

**Εφαρμογές της
Βιοτεχνολογίας
στη Βιομηχανία
Τροφίμων**

Εφαρμογές στην Οινοποιία

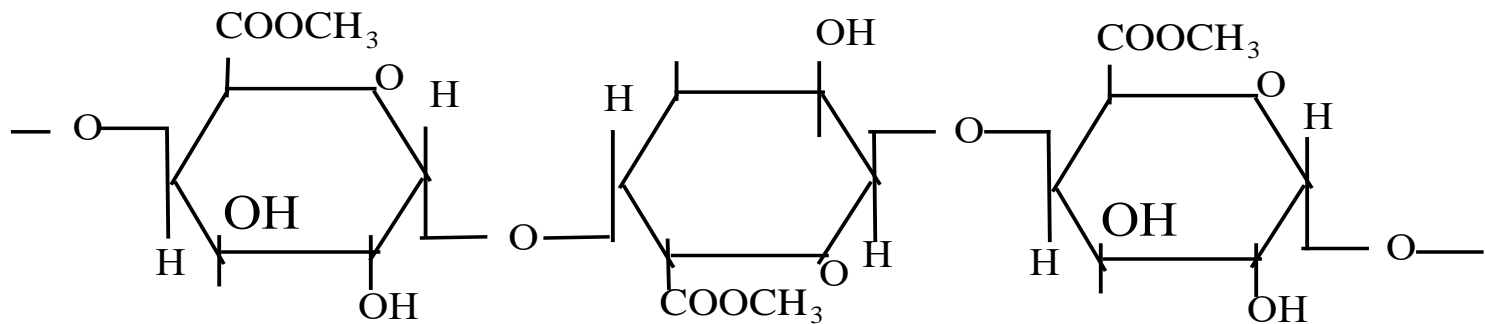
- Η παρασκευή του οίνου αποτελεί ίσως την παλαιότερη εφαρμογή της βιοτεχνολογίας, της οποίας οι ρίζες φθάνουν μέχρι την αρχαιότητα.

Παραγωγή κρασιού με ακινητοποιημένα κύτταρα

- Γενικά χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης οδηγούν σε βελτιωμένη ποιότητα.
- Η χρήση συστημάτων ακινητοποιημένων κυττάρων και συστημάτων συνεχούς λειτουργίας αυξάνουν την παραγωγικότητα.
- Τα υποστρώματα ακινητοποίησης πρέπει να είναι καθαρότητας τροφίμων (food-grade purity), συμβατά με τις οργανοληπτικές απαιτήσεις του τελικού προϊόντος, φθηνά, άφθονα και να παρουσιάζουν μηχανική και βιολογική σταθερότητα.
- Η τεχνική ακινητοποίησης πρέπει να είναι εύκολη και φθηνή για να αναπτυχθεί και εφαρμοστεί η τεχνολογία σε βιομηχανική κλίμακα.

Τα ένζυμα στην οينوποίηση

- Φυσική πηγή σημαντικών ενζύμων είναι το σταφύλι.
- Έχει, όμως, περιορισμένο ενδιαφέρον, διότι οι μικρές ποσότητες των ενζύμων αδυνατούν να επιφέρουν το επιθυμητό αποτέλεσμα εντός του διαθέσιμου χρόνου.
- Το κυριότερο ένζυμο είναι οι πολυγαλακτουρονάσες (πηκτινάσες), οι οποίες υδρολύουν τον γλυκοζιτικό δεσμό α -1,4 μορίων α -D-γαλακτουρονικού οξέος των πηκτινικών ενώσεων.



Σχ. 67. Δομή της πολυγαλακτουρονικής αλυσίδας της πηκτίνης.

- Τα χρησιμοποιούμενα εμπορικά ενζυμικά παρασκευάσματα, συνήθως, περιέχουν μίγμα ενδο- και έξω- πολυγαλακτουρονάσης, αποφεύγεται ,όμως, η παρουσία πηκτινεστεράσης, λόγω σχηματισμού μεθανόλης (τοξική).
- Κατά την παραγωγή του οίνου, η εξωτερική ενζυμική προσθήκη πραγματοποιείται σε διαφορετικά στάδια και για διαφορετικούς λόγους:
 - A. Η προσθήκη πηκτινασών κατά την συμπίεση, αποσάθρωση και ζύμωση έχει σκοπό την αποτελεσματικότερη εκχύλιση διάφορων συστατικών (χρώματος, χυμού, αρωματικών ουσιών, κλπ), και
 - B. Η προσθήκη πηκτινασών μετά τη πέρας της ζύμωσης, δηλαδή στον οίνο, έχει ως στόχο την υδρόλυση μεγαλομοριακών κολλοειδών ενώσεων, οι οποίες δημιουργούν προβλήματα κατά τη διήθηση του τελικού προϊόντος.

- Μια άλλη σύγχρονη μέθοδος παραγωγής οίνου είναι η **θερμοοινοποίηση (Thermovinification)**.
- Αυτή περιλαμβάνει τη θέρμανση άθικτων ή συνθλιμμένων σταφυλιών στους 50-80°C.
- Σε μερικές περιπτώσεις γίνεται απότομη θέρμανση ολόκληρων των σταφυλιών.
- Τέτοιοι χειρισμοί είναι μικρής διάρκειας (≈ 1 min) και στόχος είναι η θέρμανση της εξωτερικής στοιβάδας των σταφυλιών, με αποτέλεσμα την επίτευξη μεγαλύτερου ποσοστού εκχύλισης ερυθρών χρωστικών στην ερυθρά οινοποίηση.
- Η προσθήκη πηκτινολυτικών κατά την θερμοοινοποίηση (στους 45°C) οδηγεί σε αύξηση της ποσότητας του λαμβανόμενου γλεύκους.

- Μια άλλη εφαρμογή των ενζύμων στην οινοποίηση αφορά τους οίνους που προέρχονται από σταφύλια προσβεβλημένα από τον μύκητα *Botrytis cinerea* (βιολογική υπερωρίμανση).
- Ο μύκητας αυτός εμφανίζεται στο τέλος της ωρίμανσης στην επιφάνεια του σταφυλιού και σχηματίζει κηλίδες.
- Στη συνέχεια, διεισδύει κάτω από την φλούδα και με την πάροδο του χρόνου καλύπτει όλη τη ρόγα, η οποία αλλάζει χρώμα.
- Με την ευγενή σύψη έχουμε σχηματισμό β -1,3-γλυκάνης (φέρει διακλαδώσεις σε θέσεις β -1,6).
- Η γλυκάνη αυτή δεν προσβάλλεται από τις συνήθεις β -γλυκανάσες (υδρολύουν β -1,4-δεσμούς).
- Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με προσθήκη ειδικών β -1,3 και β -1,6-γλυκανασών, οι οποίες υδρολύουν την β -γλυκάνη του βοτρυτή.
- Η παρουσία θειώδους (SO_2) στην οινοποίηση αδρανοποιεί μερικώς τις πηκτινάσες.

Εφαρμογές στην Ζυθοποιία

• Τα χρησιμοποιούμενα υλικά για την παραγωγή μπύρας είναι:

1. Βύνη ζυθοποιίας (εκβλαστημένο κριθάρι),

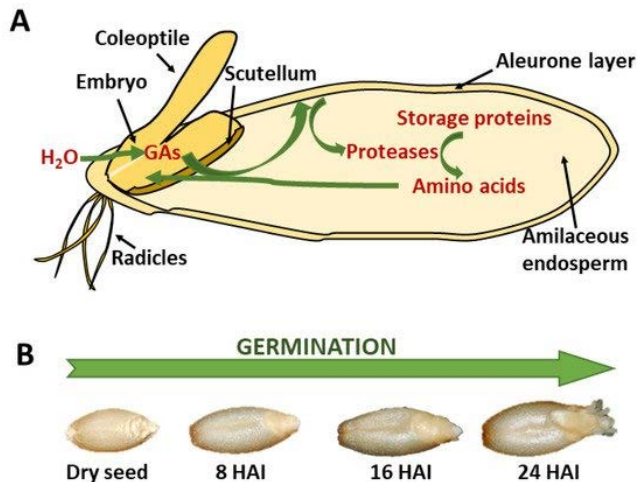
2. Νερό,

3. Ζύμη, και

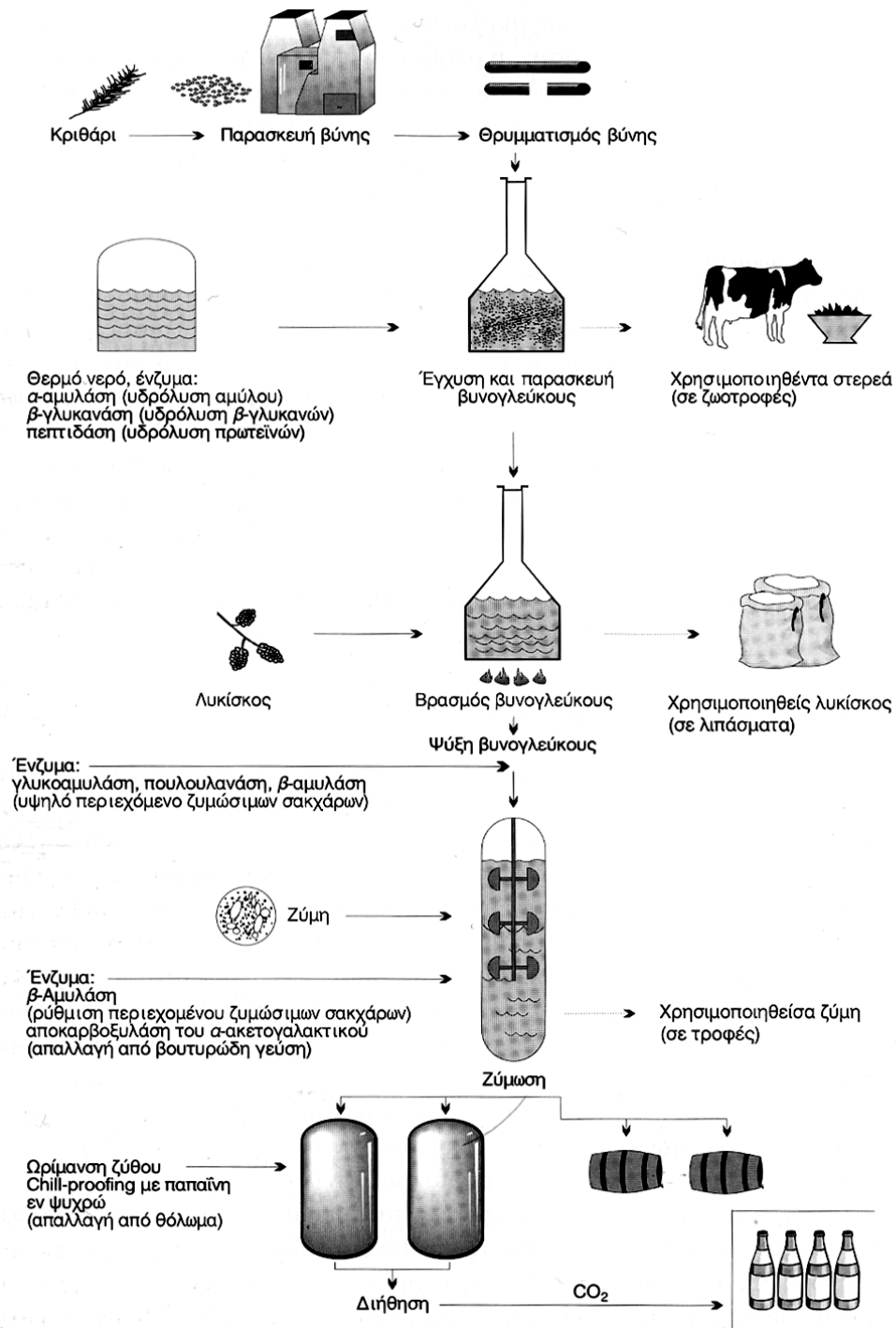
4. Φυτικά πρόσθετα γεύσεως και αρώματος (λυκίσκος).

