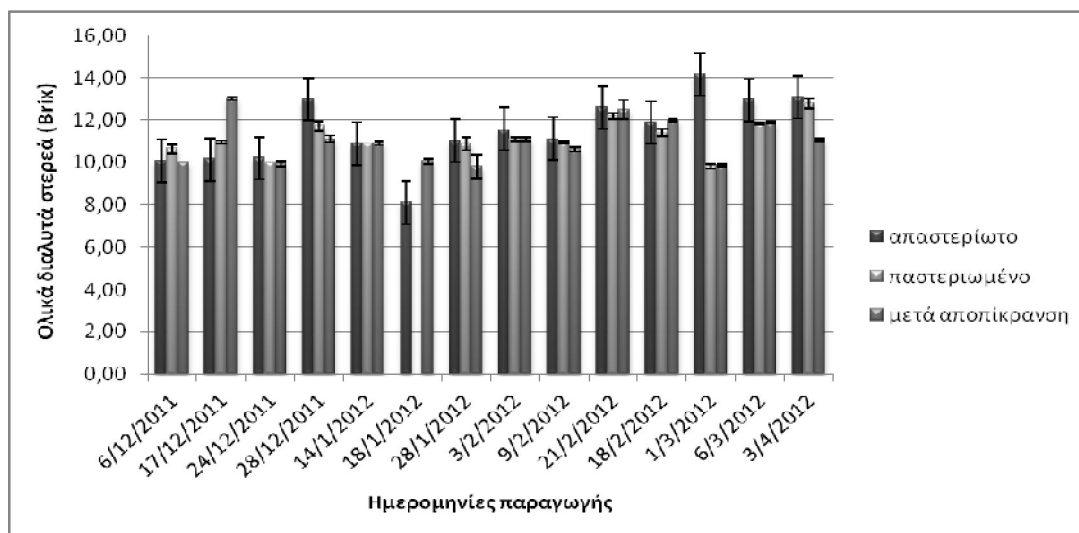
5.1.2 Παρουσίαση αποτελεσμάτων μέτρησης των ολικών διαλυτών στερεών (°Brix)

Τα ολικά διαλυτά στερεά είναι πολύ σημαντικά για τον πορτοκαλοχυμό και αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των συστατικών του. Βιβλιογραφικά έχει διαπιστωθεί ότι τα ολικά διαλυτά στερεά δε μεταβάλλονται λόγω της παστερίωσης και της αποπίκρασης του χυμού (Bull et al., 2004; Parish, 1998).

Στον Πίνακα 5-2 παρουσιάζονται οι τιμές των ολικών διαλυτών στερεών (°Brix) για τα δείγματα χυμού και στο διάγραμμα 5-2 παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 5-2: Αποτελέσματα των τιμών των ολικών διαλυτών στερεών (°Brix) των δειγμάτων χυμού πορτοκαλιών ποικιλίας Navel πριν και μετά την παστερίωση και μετά την αποπύκνωση κατά τις ημερομηνίες παραγωγής από 6/12/11-3/4/12.

Ημερομηνία παραγωγής	Απαστερίωτα δείγματα (°Brix)	Παστεριωμένα δείγματα(°Brix)	Δείγματα μετά την αποπύκνωση (°Brix)
6/12/11	10,07	10,63	10,00
17/12/11	10,13	10,97	13,00
24/12/11	10,20	10,00	9,93
28/12/11	12,97	11,70	11,10
14/1/12	10,87	10,90	10,90
18/1/12	8,13	-	10,03
28/1/12	11,00	10,87	9,80
3/2/12	10,97	11,10	11,10
9/2/12	11,10	10,93	10,60
18/2/12	12,57	12,17	12,47
21/2/12	11,87	11,40	11,97
1/3/12	14,17	9,80	9,87
6/3/12	12,93	11,83	11,87
3/4/12	13,07	12,77	11,07



Διάγραμμα 5-2: Παρουσίαση τιμών °Brix των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού από τα τρία στάδια παραγωγής ανά ημερομηνία παραγωγής.

Από τον Πίνακα 5-2 και το Διάγραμμα 5-2 διαπιστώνεται ότι οι τιμές των ολικών διαλυτών στερεών κυμαίνονται από 8,13-14,17 °Brix. Οι τιμές των απαστερίωτων δειγμάτων είναι κατά μέσο όρο 11,5 °Brix, των παστεριωμένων και των μετά την αποπύκρωση 11 °Brix περίπου. Αυτό επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που αναφέρουν ότι η συγκέντρωση των ολικών διαλυτών στερεών είναι ανεξάρτητη του σταδίου παραγωγής και δεν επηρεάζεται από τη θερμική παστερίωση και την αποπύκρωση. Εδώ πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι στο διάγραμμα παρατηρείται έντονη αύξηση των ολικών διαλυτών στερεών στο δείγμα μετά την αποπύκρωση στις 17/12/2011 και στο απαστερίωτο δείγμα στις 1/3/2012 σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα της ίδιας ημερομηνίας. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται σε λάθος χειρισμό κατά τη δειγματοληψία του χυμού, εφόσον στις υπόλοιπες ημερομηνίες παραγωγής η συγκέντρωση των ολικών διαλυτών στερεών παραμένει σταθερή πριν και μετά την παστερίωση και μετά την αποπύκρωση. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα δείγματα εμφανίζουν έντονες διαφοροποιήσεις και κατά τη μέτρηση άλλων ποιοτικών παραμέτρων, που παρουσιάζονται παρακάτω.

Παρόλα αυτά τη βιομηχανία παραγωγής πορτοκαλοχυμού ενδιαφέρει περισσότερο η διακύμανση του κλάσματος Brix/Οξύτητα κατά τη διάρκεια της παραγωγικής περιόδου. Αυτό συμβαίνει γιατί η οξύτητα που προσδίδουν στη γεύση του χυμού τα οξέα και η γλυκύτητα των σακχάρων ανιχνεύονται από γειτονικά αισθητήρια όργανα

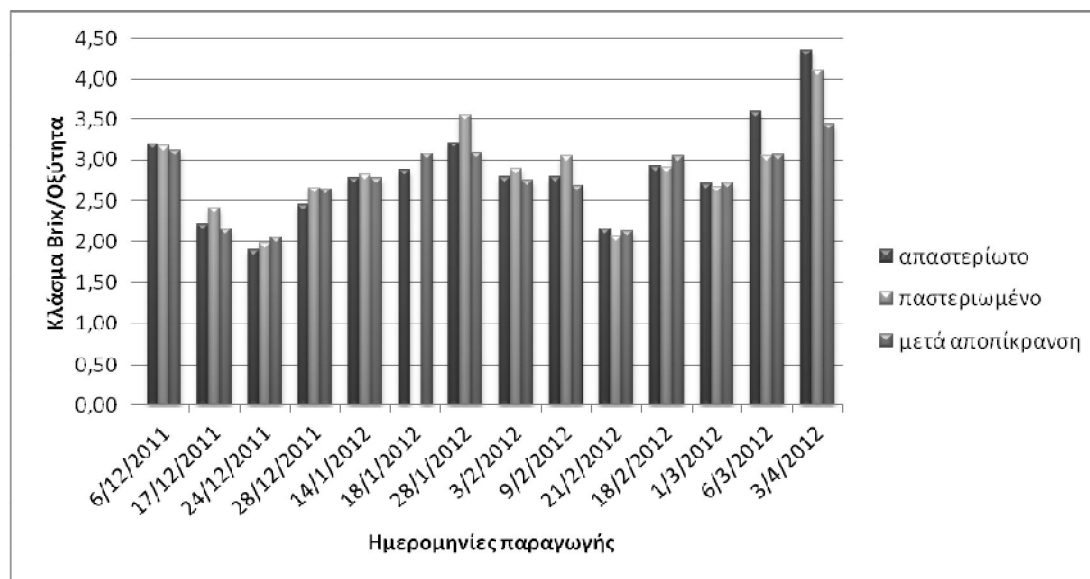
της γλώσσας του καταναλωτή. Ανάμεσα στις δύο παραμέτρους τα επίπεδα της οξύτητας επηρεάζουν περισσότερο την τιμή του κλάσματος (Kimball, 1999). Στον Πίνακα 5-3 παρουσιάζονται τα κλάσματα Βrix/Οξύτητα για τα δείγματα πορτοκαλοχυμού που μελετήθηκαν.

Πίνακας 5-3: Υπολογισμός κλάσματος °Brix/Οξύτητα των δειγμάτων χυμού πορτοκαλιών ποικιλίας Navel πριν και μετά την παστερίωση και μετά την αποπίκραση κατά τις ημερομηνίες παραγωγής από 6/12/11-3/4/12.

Ημερομηνία παραγωγής	Απαστερίωτα δείγματα	Παστεριωμένα δείγματα	Δείγματα μετά την αποπίκραση
6/12/2011	3,19	3,16	3,12
17/12/2011	2,22	2,41	2,15
24/12/2011	1,90	1,99	2,05
28/12/2011	2,45	2,66	2,64
14/1/2012	2,79	2,82	2,78
18/1/2012	2,88	-	3,07
28/1/2012	3,22	3,56	3,09
3/2/2012	2,80	2,89	2,75
9/2/2012	2,79	3,04	2,69
18/2/2012	2,17	2,06	2,13
21/2/2012	2,93	2,91	3,04
1/3/2012	2,71	2,67	2,73
6/3/2012	3,60	3,05	3,06
3/4/2012	4,36	4,10	3,45

Από τα δεδομένα του Πίνακα 5-3 διαπιστώνεται ότι το κλάσμα των ολικών διαλυτών στερεών προς την οξύτητα του χυμού δεν επηρεάζεται από τις διεργασίες παστερίωσης και αποπίκρασης, εφόσον παραμένει σχεδόν σταθερό για όλα τα

δείγματα που ανήκουν στην ίδια ημερομηνία παραγωγής. Αυτό φαίνεται και στο Διάγραμμα 5-3.



Διάγραμμα 5-3: Παρουσίαση των τιμών του κλάσματος °Brix/Οξύτητα των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού από τα τρία στάδια παραγωγής ανά ημερομηνία παραγωγής.

Η σταθερότητα του κλάσματος °Brix/Οξύτητα ήταν αναμενόμενη εφόσον όπως προέκυψε από τις πειραματικές μετρήσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων οι τιμές των ολικών διαλυτών στερεών (°Brix) και της οξύτητας (A) παραμένουν σταθερές κατά την παραγωγή του χυμού.

5.1.3 Παρουσίαση αποτελεσμάτων μέτρησης ολικών οξέων του πορτοκαλοχυμού

Τα οργανικά οξέα αποτελούν και αυτά πολύ σημαντικά συστατικά του χυμού, γιατί επηρεάζουν τη γεύση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Τα κυριότερα οξέα που περιέχει ο πορτοκαλοχυμός είναι το κιτρικό οξύ και το μηλικό οξύ.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία η οξύτητα των δειγμάτων εκφράστηκε σε γραμμάρια κιτρικού οξέος ανά 100 mL πορτοκαλοχυμού και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5-4 και το Διάγραμμα 5-4.

Πίνακας 5-4: Αποτελέσματα της οξύτητας (Α) (g κιτρικού οξέος/100 mL χυμού) των δειγμάτων χυμού πορτοκαλιών ποικιλίας Navel πριν και μετά την παστερίωση και μετά την αποπύκνωση κατά τις ημερομηνίες παραγωγής από 6/12/11-3/4/12.

