

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΑΥΤΟΛΥΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΑΓΙΑΣ

Γ. Δημόπουλος, Α. Λημναίος, Β. Ανδρέου, Π. Ταούκης

Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα

(taoukis@chemeng.ntua.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Υπερυψηλή Πίεση (ΥΠ) προκαλεί κυτταρική διάρρηξη και επιδρά στην ενεργότητα των ενδοκυτταρικών ενζύμων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της εξεργασίας με ΥΠ στην βελτίωση της παραλαβής εκχυλίσματος μαγιάς από κύτταρα ζυμομυκήτων. Κυτταρικά αιωρήματα *Saccharomyces cerevisiae* υπεβλήθησαν σε προκατεργασία με ΥΠ σε εύρος συνθηκών από 200 ως 750 MPa για χρόνους ως 120 min. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της επεξεργασίας στα ενδογενή πρωτεολυτικά ένζυμα και στο δείκτη κυτταρικής διάρρηξης. Κατόπιν κυτταρικά αιωρήματα επεξεργασμένα σε επιλεγμένες συνθήκες υπέστησαν αυτόλυση με επώαση στους 52°C για 24 ώρες και μελετήθηκε η απελευθέρωση α-αμινικού άζωτου και πρωτεϊνών. Η αυτόλυση περιγράφηκε μαθηματικά με κλασματικό εκθετικό μοντέλο πρώτης τάξης με τρεις παραμέτρους, μέσω του οποίου ποσοτικοποιήθηκε η επίδραση της ΥΠ στη διεργασία. Η επεξεργασία με ΥΠ βρέθηκε ότι επιδρά σημαντικά στην πορεία της αυτόλυσης, οδηγώντας σε επιτάχυνσή της κατά 56% ως προς το α-αμινικό άζωτο και κατά 85% ως προς τις συνολικές πρωτεΐνες σε συνθήκες επεξεργασίας 400 MPa για 16 min.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το εκχύλισμα μαγιάς *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί φυσικό πρόσθετο τροφίμων το οποίο χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό γεύσης σε προϊόντα όπως σούπες και σάλτσες. Οι ιδιότητες του εκχυλίσματος μαγιάς οφείλονται στην περιεκτικότητά του σε πεπτίδια, αμινοξέα και νουκλεοτίδια τα οποία σχηματίζονται κατά τη διεργασία της αυτόλυσης. Η αυτόλυση συνίσταται σε ένα σύνολο ενζυμικών δράσεων όπου ενδοκυτταρικά, λυτικά ένζυμα (πρωτεάσες, νουκλεάσες, γλυκανάσες) διασπούν τα μακρομοριακά συστατικά του κυττάρου. Τα προϊόντα των ενζυμικών δράσεων διαχέονται έξω από το κυτταρικό τοίχωμα στο μέσο που περιβάλλει τα κύτταρα. Μετά το πέρας της αυτόλυσης το προϊόν αποτελείται από το διαλυτό εκχύλισμα, πλούσιο σε πρωτεΐνες, και το αδιάλυτο υπόλειμμα που αποτελείται από τα κυτταρικά τοιχώματα και είναι πλούσιο σε πολυσακχαρίτες, κυρίως β-γλυκάνες και μαννοπρωτεΐνες. Σημαντικό μειονέκτημα της διεργασίας είναι η μεγάλη της διάρκεια (πάνω από 24 ώρες) καθώς και οι χαμηλές αποδόσεις σε εκχύλισμα^[1] Η διεργασία της αυτόλυσης απαιτεί τα ενδογενή ένζυμα της μαγιάς να παραμένουν ενεργά, ιδιαίτερα το σύστημα πρωτεολυτικών ενζύμων το οποίο αποτελείται από καρβοξυπεπτιδάσες, αμινοπεπτιδάσες και πρωτεάσες^[1,2]. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία έχουν πρωτεύοντα ρόλο κατά τη λύση, είναι η πρωτεάση Α, η πρωτεάση Β, η καρβοξυπεπτιδάση Υ. Τα τρία αυτά πρωτεολυτικά ένζυμα εντοπίζονται στα κενοτόπια των κυττάρων, ενώ οι παρεμποδιστές τους στο κυτταρόπλασμα^[1,2]. Εάν τα κύτταρα υποστούν κυτταρική διάρρηξη πριν την αυτόλυση, η διεργασία μπορεί να επιταχυνθεί σημαντικά λόγω της ταχύτερης απελευθέρωσης των πρωτεολυτικών ενζύμων από τα κενοτόπια και της ευκολότερης διάχυσης των προϊόντων υδρόλυσης στο εξωκυτταρικό περιβάλλον.