Παρασκευή βύνης

- Η βύνη παρασκευάζεται από κριθάρι, το οποίο πλένεται και παραμένει σε υγρό περιβάλλον (μέχρι υγρασίας $\approx 45\%$), υπό ανάδευση και συνθήκες αερισμού.
- Η διεργασία αυτή εξασφαλίζει την εκβλάστηση, που σηματοδοτεί την βιοσύνθεση των αμυλασών και πρωτεασών που θα διασπάσουν το άμυλο και τις πρωτεΐνες του ενδοσπερμίου.
- Η εκβλάστηση του κριθαριού αναστέλλεται με αύξηση της θερμοκρασίας, οδηγώντας επίσης σε αφυδάτωση (η υγρασία φθάνει στο 3-6%).



Σχ. 68. Εκβλαστημένο κριθάρι.



Σχ. 69. Στάδια παραγωγής μπύρας.

Παρασκευή και βρασμός του βυνογλεύκου

- Η βύνη θρυμματίζεται με άλεση και ακολουθεί προσθήκη νερού.
- Στη συνέχεια, εφαρμόζεται σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας.
- Κατά τη διεργασία αυτή έχουμε δράση διάφορων ενζύμων με διαφορετικές εξειδικεύσεις ως προς το υπόστρωμα και τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης:

A. α -αμυλάσης (68°C),

B. β -αμυλάσης (64°C),

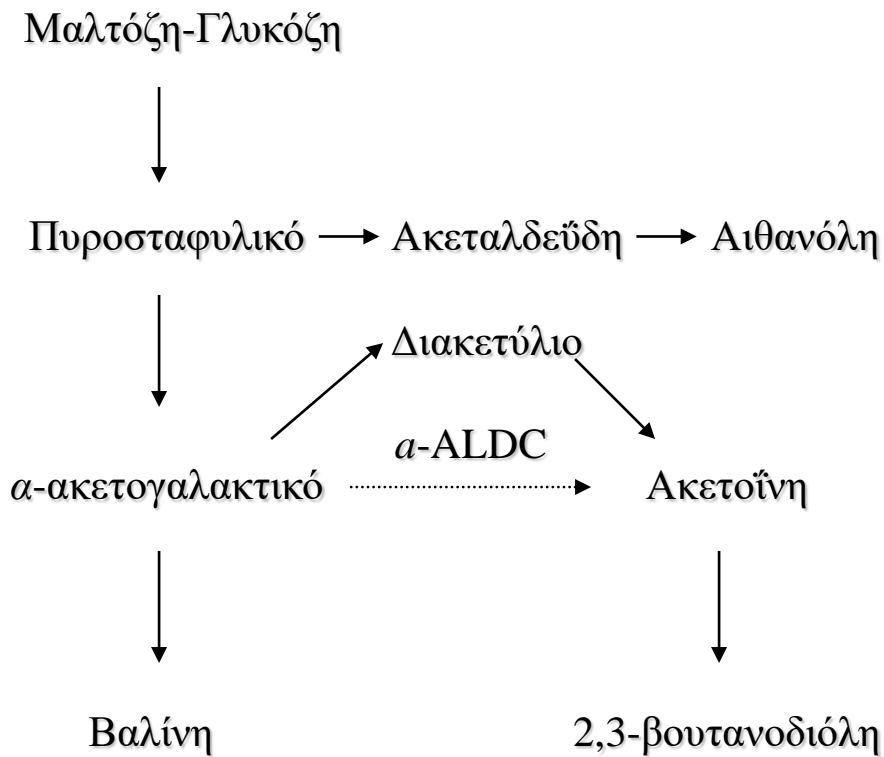
Γ. Καρβοξυπεπτιδάσης (58°C),

Δ. Γλυκανασών, κλπ.

- Στο στάδιο αυτό γίνεται προσθήκη εξωγενών ενζύμων για να υποβοηθούν οι παραπάνω διεργασίες.
- Η θερμοκρασία αυξάνεται στη συνέχεια στους 78°C, ώστε να επιτευχθεί αδρανοποίηση των ενζύμων, προστίθεται λυκίσκος (θηλυκά άνθη) και ακολουθεί βρασμός για 1-2h.

Ζύμωση του βυνογλεύκου και ωρίμανση του ζύθου

- Κατά το στάδιο της ζύμωσης έχουμε μετατροπή των σακχάρων σε αλκοόλη.
- Στο στάδιο αυτό πολλές φορές γίνεται εξωγενής προσθήκη β-αμυλάσης (από τον μύκητα *Aspergillus oryzae*), ειδικά σε περιπτώσεις, όπου λόγω ανεπιτυχούς ελέγχου της θερμοκρασίας, η μετατροπή του αμύλου σε σάκχαρα ήταν ημιτελής.



- Κατά την εξέλιξη της ζύμωσης έχουμε παραγωγή διακετυλίου, το οποίο είναι υπεύθυνο για την βουτυρώδη γεύση.
- Υπό κανονικές συνθήκες, η ζύμη μετατρέπει το διακετύλιο σε ακετοΐνη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε 2,3-βουτανοδιόλη (άοσμες ενώσεις).
- Πολλές φορές, προστίθεται εξωγενώς αποκαρβοξυλάση του α-ακετογαλακτικού, που μετατρέπει το α-ακετογαλακτικό κατευθείαν σε ακετοΐνη.

Σχ. 70. Το διακετύλιο ως ένωση-κλειδί στην παραγωγή της μπύρας.

- Μετά τη ζύμωση και κατά την ωρίμανση του ζύθου παρατηρείται σχηματισμός συμπλόκων μεταξύ πρωτεϊνών, υδρόφοβων πολυπεπτιδίων, πολυφαινολών του λυκίσκου και του κριθαριού και πολυσακχαριτών (β -γλυκανών).
- Τα σύμπλοκα αυτά οδηγούν σε σχηματισμό θολωμάτων.
- Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με προσθήκη εξωγενών πρωτεολυτικών ενζύμων (συνήθως παπαΐνη από το φυτό *Carica papaya*) κατά την ωρίμανση, σε ψυχρό περιβάλλον.
- Η παπαΐνη υδρολύει τα πρωτεϊνικά μόρια που υποβοηθούν τη δημιουργία θολώματος, ενώ με την πάροδο του χρόνου και με την παστερίωση που ακολουθεί, τελικά αδρανοποιείται.

Εφαρμογές στην Αρτοποιία

- Το αλεύρι περιέχει διάφορα ένζυμα, όπως πρωτεάσες, α -αμυλάσες, β -αμυλάσες, κλπ, τα οποία είναι απαραίτητα για την παρασκευή του άρτου.
- Αν και το κύριο συστατικό του αλεύρου είναι το άμυλο, το ζυμάρι οφείλει τις ιδιότητές του κυρίως σε δυσδιάλυτες πρωτεΐνες, τις γλουτενίνες και γλιαδίνες, οι οποίες και οι δύο μαζί ονομάζονται γλουτένη.
- Οι μηχανικές ιδιότητες του ζυμαριού εξαρτώνται άμεσα από την περιεκτικότητα σε γλουτένη, η οποία ενυδατωμένη δημιουργεί τρισδιάτατο πλέγμα, δίνοντας στο ζυμάρι την χαρακτηριστική πλαστικότητα.
- Επειδή το αλεύρι έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεάσες, οι οποίες δρουν επί της γλουτένης, συνήθως, γίνεται προσθήκη εξωγενών πρωτεασών προερχόμενες από μύκητες (π.χ. *A. oryzae*).
- Οι ενδοπεπτιδάσες υδρολύουν εσωτερικούς πεπτιδικούς δεσμούς της γλουτένης, τροποποιώντας τις μηχανικές ιδιότητες του ζυμαριού, ώστε να καθίστανται πιο εύπλαστο και να απαιτείται λιγότερος χρόνος ανάμιξης.

- Οι εξωπεπτιδάσες υδρολύουν εξωτερικούς πεπτιδικούς δεσμούς πλησίον των άκρων της πεπτιδικής αλυσίδας, ελευθερώνοντας αμινοξέα και ολιγοπεπτίδια, τα οποία αποτελούν υποστρώματα της ζύμης, διευκολύνοντας την παραγωγή CO₂.
- Η αύξηση της θερμοκρασίας κατά το ψήσιμο, επιταχύνει την δράση των αμυλολυτικών ενζύμων και της ζύμης.
- Περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας (>60°C) αδρανοποιεί τη διεργασία και στη συνέχεια λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις μεταξύ σακχάρων και αμινοξέων που δίνουν προϊόντα πολύπλοκης δομής, τα οποία ευθύνονται για το χρώμα και το άρωμα του ψωμιού (αντιδράσεις Maillard και Amadori).