Ημερομηνία παραγωγής	Απαστερίωτα δείγματα (g/100 mL)	Παστεριωμένα δείγματα (g/100 mL)	Δείγματα μετά την αποπύκνωση (g/100 mL)
6/12/2011	3,15	3,36	3,21
17/12/2011	4,57	4,55	6,03
24/12/2011	5,36	5,03	4,84
28/12/2011	5,30	4,40	4,21
14/1/2012	3,90	3,86	3,92
18/1/2012	2,82	-	3,27
28/1/2012	3,42	3,05	3,17
3/2/2012	4,13	3,84	4,03
9/2/2012	3,98	3,59	3,94
18/2/2012	5,80	5,90	5,84
21/2/2012	4,05	3,92	3,94
1/3/2012	5,23	3,67	3,61
6/3/2012	3,59	3,88	3,88
3/4/2012	3,00	3,11	3,21



Διάγραμμα 5-4: Παρουσίαση των τιμών οξύτητας των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού από τα τρία στάδια παραγωγής ανά ημερομηνία παραγωγής.

Οι τιμές της οξύτητας του πορτοκαλοχυμού κυμάνθησαν από 2,82 έως 6,03 g/100 mL. Η οξύτητα των τριών διαφορετικών δειγμάτων ανά ημερομηνία παραγωγής δε μεταβλήθηκε σημαντικά, καθώς τα απαστερίωτα δείγματα είχαν μέση οξύτητα ίση με 4,16 g/100 mL, τα παστεριωμένα 4,01 g/100 mL και τα μετά την αποπύκνωση δείγματα 4,08 g/100 mL. Από τη σύγκριση των μέσων τιμών οξύτητας προκύπτει ότι οι διεργασίες της παστερίωσης και της αποπύκνωσης επηρεάζουν ελάχιστα τη συγκέντρωση των ολικών οξέων του χυμού, το οποίο αναφέρεται και βιβλιογραφικά (Vervoort et al., 2011). Στο διάγραμμα, ξεχωρίζουν το μετά την αποπύκνωση δείγμα στις 17/12/2011 και το απαστερίωτο δείγμα στις 1/3/2012 και στις 28/12/2011, τα οποία εμφανίζουν αρκετά μεγάλη οξύτητα. Αυτό οφείλεται πιθανότατα σε λάθος χειρισμό κατά τη δειγματοληψία. Τέλος, ξεχωρίζουν τα δείγματα και των τριών σταδίων παραγωγής στις 18/2/2012, τα οποία εμφανίζουν αρκετά αυξημένη οξύτητα σε σχέση με τα υπόλοιπα. Παρόλα αυτά οι τιμές οξύτητας για τη συγκεκριμένη ημερομηνία είναι κοντινές και για τα τρία δείγματα, οπότε η αυξημένη τιμή της πιθανόν να οφείλεται σε άλλους παράγοντες, όπως οι καιρικές συνθήκες και ο τρόπος συγκομιδής του φρούτου.

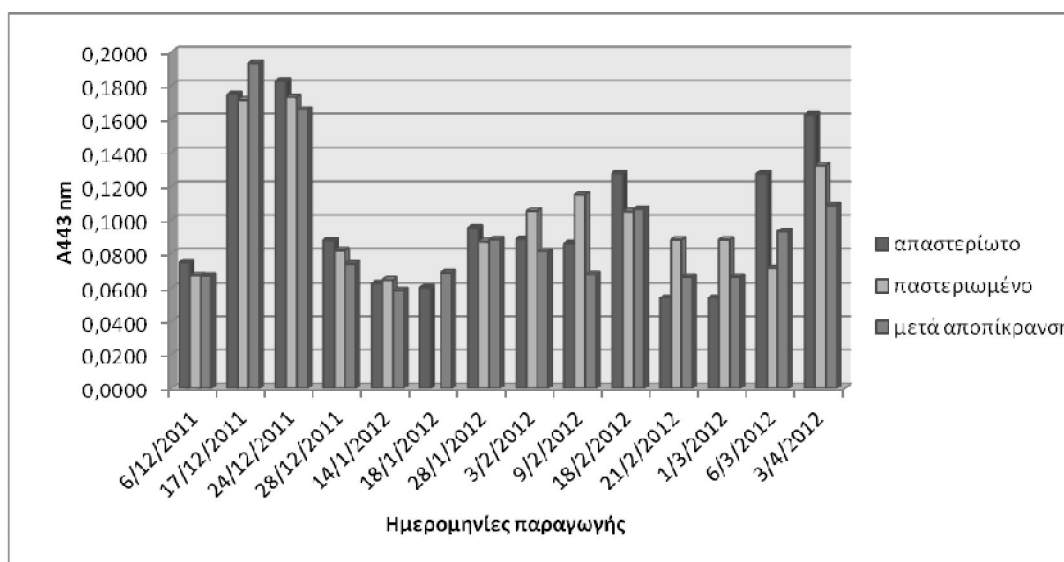
5.1.4 Παρουσίαση αποτελεσμάτων απορρόφησης καροτενοειδών, πολυφαινολών και φλαβονοειδών

Η περιεκτικότητα των καροτενοειδών στο χυμό καθορίζει το χρώμα του και για αυτό το λόγο τυχόν αλλαγές στη συγκέντρωση τους επηρεάζει την εμφάνιση του χυμού και τον καθιστά λιγότερο αποδεκτό από τους καταναλωτές. Βάση μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί αποδεικνύεται ότι η συγκέντρωση των καροτενοειδών δε μεταβάλλεται σημαντικά κατά την παραγωγή του χυμού (*Vervoot et al., 2011; Stinco et al., 2013*). Αυτό διαπιστώθηκε και κατά τη μέτρηση των καροτενοειδών στα δείγματα πορτοκαλοχυμού που αναλύονται στην παρούσα μελέτη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5-5.

Πίνακας 5-5: Αποτελέσματα της απορρόφησης των καροτενοειδών στα 443 nm δειγμάτων χυμού πορτοκαλιών ποικιλίας Navel πριν και μετά την παστερίωση και μετά την αποπίκραση κατά τις ημερομηνίες παραγωγής από 6/12/11-3/4/12.

Ημερομηνία παραγωγής	Απαστερίωτα δείγματα	Παστεριωμένα δείγματα	Δείγματα μετά την αποπίκραση
6/12/2011	0,0746	0,0670	0,0668
17/12/2011	0,1746	0,1713	0,1931
24/12/2011	0,1825	0,1730	0,1653
28/12/2011	0,0880	0,0818	0,0739
14/1/2012	0,0625	0,0645	0,0585
18/1/2012	0,0600	-	0,0687
28/1/2012	0,0953	0,0872	0,0884
3/2/2012	0,0887	0,1051	0,0810
9/2/2012	0,0862	0,1152	0,0676
18/2/2012	0,1275	0,1048	0,1063
21/2/2012	0,0540	0,0883	0,0662
1/3/2012	0,0540	0,0883	0,0662
6/3/2012	0,1272	0,0713	0,0932
3/4/2012	0,1620	0,1320	0,1086

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5-5 η απορρόφηση των καροτενοειδών μεταβάλλεται ελάχιστα ανάμεσα στα εξεταζόμενα στάδια παραγωγής. Οι μέσες τιμές απορρόφησης για τα απαστερίωτα δείγματα είναι 0,1026, 0,1038 για τα παστεριωμένα και 0,931 για τα μετά την αποπίκραση, δηλαδή υπάρχει μια μικρή αύξηση των καροτενοειδών στα παστεριωμένα δείγματα, η οποία είναι αμελητέα. Αυτά παρουσιάζονται πιο παραστατικά στο Διάγραμμα 5-5.



Διάγραμμα 5-5: Παρουσίαση των απορροφήσεων των καροτενοειδών των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού από τα τρία στάδια παραγωγής ανά ημερομηνία παραγωγής.

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα οι απορροφήσεις των καροτενοειδών των δειγμάτων που ανήκουν στην ίδια ημερομηνία δε μεταβάλλονται σημαντικά μετά τη θερμική παστερίωση και την αποπίκραση, όπως αναφέρθηκε και από τη βιβλιογραφία. Παρόλα αυτά στο διάγραμμα ξεχωρίζουν τα παστεριωμένα δείγματα στις 3/2/2012, 9/2/2012, 21/2/2012 και 1/3/2012 και τα απαστερίωτα στις 18/2/2012, 6/3/2012 και 3/4/2012, τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη απορρόφηση καροτενοειδών σε σχέση με τα υπόλοιπα των ίδιων ημερομηνιών. Αυτό οφείλεται σε λάθος χειρισμό κατά τη δειγματοληψία ή σε σφάλμα κατά την προετοιμασία του δείγματος πριν την εισαγωγή του στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Επίσης, ιδιαίτερα υψηλές απορροφήσεις παρουσιάζουν τα δείγματα στις 17 και 24/12/2011, οι οποίες δε διαφοροποιούνται κατά τα στάδια παραγωγής, οπότε θεωρούνται αποδεκτές.

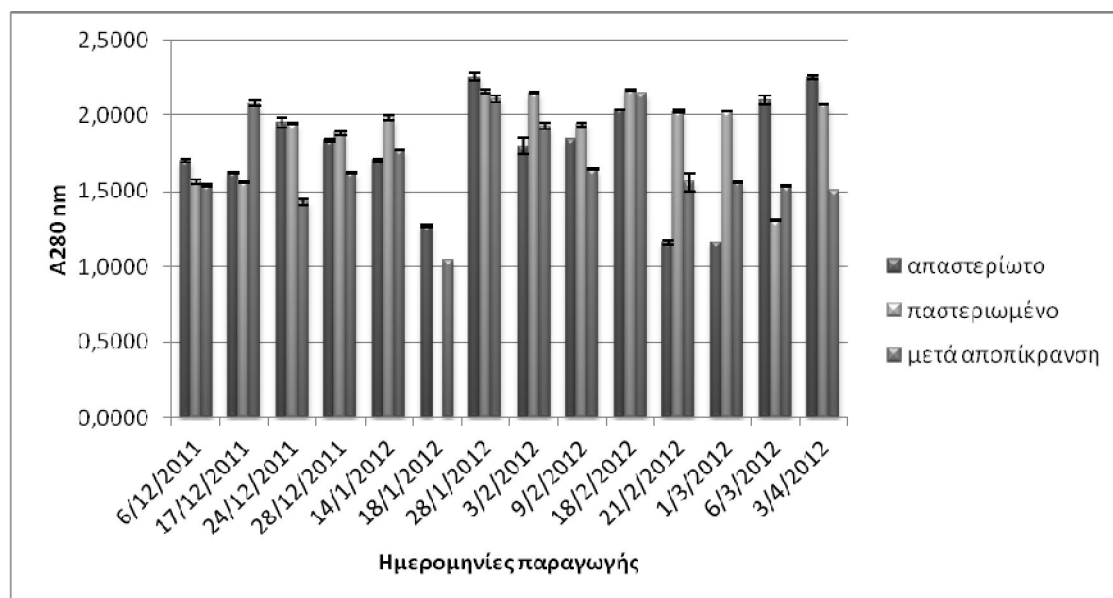
Οι απορροφήσεις των φλαβονοειδών, που περιέχονται στον πορτοκαλοχυμό παρουσιάζονται στον Πίνακα 5-6.

Πίνακας 5-6: Αποτελέσματα της απορρόφησης των φλαβονοειδών στα 280 nm δειγμάτων χυμού πορτοκαλιών ποικιλίας Navel πριν και μετά την παστερίωση και μετά την αποπύκνωση κατά τις ημερομηνίες παραγωγής από 6/12/11-3/4/12.