Η διεργασία της Υπερυψηλής Πίεσης (ΥΠ) έχει βρει εφαρμογή κυρίως στην ψυχρή παστερίωση των τροφίμων και στηρίζεται στην επίδραση που έχουν υψηλές υδροστατικές πιέσεις (100-1000 MPa) τόσο στις κυτταρικές μακροδομές όσο και στην δομή των πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, η διεργασία είναι κατάλληλη για την απενεργοποίηση ανεπιθύμητων ενζύμων και παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Η ΥΠ επηρεάζει έντονα την κυτταρική δομή της μαγιάς,

οδηγώντας σε καταστροφή του κενотоπίου και σε ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος σε πιέσεις πάνω από 100 MPa^[3]. Επίσης, έχει διαπιστωθεί εκτός της απενεργοποίησης και συνατότητας αύξησης της δραστικότητας, αναλόγως των συνθηκών ΥΠ, ενδογενών πρωτεολυτικών ενζύμων σε βακτηριακές καλλιέργειες εκίνησης^[4]. Ωστόσο η επίδραση της ΥΠ στην ενεργότητα των ενδογενών πρωτεολυτικών ενζύμων και στην αυτόλυση της μαγιάς δεν έχει ως τώρα μελετηθεί. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της διεργασίας της Υπερψηλής Πίεσης στην κυτταρική διάρρηξη και τη συνολική πρωτεολυτική ενεργότητα κυττάρων μαγιάς και η επίδραση των παραμέτρων αυτών στην βελτίωση παραγωγής εκχυλίσματος μαγιάς με αυτόλυση.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

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.

Παρασκευή κυτταρικών εκχυλισμάτων για τη μέτρηση της πρωτεολυτικής ενεργότητας

Για τη μέτρηση της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας, τα κυτταρικά αιωρήματα υπέστησαν διάρρηξη με επεξεργασία Ομογενοποίησης Υψηλής Πίεσης σε πίεση 800 bar και 4 διελεύσεις. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η απελευθέρωση των ενζύμων από τα κύτταρα. Μετά την επεξεργασία, τα κυτταρικά αιωρήματα υπέστησαν φυγοκέντρηση στα 12000g για 20 min, ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε υπό κατάψυξη μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία.

Επεξεργασία με Υπερψηλή Πίεση

Για την επεξεργασία με Υπερψηλή Πίεση (ΥΠ) χρησιμοποιήθηκε η μονάδα Food Pressure Unit FPU 1.01 (Resato International BV, Roden, Holland). Το σύστημα αποτελείται από μία μονάδα αύξησης της πίεσης συνδεδεμένη με μία συστοιχία 6 κυλινδρικών θαλάμων πίεσης όγκου 42 mL, καθώς και έναν θάλαμο πίεσης όγκου 1.5 L. Όλα τα δοχεία πίεσης φέρουν μανδύα νερού ψύξης/θέρμανσης και θερμοστοιχεία για την καταγραφή της θερμοκρασίας. Το μέσο μεταφοράς της πίεσης του συστήματος είναι πολυαιθυλενογλυκόλη (polyglycol, ISO viscosity class VG 15).

Μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στην πρωτεολυτική ενεργότητα και το δείκτη κυτταρικής διάρρηξης

Η επίδραση της ΥΠ στην πρωτεολυτική ενεργότητα και το δείκτη κυτταρικής διάρρηξης μελετήθηκε στη συστοιχία 6 θαλάμων πίεσης του συστήματος. Σε κάθε θάλαμο τοποθετήθηκαν δείγματα κυτταρικού αιωρήματος και κυτταρικού εκχυλίσματος, συσκευασμένα σε διστρωματική συσκευασία πολυαιθυλενίου-πολυπροπυλενίου. Τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με ΥΠ σε πιέσεις 200-750 MPa για χρόνους επεξεργασίας 0-120 min. Η μέτρησή του δείκτη κυτταρικής διάρρηξης Z πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του κυτταρικού αιωρήματος μετά από κάθε συνθήκη επεξεργασίας ΥΠ 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 ανεπεξεργαστού αιωρήματος και σ_{∞} η ηλεκτρική αγωγιμότητα του αιωρήματος πλήρως διαρρηγμένων κυττάρων. Η τιμή σ_{∞} ορίστηκε ως η τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας με

επεξεργασία ΥΠ στα 750 MPa για 30 min, καθώς περαιτέρω αύξηση της έντασης των συνθηκών δεν οδήγησε σε αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας των αιωρημάτων.