Εφαρμογές στην Τυροκομία

• Η διαδικασία παραγωγής τυριού περιλαμβάνει:

1. Παστερίωση του γάλακτος,

2. Προσθήκη αρχικών καλλιεργειών μικροοργανισμών (starter cultures), κυρίως του γένους *Lactobacillus*, οι οποίοι παράγουν γαλακτικό οξύ και ρυθμίζουν την οξύτητα,

3. Προσθήκη άλλων μικροοργανισμών και ενζύμων με στόχο την ανάπτυξη των επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων,

4. Προσθήκη ενζυμικών παρασκευασμάτων (π.χ. πτυτιάς) για την πήξη του γάλακτος,

5. Κοπή της τυρομάζας και απομάκρυνση του τυρογάλακτος,

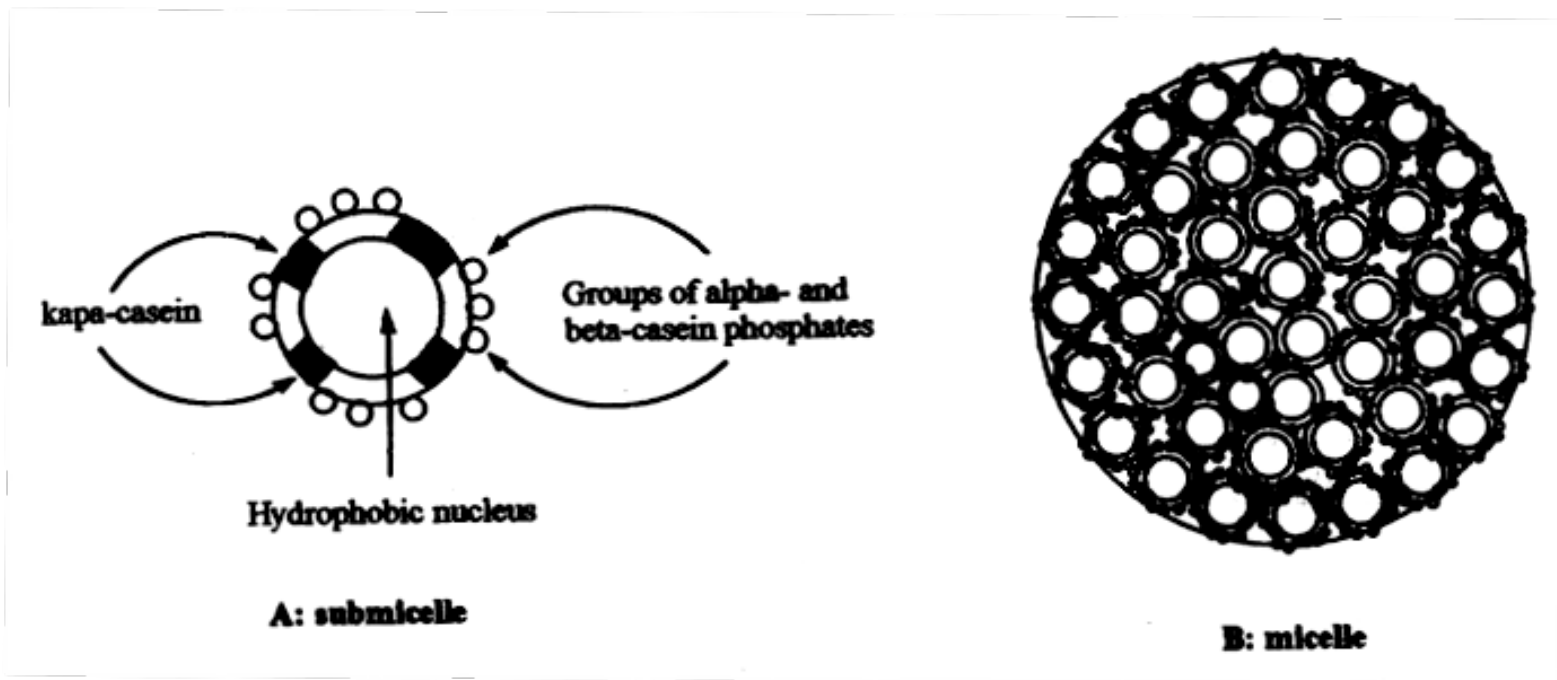
6. Μορφοποίηση και συμπίεση,

7. Προσθήκη άλατος και ωρίμανση.

- Η πήξη του γάλακτος επιτυγχάνεται με τη δράση του ενζύμου ρεννίνη (χυμοσίνη).
- Η κλασσική πτυιά απομονώνεται από το τέταρτο στομάχι μη απογαλακτισμένων ζώων και αποτελείται από χυμοσίνη και πεψίνη.
- Οι καζεΐνες αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος (80%) των πρωτεϊνών του γάλακτος.
- Συνυπάρχουν με φωσφορικό ασβέστιο υπό τη μορφή ενυδατωμένων σφαιρικών συμπλόκων διαμέτρου 30-300nm (κάποια μέχρι και 600nm), τα οποία ονομάζονται μικκύλια.
- Τα μικκύλια περιέχουν 92% πρωτεΐνη που αποτελείται από τις καζεΐνες.
- Υπάρχουν 4 τύποι καζεϊνών: $\alpha s1$, $\alpha s2$, β , και κ .

Πίνακας 5. Φορτίο και ισοηλεκτρικό σημείο των κύριων πρωτεϊνών του γάλακτος.

Πρωτεΐνη	% των συστατικών	Φορτίο σε pH 6.6	Ισοηλεκτρικό σημείο
α_{s1} -καζεΐνη B-8P	1.2-1.5	-21.9	4.94
α_{s2} -καζεΐνη A-11P	0.3-0.4	-13.8	5.37
β -καζεΐνη A ² -5P	0.9-1.1	-13.3	5.14
κ -καζεΐνη B-1P	0.2-0.4	-2.0	5.90
β -λακτογλοβουλίνη B	0.2-0.4	-10.0	5.34
α -λακταλβουμίνη B	0.06-0.17	-2.6	4.80



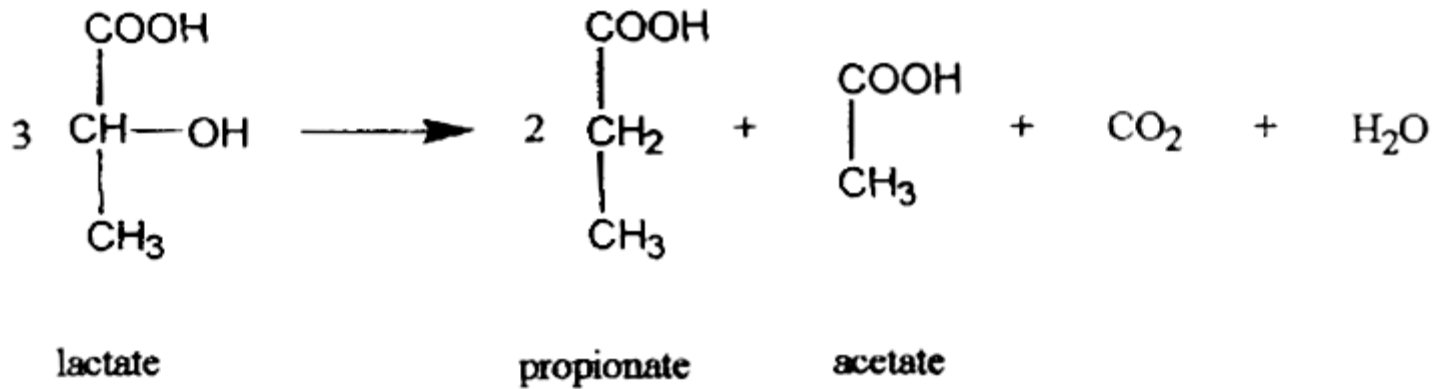
Σχ. 71. Δομή του καζεϊνικού υπομικκυλίου (A) και μικκυλίου (B).

- Η πτυδιά υδρολύει το δεσμό Phe105-Met106 στο μόριο της κ-καζεΐνης και ελευθερώνει την παρα-κ-καζεΐνη.
- Το αποτέλεσμα είναι η μείωση του συνολικού αρνητικού φορτίου των μικκυλίων, η αποσταθεροποίηση και συσσωμάτωσή τους και τελικά ο σχηματισμός του πύγματος.
- Το βέλτιστο pH της αντίδρασης είναι 5.1-5.3.

- Η δράση της ρεννίνης επεκτείνεται γρήγορα και στα μη προστατευμένα πλέον μόρια της α - και β -καζεΐνης.
- Περίπου το 10% της ρεννίνης παραμένει στο πήγμα και μετά τη στράγγιση και συνεχίζει τη δράση της, ιδιαίτερα κατά τον πρώτο μήνα της ωρίμανσης.
- Άλλες πρωτεάσες, όπως η πεψίνη, η οποία απαντά μαζί με την ρεννίνη, δεν εμφανίζουν τον ίδιο βαθμό εκλεκτικότητας και θεωρούνται μη επιθυμητές, αφού λόγω εκτεταμένης δράσης έχουν αρνητική επίδραση στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του προϊόντος.
- Η μεγάλη ζήτηση της πτυιάς (φυσικό μίγμα ρεννίνης, λιπάσης, και άλλων ενζύμων) είχε ως αποτέλεσμα την έρευνα για τον εντοπισμό άλλων πρωτεολυτικών ενζύμων, υποκατάστατων της ρεννίνης με παρόμοιες ιδιότητες.
- Γενικά, πρωτεολυτικά ένζυμα από μικροοργανισμούς εμφανίζουν, συνήθως, υψηλή δραστηριότητα και θερμοανθεκτικότητα και γενικώς θεωρούνται λιγότερο κατάλληλα για την πήξη του γάλακτος και την παρασκευή τυριού.