Ημερομηνία παραγωγής	Απαστερίωτα δείγματα	Παστεριωμένα δείγματα	Δείγματα μετά την αποπύκνωση
6/12/2011	1,7041	1,5680	1,5448
17/12/2011	1,6252	1,5625	2,0827
24/12/2011	1,9520	1,9470	1,4297
28/12/2011	1,8412	1,8858	1,6254
14/1/2012	1,7062	1,9877	1,7736
18/1/2012	1,2752	--	1,0455
28/1/2012	2,2529	2,1609	2,1069
3/2/2012	1,8010	2,1510	1,9323
9/2/2012	1,8512	1,9429	1,6485
18/2/2012	2,0367	2,1702	2,1524
21/2/2012	1,1660	2,0270	1,5635
1/3/2012	1,1660	2,0270	1,5635
6/3/2012	2,1018	1,3080	1,5376
3/4/2012	2,2536	2,0751	1,5089

Με βάση τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα οι μέσες τιμές των απορροφήσεων για τα απαστερίωτα, τα παστεριωμένα και τα μετά την αποπύκνωση δείγματα είναι 1,7666, 1,9087, 1,6797, αντίστοιχα. Στην περίπτωση των φλαβονοειδών παρατηρείται μια μικρή μείωση στα μετά την αποπύκνωση δείγματα σε σχέση με τα απαστερίωτα. Η μείωση της απορρόφησης των φλαβονοειδών στα μετά την αποπύκνωση δείγματα δικαιολογείται, καθώς κάποια από τα φλαβονοειδή που περιέχει ο πορτοκαλοχυμός,

όπως η ναριγκίνη, η νεοεσπεριδίνη και η νεοεριοκτιτρίνη, του προσδίδουν πικρή γεύση (Stinco et al., 2013; Pichaiyongvongdee et al., 2009) και ενδεχομένως τα συστατικά αυτά απορροφώνται από τη ρητίνη Alimentech P-495 κατά τη διεργασία της αποπίκρασης. Τα δεδομένα του Πίνακα 5-6 παριστάνονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 5-6: Παρουσίαση των απορροφήσεων των φλαβονοειδών των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού από τα τρία στάδια παραγωγής ανά ημερομηνία παραγωγής.

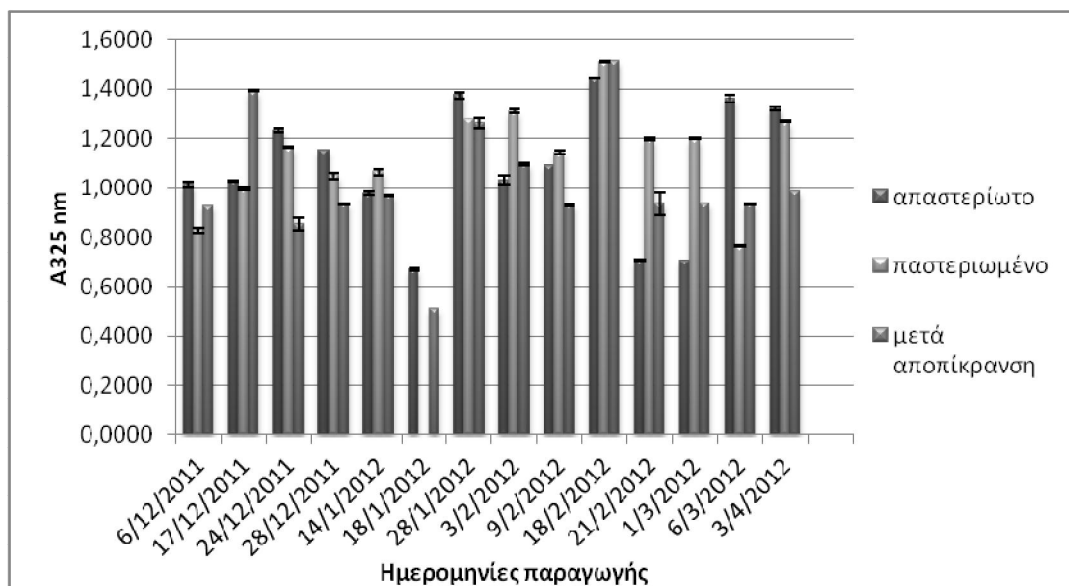
Στο Διάγραμμα 5-6 ξεχωρίζουν τα παστεριωμένα δείγματα στις 21/2/2012 και 1/3/2012, το απαστερίωτο δείγμα στις 6/3/2012 και το μετά την αποπίκραση στις 17/12/2011, τα οποία εμφανίζουν μεγάλη απορρόφηση φλαβονοειδών σε σχέση με τα δείγματα των άλλων δύο σταδίων παραγωγής των ίδιων ημερομηνιών, τα οποία εμφανίζουν κοντινές απορροφήσεις. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται σε πιθανό πειραματικό σφάλμα κατά την προετοιμασία του δείγματος.

Οι τιμές των απορροφήσεων των πολυφαινολών παρουσιάζονται στον Πίνακα 5-7 και στο Διάγραμμα 5-7.

Πίνακας 5-7: Αποτελέσματα της απορρόφησης πολυφαινολών στα 325 nm δειγμάτων χυμού πορτοκαλιών ποικιλίας Navel πριν και μετά την παστερίωση και μετά την αποπίκραση κατά τις ημερομηνίες παραγωγής από 6/12/11-3/4/12.

Ημερομηνία παραγωγής	Απαστερίωτα δείγματα	Παστεριωμένα δείγματα	Δείγματα μετά την αποπίκραση
6/12/2011	1,0111	0,8261	0,9249
17/12/2011	1,0267	0,9969	1,3936
24/12/2011	1,2331	1,1659	0,8525
28/12/2011	1,1530	1,0480	0,9355
14/1/2012	0,9773	1,0633	0,9684
18/1/2012	0,6692	-	0,5098
28/1/2012	1,3751	1,2767	1,2633
3/2/2012	1,0288	1,3096	1,0951
9/2/2012	1,0906	1,1443	0,9293
18/2/2012	1,4434	1,5066	1,5104
21/2/2012	0,7038	1,1991	0,9353
1/3/2012	0,7038	1,1991	0,9353
6/3/2012	1,3607	0,7643	0,9338
3/4/2012	1,3209	1,2701	0,9837

Οι μέσες τιμές απορρόφησης των πολυφαινολών είναι 1,0784 για τα απαστερίωτα δείγματα, 1,1361 για τα παστεριωμένα και 1,0122 για τα μετά την αποπίκραση δείγματα. Γενικά, στις τιμές απορρόφησης των πολυφαινολών δεν παρατηρούνται έντονες διακυμάνσεις ανάμεσα στα δείγματα από τα διαφορετικά στάδια παραγωγής. Αυτό φαίνεται και στο Διάγραμμα 5-7.



Διάγραμμα 5-7: Παρουσίαση των απορροφήσεων των πολυφαινολών των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού από τα τρία στάδια παραγωγής ανά ημερομηνία παραγωγής.

Παρατηρώντας τα διαγράμματα 5-6 και 5-7, παρατηρείται ότι οι τιμές απορρόφησης των πολυφαινολών παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις στα ίδια δείγματα με αυτά που αναφέρθηκαν στα φλαβονοειδή. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται λογικό, εφόσον τα φλαβονοειδή ως ενώσεις ανήκουν στην κατηγορία των φαινολών.

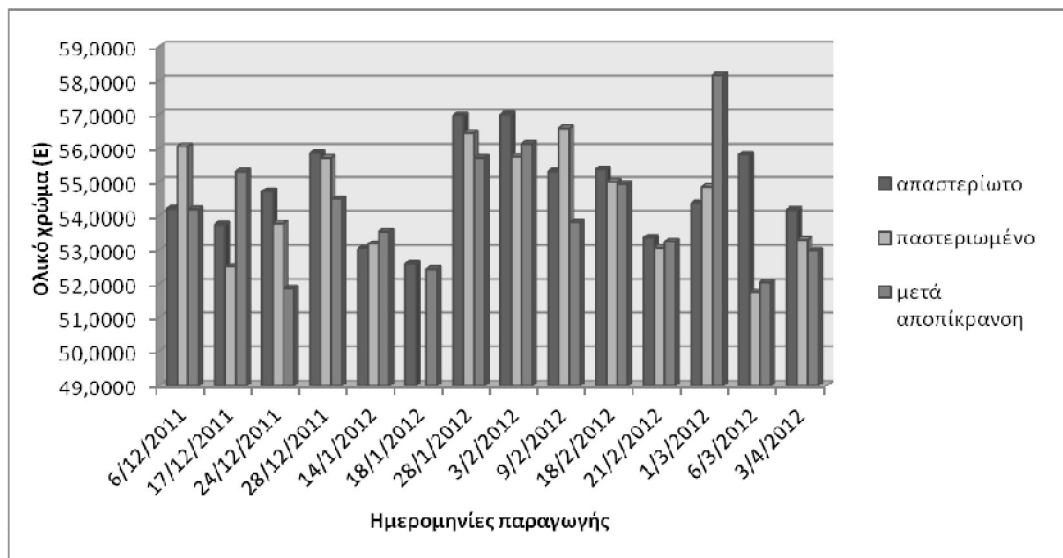
5.1.5 Παρουσίαση αποτελεσμάτων μέτρησης χρώματος

Προηγούμενες μελέτες πάνω στον πορτοκαλοχυμό έχουν αποδείξει ότι κατά τη θερμική παστερίωση αυξάνεται ο παράγοντας L που καθορίζει τη φωτεινότητα του χυμού και η παράμετρος a, η οποία υποδεικνύει τη διακύμανση του πράσινου και του κόκκινου χρώματος. Η αύξηση της παραμέτρου a υποδεικνύει ότι το χρώμα του χυμού κινείται προς την κόκκινη περιοχή. Η παράμετρος b του χρώματος που καθορίζει τη διακύμανση ανάμεσα στο κίτρινο και το μπλε χρώμα αυξάνεται και έτσι το χρώμα του χυμού γίνεται πιο κίτρινο (Cortes et al., 2008). Κατά τη διεργασία της αποπύκρωσης παρατηρείται αύξηση της παραμέτρου a και μείωση της φωτεινότητας του χυμού, ενώ το χρώμα και η παράμετρος b παραμένουν σταθερά. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ο χυμός μετά την αποπύκρωση να είναι λιγότερο φωτεινός και πιο κόκκινος (Stinco et al., 2013).

Στον Πίνακα 5-8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ολικού χρώματος των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού που εξετάστηκαν.

Πίνακας 5-8: Αποτελέσματα μέτρησης ολικού χρώματος (E) των δειγμάτων χυμού πορτοκαλιών ποικιλίας Navel πριν και μετά την παστερίωση και μετά την αποπίκραση κατά τις ημερομηνίες παραγωγής από 6/12/11-3/4/12.

Ημερομηνία παραγωγής	Απαστερίωτα δείγματα	Παστεριωμένα δείγματα	Δείγματα μετά την αποπίκραση
6/12/2011	54,1993	56,0708	54,1804
17/12/2011	53,7461	52,5108	55,3029
24/12/2011	54,7263	53,7758	51,8692
28/12/2011	55,8499	55,7060	54,4869
14/1/2012	53,0271	53,1838	53,5485
18/1/2012	52,5955	-	52,4320
28/1/2012	56,9689	56,4519	55,7020
3/2/2012	57,0010	55,7464	56,1394
9/2/2012	55,3030	56,5917	53,8208
18/2/2012	55,3672	55,0061	54,9370
21/2/2012	53,3743	53,0655	53,2528
1/3/2012	54,3527	54,8552	58,1494
6/3/2012	55,7984	51,7449	52,0429
3/4/2012	54,1669	53,3093	52,9750



Διάγραμμα 5-8: Παρουσίαση των τιμών ολικού χρώματος (E) των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού από τα τρία στάδια παραγωγής ανά ημερομηνία παραγωγής.