Μέτρηση της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας

Η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα στα επεξεργασμένα με ΥΠ κυτταρικά εκχυλίσματα προσδιορίστηκε με υπόστρωμα αζοκαζεΐνης (1% αζοκαζεΐνη σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου 0.1 M, pH=6). Για κάθε δείγμα, 100 μL εκχυλίσματος επωάστηκαν με 400 μL υποστρώματος για 1 h στους 40°C. Κατόπιν, προστέθηκαν 500 μL τριχλωροξικού οξέος και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 12000g για 10 min. Τέλος, προσδιορίστηκε η απορρόφηση του υπερκείμενου στα 340 nm. 1 unit ενζύμου ορίστηκε ως η ποσότητα του ενζύμου που δίνει μεταβολή της απορρόφησης $\Delta A=1$ για 1 ώρα επώασης.

Επιλογή συνθηκών ΥΠ και αυτόλυση δειγμάτων

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη του δείκτη κυτταρικής διάρρηξης και της πρωτεολυτικής ενεργότητας, επιλέχθηκαν συνθήκες που να καλύπτουν ένα εύρος τιμών και για τα δύο μεγέθη ώστε να μελετηθεί η επίδρασή τους στην αυτόλυση. Στις συνθήκες αυτές πραγματοποιήθηκε επεξεργασία κυτταρικών αιωρημάτων με ΥΠ στο θάλαμο όγκου 1.5 L. Αμέσως μετά την επεξεργασία, το pH των δειγμάτων ρυθμίστηκε στην τιμή 5.5 και αυτά επωάστηκαν σε υάλινους περιέκτες με πώμα (370 mL, $\varnothing 6.5\text{cm} \times 12\text{cm}$) 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.

Μέτρηση φυσικοχημικών παραμέτρων στο διαλυτό εκχύλισμα

Η εξέλιξη της αυτόλυσης προσδιορίστηκε στο διαλυτό εκχύλισμα με βάση την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες (μέθοδος Lowry)^[5], α-αμινικό άζωτο (μέθοδος νινυδρίνης)^[6] και στερεό υπόλειμμα (ξήρανση στους 105°C για 24 h). Το στερεό υπόλειμμα εκφράστηκε ως απόδοση υπολογίζοντας το ποσοστό του αρχικού ξηρού βάρους κυττάρων που διαλυτοποιήθηκε στο εκχύλισμα.

Μαθηματική περιγραφή της αυτόλυσης

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

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

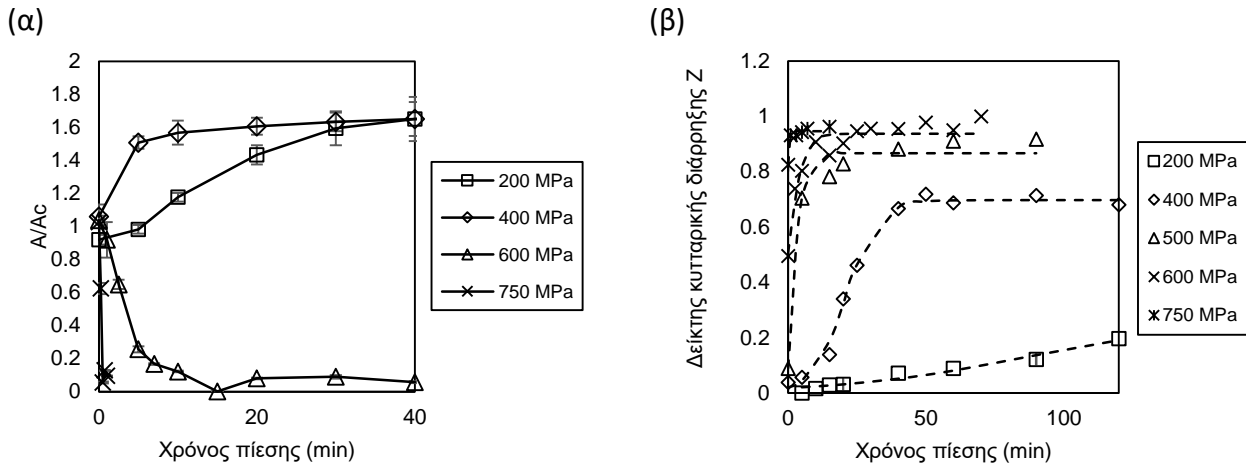
όπου C η συγκέντρωση στο χρόνο αυτόλυσης t , C_e η τελική συγκέντρωση, C_0 η αρχική συγκέντρωση (αμέσως μετά την επεξεργασία) και τ ο χαρακτηριστικός χρόνος απελευθέρωσης που συσχετίζεται με τον ρυθμό αύξησης του μελετούμενου μεγέθους με το χρόνο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Επίδραση της ΥΠ στην πρωτεολυτική ενεργότητα και το δείκτη κυτταρικής διάρρηξης