- Ορισμένοι μύκητες όμως (π.χ. *Mucor*) παράγουν πρωτεάσες που οδηγούν σε ικανοποιητική πήξη του γάλακτος και ποιότητα τυριών.
- Πρόσφατα, η ρεννίνη εκφράστηκε από τον μύκητα *Aspergillus niger* var. *awamori* με την τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA.
- Για την οξίνιση του γάλακτος χρησιμοποιούνται οξυγαλακτικές καλλιέργειες.
- Τα οξυγαλακτικά βακτήρια καταβολίζουν την λακτόζη προς πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ.
- Η πτώση του pH διευκολύνει την δράση της πτυιάς, τον σχηματισμό του πήγματος, τη δράση των ενζύμων και προστατεύει το τυρί κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης από ανεπιθύμητους παθογόνους ή/και αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς.

- Οξυγαλακτικά βακτήρια που θεωρούνται ομοζυμωτικά (χρησιμοποιούν το μονοπάτι της γλυκόλυσης) κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να μετατραπούν σε ετεροζυμωτικά (χρησιμοποιούν την οδό των φωσφορικών πεντοζών).
- Κατά την παρασκευή συγκεκριμένων τύπων τυριών (π.χ. Γραβιέρα, Emmental, κλπ) χρησιμοποιούνται προπιονικά βακτήρια.
- Έτσι, τα σάκχαρα και το γαλακτικό οξύ το οποίο παράγεται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, μετατρέπονται σε προπιονικό οξύ από τα προπιονικά βακτήρια.
- Ανάλογα με τις συνθήκες, ο μεταβολισμός δύναται να αλλάξει ροή και να οδηγήσει σε πληθώρα διαφορετικών προϊόντων.



Σχ. 72. Μετατροπή του γαλακτικού οξέος σε προπιονικό από προπιονικά βακτήρια.

- Το τελευταίο στάδιο της παρασκευής του τυριού είναι η ωρίμανση.
- Κατά το στάδιο αυτό εξελίσσεται βραδεία διάσπαση των λιπών και των πρωτεϊνών από μικροοργανισμούς και ένζυμα, με αποτέλεσμα, την ανάπτυξη των επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων του προϊόντος.
- Εκτός από την ενδογενή λιπάση του γάλακτος, στην λιπόλυση συμμετέχουν και λιπάσες ψυχρότροφων βακτηρίων, εξωγενείς λιπάσες και λιπολυτικά ένζυμα οξυγαλακτικών βακτηρίων.

- Τα λιπαρά οξέα που ελευθερώνονται μπορούν να μετατραπούν δευτερογενώς σε μεθυλοκετόνες, θειοεστέρες, κετονοξέα, υδροξυοξέα και λακτόνες.
- Αυτές οι ενώσεις συμπληρώνουν τη γεύση του προϊόντος.
- Η εξωτερική προσθήκη λιπασών ή/και φυσική παρουσία τους οδηγεί σε διάσπαση των τρυγλυκεριδίων προς ελεύθερα λιπαρά οξέα.
- Στα μικρής αλυσίδας ελεύθερα λιπαρά οξέα οφείλεται η πικάντικη γεύση, ενώ τα λιπαρά οξέα με περισσότερα άτομα C προσδίδουν ελαφρώς σαπουνώδη και λιπαρή γεύση.
- Λιπάσες από διαφορετικές πηγές αναπτύσσουν διαφορετικές οργανοληπτικές ιδιότητες στο τελικό προϊόν.
- Συνεπώς, η προσθήκη κατάλληλων λιπασών έχει εξαιρετική σημασία για την παραγωγή ορισμένων τύπων τυριών.
- Στα τυριά που ωριμάζουν παρουσία μυκήτων (π.χ. *Penicillium roquefortii*, *Penicillium camembertii*), η λιπόλυση οφείλεται σε λιπάσες αυτών των μικροοργανισμών.

Εφαρμογές στην παρασκευή Βρώσιμων Ελαίων

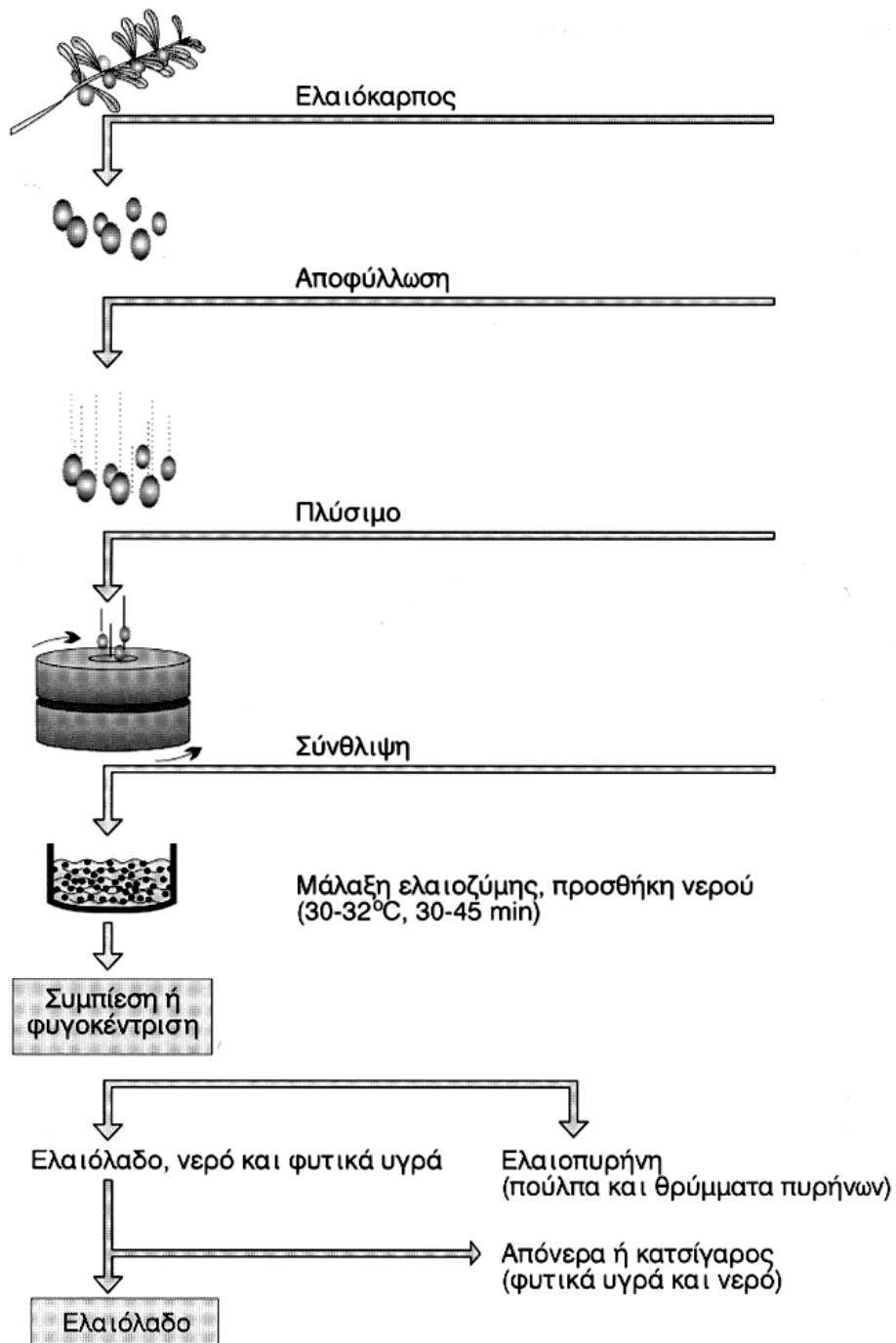
- Το σημαντικότερο έλαιο από πλευράς θρεπτικής και οικονομικής αξίας στη χώρα μας είναι το ελαιόλαδο.
- Η παρουσία υδρολυτικών ενζύμων, όπως πηκτινασών, κυτταρινασών και ημικυτταρινασών, είναι μάλλον χρήσιμη στη διεργασία παραλαβής του ελαιολάδου, ειδικότερα κατά τη φάση της μαλάξεως.
- Το προστιθέμενο ενζυμικό παρασκεύασμα πρέπει να εμφανίζει βέλτιστο pH:5.5-6.5, δηλαδή όμοιο με εκείνο του πολτού του καρπού.
- Ένα τέτοιο εμπορικό παρασκεύασμα προέρχεται από τον μύκητα *Aspergillus aculeatus*.
- Η προσθήκη εξωγενών ενζύμων βελτιώνει κυρίως τα εξής σημεία:
Α. Αυξάνεται η ποσότητα ελαίου κατά 3-10g/tn καρπού, λόγω της μείωσης της συνεκτικότητας του ιστού και των κυτταρικών τοιχωμάτων,

Β. Μειώνεται η αναγκαία ποσότητα προστιθέμενου νερού, αφού μειώνεται το ιξώδες του λαμβανόμενου υλικού,

Γ. Ο ελαιοπυρήνας περιέχει λιγότερη υγρασία και λιγότερο έλαιο, και

Δ. Μειώνεται η συνολική ποσότητα του λαμβανόμενου ελαιοπυρήνα.

- Ωστόσο, η προσθήκη εξωγενών ενζύμων δεν παρουσιάζει θεαματικά αποτελέσματα.
- Ανάλογη εφαρμογή υδρολυτικών ενζύμων γίνεται και στην παραγωγή σογιελαίου.
- Κατά την παραλαβή ελαίου από τη σόγια, πολλές φορές λαμβάνει χώρα προσθήκη εξωγενών πρωτεασών, καθώς το έλαιο βρίσκεται εγκλωβισμένο σε περιοχές με υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο.