Όπως διαπιστώνεται από το Διάγραμμα 5-8 οι διεργασίες της θερμικής παστερίωσης και της αποπύκνωσης επηρεάζουν το ολικό χρώμα του πορτοκαλοχυμού. Συγκεκριμένα, η τιμή του ολικού χρώματος είναι υψηλότερη στα ασπαστερίωτα δείγματα και μειώνεται στα παστεριωμένα και τα μετά την αποπύκνωση. Αυτό οφείλεται στη μεταβολή των παραμέτρων L, a, b μετά την επεξεργασία του χυμού, οι οποίες μεταβάλλονται κατά τον τρόπο που διαπιστώθηκε και σε προηγούμενες μελέτες, που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Από το συμπέρασμα αυτό αποκλίνουν τα παστεριωμένα δείγματα στις 6/12/2011 και 9/2/2012 και τα μετά την αποπύκνωση στις 17/12/2011 και 1/3/2012, τα οποία εμφανίζουν υψηλότερες τιμές ολικού χρώματος σε σχέση με τα αντίστοιχα ασπαστερίωτα δείγματα χυμού. Αυτές οι αποκλίσεις των τιμών οφείλονται πιθανόν σε λάθος χειρισμό κατά τη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε στη βιομηχανία.

5.1.6 Παρουσίαση αποτελεσμάτων μέτρησης L-ασκορβικού οξέος

Το L-ασκορβικό οξύ είναι το πιο σημαντικό συστατικό του πορτοκαλοχυμού και ο κυριότερος ίσως λόγος κατανάλωσης του. Το L-ασκορβικό οξύ είναι ένα ιδιαίτερα θερμοευαίσθητο συστατικό του χυμού, το οποίο οξειδώνεται κατά τη θερμική επεξεργασία του χυμού αλλά και κατά τη διάρκεια αποθήκευσης. Ο ρυθμός οξείδωσης εξαρτάται άμεσα από τις εφαρμοζόμενες θερμοκρασίες επεξεργασίας του

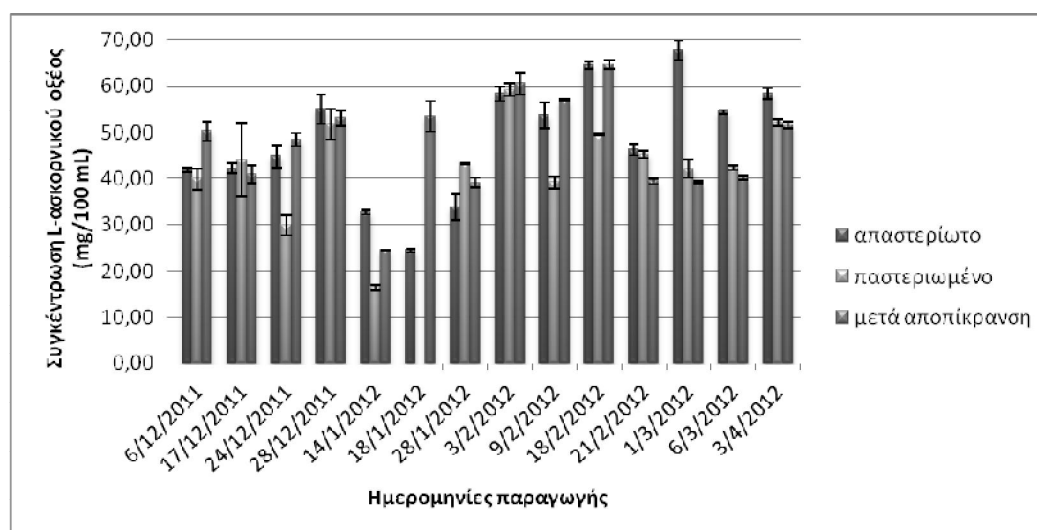
χυμού, καθώς έντονη θέρμανση επιταχύνει την οξείδωση του L-ασκορβικού οξέος σε άλλες ενώσεις (Vervoort *et al.*, 2011; Polydera *et al.*, 2005). Για αυτό το λόγο η μέτρηση της περιεκτικότητας του L-ασκορβικού οξέος στο χυμό είναι απαραίτητη, έτσι ώστε να μελετηθεί η επίδραση της βιομηχανικής παστερίωσης και αποπίκρασης στη συγκέντρωσή του. Στον Πίνακα 5-9 δίνεται η συγκέντρωση του L-ασκορβικού οξέος στα δείγματα πορτοκαλοχυμού ποικιλίας Navel εκφρασμένη σε mg L-ασκορβικού οξέος/100 mL χυμού.

Πίνακας 5-9: Αποτελέσματα μέτρησης συγκέντρωσης L-ασκορβικού οξέος των δειγμάτων χυμού πορτοκαλιών ποικιλίας Navel πριν και μετά την παστερίωση και μετά την αποπίκραση κατά τις ημερομηνίες παραγωγής από 6/12/11-3/4/12.

Ημερομηνία παραγωγής	Απαστερίωτα δείγματα (mg/100 mL)	Παστεριωμένα δείγματα (mg/100 mL)	Δείγματα μετά την αποπίκραση (mg/100 mL)
6/12/2011	41,86	39,86	50,29
17/12/2011	42,17	44,09	41,00
24/12/2011	44,88	29,73	48,47
28/12/2011	55,02	51,75	52,91
14/1/2012	32,70	16,50	24,52
18/1/2012	24,52	-	53,37
28/1/2012	33,84	43,39	39,09
3/2/2012	58,29	59,16	60,40
9/2/2012	53,68	39,18	56,96
18/2/2012	64,39	49,51	64,50
21/2/2012	46,31	45,37	39,41
1/3/2012	67,81	42,12	39,28
6/3/2012	54,41	42,30	40,28
3/4/2012	58,38	52,00	51,59

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 5-9 διαπιστώνεται ότι τα δείγματα των ημερομηνιών 21/2/2012, 1/3/2012, 6/3/2012 και 3/4/2012 παρουσιάζουν μείωση της συγκέντρωσης του L-ασκορβικού οξέος μετά τις διεργασίες παστερίωσης και αποπίκρασης. Τα απαστερίωτα δείγματα αυτών των ημερομηνιών έχουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε L-ασκορβικό οξύ, ακολουθούν τα παστεριωμένα και τα μετά την αποπίκραση δείγματα, τα οποία έχουν τη μικρότερη περιεκτικότητα. Η παρατηρούμενη μείωση οφείλεται στην αύξηση του ρυθμού οξειδωσης του L-ασκορβικού οξέος λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που εφαρμόζονται.

Κατά τις υπόλοιπες ημερομηνίες παραγωγής τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται. Τα δείγματα και των τριών σταδίων παραγωγής στις 17/12/2012, 28/12/2011, 28/1/2012 και 3/2/2012 παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές συγκέντρωσης του L-ασκορβικού οξέος, το οποίο υποδηλώνει, σε αντίθεση με τα παραπάνω, ότι οι διεργασίες παστερίωσης και αποπίκρασης δεν επηρέασαν το L-ασκορβικό οξύ. Στις 6/12/2011 και 18/1/2012 τα απαστερίωτα και τα παστεριωμένα δείγματα παρουσιάζουν παρόμοιες συγκεντρώσεις L-ασκορβικού οξέος, ενώ η συγκέντρωση στα δείγματα μετά την αποπίκραση αυξάνεται. Τέλος, στα μετά την αποπίκραση δείγματα και στα απαστερίωτα στις 24/12/2011, 14/1/2012, 9/2/2012 και 18/2/2012 παρατηρούνται παρόμοιες τιμές L-ασκορβικού οξέος, ενώ τα παστεριωμένα δείγματα εμφανίζουν μείωση. Τα παραπάνω παριστάνονται γραφικά στο Διάγραμμα 5-9.



Διάγραμμα 5-9: Παρουσίαση της συγκέντρωσης L-ασκορβικού οξέος των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού από τα τρία στάδια παραγωγής ανά ημερομηνία παραγωγής.

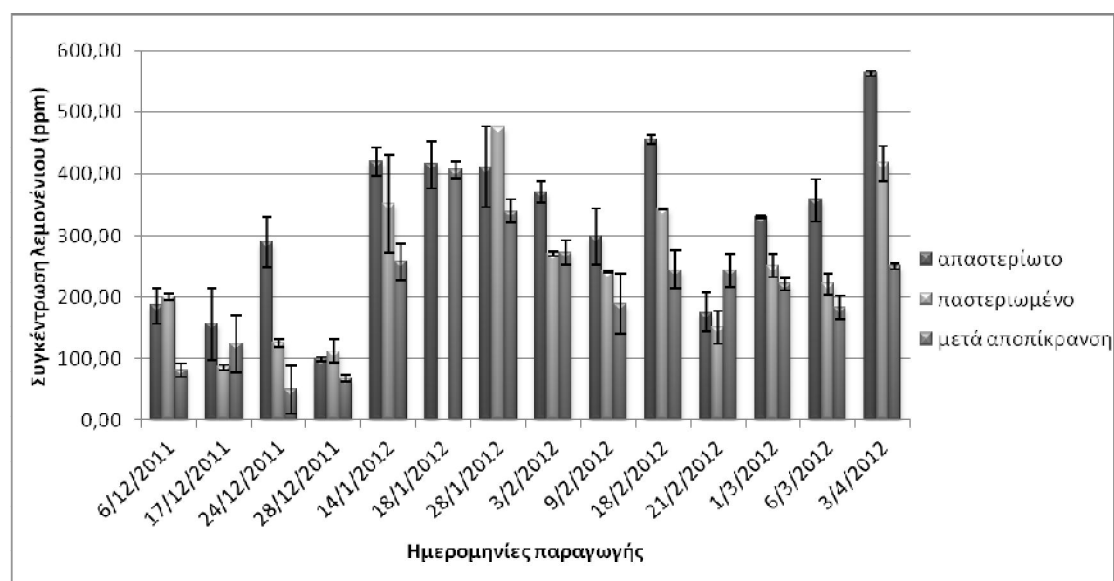
5.1.7 Ποσοτικός προσδιορισμός λεμονένιου

Το λεμονένιο ανήκει στη χημική κατηγορία των τερπένιων υδρογονανθράκων. Αυτό μαζί με άλλες αρωματικές ενώσεις, όπως το μυρκένιο, το α-πινένιο, τη δεκανάλη, την οκτανάλη και τη λιναλόλη καθορίζουν σε πολύ μεγάλο βαθμό το άρωμα του πορτοκαλοχυμού (*Farnworth et al., 2001*).

Το λεμονένιο βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στον επεξεργασμένο πορτοκαλοχυμό σε σχέση με το φρεσκοστυμένο και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το μεγαλύτερο μέρος του λεμονένιου προέρχεται από την πούλπα και αποδεσμεύεται κατά τη διάρκεια της μηχανικής πίεσης.

Έρευνες έχουν αποδείξει την αρνητική επίδραση της παστερίωσης στη συγκέντρωση του λεμονένιου του πορτοκαλοχυμού, εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας που εφαρμόζεται (*Farnworth et al., 2001*).

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων χυμού Navel που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 5-10.



Διάγραμμα 5-10: Παρουσίαση της συγκέντρωσης λεμονένιου των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού από τα τρία στάδια παραγωγής ανά ημερομηνία παραγωγής.

Από το διάγραμμα διαπιστώνεται ότι οι διεργασίες παστερίωσης και αποπύκνωσης μειώνουν τη συγκέντρωση του λεμονένιου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το λεμονένιο ως πτητικό αρωματικό επηρεάζεται από τις υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια της παστερίωσης και της αποπύκνωσης του χυμού.

Από τα αποτελέσματα αυτά αποκλίνει το μετά την αποπίκραση δείγμα στις 21/2/2012, στο οποίο η συγκέντρωση του λεμονένιου είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή του απαστερίωτου δείγματος.

