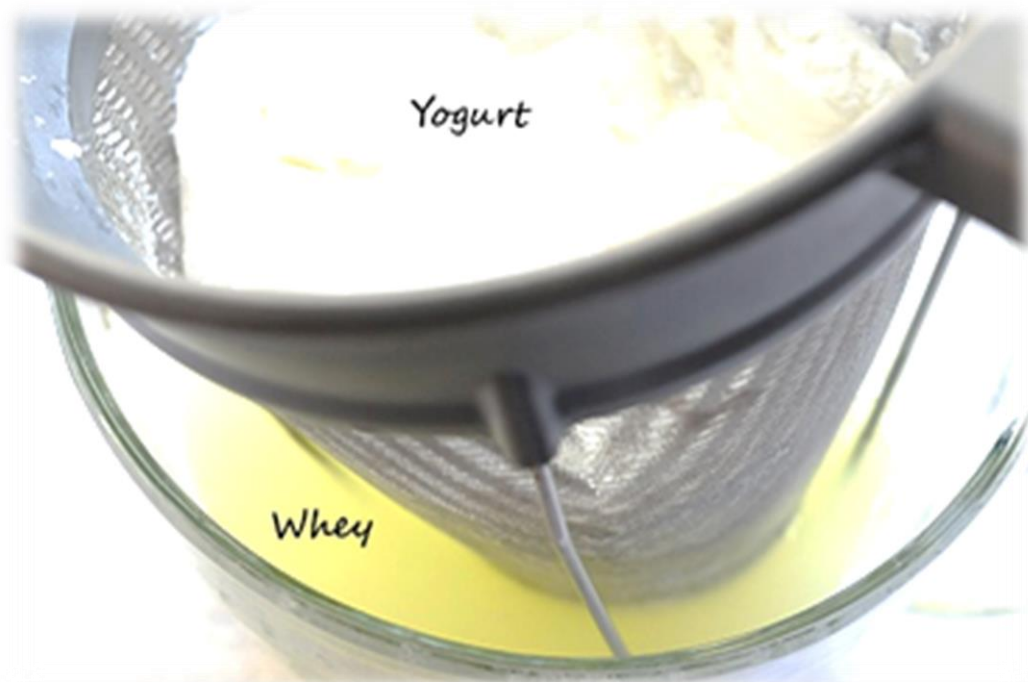




Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας IV: Σύνθεση & Ανάπτυξη Βιομηχανικών
Διαδικασιών
Εργαστήριο Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΥΨΗΛΗΣ
ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΑΞΙΑΣ ΑΠΟ ΤΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ
ΤΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ



Γαλάνη Ισμήνη-Ειρήνη

Επιβλέπων Καθηγητής: Ταούκης Πέτρος

ΑΘΗΝΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2016

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ κατά το χρονικό διάστημα 02/2016-09/2016. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Πέτρο Ταούκη για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με τον τομέα χημείας και τεχνολογίας τροφίμων. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τόσο τον κ. Πέτρο Ταούκη, όσο και τον καθηγητή κ. Ευάγγελο Τόπακα για την υποστήριξη και την υπομονή τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Τμήμα Έρευνας & Ανάπτυξης της εταιρείας ΔΕΛΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ Α.Ε για τη συνεργασία και την προμήθεια της πρώτης ύλης του όξινου ορού, χάρη στην οποία μπόρεσε να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία. Θερμές ευχαριστίες στη Δρ. Μαρία Τσεβδού και το μέλος ΕΔΙΠ του εργαστηρίου Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων, Δρ. Δημήτρη Τσιμογιάννη για τις αμέτρητες ώρες πειραμάτων και συζητήσεων, την εμπιστοσύνη τους σε μένα, τη βοήθεια και τη στήριξη τους, που αποτέλεσαν βασικό παράγοντα για την περάτωση της παρούσας εργασίας, καθώς και τη Δρ. Ελένη Γώγου για τη βοήθεια της, όποτε αυτή της ζητήθηκε.

Ευχαριστώ ακόμα τους Καθηγητές, τους Υποψήφιους Διδάκτορες και τους συμφοιτητές μου στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΕΜΠ, για τη συνεργασία μας και το φιλικό κλίμα καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια της διαδρομής μου στο ΕΜΠ. Τους φίλους μου εντός και εκτός σχολής που μοιράστηκαν μαζί μου πολλές από τις στιγμές των 5 αυτών χρόνων και την οικογένειά μου, τη μαμά μου και τις αδερφές μου, για τη συμπαράσταση και υπομονή που έδειξαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Γαλάνη Ισμήνη-Ειρήνη

Σεπτέμβριος 2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο τη μελέτη της αξιοποίησης του όξινου ορού, και συγκεκριμένα τη μετατροπή της περιεχόμενης σε αυτόν λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Galacto-oligo-saccharides-GOS), μέσω ενζυμικής αντίδρασης με το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση.

Ο όξινος ορός αποτελεί απόβλητο της βιομηχανίας γιαουρτιού και η διαχείρισή του αποτελεί επιτακτική ανάγκη καθώς σχετίζεται με ποικίλα περιβαλλοντικά προβλήματα, λόγω της χαμηλής τιμής pH του που τον καθιστά ιδιαίτερα προβληματικό, και τον διαφοροποιεί από τον γλυκό ορό, του οποίου η αξιοποίηση πραγματοποιείται ήδη, κυρίως προς παραγωγή πρωτεϊνών ορού. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εκμετάλλευση του όξινου ορού προς συστατικά υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως είναι οι GOS, οι οποίοι προσομοιάζουν τους ολιγοσακχαρίτες του ανθρώπινου γάλακτος και ανήκουν στην κατηγορία των προβιοτικών (prebiotics). Η παραγωγή GOS μπορεί να γίνει ενζυμικά μέσω του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση, το οποίο διασπά την περιεχόμενη στον ορό λακτόζη μέσω αντίδρασης γλυκοζιλίωσης, και στη συνέχεια χρησιμοποιεί τα μονομερή, δημιουργώντας δεσμούς μεταξύ τους μέσω της αντίδρασης τρανσγλυκοζιλίωσης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση από το μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae*, το οποίο έχει την ιδιότητα να διασπά τον β-(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό και να συνθέτει β-(1→6), β-(1→4) και β-(1→3) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Για την ενζυμική αντίδραση απαραίτητη ήταν η συμπύκνωση του ορού σε επίπεδα τέτοια ώστε η περιεκτικότητά του σε λακτόζη να τον καθιστά κατάλληλο υπόστρωμα για την ενζυμική αντίδραση. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα με περιεκτικότητα 15% w/v σε λακτόζη.

Αρχικά κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς της λακτόζης, της γαλακτόζης, της παρα-νιτροφαινόλης και της αλβουμίνης του ορού, οι οποίες και χρησιμοποιήθηκαν στην περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων. Επίσης, μετρήθηκε και η δραστηριότητα του ενζύμου, η οποία βρέθηκε ίση προς 28,6 ($\pm 1,25$) U/mg ενζύμου.

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε έλεγχος ως προς την επίδραση της προέλευσης του υποστρώματος στην ενζυμική μετατροπή της λακτόζης σε GOS, χρησιμοποιώντας υπόστρωμα πρότυπου διαλύματος λακτόζης και υπόστρωμα όξινου ορού, σε συγκέντρωση λακτόζης 15% w/v, τιμή pH 4,2, θερμοκρασία 55°C και ενζυμική δραστηριότητα 0,24 U/mL αντίδρασης. Στην περίπτωση χρήσης διαλύματος πρότυπης λακτόζης παρατηρήθηκε παραγωγή προϊόντος, άγνωστης σύνθεσης, του οποίου ο βαθμός πολυμερισμού εικάζεται ότι είναι 3, αφού φάνηκε

να εκλούεται σε ενδιάμεσους χρόνους σε σχέση με αυτούς που αντιστοιχούν σε πρότυπα σάκχαρα με βαθμό πολυμερισμού 3 και 4. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε παραγωγή προϊόντος στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα όξινο ορός.

Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση της σύστασης του όξινου ορού σε πρωτεΐνες, άλατα και λακτόζη στην ενζυμική αντίδραση. Χρησιμοποιήθηκε όξινο ορός ελεύθερος πρωτεϊνών (μέσω υπερδιήθησης με όριο 10 kDa) και όξινο ορός με απομακρυσμένα τα κύρια άλατά του (άλατα του φωσφόρου και του ασβεστίου, μέσω θερμικής καταβύθισης των αλάτων και φυγοκέντρωσης του ορού), με όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους ίδιες με αυτές των αρχικών αντιδράσεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία των κύριων αλάτων ή των πρωτεϊνών του ορού δεν επηρεάζει την πορεία της αντίδρασης, αφού και πάλι δεν παρατηρήθηκε παραγωγή προϊόντος. Στη συνέχεια ακολούθησε μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του όξινου ορού σε λακτόζη, πραγματοποιώντας μία επιπλέον αντίδραση με υπόστρωμα όξινο ορό με περιεκτικότητα 32% w/v σε λακτόζη, του οποίου απομακρύνθηκαν τόσο οι πρωτεΐνες όσο και τα κύρια άλατα. Οι συνθήκες της θερμοκρασίας, του pH και της χρησιμοποιούμενης ενζυμικής δραστηριότητας παρέμειναν σταθερές, αλλά και πάλι δεν παρατηρήθηκε παραγωγή προϊόντος. Έτσι, οι μελέτες επικεντρώθηκαν στην επίδραση της χρησιμοποιούμενης δραστηριότητας του ενζύμου (2,4-9,6 U/mL) και στη θερμοκρασία της αντίδρασης (40-55°C). Η επιλογή των ενζυμικών δραστηριοτήτων έγινε πειραματικά ξεκινώντας από μία συγκέντρωση δεκαπλάσια της αρχικής, ενώ η επιλογή του θερμοκρασιακού εύρους της αντίδρασης επιλέχθηκε με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα.

Η αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας σε δεκαπλάσια επίπεδα από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στα αρχικά πειράματα (2,4 U/mL έναντι 0,24 U/mL), οδήγησε στην παραγωγή προϊόντος. Λόγω αδυναμίας της στήλης να διαχωρίσει σάκχαρα με τον ίδιο βαθμό πολυμερισμού και ίδιο τύπο μονομερών αλλά διαφορετικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς, η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε για το σύνολο των δισακχαριτών με μονομερή τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη, μέσω της πρότυπης καμπύλης της λακτόζης. Παρόμοια, η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε για το σύνολο των παραγόμενων GOS και εκφράστηκε ως εμβαδόν απόκρισης, καθώς δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίησή τους με κάποια από τις διαθέσιμες πρότυπες ουσίες.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι η θερμοκρασία της αντίδρασης και η ενζυμική δραστηριότητα έχουν σημαντική ($p < 0,001$) επίδραση στη μετατροπή της λακτόζης σε GOS, για το μελετώμενο εύρος θερμοκρασιών και ενζυμικών συγκεντρώσεων. Ως βέλτιστες συνθήκες για την ενζυμική αντίδραση επιλέχθηκε ο συνδυασμός θερμοκρασίας 40°C και ενζυμικής δραστηριότητας 9,6 U/mL αντίδρασης. Τόσο η μετατροπή των δισακχαριτών όσο και η παραγωγή των συνολικών GOS ως συνάρτηση του χρόνου της αντίδρασης εκφράστηκαν

μαθηματικά μέσω των εξισώσεων $\frac{C}{C_0} = 1 + a \cdot (1 - e^{-b \cdot t})$ και *Συνολικοί GOS* = $a \cdot (1 - e^{-b \cdot t})$ αντίστοιχα. Το μαθηματικό μοντέλο της παραγωγής των GOS είναι αυτό που ακολουθείται σε αντιδράσεις πρώτης τάξης.

Η παράμετρος *b* της εξίσωσης που περιγράφει την μετατροπή των δισακχαριτών φάνηκε να εξαρτάται σημαντικά τόσο από τη θερμοκρασία όσο και από τη χρησιμοποιούμενη ενζυμική δραστικότητα. Αντίθετα, η παράμετρος *b* της εξίσωσης που περιγράφει την παραγωγή των GOS φάνηκε να επηρεάζεται μόνο από τη θερμοκρασία και όχι από τη δραστικότητα του ενζύμου, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για τη σταθερά του ρυθμού παραγωγής τους. Η εξάρτηση της σταθεράς αυτής από τη θερμοκρασία ακολούθησε κινητική Arrhenius, και υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης της ενζυμικής αντίδρασης ίση προς $95,2 \pm 12,3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Συμπερασματικά, η αξιοποίηση των αποβλήτων της βιομηχανίας γιαουρτιού για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας φάνηκε να είναι εφικτή μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης της λακτόζης του ορού και της ταυτόχρονης σύνθεσης GOS με το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης. Οι μελέτες αυτές φαίνεται να βρίσκονται ακόμα σε αρκετά πρώιμο στάδιο και είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνησή τους, ωστόσο μπορούν να οδηγήσουν στην αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών προβλημάτων που δημιουργούνται από την απόρριψη του όξινου ορού όσο και στην αύξηση του κέρδους της βιομηχανίας γιαουρτιού, αφού οι παραγόμενοι GOS μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως προβιοτικές ουσίες από την ίδια τη βιομηχανία ή να διοχετευθούν στην αγορά προς όφελός της.

PRODUCTION OF ADDED VALUE INGREDIENTS FROM THE BY-PRODUCTS OF THE GREEK YOGHURT INDUSTRY

The objective of the present study was the utilization of acid whey, and in particular the enzymatic transformation of the containing lactose to high added-value products, such as galactooligosaccharides (GOS).

The management of acid whey, a waste of yoghurt industry, is necessary as it relates to various environmental issues due to its low pH value. As a result, acid whey is considered as a toxic waste, and it is significantly differentiated from sweet whey, which is already used for the production of whey proteins. The use of acid whey in order to form GOS is of particular interest, since they have similar structure and functionality with human milk oligosaccharides (HMOs) and are included in prebiotics. The production of GOS from acid whey could be achieved enzymatically with the use of beta-galactosidase, an enzyme which cleaves lactose at its monomers through the reaction of glycosylation, and subsequently creates bonds between monomers via the reaction of transglycosylation. In the present study, the enzyme of β -galactosidase from the microorganism *Aspergillus oryzae* was used. This enzyme has the ability to cleave β -(1 \rightarrow 4) glycosidic bond and also to compose β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 4) and β -(1 \rightarrow 6) glucosidic bonds. In order for the reaction of glycosylation to take place, concentration of acid whey to certain levels of lactose is necessary. In this study, substrate with 15% w/v lactose content was used.

Firstly, reference curves of lactose, galactose, para-nitrophenol and bovine serum albumin were developed, which were used for the quantification of the results. Additionally, the enzyme activity of the used beta-galactosidase was measured and was found to be equal to 28.6 (\pm 1.25) U/mg of enzyme.

Afterwards, the effect of substrate type on the enzymatic transformation of lactose to GOS was evaluated through the use of different substrates with 15% w/v lactose content, one from acid whey and one from standard solution of lactose. The enzymatic reaction conditions were pH value 4.2, temperature 55°C and enzyme activity of 0.24 U/mL of reaction solution. In the case of standard lactose solution, the formation of a product, with unknown structure, was observed. This product was assumed to have a degree of polymerization of 3, since its retention time was between the corresponding ones of standard saccharides with degree of polymerization 3 and 4. On the other hand, in the case of acid whey substrate, no product formation was observed. Consequently, the effect of acid whey composition on the enzymatic reaction was investigated. For this purpose, two reaction experiments with different substrate treatments were performed,

including one substrate in which proteins were removed (via ultrafiltration with cut-off of 10 kDa), and one substrate in which the major minerals were removed (phosphate and calcium minerals, through thermal precipitation and centrifugation). Results showed that the presence of either proteins or minerals do not affect the enzymatic reaction, given that no formation of GOS was achieved in either cases. The next step was to investigate whether the formation of GOS was affected from acid whey lactose content. So, an enzymatic reaction with acid whey to a lactose content of 32% w/v was carried out. The conditions of the reaction (pH, temperature, enzyme activity) were the same as above, and both proteins and minerals had been eliminated from the substrate. Again, no formation of GOS was observed. Thus, the study was focused on the effect of enzyme activity (in the range of 2.4-9.6 U/mL) and temperature (in the range of 40-55°C) on the reaction performance. The selection of the tested enzyme activities was experimentally performed, starting from an initial activity 10-fold of the preliminary one, while the selection of temperature range was based on literature data.

The selection of a 10-fold enzyme activity led to the formation of GOS, when using acid whey as a substrate. Due to the inability of the used HPLC column to differentiate saccharides with same degree of polymerization and same type of monomers, but different glycosidic bonds, the quantification of the experimental results was performed for total disaccharides that have as monomers glucose and galactose, using the reference curve for lactose. Similarly, the quantification for the reaction product was performed for total GOS and was expressed as retention area, as it was not possible to identify them with any of the available standards.

Results showed that reaction temperature and enzyme activity both significantly ($p < 0.001$) affect the conversion of lactose to GOS, in the tested temperature and enzyme activity ranges. The selection of optimum reaction conditions include temperature of 40°C and enzyme activity of 9.6 U/mL of reaction solution. The conversion of disaccharides and the production of presumed GOS during the reaction time were mathematically described using the below equations; $\frac{c}{c_0} = 1 + a \cdot (1 - e^{-b \cdot t})$ and $total\ GOS = a \cdot (1 - e^{-b \cdot t})$ respectively. The proposed mathematical model that describes the formation of GOS is the one generally applied in first order reactions.

It was observed that the parameter b of the equation which describes disaccharides conversion was significantly depended on both the reaction temperature and the enzyme activity used. On the other hand, the parameter b of the equation which describes GOS formation was significantly depended on the reaction temperature only, indicating that is equal to the GOS formation rate constant. The effect of reaction temperature on GOS formation rate constant followed the Arrhenius kinetics, and the activation energy, E_a , for the studied enzymatic reaction was calculated and found to be equal to $95.2 \pm 12.3\ kJ \cdot mol^{-1}$.

In conclusion, the enzymatic hydrolysis of lactose and the simultaneous GOS formation using beta-galactosidase seems to have a potential application for the utilization of yoghurt industry wastes for the production of high added-value products. The research in this field is still in a preliminary stage and further studies are necessary. However, these studies may lead to the management of the environmental issues caused by the discard of acid whey, increasing at the same time the profit of yoghurt industry, since the formed GOS can be used either as probiotic ingredients by the industry itself or marketed as high value products.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iii
PRODUCTION OF ADDED VALUE INGREDIENTS FROM THE BY-PRODUCTS OF THE GREEK YOGHURT INDUSTRY	vi
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	ix
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: Ο ΟΡΟΣ ΤΟΥ ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ.....	3
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.2 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΟΡΟΥ.....	4
1.2.1 ΛΑΚΤΟΖΗ.....	5
1.2.2 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	6
1.2.3 ΑΛΑΤΑ.....	6
1.2.4 ΛΙΠΗ.....	7
1.3 ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΟΞΙΝΟΥ ΟΡΟΥ	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: Η ΛΑΚΤΟΖΗ	9
2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΛΑΚΤΟΖΗ.....	9
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ ΑΠΟ ΟΡΟ.....	11
2.3 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ-ΔΥΣΑΝΕΞΙΑ ΣΤΗ ΛΑΚΤΟΖΗ.....	14
2.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ.....	14
2.4.1 ΛΑΚΤΟΥΛΟΖΗ ΚΑΙ ΛΑΚΤΙΤΟΛΗ.....	15
2.4.2 ΓΑΛΑΚΤΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ (GALACTOOLIGOSACCHARIDES,GOS).....	16
2.4.3 ΛΑΚΤΟΒΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ.....	17
2.4.4 ΤΑΓΚΑΤΟΖΗ.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ ΤΗΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ.....	19
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	19
3.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ.....	19
3.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ.....	21
3.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΡΑΝΣΓΛΥΚΟΖΙΛΙΩΣΗΣ.....	24
3.5 Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i>	26

3.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΟΙ ΓΑΛΑΚΤΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ.....	29
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	29
4.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ GOS ΑΠΟ ΛΑΚΤΟΖΗ.....	30
4.3 ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΙ GOS.....	31
4.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΟΦΕΛΗ ΤΩΝ GOS.....	33
4.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ GOS.....	33
4.6 ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΩΝ GOS.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: Η ΛΑΚΤΟΥΛΟΖΗ.....	37
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	37
5.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΛΑΚΤΟΥΛΟΖΗΣ.....	38
5.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΛΑΚΤΟΥΛΟΖΗΣ.....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ.....	45
7.1 ΣΚΟΠΟΣ.....	45
7.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	45
7.3 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	49
7.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΑΔΙΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ.....	51
7.4.1 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΟΕΙΝΟΥ ΟΡΟΥ.....	51
7.4.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΟΕΙΝΟΥ ΟΡΟΥ ΣΕ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ.....	51
7.4.2.1 ΑΥΞΗΣΗ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΣΕ ΛΑΚΤΟΖΗ.....	51
7.4.2.2 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	52
7.4.2.3 ΘΕΡΜΑΝΣΗ ΚΑΙ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ.....	53
7.4.3 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ.....	54
7.4.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	54
7.4.4.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ BRADFORD.....	55
7.4.4.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ.....	55
7.4.4.3 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, HPLC).....	57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ.....	59
8.1 ΧΡΟΝΟΙ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ HPLC-RI.....	59
8.2 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΖΗΣ.....	61
8.2.1 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ.....	61
8.2.2 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΑΛΑΚΤΟΖΗΣ.....	61
8.3 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ.....	63
8.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟ <i>A. ORYZAE</i>	64
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	65
8.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.....	65
8.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.....	67
8.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.....	69
8.8 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ GOS.....	72
8.8.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.....	73
8.8.1.1 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟΥΣ 40°C.....	73
8.8.1.2 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟΥΣ 45°C.....	76
8.8.1.3 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟΥΣ 50°C.....	79
8.8.1.4 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟΥΣ 55°C.....	82
8.8.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ.....	85
8.8.2.1 ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ 2,4 U/mL Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ.....	85
8.8.2.2 ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ 4,8 U/mL Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ.....	87
8.8.2.3 ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ 7,2 U/mL Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ.....	89
8.8.2.4 ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ 9,6 U/mL Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ.....	92
8.9 ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.....	94

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ.....	97
8.10 ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΤΩΝ ΔΙΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ & ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ ΓΩΣ ΑΠΟ ΤΟ ΧΡΟΝΟ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.....	97
8.10.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΤΟΥΣ 40°C.....	98
8.10.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΤΟΥΣ 45°C.....	100
8.10.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΤΟΥΣ 50°C.....	102
8.10.4 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΤΟΥΣ 55°C.....	104
8.11 ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΕΞΙΣΩΣΕΩΝ.....	106
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	111
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	114
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	117

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες το γιαούρτι έχει καθιερωθεί ως ένα καθημερινό τρόφιμο, συμμετέχοντας όλο και περισσότερο στην παγκόσμια οικονομία. Τα υγρά απόβλητα που προκύπτουν κατά την παραγωγή του γιαουρτιού, καθώς και η απόρριψη των μη καταναλωθέντων προϊόντων γιαουρτιού αποτελούν ένα ιδιαίτερος σημαντικό ποσοστό αποβλήτων των σύγχρονων γαλακτοβιομηχανιών. Τα απόβλητα αυτά είναι ακατάλληλα για πώληση, αν και σε ένα ποσοστό χρησιμοποιούνται για ζωοτροφές (Sholten et al. 1999). Συγκεκριμένα, υπολογίζεται ότι περίπου το 1% της συνολικής παραγωγής γιαουρτιού απορρίπτεται ως απόβλητο. Μέχρι σήμερα, τα κατάλοιπα του γιαουρτιού αξιοποιούνται μόνο στην παραγωγή ζωοτροφών, αν και η υψηλή τους περιεκτικότητα σε νερό θέτει περιορισμούς ως προς αυτή την οδό αξιοποίησής τους, καθιστώντας πιο πρακτική την απόρριψη του ορού και τη χρήση μόνο του στερεού μέρους των αποβλήτων σε αυτή τη φάση αξιοποίησης (Alonso et al. 2010).