Τόσο ο δείκτης κυτταρικής διάρρηξης όσο και η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα βρέθηκε πως επηρεάζονται έντονα από την επεξεργασία ΥΠ. Η πρωτεολυτική ενεργότητα (εκφρασμένη ως κλάσμα ενεργότητας ενζύμου προς ενεργότητα ενζύμου ανεπεξεργαστού δείγματος) αυξάνεται με αύξηση του χρόνου πίεσης για πιέσεις έως και 400 MPa, ενώ για μεγαλύτερες πιέσεις, μειώνεται. Στα 200 και 400 MPa η ενεργότητα μετά από 40 min επεξεργασίας είναι έως και 1.6 φορές αυξημένη σε σχέση με την ενεργότητα του ανεπεξεργαστού δείγματος. Παρότι ο ακριβής μηχανισμός της ενεργοποίησης αυτής δεν είναι ακόμη απόλυτα σαφής, η αύξηση αυτή μπορεί να οφείλεται (α) στην απενεργοποίηση των παρεμποδιστών των πρωτεολυτικών ενζύμων που βρίσκονται εγγενώς στο κύτταρο ή (β) στην μεταβολή της δομής των ίδιων των ενζύμων κατά την επεξεργασία. Στα 600 MPa παρατηρείται απενεργοποίηση σε 15 min και στα 750 MPa σε 1 min επεξεργασίας. Αντίθετα, ο δείκτης κυτταρικής διάρρηξης εμφανίζει αυξητική τάση με αύξηση

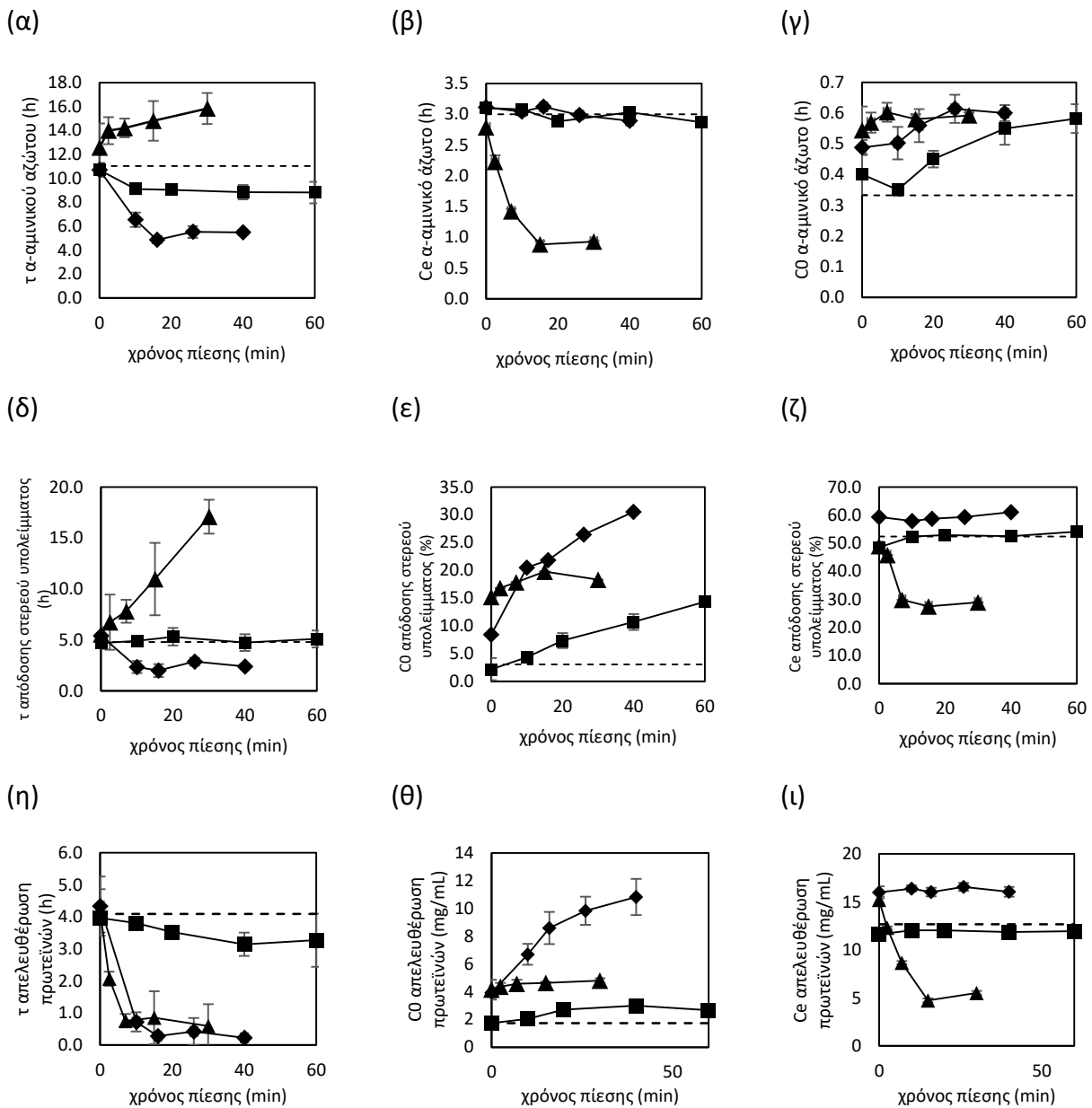
τόσο του χρόνου πίεσης όσο και της πίεσης.



Σχήμα 1. Εξάρτηση της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας (α) και του δείκτη κυτταρικής διάρρηξης (β) από το χρόνο πίεσης για διαφορετικές πιέσεις επεξεργασίας

Επίδραση της ΥΠ στις κινητικές παραμέτρους της αυτόλυσης

Η επεξεργασία των αιωρημάτων μαγιάς βρέθηκε ότι επηρεάζει σημαντικά τη διεργασία της αυτόλυσης. Η προσαρμογή του μαθηματικού μοντέλου (Εξίσωση 2) βρέθηκε ότι περιγράφει ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα ($R^2 > 0.95$) που αφορούν στην απελευθέρωση πρωτεϊνών, α-αμινοξέων και στερεού υπολείμματος. Στο Σχήμα 2 απεικονίζεται η εξάρτηση των παραμέτρων του μαθηματικού μοντέλου από το χρόνο πίεσης για τις τρεις παραμέτρους της αυτόλυσης που μελετήθηκαν. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2(α-γ), η επεξεργασία με ΥΠ οδήγησε σε μείωση του χαρακτηριστικού χρόνου απελευθέρωσης α-αμινοξέων στις πιέσεις 200 και 400 MPa, έως και κατά 56% σε σχέση με το ανεπεξεργασμένο δείγμα. Το γεγονός αυτό αντιστοιχεί σε επιτάχυνση της πρωτεόλυσης και αποδίδεται τόσο στην ενεργοποίηση των πρωτεολυτικών ενζύμων όσο και στην αύξηση του δείκτη κυτταρικής διάρρηξης. Αντιθέτως, για επεξεργασία στα 600 MPa, ο χαρακτηριστικός χρόνος απελευθέρωσης αυξάνεται με αύξηση του χρόνου πίεσης, καθώς επεξεργασία στις συνθήκες αυτές οδηγεί σε βαθμιαία απώλεια της πρωτεολυτικής ενεργότητας (βλ. Σχήμα 1α). Παρόμοια τάση παρατηρείται για τη συγκέντρωση α-αμινοξέων στο τέλος της αυτόλυσης (Σχήμα 2β), ενώ για τη συγκέντρωση αμέσως μετά την επεξεργασία, παρατηρείται πως αυτή αυξάνεται τόσο με αύξηση της πίεσης όσο και του χρόνου πίεσης, καθώς η επεξεργασία προκαλεί ακαριαία απελευθέρωση ενδοκυτταρικών αμινοξέων. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσιάζουν οι παράμετροι που αφορούν στην απόδοση του στερεού υπολείμματος (Σχήμα 2 δ,ε,ζ).