5.1.8 Ποσοτικός προσδιορισμός της λιμονίνης

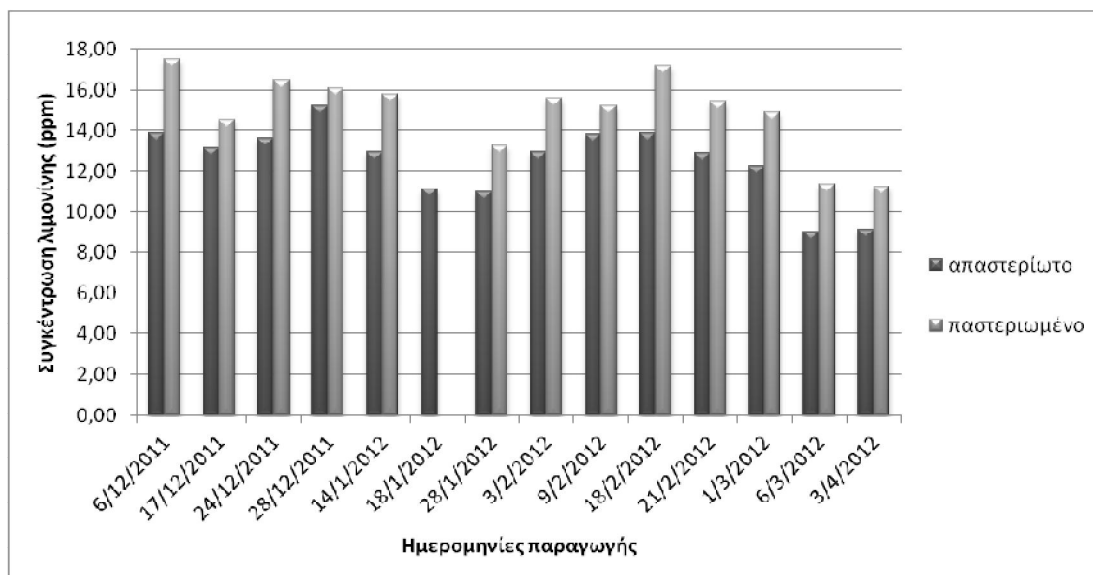
Ο χυμός από πορτοκάλια Navel έχει έντονα πικρή γεύση, η οποία οφείλεται κυρίως στην περιεκτικότητα του χυμού σε λιμονοειδή και ιδιαίτερα στη λιμονίνη. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι συγκέντρωση λιμονίνης άνω των 6 ppm επηρεάζει αρνητικά τη γεύση του χυμού και είναι ανιχνεύσιμη από τους καταναλωτές (*Pichaiyongvongdee et al., 2009*). Στη βιομηχανία εφαρμόζεται η διεργασία της αποπίκρασης προκειμένου να απομακρυνθεί η λιμονίνη και άλλες ουσίες που προσδίδουν την πικρή γεύση στο χυμό.

Στον Πίνακα 5-10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού της λιμονίνης στα δείγματα χυμού Navel.

Πίνακας 5-10: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού της λιμονίνης στα δείγματα χυμού πορτοκαλιών ποικιλίας Navel πριν και μετά την παστερίωση κατά τις ημερομηνίες παραγωγής από 6/12/11-3/4/12.

Ημερομηνία παραγωγής	Απαστερίωτα δείγματα (ppm)	Παστεριωμένα δείγματα (ppm)
6/12/2011	13,88	17,45
17/12/2011	13,12	14,52
24/12/2011	13,60	16,45
28/12/2011	15,22	16,11
14/1/2012	12,94	15,78
18/1/2012	11,13	-
28/1/2012	10,99	13,26
3/2/2012	12,94	15,54
9/2/2012	13,82	15,19
18/2/2012	13,87	17,13
21/2/2012	12,88	15,41
1/3/2012	12,27	14,86
6/3/2012	8,96	11,37
3/4/2012	9,08	11,24

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα η συγκέντρωση της λιμονίνης αυξάνεται στα δείγματα χυμού μετά την παστερίωση. Η αύξηση αυτή ήταν αναμενόμενη, γιατί λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που εφαρμόζεται κατά την παστερίωση (92°C) αυξάνεται η δραστικότητα του ενζύμου υδρολάση της D-λακτόνης, το οποίο καταλύει τη μετατροπή της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου, η οποία προϋπάρχει στο χυμό, στην πικρή λιμονίνη. Τα αποτελέσματα του Πίνακα 5-10 παριστάνονται γραφικά στο Διάγραμμα 5-11.

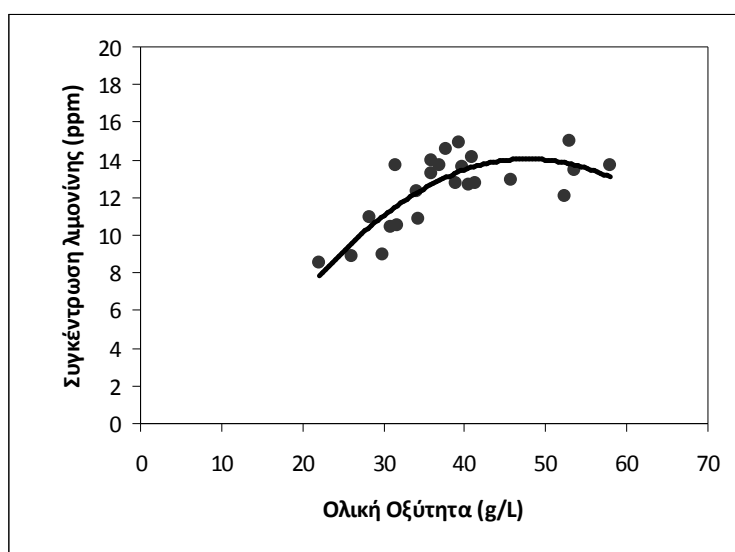


Διάγραμμα 5-11: Παρουσίαση της συγκέντρωσης λιμονίνης των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού από πριν και μετά την παστερίωση ανά ημερομηνία παραγωγής.

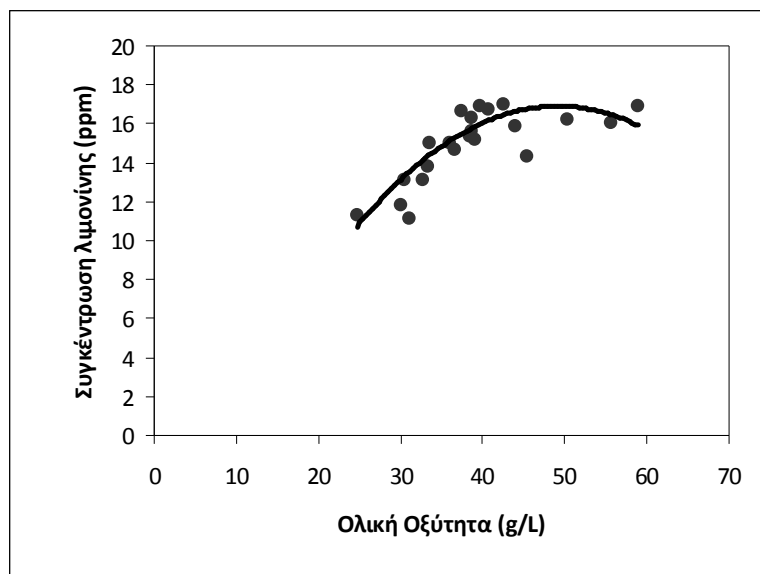
Πρέπει ακόμα να τονιστεί ότι στο διάγραμμα φαίνεται ότι η συγκέντρωση της λιμονίνης παρουσιάζει μια πτωτική τάση σε συνάρτηση με το χρόνο παραγωγής. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η περιεκτικότητα του πορτοκαλιού σε λιμονοειδή εξαρτάται από το βαθμό ωρίμανσης του φρούτου, γιατί κατά την ωρίμανση αυξάνεται η περιεκτικότητα των άγευστων γλυκοζιτών της λιμονίνης. Η αύξηση των γλυκοζιτών οφείλεται στην επιτάχυνση της αντίδρασης γλυκοζυλίωσης μέσω της οποίας τα λιμονοειδή μετατρέπονται στους αντίστοιχους γλυκοζίτες τους και έτσι τα ελεύθερα λιμονοειδή στα οποία οφείλεται η πικρή γεύση μειώνονται (Karim *et al.*, 2002).

5.2 Συσχέτιση της συγκέντρωσης λιμονίνης με την ολική οξύτητα του πορτοκαλοχυμού

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα αποτελέσματα των ποιοτικών παραμέτρων του πορτοκαλοχυμού έγινε η προσπάθεια να συσχετιστεί η συγκέντρωση λιμονίνης με κρίσιμες παραμέτρους των δειγμάτων χυμού. Από τη μαθηματική επεξεργασία προέκυψε το συμπέρασμα ότι τα επίπεδα λιμονίνης μπορούν να συσχετιστούν ικανοποιητικά με την παράμετρο της ολικής οξύτητας. Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζεται αυτή η συσχέτιση για τα δείγματα πριν και μετά την παστερίωση.



Διάγραμμα 5-12: Απεικόνιση της συσχέτισης της συγκέντρωσης λιμονίνης με την ολική οξύτητα δειγμάτων χυμού πριν το στάδιο της παστερίωσης.



Διάγραμμα 5-13: Απεικόνιση της συσχέτισης της συγκέντρωσης λιμονίνης με την ολική οξύτητα δειγμάτων χυμού μετά το στάδιο της παστερίωσης.

Η συσχέτιση μεταξύ της ολικής οξύτητας και της συγκέντρωσης λιμονίνης μελετήθηκε ξεχωριστά για τις δύο ομάδες δειγμάτων χυμού τα οποία προέρχονται από δύο διαφορετικά στάδια της γραμμής παραγωγής, (α) δείγματα χυμού μετά το στάδιο της χυμοποίησης και πριν την παστερίωση και (β) δείγματα χυμού μετά την παστερίωση και πριν το στάδιο της αποπίκρασης. Για τη συσχέτιση της λιμονίνης με την ολική οξύτητα χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από δύο χρονιές παραγωγής, 2009-2010 και 2011-2012 (Κλουκίνας, 2010). Τα δείγματα και των δύο περιόδων προέρχονταν από τη βιομηχανία Ασπίς στο Άργος.

Η συσχέτιση εκφράστηκε μαθηματικά για τις δύο κατηγορίες δειγμάτων χυμού από τις Εξισώσεις 5.1 (δείγματα χυμού πριν την παστερίωση) και 5.2 (δείγματα χυμού μετά την παστερίωση), αντίστοιχα.

$$L = -0,0093 \cdot A^2 + 0,8929 \cdot A - 7,3202 \quad (\text{Εξίσωση 5.1})$$

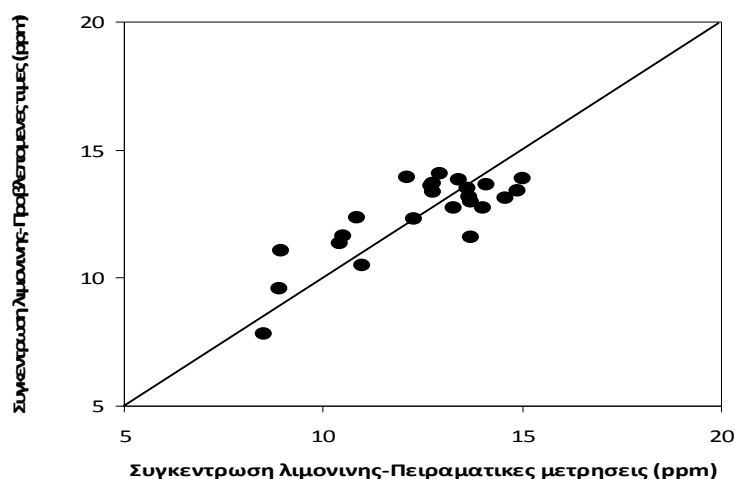
$$L = -0,0103 \cdot A^2 + 1,0152 \cdot A - 8,0279 \quad (\text{Εξίσωση 5.2})$$

Όπου: L η συγκέντρωση λιμονίνης (ppm),

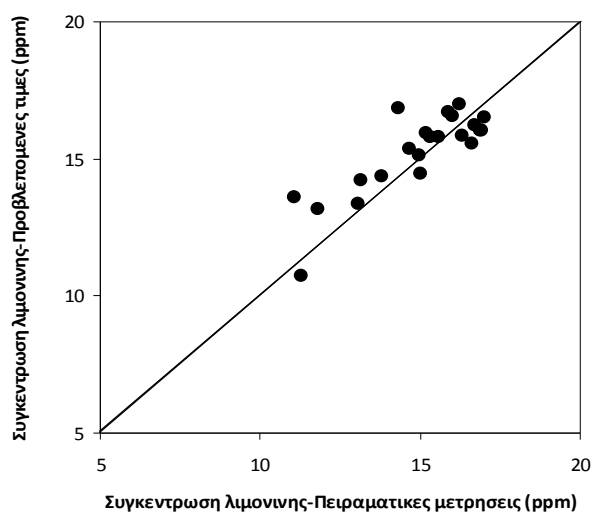
A η ολική οξύτητα (g/L).