Στην προσπάθεια η παγκόσμια αγορά να αποκτήσει περιβαλλοντική συνείδηση, οι χημικές, φαρμακευτικές και παρόμοιων τομέων απασχόλησης βιομηχανίες στρέφουν την παραγωγική διαδικασία τους, ενθαρρύνοντας τις έννοιες της βιώσιμης τεχνολογίας και της αειφόρου ανάπτυξης. Όλες οι ενεργοβόρες και ρυπογόνες τεχνολογίες πρέπει να αφήσουν χώρο σε νέες πράσινες τεχνολογίες παραγωγής (Biswas & Roy 2015). Αυτές οι στρατηγικές παραγωγής προωθούν την παραγωγή σε πιο αποτελεσματικές, με λιγότερες ενεργειακές απαιτήσεις, ευέλικτες πρακτικές (Van der Bruggen et al. 2004) και παρέχουν τη δυνατότητα μετατροπής αποβλήτων και παραπροϊόντων σε χρήσιμα, και τις περισσότερες φορές, υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντα (Pal & Nayak 2016).

Έχει εκτιμηθεί ότι κάθε χρόνο περίπου τριάντα εφτά εκατομμύρια κιλά ορού παράγονται μόνο από την Αμερική και τον Καναδά (Ghaly & Kamal 2004). Η χρήση της λακτόζης σε θεραπευτικά προϊόντα είναι περιορισμένη, διότι χαρακτηρίζεται από χαμηλή διαλυτότητα, χαμηλή γλυκαντική ικανότητα, και σε περιπτώσεις κατανάλωσης μεγάλων ποσοτήτων από επιδράσεις στην εντερική λειτουργία (Ferreira et al 2003). Η υδρόλυση της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη από το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση είναι μια σημαντική διεργασία για τη βιομηχανία τροφίμων, λόγω των δυνητικά ευεργετικών επιδράσεων των συστατικών που μπορούν να παραχθούν μέσω της αντίδρασης τρανσγλυκοζιλίωσης από το ίδιο ένζυμο. Τα πλεονεκτήματα από τεχνολογική και περιβαλλοντική άποψη είναι πολύ σημαντικά (Mariotti et al. 2008). Έτσι, σύμφωνα με τον Joe Laffin «η νέα προοπτική είναι με φυσικές μεθόδους

διαχωρισμού, τα συστατικά του ορού γάλακτος – νερό, λακτόζη και πρωτεΐνες – να απομονωθούν και να μετατραπούν σε αξιοποιήσιμα αγαθά, τα οποία μπορούν να πωληθούν ως συστατικά στην βιομηχανία τροφίμων» (Astley 2014).

Κεφάλαιο 1^ο

Ο ΟΡΟΣ ΤΟΥ ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ορός είναι το υγρό που απομένει μετά την πήξη του γάλακτος και την αποστράγγιση του σχηματιζόμενου πήγματος. Ο γλυκός ορός προκύπτει ως παραπροϊόν κατά την παρασκευή σκληρών τυριών, όπως το τυρί Cheddar, ενώ ο όξινος ορός αποτελεί παραπροϊόν της παρασκευής όξινων τύπων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το στραγγιστό γιαούρτι. Ο γλυκός ορός έχει τιμή pH μεγαλύτερη ή ίση με 5,6, σε αντίθεση με τον όξινο ορό που έχει τιμή pH το πολύ 5,1. Μια τυπική ανάλυση των δύο τύπων ορών παρουσιάζεται στον Πίνακα 1 (Elliot 2013).

Πίνακας 1. Συστατικά γλυκού ορού, όξινου ορού και αγελαδινού γάλατος

Συστατικά	Γλυκός Ορός	Όξινος Ορός	Γάλα
Συνολικά στερεά (%)	6,3	6,6	12,8
*Συνολική πρωτεΐνη (%)	0,75	0,75	3,5
Καζεΐνη	<0,05	<0,05	2,8
Πρωτεΐνες ορού	0,7	0,7	0,7
*Λίπη (%)	0,1	0,1	3,7
*Τέφρα (%)	0,5	0,8	0,7
*Λακτόζη (%)	4,9	4,9	4,9
pH	>5,6	<5,1	6,5-6,8
BOD ($mg\ O_2 \cdot L^{-1}$)	>30000	>35000	140000
COD ($mg\ O_2 \cdot L^{-1}$)	>60000	≈80000	218000
Ενέργεια ($kJ \cdot L^{-1}$)	≈1100	≈1100	≈1710

*Ποσοστά επί των συνολικών στερεών

Ο όξινος ορός είναι κύριο παραπροϊόν του στραγγιστού ή αλλιώς ελληνικού τύπου (Greek-style) γιαουρτιού. Είναι ένα λεπτό, ρευστό παραπροϊόν το οποίο δεν μπορεί να απορριφθεί απλά στο περιβάλλον, καθώς η αποσύνθεση του ορού είναι τοξική για το περιβάλλον και απαιτεί τεράστια ποσά οξυγόνου, η άμεση απόρριψή του στο περιβάλλον θα ήταν σε μεγάλη έκταση καταστροφική για την υδρόβια ζωή (Elliot 2013).

Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα, οι βιομηχανίες απέρριπταν τον ορό σε υδάτινους πόρους. Αυτή η μέθοδος «διαχείρισης» ήταν ανεκτή για ένα διάστημα, όμως οι απαιτήσεις του ορού σε Βιολογικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (Biochemical

Oxygen Demand-BOD) και Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand-COD), οι οποίες ξεπερνούν τα 35000 ppm και τα 60000 ppm αντίστοιχα, ώθησε την καθιέρωση αυστηρής περιβαλλοντικής νομοθεσίας, η οποία πλέον απαγορεύει τη διάθεση ανεπεξέργαστου ορού στο περιβάλλον (Mawson 1994). Το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο είναι η ποσότητα του οξυγόνου που απαιτείται για τη χημική οξείδωση των αποβλήτων. Το βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο είναι η ποσότητα του οξυγόνου που απαιτείται από μικροοργανισμούς προκειμένου να αποικοδομήσουν βιολογικά τα απόβλητα. Τα κύρια συστατικά του ορού που μπορούν να αποικοδομηθούν είναι η λακτόζη και η πρωτεΐνη και γι' αυτόν τον λόγο οι απαιτήσεις σε BOD και COD οφείλονται κυρίως στην υψηλή περιεκτικότητα του ορού σε λακτόζη και πρωτεΐνη. Όπως γίνεται κατανοητό, τα περιβαλλοντικά προβλήματα από την ανεπεξέργαστη απόθεση του ορού είναι έντονα και γι' αυτό πλέον υπάρχουν αυστηροί σχετικοί κανονισμοί. Όμως, έχει αρχίσει να αναδύεται μια νέα προοπτική σχετικά με τον ορό, η οποία σχετίζεται με την αξιοποίηση των συστατικών του, τα οποία έχουν αξιόλογες φυσικές, χημικές, θρεπτικές και βιολογικές ιδιότητες (Smithers 2015). Η αξιοποίηση των συστατικών σχετίζεται με την απομόνωση και τη χρήση τους ως συστατικά τροφίμων ή άλλων προϊόντων, αλλά και ως πρώτη ύλη για την παραγωγή άλλων αξιοποιήσιμων συστατικών, όπως είναι οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των προβιοτικών συστατικών (prebiotics). Αυτός ο τομέας αξιοποίησης είναι πολλά υποσχόμενος αλλά βρίσκεται ακόμα σε αρκετά πρώιμο στάδιο.

1.2 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΟΡΟΥ

Ο ορός είναι ένα πολυσύνθετο διάλυμα που περιλαμβάνει πολλά από τα ευδιάλυτα συστατικά του γάλακτος. Η ξηρή μάζα του ορού αποτελείται κυρίως από υδατάνθρακες (λακτόζη), πρωτεΐνες (διαφόρων χημικών συστάσεων πρωτεΐνες ορού), διάφορα άλατα και λίπη. Στον Πίνακα 2 φαίνονται τα συστατικά του όξινου και γλυκού ορού, ώστε να υπάρξει μια εκτίμηση της σύστασής τους, αλλά και της διαφοροποίησης του περιεχομένου τους.

Πέρα από τη σημαντικά χαμηλότερη τιμή pH και την υψηλότερη περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ, ο όξινος ορός παρουσιάζει και υψηλότερη περιεκτικότητα σε ασβέστιο και φωσφόρο, η οποία προκύπτει από τη διαλυτοποίηση του φωσφορικού ασβεστίου των καζεϊνικών μικυλλίων. Αντίθετα, στην περίπτωση του γλυκού ορού, η απομάκρυνση του ασβεστίου από τα καζεϊνικά μικύλλια δεν πραγματοποιείται κατά την πήξη σε τιμή pH 6 ή υψηλότερη, με αποτέλεσμα μεγάλο μέρος του ασβεστίου του γάλακτος να διατηρείται στο προϊόν και να μην παραλαμβάνεται στον γλυκό ορό. Οι διαφορές στην οξύτητα και την περιεκτικότητα ασβεστίου φαίνεται να είναι οι κύριοι λόγοι που διαφοροποιούν τους δύο τύπους ορού ως προς τις φυσικοχημικές τους

ιδιότητες. Στις επόμενες ενότητες αναλύονται τα βασικά συστατικά του όξινου ορού.

Πίνακας 2. Ανάλυση σύστασης όξινου και γλυκού ορού (Fischer & Kleinschmidt 2015)

Συστατικά	Γλυκός Ορός	Όξινος Ορός
Συνολικά σάκχαρα ($g \cdot L^{-1}$)	38,7 ± 0,75	39,1 ± 1,17
Γλυκόζη ($g \cdot L^{-1}$)	0,30 ± 0,02	Δεν ανιχνεύθηκε
Γαλακτόζη ($g \cdot L^{-1}$)	0,43 ± 0,05	1,10 ± 0,09
Λακτόζη ($g \cdot L^{-1}$)	38,0 ± 0,68	38,0 ± 1,08
Συνολική πρωτεΐνη ($g \cdot L^{-1}$)	5,56 ± 0,08	3,02 ± 0,03
Πρωτεΐνη ορού ($g \cdot L^{-1}$)	5,11 ± 0,07	2,42 ± 0,70
Καζεΐνη ($g \cdot L^{-1}$)	0,45 ± 0,09	0,60 ± 0,18
NPN ($g \cdot L^{-1}$)	0,71 ± 0,02	1,63 ± 0,05
Τέφρα ($g \cdot L^{-1}$)	4,33 ± 0,01	7,42 ± 0,01
Γαλακτικό οξύ ($g \cdot L^{-1}$)	0,50 ± 0,01	8,11 ± 0,08
Λίπη ($g \cdot L^{-1}$)	0,47 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Na ⁺ (mM)	16,5 ± 0,35	18,6 ± 0,25
NH ₄ ⁺ (mM)	2,41 ± 0,05	10,4 ± 0,25
K ⁺ (mM)	29,6 ± 0,95	45,2 ± 0,59
Mg ²⁺ (mM)	2,81 ± 0,09	4,90 ± 0,09
Ca ²⁺ (mM)	8,44 ± 0,22	25,5 ± 0,70
Cl ⁻ (mM)	21,5 ± 0,53	42,6 ± 0,56
NO ₃ ⁻ (mM)	0,81 ± 0,04	0,33 ± 0,02
PO ₄ ²⁻ (mM)	8,35 ± 0,19	17,6 ± 0,37
SO ₄ ²⁻ (mM)	1,14 ± 0,18	0,64 ± 0,02

Ποσότητες επί του συνόλου του ορού

1.2.1 ΛΑΚΤΟΖΗ

Η λακτόζη είναι το κύριο συστατικό του ορού με την περιεκτικότητά της να κυμαίνεται περίπου στο 4,0-4,9% κ.β. Η περιεκτικότητα του ορού σε λακτόζη εξαρτάται από τον τύπο του ορού. Ο όξινος όρος είναι χαμηλότερης περιεκτικότητας σε λακτόζη σε σχέση με το γλυκό ορό, λόγω των διαδικασιών ζύμωσης για την παρασκευή των προϊόντων από τα οποία προέρχεται αυτός ο τύπος ορού, αφού ένα μέρος της λακτόζης μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ. Αν και η λακτόζη είναι το συστατικό με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα στον ορό, το πιο χρήσιμο συστατικό του, μέχρι στιγμής φαίνεται να είναι οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος που αποτελεί περίπου το 0,7% w/v του ορού, και η περιεκτικότητα των οποίων δε φαίνεται να σχετίζεται με την προέλευση του ορού (όξινος ή γλυκός). Ωστόσο είναι ελπιδοφόρα η αξιοποίηση της λακτόζης προς παρασκευή συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας, αν και χρειάζονται ακόμα έρευνες προς

αυτή την κατεύθυνση, ιδιαίτερα όσον αφορά στον όξινο ορό που λόγω της χαμηλής τιμής pH του, η επεξεργασία του είναι πιο δύσκολη.

1.2.2 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κύριες ομάδες. Η μία περιλαμβάνει τη β-γαλακτογλοβουλίνη (β-lactoglobulin) και την α-γαλακτοαλβουμίνη (α-lactalbumin). Αυτές οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες στο pH του γλυκού ορού (6,2-6,4). Η άλλη ομάδα πρωτεϊνών αποτελείται από τη λακτοφερρίνη και τη λακτοπεροξειδάση και έχουν καθαρά θετικό φορτίο στο pH του γλυκού ορού (Chiu & Etzel 1997, Pearce 1992).

Οι πρωτεΐνες ορού είναι θερμοευαίσθητες και μπορούν να καθιζάνουν με θερμική επεξεργασία υπό κατάλληλες συνθήκες pH και ιοντικής ισχύος. Η ιδιότητα αυτή χρησιμοποιείται για την παραγωγή γαλακτοαλβουμίνης. Η γαλακτοαλβουμίνη παράγεται με θερμική καθίζηση των πρωτεϊνών του ορού και αποτελεί μίγμα μετουσιωμένων α-γαλακτοαλβουμίνης και β-γαλακτογλοβουλίνης (Chiu & Etzel 1997, Pearce 1992). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) αναφέρονται οι πρωτεΐνες που περιέχονται στον ορό του γάλακτος και κάποια φυσικά χαρακτηριστικά τους.

Πίνακας 3. Κύριες πρωτεΐνες ορού του γάλακτος και κάποια φυσικά χαρακτηριστικά τους (Bylund 1995)

Πρωτεΐνη	Συγκέντρωση (g/100 g)	Μοριακό Βάρος (g/mol)
β-γαλακτογλοβουλίνη	0,32	18,4
α-γαλακτοαλβουμίνη	0,12	14,2
Ανοσογλοβουλίνες	0,07	150-1000
Αλβουμίνη ορού	0,04	69
Λακτοφερρίνη	0,01	78

1.2.3 ΑΛΑΤΑ

Το τρίτο κύριο συστατικό της ξηρής μάζας του ορού αποτελούν τα άλατα. Η σύσταση του ορού σε άλατα, το pH και η περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ είναι τα σημεία στα οποία παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες διαφορές οι δύο τύποι ορού. Οι διαφορές των τιμών αυτών ανάμεσα στους δύο τύπους ορού σχετίζονται με τις διαδικασίες παρασκευής των προϊόντων. Σύμφωνα με τους Μανγορούλου και Kosikowski (1972) ο όξινος ορός έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε φωσφόρο,

ασβέστιο, ψευδάργυρο, σίδηρο, χαλκό. Σχετικά με τις περιεκτικότητες σε κάλιο, μαγνήσιο, νάτριο, μαγγάνιο και αλουμίνιο, η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο τύπων ορού δε φαίνεται να είναι σημαντική.

1.2.4 ΛΙΠΗ

Η περιεκτικότητα του ορού σε λιπαρή ύλη αμέσως μετά τον διαχωρισμό του ορού από το πήγμα του γιαουρτιού κυμαίνεται από 0,5-1,0% κ.β. ανάλογα με το είδος του γάλακτος και την αποδοτικότητα της διεργασίας. Ωστόσο συνήθως το λίπος ανακτάται κατά τη διεργασία της φυγοκέντρησης και πηγαίνει στη φάση του προϊόντος (τυρί ή γιαούρτι) ή αξιοποιείται. Έτσι, τυπικά η περιεκτικότητα του ορού σε λιπαρή ύλη είναι συνήθως μικρότερη του 0,1% κ.β.

1.3 ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΟΞΙΝΟΥ ΟΡΟΥ

Το γιαούρτι είναι ένα γαλακτοκομικό προϊόν, το οποίο συχνά μπορεί να υφίσταται προσθήκη συμβατικών σακχάρων, όπως η σακχαρόζη και η γλυκόζη, σε υψηλά επίπεδα. Για αυτό το λόγο, οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις των αποβλήτων γιαουρτιού είναι μεγαλύτερες από αυτές που προκύπτουν από το τυρόγαλα. Η ρύπανση που προκαλούν οφείλεται κυρίως στην καθίζηση φωσφορικού ασβεστίου, στη χαμηλή τιμή pH του, στη δυσκολία που δημιουργείται για κάποιες πρωτεΐνες του ορού να διαλυθούν στο νερό, καθώς και στην παρουσία αλάτων (Konrad et al. 2012).

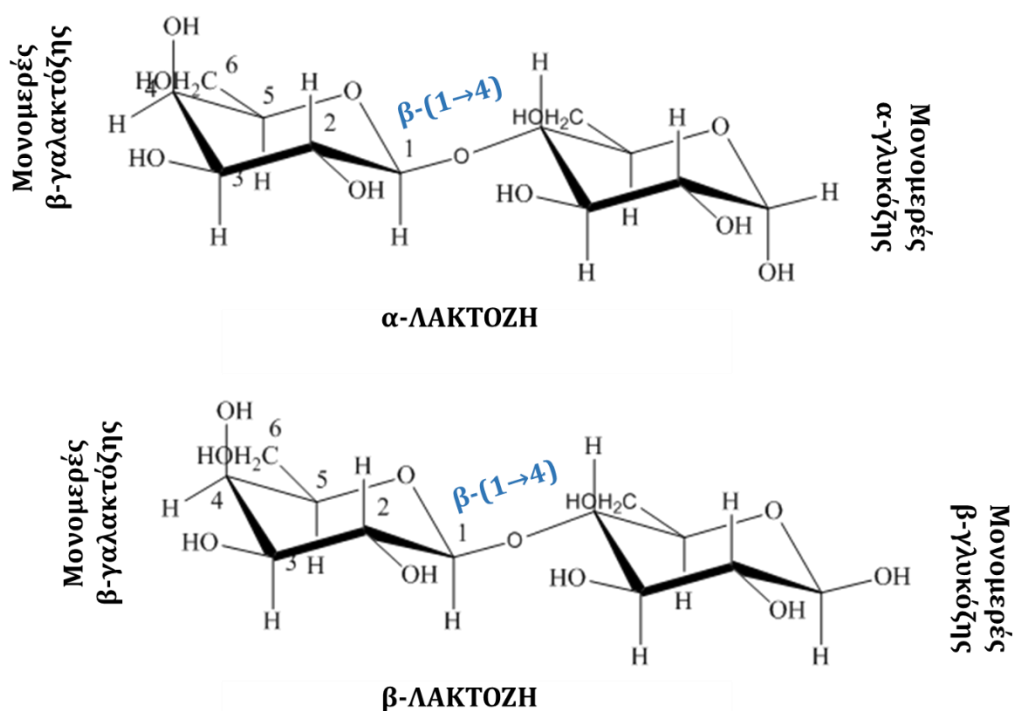
Το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό αυτού του υπολείμματος είναι η υψηλή του περιεκτικότητα σε ζυμώσιμα σάκχαρα, όπως η λακτόζη. Κατά συνέπεια, μια από τις πιθανές αξιοποιήσεις του θα ήταν η χρήση της λακτόζης ως αρχικό συστατικό για την παραγωγή άλλων συστατικών ύστερα από ζύμωση. Η αξιοποίησή του έχει ως κύριο στόχο τη μείωση των αποβλήτων και επομένως τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων από την απόρριψή του. Κάτι τέτοιο θα συνέβαλε σημαντικά στην αειφόρο ανάπτυξη των βιομηχανιών τροφίμων και κυρίως των βιομηχανιών γιαουρτιού, οι οποίες τώρα αντιμετωπίζουν ένα σημαντικό πρόβλημα με τον ορό που παράγουν και τη διαχείρισή του. Ωστόσο, η βιομηχανική αξιοποίηση του όξινου ορού γάλακτος από υπολείμματα γιαουρτιού βρίσκεται σε πολύ πρώιμο στάδιο και χρειάζεται ακόμα έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση (Alonso et al. 2010).

Κεφάλαιο 2^ο

Η ΛΑΚΤΟΖΗ

2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΛΑΚΤΟΖΗ

Η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο γλυκόζης. Τα μονομερή της γλυκόζης και της γαλακτόζης στο μόριο της λακτόζης βρίσκονται ενωμένα με β -(1 \rightarrow 4) γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ του 1-C της γαλακτόζης και του 4-C της γλυκόζης. Η συστηματική ονομασία της γλυκόζης είναι β -D-γαλακτοπυρανοζυλο-(1 \rightarrow 4)-γλυκόζη. Το μόριο της γλυκόζης μπορεί να έχει την μορφή είτε α -πυρανόζης είτε β -πυρανόζης, ενώ η γαλακτόζη απαντάται μόνο στη μορφή της β -πυρανόζης. Υπάρχουν έτσι δύο ονομασίες της λακτόζης, η α - και η β - λακτόζη (Εικόνα 1). Στην ουσία, οι ονομασίες αυτές προκύπτουν από τις ανωμερείς μορφές του δακτυλίου της γλυκοπυρανόζης.



Εικόνα 1. Μορφές α - και β - λακτόζης

Η λακτόζη παράγεται μόνο ως μέρος του γάλακτος των θηλαστικών και ως υδατάνθρακας αποθήκευσης στους σπόρους ορισμένων φυτών.

