

## Συνδυαστική εφαρμογή της λιμονικής αφυδρογονάσης και της Υπερυψηλής Πίεσης για τη βελτίωση της ποιότητας παστεριωμένου χυμού πορτοκαλιού

Αργυρώ Ορφανουδάκη<sup>1</sup>, Ελένη Γώγου<sup>1</sup>, Ευάγγελος Τόπακας<sup>2</sup>, Πέτρος Ταούκης<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Αθηνών, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

<sup>2</sup>Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Αθηνών, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

([taoukis@chemeng.ntua.gr](mailto:taoukis@chemeng.ntua.gr))

Ο μη συμπυκνωμένος πορτοκαλοχυμός έχει ένα σημαντικό μερίδιο της αγοράς λόγω της υψηλής ποιότητας. Η παραγωγή του από τη κύρια καλλιεργούμενη ελληνική ποικιλία Navel αντιμετωπίζει το πρόβλημα της ανάπτυξης πικρής γεύσης και απαιτεί τη χρήση μεθόδων αποπίκρασης για την τελική παραγωγή πορτοκαλοχυμού αποδεκτής ποιότητας. Το φαινόμενο της ανάπτυξης πικρής γεύσης και αρώματος (πίκραση) στο χυμό των εσπεριδοειδών οφείλεται κυρίως στο σχηματισμό του πικρού λιμονοειδούς, λιμονίνη. Η συμβατική επεξεργασία αποπίκρασης σε βιομηχανικό επίπεδο πραγματοποιείται με τη μέθοδο της χρήσης επιλεκτικών ρητινών προσρόφησης. Η χρήση ρητινών είναι ικανή να μειώσει σημαντικά τα επίπεδα λιμονίνης αλλά ταυτόχρονα παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα που συνδέονται τόσο με τις αυξημένες προκατεργασίες όσο και με την οργανοληπτική υποβάθμιση (ως προς τα πτητικά αρωματικά χαρακτηριστικά) του τελικού προϊόντος. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση ανάπτυξης εναλλακτικών, καινοτόμων μεθόδων αποπίκρασης του πορτοκαλοχυμού Navel με τη συνδυαστική χρήση ενζύμων και της επεξεργασίας με Υπερυψηλή Πίεση (ΥΠ).

Η λιμονίνη παράγεται στον πορτοκαλοχυμό αμέσως μετά το στάδιο της χυμοποίησης από τη μετατροπή της λιμονικής λακτόνης Α-δακτυλίου σε λιμονίνη. Η παρεμπόδιση αυτού του φαινομένου μπορεί να επιτευχθεί από την αποικοδόμηση της λιμονικής λακτόνης σε αφυδρογονολιμονοειδή οι οποίες είναι άγευστες ενώσεις. Η αποικοδόμηση της λιμονικής λακτόνης και άρα η παρεμπόδιση της παραγωγής λιμονίνης καταλύεται από τη δράση ενζύμων όπως η λιμονική αφυδρογονάση (LDase, EC 3.1.1.36). Η χρήση της ΥΠ επιτρέπει την ψυχρή παστερίωση τροφίμων και την παραγωγή προϊόντων με βελτιωμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά με αυξημένη διάρκεια ζωής. Παράλληλα με τη δυνατότητα της παστερίωσης, η εφαρμογή ΥΠ μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων καινοτόμων προϊόντων.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η παραγωγή και παραλαβή του ενζύμου εκχυλίσματος LDase από τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas putida* και *Rhodococcus fascians* που αναπτύχθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό στους 30°C μετά από 1 και 2 ημέρες, αντίστοιχα. Από τις υγρές καλλιέργειες παραλήφθηκε το ακατέργαστο ενζυμικό εκχύλισμα το οποίο οδηγήθηκε σε διήθηση και συμπύκνωση πριν την περαιτέρω χρήση του σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό. Τα ακατέργαστα ενζυμικά εκχυλίσματα ενσωματώθηκαν σε δείγματα χυμού Navel και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες επώασης ως προς την ικανότητα μείωσης της συγκέντρωσης λιμονίνης στο χυμό. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η επίδραση της εφαρμογής ΥΠ, στο εύρος 100-600 MPa, στη δραστηριότητα των ενζύμων έτσι ώστε να επιλεχθούν οι βέλτιστες συνθήκες επώασης και σε συνθήκες ΥΠ. Δείγματα χυμού χρησιμοποιήθηκαν για την ενζυμική προκατεργασία τους τόσο σε ατμοσφαιρική