Για να αξιολογήσουμε την εγκυρότητα των παραπάνω εξισώσεων υπολογίστηκαν οι προβλεπόμενες τιμές λιμονίνης χρησιμοποιώντας τις Εξισώσεις 5.1 και 5.2 και τις πειραματικές τιμές της ολικής οξύτητας. Οι προβλεπόμενες τιμές λιμονίνης

συγκρίθηκαν με τις πραγματικές τιμές που είχαν προσδιοριστεί πειραματικά. Η σύγκριση των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών της συγκέντρωσης λιμονίνης απεικονίζεται στα Διαγράμματα 5-14 και 5-15 για τα δείγματα χυμού πριν και μετά την παστερίωση, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 5-14: Συγκριτική απεικόνιση πειραματικών μετρήσεων λιμονίνης και προβλεπόμενων τιμών λιμονίνης με χρήση της Εξ. 5.1 για δείγματα χυμού πορτοκαλιού Navel πριν το στάδιο της παστερίωσης.



Διάγραμμα 5-15: Συγκριτική απεικόνιση πειραματικών μετρήσεων λιμονίνης και προβλεπόμενων τιμών λιμονίνης με χρήση της Εξ. 5.2 για δείγματα χυμού πορτοκαλιού Navel μετά το στάδιο της παστερίωσης.

Από τα παραπάνω διαγράμματα επιβεβαιώνεται ότι η παράμετρος της ολικής οξύτητας χυμού πορτοκαλιού Navel θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να κατασκευαστεί μια μαθηματική εξίσωση από όπου η συγκέντρωση της λιμονίνης μπορεί να προβλεφθεί με ικανοποιητική ακρίβεια. Το συγκεκριμένο συμπέρασμα είναι πολύ σημαντικό αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τη βιομηχανία χυμοποίησης ως μια εναλλακτική μέθοδος εκτίμησης της λιμονίνης, αντικαθιστώντας έτσι τη συμβατική μέθοδο προσδιορισμού της λιμονίνης με υγρή χρωματογραφία η οποία εκτός από χρονοβόρα είναι και πολυέξοδη.

5.3 Μελέτη της επίδρασης ΥΥΠ στον πορτοκαλοχυμό Navel

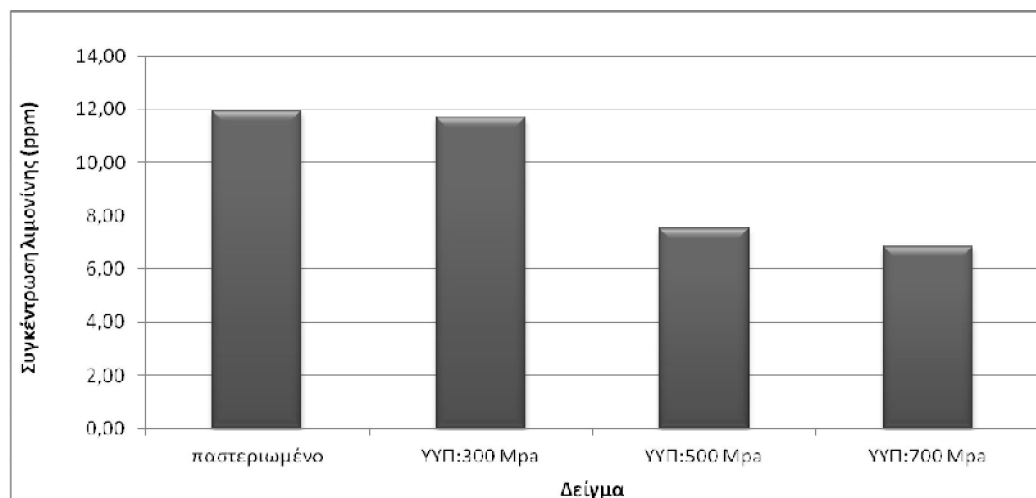
Η μελέτη της επίδρασης της τεχνολογίας της ΥΥΠ πραγματοποιήθηκε σε απαστερίωτα δείγματα πορτοκαλοχυμού Navel αρχικής περιεκτικότητας σε λιμονίνη 7,5 ppm. Στα δείγματα αυτά εφαρμόστηκαν πιέσεις 300, 500 και 700 MPa για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης λιμονίνης στα δείγματα χυμού παρουσιάζονται στο Πίνακα 5-11.

Πίνακας 5-11: Ποσοτικός προσδιορισμός της λιμονίνης στα επεξεργασμένα με ΥΥΠ δείγματα παστεριωμένου χυμού

Περιγραφή διεργασίας δείγματος	Συγκέντρωση λιμονίνης (ppm)
Θερμική παστερίωση (92°C)	11,93
ΥΥΠ:300MPa, 10 min	11,71
ΥΥΠ:500 MPa, 10 min	7,50
ΥΥΠ:700 MPa, 10 min	6,84

Όπως παρατηρείται στα αποτελέσματα του Πίνακα 5-11 η συγκέντρωση της λιμονίνης των απαστερίωτων δειγμάτων με εφαρμογή πίεσης 300 MPa αυξάνεται σημαντικά προσεγγίζοντας τα επίπεδα λιμονίνης του θερμικά παστεριωμένου δείγματος. Με εφαρμογή μεγαλύτερων πιέσεων παρατηρείται ότι στα 500 MPa η

συγκέντρωση της λιμονίνης παραμένει σταθερή, ενώ με εφαρμογή πίεσης 700 MPa μειώνεται ελάχιστα. Τα αποτελέσματα παριστάνονται στο Διάγραμμα 5-16.



Διάγραμμα 5-16: Παρουσίαση της συγκέντρωσης λιμονίνης στο βιομηχανικά παστεριωμένο δείγμα χυμού και στα επεξεργασμένα με ΥΥΠ απαστερίωτα δείγματα.

Η αύξηση της συγκέντρωσης της λιμονίνης με εφαρμογή πίεσης 300 MPa οφείλεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου υδρολάση της D-λακτόνης που καταλύει τη μετατροπή της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου σε λιμονίνη λόγω της εφαρμοζόμενης πίεσης.

Στις περιπτώσεις της επεξεργασίας σε πίεση 500 και 700 MPa η σταθερή και η μειωμένη, αντίστοιχα συγκέντρωση λιμονίνης είναι πιθανό να οφείλεται είτε στη μερική απενεργοποίηση του ενζύμου υδρολάση της D-λακτόνης, λόγω των υψηλών εφαρμοζόμενων πιέσεων, είτε σε χαμηλούς ρυθμούς ενζυμικής αντίδρασης, εξαιτίας της χαμηλής θερμοκρασίας (θερμοκρασία περιβάλλοντος) και της ΥΥΠ.

5.4 Ενζυμική προκατεργασία

5.4.1 Παραλαβή και καθαρισμός του ακατέργαστου εκχυλίσματος της LGTase

Για τη μελέτη της δράσης της LGTase στον πορτοκαλοχυμό πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ενζύμου από το μεσοκάρπιο φράπας (*Citrus maxima*), σύμφωνα με τη μέθοδο των Karim et al. (2002). Αρχικά, οι φράπες καθαρίστηκαν και παραλήφθηκε το μεσοκάρπιο τους με βάρος 1091,73 g (ο όγκος του μεσοκαρπίου

ήταν περίπου 3 L) και ομογενοποιήθηκαν με 12 L διαλύματος εκχύλισης σε ομογενοποιητή τύπου stomacher. Το διάλυμα εκχύλισης περιείχε 0,1M NaCl, 0,5% w/v PVP (polyvinylpyrrolidone) και 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride). Ο πολτός που δημιουργήθηκε αφέθηκε για 2 h υπό ανάδευση. Μετά το πέρας των 2 h ο πολτός διηθήθηκε από φίλτρο γάζας και το διήθημα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε, ενώ το ίζημα απορρίφθηκε. Το διήθημα χωρίστηκε σε δύο μέρη προκειμένου να διευκολυνθεί η όλη διαδικασία και 7 L από αυτό φυγοκεντρήθηκαν για 30 min με ταχύτητα 7.000 rpm. Μετά τη φυγοκέντρωση κρατήθηκε το υπερκείμενο υγρό με όγκο 4 L και στη συνέχεια κορέστηκε κατά 75% με σταδιακή προσθήκη 2.428,20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ακολούθως, αφέθηκε υπό ανάδευση για 14 h και έπειτα σε ηρεμία για 2 h για να ολοκληρωθεί η καταβύθιση των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, οι καταβυθισμένες πρωτεΐνες συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση για 30 min και ταχύτητα 7.000 rpm, από όπου κρατήθηκε το ίζημα, το οποίο επαναδιαλυτοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 10 mM και pH 7,8. Από την παραπάνω διαδικασία προέκυψε πρωτεϊνικό διάλυμα με όγκο 1,250 L, το οποίο οδηγήθηκε προς αφαλάτωση και ταυτόχρονη συμπύκνωση. Για τη συμπύκνωση του πρωτεϊνικού διαλύματος χρησιμοποιήθηκε μονάδα υπερδιήθησης με μεμβράνη αποκοπής 30 kDa και συσκευή Amicon με μεμβράνη αποκοπής 10 kDa. Το συμπύκνωμα με όγκο 6,5 mL που παραλήφθηκε αποτελεί το ακατέργαστο εκχύλισμα (crude extract) της LGTase, το οποίο οδηγήθηκε προς καθαρισμό. Εδώ πρέπει να τονιστεί πώς όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν υπό ψύξη στους 4°C.