Η λακτόζη, ως αναγωγικό σάκχαρο, συμμετέχει στην αντίδραση Maillard κι έτσι παίζει ρόλο στη διαμόρφωση της γεύσης και του χρώματος των

γαλακτοκομικών προϊόντων που υφίστανται θερμική επεξεργασία. Επίσης, είναι πηγή ενέργειας για τον ανθρώπινο οργανισμό, αφού πρώτα διασπαστεί σε γλυκόζη και γαλακτόζη από το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση (λακτάση) του πεπτικού συστήματος. Ενισχύει την απορρόφηση ορισμένων μεταλλικών στοιχείων (π.χ. Ca, Mg, Fe, Co, Zn) από την μεμβράνη του εντέρου, ιδιότητα την οποία δεν έχουν οι μονοσακχαρίτες και οι δισακχαρίτες που υδρολύονται πριν φθάσουν στο λεπτό έντερο.

Η ανεπάρκεια του πεπτικού συστήματος ορισμένων ατόμων σε β-γαλακτοζιδάση οδηγεί στο πρόβλημα της δυσανεξίας της λακτόζης. Πολύ σοβαρότερο γενετικό ελάττωμα που σχετίζεται με το μεταβολισμό της λακτόζης αποτελεί η γαλακτοζαιμία. Η γαλακτοζαιμία οφείλεται στην αδυναμία μεταβολισμού της λακτόζης λόγω διαταραχών ενός εκ των τριών ενζύμων, που ενέχονται στην αντίδραση αυτή. Η πιο συχνή μορφή γαλακτοζαιμίας οφείλεται στην ανεπάρκεια του ενζύμου ουριδυλοτρανσφεράση της 1-φωσφορικής γαλακτόζης. Τα υπόλοιπα δύο ένζυμα είναι η επιμεράση και η γαλακτοκινάση της γαλακτόζης. Η διάγνωση της γαλακτοζαιμίας πραγματοποιείται είτε μέσω της αυξημένης συγκέντρωσης γαλακτόζης και 1-φωσφορικής-γαλακτόζης είτε μέσω της μέτρησης της δραστικότητας του ενεχόμενου ενζύμου σε αποξηραμένες σταγόνες αίματος (κλασσική γαλακτοζαιμία). Η πάθηση αυτή προκαλεί καταρράκτη, νοητική υστέρηση, προβλήματα στείρωσης στα κορίτσια και ακόμη θάνατο από σηψαιμία, εάν δεν διαγνωσθεί τις πρώτες ημέρες ζωής. Η συχνότητά της ποικίλλει από 1:15.000–50.000 και κληρονομείται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο. Η αντιμετώπιση έγκειται στην εφ' όρου ζωής αποφυγή λήψης γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων.

Παρά το γεγονός ότι η α-λακτόζη και η β-λακτόζη διαφέρουν μόνο ως προς το ανωμερές της γλυκόζης και όχι ως προς τον δεσμό των μονομερών, οι διαφορετικές μορφές της λακτόζης παρουσιάζουν και διαφορετικές φυσικές ιδιότητες, κάποιες από τις οποίες αναγράφονται στον Πίνακα 4, που τις καθιστούν αξιοποιήσιμες σε διαφορετικές εφαρμογές.

Πίνακας 4. Φυσικές ιδιότητες α- και β-λακτόζης

	α- λακτόζη	β- λακτόζη
Μοριακό Βάρος (Da)	360,3	342,3
Σημείο τήξης (°C)	202	252
Πυκνότητα (g·mL ⁻¹)	1,545	1,590
Ειδική στροφική ικανότητα (α ²⁰ ₅₈₉)	+91,1	+33,5
Θερμότητα διαλυτοποίησης (J·g ⁻¹)	-50,2	-9,62
Διαλυτότητα σε νερό στους 20°C (g/100 mL)	7,40	50,0

Η α- μορφή της λακτόζης συνήθως βρίσκεται συνδεδεμένη με ένα μόριο νερού. Σε θερμοκρασίες άνω των 120°C το μόριο του νερού αποσπάται και έτσι το μόριο της λακτόζης παίρνει την άνυδρη μορφή του. Όταν η λακτόζη βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα λαμβάνει χώρα το φαινόμενο του πολυστροφισμού και έτσι υπάρχουν στο διάλυμα και οι δύο ανωμερείς μορφές της λακτόζης. Χαρακτηριστικό είναι ότι στους 20°C ένα διάλυμα λακτόζης ισορροπεί έχοντας ποσοστό β-λακτόζης 62,7% (Kellam 1998).

Ο σχηματισμός κρυστάλλων και η κρυσταλλική ανάπτυξη είναι κρίσιμης σημασίας για την εξαγωγή και τον καθαρισμό της λακτόζης. Η λακτόζη κρυσταλλώνεται προς ποικίλες μορφές και ανάλογα με την κρυσταλλική της μορφή έχει άλλες φυσικές ιδιότητες. Η α- μορφή της λακτόζης κρυσταλλώνεται μέσω υπέρκορων διαλυμάτων σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 93,5°C και παράγει μη υγροσκοπικής μορφής κρυστάλλους. Με θέρμανση πάνω από 100°C και σε κενό, άνυδρης μορφής κρύσταλλοι προκύπτουν από μόρια α-λακτόζης συνδεδεμένα με ένα μόριο νερού το καθένα, ενώ σε ατμοσφαιρική πίεση σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 93,5°C κρυσταλλώνεται η β-λακτόζη. Η κρυσταλλική μορφή των μορίων της λακτόζης επηρεάζει την διαλυτότητά της. Έτσι, η β-λακτόζη διαλυτοποιείται εύκολα με ανάμιξη, ενώ είναι λιγότερο διαλυτή σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 93,5°C (Harper 1992, Zadow 1992). Η διαλυτότητα της λακτόζης είναι μια ιδιότητα που επηρεάζει τη χρήση της σε εφαρμογές σε τρόφιμα ή και σε άλλους τομείς, με τη β-λακτόζη να κυριαρχεί σε εφαρμογές σε προϊόντα που απαιτούν τη γρήγορη διαλυτοποίηση της λακτόζης (Yang & Silva 1995).

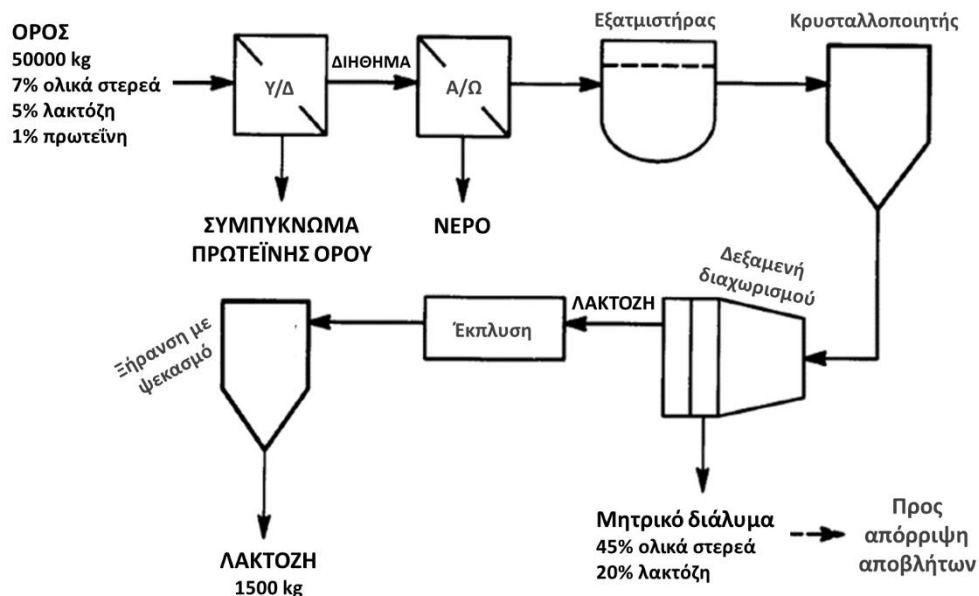
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ ΑΠΟ ΟΡΟ

Υπάρχουν τρεις μέθοδοι για την παραγωγή λακτόζης από ορό. Η πιο κοινή μέθοδος είναι η κρυστάλλωση από ένα υπέρκορο διάλυμα, αλλά αυτή η μέθοδος είναι οικονομικά εφικτή μόνο για μεγάλης κλίμακας παραγωγή (Harper 1992).

Η καταβύθιση της λακτόζης με μεταλλικές αλκαλικές γαίες που σχηματίζουν σύμπλοκα με τα σάκχαρα, γνωστή ως μέθοδος Steffan, είναι επίσης μια μέθοδος παραγωγής λακτόζης από ορό. Αλκοόλες ή άλλοι διαλύτες που μειώνουν την διαλυτότητα της λακτόζης μπορούν επίσης να αξιοποιηθούν στην κρυστάλλωση της λακτόζης, αλλά αυτή είναι μια μη χρησιμοποιήσιμη μέχρι στιγμής μέθοδος.

Στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα ροής διαχείρισης του ορού σε βιομηχανική κλίμακα με τη μέθοδο της κρυστάλλωσης. Αρχικά απομακρύνονται οι πρωτεΐνες ορού με υπερδιήθηση. Σε μερικές διεργασίες, αντίστροφη ώσμωση λαμβάνει μέρος για την αύξηση της περιεκτικότητας του ορού σε στερεά σε ποσοστό 12-15%.

Η ανάκτηση όλου του ποσοστού της λακτόζης που περιέχεται στον ορό μέσω της κρυστάλλωσης δεν είναι οικονομικά βιώσιμη. Ένα ποσοστό της τάξης 20-40% του αρχικού ποσοστού της λακτόζης παραμένει στο αρχικό διάλυμα με τα άλατα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των οποίων, δεν αξιοποιείται βιομηχανικά.

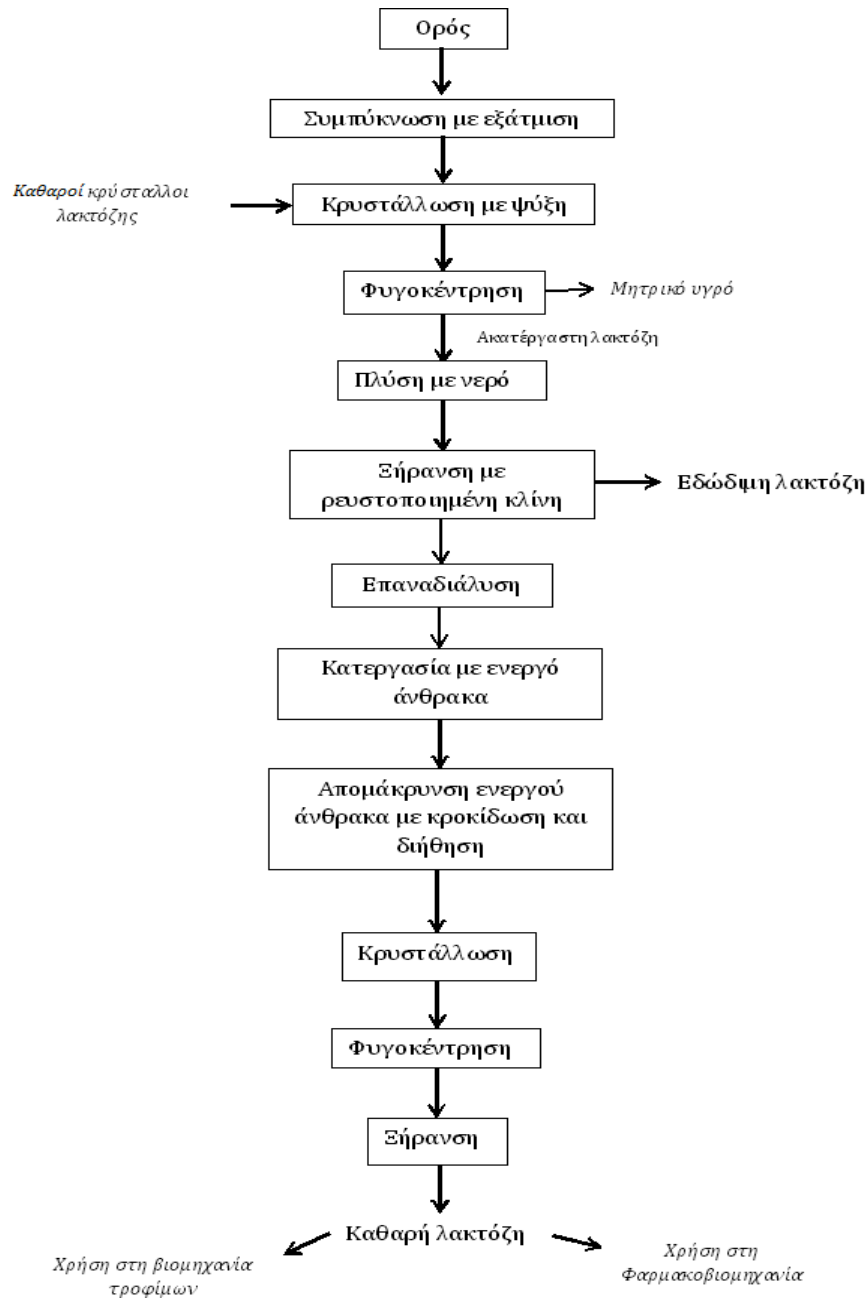


Εικόνα 2. Διάγραμμα διαχείρισης ορού σε βιομηχανική κλίμακα (όπου Υ/Δ: υπερδιήθηση, Α/Ω: αντίστροφη ώσμωση)

Μια εναλλακτική τεχνολογία είναι ο διαχωρισμός των αλάτων και της λακτόζης στον ορό μέσω νανοδιήθησης. Το ρεύμα που περιλαμβάνει τη λακτόζη μετά τη νανοδιήθηση υφίσταται περαιτέρω καθαρισμό με ηλεκτροδιάλυση και ιοντοεναλλαγή προτού ξηραθεί με ψεκασμό. Αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελάχιστων αποβλήτων (Yang & Silva 1995).

Λακτόζη παράγεται βιομηχανικά στη Νέα Ζηλανδία, από την εταιρεία Lactose Company of New Zealand Ltd. Στην Εικόνα 3 φαίνεται το διάγραμμα ροής που ακολουθεί αυτή η εταιρεία για την παραγωγή λακτόζης από ορό. Αναφέρεται ότι ο ορός προλαμβάνεται προ-συμπυκνωμένος με περιεκτικότητα σε στερεά 12-50%. Ακολουθεί συμπύκνωση με εξάτμιση για τελική περιεκτικότητα σε ολικά στερεά περίπου 65%, ώστε το ποσοστό της λακτόζης να είναι αρκετό για να πραγματοποιηθεί κρυστάλλωση της λακτόζης με ψύξη. Η κρυστάλλωση συνήθως επιταχύνεται με προσθήκη καθαρών κρυστάλλων λακτόζης. Αυτή η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει πολλές μέρες μέχρι να ολοκληρωθεί. Κατόπιν, οι «κρύσταλλοι» εξάγονται από το μητρικό υγρό με φυγοκέντρηση. Σε αυτό το στάδιο παραλαμβάνεται ακατέργαστη λακτόζη, η οποία έχει ένα κρεμμώδες κίτρινο χρώμα λόγω της παρουσίας ριβοφλαβίνης. Αυτοί οι κρύσταλλοι πλένονται, ανακτώνται με φυγοκέντρηση και ξηραίνονται σε ξηραντήρα

ρευστοποιημένης κλίνης για να παραχθεί λακτόζη σε τέτοιο βαθμό ώστε να μπορεί να θεωρηθεί εδώδιμη.



Εικόνα 3. Διάγραμμα παραγωγής λακτόζης σε βιομηχανική κλίμακα στη Νέα Ζηλανδία

Για να παραχθεί λακτόζη με τέτοια καθαρότητα που να μπορεί να αξιοποιηθεί για φαρμακευτικούς σκοπούς είναι απαραίτητος περαιτέρω εξευγενισμός, ο οποίος πραγματοποιείται με επαναδιάλυση των κρυστάλλων της λακτόζης και κατεργασία του διαλύματος με καθαρό ενεργό άνθρακα, ο οποίος απορροφά έναν αριθμό διαλυμένων ουσιών όπως είναι η ριβοφλαβίνη και μια ποικιλία πρωτεϊνών. Ο άνθρακας απομακρύνεται με κροκίδωση και διήθηση. Μετά την κρυστάλλωση ακολουθεί διαχωρισμός των κρυστάλλων με φυγοκέντρωση και

ξήρανση. Υψηλής καθαρότητας λακτόζη έχει παραχθεί. Οι κρύσταλλοι αλέθονται ή κοσκινίζονται με σκοπό να έχουν τελική μορφή συγκεκριμένου μεγέθους (Kellam 1998).

2.3 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ-ΔΥΣΑΝΕΞΙΑ ΣΤΗ ΛΑΚΤΟΖΗ

Η λακτόζη εμφανίζει κάποια μειονεκτήματα όταν χρησιμοποιείται στα τρόφιμα. Σχετικά με άλλα σάκχαρα είναι λιγότερο διαλυτή (Harper 1992), κάτι που οδηγεί στην τάση της να κρυσταλλώνεται σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις προσδίδοντας μια όχι και τόσο ευχάριστη αίσθηση υφής.

Επιπρόσθετα, η λακτόζη δεν είναι εύπεπτη, καθώς πρέπει να υδρολύεται στα μονομερή της προτού φτάσει στο λεπτό έντερο. Αυτό πραγματοποιείται, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μέσω ενζυμικής αντίδρασης από μία ομάδα ενζύμων που ονομάζεται β-γαλακτοζιδάσες. Τα άτομα που έχουν έλλειψη στο ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης, εμφανίζουν δυσανεξία στη λακτόζη. Ως δυσανεκτικά χαρακτηρίζονται τα άτομα που είναι ανίκανα να πέψουν 10-50 g καθαρής λακτόζης και εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα όπως διάρροια, πρήξιμο κ.ά., μετά από κατανάλωση σχετικά μικρών ποσοτήτων λακτόζης. Η συχνότητα εμφάνισης της πάθησης είναι κρίσιμης σημασίας τόσο για την βιομηχανία τροφίμων όσο και για αυτή των φαρμάκων, καθώς θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την κατανάλωση τροφίμων ή φαρμακευτικών προϊόντων που περιέχουν λακτόζη στα συστατικά τους (Zadow 1992).

2.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ

Η λακτόζη χρησιμοποιείται σε μικρές ποσότητες για να αναστείλει την κρυστάλλωση άλλων σακχάρων, όπως είναι η σακχαρόζη, γεγονός που έχει οδηγήσει στην ευρεία χρήση της στη ζαχαροπλαστική (Zadow 1992). Η λακτόζη βρίσκει επίσης εφαρμογή και στον τομέα της φαρμακευτικής ως πληρωτικό ή επικαλυπτικό υλικό ή και ως φορέας άλλων φαρμακευτικών ουσιών.

Η λακτόζη έχει χρησιμοποιηθεί παλαιότερα και ως πηγή άνθρακα ή ενέργειας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της πενικιλίνης τα πρώτα χρόνια της βιομηχανικής παραγωγής της. Πιο συγκεκριμένα, το 1940 το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στη μαζική παραγωγή πενικιλίνης, λόγω της ανάγκης για θεραπεία των τραυματιών του 2^{ου} Παγκοσμίου πολέμου. Στις ΗΠΑ, οι ερευνητές των φαρμακευτικών βιομηχανιών αντικατέστησαν την τεχνική που υπήρχε για την ανάπτυξη του μύκητα *Penicillium chrysogenum*, δηλαδή στην επιφάνεια θρεπτικού υγρού σε επίπεδες φιάλες (παλαιότερα γνωστού και ως *Penicillium notatum*), με την κατά πολύ αποδοτικότερη τεχνική της «βυθισμένης καλλιέργειας» (submerged culture), όπου ο μύκητας αναπτυσσόταν σε θρεπτικό διάλυμα σε μεγάλες δεξαμενές (ζυμωτήρες) υπό

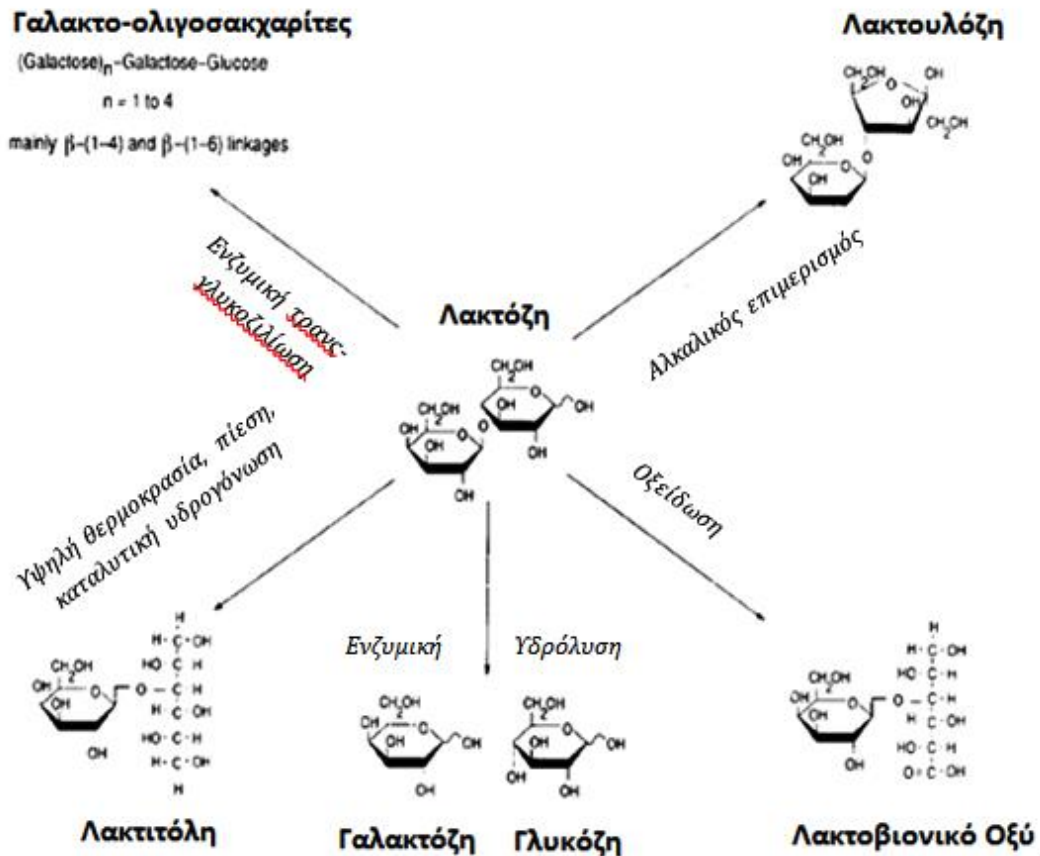
σταθερή ανάδευση και με συνεχή διαβίβαση αέρα. Έτσι, η ελάχιστη αποδοτική τεχνική των «δύο διαστάσεων» της ομάδας της Οξφόρδης, αντικαταστάθηκε από την τεχνική των «τριών διαστάσεων», δηλ. σε όλη τη μάζα του θρεπτικού υγρού. Μεγάλες αποδόσεις ακόμη παρατηρήθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υλικό ένα υγρό παραπροϊόν της υγρής άλεσης του καλαμποκιού για την παραγωγή καλαμποκάλευρου (corn steep liquor) πλούσιο σε υδατάνθρακες, οργανικό άζωτο, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Η προσθήκη λακτόζης στο υγρό αυτό αύξησε (διπλασίασε) ακόμη περισσότερο την απόδοση.

