



UNIVERSITY OF
PATRAS
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

Ακαδημαϊκό έτος 2023-2024

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Χημείας

Βιοχημεία Τροφίμων

Ενζυμική αμάρωση

Πολυφαινολοξειδάσες

Υποστρώματα

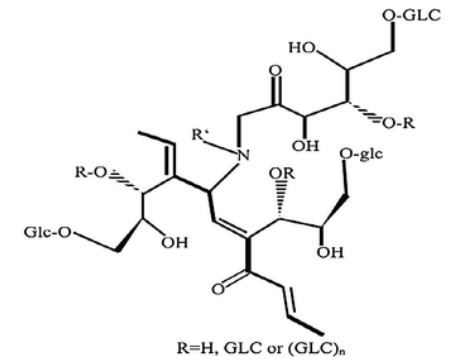
Μηχανισμός αντίδρασης

Μέθοδοι ελέγχου της ενζυμικής αμάρωσης

ΖΩΗ ΠΙΠΕΡΙΓΚΟΥ
Επίκουρη Καθηγήτρια

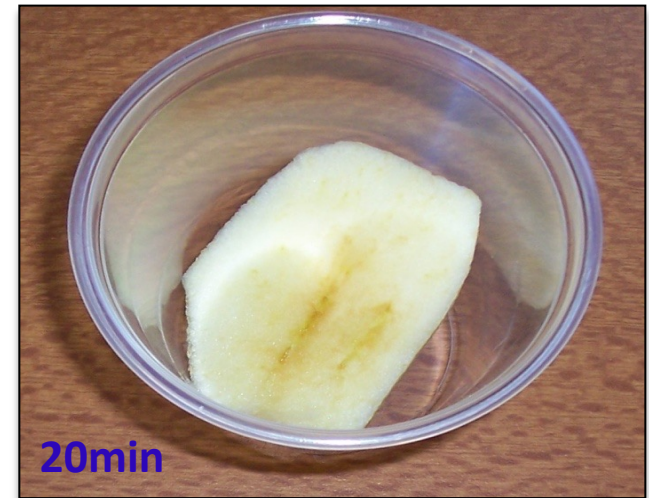
Αντιδράσεις Αμαύρωσης – Σύνοψη...

- ↪ Αντιδράσεις **Maillard** μεταξύ σακχάρων και αμινοξέων
- ↪ **Καραμελοποίηση** – Σάκχαρα σε υψηλές θερμοκρασίες
- ↪ Αμαύρωση **λιπιδίων** – Πολυμερισμός ελαίων τηγανίσματος
- ↪ Αμαύρωση **ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C)** – οξείδωση
- ↪ **Ενζυμικές** (πολυφαινολοξειδάση)
Εμφανίζονται σε φυτικούς ιστούς (μήλο, μπανάνα, αβοκάντο, πατάτα) –
Μη τοξικές – Δεν αλλάζουν τη γεύση των τροφίμων.

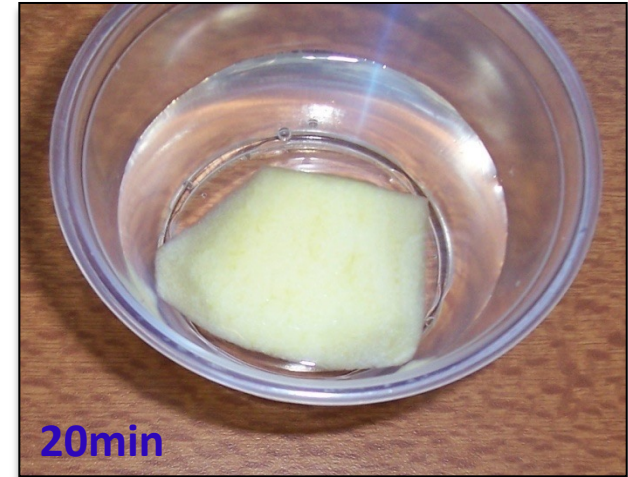
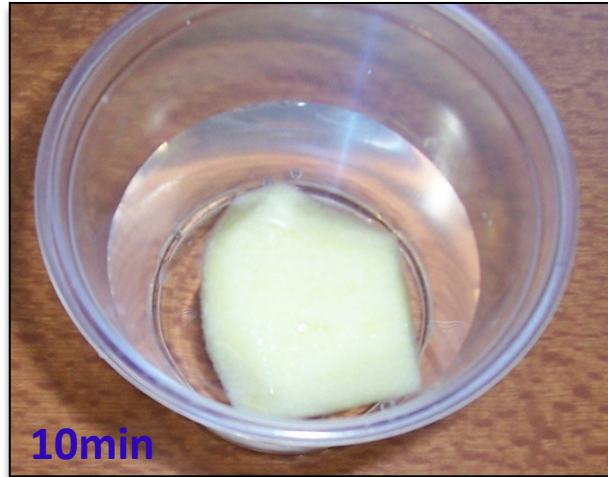
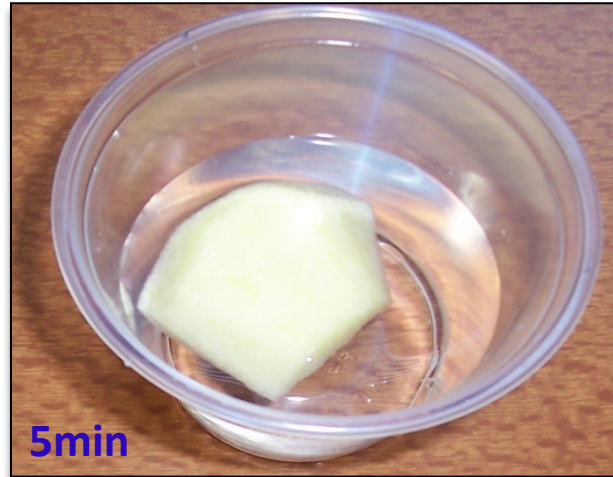


Μελανοΐδίνες

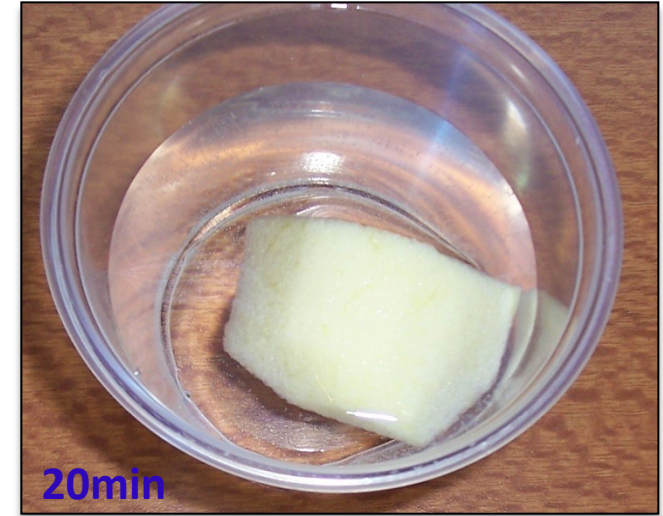
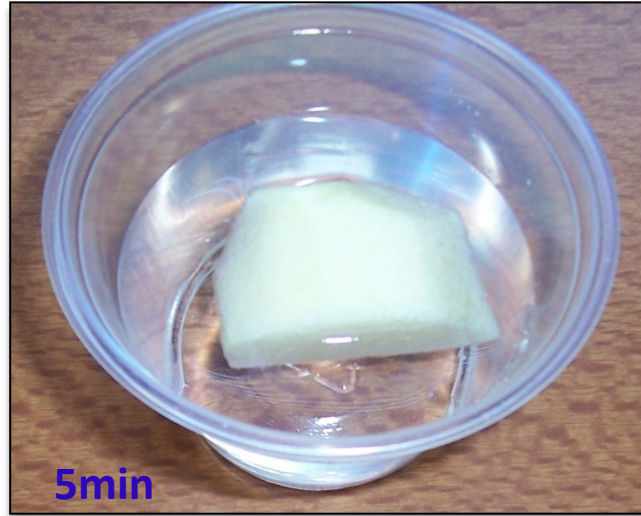
Αέρας



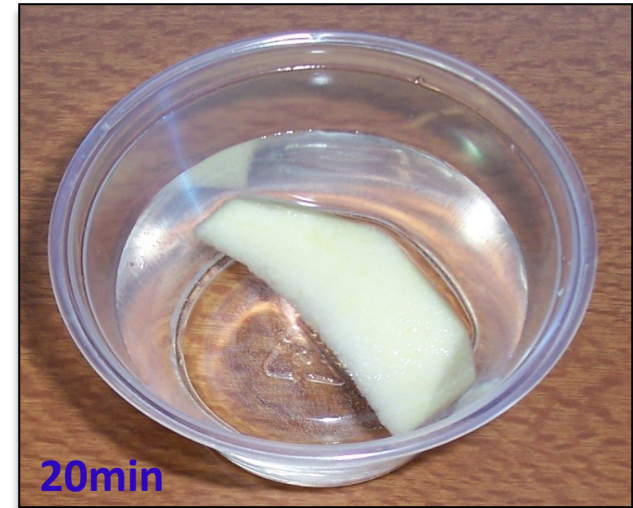
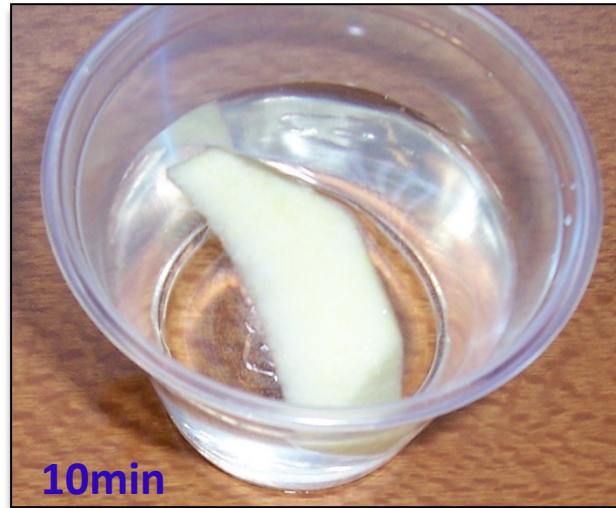
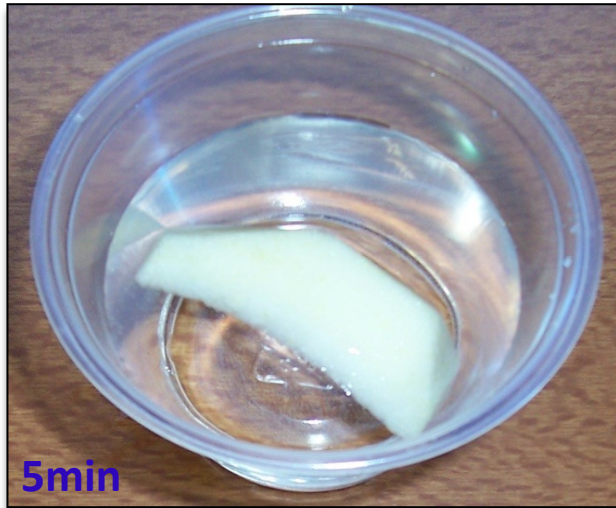
Νερό