Το ακατέργαστο εκχύλισμα της LGTase απομονώθηκε και καθαρίστηκε με χρήση χρωματογραφίας ανταλλαγής ανιόντων, σύμφωνα με τη μέθοδο των Karim et al. (2002). Ο ανιχνευτής του συστήματος ήταν ρυθμισμένος στα 280 nm και η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν πληρωμένη με ρητίνη ανιονικής ανταλλαγής και ισορροπημένη με ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM και pH 7,8. Η ροή του διαλύτη ήταν ρυθμισμένη στο 1,5 mL/min για όλη τη διάρκεια του διαχωρισμού. Ο καθαρισμός της LGTase είχε διάρκεια 300 min και η έκλυση του δείγματος έγινε με γραμμική βαθμίδα 0-0,5 M NaCl. Τα δείγματα με αριθμό 21-35 που παρουσίασαν αυξημένη απορρόφηση UV συλλέχθηκαν ως υποψήφια ενεργά κλάσματα LGTase. Τα κλάσματα αυτά ενοποιήθηκαν και αφού ογκομετρήθηκαν (συνολικός όγκος 54 mL) συμπυκνώθηκαν υπό ψύξη (4°C) με τη συσκευή Amicon και χρήση μεμβράνης

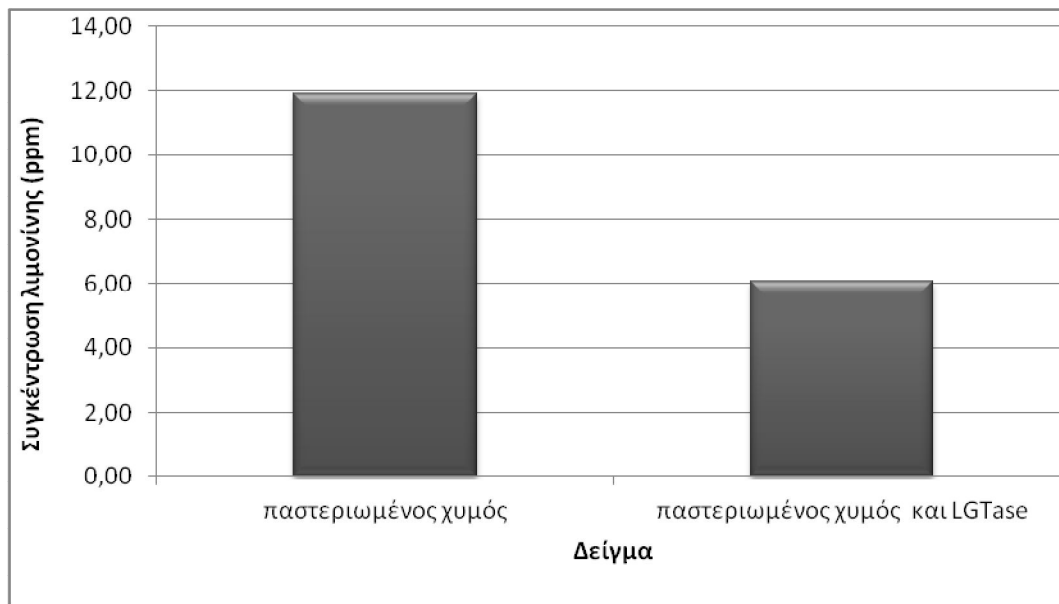
αποκοπής 10 kDa μέχρι τελικό όγκο 7 mL. Το καθαρό εκχύλισμα της LGTase αποθηκεύτηκε στους 0°C μέχρι την εκτέλεση των πειραμάτων για τη μελέτη της δράσης της.

Η επαλήθευση της παραλαβής του ενζύμου LGTase πραγματοποιήθηκε με χρήση του καθαρού εκχυλίσματος LGTase για την αποδόμηση πρότυπου διαλύματος λιμονίνης.

5.4.2 Εφαρμογή της LGTase στον πορτοκαλοχυμό

- 1^η σειρά πειραμάτων

Με αφορμή τη μικρή μείωση της συγκέντρωσης της λιμονίνης που παρατηρήθηκε στα επεξεργασμένα με ΥΥΠ δείγματα πορτοκαλοχυμού, μελετήθηκε περαιτέρω η επίδραση της ΥΥΠ σε δείγματα που περιείχαν χυμό και το ένζυμο LGTase, προκειμένου να διερευνηθεί η συνεργιστική δράση του ενζύμου και της πίεσης. Τα δείγματα περιείχαν 30 mL παστεριωμένου πορτοκαλοχυμού και 200 μL ενζύμου, στα οποία εφαρμόστηκε πίεση 300 MPa για 10 min. Η επιλογή της συγκεκριμένης πίεσης έγινε γιατί στη διεθνή βιβλιογραφία έχει διαπιστωθεί ότι για πολλά ένζυμα οι εφαρμογές ΥΥΠ στο εύρος πιέσεων από 100 έως 300 MPa μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε μικρή αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας (*Eisenmenger et al., 2009; Bang et al., 2010*). Επιπλέον, από προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών έχει διαπιστωθεί ότι η εφαρμογή πιέσεων στο εύρος 200-300 MPa σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι ικανή να αυξήσει την ενεργότητα της LGTase έως και 20 %. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 5-17.



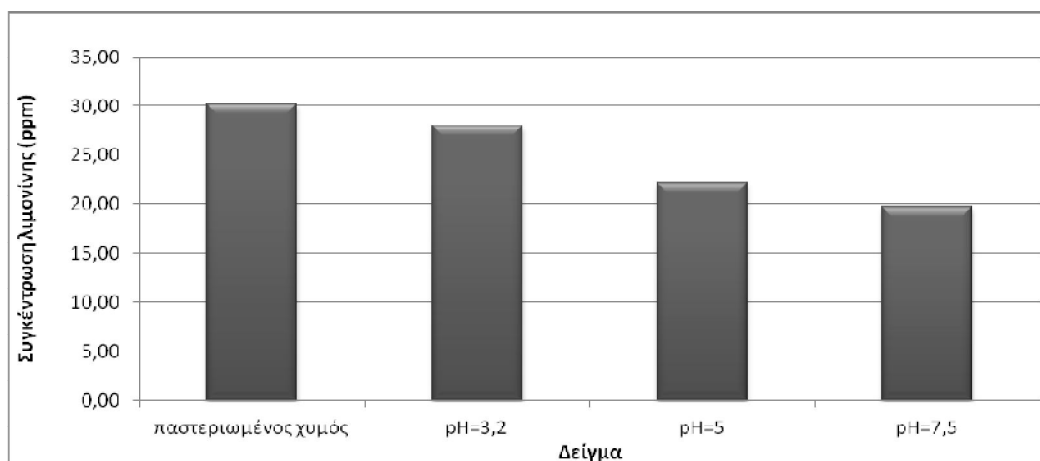
Διάγραμμα 5-17: Συγκέντρωση λιμονίνης σε βιομηχανικά παστεριωμένο δείγμα χυμού και σε δείγμα χυμού με LGTase επεξεργασμένο με ΥΥΠ (300 MPa, 10 min).

Είναι εμφανές στο Διάγραμμα 5-17 ότι η συγκέντρωση της λιμονίνης του δείγματος χυμού και ενζύμου που επεξεργάστηκε σε πίεση 300 MPa για 10 min μειώνεται στο μισό της συγκέντρωσης του ανεπεξέργαστου και χωρίς ένζυμο δείγματος. Η παρατηρούμενη μείωση της λιμονίνης οφείλεται στο γεγονός ότι η εφαρμοζόμενη πίεση ενισχύει τη δραστηριότητα της LGTase, η οποία καταλύει την αντίδραση μετατροπής της λιμονίνης στους άγευστους γλυκοζίτες της.

- 2^η σειρά πειραμάτων

Στη 2^η σειρά πειραμάτων εξετάστηκε η προσθήκη του ενζύμου σε δείγματα παστεριωμένου χυμού Navel, τα οποία επεξεργάστηκαν σε ατμοσφαιρική πίεση και pH ίσο με 3,2, 5 και 7,5. Η επιλογή των pH έγινε επιδιώκοντας τη μελέτη δράσης της LGTase σε τιμές pH που είναι κοντά στο πραγματικό pH του χυμού (3,5-4) για αυτό και εξετάστηκαν τα pH 3,2 και 5, ενώ η τιμή pH ίση με 7,5 επιλέχθηκε, γιατί βρίσκεται κοντά στο βέλτιστο pH λειτουργίας του ενζύμου. Η συγκεκριμένη ενζυμική προκατεργασία του χυμού πραγματοποιήθηκε με συνεχή ανάδευση των δειγμάτων χυμού και ενζύμου για 40 min σε θερμοκρασία 37°C.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 5-18.



Διάγραμμα 5-18: Συγκέντρωση της λιμονίνης σε δείγματα χυμού και ενζύμου σε pH 3,2, 5, 7,5.

Γενικά, παρατηρείται μείωση της λιμονίνης σε όλα τα δείγματα, η οποία οφείλεται στη δράση του ενζύμου. Στο δείγμα με pH 3,2, το οποίο είναι παρόμοιο με το πραγματικό pH του χυμού, η μείωση της συγκέντρωσης της λιμονίνης δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή, όπως επίσης και στο δείγμα με pH 5. Η μεγαλύτερη μείωση, της τάξης του 65%, παρατηρείται στο δείγμα με pH ίσο με 7,5. Η αυξημένη δράση του ενζύμου στο συγκεκριμένο pH οφείλεται στο γεγονός ότι βρίσκεται πολύ κοντά στο βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου που είναι το 7,8 (Karim et al., 2002).

Βιβλιογραφία 5^ο κεφαλαίου

- Bang W.S., Chung H.J., 2010, *Effect of high hydrostatic pressure on the enzyme activities in Saccharomyces cerevisiae and Escherichia coli*, *New biotechnology*, 24, 440-444.
- Bull K. M., Zerdin K., Howe E., Goicoechea D., Paramanandhan P., Stockman R., Sellahewa J., Szabo A. E., Johnson L. R., Stewart M. C., 2004, *The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice*, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 135–149.
- Cortes C., Esteve J. M., Ana Frigola A., *Color of orange juice treated by High Intensity Pulsed Electric Fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice*, *Food Control* 19, 151–158.
- Eisenmenger J. M., Reyes-De-Corcuera I. J., 2009, *High pressure enhancement of enzymes: A review*, *Enzyme and Microbial Technology* 45, 331–347.
- Farnworth R.E., Lagace M., Couture R., Yaylayan V., Stewart B., 2001, *Thermal processing, storage conditions, and the composition and physical properties of orange juice*, *Food research international*, 34, 25-30.
- 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, 197-203.
- Karim R. M., Hashinaga F., 2002, *Isolation and characterization of limonoid glucosyltransferase from pummelo albedo tissue*, *Food Chemistry*, 76, 431–436.
- Kimball A. D., 1999, *Analyses of Brix, Soluble Solids, Acids, Oils and Pulp*, *Citrus Processing a complete guide*, Ed. Aspen, USA, pp. 218-221.
- Κλουκίνας Β, 2010, *Μέτρηση λιμονίνης σε χυμό πορτοκαλιού Navel και συσχέτιση με φυσικοχημικούς δείκτες*, Ε.Μ.Π., Αθήνα.
- Parish E.M., 1998, *Orange Juice Quality After Treatment by Thermal Pasteurization or Isostatic High Pressure*, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 31, 439–442.
- Pichaiyongvongdee S., Haruenkit R., 2009, *Comparative Studies of Limonin and Naringin Distribution in Different Parts of Pummelo [Citrus grandis (L.) Osbeck] Cultivars Grown in Thailand*, *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 43, 28 – 36.

- Stinco M. C., Fernandez-Vazquez R., Hernanz D., Heredia J. F., Melendez-Martinez J. A., Vicario M. I., 2013, Industrial orange juice debittering: Impact on bioactive compounds and nutritional value, Journal of Food Engineering, 116, 155–161.*
- Vervoort L., Van der Plancken I., Grauwet T., Timmermans H.A. R., Mastwijk C. H., Matser M. A., Hendrickx E. M., Van Loey A., 2011, Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 12,466–47.*

6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην Ελλάδα παράγονται ετησίως περίπου 10.000.000 τόνοι πορτοκαλιών και αποτελούν το 57% της συνολικής παραγωγής εσπεριδοειδών της Μεσογειακής ζώνης. Οι πιο γνωστές ποικιλίες είναι τα πορτοκάλια Navel και Valencia, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χυμών.