Μια από τις καινοτόμες εφαρμογές είναι η χρήση της λακτόζης για την παραγωγή συστατικών χρήσιμων για φαρμακευτικές και διατροφικές εφαρμογές, όπως αυτά απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4, Yang & Silva 1995). Μεγάλες ποσότητες μη καθαρής λακτόζης υπάρχουν στον ορό, αλλά η αξιοποίησή τους εξαρτάται από τη συνολική σύσταση του ορού. Από αυτά τα παράγωγα η συγκεκριμένη εργασία θα επικεντρωθεί στους γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Ωστόσο σε αυτό το σημείο θα γίνει μια σύντομη αναφορά σε όλα τα παράγωγα.

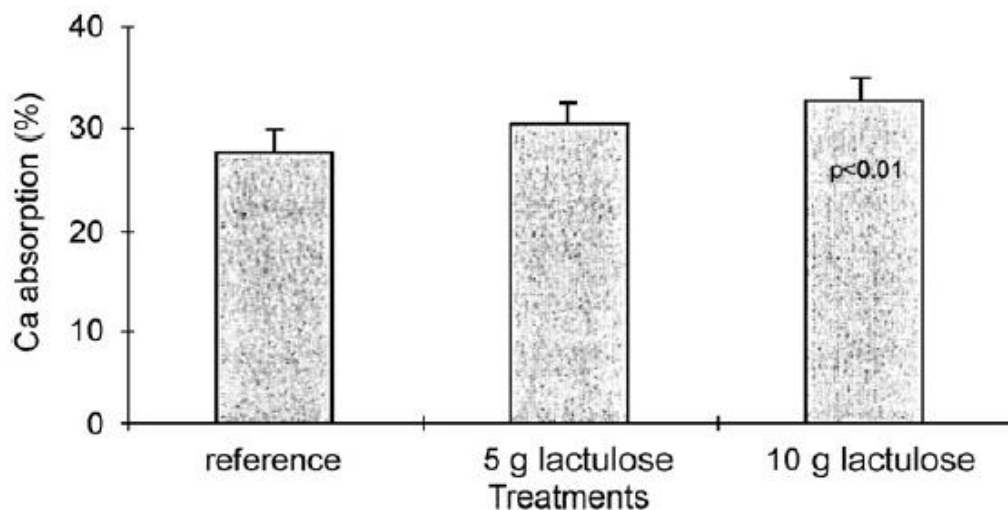
2.4.1 ΛΑΚΤΟΥΛΟΖΗ ΚΑΙ ΛΑΚΤΙΤΟΛΗ

Η λακτουλόζη (β -D-galactosyl-D-fructose) και η λακτιτόλη (β -D-galactosyl-sorbitol) είναι συνθετικά παράγωγα της λακτόζης και χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση ασθενειών που σχετίζονται με την ηπατική εγκεφαλοπάθεια (εγκεφαλική δηλητηρίαση από αδυναμία του ήπατος να μετατρέψει την αμμωνία σε ουρία) και σε ασθενείς με χρόνια προβλήματα δυσκοιλιότητας. Τόσο η λακτουλόζη όσο και η λακτιτόλη δεν διασπώνται στο λεπτό έντερο και αποτελούν τροφή για τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου, καθώς λόγω των προβιοτικών ιδιοτήτων τους, μειώνουν την παραγωγή αμμωνίας από τη μικροχλωρίδα του εντέρου. Επιπλέον, όπως και όλοι οι δύσπεπτοι υδατάνθρακες, η λακτουλόζη και η λακτιτόλη ενισχύουν την απορρόφηση του μαγνησίου και του ασβεστίου. Σύμφωνα με τους Van den Heuvel et al. (1999) η απορρόφηση ασβεστίου παρουσιάζει μια αυξητική τάση με αύξηση κατανάλωσης λακτουλόζης στις γυναίκες που έχουν περάσει το στάδιο της εμμηνόπαυσης. Τα αποτελέσματα αυτά παρατηρήθηκαν μετά από κατανάλωση 5 και 10 g λακτουλόζης, και απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5).

Τέλος, η λακτουλόζη και η λακτιτόλη παρά το γεγονός ότι είναι γλυκαντικές ουσίες, δεν προκαλούν τερηδόνα, γεγονός που τις καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικές για εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα προϊόντων τροφίμων, όπως στις τσίχλες, τη ζαχαροπλαστική και τα παγωτά. Ωστόσο, η υπερκατανάλωσή τους μπορεί να προκαλέσει γαστρεντερικές δυσλειτουργίες παρόμοιες με αυτές που εμφανίζουν τα άτομα που πάσχουν από δυσανεξία στη λακτόζη (Schaafsma 2008).



Εικόνα 4. Η λακτόζη και τα παράγωγά της (Yang & Silva 1995)



Εικόνα 5. Διάγραμμα συσχέτισης απορρόφησης ασβεστίου-κατανάλωσης λακτουλόζης σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση

2.4.2 ΓΑΛΑΚΤΟ-ΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ (Galacto-oligo-saccharides, GOS)

Οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες παράγονται από τη λακτόζη με την δράση μιας γαλακτο-συλο-τρανσφεράσης. Αυτού του είδους οι ολιγοσακχαρίτες είναι

ανθεκτικοί στα ένζυμα του πεπτικού συστήματος και δρουν ως προβιοτικά. Τα GOS χρησιμοποιούνται κυρίως ως συστατικά για την ανάπτυξη βακτηρίων του εντέρου σε βρεφικά προϊόντα, αν και η εφαρμογή τους σε μια ποικιλία τροφίμων, όλο και αυξάνεται. Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες έχουν ελαφρώς γλυκιά γεύση και χαμηλό θερμιδικό φορτίο. Ύστερα από μελέτη σχετικά με τα επίπεδα ανεκτικότητας νεαρών ενήλικων ατόμων αρσενικού φύλου σε GOS βρέθηκε ότι ημερήσια κατανάλωση 15 g αυτών από ενήλικα άτομα δεν παρουσιάζει σοβαρού είδους παρενέργειες (Schaafsma 2008). Περισσότερα σχετικά με τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες αναφέρονται στο Κεφάλαιο 4.

2.4.3 ΛΑΚΤΟΒΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ

Το λακτοβιονικό οξύ (β -D-galactosyl-gluconic acid) παράγεται με οξείδωση της λακτόζης. Το λακτοβιονικό οξύ είναι μια ένωση που ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα και έτσι δεν εφαρμόζεται ακόμα στην ευρωπαϊκή αγορά τροφίμων. Το οξύ συνδυάζει τη γλυκιά γεύση με τις ιδιότητες της χαμηλής τιμής pH. Χαρακτηρίζεται επίσης από συμπλοκοποίηση με ανόργανες ουσίες, γεγονός που το καθιστά κατάλληλο για συστατικό τροφίμων. Είναι ανθεκτικό στα ένζυμα του πεπτικού συστήματος και αποικοδομείται από την εντερική μικροχλωρίδα και θεωρείται ότι μπορεί να παρουσιάζει προβιοτικές ιδιότητες. Εκτός από τα παραπάνω βρέθηκε ότι έρχεται σε ανταγωνισμό με τη λακτόζη ως προς το ποια από τις δύο ουσίες θα αποτελέσει υπόστρωμα για την β -γαλακτοζιδάση του εντερικού συστήματος. Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία τροφίμων, το λακτοβιονικό οξύ θα αποτελέσει ένα καινοτόμο τρόφιμο. Ωστόσο θα πρέπει πρώτα να επιβεβαιωθεί η ασφάλειά του πριν διατεθεί στο εμπόριο (Schaafsma 2008).

2.4.4 ΤΑΓΚΑΤΟΖΗ

Η ταγκατόζη αποτελεί και αυτή μια νέα ένωση. Μόλις το 2005 εγκρίθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως συστατικό τροφίμων, όμως για οικονομικούς λόγους η παραγωγή της δεν ξεκίνησε πριν τον Απρίλιο του 2006. Περίπου το 80% της ταγκατόζης που καταναλώνεται διέρχεται αμετάβλητη στο παχύ έντερο, όπου ασκεί προβιοτική δράση. Οι προβιοτικές ιδιότητες της ταγκατόζης αφορούν στην παραγωγή βουτυρικού οξέος και την ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων, και σε συνδυασμό με το ότι αποτελεί γλυκαντικό συστατικό με χαμηλό θερμιδικό δείκτη (περίπου 2 kcal/g) ενισχύεται η εφαρμογή της σε μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων, όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα προϊόντα ζαχαροπλαστικής και αρτοποιίας, και τα συμπληρώματα διατροφής (Schaafsma 2008).

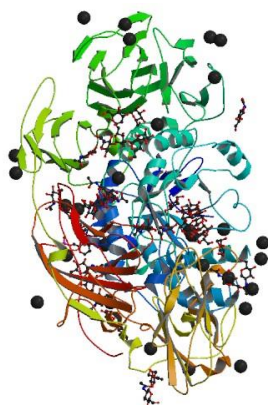
Η ταγκατόζη είναι ένας σπάνιος μονοσακχαρίτης, που αποτελείται από τον ίδιο τύπο εξόζης με τη γλυκόζη, τη γαλακτόζη και τη φρουκτόζη, αλλά διαφέρουν

Κεφάλαιο 3^ο

ΤΟ ENZYMO ΤΗΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η β-γαλακτοζιδάση (Εικόνα 7) είναι ένα εμπορικό ένζυμο που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων χαμηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη (Guerreri et al. 2015).



Εικόνα 7. Το μόριο της β-γαλακτοζιδάσης

Η β-γαλακτοζιδάση (EC 3.2.1.23) είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο. Ονομάζεται και λακτάση επειδή καταλύει το δισακχαρίτη λακτόζη. Η β-γαλακτοζιδάση καταλύει την υδρόλυση της χαρακτηριστικής γαλατο-σουλ-ομάδας στο μη αναγωγικό άκρο διάφορων ολιγοσακχαριτών. Επιπλέον, καταλύει αντιδράσεις τρανσγλυκοζιλίωσης, στις οποίες το μόριο της γαλακτόζης μεταφέρεται σε έναν πυρηνόφιλο δέκτη αντί για την πρόσδεση του μορίου σε ένα μόριο νερού. Θεωρητικά, κατά την τρανσγλυκοζιλίωση, οποιοδήποτε σάκχαρο είναι παρόν στο μέσο της αντίδρασης μπορεί να αποτελέσει μόριο δέκτη. Έτσι, είναι δυνατός ο σχηματισμός πολλών διαφορετικών ολιγοσακχαριτών (Urrutia et al. 2013).

3.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ

Το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση που προέρχεται από μύκητες είναι πολύ σταθερό και δεν απαιτεί μεταλλικά ιόντα για την ενεργοποίησή της δραστηριότητάς του. Το κόστος του ενζύμου εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο θα παραχθεί, καθώς και τον βαθμό καθαρότητάς του. Η επιλογή ενός οικονομικού υποστρώματος, το οποίο θα βελτιστοποιεί την παραγωγή του ενζύμου εντός του μικροοργανισμού, καθώς και η επιλογή των βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης του μικροοργανισμού είναι σημαντικής σημασίας για την μείωση του κόστους και την ευκολία παρασκευής του ενζύμου. Η μέθοδος της Ζύμωσης Στερεάς Κατάστασης (Solid-State Fermentation, SSF) έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με πιο συμβατικές

μεθόδους παρασκευής, όπως είναι η βυθισμένη ζύμωση (submerged fermentation) (Nizamuddin et al. 2008).

Η ζύμωση στερεάς κατάστασης ορίζεται ως η ανάπτυξη μικροοργανισμών σε αδιάλυτα στο νερό υποστρώματα, απουσία ελεύθερου νερού. Καθώς αυξάνεται η ποσότητα του ελεύθερου νερού, υπάρχει σταδιακή μετατόπιση από την SSF στη «λασπώδη» ζύμωση ημιστερεάς κατάστασης, και τέλος στη ζύμωση υγρής καλλιέργειας. Η περιεκτικότητα του νερού στις SSF ζυμώσεις κυμαίνεται μεταξύ 10-85%, ενώ στην υγρή καλλιέργεια αποτελεί το 90-99% της συνολικής μάζας. Οι μύκητες είναι αυτοί που παρουσιάζουν την μεγαλύτερη ικανότητα προσαρμογής σε περιβάλλον SSF, απαιτούν μικρότερες ενεργότητες νερού, χαμηλή τιμή pH και παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα και σπόρια. Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν για τη στερεοποίηση του υποστρώματος γιατί αυτά παρέχουν στους μικροοργανισμούς τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, ενώ μπορεί να παρέχουν και συστατικά που αναστέλλουν την μικροβιακή ανάπτυξη.

Το επόμενο στάδιο μετά τη ζύμωση είναι η ανάκτηση του προϊόντος, που στην προκειμένη περίπτωση είναι το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης. Τα κύρια στάδια ανάκτησης των προϊόντων είναι κατά σειρά εφαρμογής ο διαχωρισμός των κυττάρων και των στερεών σωματιδίων, η απομόνωση, ο καθαρισμός και η μορφοποίηση του προϊόντος, και τέλος η διαχείριση των αποβλήτων. Οι τρόποι ανάκτησης του ενζύμου περιλαμβάνουν:

- άμεση χρήση των νωπών σωματιδίων πάνω στα οποία έχει αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός,
- ξήρανση των στερεών σε υγρασία κάτω από 8% και μετατροπή τους σε σκόνη,
- εκχύλιση του ενζύμου με τη χρησιμοποίηση του κατάλληλου διαλύτη, και
- καταβύθιση και μερικός καθαρισμός του ενζύμου, μετά την εκχύλιση (Καλογεράκης 1999).

Αν και οι περισσότερες έρευνες έχουν γίνει σε β-γαλακτοζιδάση με πηγή προέλευσης το μικροοργανισμό *Escherichia coli*, πιθανοί τοξικοί παράγοντες που σχετίζονται με κολοβακτηρίδια, καθιστούν αδύνατη τη χρήση του ενζύμου από αυτόν τον μικροοργανισμό σε διεργασίες που σχετίζονται με τα τρόφιμα. Τη μεγαλύτερη εμπορική σημασία έχουν οι β-γαλακτοζιδάσες που προέρχονται από ζυμομύκητες (κυρίως από *Kluyvermyces lactis* και *Kluyvermyces fragilis*) και από μύκητες (κυρίως από *Aspergillus niger* και *Aspergillus oryzae*)

Ως προέλευση του ενζύμου, ο μικροοργανισμός *A. oryzae* αποτελεί μια ευρέως αποδεκτή πηγή, καθώς εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μικροβιακές πηγές, κυρίως λόγω του ότι έχει αποδειχθεί ότι ο μικροοργανισμός αυτός ως γενικώς ασφαλής (GRAS), και παράλληλα η παραγωγή του ενζύμου πραγματοποιείται εξωκυτταρικά (Πίνακας 5, Mlichova & Rosenberg 2006).

Πίνακας 5. Παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης από διαφορετικούς μικροοργανισμούς

	Μικροοργανισμός	Παραγωγή ενζύμου
Μύκητες	<i>Aspergillus niger</i> <i>Asperigullus oryzae</i>	Εξωκυτταρικά
Ζυμομύκητες	<i>Kluyvermyces lactis</i> <i>Kluyvermyces fragilis</i>	Ενδοκυτταρικά
Βακτήρια	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Leuconostoc citrovorum</i> <i>Bacillus circulans</i>	Ενδοκυτταρικά

Σε διεργασίες βιομηχανικού ενδιαφέροντος, δύο είναι οι τύποι β-γαλακτοζιδάσης που έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, ο τύπος της θερμοσταθερής β-γαλακτοζιδάσης και ο τύπος της ψυχρά ενεργής. Η χρήση αυτών των τύπων παρέχουν μια σειρά από πλεονεκτήματα. Η θερμοσταθερή β-γαλακτοζιδάση χρησιμοποιείται σε εφαρμογές σε υψηλές θερμοκρασίες και συνδέεται με τη μείωση του ιξώδους του διαλύματος του υποστρώματος, καθώς και με μείωση της πιθανότητας μόλυνσης από ανεπιθύμητο μικροβιακό πληθυσμό. Η ψυχρά ενεργή β-γαλακτοζιδάση χρησιμοποιείται στην επεξεργασία του γάλατος και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων υπό ήπιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, ώστε η γεύση και η θρεπτική τους αξία να μην επηρεαστεί (Michova & Rosenberg 2006).

3.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ

Η β-γαλακτοζιδάση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σε γαλακτοκομικά προϊόντα το 1950 (Dam 1950). Από το 1970 άρχισαν να αναπτύσσονται προϊόντα, όπως το γάλα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, στα οποία γινόταν υδρόλυση της λακτόζης. Η διαδικασία υδρόλυσης της λακτόζης είναι απλή και δεν απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμό. Όταν χρησιμοποιείται ένζυμο μιας χρήσης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη αρκετοί παράγοντες, όπως η συγκέντρωση της λακτόζης, η τιμή pH της αντίδρασης, η μέγιστη λειτουργία στην οποία μπορεί να υποβληθεί το ένζυμο, ο χρόνος της αντίδρασης, η δραστηριότητα του ενζύμου, ο τύπος της διεργασίας που θα ακολουθηθεί και φυσικά το κόστος. Στους Πίνακες 6 και 7 φαίνεται πώς διαφοροποιούνται οι παράμετροι αυτοί ανάλογα με τον μικροοργανισμό που πρόκειται να δράσει. Ο σωστός συνδυασμός των παραμέτρων είναι σημαντικός. Για παράδειγμα, ένας εκτεταμένος χρόνος επαφής στους 35-45°C πιθανόν να οδηγούσε σε μείωση του κόστους αλλά μπορεί να έχει ως συνέπεια την εκτεταμένη ανάπτυξη μικροβίων (Zadow 1986).

Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση από διαφορετικές πηγές προέλευσης

Προέλευση	Μοριακό Βάρος (kDa)	Βέλτιστη τιμή pH	Βέλτιστη θερμοκρασία (°C)	Λακτόζη K _m (mM)	Υποκινητές	Αναστολείς	Αναφορά
<u>Μύκητες</u>							
<i>Aspergillus niger</i>	124	3,5	58	85	-	-	Aehle (2004)
<i>Aspergillus oryzae</i>	90	5,0	55	50	-	-	Aehle (2004)
<u>Ζύμες</u>							
<i>Kluyveromyces lactis</i>	115	6,5	37	35	K ⁺ , Mg ²⁺	Ca ²⁺ , Na ⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺	Aehle (2004)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	200	6,6	30	0,23-0,99 (oNPG)	-	SDS	Jurado et al. (2004)
<i>Sterigmatomyces elviae</i> CBS8119	-	6,0	60	-	Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺	-	Onishi & Tanaka (1998)
<u>Βακτήρια</u>							
<i>Escherihia coli</i>	540	7,2	40	2	Na ⁺ , K ⁺	-	Aehle (2004)
<i>Bacillus subtilis</i>	-	6,5	50	700	-	-	Aehle (2004)
<i>Bacillus stearochemophilus</i>	220	6,2	55	2	Mg ²⁺	-	Aehle (2004)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	540	6,2	55	6	-	-	Aehle (2004)
<i>Lactobacillus reuteri</i> L103	35	8,0	45	13	Na ⁺ , K ⁺ , Mn ²⁺	Fe ²⁺ , Ca ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺	Nguyen et al. (2006)
<i>Lactobacillus reuteri</i> L461	72	6,5	50	31	Na ⁺ , K ⁺ , Mn ²⁺	Fe ²⁺ , Ca ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺	Nguyen et al. (2006)
<i>Bullera singularis</i> KCTC7534	53	5,0	50	580	-	Ag ³⁺ , SDS	Cho et al. (2003)
<i>Bacillus stearochemophilus</i>	70	7,0	70	2.96	-	Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺	Chen et al. (2008)
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	362	4,8	45	800	EDTA	Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Ca ²⁺ , Sn ²⁺	Dumortier et al. (1994)
<i>Bifidobacterium infantis</i>	470	5,0	60	2.6	Na ⁺ , K ⁺	Cr ³⁺ , EDTA, urea	Hung & Lee (2002)
<i>Bacillus circulans</i>	67	6,0	65	41.7	-	-	Nakanishi et al. (1983)
<i>Bacillus coagulans</i>	430	6,5	55	50	EDTA	Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , gal	Batra et al. (2005)

Πίνακας 7. Απόδοση σε προϊόντα γαλακτοολιγοσακχαριτών από διαλύματα λακτόζης μέσω διεργασιών διαλείποντος και συνεχούς έργου

Προέλευση ενζύμου	Τύπος αντίδρασης	Συνθήκες αντίδρασης			Απόδοση σε προϊόν (%)	Αναφορά
		Λακτόζη (% κ.β.)	T (°C)	pH		
<i>Aspergillus oryzae</i>	Διαλείποντος (ΕΕ)	38	40	4,5	32	Iwasakiet al. (1995)
<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC20423	Διαλείποντος (ΑΕ)	-	30	4,6	26	Sheu et al. (1998)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Συνεχούς (ΑΕ, ΡΚ)	4,0	40	4,5	27	Albayrak & Yang (2002)
<i>Bacillus circulans</i>	Διαλείποντος (ΕΕ)	4,6	40	6,0	24	Mozaffar et al. (1986)
<i>Bacillus circulans</i>	Διαλείποντος (ΑΕ)	4,6	40	6,0	40	Mozaffar et al. (1986)
<i>Bacillus singularis</i>	Συνεχούς (ΑΕ, ανάδευση)	30	45	3,7	54	Shin et al. (1998)
<i>Bacillus singularis</i>	Διαλείποντος (ΑΕ)	10	45	4,8	55	Shin et al. (1998)
<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	Συνεχούς (ΑΕ, ΡΚ)	16	70	4,0	35	Berger & Venhaus (1992)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Διαλείποντος (ΑΕ)	-	-	-	36	Splechtna et al. (2007)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Συνεχούς (ανάδευση)	-	-	-	30	Splechtna et al. (2007)
<i>Pyrococcus furiosus</i> F426Y	Διαλείποντος	70	95	5,0	45	Hansson et al. (2001)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Διαλείποντος	60	50	65	31	Cruz et al. (1999)
<i>Kluyveromyces lactis</i> (εμπορ.)	Διαλείποντος	25	40	65	17	Villaluenga et al. (2008)
<i>Bullera singularis</i> KCTC7534	Διαλείποντος	20	50	5,0	50	Cho et al. (2003)
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Διαλείποντος	60	70	6,0	41	Nakao et al. (1994)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB-12	Διαλείποντος (ανάδευση)	5-30	55	7,5	38	Rabiu et al. (2001)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> NCIMB41171	Συνεχούς	45-50	40-45	6,8	36-43	Goulas et al. (2007)
<i>Bifidobacterium angulant</i>	Διαλείποντος (ανάδευση)	5-30	55	7,5	44	Rabiu et al. (2001)
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Διαλείποντος (ανάδευση)	5-30	55	7,5	48	Rabiu et al. (2001)
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	Διαλείποντος (ανάδευση)	5-30	55	7,5	27	Rabiu et al. (2001)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Διαλείποντος (ανάδευση)	5-30	55	7,5	43	Rabiu et al. (2001)

ΕΕ: Ελεύθερο ένζυμο, ΑΕ: Ακίνητοποιημένο ένζυμο, ΡΚ: Ρευστοστερεής κλίνης

Η υδρόλυση της λακτόζης αυξάνει τη γλυκύτητα του προϊόντος, γεγονός που σε πολλές περιπτώσεις οδηγεί σε μείωση της γλυκόζης που προστίθεται. Υδρόλυση του 70% της λακτόζης του γάλατος αυξάνει τη γλυκύτητά του κατά ένα ποσοστό που αντιστοιχεί με την προσθήκη 2% κ.β. σακχαρόζης. Ωστόσο, σε θερμικά επεξεργασμένα προϊόντα, η αύξηση του ποσοστού των σακχάρων οδηγεί σε συχνότερη εμφάνιση αντιδράσεων Maillard (Harju et al. 2012).