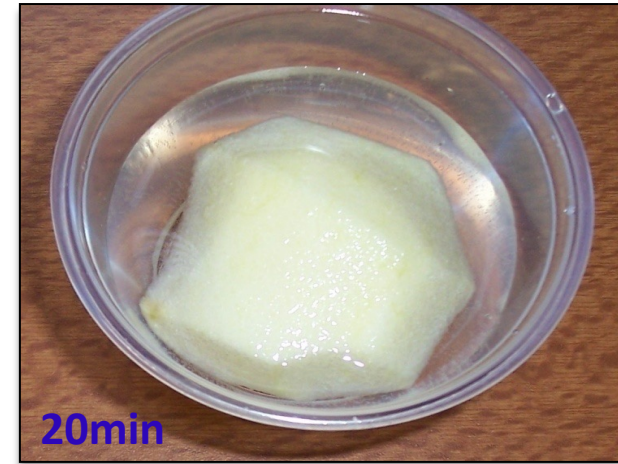
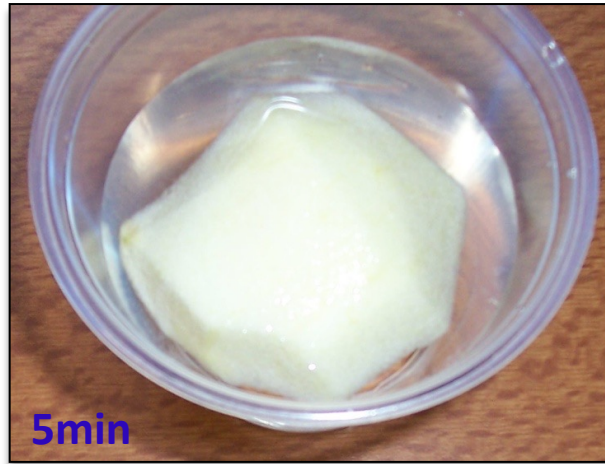
0.1% CH₃COOH



0.1% Κιτρικό Οξύ



0.1% Ασκορβικό Οξύ



Επίδραση διαφορετικών συνθηκών στην αμάρωση αχλαδιού - Εξήγηση

- Αέρας: έκθεση σε οξυγόνο
- Νερό: περιορίζει το διαθέσιμο οξυγόνο
- Οξικό οξύ: ελαττώνει το pH κάτω από 3, αποδιατάσσει πρωτεΐνες
- Κιτρικό οξύ: σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα με δισθενή κατιόντα (Cu^{2+})
- Ασκορβικό οξύ: αντιοξειδωτικό – ισχυρό αναγωγικό μέσο

Ενζυμική αμαύρωση
Πολυφαινολοξειδάσες



Γενικά χαρακτηριστικά

Πολύ γρήγορο φαινόμενο, απαιτεί έκθεση των ιστών σε οξυγόνο, καταλύεται από ένζυμα, συμβαίνει κυρίως στους φυτικούς ιστούς.

Έντονο φαινόμενο, γενικά ανεπιθύμητο (π.χ. πολτοποίηση μπανάνας, παραγωγή τσιπς κ.ά.)

Μετατροπή φαινολικών ενώσεως **τελικά** σε **μελανοϊδίνες** από ένζυμα γνωστά ως **οξειδάσες της πολυφαινόλης** (πολυφαινολάσες ή πολυφαινολοξειδάσες)

Ο χαλκός αποτελεί προσθετική ομάδα του ενζύμου – ομοιοπολική πρόσδεση

Το αρχικό στάδιο για την κατάληξη σε μελανοϊδίνες είναι η **οξείδωση φαινολών σε κετόνες** από τις πολυφαινολικές οξειδάσες. Τα ένζυμα αυτά έχουν ως αποδέκτη ηλεκτρονίων το οξυγόνο και ως προσθετική ομάδα το χαλκό

Κάθε βλάβη των φυτικών ιστών (τραυματισμός, θέρμανση κλπ) μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση των πολυφαινολοξειδασών.

*Επιθυμητό φαινόμενο στο τσάι και στο κακάο για την ανάπτυξη επιθυμητού χρώματος-αρώματος.

Πολυφαινολοξειδάσες

9-13 ισοένζυμα από μερικώς καθαρισμένο εκχύλισμα 5 ποικιλιών μπανάνας

Συστηματική ονομασία:

Ορθο-διφαινολική οξειδοαναγωγή EC1.10.3.1

Κοινές ονομασίες/δράσεις

Τυροσινάση, πολυφαινολάση, οξειδάση της κατεχόλης, κρεζολάση, κατεχολάση

Η αντίδραση του ενζύμου

1. Υδροξυλίωση

2. Αφυδρογόνωση ή οξείδωση ορθο-δι-φαινολών

Βρίσκεται σε ιστούς φυτών, ζώων και μερικών μικροοργανισμών

Απαιτεί: Cu^{2+} , O_2

Υποστρώματα: μονο-, δι-, πολύ-φαινόλες

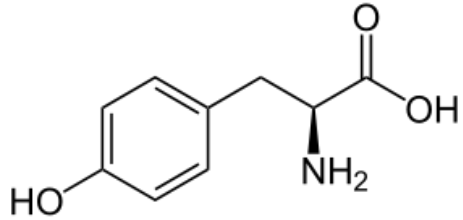
Άριστο pH 7,0

Θερμικά σταθερό

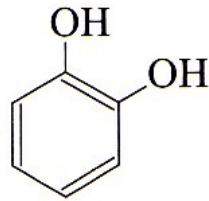
Υποστρώματα

Υπάρχουν στα χυμοτόπια των φυτικών κυττάρων.

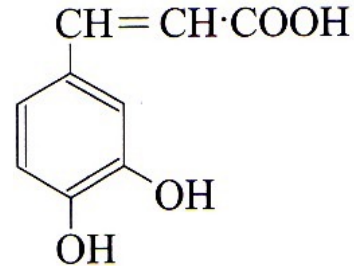
Απλές φαινόλες: μονοφαινόλες (L-τυροσίνη) και ο-διφαινόλες (κατεχόλη)



