

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΖΥΜΗΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΛΑΒΗ Β-ΓΛΥΚΑΝΗΣ

Γ. Δημόπουλος¹, Μ. Τσαντές¹, Β. Ανδρέου¹, Π. Ταούκης^{1*}

¹Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα

(*taoukis@chemeng.ntua.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της τεχνολογίας τη Ομογενοποίησης Υψηλής Πίεσης (ΟΥΠ) στην βελτίωση της παραλαβής εκχυλίσματος μαγιάς και β-γλυκάνης από κύτταρα μαγιάς. Καθώς η ΟΥΠ προκαλεί κυτταρική διάρρηξη, αποτελεί κατάλληλη προκατεργασία για την επίτευξη των στόχων αυτών. Κυτταρικά αιωρήματα *Saccharomyces cerevisiae* υπέστησαν επεξεργασία με ΟΥΠ σε πιέσεις από 200 έως 800 bar για 1 έως 3 διελεύσεις. Κατόπιν, τα αιωρήματα επωάστηκαν στους 52°C για 24 ώρες (αυτόλυση) και μελετήθηκε η απελευθέρωση α-αμινικού αζώτου και πρωτεϊνών κατά την αυτόλυση. Επίσης μελετήθηκε η περιεκτικότητα σε β-γλυκάνη στο στερεό υπόλειμμα της αυτόλυσης. Η αυτόλυση περιγράφηκε μαθηματικά με κλασματικό εκθετικό μοντέλο πρώτης τάξης με τρεις παραμέτρους, μέσω του οποίου ποσοτικοποιήθηκε η επίδραση της ΟΥΠ στη διεργασία. Η επεξεργασία με ΟΥΠ βρέθηκε ότι επιδρά σημαντικά στην πορεία της αυτόλυσης, οδηγώντας σε επιτάχυνσή της κατά 79% ως προς το α-αμινικό άζωτο και κατά 66% ως προς τις συνολικές πρωτεΐνες. Τέλος, ο συνδυασμός αυτόλυσης και ΟΥΠ βρέθηκε να οδηγεί σε αύξηση της περιεκτικότητας β-γλυκάνης στο ξηρό, στερεό υπόλειμμα της αυτόλυσης έως και 100%, ενώ παράλληλα οδήγησε σε μείωση της περιεχόμενης πρωτεΐνης έως και 63% (επεξεργασία 800 bar/1 διεύση, 8 ώρες αυτόλυσης).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα κύτταρα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* αποτελούν πηγή αρκετών ενώσεων πολύτιμων για τη βιομηχανία τροφίμων. Μέσω της διαδικασίας αυτόλυσης, τα ενδογενή κυτταρικά ένζυμα διασπούν τα μακρομόρια του κυττάρου και απελευθερώνουν πεπτίδια και αμινοξέα, παράγοντας εκχύλισμα μαγιάς. Το εκχύλισμα αυτό αποτελεί σημαντικό φυσικό πρόσθετο τροφίμων, καθώς δρα ως φυσικό ενισχυτικό γεύσης^[1]. Η δράση του αυτή οφείλεται κατά κύριο λόγο στα συστατικά της πρωτεόλυσης που παράγονται κατά την αυτόλυση, κυρίως αμινοξέα και πεπτίδια. Καθώς η λύση του κυττάρου κατά την αυτόλυση δεν πραγματοποιείται ακαριαία, η εκροή των προϊόντων της υδρόλυσης παρεμποδίζεται από τις κυτταρικές δομές^[2]. Η παρεμπόδιση αυτή οδηγεί σε χαμηλούς ρυθμούς παραγωγής εκχυλίσματος και χαμηλές αποδόσεις. Εάν τα κύτταρα υποστούν διάρρηξη πριν την αυτόλυση, η διεργασία επιταχύνεται καθώς τα ενδογενή πρωτεολυτικά ένζυμα απελευθερώνονται και δρουν πιο αποτελεσματικά στις πρωτεΐνες. Επίσης, τα προϊόντα της υδρόλυσης διαχέονται ταχύτερα έξω από το κύτταρο, επιταχύνοντας τη διεργασία^[2]. Μετά το πέρας της αυτόλυσης, το στερεό υπόλειμμα της διεργασίας περιέχει τα μέρη του κυττάρου που δεν διαλυτοποιήθηκαν και συνεπώς δεν πέρασαν στο εκχύλισμα. Το στερεό περιέχει ένα μεγάλο μέρος του κυτταρικού τοιχώματος το οποίο είναι πλούσιο σε β-γλυκάνες (β-(1,3)/(1,6)-D-γλυκάνες) και μαννοπρωτεΐνες. Περίπου 60% κ.β του κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται από β-γλυκάνες, καθιστώντας το πλούσια πηγή β-γλυκανών. Οι β-γλυκάνες έχουν σημαντικά οφέλη στην υγεία και χρησιμοποιούνται επίσης και ως πηκτικά στη βιομηχανία τροφίμων^[3-5]. Κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης τα κυτταρικά τοιχώματα δεν υφίστανται έντονη λύση και οι β-γλυκάνες δεν καταστρέφονται^[6]. Ωστόσο, η αποτελεσματική παραλαβή τους απαιτεί την διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος^[7].