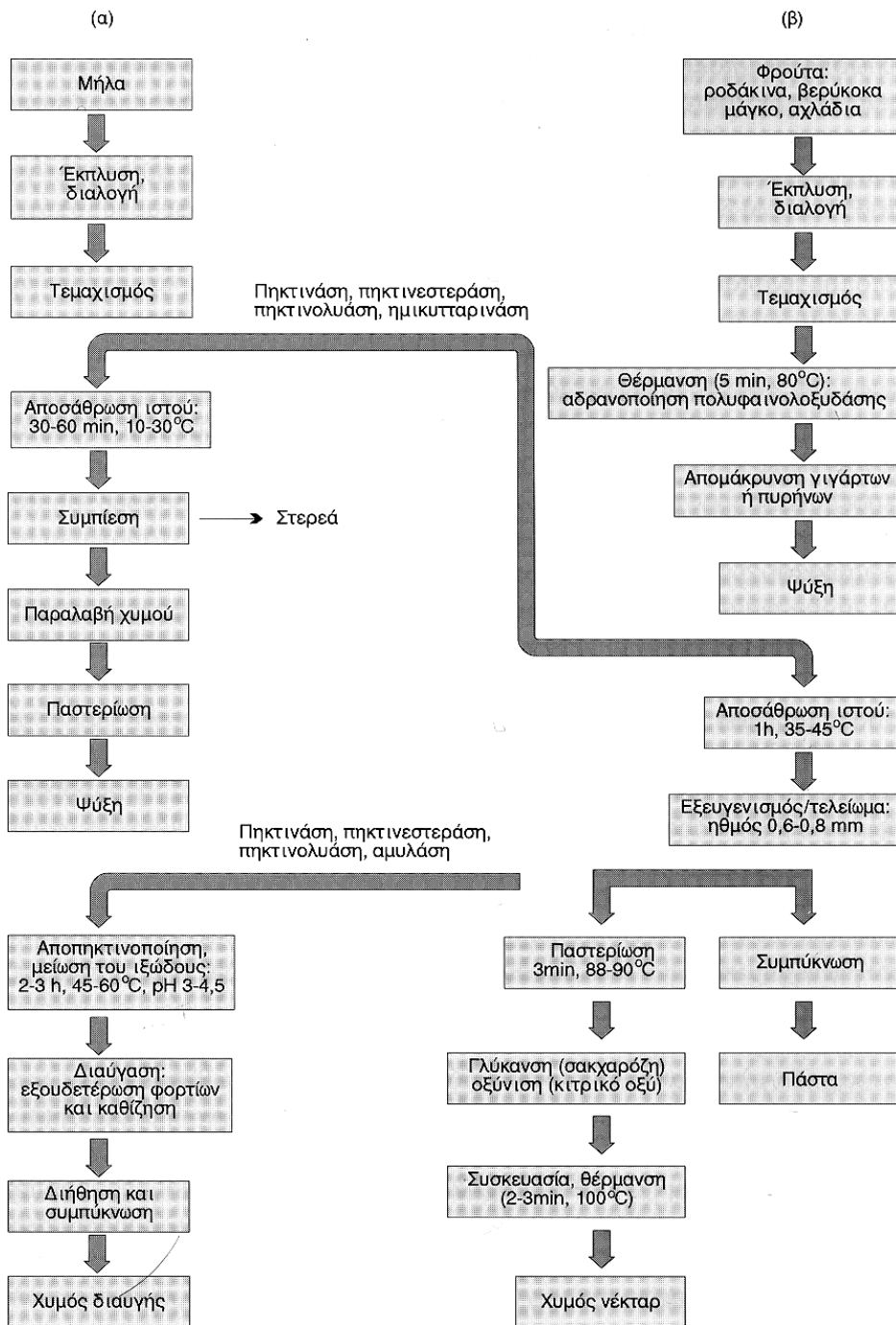


Σχ. 73. Στάδια παρασκευής ελαιολάδου.

- Οι πρωτεάσες, όμως, χρησιμοποιούνται σε αυστηρά καθορισμένη συγκέντρωση και η όλη διεργασία τελεί υπό στενό έλεγχο, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη εκχύλιση ελαίου με την ελάχιστη απώλεια πρωτεϊνών.
- Επειδή κατά τη σύνθλιψη και μάλαξη είναι δυνατή η απελευθέρωση λιπασών, οι οποίες λόγω υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων και απελευθέρωσης ελεύθερων λιπαρών οξέων οδηγούν σε αύξηση της οξύτητας, η σύνθλιψη πραγματοποιείται παρουσία θερμού ύδατος (αδρανοποίηση λιπασών).
- Εναλλακτικά, ο καρπός υφίσταται προκατεργασία στους 100°C ή με μικροκύματα.

Εφαρμογές στην παρασκευή Προϊόντων Φρούτων

- Οι πηκτινικές ενώσεις μαζί με την κυτταρίνη και τις ημικυτταρίνες αποτελούν τα κύρια συστατικά των φυτικών ιστών.
- Τα ένζυμα που διαδραματίζουν τον κύριο ρόλο στη διεργασία παραγωγής φρουτοχυμών και άλλων προϊόντων φρούτων είναι:
 1. Τα πηκτινικά ένζυμα,
 2. Οι αμυλάσες,
 3. Οι κυτταρινάσες, και
 4. Οι ημικυτταρινάσες.



Σχ. 74. Στάδια επεξεργασίας φρούτων για παρασκευή (α) διαυγούς χυμού και (β) χυμού τύπου «νέκταρ».

- Τα πηκτινικά ένζυμα αποτελούν την κυριότερη κατηγορία. Διακρίνονται σε:

A. Πηκτινεστεράσες. Υδρολύουν τους μέθυλο- και ακετυλο-εστέρες των πηκτινών.

B. Πολυγαλακτουρονάσες ή πηκτινάσες. Υδρολύουν τους γλυκοζιτικούς α -1,4-δεσμούς των μονάδων γαλακτουρονικού οξέος χαμηλού βαθμού εστεροποιήσεως παρουσία νερού, και

Γ. Πηκτινολυάσες. Διασπούν τους γλυκοζιτικούς α -1,4-δεσμούς μεταξύ μονάδων γαλακτουρονικού οξέος υψηλού βαθμού εστεροποιήσεως μέσω β -απόσπασης (δημιουργία διπλού δεσμού μεταξύ C4-C5).

- Οι αμυλάσες, συνήθως, χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση του αμύλου, κυρίως σε πρώιμα φρούτα.

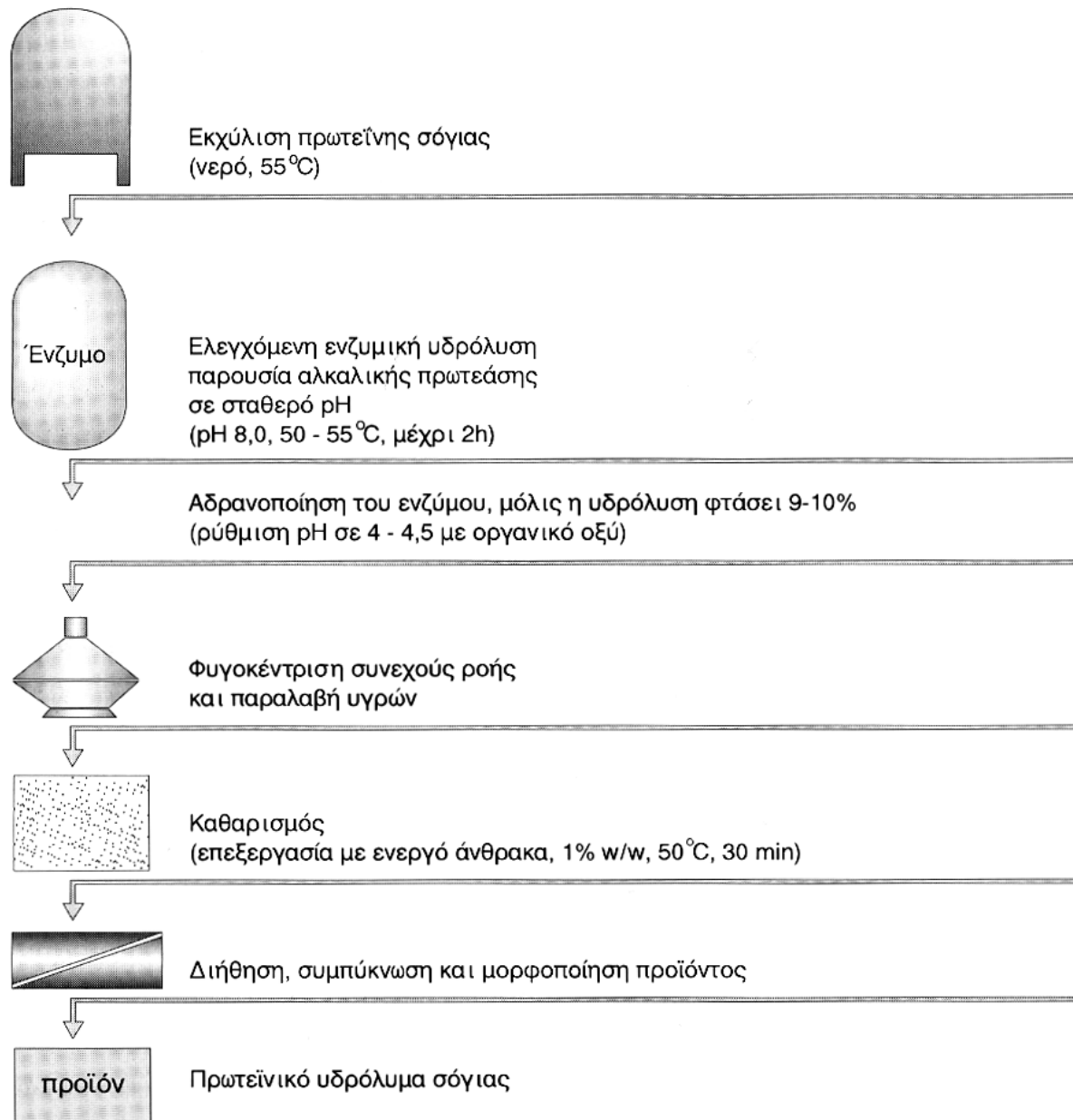
- Οι κυτταρινάσες και οι ημικυτταρινάσες χρησιμοποιούνται ως πρόσμιξη εμπορικών παρασκευασμάτων πηκτινών και βοηθούν στη μείωση της συνεκτικότητας του ιστού.