3.4 ANTIΔΡΑΣΗ ΤΡΑΝΣΓΛΥΚΟΖΙΛΙΩΣΗΣ

Η τρανσγλυκοζιλίωση είναι μια κινητικά ελεγχόμενη αντίδραση, η οποία προκαλείται από τον ανταγωνισμό υδρόλυσης και σύνθεσης. Η επικράτηση της αντίδρασης σύνθεσης από αυτή της υδρόλυσης εξαρτάται κυρίως από την προέλευση του ενζύμου της λακτάσης, τις συγκεντρώσεις των σακχάρων στο μέσο της αντίδρασης και από την θερμοδυναμική ενεργότητα του νερού (Torres et al. 2012).

Αν το κύριο υπόστρωμα είναι η λακτόζη, η αντίδραση της τρανσγλυκοζιλίωσης οδηγεί στον σχηματισμό γαλακτοολιγοσακχαριτών (galactooligosaccharides, GOS), όχι ενός συγκεκριμένου είδους αλλά μιας ομάδας, οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον βαθμό πολυμερισμού. Οι GOS χαρακτηρίζονται από ένα τερματικό μόριο γλυκόζης, εκτός από το μονοσακχαρίτη της γαλακτόζης και τους δισακχαρίτες που αποτελούνται από δύο μόρια γαλακτόζης (Urrutia et al. 2013). Αντίθετα, στη σύνθεση λακτουλόζης, η λακτόζη είναι ο δότης γαλακτόζης και η φρουκτόζη έχει το ρόλο του δέκτη (Guerrero et al. 2015).

Στην περίπτωση σύνθεσης GOS, το φάσμα των προϊόντων που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια μετατροπής της λακτόζης, πέρα από το βαθμό πολυμερισμού, διαφέρουν και στους δεσμούς που συνδέουν τα μονομερή μεταξύ τους. Ο τύπος των δεσμών, το φάσμα των προϊόντων και η απόδοση της αντίδρασης εξαρτώνται από την προέλευση του ενζύμου και τις φυσικοχημικές συνθήκες του περιβάλλοντος της αντίδρασης. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του δέκτη της γαλακτόζης και του ενεργού κέντρου του ενζύμου παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των προϊόντων. Έτσι, η ικανότητα του δέκτη να προσδεθεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, καθώς και ο χωρικός προσανατολισμός του δέκτη είναι καταλυτικοί παράγοντες για την απόδοση της αντίδρασης και τον καθορισμό των θέσεων στις οποίες θα δημιουργηθούν οι νέοι γλυκοζιτικοί δεσμοί. Στον Πίνακα 8 αναφέρονται κάποια στοιχεία για την αντίδραση τρανσγλυκοζιλίωσης της λακτόζης σε GOS από β-γαλακτοζιδάση από διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Προς καλύτερη κατανόηση του πίνακα ως L_0 αναφέρεται η ποσότητα υποστρώματος της αντίδρασης (δηλαδή, λακτόζης ή ορού) και ως Y η απόδοση της αντίδρασης (Torres et al. 2012).

Πίνακας 8. Χαρακτηριστικά της αντίδρασης τρανσγλυκοζιλίωσης από β-γαλακτοζιδάση διαφορετικής καθαρότητας κι προέλευσης σε υπόστρωμα λακτόζης

Προέλευση ενζύμου	Καθαρότητα ενζύμου	T (°C)	pH	Lo ¹	Y ²
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Ακατέργαστο κλάσμα	45-60	4,5-6,5	10-57	25
	>>>	45-50	6,5	21-24	45
	>>>	50	6,5	30	15
<i>Aspergillus niger</i>	Ακατέργαστο κλάσμα	40	7,0	2,0-30	16
<i>Aspergillus oryzae</i>	Ακατέργαστο κλάσμα	4080	4,5-7,0	1,0-72	35
	>>>	45	7,0	10-50	51
	>>>	40	4,5	27	22
	>>>	50-55	4,5-4,7	17-30	31
	>>>	35-50	4,5-5,	Ορός, 4-23	18
	>>>	40	4,0-4,5	10-30	26
	>>>	40	4,5	5,0-50	27
	>>>	40	4,5	27	20
	>>>	40	4,5	5,0-50	26
	>>>	40	4,5	5,0-50	26
	>>>	40	4,5	Ορός, 6-20	14
<i>Penicillium exponsum</i>	Ακατέργαστο κλάσμα	50	5,4	5,0-48	29
	Μικτή καλλιέργεια με <i>S. cerevisiae</i>	25	-	5,0-25	44
<i>Penicillium funiculosum</i>	Ακατέργαστο κλάσμα	40	5,0	5,0	20
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Καθαρό ένζυμο	50	6,5	30-60	30
<i>Talaromyces thermophilus</i>	Καθαρό ένζυμο	40	6,5	20	50
	>>>	40	6,5	5,0-20	41
	>>>	40	6,5	20	25
<i>Trichoderma harzianum</i>	Κυτταροκαλλιέργεια	30	7,0	15	32
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Ακατέργαστο κλάσμα	24-50	5,0-7,5	5,0-40	38
	>>>	40	6,9-7,5	17-31	43
	>>>	40	6,5	8,0-32	28
	>>>	40	6,5	16	28
	>>>	37	6,6	3,0-13	7.4
	>>>	35-45	7,0	Ορός, 14-23	22
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	>>>	45	7,0	Ορός, 20	31
	Ακατέργαστο κλάσμα	35-40	6,2-7,0	5,0-50	45
<i>Sirobasidium magnum</i>	>>>	45	7,0	Ορός, 14-23	24
	Καθαρό ένζυμο	60	5,0	20	36
	Κυτταροκαλλιέργεια	30	6,0	36	62
	Ηρεμούν κύτταρα	50	6,0	36	38
	Καθαρό ένζυμο	60	5,0	20	38
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	Κυτταροκαλλιέργεια	30	6,0	36	64
	Ηρεμούν κύτταρα	30	6,0	36	38
	Καθαρό ένζυμο*	60	5,0	20	39
<i>Rhodotorula minuta</i>	Κυτταροκαλλιέργεια	30	6,0	36	64
	Ηρεμούν κύτταρα	60	6,0	20	39
	Καθαρό ένζυμο*	37-50	3,7-6,0	18-30	54
<i>Sporobolomyces singularis</i>	>>>	45	4,8	10	55
	>>>	37	6,0	Ορός, 20	34
	Ηρεμούν κύτταρα	55	5,0	60	41
	Ηρεμούν κύτταρα	55	5,0	60	40

*Γλυκοζιδάση, Lo¹: ποσότητα υποστρώματος της αντίδρασης και Y²: απόδοση της αντίδρασης

3.5 Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ *Aspergillus oryzae*

Το ένζυμο που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία είναι από τον μύκητα *Aspergillus oryzae*. Η β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae* είναι ένα μονομερές ένζυμο του οποίου το μοριακό βάρος είναι 105 kDa. Η βέλτιστη δράση του εμφανίζεται στο εύρος θερμοκρασιών 45-55°C και τιμή pH 4,5 με υπόστρωμα o-NPG (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside), ενώ για υπόστρωμα λακτόζης η βέλτιστη τιμή pH είναι 4,8.

Η β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae* έχει χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση πολλών προϊόντων μέσω της αντίδρασης της τρανσγλυκοζιλίωσης, στα οποία περιλαμβάνεται η σύνθεση GOS που αφορά και το θέμα μελέτης της παρούσας διπλωματικής. Βιβλιογραφικά, έχει γίνει χρήση του ενζύμου τόσο σε ελεύθερη όσο και σε ακινητοποιημένη μορφή, ενώ στη παρούσα εργασία γίνεται χρήση ελεύθερου ενζύμου. Το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης από τον *A. oryzae* έχει την ικανότητα να σχηματίζει β-γλυκοζιτικούς δεσμούς ανάμεσα σε (1→3), (1→4) και (1→6) άνθρακες (Πίνακας 9, Urrutia et al. 2013).

Πίνακας 9. Τύποι GOS που παράγονται με τη δράση β-γαλακτοζιδάσης από *A. oryzae*

Τύπος	Σύσταση	Ονομασία
Δισακχαρίτης	Gal-β(1→6)-Gal	6-galactobiose
Δισακχαρίτης	Gal-β(1→6)-Glc	allolactose
Δισακχαρίτης	Gal-β(1→3)-Gal	3-galactobiose
Δισακχαρίτης	Gal-β(1→4)-Gal	4-galactobiose
Τρισακχαρίτης	Gal-β(1→6)-Gal-β(1→4)-Glc	6'-O-β-galactosyl-lactose
Δισακχαρίτης	Gal-β(1→3)-Glc	3-O-β-galactosyl-glucose
Τετρασακχαρίτης	Gal-β(1→6)-Gal-β(1→6)-Gal-β(1→4)-Glc	6'-O-β-(6-galactobiosyl)-lactose
Τρισακχαρίτης	Gal-β(1→4)-Gal-β(1→4)-Glc	4'-O-β-galactosyl-lactose
Τρισακχαρίτης	Gal-β(1→3)-Gal-β(1→4)-Glc	3'-O-β-galactosyl-lactose

3.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ

Υπάρχουν ουσίες που μπορούν να αναστείλουν τη δράση των ενζύμων και γι' αυτό ονομάζονται αναστολείς. Διακρίνονται σε μη αντιστρεπτούς και αντιστρεπτούς. Οι μη αντιστρεπτοί συνδέονται μόνιμα με το ένζυμο και δεν το αφήνουν να δράσει πλέον. Σ' αυτούς ανήκουν διάφορα αέρια (π.χ. εντομοκτόνα) και ιόντα βαρέων μετάλλων, όπως τα Hg²⁺, Pb²⁺, Ag⁺. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς εμποδίζουν, παροδικά μόνο, τη δράση των ενζύμων. Από την άλλη, ορισμένα ένζυμα είναι δραστικά μόνο με την παρουσία ουσιών, μη πρωτεϊνικής φύσης, που

ονομάζονται υποκινητές. Οι υποκινητές μπορεί να είναι ανόργανα ιόντα (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} κ.ά.) ή και οργανικές ενώσεις. Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν και τα συνένζυμα. Όπως είναι αντιληπτό, η παρουσία ιόντων μπορεί να επηρεάζει θετικά, αρνητικά ή και καθόλου τη δράση του ενζύμου (Κλώνης 2012).

Σύμφωνα με τους Fischer και Kleinschmidt (2015) τα κατιόντα Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} και Ca^{2+} έχουν πολύ μικρή επίδραση στην ενζυμική δραστηριότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον *A. oryzae* σε υπόστρωμα ο-NPG. Έτσι, αναμένεται ότι η παρεμπόδιση που θα δέχεται το ένζυμο στην αντίστοιχη αντίδραση με υπόστρωμα ορού να είναι αμελητέα. Τα αποτελέσματα διαφοροποιήθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε ένζυμο από το μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*. Στην περίπτωση αυτή, η δράση του ενζύμου παρουσίασε ισχυρή εξάρτηση από τον τύπο των κατιόντων που υπάρχουν στο μέσο της αντίδρασης. Έτσι, ενώ το ασβέστιο φάνηκε να μην έχει επίδραση στην ενζυμική δραστηριότητα, το μαγνήσιο φάνηκε να έχει μια μέτρια επίδραση.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10) φαίνονται τα αποτελέσματα για την επίδραση των κατιόντων στην δραστηριότητα των δύο διαφορετικής προέλευσης ενζύμων β-γαλακτοζιδάσης σε αντιδράσεις με τιμή pH 4,5 και θερμοκρασία 55°C για τον *A. oryzae*, και σε pH 6,5 και θερμοκρασία 45°C για τον *K. lactis*.

Πίνακας 10. Δραστηριότητες ενζύμων σε σχέση με τη συγκέντρωση κατιόντων στο μέσο της αντίδρασης

Προέλευση ενζύμου	Συγκέντρωση κατιόντος (mM)	Ενεργότητα ενζύμου παρουσία:				
		Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	NH_4^+	K^+
<i>A. oryzae</i>	0	100±3	100±3	100±3	100±3	100±3
	1	103±1	100±0	99±2,5	104±0	103±2
	10	100±1	99±1	95±0	99±0	101±0
	100	-	-	99±0	99±0	98±1
<i>K. lactis</i>	0	100±11	100±11	100±11	100±11	100±11
	1	96±7	114±19	144±10	133±7	146±18
	10	100±6	138±17	409±40	424±43	467±52
	100	-	-	772±108	2399±497	9005±4108

Ωστόσο οι Flores et al. (1996) αναφέρουν ότι το νάτριο, το αμμώνιο και το κάλιο προκαλούν ενεργοποίηση του *K. lactis*, ενώ δεν παρατήρησαν κάποιου είδους παρεμπόδιση από κατιόντα. Τα διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των δύο ερευνητικών ομάδων είναι πιθανόν να οφείλονται στις διαφορετικές συγκεντρώσεις κατιόντων που χρησιμοποιήθηκαν (40-200 mM και 10-100 mM, στην πρώτη και δεύτερη εργασία αντίστοιχα).

Κεφάλαιο 4^ο

ΟΙ ΓΑΛΑΚΤΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως προαναφέρθηκε, η λακτόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή σύνθεσης γαλακτοολιγοσακχαριτών (galactooligosaccharides, GOS). Οι GOS είναι μη αφομοιώσιμοι υδατάνθρακες που αποτελούν συστατικά τροφίμων με ευεργετικές επιδράσεις στις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Κάτι τέτοιο σημαίνει ότι παρέχουν προστασία από μολύνσεις, μειώνουν τον αριθμό των δυνητικά παθογόνων βακτηρίων, διευκολύνουν τη σωστή λειτουργία του εντέρου, διεγείρουν την απορρόφηση κάποιων ανόργανων συστατικών και μειώνουν τη συγκέντρωση των λιπιδίων στο αίμα (Van den Broek et al. 2008). Οι ολιγοσακχαρίτες αυτοί έχουν αναγνωριστεί γενικώς ως ασφαλείς (Generally Recognized As Safe, GRAS Notice No. GRN 000236) και πλέον ανήκουν στην κατηγορία των προβιοτικών συστατικών. Αν και στο παρελθόν οι ιδιότητες των GOS δεν ήταν γνωστές και δεν έτυχαν ιδιαίτερου ενδιαφέροντος λόγω της χαμηλής τους γλυκύτητας και της δυσπεπτότητας που τους χαρακτήριζε, σήμερα βρίσκονται στο επίκεντρο του τομέα των λειτουργικών τροφίμων (Clemens 2010).

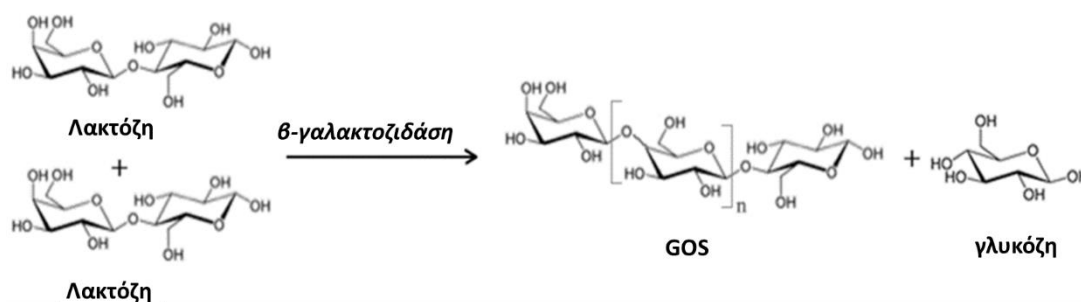
Όπως είναι αντιληπτό από την ονομασία τους, οι GOS είναι μόρια που κατά κύριο λόγο αποτελούνται από μονάδες γαλακτόζης συνδεδεμένες μεταξύ τους. Ο βαθμός πολυμερισμού των GOS κυμαίνεται από δύο έως δέκα μονομερή σακχάρου ανά μόριο. Οι GOS μπορούν να συντεθούν από λακτόζη από δύο πηγές, από γάλα σόγιας ή γάλα θηλαστικών. Οι GOS που έχουν ως πηγή προέλευσης τη λακτόζη προσομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες που βρίσκονται στο ανθρώπινο μητρικό γάλα. Έτσι, πρωταρχική θέση στη χρήση τους κατέχουν τα σκευάσματα βρεφικών τροφών.

Το εμπορικό ενδιαφέρον που έχει αναπτυχθεί για τους GOS βασίζεται κυρίως στο γεγονός ότι οι GOS συναντώνται στο ανθρώπινο γάλα και ότι η δομή τους προσομοιάζει πολύ αυτή των ανθρώπινων ολιγοσακχαριτών. Οι ολιγοσακχαρίτες που υπάρχουν στο ανθρώπινο γάλα αποτελούν το τρίτο κύριο συστατικό του γάλακτος μετά τη λακτόζη και τα λίπη. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα αναφέρουν ότι οι ολιγοσακχαρίτες στο ανθρώπινο γάλα αποτελούνται από 60%-90% GOS και 10-40% φρουκτοολιγοσακχαρίτες (fructooligosaccharides, FOS) τους πρώτους μήνες της γαλουχίας (Ben et al. 2004). Κύριος ρόλος τους είναι να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της μικροχλωρίδας του βρέφους και το ανοσοποιητικό του σύστημα. Επιπρόσθετα, τα βρέφη που θρέφονται με μητρικό γάλα έχουν υψηλότερα επίπεδα bifidobacteria, λιγότερο πολύπλοκη μικροχλωρίδα και είναι λιγότερο επιρρεπή σε

μολυσματικές ασθένειες σε σχέση με τα μωρά που δεν θηλάζουν. Ακόμα τα βρέφη που τρέφονται με σκόνη γάλακτος έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων σε αμμωνία, αμίνες, φαινόλες και άλλες επιβλαβείς ουσίες (Heaney et al. 2003). Η συμπλήρωση βρεφικών παρασκευασμάτων με κατάλληλα επίπεδα GOS μπορεί να ισορροπήσει την κατάσταση και να αποκαταστήσει τα επίπεδα των παραπάνω ουσιών (Bruzzese et al. 2006).

4.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ GOS ΑΠΟ ΛΑΚΤΟΖΗ

Η λακτόζη είναι το κύριο υπόστρωμα για τη σύνθεση γαλακτο-ολιγοσακχαριτών μέσω της διαδικασίας της τρανσγλυκοζυλίωσης, κατά την οποία το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση υδρολύει τη λακτόζη και μεταφέρει τη γαλακτόζη σε έναν άλλο υδατάνθρακα αντί στην υδροξυλομάδα του νερού (Εικόνα 8). Στην περίπτωση που μελετάται στην παρούσα εργασία, ο άλλος υδατάνθρακας είναι είτε ένα άλλο μόριο γαλακτόζης ή ένα μόριο γλυκόζης. Με αυτόν τον τρόπο παρασκευάζονται ολιγοσακχαρίτες με υψηλότερο βαθμό πολυμερισμού (Kim et al. 1997). Δεδομένου ότι τα προϊόντα της τρανσγλυκοζυλίωσης αποτελούν και υπόστρωμα της β-γαλακτοζιδάσης, η οποία και τα υδρολύει, η σύνθεση του μίγματος της αντίδρασης συνεχώς μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ενζυμικής δράσης και έτσι προκύπτει η ανάγκη προσδιορισμού των βέλτιστων συνθηκών της αντίδρασης. Ωστόσο, όταν το μέσο της αντίδρασης είναι τέτοιο που ευνοεί την αντίδραση τρανσγλυκοζυλίωσης, το σύστημα της αντίδρασης είναι επίσης δυναμικό και παράγονται γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες διαφορετικών βαθμών πολυμερισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι, όταν προσδεθεί ένα μόριο γλυκόζης σε ένα μόριο γαλακτόζης, τότε ο πολυμερισμός τερματίζεται καθώς το ένζυμο προσδένεται στα μόρια της γαλακτόζης.

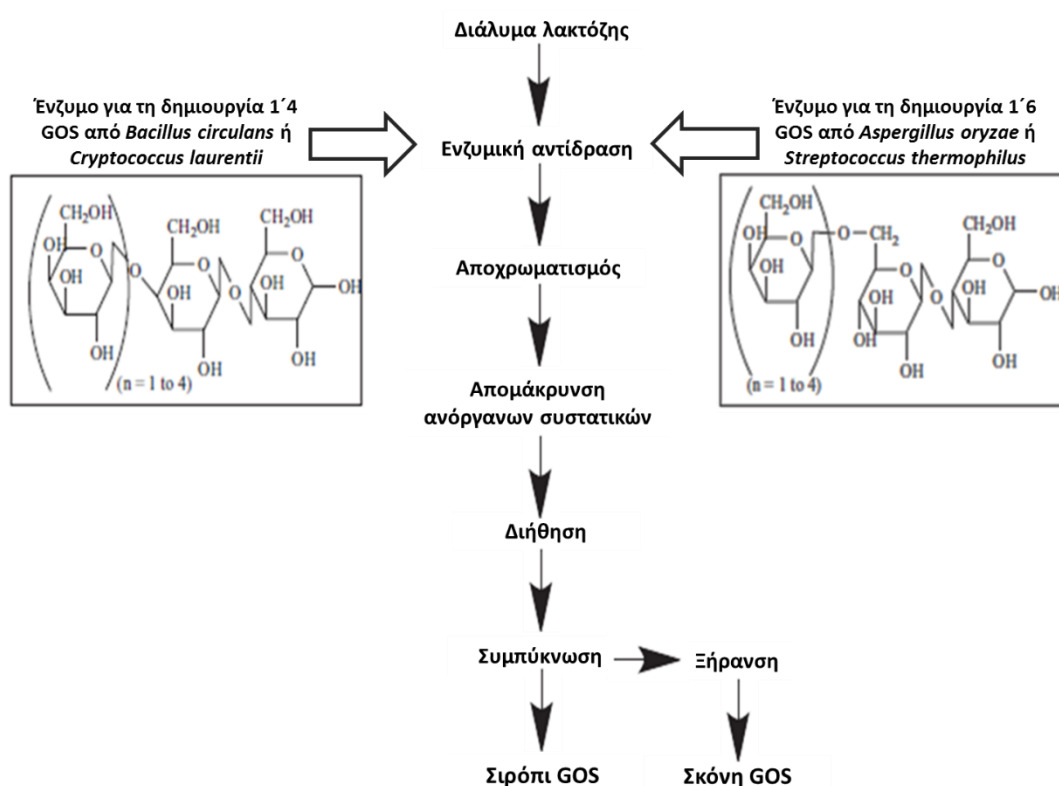


Εικόνα 8. Αντίδραση λακτόζης προς γαλακτοολιγοσακχαρίτες

Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι υπόστρωμα με ικανοποιητική περιεκτικότητα σε λακτόζη, ασχέτως από την πηγή προέλευσής της (πρότυπο διάλυμα ή όξινος ορός), μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή

γαλακτοολιγοσακχαριτών Στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 9) φαίνεται η διεργασία παραγωγής GOS από β-γαλακτοζιδάση.