πίεση όσο και σε συνθήκες ΥΠ στις επιλεγμένες βέλτιστες συνθήκες. Στη συνέχεια τα δείγματα χυμού οδηγήθηκαν σε δύο εναλλακτικές μεθόδους παστερίωσης: θερμική παστερίωση στους 90°C για 40 s και ψυχρή παστερίωση με την εφαρμογή ΥΠ στα 600 MPa για 5 min. Όλες οι ομάδες παστεριωμένων δειγμάτων αποθηκεύτηκαν σε ψυκτικούς θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας 5 και 10°C. Σε προκαθορισμένους χρόνους δειγματοληψίας προσδιορίστηκαν σημαντικές ποιοτικές παράμετροι των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση λιμονίνης με HPLC, η σύσταση των αρωματικών πτητικών ενώσεων με GC-MS (Purge & Trap), το χρώμα, η βιταμίνη C ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιούνταν οργανοληπτικός και μικροβιολογικός έλεγχος.

Το ένζυμο που απομονώθηκε από τον *P. putida* παρουσίασε υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα LDase σε σχέση με αυτό του *R. fascians*, εκφρασμένο ως προς την ικανότητα μείωσης της συγκέντρωσης λιμονίνης σε χυμό Navel όπου η λιμονίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο. Για αυτό το λόγο ο αναλυτικός πειραματικός σχεδιασμός και η υλοποίηση του πραγματοποιήθηκε μόνο για το ακατέργαστο ενζυμικό εκχύλισμα του *P. putida*. Από το προκαταρκτικό πείραμα διερεύνησης της ενεργότητας LDase σε χυμό Navel, η θερμοκρασία των 50°C και ο χρόνος 5 min αναγνωρίστηκαν ως οι βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής προκατεργασίας του χυμού. Η εφαρμογή της ΥΠ έως τα 300 MPa οδήγησε στην ενίσχυση της δραστηριότητας LDase, ενώ διεργασίες ΥΠ με πιέσεις άνω των 300 MPa οδήγησαν σε σταδιακή απενεργοποίηση του ενζύμου με την εφαρμογή πίεσης 600 MPa για 5 min να οδηγεί στην πλήρη απενεργοποίηση του. Σύμφωνα με τα προκαταρκτικά πειράματα σχεδιάστηκε η συνολική διεργασία χυμού Navel: αρχικά πραγματοποιήθηκε η ενζυμική προκατεργασία χυμού σε ατμοσφαιρική πίεση (50°C, 5 min), στη συνέχεια τα δείγματα χυμού οδηγήθηκαν σε δύο διαδοχικούς κύκλους πίεσης με τον πρώτο να πραγματοποιείται στα 200 MPa για 2 min και το δεύτερο στα 600 MPa για 5 min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μια δεύτερη σειρά δειγμάτων ακολούθησε το στάδιο της ενζυμικής προκατεργασίας σε ατμοσφαιρική πίεση και στη συνέχεια παστεριώθηκε στους 90°C για 40 s. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η συνδυασμένη χρήση της ενζυμικής προκατεργασίας με LDase και η εφαρμογή ΥΠ οδήγησε στην παραγωγή χυμού Navel μικροβιολογικά σταθερού και ταυτόχρονα με ανώτερη ποιότητα ως προς τη σύσταση των πτητικών ενώσεων και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η προτεινόμενη εναλλακτική μέθοδος επεξεργασίας του χυμού Navel σε συνθήκες ΥΠ οδήγησε σε σημαντική μείωση της λιμονίνης έως και 40 % συγκριτικά με τα δείγματα χυμού τα οποία παστεριώθηκαν θερμικά. Η εφαρμογή της ψυχρής παστερίωσης έναντι της θερμικής οδήγησε ταυτόχρονα σε επιμήκυνση της διάρκειας ζωής του χυμού από 45 σε 65 ημέρες σε θερμοκρασία αποθήκευσης 10°C.

Από τα συνολικά αποτελέσματα προκύπτει ότι η συνδυασμένη εφαρμογή του ενζύμου LDase και η επεξεργασία με ΥΠ μπορεί να εφαρμοστεί ως μία εναλλακτική μέθοδος αποπύκνωσης και παραγωγής τελικών προϊόντων χυμού Navel με ανώτερα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά με ταυτόχρονα αυξημένη διάρκεια ζωής.