- Η εξωγενής προσθήκη πηκτινικών ενζύμων (περιέχονται κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες) συντελεί στη διάσπαση των πηκτινικών ενώσεων και στη μείωση της συνοχής του ιστού, με αποτέλεσμα αποδοτικότερη εκχύμωση, καθώς μεγάλο μέρος του χυμού εγκλωβίζεται σε αδιάλυτους πολυσακχαρίτες (πηκτίνες).
- Τα πηκτινικά ένζυμα και οι αμυλάσες συντελούν, επίσης, στη διαύγαση των χυμών (οι πηκτίνες είναι συνήθως υπεύθυνες για τη δημιουργία θολωμάτων).

Εφαρμογές στην παρασκευή Πρωτεϊνικών Παρασκευασμάτων

- Τα πρωτεϊνικά υδρολύματα χρησιμοποιούνται κυρίως ως πρόσθετα σε ζωοτροφές και λιγότερο ως πρόσθετα σε ανθρώπινες τροφές.
- Οι σημαντικότερες πηγές πρωτεϊνικών παρασκευασμάτων είναι:
 1. Πρωτεϊνικό υδρόλυμα σόγιας,
 2. Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract),
 3. Πρωτεϊνικό υδρόλυμα αίματος.
- Διάφορα πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως παπαΐνη, χρησιμοποιούνται και για την τρυφεροποίηση του κρέατος.

- Η προσθήκη τους γίνεται είτε μέσω ενέσεως λίγο πριν την θανάτωση του ζώου, ή απευθείας επί του νωπού ιστού, ή κατά το μαγείρεμα.
- Τα πρωτεολυτικά ένζυμα χρησιμοποιούνται, επίσης, και για την εκμετάλλευση υπολειμμάτων κρέατος σε οστά.
- Υπολογίζεται ότι περίπου 5% του βάρους των οστών αποτελείται από υπολείμματα κρέατος, τα οποία χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε κονσερβοποιημένα προϊόντα, λουκάνικα, κλπ.



Σχ. 75. Στάδια παρασκευής πρωτεϊνικού υδrolύματος σόγιας.



Πλασμόλυση και αυτόλυση
(ρύθμιση pH αιωρήματος κυττάρων σε 5,0,
αύξηση θερμοκρασίας σε 55°C σε διάστημα 5-8 h,
παραμονή επί 24 h, προσθήκη εξωγενών ενζύμων)



Ολοκλήρωση αυτολύσεως και έναρξη παστερίωσης
(αύξηση θερμοκρασίας σε 70°C και παραμονή επί 25 min)



Διαύγαση με φυγοκέντριση
(απομάκρυνση κυττάρων, κυτταρικών θραυσμάτων, κ.τ.λ.)



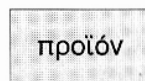
Συμπύκνωση και παστερίωση
(πρώτη φάση: 70-75°C, 2-5 h, έως 30% w/v)



Διήθηση (απαλλαγή από στερεά)



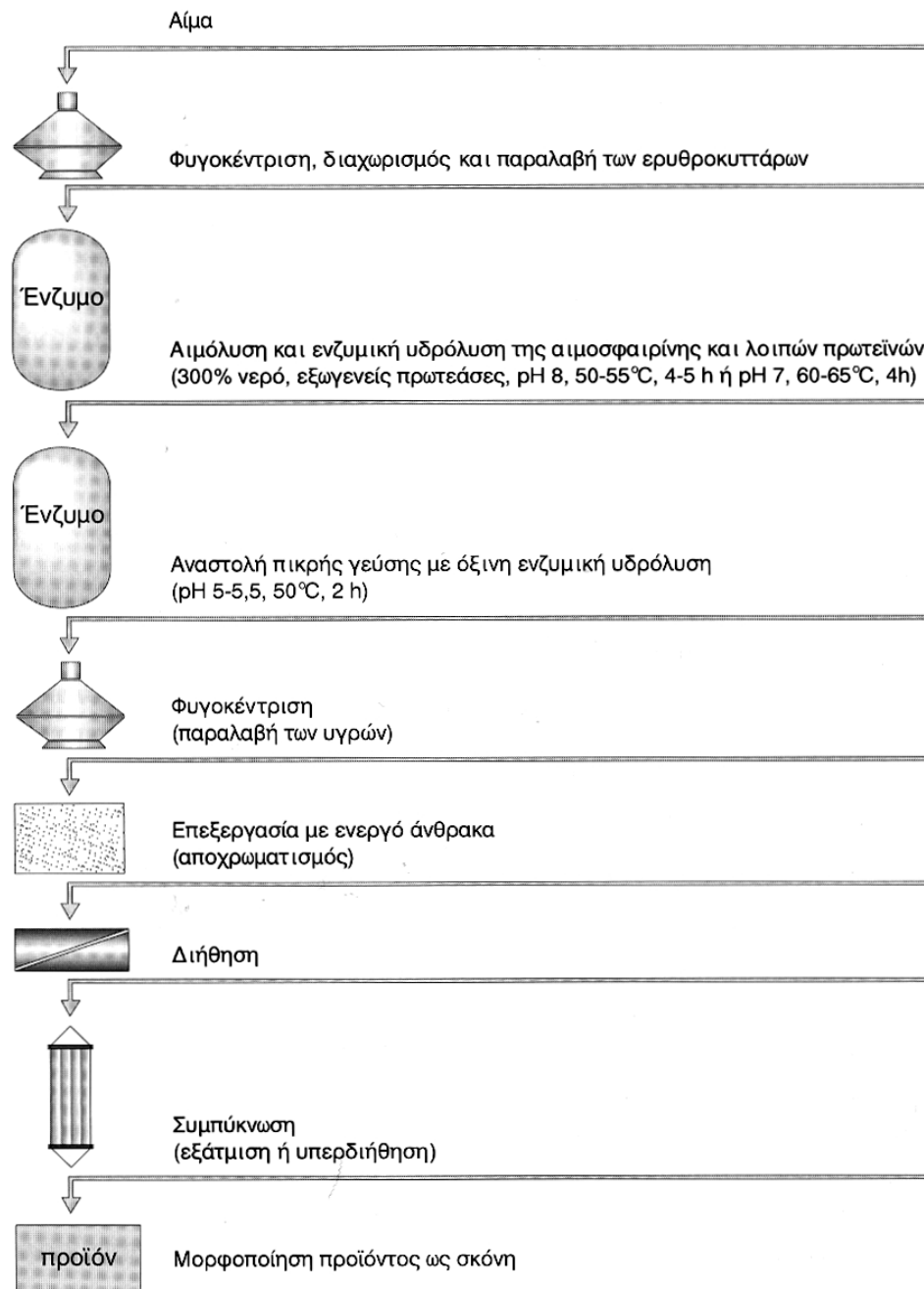
Συμπύκνωση
(Δεύτερη φάση: 55°C, έως 70-75% w/v)



προϊόν

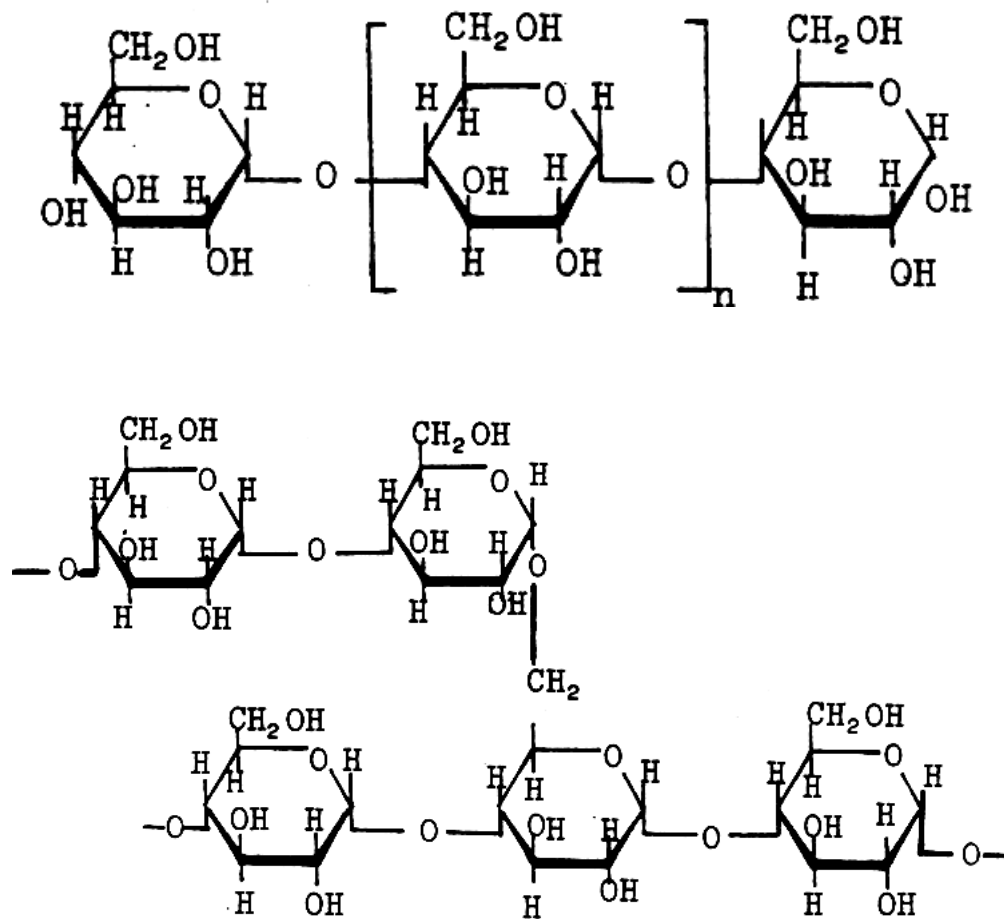
Εκχύλισμα ζυμομύκητα

Σχ. 76. Στάδια παρασκευής εκχυλίσματος ζυμομύκητα.



Σχ. 77. Στάδια παρασκευής πρωτεϊνικού εκχυλίσματος ερυθροκυττάρων.

Ενζυμική Επεξεργασία Αμύλου



Σχ. 78. Δομή αμύλου.