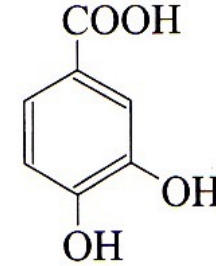
Τυροσίνη



Πυροκατεχόλη

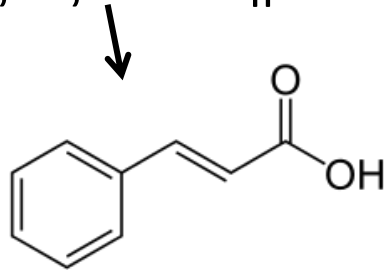


Καφεϊκό οξύ

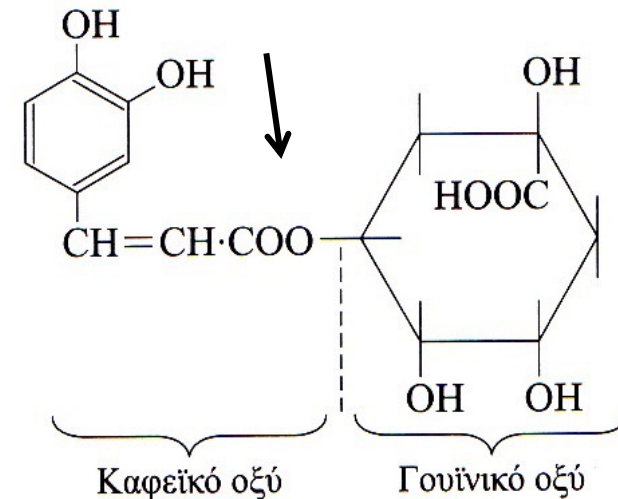


Πρωτοκατεχικό οξύ

και παράγωγα του κινναμικού οξέος - πιο σημαντικό το χλωρογενικό οξύ



Υπόστρωμα-κλειδί για την ενζυμική αμαύρωση
μήλων και αχλαδιών

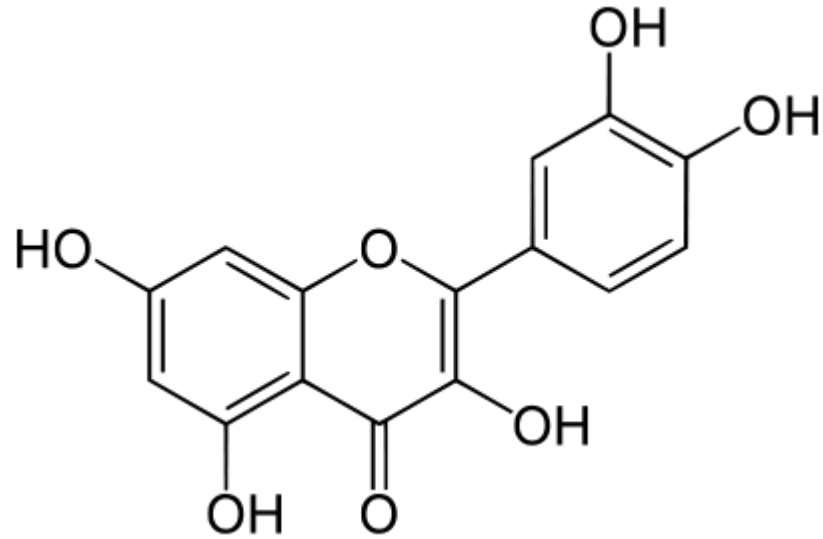


Πατάτες: μαύρισμα μετά το μαγείρεμα

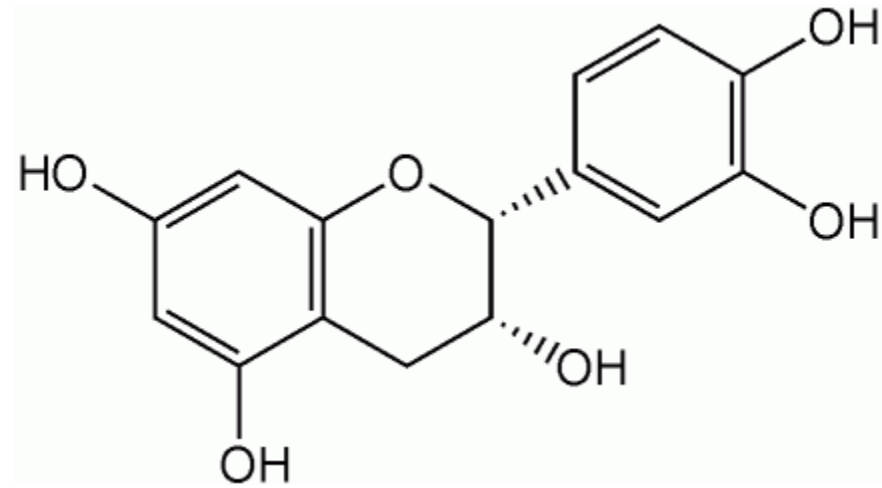
αντίδραση μεταξύ συμπλόκων σιδήρου και του καφεϊκού οξέος και του χλωρογενικού οξέος

Υποστρώματα

Πολυφαινόλες: Φλαβονοειδή



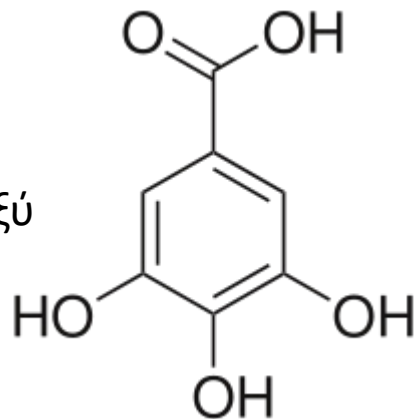
κερσετίνη



επικατεχίνη

και ταννίνες

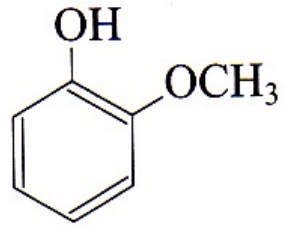
που αποτελούνται από γαλλικό οξύ



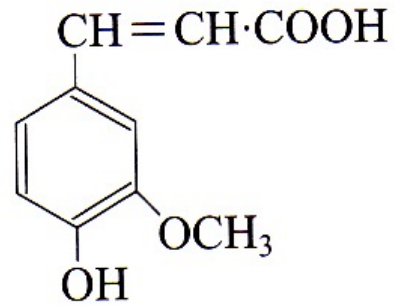
- ▶ Ζύμωση τσαγιού
- ▶ Ωρίμανση χουρμάδων
- ▶ Σπόροι κακάο κατά την ξήρανση

Ιδανικό υπόστρωμα η ο-διυδροξύ δομή

Μεθυλιωμένα παράγωγα των παραπάνω ενώσεων δεν αποτελούν υποστρώματα:

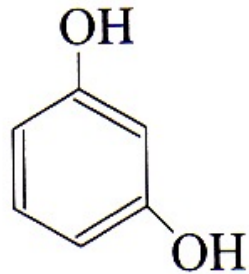


Γουαϊκόλη

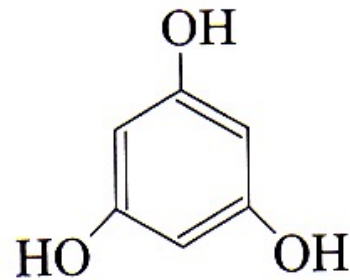


Φερουλικό οξύ

Οι μετα-διφαινόλες σπάνια αποτελούν υποστρώματα, ενίοτε δρουν ως συναγωνιστικοί αναστολείς:



Ρεζορκινόλη



Φλωρογλυκινόλη

Πηγή

Φαινολικά υποστρώματα

Μήλο

chlorogenic acid (flesh), catechol, catechin (peel), caffeic acid, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), 3,4-dihydroxy benzoic acid, *p*-cresol, 4-methyl catechol, leucocyanidin, *p*-coumaric acid, flavonol glycosides

Βερούκοκκο

isochlorogenic acid, caffeic acid, 4-methyl catechol, chlorogenic acid, catechin, epicatechin, pyrogallol, catechol, flavonols, *p*-coumaric acid derivatives

Αβοκάντο

4-methyl catechol, dopamine, pyrogallol, catechol, chlorogenic acid, caffeic acid, DOPA

Μπανάνα

3,4-dihydroxyphenylethylamine (Dopamine), leucodelphinidin, leucocyanidin

Κακάο

catechins, leucoanthocyanidins, anthocyanins, complex tannins

Καφές

chlorogenic acid, caffeic acid

Μελιτζάνα

chlorogenic acid, caffeic acid, coumaric acid, cinnamic acid derivatives

Σταφύλι

catechin, chlorogenic acid, catechol, caffeic acid, DOPA, tannins, flavonols, protocatechuic acid, resorcinol, hydroquinone, phenol

Μαρούλι

tyrosine, caffeic acid, chlorogenic acid derivatives

Αστακός

tyrosine

Μάνγκο

dopamine-HCl, 4-methyl catechol, caffeic acid, catechol, catechin, chlorogenic acid, tyrosine, DOPA, *p*-cresol

Μανιτάρι

tyrosine, catechol, DOPA, dopamine, adrenaline, noradrenaline

Πηγή

Αχλάδι

Δαμάσκηνο

Πατάτα

Γαρίδα

Γλυκοπατάτα

Τσάι

Φαινολικά υποστρώματα

chlorogenic acid, catechol, catechin, caffeic acid, DOPA, 3,4-dihydroxy benzoic acid, *p*-cresol

chlorogenic acid, catechin, caffeic acid, catechol, DOPA

chlorogenic acid, caffeic acid, catechol, DOPA, *p*-cresol, *p*-hydroxyphenyl propionic acid, *p*-hydroxyphenyl pyruvic acid, *m*-cresol

tyrosine

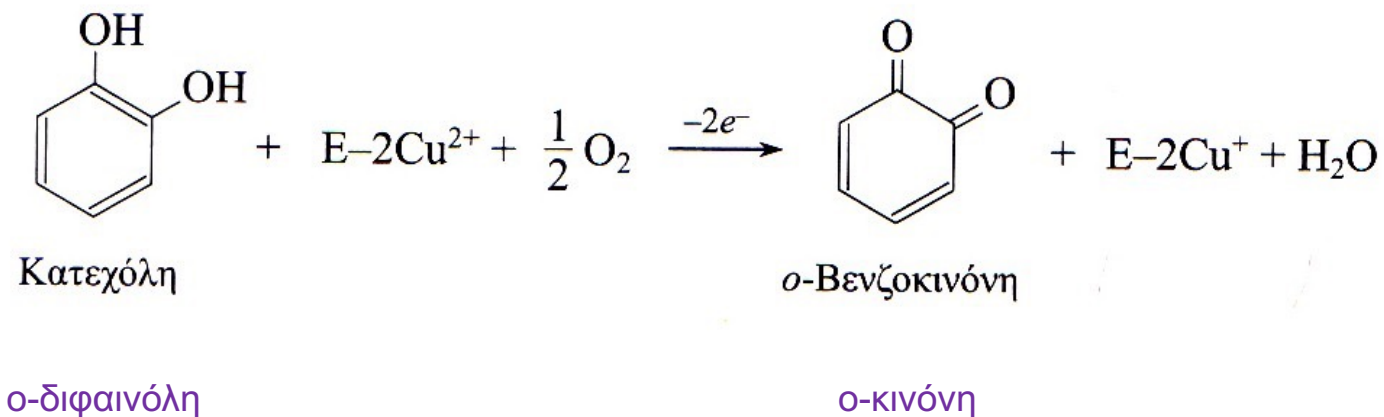
chlorogenic acid, caffeic acid, caffeylamide

flavanols, catechins, tannins, cinnamic acid derivatives

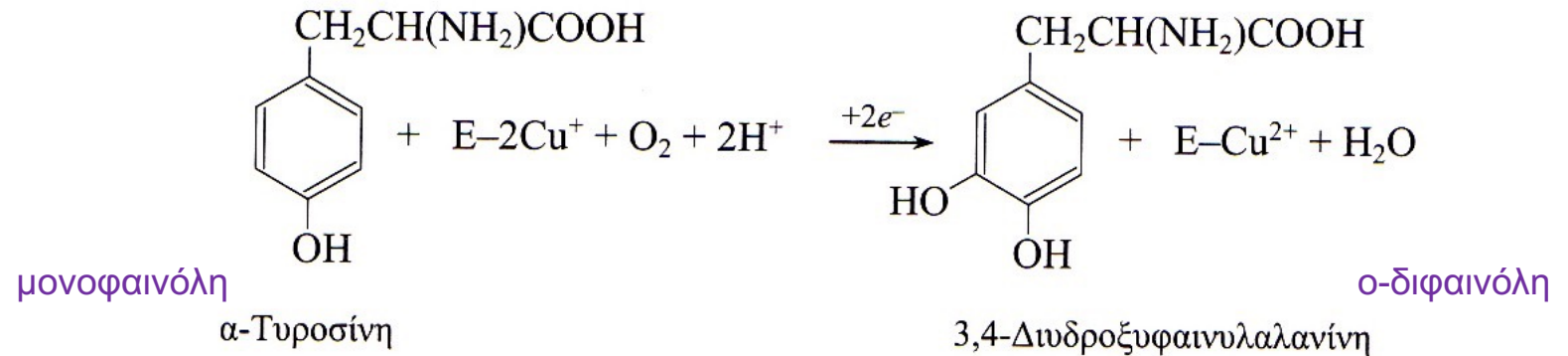
Γενικός μηχανισμός της αντίδρασης σε δύο στάδια

Περίληψη: Καταλύονται δύο τύποι ενζυμικών αντιδράσεων οι οποίοι οδηγούν στο σχηματισμό ο-κινονών. Στη συνέχεια οι ο-κινόνες μετατρέπονται σε τριφαινολικό τριυδροξυβενζένιο το οποίο αντιδρά με κινόνες για να δώσει υδροξυκινόνες οι οποίες πολυμεριζόμενες δίνουν σκούρο καφέ χρώμα.