Η Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης είναι μια τεχνική μηχανικής διάρρηξης των κυττάρων που χρησιμοποιείται συχνά για την παραλαβή ενδοκυτταρικών προϊόντων. Η δράση της στηρίζεται

στην αύξηση της πίεσης κυτταρικών αιωρημάτων σε πιέσεις έως και 1000 bar και στη διέλευση του αιωρήματος μέσα από βαλβίδα πολύ μικρής διατομής. Οι διατμητικές τάσεις και τα φαινόμενα σπηλαίωσης που εμφανίζονται κατά την εκτόνωση είναι υπεύθυνα για την καταστροφή της κυτταρικής δομής^[8]. Η ΟΥΠ έχει βρεθεί ότι προκαλεί κυτταρική διάρρηξη σε κύτταρα μαγιάς και αυξάνει την εκροή ενδοκυτταρικών συστατικών κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης^[9]. Ακόμη, η ΟΥΠ έχει χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή β-γλυκανών από κύτταρα μαγιάς μετά την αυτόλυση, σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές διάρρηξης όπως η άλεση σε μύλο σφαιριδίων^[6,10]. Ωστόσο, η χρήση της ΟΥΠ σε διάφορες συνθήκες επεξεργασίας σε συνδυασμό με την αυτόλυση δεν έχει μελετηθεί για την ταυτόχρονη βελτίωση παραλαβής εκχύλισματος μαγιάς και β-γλυκάνης. Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης της ΟΥΠ για την ταυτόχρονη βελτίωση της αυτόλυσης ως προς το διαλυτό εκχύλισμα μαγιάς και την ανάκτηση β-γλυκάνης από το στερεό υπόλειμμά της.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Παρασκευή κυτταρικών αιωρημάτων

Για την παρούσα μελέτη, αρχικά παρασκευάστηκαν αιωρήματα ξηρής μαγιάς αρτοποιίας με περιεκτικότητα σε κύτταρα 9.3 CFU/g. Η ξηρή μαγιά αιωρήθηκε σε απιονισμένο νερό υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min ώστε να εξασφαλισθεί η πλήρης ενυδάτωση των κυττάρων.

Επεξεργασία αιωρημάτων με ΟΥΠ

Η επεξεργασία των κυτταρικών αιωρημάτων πραγματοποιήθηκε σε μονάδα ομογενοποίησης υψηλής πίεσης εργαστηριακής κλίμακας δύο σταδίων (Invensys APV-1000, London, UK). Τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία σε πιέσεις 200, 500 και 800 bar για 1 και 3 διελεύσεις από τον ομογενοποιητή. Η ψύξη των δειγμάτων κατά την έξοδό τους από τη συσκευή πραγματοποιήθηκε πρακτικά ακαριαία με διέλευσή τους από μεταλλική σπείρα βυθισμένη σε ψυχρό νερό.