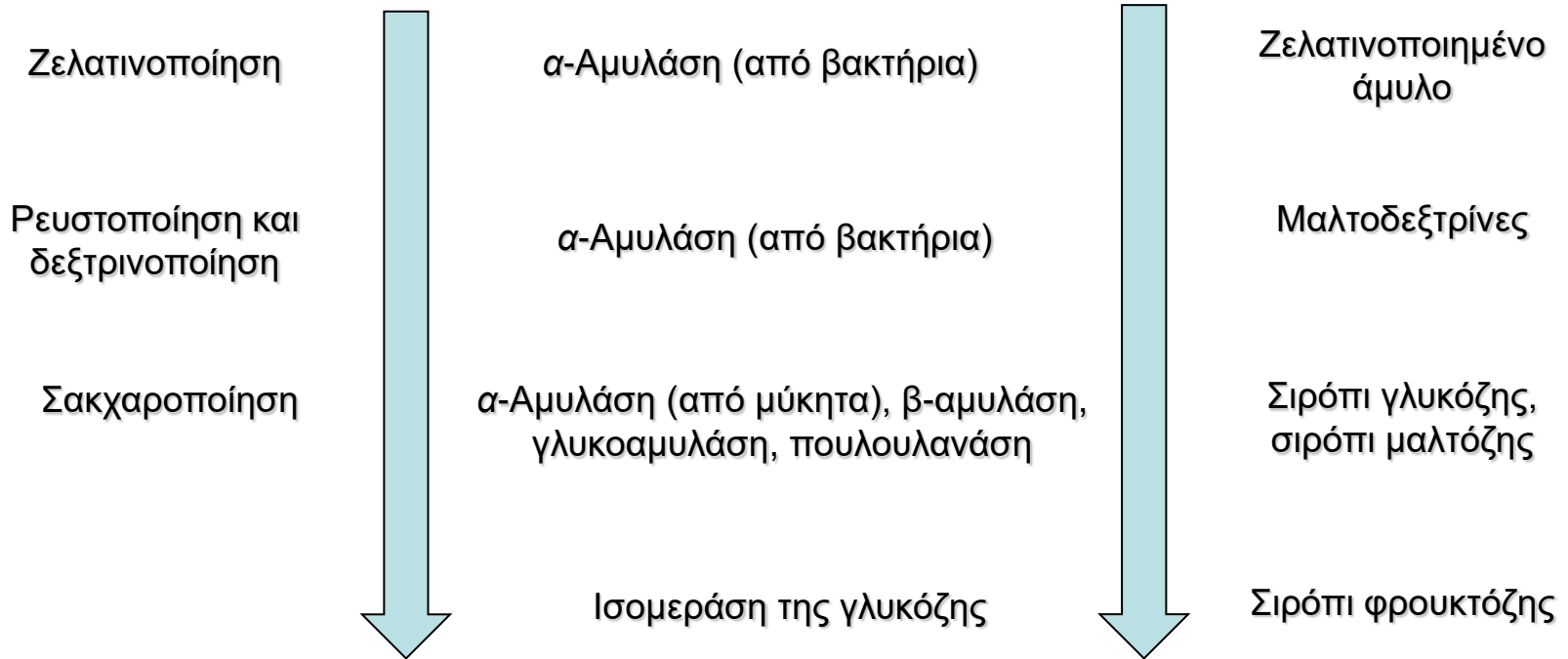
- Το άμυλο αποτελεί αποταμιευτική ύλη των περισσότερων φυτών και πολύτιμο συστατικό των τροφίμων.
- Το άμυλο μπορεί να διαχωριστεί σε δύο συστατικά: την αμυλόζη (κατά 20%) και την αμυλοπηκτίνη (κατά 80%).
- Και τα δύο συστατικά έχουν ως δομικό υλικό την α-γλυκόζη, διαφέρουν, όμως, ως προς τη σύνταξη και το μοριακό βάρος.

- Στην αμυλόζη τα μόρια της γλυκόζης συνδέονται γραμμικά, ενώ στην αμυλοπηκτίνη διακλαδίζονται.
- Στην αμυλόζη τα μόρια της γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με α -(1-4) γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ στην αμυλοπηκτίνη με α -(1-4) και με α -(1-6) γλυκοζιτικούς δεσμούς.
- Η ενζυμική μέθοδος επεξεργασίας του αμύλου αντικατέστησε την όξινη χημική υδρόλυση, η οποία παρουσιάζει σαφή μειονεκτήματα, όπως:
 1. Χαμηλή απόδοση,
 2. Σχηματισμό παραπροϊόντων λόγω ακραίων συνθηκών,
 3. Χρησιμοποίηση διατάξεων ανθεκτικών σε οξέα και σε υψηλές θερμοκρασίες και συνεπώς υψηλού κόστους.

Στάδιο επεξεργασίας

Χρησιμοποιούμενο ένζυμο

Προϊόν



Σχ. 79. Ενζυμική επεξεργασία αμύλου.

- Τα στάδια υδρόλυσης του αμύλου περιλαμβάνουν:

A. Ζελατινοποίηση του υδάτινου αιωρήματος στερεού αμύλου (25-40%) σε υψηλή θερμοκρασία ($>60^{\circ}\text{C}$),

B. Ρευστοποίηση και δεξτρίνοποίηση του ζελατινοποιημένου αμύλου προς μίγμα ολιγοσακχαριτών μειωμένου ιξώδους με βακτηριακές α -αμυλάσες, και

Γ. Σακχαροποίηση του μίγματος μαλτοδεξτρινών με μίγμα ενζύμων (α -αμυλάση, β -αμυλάση, γλυκοαμυλάση και πουλουλανάση).

Ένζυμα

<i>α-αμυλάση</i>	<p>Υδρολύει μόνο α-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς.</p> <p>Σταματά σε α-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς που βρίσκονται 4 θέσεις πριν από μια α-1,6-διακλάδωση.</p> <p>Συνεπώς, προϊόντα υδρόλυσης είναι η μαλτόζη, η μαλτοτριόζη και α-δεξτρίνες (ολιγοπολυμερή γλυκόζης με α-1,4-δεσμούς αλλά και α-1,6-διακλαδώσεις).</p> <p>Είναι μεταλλοένζυμο και η δραστικότητα του εξαρτάται από ασβέστιο.</p> <p>Παντελής απουσία ασβεστίου αναστέλλει τη δραστικότητά του και μειώνει την ανθεκτικότητά του έναντι διαφόρων παραγόντων, όπως η θερμοκρασία, το pH, η ουρία και διάφορα πρωτεολυτικά ένζυμα.</p>
<i>β-αμυλάση</i>	<p>Υδρολύει το άμυλο αποσπώντας μόρια μαλτόζης από το μη ανάγων άκρο του.</p>
<i>γλυκοαμυλάση</i>	<p>Ελευθερώνει βήμα-βήμα μόρια β-γλυκόζης από το μη ανάγων άκρο ολιγο- και πολυ-σακχαριτών, υδρολύοντας διαδοχικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4, καθώς και α-1,6 και α-1,3, αλλά με μικρότερη ταχύτητα (20-30 φορές).</p>

α-1,4-γλυκοζιδάση	Υδρολύει την μαλτόζη προς γλυκόζη.
Πουλουανάση	Υδρολύει τους α-1,6-γλυκοζιτικούς δεσμούς στις θέσεις διακλαδώσεως.

- Η ζελατινοποίηση του αμύλου ολοκληρώνεται σε δύο στάδια:
 1. Αρχικά στους 60°C διασπάται η κρυσταλλική δομή και ελευθερώνονται οι προσκολλημένες στους αμυλόκοκκους πρωτεΐνες, και στη συνέχεια,
 2. Στους 105°C διασπάται το σύμπλοκο αμυλόζης-λιπών.
- Όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος των αλειφατικών αλυσίδων και όσο υψηλότερος ο βαθμός κορεσμού, τόσο υψηλότερη είναι και η θερμοκρασία ζελατινοποίησης.
- Καθώς η διάσπαση των συμπλόκων είναι αντιστρεπτή, το ζελατινοποιημένο άμυλο πρέπει να υδρολυθεί σε υψηλή θερμοκρασία.

- Μετά τη ζελατινοποίηση, το άμυλο είναι διαθέσιμο για το ενζυμικό υπόστρωμα.
- Συνήθως, χρησιμοποιείται α -αμυλάση από τα βακτήρια *Bacillus licheniformis* και *B. stearothermophilus*, η οποία είναι θερμοανθεκτική (105-110°C).
- Κύρια προϊόντα δεξτρίνοποίησης του ζελατινοποιημένου αμύλου είναι μαλτόζη, μαλτοτριόζη, μαλτοπεντόζη ή μαλτοεξόζη (αν χρησιμοποιηθεί α -αμυλάση από *B. licheniformis* ή *B. amyloliquefaciens*, αντίστοιχα) και λίγη γλυκόζη.
- Η περαιτέρω υδρόλυση των δεξτρινών κατά το στάδιο της σακχαροποίησης επιτυγχάνεται με μίγμα ενζύμων, σημαντικότερα των οποίων είναι η γλυκοαμυλάση, του *Aspergillus niger* και η α -αμυλάση του *A. oryzae*.

Σιρόπι γλυκόζης

- Παρασκευάζεται από μίγμα μαλτοδεξτρινών με το ένζυμο γλυκοαμυλάση (60°C, pH:4.5, για 40-72h) σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου.
- Η παρουσία πουλουλανάσης έχει ως αποτέλεσμα αύξηση 1-2% της απόδοσης σε γλυκόζη.
- Μετά το πέρας της αντίδρασης τα ένζυμα απενεργοποιούνται με θερμική επεξεργασία (80-85°C, 20-30min).
- Η θερμική αδρανοποίηση δεν είναι απαραίτητη αν το σιρόπι διηθηθεί και υποστεί επεξεργασία με ενεργό άνθρακα αμέσως μετά την παρασκευή του.

Σιρόπι μαλτόζης

- Παρασκευάζεται με δράση α -αμυλάσης του *A. oryzae* επί μίγματος μαλτοδεξτρινών (55-60°C, pH:4.7-5.0, 24-40h) σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου.
- Το προϊόν αποτελείται από 30-50% μαλτόζη, 6-10% γλυκόζη και μέχρι 30% μαλτοτριόζη.
- Για παρασκευή σιροπιού αυξημένης περιεκτικότητας σε μαλτόζη (50-60%), χρησιμοποιείται β -αμυλάση, ενώ η ταυτόχρονη δράση πουλουλανάσης οδηγεί σε ακόμα υψηλότερα ποσοστά (75%).