Όπως φαίνεται, η σύνθεση των γαλακτοολιγοσακχαριτών ξεκινά με την αντίδραση της τρανσγλυκοζυλίωσης της λακτόζης από τη β-γαλακτοζιδάση. Η αντίδραση θα πρέπει να γίνεται υπό τέτοιες συνθήκες, ώστε η απόδοση παραγωγής GOS να είναι η βέλτιστη. Η ενζυμική αντίδραση οδηγεί στην παραγωγή μιας ποικιλίας GOS που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον βαθμό πολυμερισμού και τον τύπο των δεσμών μεταξύ των μονομερών. Τα παράγωγα εξαρτώνται από τις συνθήκες, τη διάρκεια της αντίδρασης και κυρίως την προέλευση του ενζύμου (Otiemo 2010).



Εικόνα 9. Διεργασία παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από λακτόζη

4.3 ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΙ GOS

Γαλακτοολιγοσακχαρίτες έχουν παραχθεί και είναι εμπορικά διαθέσιμοι από πολύ λίγες εταιρείες. Κάποιες εταιρείες που παράγουν GOS δεν τους διαθέτουν στο εμπόριο, αλλά κάνουν ιδία χρήση. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11) φαίνονται οι κύριες εταιρείες παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών, η χώρα προέλευσής τους και η εμπορική ονομασία τους (Sangwan et al. 2011).

Πίνακας 11. Κύριες εταιρείες παρασκευής γαλακτοολιγοσακχαριτών

Παραγωγός εταιρεία	Εμπορική ονομασία
<i>Friesland Foods Domo (Ολλανδία)</i>	Vivinal GOS
<i>Yakult Honsha (Ιαπωνία)</i>	Oligomate
<i>GTC Nutrition (ΗΠΑ)</i>	Purimune
<i>Dairygold Food Ingredients (Ιρλανδία)</i>	Dairygold GOS
<i>First Milk Ingredients</i>	Promovita
<i>Nissin Sugar Manufacturing Company (Ιαπωνία)</i>	Cup-Oligo
<i>Snow Brand Milk Products (Ιαπωνία)</i>	P7L
<i>Clasado Ltd. (Ηνωμένο Βασίλειο)</i>	Bimuno

Πρόσφατα άρχισαν να δραστηριοποιούνται και άλλοι στον τομέα παραγωγής GOS, όμως πληροφορίες σχετικά με τα προϊόντα τους είναι ελάχιστες. Κάποιες πληροφορίες σχετικά με σκευάσματα εμπορικά διαθέσιμων GOS αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 12, Torres et al. 2010).

Πίνακας 12. Στοιχεία εμπορικά διαθέσιμων σκευασμάτων γαλακτοολιγοσακχαριτών

	Glu ¹	Gal ²	Lac ³	GOS				Σύνολο	Πηγή ενζύμου
				DP2	DP3	DP4	*DP>4		
<i>Cup-oligo</i>		25-30		-	-	-	-	70	<i>Cr. laurentii</i>
<i>Oligomate 55</i>		18-39	10-22	15-17	18-24	10-16	2-5.4	50-60	<i>A. oryzae</i> <i>S. thermophilus</i>
<i>TOS-100</i>	0	-	0-1	0	55	33-35	12-14	99-100	<i>A. oryzae</i> <i>S. thermophilus</i>
<i>Vivinal GOS</i>	19-22	0,8-1,3	10-23	19-27	22-23	11	6,0-7,6	57-59	<i>B. circulans</i>
<i>Bimuno</i>	18	12	22	25-29	12-14	6,7-7,7	3,8-4,4	48-55	<i>B. bifidum</i>
<i>Purimune</i>	0-1	0-0,5	7-10	16-21	38-51		25-29	90-92	<i>B. circulans</i>
<i>Promovita GOS</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Γλυκόζη, ²Γαλακτόζη, ³Λακτόζη

*DP (degree of polymerization): βαθμός πολυμερισμού

Οι GOS που χρησιμοποιούνται στον τομέα των τροφίμων είναι συνήθως σε μορφή διάφανου σιροπιού ή λευκής σκόνης. Και στις δύο περιπτώσεις πρόκειται για μίγματα που περιέχουν γαλακτοολιγοσακχαρίτες διαφορετικού βαθμού πολυμερισμού, τη λακτόζη που δεν αντέδρασε και τα μονομερή της, γαλακτόζη και γλυκόζη. Από κάποιες εταιρείες, βέβαια, τα εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα εμφανίζουν μεγαλύτερη από 90% καθαρότητα ως προς τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Πέρα από τις διαφορές των εμπορικά διαθέσιμων GOS ως προς την καθαρότητα, διαφορές παρουσιάζονται και στους δεσμούς που συνδέουν τα

μονομερή μεταξύ τους, που εξαρτάται από την προέλευση του ενζύμου που χρησιμοποιείται (Sangwan et al. 2011).

4.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΟΦΕΛΗ ΤΩΝ GOS

Τα διαφορετικά λειτουργικά οφέλη που έχουν οι GOS και τους καθιστούν ξεχωριστούς είναι η υψηλή τους διαλυτότητα, η γεύση τους που είναι καθαρή και ευχάριστη, η θερμο-σταθερότητά τους και η σταθερότητάς τους σε αλλαγές της τιμής του pH, καθώς και ο χαμηλός γλυκαιμικός δείκτης που τους χαρακτηρίζει.

Οι GOS είναι πλήρως διαλυτοί στο νερό και δημιουργούν ένα διαυγές διάλυμα. Επίσης, διαλύονται επαρκώς στο γάλα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα χωρίς να επηρεάζουν το ιξώδες τους. Η προσθήκη GOS δεν επηρεάζει τη γεύση ή την υφή του προϊόντος, καθώς έχουν μια ελαφρώς γλυκιά έως ουδέτερη γεύση. Έτσι, το εύρος των εφαρμογών αλλά και των δοσολογιών τους είναι αρκετά μεγάλο.

Η θερμο-σταθερότητα και η χημική σταθερότητα των GOS επιτρέπουν την αποθήκευσή τους σε περιβάλλον χαμηλής τιμής pH χωρίς να βρίσκονται υπό ψύξη και χωρίς να υφίστανται υποβάθμιση για αρκετούς μήνες. Παράλληλα, η παρουσία β-γλυκοζιτικού δεσμού τους καθιστά ανθεκτικούς σε υψηλή θερμοκρασία σε όξινο περιβάλλον, αφού έχει παρατηρηθεί ότι η σύστασή τους παραμένει αμετάβλητη μετά από επεξεργασία στους 160°C για 10 λεπτά σε ουδέτερο περιβάλλον, μετά από επεξεργασία στους 120°C για 10 λεπτά σε περιβάλλον με τιμή pH 3 και μετά από 3 λεπτά στους 120°C σε τιμή pH 2.

Οι GOS φαίνεται να σχετίζονται με θέματα αντιμετώπισης του διαβήτη, διαχείρισης βάρους και αντιμετώπισης καρδιακών παθήσεων, λόγω του χαμηλού γλυκαιμικού τους δείκτη. Οι GOS επίσης δεν υδρολύονται από τα παγκρεατικά ένζυμα και το γαστρικό υγρό, με συνέπεια να διέρχονται από το λεπτό έντερο, προσφέροντας έτσι χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη και θερμιδικό περιεχόμενο περίπου μισό από αυτό της σακχαρόζης. Έτσι, είναι πιθανή η χρήση τους σε διαιτητικά τρόφιμα και τρόφιμα που προορίζονται για διαβητικούς (Sangwan et al. 2011).

4.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ GOS

Όσον αφορά στις εφαρμογές των GOS, στόχος για τη χρήση τους στις βρεφικές τροφές αποτελεί η παρασκευή ενός προϊόντος που θα ενισχύει την ανάπτυξη των bifidobacteria και θα παρέχει όλα τα πλεονεκτήματα του μητρικού γάλακτος (Veereman-Wauters 2005). Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες αποτελούν ένα ιδανικό ως προς αυτή την κατεύθυνση συστατικό βρεφικών προϊόντων, καθώς η συμπλήρωση βρεφικών τροφών με χαμηλά επίπεδα GOS (0,24 g/100 mL) μπορεί να καταστεί ευεργετική για τη συχνότητα κενώσεων, τη μείωση της

τιμής του pH των κοπράνων και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών του εντέρου που ευνοούν τη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Τα επίπεδα βελτίωσης σε αυτούς τους τομείς τείνουν να ταυτιστούν με τις ευεργετικές δράσεις του μητρικού γάλακτος και επομένως τα νεογνά δύναται να μην εμφανίζουν προβλήματα λόγω της μη κατανάλωσης μητρικού γάλακτος (Ben et al. 2005). Επιπρόσθετα, παρόλο που τα παιδιά κατά τα πρώτα χρόνια της ανάπτυξής τους και μετά τον πρώτο χρόνο δεν έχουν την ανάγκη για κατανάλωση γάλακτος ίδιας σύστασης με αυτή του μητρικού, ωστόσο κρίνεται απαραίτητη η κατανάλωση γάλακτος που θα συνεισφέρει στην σωστή ανάπτυξή τους. Οι GOS προστίθεται και σε αυτά τα είδη (προϊόντα πρώτης ανάπτυξης) για την σταδιακή και υγιή ανάπτυξη του παιδιού (Sangwan et al. 2011).

Εκτός από τη χρήση τους στις βρεφικές τροφές, οι GOS βρίσκουν εφαρμογή σε μια ευρεία ποικιλία προϊόντων τροφίμων, λόγω της σταθερότητάς τους. Παράδειγμα αποτελεί η εφαρμογή τους σε αναψυκτικά, χυμούς και άλλα όξινα ροφήματα, σε υποκατάστατα κρέατος, σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής και σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Επιπρόσθετα, το ψωμί καθώς και άλλα προϊόντα αρτοποιίας μπορούν να αποτελέσουν φορείς γαλακτοολιγοσακχαριτών, αφού δεν καταναλώνονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Επιπλέον, λόγω της ικανότητας των GOS να συγκρατούν υψηλά επίπεδα υγρασίας, η παρουσία τους εμποδίζει την υπερβολική ξήρανση των προϊόντων αυτών και προσδίδει καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο παρασκεύασμα. Οι GOS, επειδή ανήκουν στην κατηγορία των μη αφομοιώσιμων σακχάρων, χαρακτηρίζονται από την ιδιότητα που πολλά στοιχεία αυτής της κατηγορίας εμφανίζουν. Έχουν ευχάριστη γεύση και βελτιώνουν την υφή και τη μετάγευση των τροφίμων, παρέχοντας ιδιότητες παρόμοιες με αυτές της σακχαρόζης. Οι GOS δεν αποικοδομούνται με το σάλιο και έτσι δεν συνεισφέρουν στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών της στοματικής κοιλότητας. Κατά συνέπεια, αποτελούν ένα είδος γλυκαντικού που προκαλεί τερηδόνα σε πολύ χαμηλά ποσοστά. Επιπρόσθετα, λόγω του χαμηλού ποσοστού αποικοδόμησής τους, έχουν αμελητέα επίδραση στην αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αρχίσει να παρουσιάζεται και για εφαρμογές τους σε τρόφιμα που προορίζονται για ηλικιωμένους και νοσηλευόμενους. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι πρόκειται για μια κατηγορία ατόμων που είναι ευάλωτα σε θέματα υγείας, και άρα είναι ιδιαίζουσας σημασίας η διατροφή τους να καλύπτει τις ειδικές διατροφικές ανάγκες των ατόμων αυτών. Η χρήση των GOS μελετάται προς αυτή την κατεύθυνση, δεδομένου ότι διεγείρει την ανάπτυξη της μικροχλωρίδας του εντέρου και παράλληλα παρέχει οφέλη για την υγεία, όπως καταπολέμηση της δυσκοιλιότητας, ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και βελτίωση της απορρόφησης των ανόργανων συστατικών (Sangwan et al. 2011).

Πέρα από τον τομέα των τροφίμων, οι GOS βρίσκουν εφαρμογή και σε άλλους τομείς, όπως οι φαρμακοβιομηχανίες και ο τομέας της κοσμετολογίας. Το εύρος των τομέων χρήσης των GOS οφείλεται κυρίως στις φυσικοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητές τους. Οι GOS ως προβιοτικά συστατικά μπορούν να λειτουργήσουν ευεργετικά αυξάνοντας επιλεκτικά τα βακτήρια του ανθρώπινου σώματος. Οι GOS βελτιώνουν την υγεία και την ανάπτυξη μέσω βελτίωσης του μικροβιακού πληθυσμού του εντέρου, μειώνοντας έτσι την χρήση αντιβιοτικών, συμμετέχοντας παράλληλα στην πρόληψη της θνησιμότητας και μειώνοντας τη δυσσομία από εντερικές δυσλειτουργίες. Μελετάται ακόμα η χρήση GOS για την μείωση παραγωγής μεθανόλης από τα μηρυκαστικά (Torres et al. 2010).

4.6 ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΩΝ GOS

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες έχουν αναγνωρισθεί ως γενικώς ασφαλή συστατικά (GRAS) στις Ηνωμένες Πολιτείες ενώ στην Ιαπωνία θεωρούνται ως συστατικά τροφίμων που προορίζονται για συγκεκριμένη ιατρική χρήση. Η ασφάλειά τους θεωρείται εξασφαλισμένη αφού αποτελούν συστατικά του ανθρώπινου γάλατος και μπορούν να παραχθούν από τα εντερικά βακτήρια με υπόστρωμα τη λακτόζη. Τα μόνα αρνητικά συμπτώματα που έχουν αναφερθεί αφορούν σε παροδική διάρροια λόγω κατανάλωσης υπερβολικής ποσότητάς τους, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση υπερκατανάλωσης αλκοολικών σακχάρων και λακτόζης. Η εμφάνιση τέτοιων συμπτωμάτων είναι συνηθισμένη σε περιπτώσεις ατόμων που πάσχουν από δυσανεξία στη λακτόζη, καταναλώνοντας όμως μικρές ποσότητες λακτόζης. Τα ασφαλή επίπεδα κατανάλωσης GOS υπολογίζονται ότι είναι περίπου 0,3-0,4 g/kg σωματικού βάρους (Torres et al. 2010).

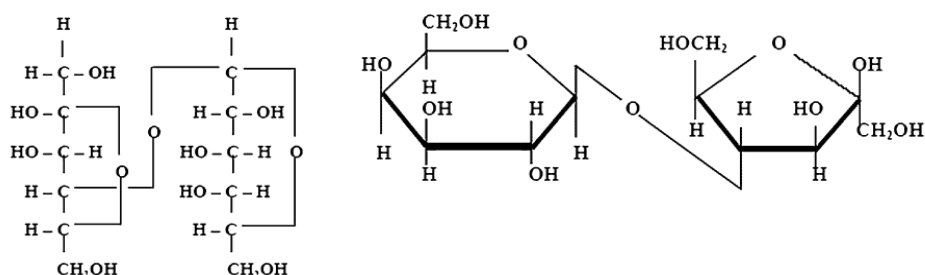
Σύμφωνα με τους Torres et al. (2010), στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) έχει ήδη αποφασίσει για περίπου έξι αιτήματα που έχουν υποβληθεί για τη χρήση GOS σε προϊόντα τροφίμων, τα οποία προάγουν θέματα υγείας. Τα τρία αιτήματα από αυτά έχουν περάσει τις πρώτες φάσεις αξιολόγησης για αξιώσεις με τίτλους «διατήρηση ενός φυσιολογικά υγιούς πεπτικού συστήματος», «προβιοτικά» και «αυξητικός παράγοντας απορρόφησης ασβεστίου». Τα άλλα τρία αιτήματα αφορούν στους τίτλους «παράγοντας υποστήριξης υγιούς ανοσοποιητικού συστήματος σε άτομα τρίτης ηλικίας», «παράγοντας διαχείρισης συμπτωμάτων σχετικών με το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου» και «παράγοντας ενίσχυσης αυτοάμυνας οργανισμού» και έχουν απορριφθεί λόγω ανεπαρκών επιστημονικών δεδομένων.

Κεφάλαιο 5^ο

Η ΛΑΚΤΟΥΛΟΖΗ

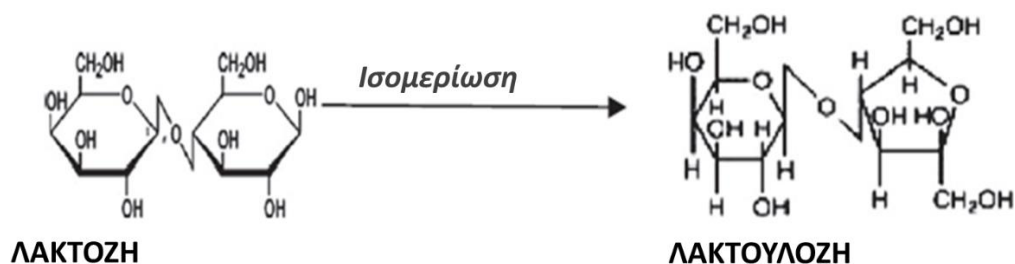
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λακτουλόζη (4-O-β-D-Galactopyranosyl-D-fructofuranose) είναι ένας συνθετικός δισακχαρίτης, ο οποίος αποτελείται από την ένωση ενός μορίου φρουκτόζης με ένα μόριο γαλακτόζης με β-(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό (Panesar & Kumari 2011). Η λακτουλόζη (Εικόνα 10) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων, καθώς και σε φαρμακευτικά σκευάσματα για διατροφικούς λόγους (όπως π.χ. στα συμπληρώματα διατροφής), λόγω της ευεργετικής της δράσης στην υγεία του ανθρώπου. Η τεχνολογία παραγωγής λακτουλόζης βασίζεται κυρίως στην αντίδραση ισομερίωσης της λακτόζης, η οποία λαμβάνει χώρα σε αλκαλικό περιβάλλον (Aider & Halleux 2007).



Εικόνα 10. Απεικόνιση του μορίου της λακτουλόζης

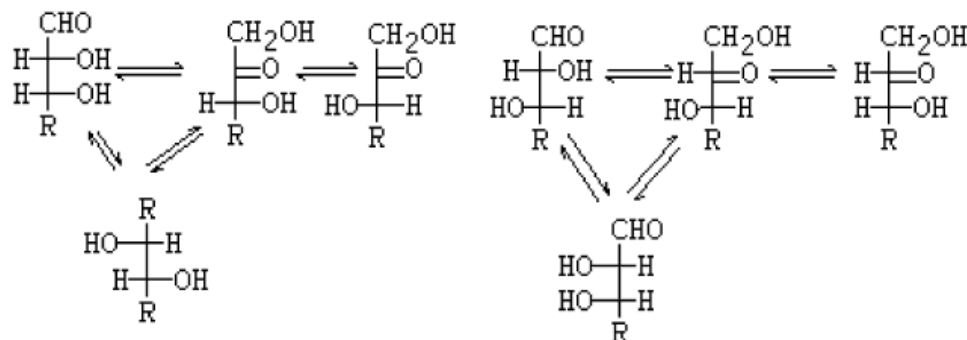
Η ισομερίωση της λακτόζης (Εικόνα 11) μπορεί να γίνει με ποικίλους τρόπους, οι οποίοι θα αναλυθούν στη συνέχεια. Για τον μετασχηματισμό της λακτόζης σε λακτουλόζη απαιτούνται δέκτες ηλεκτρονίων και για αυτό χρησιμοποιούνται καταλύτες που όταν διαλυθούν δημιουργούν ένα βασικού χαρακτήρα περιβάλλον (Aider & Halleux 2007). Οι καταλύτες που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να είναι χαμηλού κόστους, να μπορούν να διαχωριστούν εύκολα, να είναι φιλικό προς το περιβάλλον, ασφαλείς και μη τοξικοί. Οι μέθοδοι για την παραγωγή λακτουλόζης με χρήση καταλυτών μπορούν να διαχωριστούν σε χημικές και ενζυμικές μεθόδους (Panesar & Kumari 2011).



Εικόνα 11. Αντίδραση ισομερίωσης της λακτόζης προς λακτουλόζη

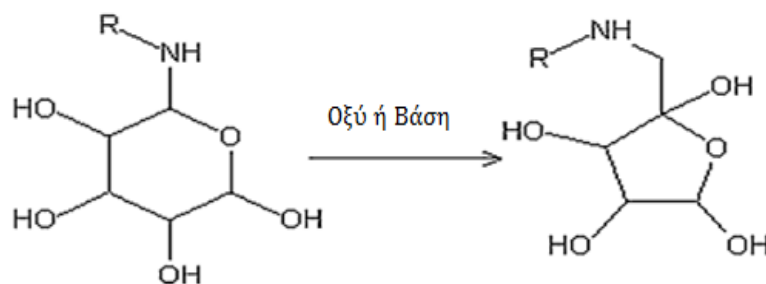
5.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΛΑΚΤΟΥΛΟΖΗΣ

Θεωρητικά η λακτουλόζη μπορεί να παρασκευαστεί από τη λακτόζη με αντικατάσταση του μορίου της γλυκόζης από μια φρουκτόζη. Ο πρώτος τρόπος είναι μέσω της αντίδρασης Lobry de Bruynevan Ekenstein (Εικόνα 12). Αυτός ο τρόπος μπορεί να περιγραφεί συνοπτικά από το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου ενολικής μορφής της λακτόζης και της επιλακτόζης σε αλκαλικό περιβάλλον με επακόλουθο μετασχηματισμό ενός μορίου γλυκόζης της λακτόζης σε φρουκτόζη και συνεπώς το σχηματισμό λακτουλόζης (Aider & Halleux 2007).



Εικόνα 12. Αντίδραση Lobry de Bruynevan Ekenstein

Ο δεύτερος τρόπος ισομερίωσης της λακτόζης είναι μέσω αντίδρασης με αμμωνία ή κάποια αμίνη. Σε αυτή την περίπτωση παρασκευάζεται λακτοζυλαμίνη, η οποία με αντίδραση Amadori (Εικόνα 13) μετατρέπεται σε λακτουζολαμίνη, η οποία με υδρόλυση καταλήγει σε λακτουλόζη (Aider & Halleux 2007).



Εικόνα 13. Αντίδραση Amadori

Η βιομηχανική παραγωγή της λακτουλόζης πραγματοποιείται αποκλειστικά μέσω χημικής ισομερίωσης της λακτόζης μέσω της αναδιάταξης Lobry de Bruyne-Alberda van Ekenstein (LA). Η τεχνολογία παραγωγής της λακτουλόζης βασίζεται κυρίως στην ισομερίωση της λακτόζης σε αλκαλικό περιβάλλον. Ακόμα δεν έχει βρεθεί ο βέλτιστος καταλύτης, καθώς δεν εφαρμόζεται μέχρι στιγμής κάποιος

καταλύτης που να συνδυάζει όλα τα χαρακτηριστικά που να ευνοούν τη χρήση του (Panesar & Kumari 2011).

Η λακτουλόζη μπορεί να παρασκευαστεί και ενζυμικά. Η ενζυμική σύνθεση της λακτουλόζης πραγματοποιείται κυρίως από τα ένζυμα β-γαλακτοζιδάση και γλυκοζιδάση, χρησιμοποιώντας ελεύθερο ένζυμο, ακινητοποιημένο ένζυμο ή και ολόκληρα κύτταρα. Η παραγωγή λακτουλόζης με χρήση ελεύθερου ενζύμου βασίζεται στην τρανσγλυκοζιλίωση που προκαλείται από τη β-γαλακτοζιδάση, η οποία χρησιμοποιεί τη λακτόζη ως πηγή γαλακτόζης και συνδέει τη γαλακτόζη σε ένα μόριο φρουκτόζης την οποία αντιμετωπίζει ως δέκτη (Kim et al. 2006). Έτσι, παράγονται μόρια λακτουλόζης. Η ενζυμική σύνθεση λακτουλόζης από ορό επηρεάζεται από την επιλεκτικότητα του ενζύμου, τη συγκέντρωση της λακτόζης και την ποσότητα φρουκτόζης που προστίθεται. Κατά την σύνθεση της λακτουλόζης παρατηρείται σύνθεση και άλλων γαλακτοολιγοσακχαριτών (Adamczak et al. 2009).

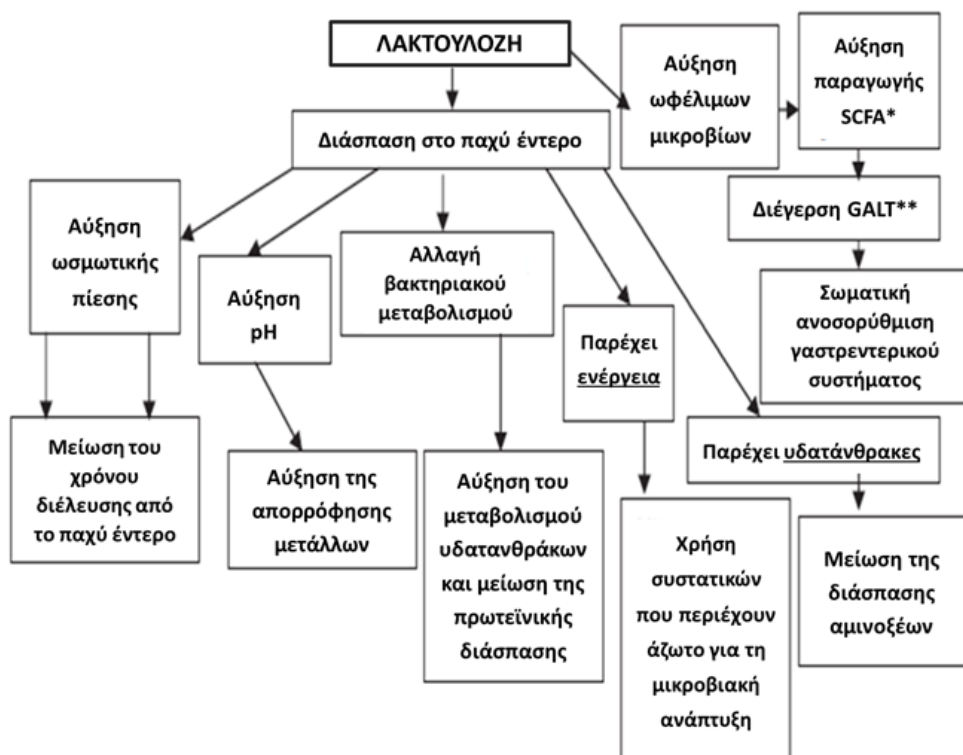
5.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΛΑΚΤΟΥΛΟΖΗΣ

Η λακτουλόζη βρίσκει εφαρμογές τόσο στη βιομηχανία τροφίμων όσο και στη φαρμακοβιομηχανία. Όσον αφορά στη βιομηχανία τροφίμων, η λακτουλόζη εφαρμόζεται σε μεγάλο εύρος ως ευεργετικός παράγοντας για τα bifidobacteria ή ως λειτουργικό συστατικό για την καλή λειτουργία του εντέρου. Ο β-γλυκοζιτικός δεσμός του δισακχαρίτη της λακτουλόζης δεν υδρολύεται από τα ένζυμα του πεπτικού συστήματος των θηλαστικών και ένα μέρος της λακτουλόζης που καταναλώνεται διέρχεται από το στομάχι και το λεπτό έντερο χωρίς να υποστεί κάποιου είδους υποβάθμιση. Στο παχύ έντερο, μεγάλος αριθμός βακτηρίων μεταβολίζουν τη λακτουλόζη και τρέφονται από αυτή. Από τη χρήση της λακτουλόζης ως τροφή, τα βακτήρια αυτά παράγουν γαλακτικό, οξικό και μυρμηκικό οξύ, καθώς και διοξείδιο του άνθρακα. Έτσι, η λακτουλόζη έχει προβιοτικές ιδιότητες καθώς διεγείρει την ανάπτυξη βακτηρίων που συνεισφέρουν στην υγεία του ανθρώπου, ενώ παράλληλα αναστέλλει την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων (Tabatabaie & Mortavai 2008).

Επίσης, η λακτουλόζη κατέχει ιδιότητες που είναι επιθυμητές για εφαρμογή τους στα τρόφιμα. Για παράδειγμα ενισχύει το άρωμα, προσδίδει ωραία εμφάνιση στα τρόφιμα μέσω της αντίδρασης Maillard, παρουσιάζει εξαιρετική διαλυτότητα στο νερό, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης ως γλυκαντικό μέσο για διαβητικούς, μέσω της υποκατάστασης της ζάχαρης σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής, αναψυκτικά, σκόνες γάλακτος για βρέφη, προϊόντα αρτοποιίας, γιαούρτια και προϊόντα διατροφής για ηλικιωμένους.

Παρά τις εφαρμογές της λακτουλόζης στο πεδίο των τροφίμων, οι εφαρμογές της στη φαρμακοβιομηχανία είναι περισσότερο διαδεδομένες και αφορούν στην

αντιμετώπιση της δυσκοιλιότητας, της ηπατικής εγκεφαλοπάθειας, επιπλοκών από ηπατικές νόσους, φορείς *Salmonella*, την πρόληψη καρκινογενέσεων, και τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης και της ινσουλίνης στο αίμα σε φυσιολογικά επίπεδα (Schumann 2002). Στην Εικόνα 14 απεικονίζεται ο μηχανισμός δράσης της λακτουλόζης και η επίδραση σε αυτόν από τον βακτηριακό μεταβολισμό.



Εικόνα 14. Μηχανισμός δράσης της λακτουλόζης και η επίδρασή του από τον βακτηριακό μεταβολισμό

(*SCFA: short-chain fatty acids, λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας, **GALT: gut-associated lymphatic tissue, λεμφικοί ιστοί του εντέρου)

Επίσης, η λακτουλόζη χορηγείται πριν από εγχειρήσεις, καθώς μπορεί να αποτρέψει την εμφάνιση επιπλοκών που σχετίζονται με ενδοτοξίνες, όπως είναι η νεφρική ανεπάρκεια. Τέλος, μια ακόμα εφαρμογή της αποτελεί η διάγνωση εντερικών διαταραχών, μέσω μιας μεθόδου που βασίζεται στην εκπνοή υδρογόνου. Πιο αναλυτικά, η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην στοματική χορήγηση μιας δόσης λακτουλόζης και τον προσδιορισμό του εκπνεομένου υδρογόνου τις επόμενες ώρες μετά τη χορήγηση. Το υδρογόνο παράγεται από το μεταβολισμό της λακτουλόζης από τα εντερικά βακτήρια, με το ποσό και το χρόνο παραγωγής υδρογόνου να συσχετίζονται με το χρόνο διέλευσης από το παχύ έντερο και τον μικροβιακό πληθυσμό.

Κεφάλαιο 6°

ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εξετάζει την αξιοποίηση του όξινου ορού προς παραγωγή συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Αυτή η προσέγγιση αντιμετώπισης των αποβλήτων της βιομηχανίας γιαουρτιού είναι πολλά υποσχόμενη, καθώς η ίδια η βιομηχανία θα μπορεί να επεξεργάζεται τα απόβλητά της και να τα αξιοποιεί για την παραγωγή καινοτόμων προϊόντων ή προϊόντων προς πώληση. Έτσι, η προσέγγιση αυτή όχι μόνο επιλύει ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της βιομηχανίας γιαουρτιού, αλλά μπορεί να της προσδώσει και κέρδος. Συγκεκριμένα, η παραγωγή GOS και λακτουλόζης μπορεί να ενισχύσει την οικονομία της βιομηχανίας γιαουρτιού χρησιμοποιώντας αυτά τα συστατικά στα γιαούρτια, προς εκμετάλλευση των προβιοτικών τους ιδιοτήτων. Παρακάτω αναφέρονται μελέτες σχετικά με την αξιοποίηση της λακτόζης προς σχηματισμό γαλακτοολιγοσακχαριτών και λακτουλόζης.

Οι Fischer και Kleinschmidt (2015) μελέτησαν την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών τόσο από όξινο όσο και από γλυκό ορό, καθώς και από διάλυμα καθαρής λακτόζης μέσω ενζυμικής αντίδρασης. Πραγματοποίησαν ενζυμικές αντιδράσεις με β-γαλακτοζιδάση από δύο διαφορετικούς μικροοργανισμούς, τον *Aspergillus oryzae* και τον *Kluyveromyces lactis* και μελέτησαν τις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης. Από τις μελέτες τους προέκυψε ότι τόσο ο γλυκός όσο και ο όξινος ορός μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για την παραγωγή GOS. Η λακτάση από τον *K. lactis* παρουσιάζει ευαισθησία στην περιεκτικότητα του ορού σε κατιόντα και η δράση της παρεμποδίζεται από τα άλατα. Το ένζυμο που προέρχεται από τον *A. oryzae* δε φάνηκε να δέχεται κάποιου είδους παρεμπόδιση. Χαρακτηριστικά, σε αρχική συγκέντρωση λακτόζης 38 g/L, το ένζυμο από τον *A. oryzae* έδωσε απόδοση σε GOS 10,9±0,01% σε πρότυπο διάλυμα λακτόζης, 10,9±0,18% σε γλυκό ορό γάλακτος και 11,3±0,59% σε όξινο ορό. Όπως φαίνεται, η αντίδραση τρανσγλυκοζιλίωσης δεν επηρεάστηκε από τη σύσταση των διαλυμάτων. Από την άλλη πλευρά, το ένζυμο από τον *K. lactis* έδειξε μία ισχυρή εξάρτηση από τη σύσταση του ορού. Σε αρχική συγκέντρωση λακτόζης 38 g/L, οι αποδόσεις σε GOS ήταν 10,9±0,26% σε πρότυπο διάλυμα λακτόζης, 4,30±0,17% σε γλυκό ορό και 10,6±0,41% σε όξινο ορό. Ωστόσο, με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης φάνηκε να μην υπάρχει σημαντικός βαθμός παρεμπόδισης.

Οι Rodriguez-Colinas et al. (2014) μελέτησαν την παραγωγή GOS από λακτόζη περιεχόμενη σε αποβουτυρωμένο γάλα, χρησιμοποιώντας β-γαλακτοζιδάση με διαφορετικές προελεύσεις (*Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* και *Aspergillus oryzae*) σε θερμοκρασίες 4°C και 40°C. Η μέγιστη συγκέντρωση GOS εντοπίστηκε σε μετατροπή 40-50% στις περιπτώσεις των ενζύμων από *B. circulans* και *A. oryzae*, ενώ στην περίπτωση β-γαλακτοζιδάσης

από τον *K. lactis* η κατανάλωση της λακτόζης έφτασε το 95%. Η μέγιστη παραγωγή GOS επιτεύχθηκε με το ένζυμο από τον *K. lactis* (7,0 g/L), ενώ η μικρότερη στην περίπτωση της β-γαλακτοζιδάσης από *A. oryzae* (4,5 g/L). Χρησιμοποιώντας ποσότητα ενζύμου 0,1 % v/v, η μέγιστη συγκέντρωση GOS με β-γαλακτοζιδάση από *K. lactis* επιτεύχθηκε σε 1 h στους 40°C και στις 5 h στους 4°C αντίστοιχα. Με τη χρήση αυτού του ενζύμου ήταν δυνατό να παρασκευαστεί γάλα με 7,0 g/L περιεκτικότητα σε GOS (οι ολιγοσακχαρίτες του μητρικού γάλακτος - Human Milk Oligosaccharides, HMOs - βρίσκονται σε συγκέντρωση 5-15 g/L), ενώ η περιεκτικότητα του επεξεργασμένου γάλακτος σε λακτόζη ήταν πολύ χαμηλή, σχεδόν 2,1 g/L (η αρχική περιεκτικότητα του γάλακτος σε λακτόζη ήταν 44-46 g/L). Τέλος βρέθηκε ότι, με τη β-γαλακτοζιδάση από *K. lactis*, οι κύριοι GOS που παρασκευάστηκαν ήταν η 6-γαλακτοβιόζη (6-galactobiose: Gal-b(1→6)-Gal), η αλλολακτόζη (allolactose: Gal-b(1→6)-Glc) και η 6'-O-β-γαλακτοσυλλακτόζη (6'-O-b-galactosyl-lactose: Gal-b(1→6)-Gal-b(1→4)-Glc).

Οι Urrutia et al. (2013) μελέτησαν την παραγωγή GOS ενζυμικά, με το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae* σε υπόστρωμα πρότυπου διαλύματος λακτόζης. Σε υπόστρωμα με περιεκτικότητα 400 g/L σε λακτόζη, με 15 U/mL ενζύμου, στους 40°C και τιμή pH υποστρώματος 4,5, παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή GOS, η οποία μετρήθηκε σε 26,8 % w/w με 70% μετατροπή της λακτόζης. Στη συγκεκριμένη μελέτη εντοπίστηκαν 17 υδατάνθρακες, με την 6'-O-β-γαλακτοσυλλακτόζη να είναι το κύριο προϊόν αποτελώντας το 1/3 (κατά βάρος) των συνολικών GOS. Σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες, ανιχνεύθηκε η παρουσία τουλάχιστον πέντε δισακχαριτών (με την αλλολακτόζη και την 6-γαλακτοβιόζη να αποτελούν του κύριους), οι οποίοι υπολογίστηκε ότι αποτελούσαν το 40% των συνολικών GOS, στο σημείο μέγιστης παραγωγής τους. Επίσης έδειξαν ότι η β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae* σχηματίζει β-(1→6), β(1→3) και β(1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ ισχυρίζονται με βάση άλλες μελέτες ότι η θερμοκρασία και το pH δεν αποτελούν σημαντικούς παράγοντες επίδρασης στην μέγιστη παραγωγή GOS, σε αντίθεση με την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη, που είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την αντίδραση. Τέλος υποστηρίζουν, ότι η προέλευση του ενζύμου έχει ιδιαίτερη σημασία στον τύπο των GOS που θα παραχθούν, όπως και στην απόδοση της αντίδρασης. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης με άλλες, που αφορούν την δράση της β-γαλακτοζιδάσης από *Kluyveromyces lactis* και *Bacillus circulans*, καταλήγουν ότι μεγαλύτερη απόδοση ως προς την παραγωγή GOS, όπως και πιο εξειδικευμένη παραγωγή, επιτυγχάνεται με τη χρήση β-γαλακτοζιδάσης από *B. circulans*.

Οι Iqbal et al. (2010) παρήγαγαν καθαρή β-γαλακτοζιδάση από *Lactobacillus plantarum* WCFS1, μελέτησαν τις ιδιότητες του ενζύμου, και στη συνέχεια ερεύντησαν την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών από αυτό, σε υπόστρωμα πρότυπου διαλύματος λακτόζης. Όσον αφορά στην μελέτη τους για την παραγωγή GOS, βρήκαν ότι η μέγιστη παραγωγή ήταν 41% w/w, με 85%

μετατροπή της λακτόζης σε υπόστρωμα πρότυπου διαλύματος λακτόζης συγκέντρωσης 600 mM, σε θερμοκρασία 37°C, τιμή pH της αντίδρασης 6,5 και δραστηριότητα ενζύμου 1 U/mL. Κατά την αντίδραση τρανσγλυκοζυλίωσης, το ένζυμο φάνηκε να σχηματίζει κατά προτίμηση γλυκοζιτικούς δεσμούς β-(1→6), σε ποσοστό 80% και β(1→3) σε ποσοστό 9%. Τα κύρια προϊόντα γαλακτοολιγοσακχαριτών που σχηματίστηκαν ήταν ο τρισακχαρίτης b-D-Galp-(1→6)-D-Lac, σε ποσοστό 34% των συνολικών GOS, και ο δισακχαρίτης b-D-Galp-(1→6)-D-Glc, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 29% των συνολικών GOS.

Οι Spletcha et al. (2007) μελέτησαν την ενζυμική παραγωγή GOS με β-γαλακτοζιδάση από τον *Lactobacillus reuteri* σε διεργασίες διαλείποντος και συνεχούς έργου και βρήκαν ότι οι δύο τύποι διεργασιών παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς την παραγωγή των GOS. Σε θερμοκρασία 37°C, τιμή pH 6,0 και συγκέντρωση υποστρώματος 600 mM σε λακτόζη, στην περίπτωση της διεργασίας διαλείποντος έργου η παραγωγή σε GOS ήταν 36%, με μετατροπή της λακτόζης 80%, ενώ στην περίπτωση της συνεχούς λειτουργίας, η παραγωγή των GOS ήταν 24%, με 50% μετατροπή της λακτόζης. Η παραγωγή των GOS ήταν χαμηλότερη στην συνεχή διεργασία, λόγω της χαμηλότερης παραγωγής τρισακχαριτών και τετρασακχαριτών στο διάλυμα της αντίδρασης. Ωστόσο, η επιλεκτικότητα του ενζύμου στον σχηματισμό δεσμού β(1→6) στην περίπτωση της συνεχούς διεργασίας (στην ημισυνεχή διεργασία το ένζυμο σχηματίζει β(1→6) και β(1→3) δεσμούς), έχει ως αποτέλεσμα η συνεχής διεργασία να παρουσιάζει το πλεονέκτημα του πιο εξειδικευμένου προϊόντος.

Οι Reuter et al. (1999) μελέτησαν την σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών ενζυμικά με β-γαλακτοζιδάση από διαφορετικούς μικροοργανισμούς και συγκεκριμένα από *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus oryzae* και *Escherichia coli*. Στόχος ήταν η σύγκριση της συνθετικής δυναμικότητας της β-γαλακτοζιδάσης από τον *S. solfataricus*, η οποία είναι σταθερή, με εμπορικά διαθέσιμη β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae*, η οποία είναι και αυτή θερμοσταθερή και με εμπορικά διαθέσιμη β-γαλακτοζιδάση από *E. coli* η οποία δεν εμφανίζει θερμοσταθερότητα. Η σύνθεση GOS μελετήθηκε σε ένα εύρος θερμοκρασιών και για την αντίδραση της τρανσγλυκοζυλίωσης, ως δότης μονομερών χρησιμοποιήθηκε η λακτόζη, ενώ ως δέκτης N-ακετυλλακτοζαμίνη (GlcNAc). Οι θερμοκρασίες που μελετήθηκαν ήταν οι 75°C και οι 65°C στην περίπτωση της β-γαλακτοζιδάσης από *S. solfataricus*, 60 και 50°C αντίστοιχα για προέλευση ενζύμου από τον *A. oryzae* και τέλος 37 και 30°C για την περίπτωση ενζυμικής αντίδρασης με β-γαλακτοζιδάση από *E. coli*, ενώ η συγκέντρωση της λακτόζης μελετήθηκε από 50 mM έως 1 M και η συγκέντρωση της GlcNAc από 10 mM έως 1 M. Η δραστηριότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 U/mL. Η τιμή του pH της αντίδρασης ήταν 7,0 για την περίπτωση προέλευσης της β-γαλακτοζιδάσης από *S. solfataricus*, 4,8 για την περίπτωση από *A. oryzae* και 7,3 για την περίπτωση από *E. coli*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ένζυμο από *S. solfataricus* οδήγησε σε υψηλότερες αποδόσεις (48%) στους 65°C, με 1 M λακτόζη και 1 M GlcNAc,

ακολουθούμενο από το ένζυμο από τον *A. oryzae* (36% απόδοση) στους 60°C με 1 M λακτόζη και 1 M GlcNAc, ενώ την χαμηλότερη απόδοση έδωσε η αντίδραση με τη β-γαλακτοζιδάση από *E. coli* (32%) στους 37°C με 500 mM λακτόζη και 500 mM GlcNAc. Τα κύρια προϊόντα που λήφθηκαν από την αντίδραση με τη β-γαλακτοζιδάση από τον *S. solfataricus* ήταν οι δισακχαρίτες b-D-Gal-[1-6]-D-GlcNAc, b-D-Gal-[1-4]-D-GlcNAc και κάποιοι ολιγοσακχαρίτες. Στην περίπτωση της β-γαλακτοζιδάσης από *A. oryzae* τα κύρια προϊόντα ήταν τα ίδια με τα προαναφερθέντα, σε χαμηλότερες όμως περιεκτικότητες. Στην περίπτωση αντίδρασης με β-γαλακτοζιδάση από *E. coli* το κύριο προϊόν ήταν ο δισακχαρίτης b-D-Gal-[1-6]-D-GlcNAc, ενώ οποιοδήποτε άλλο προϊόν ανιχνεύθηκε μόνο σε ίχνη.

Οι Seo et al. (2016) μελέτησαν την παραγωγή λακτουλόζης από γλυκό ορό με αλκαλικό καταλύτη ανθρακικό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ σύμφωνα με την αντίδραση Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein (LA), η οποία έχει αναλυθεί στην παράγραφο χημικής παραγωγής λακτουλόζης. Η μέγιστη απόδοση της αντίδρασης παρατηρήθηκε σε χρόνο 28,44min, με ανθρακικό αμμώνιο 0,76%, θερμοκρασία 97°C και ήταν 29,6%. Αυτή η έρευνα ουσιαστικά ανέδειξε το ανθρακικό αμμώνιο ως έναν καλό καταλύτη για αλκαλική παραγωγή λακτουλόζης, καθώς είναι εύκολος ο διαχωρισμός και η ανάκτησή του υπό σχετικά χαμηλή θερμοκρασία (<75°C) σε μικρό χρονικό διάστημα (<15 min).