Αυτόλυση επεξεργασμένων δειγμάτων

Τα επεξεργασμένα δείγματα συλλέχθηκαν σε υάλινους περιέκτες με πώμα (370 mL, $\varnothing 6.5\text{cm} \times 12\text{cm}$). Το pH των δειγμάτων ρυθμίστηκε στην τιμή 5.5 με οξικό οξύ και καυστικό νάτριο 0.1M και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 52°C υπό ήπια ανάδευση. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα από τα αιωρήματα. Τα δείγματα υπέστησαν φυγοκέντρωση (6500g, 10 min) και τα υπερκείμενα, που αποτελούν το διαλυτό εκχύλισμα, αποθηκεύτηκαν υπό κατάψυξη μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή τους. Το στερεό υπόλειμμα της φυγοκέντρωσης, που αποτελεί τα μη διαλυτοποιημένα κυτταρικά στερεά, εκπλύθηκε με απιονισμένο νερό και λυοφιλώθηκε για 48 ώρες (-51°C, 0.040 mbar).

Μέτρηση του δείκτη κυτταρικής διάρρηξης Z

Ο δείκτης κυτταρικής διάρρηξης χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της έκτασης της κυτταρικής καταστροφής που προκαλεί η ΟΥΠ. Ο δείκτης προσδιορίστηκε με μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του κυτταρικού αιωρήματος μετά από κάθε συνθήκη επεξεργασίας ΟΥΠ με τη χρήση φορητού αγωγιμομέτρου (Hanna HI 99300, Hanna Instruments, Woonsocket, USA). Ο δείκτης υπολογίστηκε για κάθε συνθήκη μέσω της Εξίσωσης 1:

$$Z = \frac{\sigma - \sigma_0}{\sigma_{\infty} - \sigma_0} \quad (1)$$

Όπου σ η ηλεκτρική αγωγιμότητα του αιωρήματος σε κάθε συνθήκη επεξεργασίας, σ_0 η ηλεκτρική αγωγιμότητα του ανεπεξέργαστου αιωρήματος και σ_{∞} η ηλεκτρική αγωγιμότητα του αιωρήματος πλήρως διαρρηγμένων κυττάρων. Η τιμή σ_{∞} ορίστηκε ως η τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας με

επεξεργασία ΟΥΠ στα 800 bar για 4 διελεύσεις, καθώς περαιτέρω αύξηση της έντασης των συνθηκών δεν οδήγησε σε αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας των αιωρημάτων.

Μέτρηση φυσικοχημικών παραμέτρων στο διαλυτό εκχύλισμα

Η εξέλιξη της αυτόλυσης προσδιορίστηκε στο διαλυτό εκχύλισμα με βάση την περιεκτικότητά του σε διαλυτές πρωτεΐνες (μέθοδος Lowry^[11]) α-αμινικό άζωτο (μέθοδος νινυδρίνης^[12]) και ολικά στερεά (μέτρηση στερεού υπολείμματος με ξήρανση στους 105°C για 24 h)

Μέτρηση περιεχόμενης β-γλυκάνης και πρωτεΐνης στο στερεό υπόλειμμα

Η περιεχόμενη β-γλυκάνη στο στερεό υπόλειμμα της φυγοκέντρησης προσδιορίστηκε με εξειδικευμένη ενζυμική μέθοδο (Megazyme K-YBGL). Η μέθοδος στηρίζεται στην υδρόλυση της β-γλυκάνης μεθειικό οξύ και β-γλυκανάση και στον περαιτέρω προσδιορισμό της παραγόμενης γλυκόζης με χρήση μείγματος οξειδάσης της γλυκόζης και υπεροξειδάσης. Η μέτρηση της περιεχόμενης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με αρχική υδρόλυση του στερεού σε 6 N HCl και κατόπιν με προσδιορισμό των ελεύθερων αμινοξέων με τη μέθοδο της νινυδρίνης^[13].

Μαθηματική περιγραφή της αυτόλυσης

Η αυτόλυση περιγράφηκε μαθηματικά ως προς τη απελευθέρωση α-αμινικού αζώτου και ολικών πρωτεϊνών μέσω της Εξίσωσης 2:

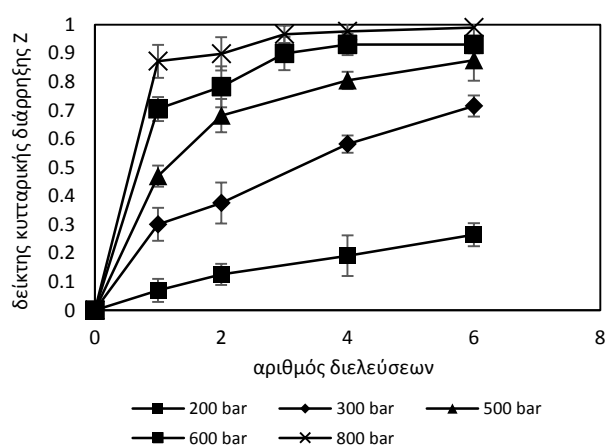
$$C = C_e - (C_e - C_0)e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2)$$