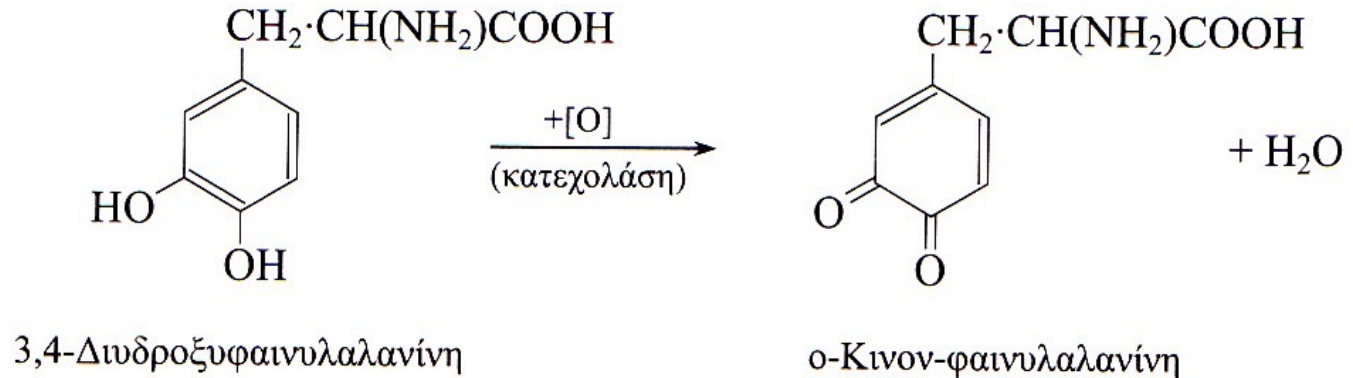
1. Δράση κατεχολάσης που οξειδώνει μία ο-διφαινόλη σε ο-κινόνη: απομάκρυνση δύο ηλεκτρονίων («υδρογόνων») από το υπόστρωμα



2. Δράση κρεζολάσης (προηγείται): μια μονοφαινόλη (τυροσίνη) υδροξυλιώνεται σε ο-διφαινόλη, δηλαδή καταλύει τη μεταφορά οξυγόνου στο υπόστρωμα. Το προϊόν της αντίδρασης είναι 3,4-διυδροξυ φαινυλαλανίνη:



Η αντίδραση ακολουθείται από απομάκρυνση υδρογόνου και σχηματισμό συστατικού κόκκινου χρώματος κατά την αντίδραση:

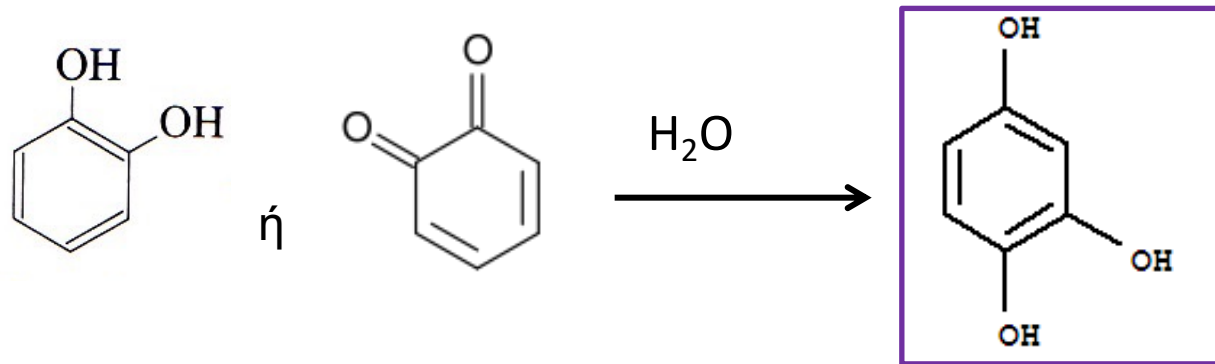


- ✓ Η αντίδραση 2 είναι πολύ σημαντική για την ενζυμική αμαύρωση των ιστών της πατάτας, αλλά και για τη βιοσύνθεση της μελανίνης των ζώων.

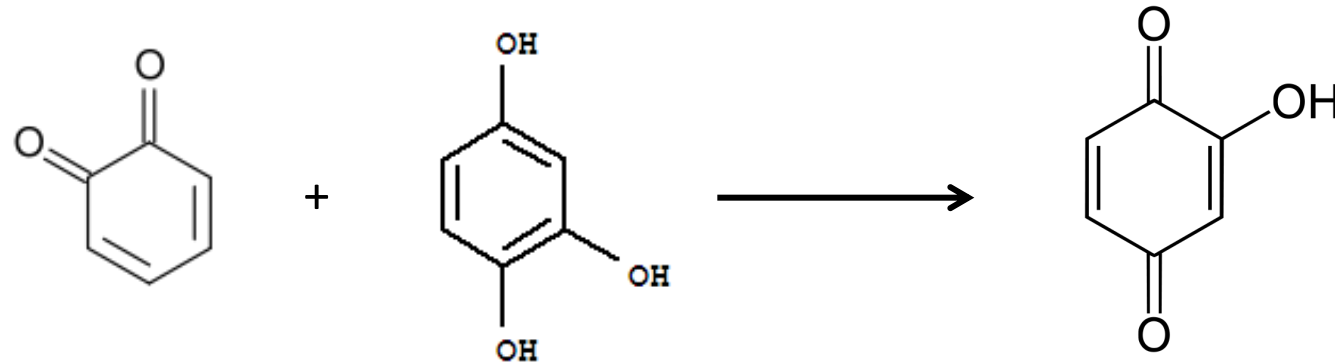
Περαιτέρω αντιδράσεις

Αφού σχηματιστεί η κινόνη, οι αντιδράσεις προχωρούν αυτόματα

Η κινόνη μετατρέπεται σε τριφαινολικό τριυδροξυβενζένιο:

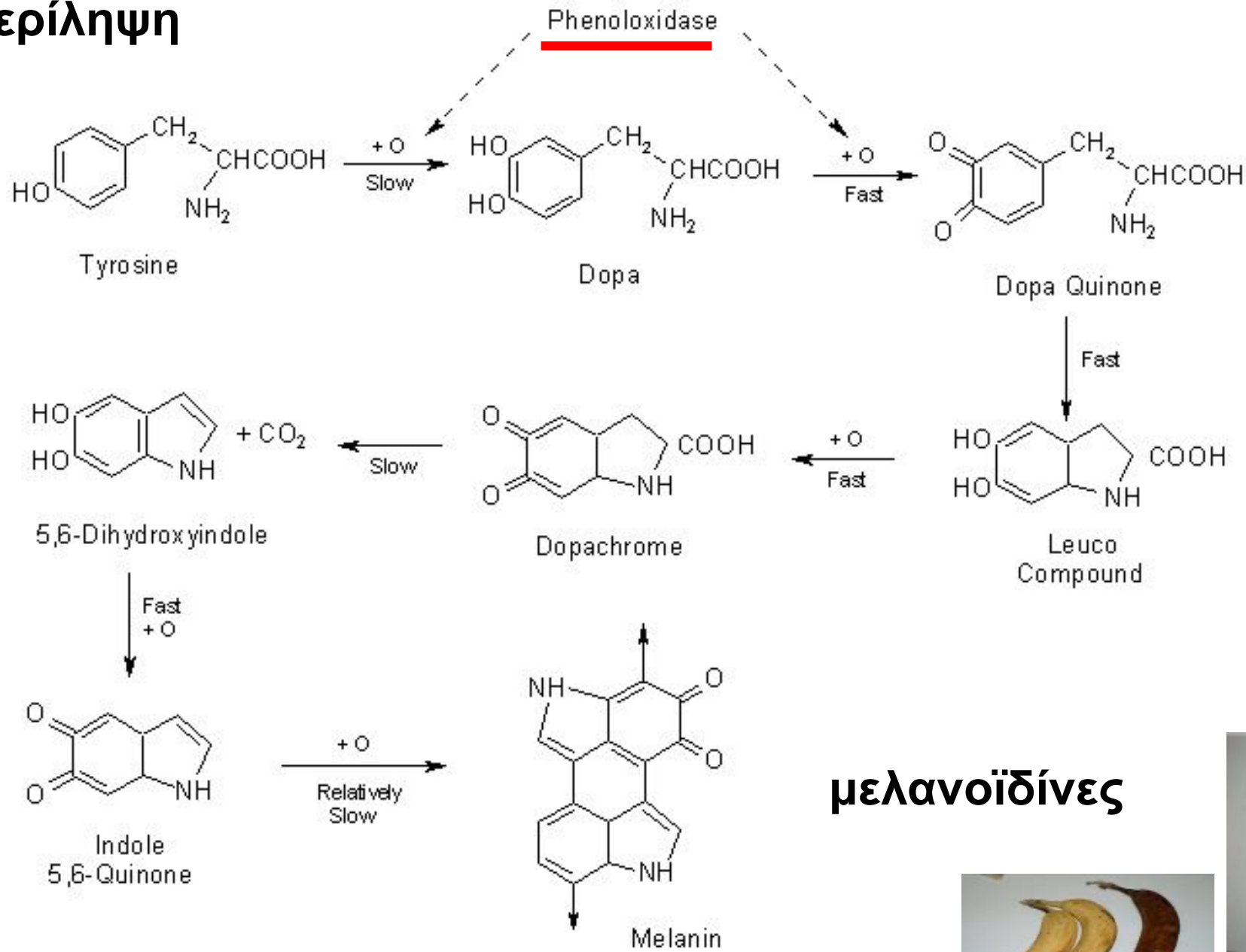


Το τριφαινολικό τριυδροξυβενζένιο αντιδρά με ο-κινόνες σχηματίζοντας υδροξυκινόνες:



που πολυμερίζονται διαδοχικά και δίνουν πολυμερή κόκκινου και καφέ χρώματος και τελικά **μελανίνες** (μελανοϊδίνες).

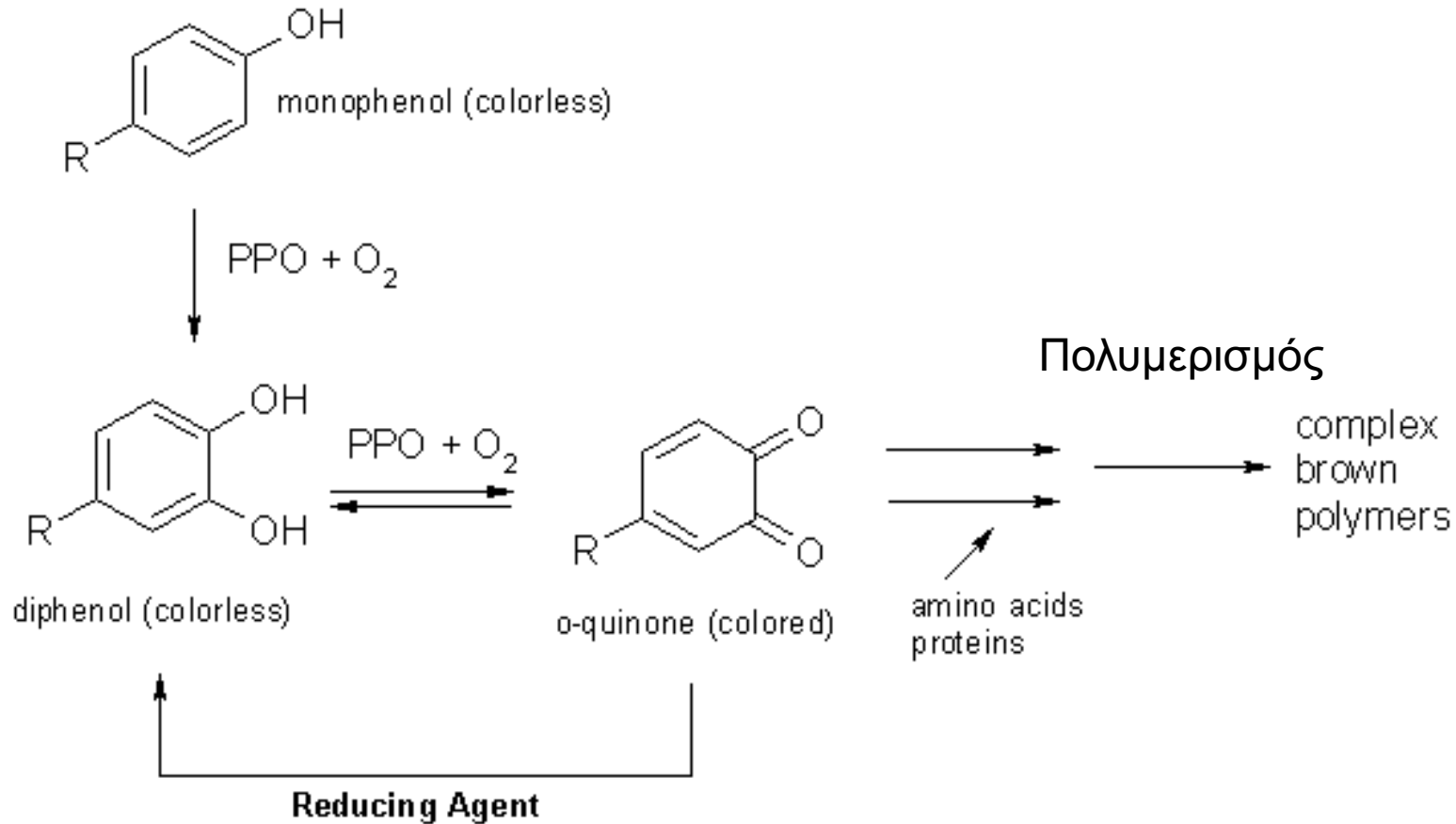
Περίληψη



μελανοϊδίνες



Περαιτέρω αντιδράσεις: Οι αμίνες, αμινοξέα και παρόμοιες αζωτούχες ενώσεις αντιδρούν με όρθο κινόνες και δίνουν σύμπλοκα με έντονο χρωματισμό:



- ☞ Η αλληλεπίδραση παρουσιάζει ενδιαφέρον στην ενζυμική αμαύρωση των τροφίμων, πχ στα άσπρα κρεμμύδια, σκόρδα και πράσα παρατηρείται κόκκινο χρώμα.
- ☞ Γενικά ανεπιθύμητο φαινόμενο, πλην της επεξεργασίας κακάο (προσθήκη αμινών κατά την επεξεργασία), το μαύρισμα της σταφίδας (σουλτανίνα) κ.ά.

Μέθοδοι περιορισμού της ενζυμικής αμαύρωσης

Η ενζυμική αμαύρωση εμφανίζεται όταν υπάρχουν:

1. Τα κατάλληλα φαινολικά υποστρώματα
2. Ενεργές πολυφαινολάσες
3. Οξυγόνο
4. Χαλκός στο ενεργό κέντρο

Περιορισμός αμαύρωσης με:

1. Μετουσίωση πολυφαινολασών με θέρμανση
2. Χρήση διοξειδίου του θείου και θειωδών αλάτων για τη δέσμευση των φαινολικών υποστρωμάτων του ενζύμου
3. Χρήση οξέων (και δέσμευση του χαλκού με ασκορβικό οξύ)
4. Τροποποίηση του υποστρώματος (μεθυλίωση)
5. Αποκλεισμό του οξυγόνου
6. Χρήση εξειδικευμένων αναστολέων

Ξήρανση χωρίς αναχαίτιση ενζυμικής δράσης:

- ✓ χουρμάδες
- ✓ σύκα
- ✓ δαμάσκηνα
- ✓ σταφίδες

Πιθανά προβλήματα στα τρόφιμα → γεύση, οσμή, τοξικότητα, κόστος

Θερμική Αδρανοποίηση πολυφαινολασών

Αδρανοποίηση της οξειδάσης της πολυφαινόλης σε υψηλή θερμοκρασία και μικρό χρόνο (ζεμάτισμα, HTST).

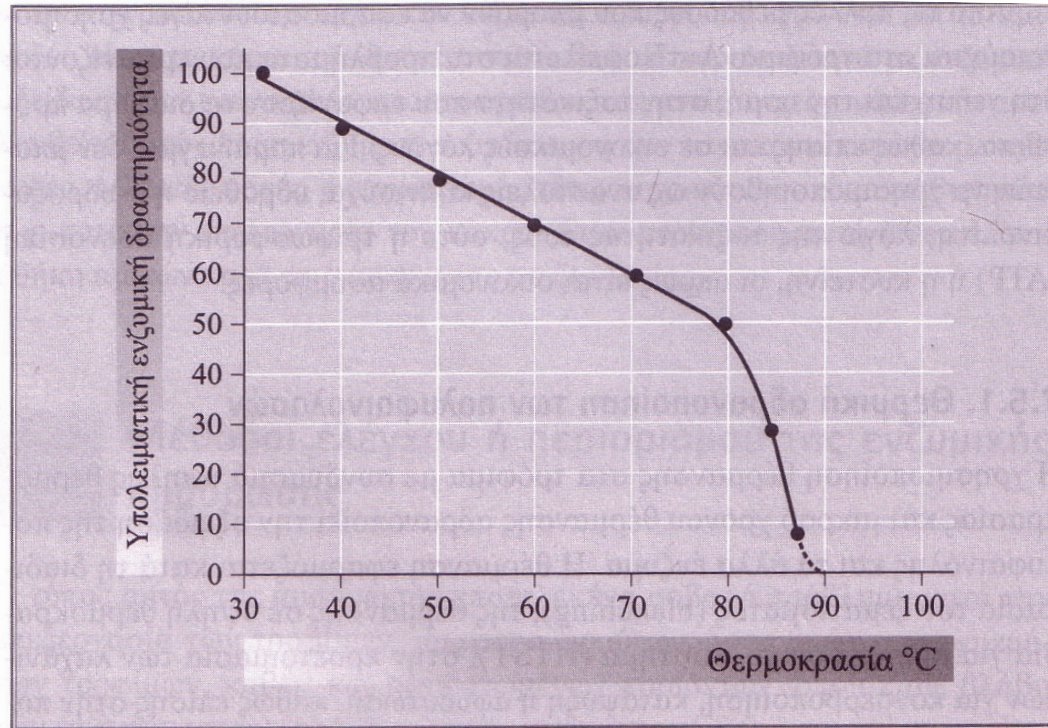
Προετοιμασία λαχανικών για κονσερβοποίηση, κατάψυξη ή αφυδάτωση, παραγωγή χυμών και πολτών φρούτων

Μειονεκτήματα

Τα φρούτα και λαχανικά εμφανίζονται σαν βρασμένα (αλλαγές δομής), εμφάνιση μη κανονικών γεύσεων και οσμών. Ανάγκη για ακριβή καθορισμό θερμοκρασίας (εμφάνιση κόκκινου χρωματισμού σε σκόρδα και κρεμμύδια που υπέστησαν θερμική επεξεργασία) και χρόνο θερμικής κατεργασίας.

Θερμική Αδρανοποίηση πολυφαινολασών

Στενή σχέση θερμοκρασίας και χρόνου θέρμανσης



Σχήμα 7.1. Επίδραση της θερμοκρασίας στη δράση της φαινολάσης πολτού αχλαδιών με διάρκεια θέρμανσης 8 sec.