Οι βιομηχανίες παραγωγής πορτοκαλοχυμών από πορτοκάλια Navel καλούνται να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα της πικρής γεύσης, η οποία οφείλεται στην περιεκτικότητα του χυμού σε λιμονοειδή και κυρίως στη λιμονίνη. Η έντονη πικρή γεύση του πορτοκαλιού Navel ήταν ο λόγος που παλαιότερα οι βιομηχανίες απέφευγαν τη χυμοποίησή του, αλλά το εμπόδιο αυτό ξεπεράστηκε μετά την είσοδο των τεχνολογιών αποπίκρασης με χρήση απορροφητικών ρητίνων, οι οποίες απομακρύνουν τα πικρά συστατικά του χυμού. Συνολικά, τα στάδια παραγωγής του πορτοκαλοχυμού επηρεάζουν τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος και για αυτό το λόγο οι βιομηχανίες ερευνούν συνεχώς την ανάπτυξη νέων μεθόδων επεξεργασίας και αποπίκρασης του χυμού με στόχο ένα άριστης ποιότητας και θρεπτικής αξίας προϊόν. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση των διεργασιών παστερίωσης και αποπίκρασης στις φυσικοχημικές παραμέτρους του χυμού πορτοκαλιού Navel, προσδιορίστηκε ποσοτικά η λιμονίνη που περιέχεται στο χυμό και είναι υπεύθυνη για την πικρή γεύση του και η συγκέντρωση της συσχετίστηκε με τα ολικά οργανικά οξέα του χυμού. Μελετήθηκε, επιπλέον, η επίδραση της ΥΥΠ στην περιεκτικότητα της λιμονίνης του χυμού Navel και διερευνήθηκε η δυνατότητα της ενζυμικής αποπίκρασης του από το ένζυμο γλυκοζυλοτρανσφεράση λιμονοειδών (LGTase).

Εξετάστηκαν δείγματα πορτοκαλοχυμού, από τη βιομηχανία Ασπίς στο Άργος, προερχόμενα από τρία διαφορετικά στάδια της γραμμής παραγωγής. Τα δείγματα προήλθαν από το στάδιο πριν και μετά την παστερίωση και μετά την αποπίκραση από 14 διαφορετικές εβδομάδες παραγωγής του έτους 2011-2012. Στα δείγματα πορτοκαλοχυμού πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των παρακάτω ποιοτικών παραμέτρων.

✓ pH	✓ Ολικά διαλυτά στερεά (°Brix)
✓ Χρώμα	✓ Οξύτητα
✓ Απορροφήσεις καροτενοειδών, φλαβονοειδών και πολυφαινολών	✓ L-ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)
✓ Συγκέντρωση λεμονένιου	✓ Συγκέντρωση λιμονίνης

Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι οι φυσικοχημικές παράμετροι, όπως οι τιμές του pH, των ολικών διαλυτών στερεών (°Brix) και της οξύτητας δεν επηρεάζονται από το στάδιο παραγωγής και τη χρονική περίοδο συγκομιδής του φρούτου. Αντίθετα, το χρώμα του χυμού, το οποίο εκφράστηκε με βάση την παράμετρο του ολικού χρώματος (E) παρουσίασε μεταβολές μετά το στάδιο της παστερίωσης και της αποπίκρασης, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση του ολικού χρώματος στα δείγματα των τελευταίων ημερών του μήνα Ιανουάριο και τις πρώτες μέρες του Φεβρουαρίου. Οι απορροφήσεις των καροτενοειδών, των φλαβονοειδών και των πολυφαινολών των δειγμάτων μελετήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis και διαπιστώθηκε ότι οι απορροφήσεις των καροτενοειδών και των πολυφαινολών δε μεταβάλλονται σημαντικά σε συνάρτηση με το στάδιο παραγωγής και το χρόνο συγκομιδής, ενώ οι απορροφήσεις των φλαβονοειδών παρουσίασαν μικρή μείωση μετά τη διεργασία της αποπίκρασης. Η παρατηρούμενη μείωση οφείλεται στην απορρόφηση των πικρών φλαβονοειδών, όπως η ναριγκίνη και η νεοεσπεριδίνη, από τη ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο αυτό. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του λεμονένιου, το οποίο καθορίζει το άρωμα του πορτοκαλοχυμού, έγινε με τη μέθοδο GC-MS, όπου ο χυμός εισάγεται αρχικά στο σύστημα Purge & Trap. Η ανάλυση παρουσίασε μείωση της συγκέντρωσης του λεμονένιου στα παστεριωμένα και μετά την αποπίκραση δείγματα. Σε αντίθεση με το στάδιο παραγωγής, η συγκέντρωση του λεμονένιου ήταν ανεξάρτητη του χρόνου παραγωγής. Όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό του L-ασκορβικού οξέος με χρήση υγρής χρωματογραφικής μεθόδου υψηλής απόδοσης (HPLC), δεν παρουσίασαν την ίδια συμπεριφορά όλα τα δείγματα. Ορισμένα από τα δείγματα εμφάνισαν μείωση της συγκέντρωσης του L-ασκορβικού οξέος μετά τις διεργασίες παστερίωσης και αποπίκρασης, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι θερμικές διεργασίες επηρεάζουν το L-ασκορβικό οξύ, ενώ σε άλλα οι τιμές των

δειγμάτων και των τριών σταδίων παραγωγής κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα. Επίσης, σε κάποια δείγματα παρατηρήθηκε ότι οι τιμές της συγκέντρωσης του L-ασκορβικού οξέος ήταν παρόμοιες είτε για τα απαστερίωτα δείγματα και τα παστεριωμένα, ενώ τα μετά την αποπίκραση αυξάνονταν, είτε οι τιμές ήταν παρόμοιες για τα απαστερίωτα και τα μετά την αποπίκραση δείγματα και μειωνόνταν η τιμή των παστεριωμένων. Τέλος, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της λιμονίνης με υγρή χρωματογραφική μέθοδο (HPLC) σε απαστερίωτα και παστεριωμένα δείγματα και βρέθηκε ότι μετά το στάδιο της παστερίωσης αυξάνεται σημαντικά. Η αύξηση οφείλεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου υδρολάση της D-λακτόνης, η οποία καταλύει τη μετατροπή της πρόδρομης ένωσης της λιμονίνης, λιμονική λακτόνη A-δακτυλίου σε λιμονίνη.

Στη συνέχεια, με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης των φυσικοχημικών παραμέτρων και της συγκέντρωσης της λιμονίνης έγινε προσπάθεια συσχέτισης της λιμονίνης με κάποια από τις κρίσιμες φυσικοχημικές παραμέτρους. Τελικά, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της λιμονίνης είναι συσχετίσιμη με τα ολικά οργανικά οξέα του χυμού. Η συσχέτιση αυτή οφείλεται στο κύριο οξύ του πορτοκαλοχυμού, που είναι το κιτρικό οξύ και ενδέχεται να συμβάλει στην αύξηση του ρυθμού μετατροπής της λιμονικής λακτόνης A-δακτυλίου σε λιμονίνη, εφόσον με βάση τη βιβλιογραφία το χαμηλό pH του χυμού ευνοεί αυτή την αντίδραση.

Ακολούθησε επεξεργασία των δειγμάτων με την τεχνολογία της ΥΥΠ και διαπιστώθηκε ότι με εφαρμογή πίεσης 300 MPa για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος η συγκέντρωση της λιμονίνης αυξάνεται. Αυτό οφείλεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου υδρολάση της D-λακτόνης εξαιτίας της ασκούμενης πίεσης. Με εφαρμογή πίεσης 500 MPa για τον ίδιο χρόνο και την ίδια θερμοκρασία επεξεργασίας η περιεχόμενη λιμονίνη παρέμεινε σταθερή, ενώ με πίεση 700 MPa μειώθηκε. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται είτε στην απενεργοποίηση της υδρολάσης της D-λακτόνης, είτε στο χαμηλό ρυθμό δράσης του ενζύμου λόγω συνδυασμού της χαμηλής θερμοκρασίας με την ΥΥΠ. Το παραπάνω αποτέλεσμα θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω, αυξάνοντας την εφαρμοζόμενη πίεση και το χρόνο επεξεργασίας προκειμένου να επιτευχθεί απενεργοποίηση της υδρολάσης της D-λακτόνης και κατά συνέπεια να μειωθεί η παραγωγή λιμονίνης. Η επίτευξη αποπίκρασης του χυμού με ΥΥΠ θα αποτελούσε ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα

για τη βιομηχανία, εφόσον τα στάδια της θερμικής παστερίωσης και της αποπίκρασης θα συνδυάζονταν σε ένα, αφού η ΥΥΠ αποτελεί μέθοδο ψυχρής παστερίωσης επιτυγχάνοντας μείωση του μικροβιακού φορτίου και απενεργοποίηση των ανεπιθύμητων ενζύμων. Με αυτόν τον τρόπο, λοιπόν, θα ήταν δυνατή η παραγωγή ενός χυμού απαλλαγμένο από τα πικρά συστατικά του και παράλληλα με πολύ καλύτερα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και χαμηλότερο κόστος παραγωγής.

Επιπλέον, διερευνήθηκε η δυνατότητα ενζυμικής αποπίκρασης του χυμού από πορτοκάλια Navel με χρήση του ενζύμου LGTase, το οποίο απομονώθηκε από το μεσοκάρπιο φράπας.

Μετά την ολοκλήρωση παραλαβής και καθαρισμού της LGTase, η διερεύνηση της δράσης της κατέληξε σε πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα, γιατί επιβεβαιώθηκε η ικανότητα μείωσης της λιμονίνης κατά την εφαρμογή πίεσης 300 MPa για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Πιο συγκεκριμένα, η συνδυασμένη δράση της LGTase και της ΥΥΠ οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης της λιμονίνης στο 50% του ακατέργαστου δείγματος, λόγω της ενεργοποίησης της LGTase. Η δράση της LGTase επιβεβαιώθηκε, σε μικρότερο ποσοστό, και σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ατμοσφαιρική πίεση και διαφορετικές τιμές pH (3,2, 5, 7,5), στα οποία το δείγμα χυμού και ενζύμου αναδεύτηκε για 40 min στους 37°C. Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων η μέγιστη μείωση (65%) παρουσιάστηκε σε pH ίσο με 7,5, το οποίο πλησιάζει το βέλτιστο pH του ενζύμου.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η ενζυμική αποπίκραση με χρήση του ενζύμου LGTase είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος και ο συνδυασμός της με την τεχνολογία της ΥΥΠ δίνει εξαιρετικά αποτελέσματα. Το μοναδικό και βασικό μειονέκτημα σε αυτή τη μέθοδο αποπίκρασης είναι ότι η LGTase δεν είναι εμπορικά διαθέσιμη και η απομόνωση της έχει πραγματοποιηθεί μόνο εργαστηριακά. Ένα επιπλέον μειονέκτημα είναι ότι το βέλτιστο pH λειτουργίας της LGTase είναι 7,8, το οποίο είναι αρκετά μεγαλύτερο από το pH του χυμού που είναι μεταξύ 3,5 και 4. Ασφαλώς αυτό θα μπορούσε να επιλυθεί με βελτιστοποίηση αρχικά της μεθόδου απομόνωσης και καθαρισμού του ενζύμου και έπειτα με χρήση των μεθόδων γενετικής μηχανικής να πραγματοποιηθεί παραγωγή του ενζύμου. Θα ήταν, ακόμα δυνατόν να γίνουν προσπάθειες ακινητοποίησης του ενζύμου σε διάφορους φορείς,

ώστε οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας της LGTase να τροποποιηθούν για να είναι δυνατή η βιομηχανική της χρήση. Θα μπορούσε, επίσης να επιχειρηθεί κλωνοποίηση του ενζύμου σε κατάλληλο μικροοργανισμό προκειμένου να επιτευχθεί ο προηγούμενος στόχος. Η ακινητοποίηση, τέλος ενός γενετικά τροποποιημένου ενζύμου θα μπορούσε να επιφέρει σημαντικά αποτελέσματα ως προς τις συνθήκες λειτουργίας του.

Οι παραπάνω προτάσεις απαιτούν μεγάλη και χρονοβόρα έρευνα πάνω στο ένζυμο LGTase. Η επίτευξη, όμως χρήσης του ενζύμου σε βιομηχανική κλίμακα θα αποτελούσε σημαντική επιστημονική κατάκτηση και θα έδινε στη βιομηχανία τη δυνατότητα παραγωγής ενός πορτοκαλοχυμού που θα ανταποκρίνεται στις αυξανόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών.