



Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής
Πανεπιστήμιο Αιγαίου (Λήμνος)

Βιοχημεία Τροφίμων

Μέρος ΙΙ: Ο Ρόλος των Ενζύμων στα Τρόφιμα – Ενζυμική Τεχνολογία

Ακαδημαϊκό Έτος 2014 - 2015

Ενότητα 5^η
Εφαρμογές Οξειδωτικών Ενζύμων



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Δημήτρης Π. Μακρής *PhD DIC*
Επικουρος Καθηγητής

Άδειες Χρήσης

Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό διατίθεται με τους όρους χρήσης Creative Commons (CC) - Αναφορά Δημιουργού - Μη Εμπορική Χρήση - Όχι Παράγωγα Έργα.

Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, διαγράμματα, κείμενα, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



Χρηματοδότηση

Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.

Το έργο «Ανοιχτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Αιγαίου» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.

Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Εισαγωγικά

Οι οξειδωτικές και οι αναγωγικές διεργασίες παίζουν σημαντικό ρόλο στα τρόφιμα. Δεν επηρεάζουν μόνο τη γεύση, αλλά και την εμφάνιση, τη δομή, τη διάρκεια ζωής, τη διατροφική αξία και την αντοχή στην επεξεργασία.

Σε μερικές περιπτώσεις οι οξειδοαναγωγικές διεργασίες συνεισφέρουν με θετικό τρόπο στην ανάπτυξη του τελικού αρώματος, σε βελτιωμένη δομή και εμφάνιση ή αυξημένη διάρκεια ζωής.

Συνεπώς, ο έλεγχος της οξειδοαναγωγικής συμπεριφοράς των τροφίμων κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων επεξεργασίας και αποθήκευσης είναι ύψιστης σημασίας.

Γεύση / Άρωμα

Λιποξυγενάσες (LOX)

Είναι ενδογενή ένζυμα που διαμορφώνουν τόσο τη δημιουργία αρώματος, όσο και τη δημιουργία δυσάρεστων οσμών (off-flavours) σχεδόν σε όλα τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης.

Ανάλογα με την τελική συγκέντρωση και τον τύπο του τροφίμου, η ίδια ουσία μπορεί να συνεισφέρει στο αρωματικό/γευστικό προφίλ ή ν' αποτελεί οργανοληπτικό ελάττωμα.

Για παράδειγμα, οι C-6 αλδεΐδες και αλκοόλες που προέρχονται από την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, μέσω κατάλυσης της LOX, έχουν σε πολλές περιπτώσεις θετική επίδραση στο άρωμα (οίνοι, χυμοί φρούτων), αλλά σε άλλα ποτά (ζύθος) έχουν αρνητικό αντίκτυπο.

Γεύση / Άρωμα

Η LOX χρησιμοποιείται επίσης για την *in vitro* παραγωγή ορισμένων χαρακτηριστικών αρωμάτων, τα οποία προστίθενται σε ποτά και γαλακτοκομικά προϊόντα για να εμπλουτίσουν / ενισχύσουν το αρωματικό προφίλ τους.

Τυπικά παραδείγματα συμπεριλαμβάνουν τη μετατροπή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε διάφορες μικρού έως μετρίου μήκους ανθρακικής αλυσίδας αλδεΰδες / αλκοόλες ή σε (S)-δ-δεκαλακτόνη (άρωμα βουτύρου).

Γνωστές αρωματικές αλδεΰδες / αλκοόλες που προέρχονται από λιπαρά οξέα συμπεριλαμβάνουν επίσης την (E2, E6)-νοναδιενάλη (αγγούρι), 1-οκτεν-3-όνη (μανιτάρια), (Z5)-οκταδιεν-3-όνη (φύλλα γερανιού), (E3, E5)-ενδεκατριένιο (βαλσάμικο) και (E3, Z5, Z8)-ενδεκατετραένιο (φύκια).

Γεύση / Άρωμα

Ανάλογα με το βαθμό ακορεσιτότητας του υποστρώματος και την τοποεκλεκτικότητα του ενζύμου, δημιουργούνται διαφορετικές υδροπερόξυ ενώσεις, από τις οποίες προέρχονται οι παραπάνω ενώσεις μετά από μια αλληλουχία ενζυμικών αντιδράσεων.

Οι LOX μπορούν να δεχτούν ως υποστρώματα και ένα ευρύ φάσμα φαινολικών ουσιών. Στη βιομηχανία των τροφίμων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μετατροπή, μέσω καταλυτικής δράσης της LOX, της ισοευγενόλης και του βενζοϊκού κονιφερυλεστέρα σε βανιλίνη.

Η βιομηχανική εφαρμογή αυτών των μετατροπών όμως εμποδίζεται από τεχνικούς παράγοντες (διαθεσιμότητα πρώτων υλών, κόστος).

Άλλες εφαρμογές της LOX συμπεριλαμβάνουν την οξείδωση του β -καροτενίου για την παραγωγή β -ιονόνης και τη δημιουργία αρώματος «μπισκότου» από αμυλούχες πρώτες ύλες σε συνδυασμό με αμυλάσες.

Γεύση / Άρωμα

Οξειδάσες αλκοολών και δεϋδρογονάσες

Γενικά, οι αλδεϋδες είναι πιο ισχυρά αρωματικά μόρια απ' ότι οι αντίστοιχες αλκοόλες, γι' αυτό οι οξειδάσες αλκοολών παρουσιάζουν ενδιαφέρον για την *in vitro* παραγωγή αρωμάτων, τα οποία έχουν εφαρμογές στα ποτά.

Ένα τυπικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση οξειδάσης της μεθανόλης από τους μύκητες (ζύμες) *Pichia*, *Hansenula* και *Candida* για την παραγωγή ακεταλδεϋδης από αιθανόλη.

Ανάμεσα στις διαφορετικές ζύμες, η εξειδίκευση υποστρώματος μπορεί να κυμαίνεται. Έτσι, τα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και με άλλα υποστρώματα, όπως εξενόλη και άλλες αλκοόλες μακράς αλυσίδας, και να παραχθούν οι αντίστοιχες αλδεϋδες.

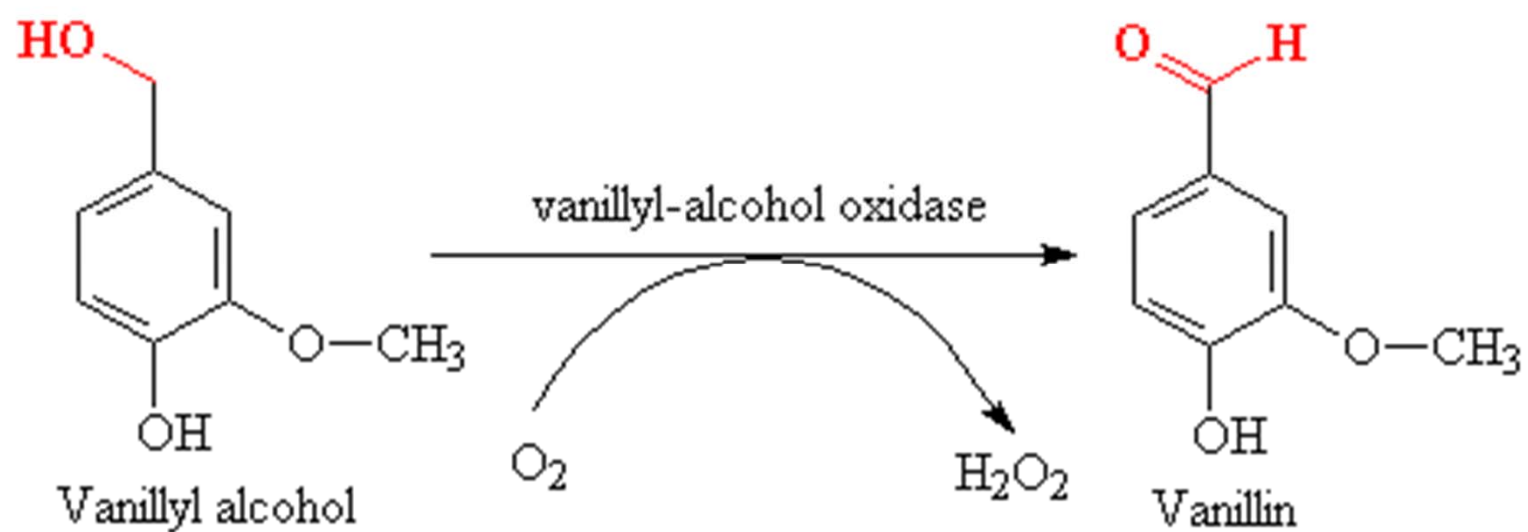
Γεύση / Άρωμα

Η οξειδάση της βανιλικής αλκοόλης (vanillyl alcohol oxidase - VAO) από το μύκητα *Penicillium simplicissimum* είναι ένας ειδικός τύπος οξειδάσης αλκοολών.

Είναι ένα σταθερό ένζυμο με ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος και μετατρέπει εύκολα *p*-υποκατεστημένες φαινόλες σε πρόδρομες ουσίες αρωμάτων ή αρώματα.

Εκτός από τη φυσική βανιλίνη και την κονιφερυλική αλκοόλη, διάφορες βινυλ-φαινόλες και αλλυλ-φαινόλες μπορούν να παραχθούν από φθηνές πρώτες ύλες και O₂ ως δέκτη ηλεκτρονίων.

Έτσι, ένα μίγμα φαινολικών ουσιών μπορεί να μετασχηματιστεί από την VAO και να δώσει ένα φάσμα αρωμάτων που αποτελούνται από διάφορες αλδεΐδες.



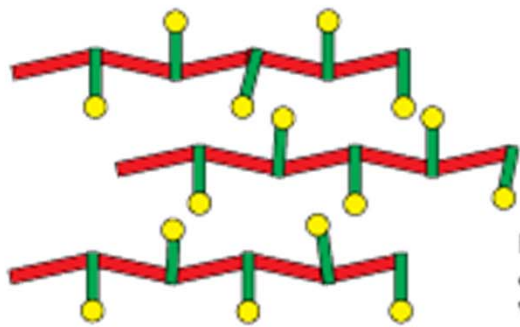
Δομή

Η χρήση οξειδοαναγωγασών για μεταβολές της δομής (υφής) των τροφίμων αποδίδεται στην ικανότητά τους να προκαλούν διασύνδεση (crosslinking) πρωτεϊνών ή/και πολυσακχαριτών.

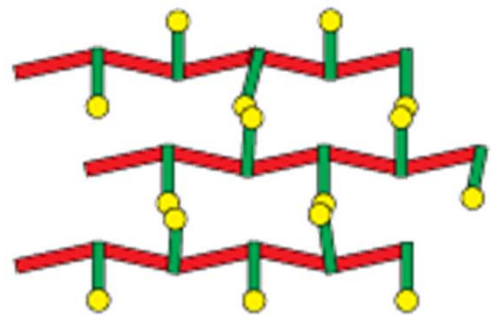
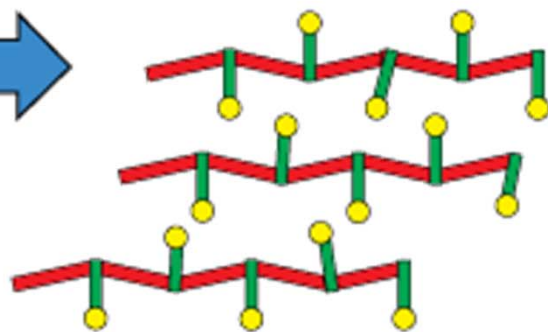
Αυτή η ιδιότητα είναι σημαντικού ενδιαφέροντος για τη βελτίωση της δομής ζύμης και ζυμαρικών (όγκο, ελαστικότητα, τραγανότητα) και γαλακτοκομικών προϊόντων (εμφάνιση, στοματική αίσθηση - mouthfeel).

Η ενζυμική διασύνδεση μπορεί να συμβεί μέσω δύο οδών:

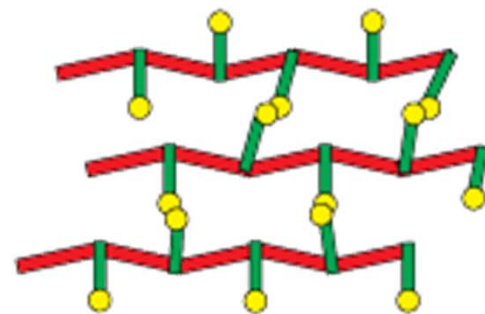
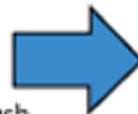
1. Έμμεσα, μέσω ενζυμικώς παραγόμενου H_2O_2 (οξειδάση της γλυκόζης, οξειδάση του ασκορβικού οξέως) ή μέσω ενζυμικής παραγωγής ελευθέρων ριζών (περοξειδάση, λιποξυγενάση).
2. Άμεσα, μέσω οξείδωσης λειτουργικών ομάδων στις πρωτεΐνες. Παράδειγμα αποτελούν η σύνδεση καταλοίπων τυροσίνης και φερουλικού οξέως μέσω τυροσινάσης ή λακκάσης, καταλοίπων λυσίνης μέσω της λυουλ οξειδάσης και δημιουργία γεφυρών δισουλφιδίων μέσω της οξειδάσης σουλφυδριλίων.



Not crosslinked: when you push on one chain, it is free to move
Viscous, but not elastic



Crosslinked: when you push on one chain, the others resist and pull it back into place when the force is removed



Δομή

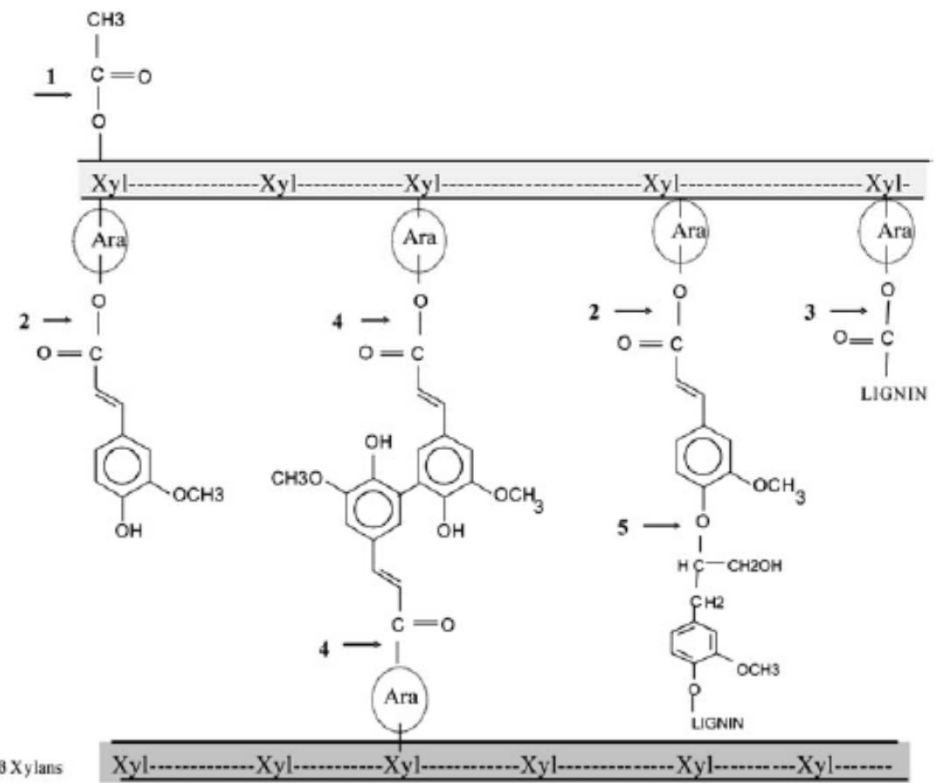
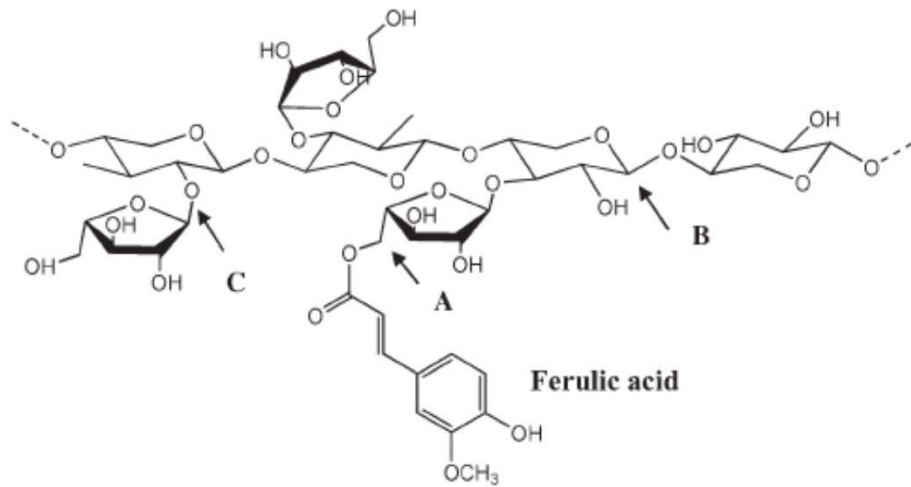
Περοξειδάση (POD)

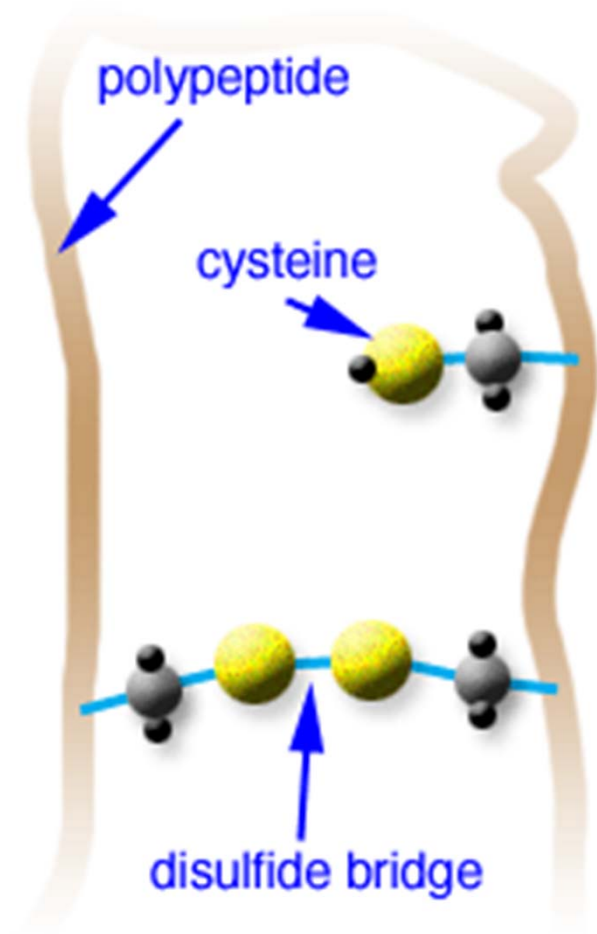
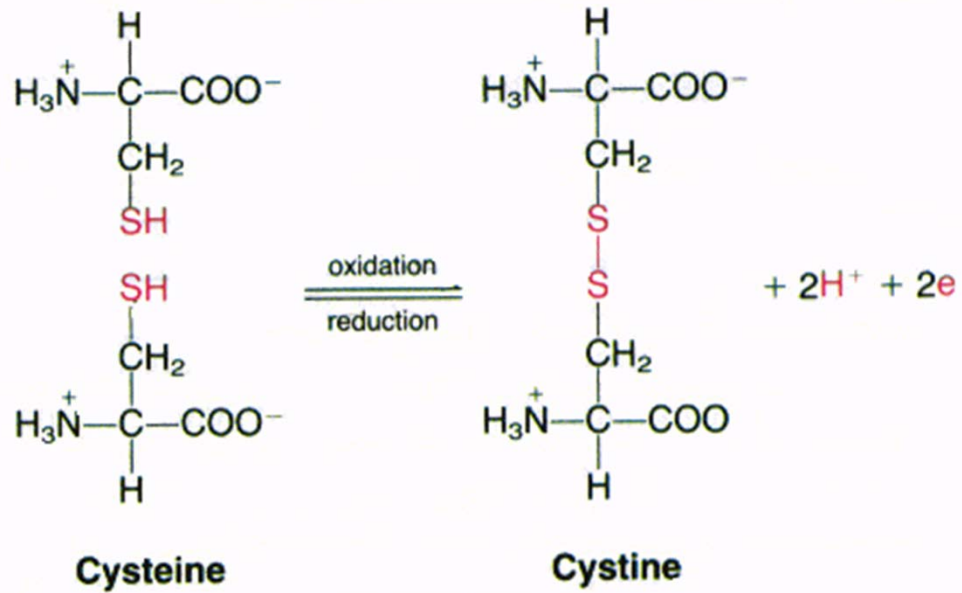
Από τα ένζυμα που προαναφέρθηκαν (λιποξυγενάση, οξειδάση της γλυκόζης, οξειδάση σουλφυδριλίων), η POD παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Το σιτάλευρο περιέχει POD που μπορεί να διασυνδέσει φαινολικά συστατικά όπως το φερουλικό και το βανιλλικό οξύ.

Το βέλτιστο pH όμως του ενζύμου από σιτάρι είναι 4.5, ενώ το pH της ζύμης κυμαίνεται μεταξύ 5 – 6. Συνεπώς, η ενεργότητα του ενζύμου είναι χαμηλή.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η POD βελτιώνει τις ιδιότητες της ζύμης δεν έχει διαλευκανθεί, αλλά εικάζεται ότι εμπλέκονται σουλφυδρυλ- και λυσουλ- ομάδες.

Οι POD, ή οι κινόνες που παράγονται από τη δράση τους, προκαλούν οξειδωτική απαμίνωση της λυσίνης, μετατρέποντάς της σε αλδεΐδη. Αυτό μέσω αντιδράσεων που καταλήγουν στη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών, παράγει πρωτεϊνικά πολυμερή.





Εμφάνιση / Χρώμα

Λιποξυγενάσες (LOX)

Η LOX από σόγια χρησιμοποιείται για τη λεύκανση του αλεύρου στην παρασκευή λευκού ψωμιού. Αυτό συμβαίνει επειδή τα καροτενοειδή που υπάρχουν στο σιτάλευρο καταστρέφονται μέσω ενός μηχανισμού συν-οξειδωσης.

Το σιτάλευρο περιέχει LOX, αλλά η ενεργότητά της είναι πολύ χαμηλή. Γι' αυτό συχνά στο σιτάλευρο προστίθεται 0.5% σογιάλευρο, το οποίο περιέχει ενεργή LOX.

Άλλες εφαρμογές της LOX συμπεριλαμβάνουν λεύκανση των noodles, και προϊόντων ρυζιού.

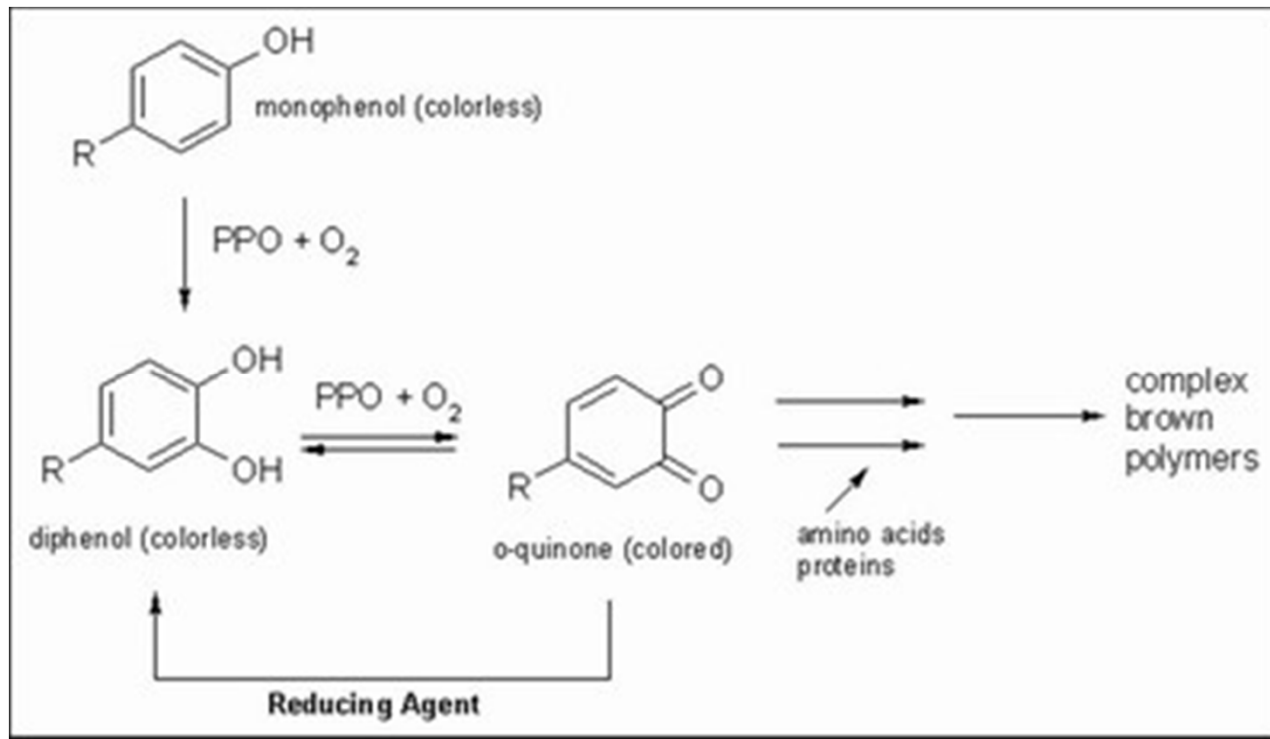
Εμφάνιση / Χρώμα

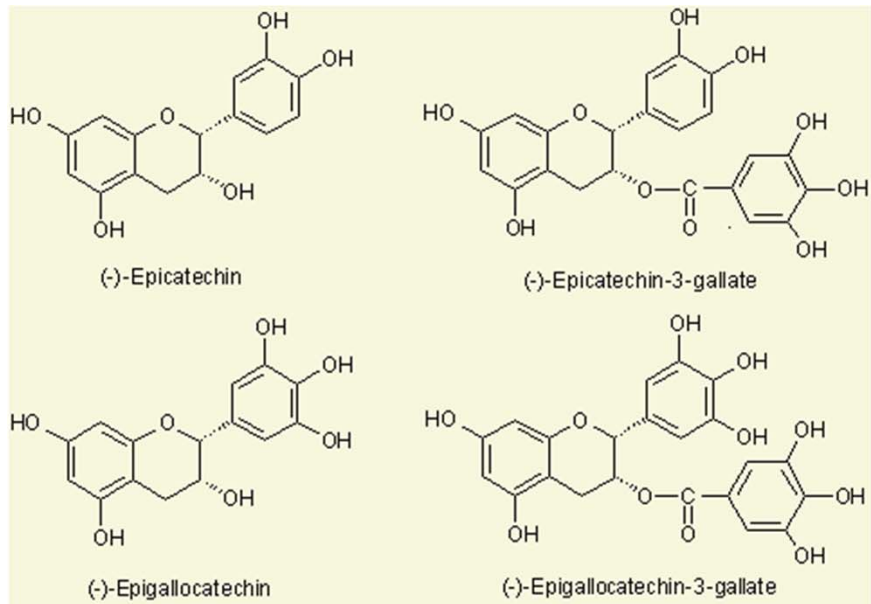
Πολυφαινολοξειδάσες (PPO)

Η πρόληψη/αναστολή ενζυμικής αμαύρωσης πριν και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών επιτυγχάνεται με αποκλεισμό του O_2 ή/και με αναστολή της PPO χρησιμοποιώντας αναστολείς όπως συμπλοκοποιητές μετάλλων, βενζοϊκό οξύ, αναγωγικούς παράγοντες (L-κυστεΐνη, γλουταθειώνη, θειώδη, ασκορβικό οξύ) και συνδυασμούς αυτών.

Αντιθέτως, κατά τη διάρκεια της «ζύμωσης» του μαύρου τσαγιού η PPO χρησιμοποιείται για να επάγει την αμαύρωση μέσω οξείδωσης των φλαβονολών (πολυφαινολικών ουσιών).

Η παραγωγή ουσιών που χαρακτηρίζουν την ποιότητα του μαύρου τσαγιού μπορεί επίσης να ενισχυθεί από την προσθήκη εξωγενών ενζύμων, όπως ένας συνδυασμός λακκάσης / περοξειδάσης.



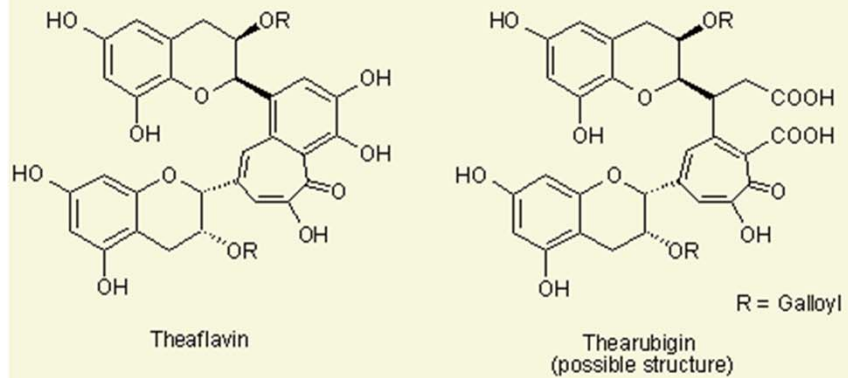


Major Components of Green Tea

Fermentation



Tea Polyphenol Oxidase



Major Components of Black Tea



Εμφάνιση / Χρώμα

Οι PPO παίζουν σημαντικό ρόλο και στην κατεργασία του καφέ. Η ενεργότητα της PPO σε πράσινα φασόλια καφέ είναι άμεσα συσχετισμένη με την ποιότητα του καφέ που παράγεται.

Ο ακριβής ρόλος της PPO στην κατεργασία του κακάο δεν είναι όμως πλήρως κατανοητός, αλλά υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ουσιαστικής επίδρασης σε αντιδράσεις αμαύρωσης που σχετίζονται με ποιοτικά χαρακτηριστικά.

Οξειδάσες ασκορβικού οξέως: Αυτά τα ένζυμα παίζουν ρόλο σε ποτά όπως χυμοί λεμονιού και grapefruit, όπου είναι υπεύθυνα για αντιδράσεις μη-ενζυμικής αμαύρωσης και απώλειας βιταμίνης C κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Η έκταση της αμαύρωσης μπορεί να περιοριστεί κυρίως με αποκλεισμό του O₂.

Διάρκεια Ζωής (Shelf Life)

Η εφαρμογή οξειδοαναγωγικών ενζύμων για τη βελτίωση της διάρκειας ζωής των τροφίμων συμπεριλαμβάνει κυρίως ένζυμα που είναι ικανά ν' απομακρύνουν το O_2 ή δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species), όπως το H_2O_2 , καθώς και ένζυμα τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Η χρησιμοποίηση ενζύμων που μπορούν να δράσουν μ' ένα ή περισσότερους από τους παραπάνω τρόπους είναι δυνατό να βελτιώσει τη σταθερότητα ορισμένων τροφίμων σε σχέση με τη γεύση, την εμφάνιση και τη μικροβιακή αλλοίωση.

Διάρκεια Ζωής (Shelf Life)

Λακτοπεροξειδάση (LPO)

Είναι το πιο σημαντικό ένζυμο του βοδινού γάλακτος, όπου βρίσκεται σε συγκεντρώσεις περίπου 30 mg L^{-1} . Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με ομοιοπολικά ενωμένη ομάδα αίμης. Η LPO απαιτεί H_2O_2 και θειοκυανιούχο ιόν (SCN^-) για αντιβακτηριακή δράση. Και τα τρία αυτά συστατικά αναφέρονται ως «*το σύστημα LP*».

Η αναστολή ανάπτυξης των βακτηρίων που προκαλείται από το σύστημα LP οφείλεται στη δημιουργία προϊόντων οξείδωσης του SCN^- , όπως το OSCN^- , το οποία αντιδρά με σουλφυδριλομάδες πάνω σε ένζυμα - κλειδιά για το μεταβολισμό των βακτηρίων.

Για επαρκή λειτουργία του συστήματος απαιτούνται χαμηλές συγκεντρώσεις ενζύμου, της τάξεως των $10 - 20 \text{ mg L}^{-1}$. Οι απαιτήσεις σε H_2O_2 και SCN^- είναι εξίσου χαμηλές και κυμαίνονται μεταξύ $10 - 15$ και $10 - 25 \text{ mg L}^{-1}$, αντίστοιχα.

Glucose + O₂



Glucose Oxidase

H₂O₂ + SCN⁻ [and/or I⁻]

Lactoperoxidase



OSCN⁻ [and/or OI⁻]

+Lysozyme and Lactoferrin

Διάρκεια Ζωής (Shelf Life)

Το σύστημα LP έχει εφαρμογές σε τρόφιμα όπως γάλα, τυρί, κρέας, ψάρια και πουλερικά. Αξιοσημείωτο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση του συστήματος LP στο γιαούρτι.

Η προσθήκη LPO σε γιαούρτι έχει βρεθεί ότι περιορίζει την υπερβολική παραγωγή οξέως από τα γαλακτικά βακτήρια.

Οι εφαρμογές της LPO στα τρόφιμα έχουν γίνει περισσότερες προσιτές, επειδή η απομόνωση και ο καθαρισμός σε υψηλό βαθμό αυτού του ενζύμου πραγματοποιείται πλέον σε βιομηχανική κλίμακα.

Έτσι, LPO υψηλής καθαρότητας είναι εμπορικά διαθέσιμη σε σχετικά χαμηλό κόστος.

Διάρκεια Ζωής (Shelf Life)

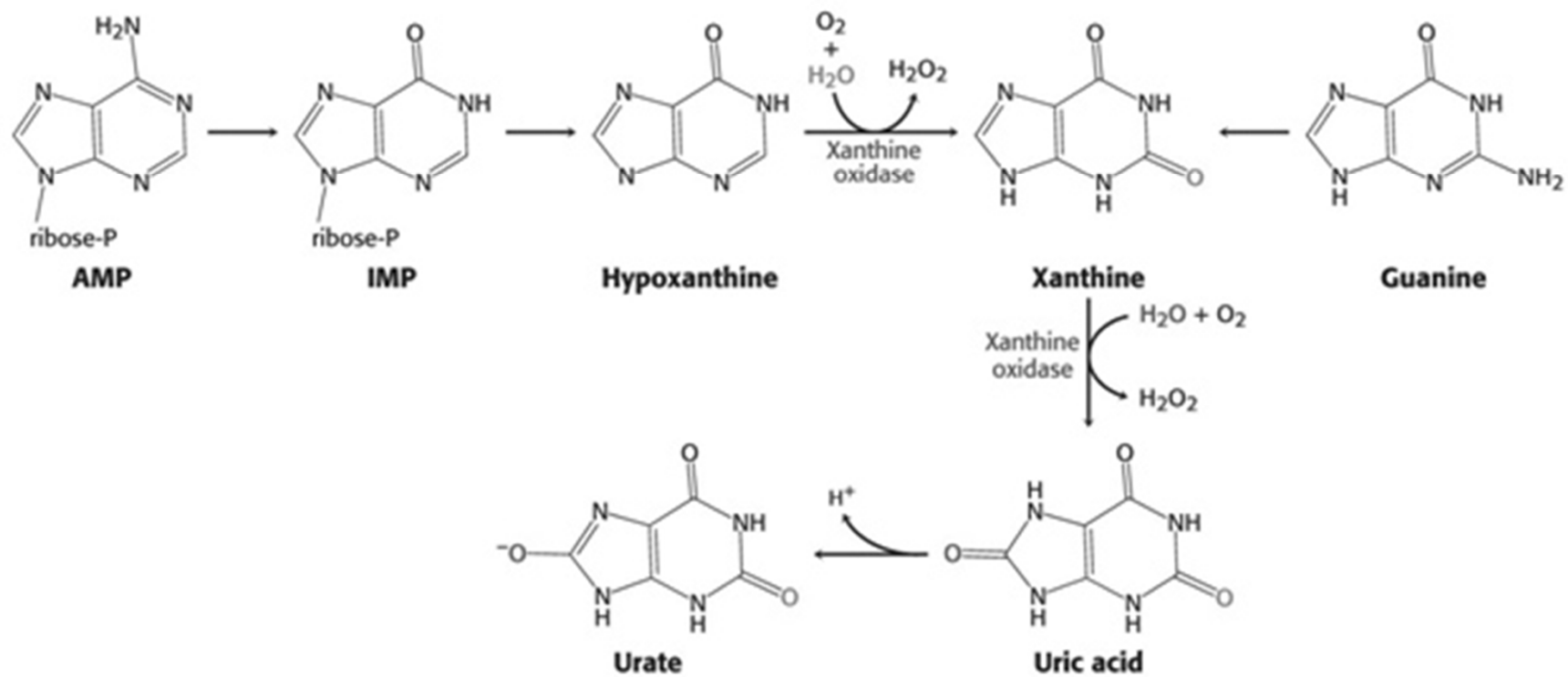
Οξειδάση της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης (xanthine oxidase - XO) είναι ευρέως διαδεδομένη σε ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς. Καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ.

Η XO είναι ικανή να καταλύσει την οξείδωση ενός εύρους από πουρίνες, αλδεΐδες και περιδίνες με ταυτόχρονη αναγωγή του O_2 σε H_2O_2 . Μέσω της καταλυτικής δράσης της XO παράγεται επίσης και το πολύ δραστικό ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$).

Το βοδινό γάλα είναι πλούσιο σε XO, της οποίας η συγκέντρωση ανέρχεται σε περίπου 35 mg L^{-1} . Η XO θεωρείται ότι εμπλέκεται στην οξειδωτική υποβάθμιση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων εξαιτίας της παραγωγής $O_2^{\bullet-}$ κατά την οξείδωση του υποστρώματος.

Εικάζεται ότι υπό την παρουσία πουρινών, η XO παράγει H_2O_2 , το οποίο χρησιμοποιεί η LPO για να εμφανίσει αντιβακτηριακή δράση.



Διάρκεια Ζωής (Shelf Life)

Διομιουτάση υπεροξειδίου & καταλάση

Και τα δύο ένζυμα υπάρχουν στο γάλα και μπορούν ν' απομακρύνουν ενεργές μορφές οξυγόνου που παράγονται από άλλες (βιο)χημικές διεργασίες. Η διομιουτάση του υπεροξειδίου (superoxide dismutase - SOD) καταλύει την αναγωγή του ανιόντος υπεροξειδίου σε H_2O_2 και O_2 .

Ακολούθως, η καταλάση «εξουδετερώνει» το H_2O_2 παράγοντας νερό και O_2 . Εάν η SOD προστεθεί εξωγενώς σε χαμηλά επίπεδα, σε συνδυασμό με την καταλάση, αποτελούν ένα πολύ καλό αντιοξειδωτικό σύστημα σε γαλακτοκομικά προϊόντα.

Πλούσιες πηγές καταλάσης είναι το βοδινό κρέας, ο μύκητας *Aspergillus niger* και η γλυκοπατάτα. Υπάρχει βιομηχανικό ενδιαφέρον για την ακινητοποίηση της καταλάσης, με σκοπό την παστερίωση του γάλακτος και για αντιδράσεις συνδυασμένης δράσης οξειδάσης της γλυκόζης - καταλάσης.