Η αδρανοποίηση επηρεάζεται επίσης από τη συγκέντρωση ενζύμου και το pH.

Η χρήση μικροκυμάτων μπορεί επίσης να εφαρμοστεί: η αδρανοποίηση του ενζύμου από πατάτες είναι γρηγορότερη μετά από έκθεση σε φούρνο μικροκυμάτων παρά σε καυτό νερό. Επίσης το προϊόν διατηρεί τη δομή του.

Χρήση διοξειδίου του θείου και θειωδών αλάτων

Το διοξείδιο του θείου και τα θειώδη άλατα είναι ισχυροί αναστολείς της πολυφαινολάσης. Παρεμποδίζουν επίσης και τη μη ενζυμική αμαύρωση.

Μηχανισμός δράσης SO_2 και θειωδών αλάτων

Αναστολή ενζύμου (αναστολή υδροξυλίωσης της L-τυροσίνης σε 3,4 διυδροξύ φαινυλαλανίνη) ή αναστολή μετατροπής κινονών σε φαινόλες.

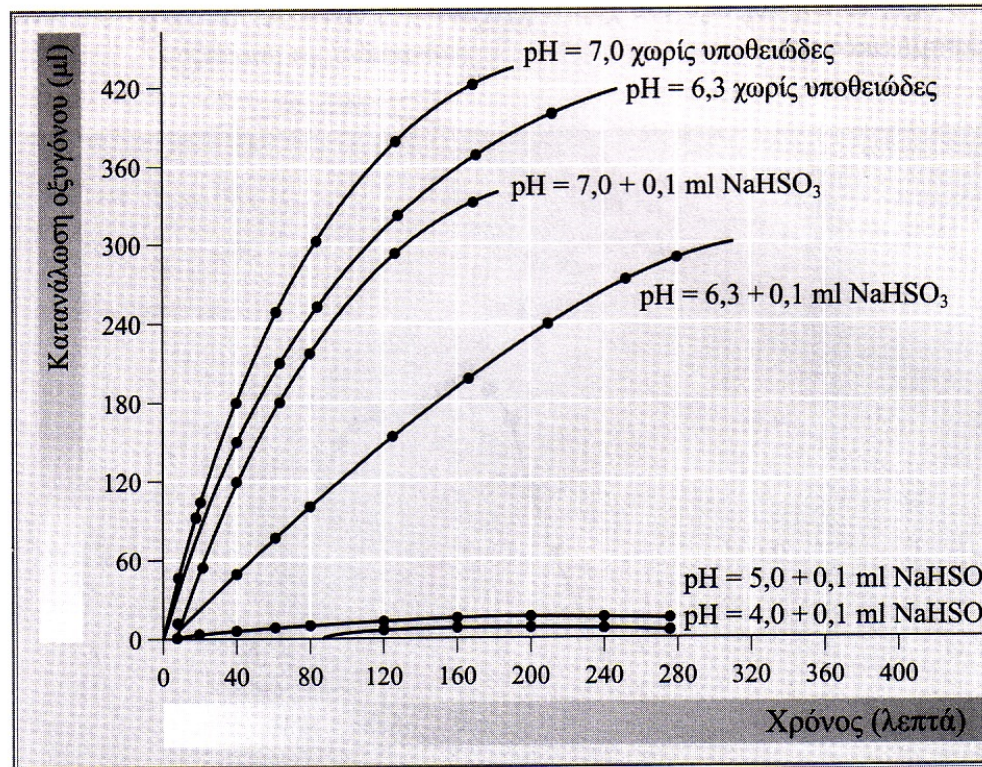
Μόνο το ελεύθερο SO_2 αναστέλλει την ενζυμική αμαύρωση. Αρκετή ποσότητα SO_2 ή υποθειωδών (HSO_3^-) αντιδρούν με αλδεΐδες και κετόνες.

Χρήση: με μορφή αερίου (SO_2 , εύκολη διείσδυση σε φρούτα και λαχανικά) ή με θειώδη άλατα (πιο εύκολη εφαρμογή μεθόδου, πχ. Βύθιση ή ψέκασμα).

Απομάκρυνση: κενό, βρασμός, χρήση χημικών μέσων.

Χρήση διοξειδίου του θείου και θειωδών αλάτων

Επίδραση του διοξειδίου του θείου και του pH στην αναστολή
Η αναστολή της ενζυμικής αμαυρώσεως ευνοείται σε $\text{pH} < 5$



Σχήμα 7.2. Επίδραση pH και υποθειωδών αλάτων στην ενζυμική οξείδωση της τυροσίνης.

Χρήση διοξειδίου του θείου και θειωδών αλάτων

Επίδραση του pH στην αναστολή, παράδειγμα:

Με τη χρήση θειωδών σε pH 4 προκαλείται γρήγορη αναστολή του ενζύμου σε καθαρισμένες πατάτες. Αμέσως πριν υποβληθούν σε κατεργασία, οι πατάτες πλένονται με άφθονο νερό για την απομάκρυνση του οξέος και του υποθειώδους.

Πλεονεκτήματα

Εύκολη χρήση ιδιαίτερα όταν η θερμική κατεργασία αντενδείκνυται

Αντισηπτικές ιδιότητες

Προστασία της βιταμίνης C (ασκορβικού οξέος)

Χαμηλό κόστος

Μειονεκτήματα

Ανεπιθύμητη γεύση και οσμή

Επικάλυψη του φυτικού χρώματος των τροφίμων

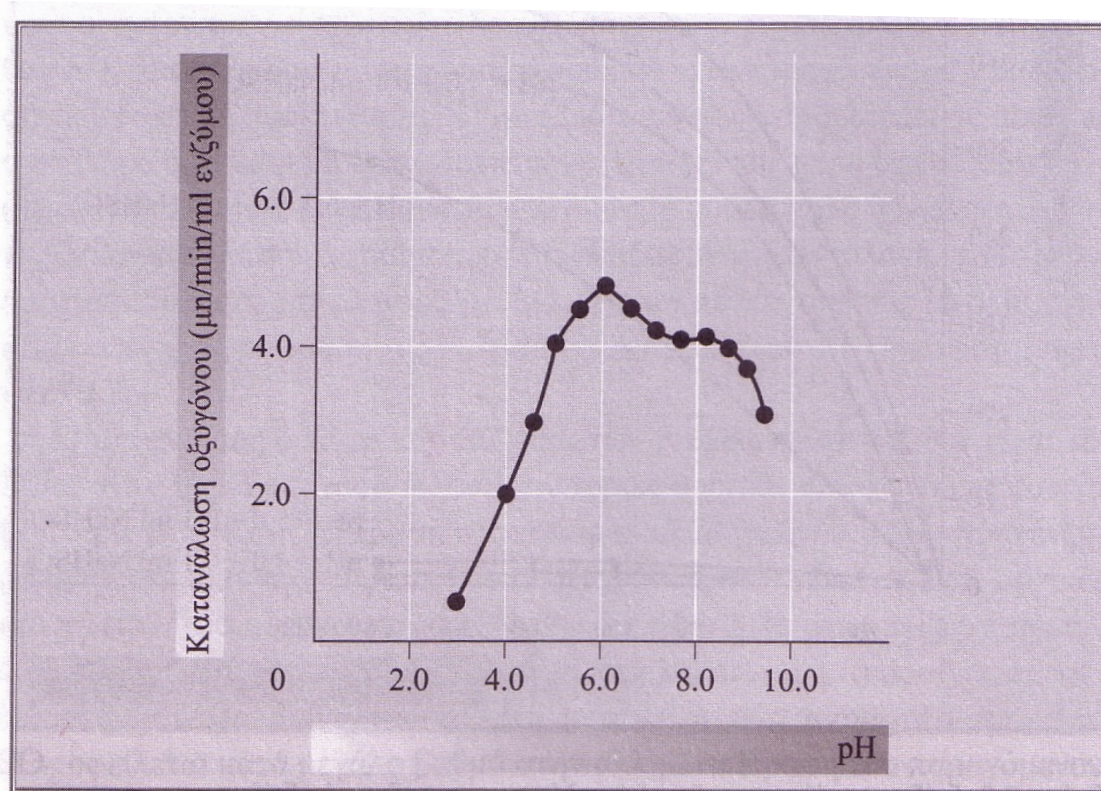
Διάβρωση των δοχείων συσκευασίας

Τοξικότητα

Καταστροφή βιταμίνης B₁ (θειαμίνη)

Χρήση οξέων

Το βέλτιστο pH για τις περισσότερες πολυφαινολάσες είναι μεταξύ 4 και 7.



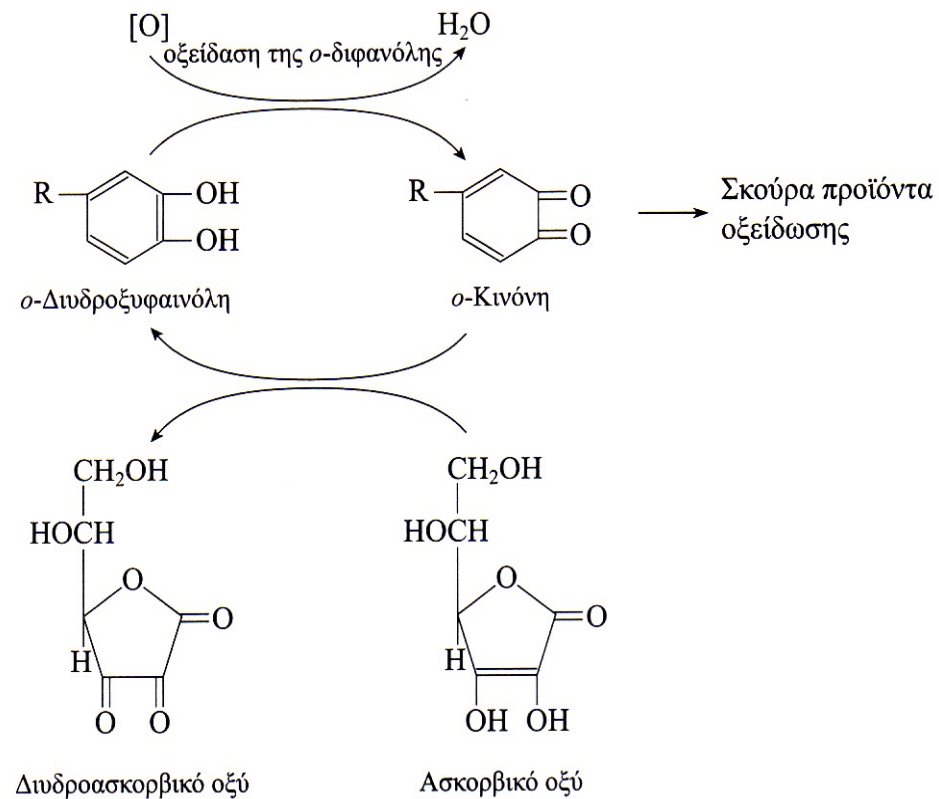
Σχήμα 7.3. Άριστο pH δράσης οξειδάσης της πολυφαινόλης σε υπόστρωμα κατεχόλης.