όπου C η συγκέντρωση στο χρόνο αυτόλυσης t , C_e η τελική συγκέντρωση, C_0 η αρχική συγκέντρωση (αμέσως μετά την επεξεργασία) και τ ο χαρακτηριστικός χρόνος απελευθέρωσης που συσχετίζεται με τον ρυθμό αύξησης του μελετούμενου μεγέθους με το χρόνο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μεταβολή του δείκτη κυτταρικής διάρρηξης με τις συνθήκες επεξεργασίας

Ο δείκτης κυτταρικής διάρρηξης συσχετίζεται με την ένταση των συνθηκών επεξεργασίας ΟΥΠ. Τόσο αύξηση της πίεσης επεξεργασίας όσο και αύξηση του αριθμού διελεύσεων ενισχύουν την κυτταρική διάρρηξη και οδηγούν σε αύξηση του δείκτη. Με αύξηση της πίεσης, ο δείκτης Z αυξάνεται ήδη από την πρώτη κιάλας διέλευση.

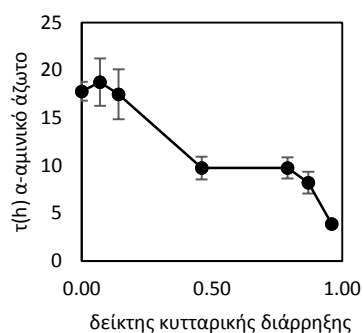


Σχήμα 1. Εξάρτηση του δείκτη κυτταρικής διάρρηξης αιωρημάτων μαγιάς από τον αριθμό διελεύσεων για πιέσεις επεξεργασίας 200-800 bar

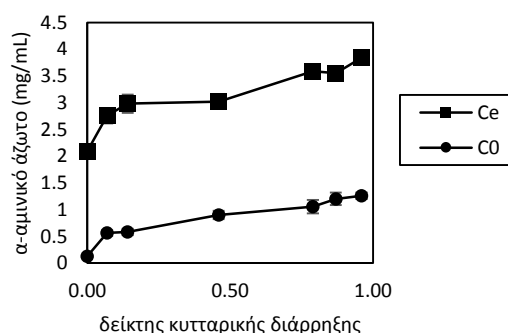
Μεταβολή των κινητικών παραμέτρων της αυτόλυσης

Η προσαρμογή της Εξίσωσης 2 βρέθηκε ότι περιγράφει ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα ($R^2 > 0.95$). Η εξάρτηση των παραμέτρων της εξίσωσης που αφορά στο α-αμινικό άζωτο από το δείκτη κυτταρικής διάρρηξης για κάθε συνθήκη ΟΥΠ παρουσιάζεται στα Σχήματα 1α,β. Παρατηρείται ότι αύξηση της έντασης των συνθηκών επεξεργασίας (άρα και αύξηση του δείκτη κυτταρικής διάρρηξης) οδηγεί σε μείωση του χαρακτηριστικού χρόνου απελευθέρωσης α-αμινικού αζώτου (Σχήμα 2α) από 17.8 h σε 3.9 h για $Z=0.96$. Μείωση του χαρακτηριστικού χρόνου απελευθέρωσης συνεπάγεται ταχύτερη απελευθέρωση αμινοξέων κατά την αυτόλυση. Αντίστοιχα, με αύξηση του Z , τόσο η αρχική συγκέντρωση C_0 όσο και η τελική συγκέντρωση C_e αυξάνονται. Η αύξηση αυτή, στη μεν περίπτωση του C_0 οφείλεται στην ακαριαία απελευθέρωση αμινοξέων από το κύτταρο αμέσως μετά την επεξεργασία, ενώ στην περίπτωση του C_e στην εντονότερη κατάτμηση του κυττάρου λόγω της επεξεργασίας με ΟΥΠ και της αυτόλυσης.