Σιρόπι υψηλής μετατροπής

- Χαρακτηρίζεται από υψηλής συγκέντρωσης ζυμώσιμων σακχάρων.
- Παραμένει αναλλοίωτο κατά την αποθήκευση, δεν στερεοποιείται σε χαμηλή θερμοκρασία (4°C).
- Βρίσκει εφαρμογή στην ζυθοποιία και στην αρτοποιία.
- Παρασκευάζεται από συνδυασμένη δράση γλυκοαμυλάσης και α-αμυλάσης (55°C, pH:5.0-5.5, 40h) επί μίγματος δεξτρινών σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, δεδομένου ότι τα δύο ένζυμα έχουν παρόμοιο βέλτιστο pH δράσης.

Σιρόπι φρουκτόζης

- Παράγεται ενζυμικά παρουσία ισομεράσης της γλυκόζης.
- Η γλυκόζη παράγεται σε μεγάλες ποσότητες κυρίως από άμυλο αραβοσίτου.
- Το ενδιαφέρον της μετατροπής της γλυκόζης σε φρουκτόζη οφείλεται στο γεγονός ότι η γλυκόζη εμφανίζει μόνο το 65% της γλυκαντικής ικανότητας της σουκρόζης (κοινή ζάχαρη), ενώ η φρουκτόζη 120%.
- Η ισομεράση της γλυκόζης είναι ενδοκυτταρικό ένζυμο, θερμοανθεκτικό (60°C) και η αντίδραση ευνοείται σε αλκαλικό pH.
- Αδρανοποιείται, όμως, παρουσία οξυγόνου, ενώ για τη μέγιστη δραστηκότητά του απαιτείται η παρουσία κατιόντων μαγνησίου και κοβαλτίου.
- Συνήθως, χρησιμοποιείται ένζυμο από τα γένη *Streptomyces*, *Bacillus* και *Arthrobacter*.

- Στο σημείο ισορροπίας η περιεκτικότητα του σιροπιού σε φρουκτόζη/γλυκόζη είναι 52/48.
- Καθώς η ισομεράση της γλυκόζης είναι ενδοκυτταρικό ένζυμο, η απομόνωσή της είναι δαπανηρή και επομένως προτιμάται η ακινητοποίησή του.
- Στις βιομηχανικές εφαρμογές χρησιμοποιούνται, συνήθως, είτε μερικώς καθαρισμένα και ακινητοποιημένα ένζυμα ή ακινητοποιημένα κύτταρα.
- Συχνά, χρησιμοποιούνται πολλαπλοί βιοαντιδραστήρες στήλης σε σειρά, επιτυγχάνοντας σταθερή παραγωγικότητα, καλύτερο έλεγχο συνθηκών και μικρότερο χρόνο παραμονής του σιροπιού στον βιοαντιδραστήρα σε σχέση με τον βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου.
- Ο μικρότερος χρόνος παραμονής περιορίζει την εμφάνιση χρώματος από παραπροϊόντα διάσπασης της γλυκόζης και της φρουκτόζης, όπως οξέα και καρβονυλικές ενώσεις.

- Παραδείγματα ακινητοποιημένης ισομεράσης είναι:

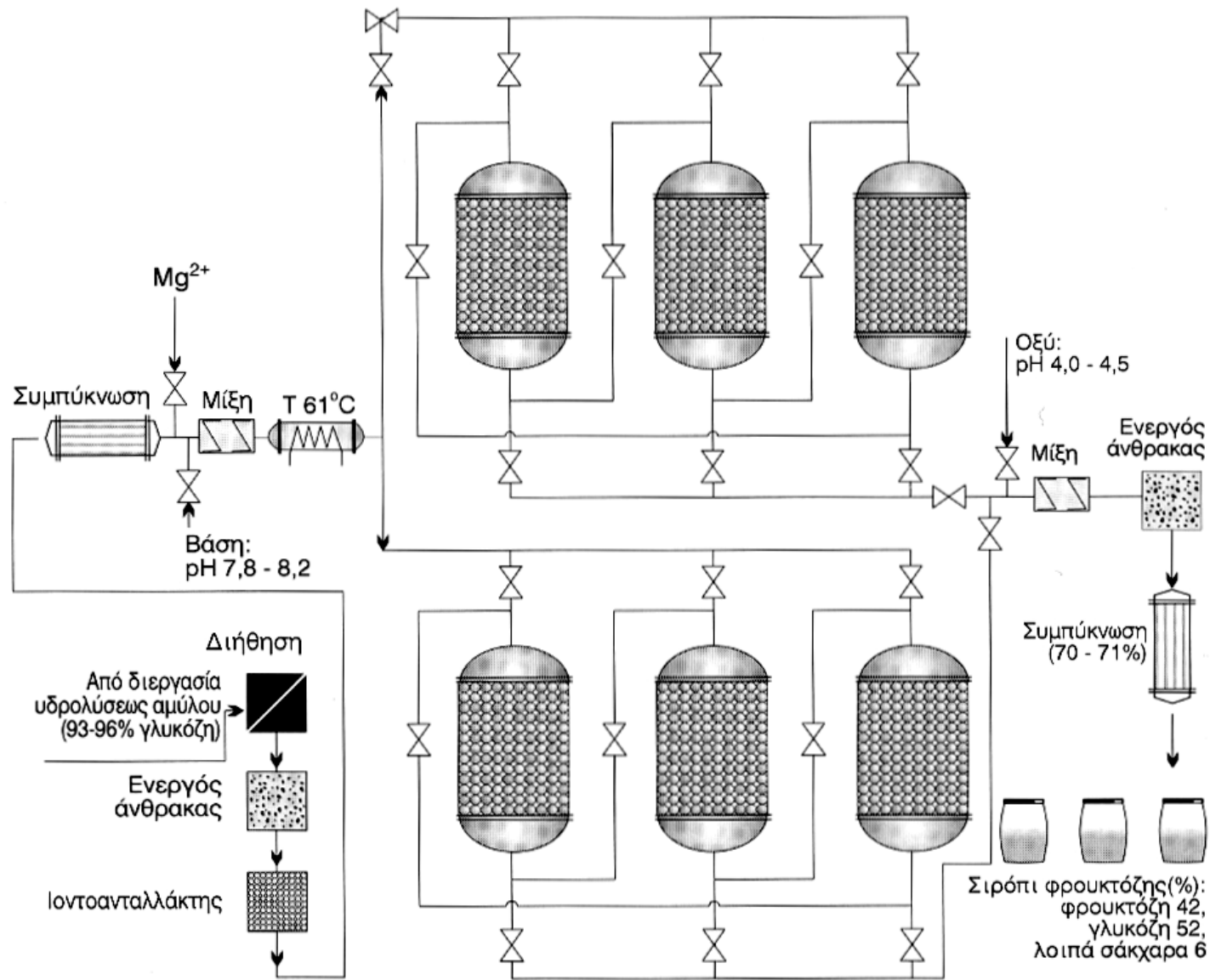
A. Ένζυμο από *Streptomyces* ακινητοποιημένο σε DEAE-κυτταρίνη, και

B. Κύτταρα του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* διαρηγνύονται και το υλικό που λαμβάνεται συνδέεται παρουσία γλουταραλδεϋδης, έτσι ώστε να σχηματιστεί τρισδιάστατο πλέγμα, το οποίο στη συνέχεια θρυματίζεται και εισάγεται στον βιοαντιδραστήρα.

- Άλλη περίπτωση αποτελεί η ακινητοποίηση ολόκληρων κυττάρων του ακτινομύκητα *Actinoplanes missouriensis*, που έχει δράση ισομεράσης της γλυκόζης, σε ζελατίνη.

- Το σύμπλεγμα σταθεροποιείται παρουσία γλουταραλδεϋδης.

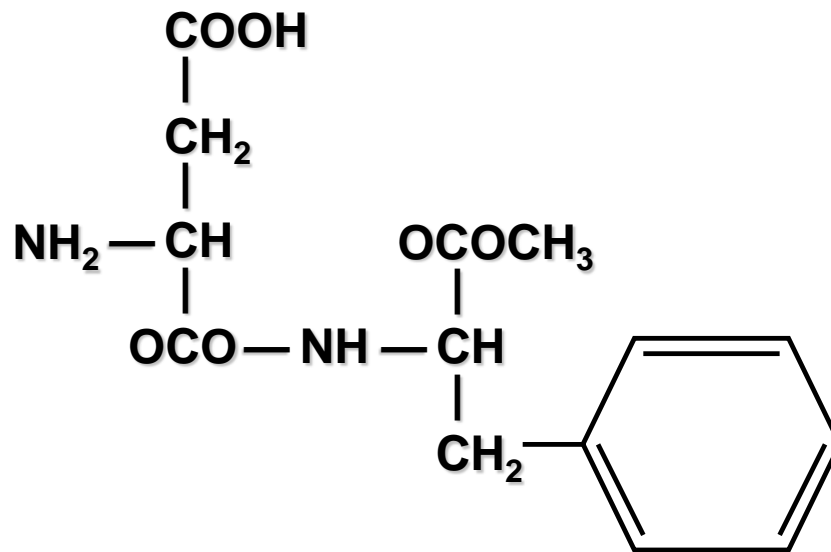
- Αν και η τεχνολογία ακινητοποιημένης ισομεράσης της γλυκόζης χρησιμοποιείται ευρέως, ακόμα επιδέχεται βελτιώσεις, π.χ. η οικονομικοτεχνική εικόνα θα μπορούσε να βελτιωθεί αν το ασβέστιο δεν αποτελούσε αναστολέα του ενζύμου, αν εμφάνιζε καλύτερη θερμοανθεκτικότητα (>60°C) και όξινο βέλτιστο pH.



Σχ. 80. Στάδια παρασκευής σιροπιού φρουκτόζης.

Άλλα προϊόντα γλυκιάς γεύσης

- Η ασπαρτάμη (μεθυλεστέρας του διπεπτιδίου L-Asp-L-Phe) έχει γλυκαντικές ιδιότητες.
- Οι πρωτεΐνες θαυματίνη και μονελίνη, οι οποίες απομονώθηκαν από τον καρπό αφρικανικών φυτών έχουν επίσης γλυκαντικές ιδιότητες.



Σχ. 81. Ασπαρτάμη.