Ευρεία χρήση (βιομηχανική και οικιακή) για τον περιορισμό του φαινομένου
Χρησιμοποιούμενα οξέα: κιτρικό, μηλικό, φωσφορικό, **ασκορβικό**.

Χρήση οξέων

Το μηλικό οξύ πιο αποτελεσματικό από το κιτρικό.

Το **ασκορβικό οξύ** πιο αποτελεσματικό όλων, επιπλέον δεν έχει οσμή.



Σχήμα 7.4. Μείωση παραγωγής της κινόνης από τη δράση του ασκορβικού οξέος.

Χρήση οξέων

Προσθήκη ασκορβικού μπορεί να αποτρέψει την ενζυμική αμαύρωση και να μειώσει το οξυγόνο που υπάρχει μέσα σε κονσέρβες μήλων.

Συνεργιστική δράση κιτρικού με ασκορβικό: μείωση pH και δέσμευση χαλκού.

Τροποποίηση του υποστρώματος (μεθυλίωση)

Ενζυμική μεθυλίωση της ο-διυδρόξυ δομής από μία ο-μεθυλοτρανσφεράση, ένζυμο που απαντάται σε φυτικούς ιστούς

Μεταφορά μεθυλομάδας από S-αδενοσύλ μεθειονίνη σε ο-διφαινόλη

Η μεθυλιωμένη διφαινόλη δεν αποτελεί πλέον υπόστρωμα

Μέθοδος

Κομμένα φρούτα και λαχανικά βυθίζονται σε υδατικό διάλυμα με ελαφρώς αλκαλικό pH κάτω από αναερόβιες συνθήκες για 3 λεπτά ως 5 ώρες στους 20-40 °C

Τα κομμάτια απομακρύνονται, πλένονται και αποθηκεύονται σε κανονικό για τους ιστούς pH

Πλεονέκτημα: δεν επηρεάζονται το αρχικό σχήμα, η γεύση, το άρωμα και η δομή

Αποκλεισμός του οξυγόνου

Μέθοδος που εφαρμόζεται όταν όλες οι άλλες αποτυγχάνουν.

Απλούστερη εφαρμογή: τοποθέτηση του προϊόντος σε ατμόσφαιρα αζώτου, σε κενό, σε νερό, έκθεση σε ασκορβικό οξύ, σακχαρόζη.

Παραδείγματα

Αβοκάντο

Συσκευασία σε ατμόσφαιρα αζώτου. Εμφάνιση πικρής γεύσης με θερμική κατεργασία, αλλαγή του pH επηρεάζει το άρωμα, χρήση ασκορβικού οξέως δεν έχει αποτέλεσμα.

Πατάτα

Έκθεση των λεπτών φετών για προετοιμασία τσιπς σε νερό.

Κατεψυγμένα ροδάκινα

Έκθεση κομματιών σε ασκορβικό οξύ πριν την κατάψυξη. Το ασκορβικό οξύ που περιβάλλει τους ιστούς οξειδώνεται εκλεκτικά και προστατεύει τους ιστούς από την αμαύρωση. Στη συνέχεια το προϊόν συσκευάζεται υπό κενό

Αποκλεισμός του οξυγόνου

Μήλα και αχλάδια

Εφαρμογή κενού όταν τα κομμάτια των φρούτων είναι βυθισμένα σε νερό ή σιρόπι.
Χρήση σακχαρόζης στα κατεψυγμένα φρούτα μειώνει το αδιάλυτο οξυγόνο των ιστών και εμποδίζει τη διάχυση οξυγόνου μέσα στους ιστούς.

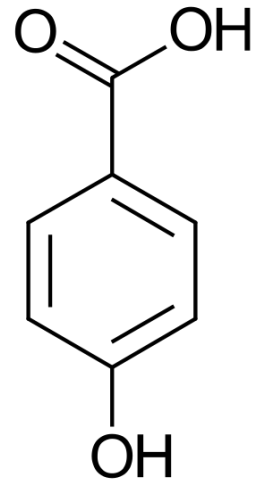
Μειονεκτήματα

Τα φρούτα και λαχανικά μαυρίζουν όταν εκτεθούν πάλι στον αέρα.
Δημιουργία αναεροβίων συνθηκών που μπορούν να καταστρέψουν τους ιστούς.

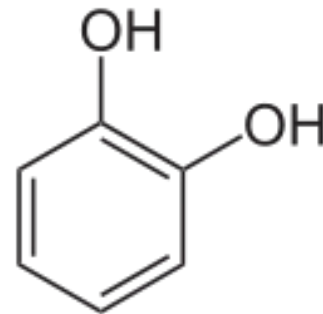
Χρήση εξειδικευμένων αναστολέων

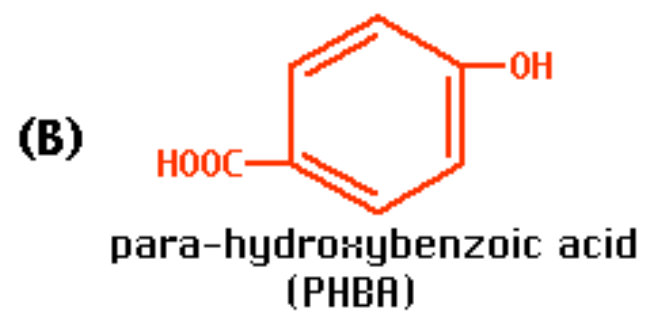
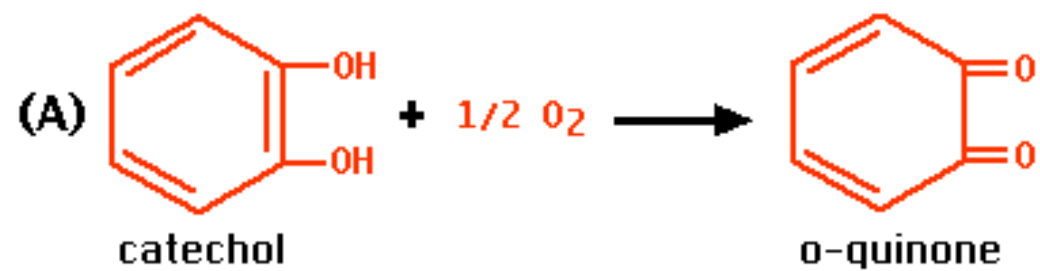
- Αναγωγικοί παράγοντες (δέσμευση οξυγόνου)

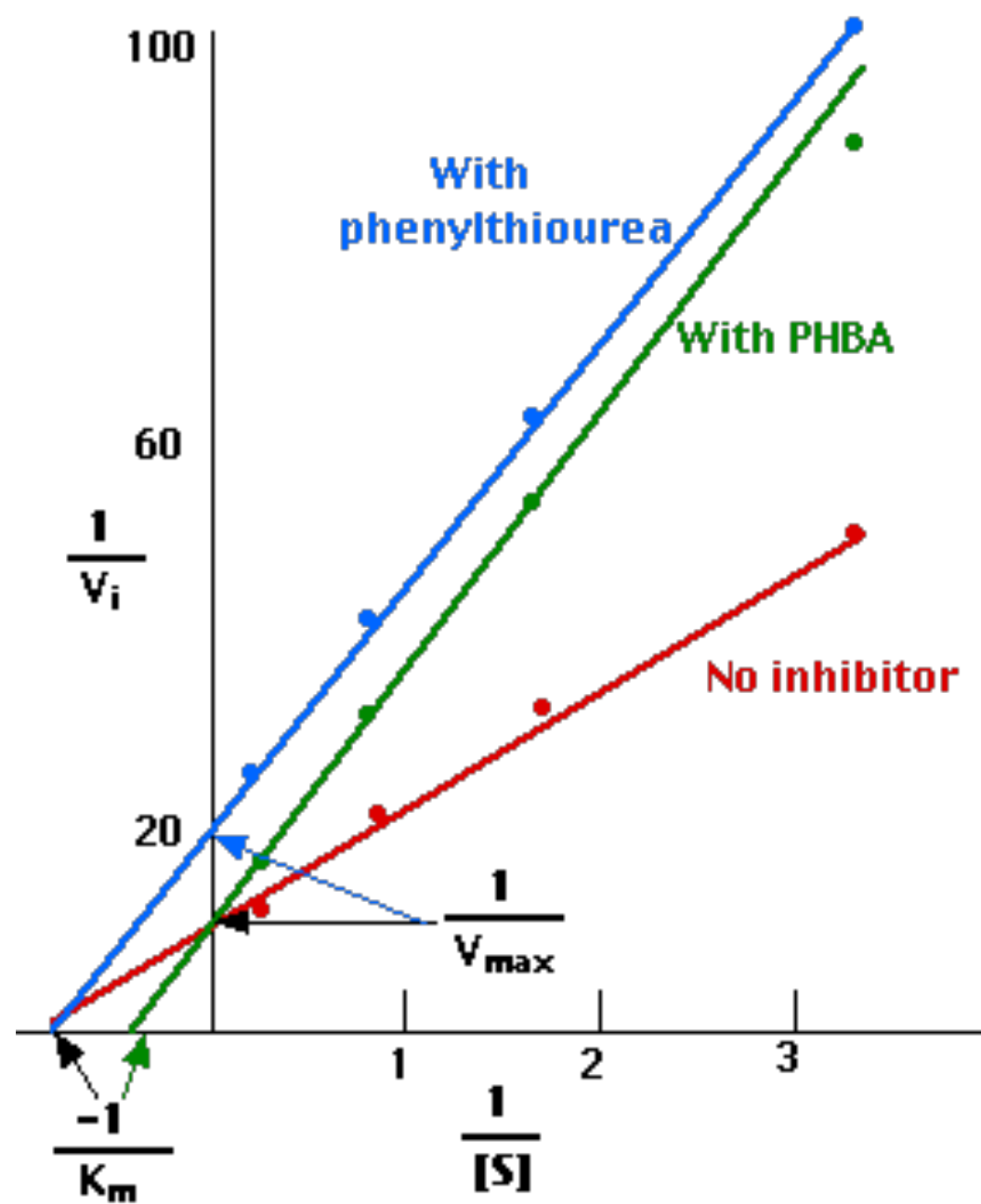
παρα-υδροξυβενζοϊκό οξύ (PHBA)