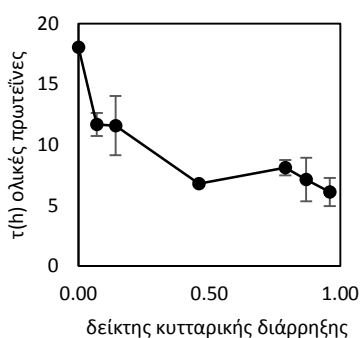
(α)



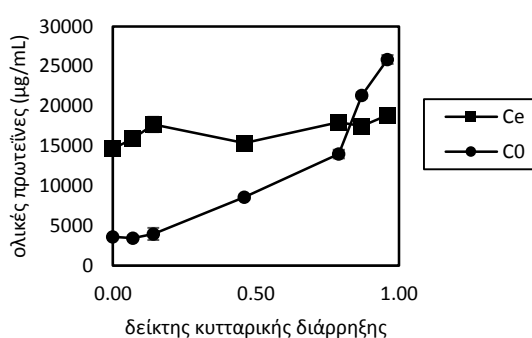
(β)



(γ)



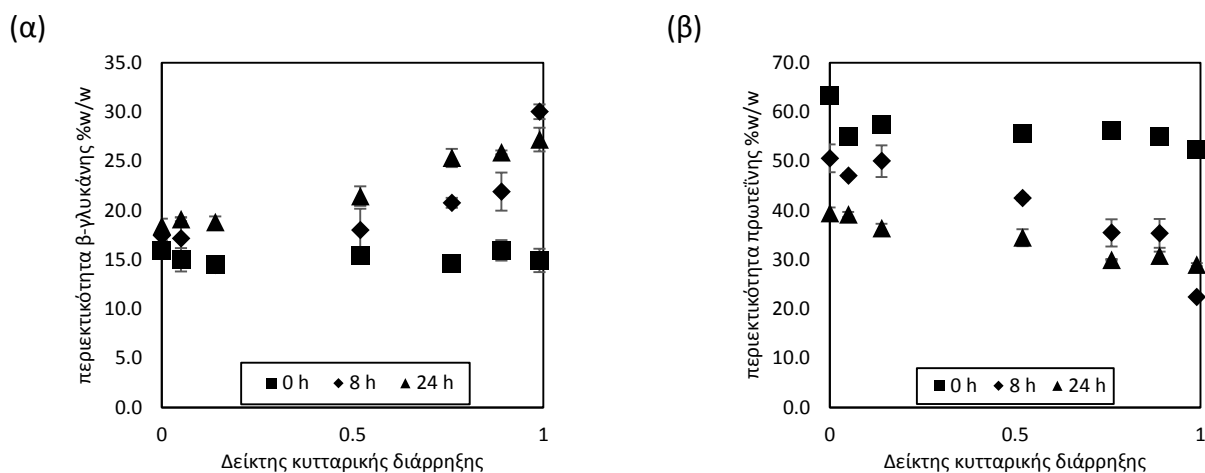
(δ)



Σχήμα 2. Εξάρτηση των παραμέτρων τ , C_e και C_0 για την απελευθέρωση α-αμινικού αζώτου (α,β) και ολικών πρωτεϊνών (γ,δ) από το δείκτη κυτταρικής διάρρηξης

Εξάρτηση της συγκέντρωσης β-γλυκάνης και πρωτεΐνης στο στερεό υπόλειμμα

Η επεξεργασία με ΟΥΠ βρέθηκε ότι οδηγεί σε αύξηση της περιεχόμενης β-γλυκάνης στο στερεό υπόλειμμα της αυτόλυσης και μείωση της περιεχόμενης πρωτεΐνης. Η επεξεργασία με ΟΥΠ, χωρίς την επίδραση της αυτόλυσης (Σχήμα 3α,β "0 h") επιδρά στην απώλεια πρωτεΐνης από το στερεό υπόλειμμα, καθώς ο δείκτης κυτταρικής διάρρηξης αυξάνεται. Με την πάροδο της αυτόλυσης, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη για όλες τις συνθήκες ΟΥΠ μειώνεται καθώς οι πρωτεΐνες διαλυτοποιούνται από τα ενδογενή πρωτεολυτικά ένζυμα και περνούν στο διαλυτό εκχύλισμα, όπως συζητήθηκε παραπάνω. Παράλληλα, η περιεκτικότητα σε β-γλυκάνη αυξάνεται, καθώς το στερεό χάνει πρωτεΐνες.