Σχήμα 2. Εξάρτηση των παραμέτρων τ , C_e και C_0 της αυτόλυσης από το χρόνο πίεσης για την απελευθέρωση α-αμινοϊκού αζώτου (α,β,γ), στερεού υπολείμματος (δ,ε,ζ) και πρωτεϊνών (η,θ,ι) σε πιέσεις 200 MPa (■), 400 MPa (◆), και 600 MPa (▲). Οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στις τιμές του ανεπεξέργαστου δείγματος.

Η απελευθέρωση πρωτεϊνών κατά την αυτόλυση οφείλεται τόσο στην κυτταρική διάρρηξη και την απελευθέρωση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών όσο και στην διάσπαση θραυσμάτων από το κυτταρικό τοίχωμα. Παρατηρήθηκε ότι ο χαρακτηριστικός χρόνος απελευθέρωσης για τις πρωτεΐνες μειώνεται για τις τρεις πιέσεις που μελετήθηκαν (Σχήμα 2η). Επεξεργασία στα 200 MPa οδηγεί σε μείωση του τ που εξαρτάται από το χρόνο πίεσης. Αντίθετα, για πιέσεις 400 και 600 MPa ο χαρακτηριστικός χρόνος απελευθέρωσης μειώνεται κατά 85% με επεξεργασία για 7 min. Η μείωση αυτή υποδηλώνει ακαριαία απελευθέρωση των πρωτεϊνών κατά την επεξεργασία. Ακόμη ενδιαφέρον παρουσιάζει η εξέλιξη των παραμέτρων C_0 και C_e με το χρόνο πίεσης. Στις πιέσεις 200 και 400 MPa οι παράμετροι αυξάνονται σε σχέση με το ανεπεξέργαστο δείγμα, υποδηλώνοντας αύξηση τόσο της συγκέντρωσης πρωτεΐνης μετά την επεξεργασία όσο και αύξηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο τέλος της αυτόλυσης. Η εξάρτηση της C_e από το χρόνο πίεσης δεν

βρέθηκε να εξαρτάται από το χρόνο επεξεργασίας στις πιέσεις αυτές. Αντίθετα, σε πίεση 600 MPa φαίνεται από την τάση και των δύο παραμέτρων πως η απελευθέρωση πρωτεΐνης παρεμποδίζεται, πιθανώς λόγω μετουσίωσης ή καταβύθισής τους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η επεξεργασία αιωρημάτων μαγιάς *Saccharomyces cerevisiae* με Υπερυψηλή Πίεση προκαλεί τόσο αύξηση της κυτταρικής διάρρηξης όσο και μεταβολή της εγγενούς πρωτεολυτικής ενεργότητας των κυττάρων. Οι μεταβολές αυτές βρέθηκε ότι αντικατοπτρίζονται και στην παραγωγή εκχυλίσματος μαγιάς με αυτόλυση. Η απελευθέρωση αμινοξέων και πρωτεϊνών στο διαλυτό εκχύλισμα επιταχύνεται με επεξεργασία σε πιέσεις έως και 400 MPa, ενώ η επεξεργασία στα 600 MPa οδηγεί σε παρεμπόδιση της αυτόλυσης.

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. *Folia Microbiologica* 24 (1979) 455-461
- [3] S. Shimada, M. Andou, N. Naito, M. Osumi, R. Hayashi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40 (1993) 123-131
- [4] G. Katsaros, M. Giannoglou, P. Taoukis. *Journal of Food Science* 74 (2009) 219-225
- [5] E.F. Hartree. *Analytical Biochemistry* 48 (1972) 422-427
- [6] S. Lie. *Journal of the Institute of Brewing* 79 (1973) 37-41