κατεχόλη



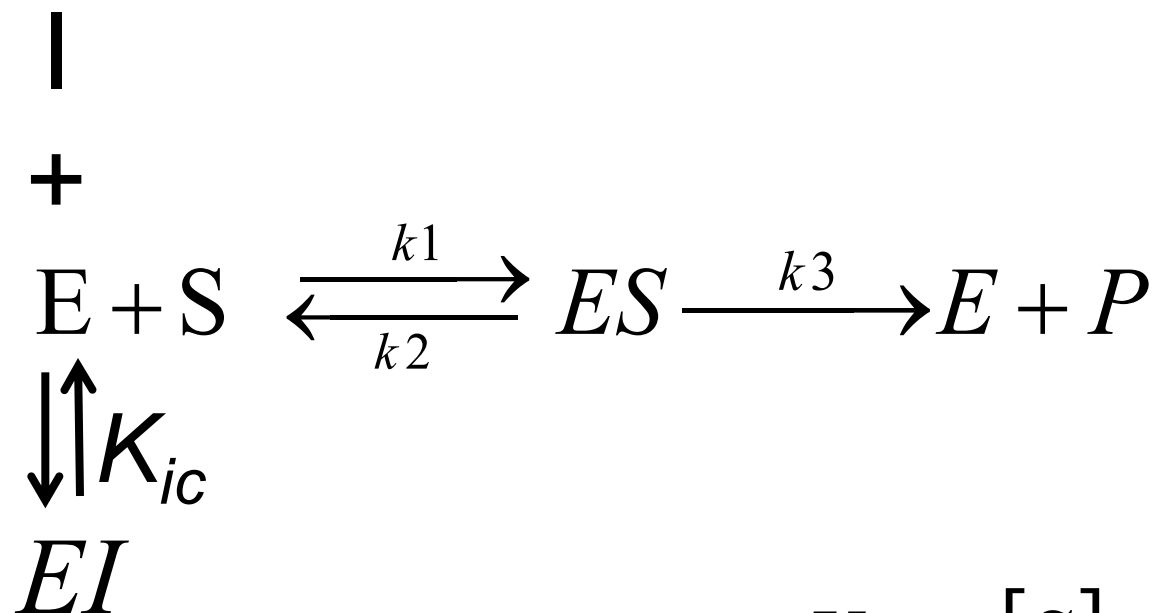




Αναστολή από PHBA



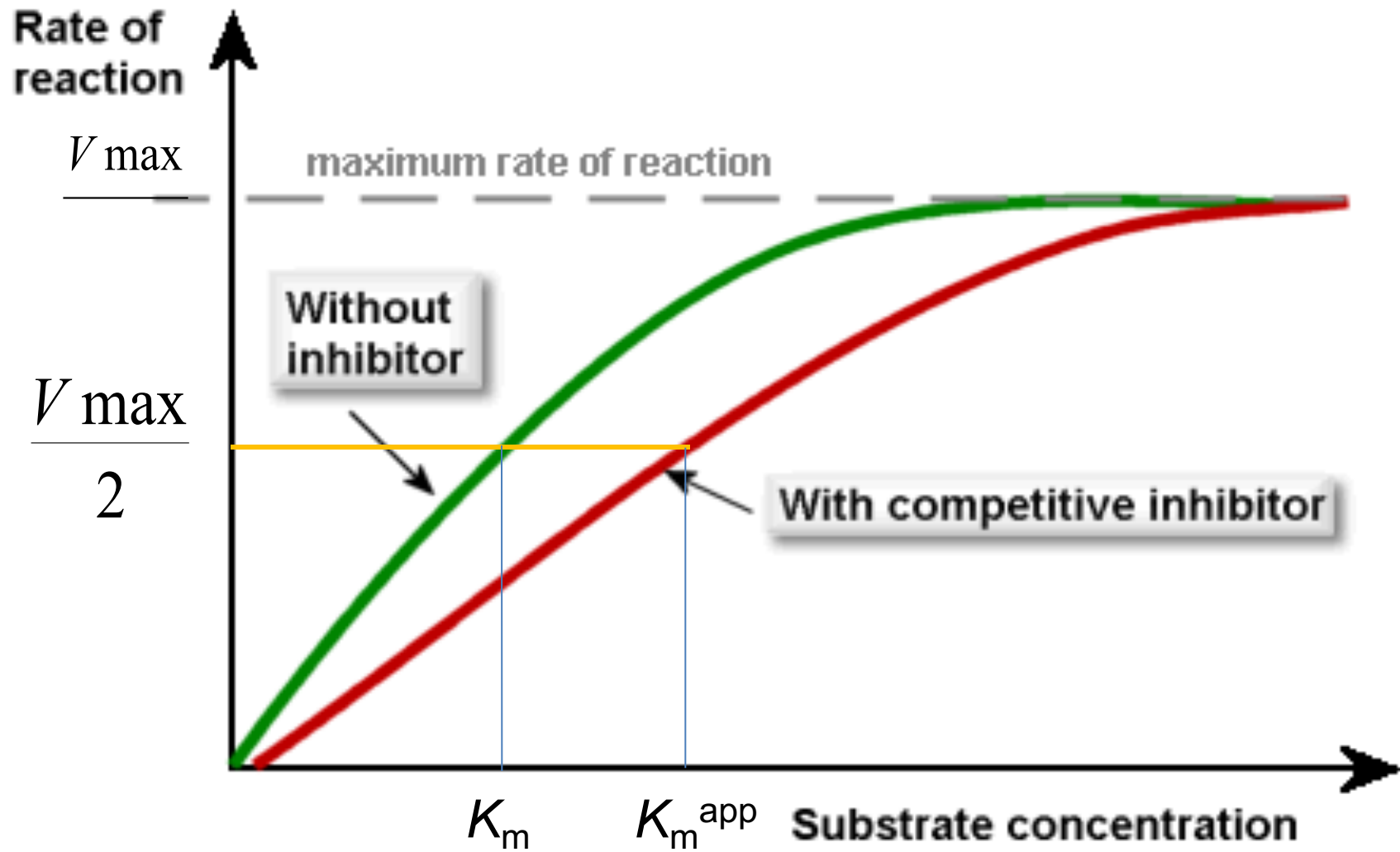
Συναγωνιστική αναστολή: αυξάνεται η K_m δεν αλλάζει η V_{max}



$$u = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}} \right)}$$

Reminder!

αλλάζει η K_m δεν αλλάζει η V_{max}



Χρήση εξειδικευμένων αναστολέων

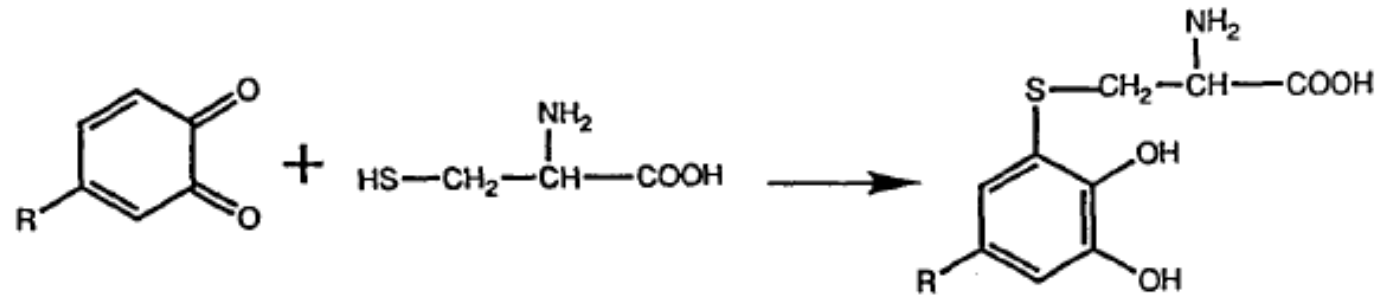
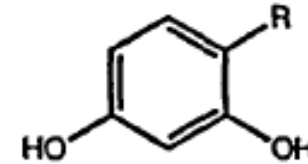


FIGURE 4. The mode action of sulfhydryl compounds in the inhibition of enzymatic browning.

Χρήση εξειδικευμένων αναστολέων

- Ρ- ή m-διφαινόλες → δεν αποτελούν υποστρώματα για το ένζυμο
- Συναγωνιστική αναστολή
- Δεν προχωρά η ενζυμική αμαύρωση

I₅₀ Values for Synthetic 4-Substituted Resorcinols as PPO Inhibitors



R	I ₅₀ μM
H	2700
Hexanoyl	750
Carboxyl	150
Ethyl	0.8
Hexyl	0.5
Dodecyl	0.3
Cyclohexyl	0.2

From McEvily, A. J., Iyengar, R., and Gross, A. T., in *ACS Symposium Series*, Ho, C.-T., Ed., American Chemical Society, Washington, D.C., 1991, in press. With permission.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.tandfonline.com/loi/bfsn20>

Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages

Arthur J. McEvily^a, Radha Iyengar^a & W. Steven Otwell^b



Καλή μελέτη!

zoipip@upatras.gr