Σχήμα 3. Εξάρτηση της επί τοις εκατό κατά βάρος περιεκτικότητας του ξηρού στερεού υπολείμματος της αυτόλυσης σε β-γλυκάνη (α) και πρωτεΐνη (β) από το δείκτη κυτταρικής διάρρηξης για χρόνους αυτόλυσης 0, 8 και 24 h.

Η περιεκτικότητα των επεξεργασμένων δειγμάτων σε β-γλυκάνη αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο δείκτης κυτταρικής διάρρηξης. Η επίδραση αυτή δεν είναι σημαντική για κύτταρα που δεν έχουν υποστεί αυτόλυση (Σχήμα 3α "0 h"), αποδεικνύοντας πως η επεξεργασία με ΟΥΠ αυτή καθαυτή δεν οδηγεί σε απώλειες β-γλυκάνης στο υπερκείμενο υγρό αμέσως μετά την επεξεργασία. Ωστόσο, αύξηση του χρόνου αυτόλυσης οδηγεί σε θετική επίδραση της επεξεργασίας στην περιεκτικότητα β-γλυκάνης. Αντίστροφη τάση εμφανίζει η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (Σχήμα 3β): καθώς τα κύτταρα καταστρέφονται μηχανικά, τα θραύσματα που δημιουργούνται καθίστανται πιο προσβάσιμα στα ενδογενή πρωτεολυτικά ένζυμα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διεργασία της Ομογενοποίησης Υψηλής Πίεσης βρέθηκε πως επηρεάζει έντονα την αυτόλυση των κυττάρων μαγιάς. Αύξηση του δείκτη κυτταρικής διάρρηξης οδήγησε σε αύξηση των ελεύθερων αμινοξέων και πρωτεϊνών στο διαλυτό εκχύλισμα και μείωσε τη διάρκεια της αυτόλυσης. Παράλληλα, η επεξεργασία με ΟΥΠ οδήγησε σε αύξηση της περιεκτικότητας σε β-γλυκάνη και μείωση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη στο στερεό υπόλειμμα της αυτόλυσης. Η επίδραση αυτή παρατηρήθηκε μόνο για επεξεργασμένα κύτταρα που είχαν υποστεί αυτόλυση 8 και 24 ώρες.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα έρευνα συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω της πράξης με τίτλο «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) στα πλαίσια της πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» του Ευρωπαϊκού Ερευνητικού Πλαισίου Στήριξης (ΕΣΠΑ) 2014-2020.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] G. Reed, T.W. Nagodawithana. Yeast Technology (1991) 369-412
- [2] B. Behalova, K. Beran. Acta Biotechnologica 6 (1986) 157-152
- [3] M.S. Mantovani, M.F. Bellini, J.P.F. Angeli, R.J. Oliveira, A.F. Silva, L.R. Ribeiro. Mutation Research 3 (2008) 154-161
- [4] M. Novak, V. Vetvicka. Journal of Immunotoxicology 1 (2008) 47-57
- [5] A. Ahmad, B. Munir, M. Abrar, S. Bashir, M. Adnan, T. Tabassum. Journal of Nutrition and Food Sciences 2 (2012) 134-148
- [6] A. Bdzucha-Wróbel, S. Bllazejak, A. Kawarska, L. Stasiak-Rózanska, I. Gientka, E. Majewska. Molecules 19 (2014) 20941–20961
- [7] K. S. Kim, H. S. Sun. Enzyme and Microbial Technology 39 (2006) 496-500
- [8] A. R. Kleinig, A.P.J. Miiiddelberg. Chemical Engineering Science 53 (1998) 891-898
- [9] C. Verduyn, A. Suksomcheep, M. Supphantharika. World Journal of Microbiology and Biotechnology 15 (1999) 57-63
- [10] X.Y. Liu, Q. Wang, S.W. Cui, H.Z. Liu. Food Hydrocolloids 22 (2008) 239-247
- [11] E.F. Hartree. Analytical Biochemistry 48 (1972) 422-427
- [12] S. Lie. Journal of the Institute of Brewing 79 (1973) 37-41
- [13] B. Starcher. Analytical Biochemistry 292 (2001) 125-129