Οι Song et al. (2013) παρήγαγαν λακτουλόζης ενζυμικά με ακινητοποιημένη β-γαλακτοζιδάση και ισομεράση της γλυκόζης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα φωσφορικό διάλυμα πρωτεϊνών ορού, χωρίς την προσθήκη φρουκτόζης. Το μόριο της φρουκτόζης που απαιτείται για το σχηματισμό λακτουλόζης δημιουργήθηκε με τη δράση της ισομεράσης σε γλυκόζη. Οι βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν ήταν σε 53,5°C με 20% αρχική συγκέντρωση λακτόζης στον ορό, 12 U/mL ακινητοποιημένη β-γαλακτοζιδάση και 60 U/mL ακινητοποιημένη ισομεράση σε 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου σε τιμή pH 7,5 με αποτέλεσμα συγκέντρωση 7,68 g/L λακτουλόζης και παραγωγικότητα 0,32 mg/(U·h). Τέλος, μετά από επαναχρησιμοποίηση των ενζύμων, η ενεργότητά τους ήταν 57,1% της αρχικής μετά και από την έβδομη χρήση τους.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, οι μελέτες που αφορούν στην παραγωγή GOS από όξινο ορό είναι πολύ λίγες και ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί προς αυτή την κατεύθυνση. Ο λόγος που η αξιοποίηση συγκεκριμένα του όξινου ορού είναι τόσο σημαντική είναι η χαμηλή τιμή του pH, που τον καθιστά επιβλαβή για το περιβάλλον και δύσκολα διαχειρίσιμο προς άλλες κατευθύνσεις. Ο γλυκός ορός δεν είναι τόσο επιβλαβής (η τιμή του pH του είναι σημαντικά ψηλότερη, 6-6,5) για το περιβάλλον, ενώ είναι ο τύπος ορού που χρησιμοποιείται κυρίως για την παρασκευή πρωτεϊνών. Προς το πεδίο αξιοποίησης του όξινου ορού ελκυστική είναι και η παραγωγή λακτουλόζης με προσθήκη φρουκτόζης στον ορό.

Κεφάλαιο 7^ο

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

7.1 ΣΚΟΠΟΣ



Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο τη διερεύνηση της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό, ένα απόβλητο της γαλακτοβιομηχανίας που είναι πλούσιο σε συστατικά υψηλής προστιθέμενης αξίας, η αξιοποίηση των οποίων δυσχεραίνεται από τη χαμηλή τιμή pH του ορού. Στην συγκεκριμένη

εργασία μελετάται η αξιοποίηση της λακτόζης, με σκοπό τη μετατροπή της σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Galacto-oligosaccharides, GOS). Η μετατροπή της λακτόζης σε GOS γίνεται μέσω ενζυμικής αντίδρασης με χρήση του ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης, το οποίο διασπά τη λακτόζη στα μονομερή της, τα οποία στη συνέχεια αποτελούν υπόστρωμα για τον σχηματισμό των GOS μέσω πάλι της δράσης του ίδιου ενζύμου. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία για την επίτευξη αυτού του σκοπού μπορούν να συνοψισθούν στα ακόλουθα:

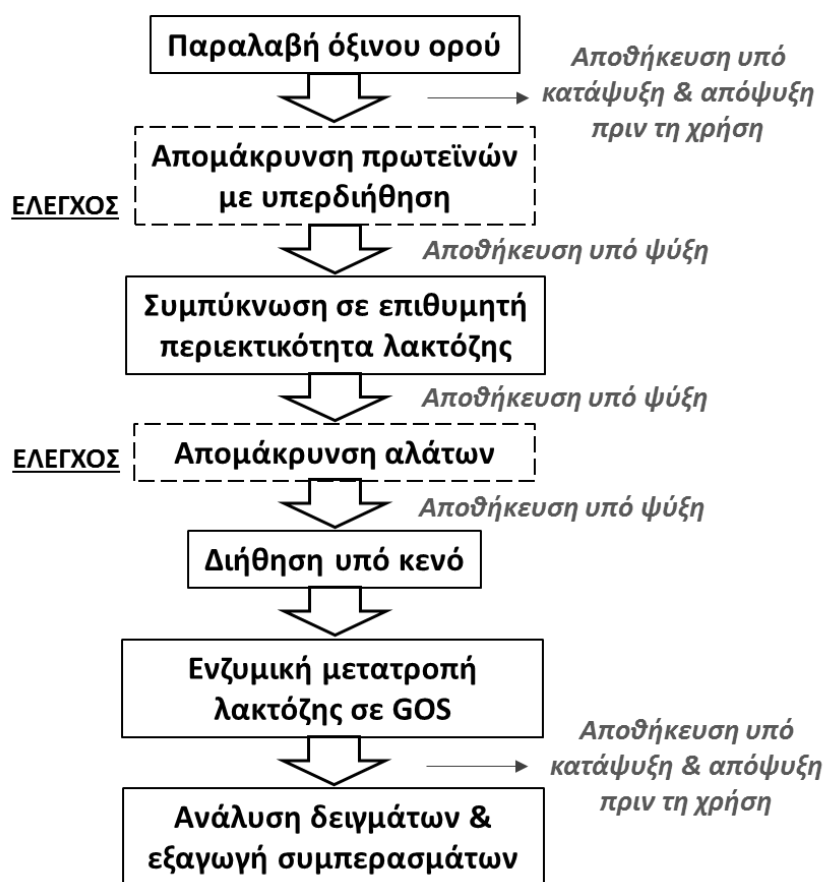
- I. Παραλαβή όξινου ορού
- II. Προετοιμασία όξινου ορού σε κατάλληλο υπόστρωμα για την ενζυμική αντίδραση
- III. Ενζυμική αντίδραση
- IV. Παραλαβή δειγμάτων ενζυμικής αντίδρασης και ανάλυσή τους.

7.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Πρώτο βήμα για τη μετατροπή της περιεχόμενης στον ορό λακτόζης σε GOS είναι ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του ορού σε λακτόζη και η συμπύκνωσή του, ώστε η τελική περιεκτικότητα σε λακτόζη να είναι εκμεταλλεύσιμη (Εικόνα 15). Η μετατροπή της λακτόζης σε GOS γίνεται ενζυμικά με β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae* και το υπόστρωμα θα πρέπει να ευνοεί τη δράση του ενζύμου. Δεδομένου ότι ο όξινος ορός περιέχει επιπρόσθετα και άλλα συστατικά, όπως πρωτεΐνες και άλατα, κρίθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί το κατά πόσο τα συστατικά αυτά δρουν παρεμποδιστικά στη δράση του ενζύμου. Για τον σκοπό αυτό η απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των αλάτων μπορεί να

πραγματοποιηθεί με υπερδιήθηση και θέρμανση-φυγοκέντρηση αντίστοιχα. Επειδή κατά την υπερδιήθηση η περιεκτικότητα του ορού σε λακτόζη μειώνεται, το στάδιο αυτό προηγείται της συμπύκνωσης ώστε να είναι γνωστή η περιεκτικότητά του σε λακτόζη.

Αφού ο ορός μετατραπεί στο πλέον κατάλληλο υπόστρωμα για την ενζυμική αντίδραση, πραγματοποιείται σε αυτόν προσθήκη του ενζύμου σε κατάλληλες ενζυμικές συγκεντρώσεις. Η επιλογή των συνθηκών της ενζυμικής αντίδρασης αντικατοπτρίζουν ποιες παράμετροι θα μελετηθούν. Σκοπός είναι η βέλτιστη απόδοση της αντίδρασης ως προς την παραγωγή GOS. Η επίτευξη του σκοπού ταυτίζεται με τη μέγιστη μείωση της περιεχόμενης στο υπόστρωμα λακτόζης. Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των προϊόντων και των αντιδρώντων της αντίδρασης είναι το τελικό στάδιο για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων. Σημειώνεται ότι ο ορός, μετά την παραλαβή του, αποθηκεύεται υπό κατάψυξη μέχρι τη χρήση του, ενώ στις ενδιάμεσες φάσεις αποθηκεύεται υπό ψύξη.



Εικόνα 14. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα ροής στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκαν τα ακόλουθα:

- Η διαφοροποίηση της παραγωγής GOS σε υπόστρωμα πρότυπης λακτόζης και υπόστρωμα ορού στις ίδιες συνθήκες (Πίνακας 13). Το ένζυμο μπορεί να συμπεριφέρεται διαφορετικά σε διαφορετικό υπόστρωμα, οπότε κρίθηκε αναγκαία η συσχέτιση της δράσης του σε πρότυπη λακτόζη και σε λακτόζη όξινου ορού. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε περιεκτικότητα υποστρώματος σε λακτόζη 15% w/v (weight/volume: βάρος κατ' όγκο).

Πίνακας 13. Έλεγχος της επίδρασης της προέλευσης του υποστρώματος στην ενζυμική αντίδραση

	Υπόστρωμα	Ενζυμική Δραστητικότητα (U/mL αντίδρασης)	Τιμή pH υποστρώματος	Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)
Δείγμα 1	Πρότυπη λακτόζη	0,24	4,20	55
Δείγμα 2	Λακτόζη όξινου ορού	0,24	4,20	55

- Η επίδραση των συστατικών του ορού, και συγκεκριμένα των πρωτεϊνών και των αλάτων, στην ενζυμική αντίδραση (Πίνακας 14). Ο έλεγχος αυτός είναι σημαντικός, διότι ερευνάται αν οι διεργασίες της απομάκρυνσης των πρωτεϊνών και των αλάτων είναι απαραίτητες, γεγονός που κάνει τη συνολική διεργασία περισσότερο ενεργοβόρα και το υπόστρωμα καταπονείται περισσότερο. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε δείγματα όξινου ορού με περιεκτικότητα υποστρώματος σε λακτόζη 15% w/v (weight/volume: βάρος κατ' όγκο).

Πίνακας 14. Έλεγχος της επίδρασης της σύστασης του υποστρώματος στην ενζυμική αντίδραση

	Υπόστρωμα	Ενζυμική Δραστητικότητα (U/mL αντίδρασης)	Τιμή pH υποστρώματος	Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)
Δείγμα 1	Χωρίς απομάκρυνση πρωτεϊνών	0,24	4,20	55
Δείγμα 2	Με απομάκρυνση πρωτεϊνών	0,24	4,20	55
Δείγμα 1'	Χωρίς απομάκρυνση αλάτων	0,24	4,20	55
Δείγμα 2'	Με απομάκρυνση αλάτων	0,24	4,20	55

- Η επίδραση της περιεκτικότητας του ορού σε λακτόζη στην ενζυμική αντίδραση (Πίνακα 15). Ο έλεγχος αυτός είναι σημαντικός, διότι ερευνάται η αναγκαιότητα της συμπύκνωσης του υποστρώματος σε υψηλές περιεκτικότητες σε λακτόζη, με αποτέλεσμα η συνολική διεργασία να γίνεται αρκετά χρονοβόρα. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε δείγματα όξινου ορού χαμηλής και υψηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη, με το τελευταίο να έχει προηγούμενα υποστεί και απομάκρυνση τόσο των πρωτεϊνών όσο και των αλάτων.

Πίνακας 15. Έλεγχος της επίδρασης της περιεκτικότητας του υποστρώματος σε λακτόζη στην ενζυμική αντίδραση

	Περιεκτικότητα σε λακτόζη (%w/v)	Ενζυμική Δραστικότητα (U/mL αντίδρασης)	Τιμή pH υποστρώματος	Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)
Δείγμα 1	15	0,24	4,20	55
Δείγμα 2	32	0,24	4,20	55

Σε μελέτες που έχουν ως στόχο την βελτιστοποίηση μιας διεργασίας, κατασκευάζονται μοντέλα ακολουθώντας δεδομένες μεθοδολογίες, όπως π.χ. η μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης (response surface methodology, RSM), που ανάλογα με τον αριθμό των παραμέτρων του συστήματος απαιτείται η πραγματοποίηση συγκεκριμένου αριθμού πειραμάτων, τα οποία θα εξετάζουν μεταξύ άλλων και την αλληλεπίδραση των παραμέτρων αυτών. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν δύο παράμετροι, αυτές της θερμοκρασίας και της χρησιμοποιούμενης ενζυμικής δραστικότητας, οδηγώντας στην πραγματοποίηση δεκαέξι (16) πειραματικών σειρών, καθώς ελέγχθηκαν τόσο οι επιμέρους επιδράσεις τους στο μελετώμενο σύστημα όσο και η αλληλεπίδρασή τους. Η επιλογή των τιμών των παραμέτρων δεν έγινε τυχαία, αλλά στηρίχθηκε αφενός σε βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά στο μελετώμενο θερμοκρασιακό εύρος, και πειραματικά όσον αφορά στην χρησιμοποιούμενη ενζυμική δραστικότητα. Έτσι, μελετήθηκαν:

- Η απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης σε ένα εύρος θερμοκρασιών 40-55°C, ώστε να επιλεγεί η βέλτιστη θερμοκρασία παραγωγής GOS. Βιβλιογραφικά είναι γνωστό ότι η βέλτιστη θερμοκρασία παραγωγής GOS με χρήση ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης από τον *A. oryzae* σε υπόστρωμα πρότυπης λακτόζης είναι οι 40°C (Urrutia et al. 2013), ενώ σε υπόστρωμα όξινου ορού οι 55°C (Fischer & Kleinschmidt 2015). Από τον προμηθευτή, δίνεται ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι οι 50°C. Έτσι, κρίθηκε απαραίτητη η

μελέτη της βέλτιστης θερμοκρασίας αντίδρασης μετατροπής της λακτόζης σε GOS.

- Η βέλτιστη δραστικότητα ενζύμου σε υπόστρωμα ορού με 15% w/v περιεκτικότητα σε λακτόζη. Αναγκαία είναι η διερεύνηση της ποσότητας του ενζύμου που οδηγεί στη βέλτιστη απόδοση της αντίδρασης, ώστε να μην εισάγεται περισσότερο ένζυμο από όσο χρειάζεται (οικονομικά ασύμφορο) αλλά ούτε λιγότερο από αυτό που θα δώσει την μέγιστη παραγωγή σε GOS (μη μετατροπή της μέγιστης λακτόζης σε GOS, οπότε και η διεργασία δεν έχει φτάσει στο βέλτιστο σημείο, απώλεια προϊόντος). Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση της ενζυμικής δραστικότητας στην απόδοση της αντίδρασης προς GOS, για ένα εύρος ενζυμικής δραστικότητας 2,4-9,6 U/mL.

7.3 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Οι συσκευές και τα όργανα, καθώς και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

ΣΥΣΚΕΥΕΣ-ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή απομάκρυνση πρωτεϊνών Amino pellicon 300 mL (M8400, Millipore, ΗΠΑ)
- Εξοπλισμός Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης HPLC ((HPLC system Agilent series 1100, Γερμανία) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης RI (RI Hewlett Packard 1047A, Ιαπωνία), απαερωτή (degasser Hewlett Packard series 1200 G1379B, Ιαπωνία) και αντλία (iso pump G1310A Agilent series 1100, Γερμανία)
- Σύστημα συμπύκνωσης με εξάτμιση υπό κενό (Rotary evaporators, Hel-VAP, Heidolph, Γερμανία)
- Μαγνητικός αναδευτήρας με εστία βρασμού (Velp Scientifica, Ιταλία)
- Αναλυτικό ζυγός (Precisa, Ελβετία)
- Διάταξη διήθησης υπό κενό
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Helios α Unicam, Γερμανία)
- Φυγόκεντρος (Heraeus megafure 16R, ThermoFischer Scientific, ΗΠΑ)
- Υδατόλουτρο (Bio Line Scientific, Ελλάδα)
- Ψυγείο (Hotpoint Ariston, Ιταλία)
- Καταψύκτης (Pitsos, Ελλάδα)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Όξινος ορός από τη Δέλτα Τρόφιμα Α.Ε.
- H₂O υψηλού βαθμού καθαρότητας για αναλύσεις HPLC (Sigma-Aldrich, Γερμανία)
- Ακετονιτρίλιο υψηλού βαθμού καθαρότητας για αναλύσεις HPLC (Fisher Scientific, Γερμανία)
- Λακτόζη (Lactose hydrous C₁₂H₂₂O₁₁·H₂O, Malinckrodt chemical works, ΗΠΑ)
- Γαλακτόζη (D(+)-Galactose extra pure, C₆H₁₂O₆, Art. 4061, Merck, Γερμανία)
- Γλυκόζη (D (+)-glucose anhydrous for bacteriology, HOCH₂CH(CHOH)₄O, Fluka-Garantie, Γερμανία)
- Φρουκτόζη (D(+)-Fructose, Guarantee analysis, Riedel-de Haën, Γερμανία)
- Τρεχαλόζη (D(+)-Trehalose Dihydrate for microbiology (assay 99%-HPLC), Fluka BioChemika, Ελβετία)
- Μελιβιόζη (anhydrous α-D(+)-Melibiose No M-5500, Sigma chemical Company, ΗΠΑ)
- Σακχαρόζη (EBZ, Ελλάδα)
- Μαλτόζη ((+)-Maltose, Riedel-de Haën seelze-Hannover, Γερμανία)
- Ραφινόζη (D(+)-Raffinose Pentahydrat puriss.p.a., Fluka-Garantie, Γερμανία)
- Σταχυόζη (stachyose hydrate from *Stachys tuberifa*, Sigma analytica, USA)
- Αλβουμίνη ορού αγελαδινής προέλευσης, (Ficher Scientific, Αγγλία)
- Ανθρακικό νάτριο (sodium carbonate, anhydrous a.r., Chem-Lab NV, Βέλγιο)
- Δείκτης Coomasie Coomar Blue (CI 42655, Coomassie Brilliant Blue G, Dye content approx.. 98%, Sigma, Γερμανία)
- ορθο- νιτροφαινόλη (o-NPG) (Sigma-Aldrich chemie GmbH, Γερμανία)
- παρα-νιτροφαινόλη (pNP) (Sigma-Aldrich chemie GmbH, Γερμανία)

ΕΝΖΥΜΑ

- Ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* (G5160, Sigma Aldrich, Γερμανία)

7.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΑΔΙΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

7.4.1 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΟΞΙΝΟΥ ΟΡΟΥ

Ο όξινος ορός που χρησιμοποιείται προέρχεται από απόβλητα γιαουρτιού της Ελληνικής Βιομηχανίας ΔΕΛΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ Α.Ε. Μελετήθηκαν απόβλητα με δύο διαφορετικές ημερομηνίες συλλογής (26/02/2016 και 01/03/2016), ώστε να ελεγχθεί πιθανή διαφοροποίηση της σύστασης του ορού σε λακτόζη ανάλογα με την ημερομηνία συλλογής του. Ο ορός που παραλήφθηκε είχε χαμηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη και για αυτό τον λόγο έπρεπε να επεξεργαστεί κατάλληλα, ώστε να αποτελέσει κατάλληλο υπόστρωμα για την ενζυμική αντίδραση.

7.4.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΟΞΙΝΟΥ ΟΡΟΥ ΣΕ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

7.4.2.1 ΑΥΞΗΣΗ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΣΕ ΛΑΚΤΟΖΗ

Ο ορός χαμηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη που παραλήφθηκε μετατράπηκε μέσω συμπύκνωσης με εξάτμιση υπό κενό σε ένα υπόστρωμα υψηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη. Η συσκευή με την οποία πραγματοποιήθηκε η συμπύκνωση παρουσιάζεται στην Εικόνα 16. Τα αριθμημένα σημεία αναφέρονται σε:

1. Χοάνη που λειτουργεί ως συνεχής τροφοδοσία του δείγματος στο σύστημα
2. Λουτρό του οποίου η θερμοκρασία ρυθμίζεται κατάλληλα για την εξάτμιση του δείγματος, στο οποίο είναι τοποθετημένη η φιάλη συλλογής του συμπυκνώματος. Η φιάλη βρίσκεται υπό ανάδευση ώστε το δείγμα να βρίσκεται στην ίδια θερμοκρασία σε όλα τα σημεία του και να αποφεύγονται φαινόμενα βρασμού



Εικόνα 16. Συσκευή συμπύκνωσης μέσω εξάτμισης υπό κενό

3. Ρυθμιστής θερμοκρασίας λουτρού
4. Ρυθμιστής ανάδευσης της φιάλης συλλογής του συμπυκνώματος
5. Αντλία κενού
6. Φιάλη συλλογής ατμού
7. Ψυκτήρας τύπου Dimroth
8. Παροχή νερού
9. Φιάλη συλλογής συμπυκνώματος

Το σύστημα λειτουργεί υπό κενό, ώστε να μπορεί να γίνει η συμπύκνωση σε χαμηλές θερμοκρασίες και με μεγαλύτερη απόδοση. Το κενό δημιουργείται μέσω μιας αντλίας, η οποία είναι συνδεδεμένη με τον ψυκτήρα. Ο ψυκτήρας τύπου Dimroth διαθέτει μια στρόφιγγα, η οποία ανάλογα με τη θέση στην οποία βρίσκεται, επιτυγχάνεται ή όχι κενό. Ο ψυκτήρας επικοινωνεί μέσω σωλήνα με τη χοάνη, από όπου το δείγμα εισέρχεται στο σύστημα λόγω διαφοράς πίεσης, και καταλήγει στη φιάλη συλλογής του συμπυκνώματος.

Στην παρούσα εργασία, ο συμπυκνωτήρας εξάτμισης λειτουργούσε υπό κενό σε θερμοκρασία 52°C και με συνεχή ανάδευση στα 190-220 rpm. Η θερμοκρασία επιλέχθηκε με βάση την απόδοση της διεργασίας σε σχέση με το χρόνο (επιτάχυνση με αύξηση της θερμοκρασίας), και οι στροφές επιλέχθηκαν σε αυτό το εύρος, προκειμένου η ανάδευση να είναι ικανοποιητική ως προς το δείγμα στη φιάλη συλλογής του συμπυκνώματος (κάθε σημείο του δείγματος να έχει την ίδια θερμοκρασία και να αποφεύγονται φαινόμενα βρασμού και αναρρόφησης του δείγματος στον ψυκτήρα).

7.4.2.2 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ο όξινος ορός προκειμένου να αποτελέσει υπόστρωμα για την ενζυμική μετατροπή της λακτόζης σε GOS υφίστανται απομάκρυνση του πρωτεϊνικού περιεχομένου του, ώστε το υπόστρωμα να είναι όσο το δυνατόν καθαρότερο και να αποφευχθούν τυχόν παρεμποδίσεις του ενζύμου από άλλα στοιχεία. Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με υπερδιήθηση σε σύστημα amino pellicon, όπου ο διαχωρισμός στηρίζεται σε μια μεμβράνη, η οποία διαχωρίζει, με βάση το μοριακό βάρος, τα περιεχόμενα συστατικά του ορού. Οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στον όξινο ορό είναι γνωστές βιβλιογραφικά, με την α-γαλακτοαλβουμίνη να εμφανίζει το μικρότερο μέγεθος (14 kDa), και έτσι επιλέχθηκε μεμβράνη με κατώτερο όριο διέλευσης μορίων τα 10 kDa. Η συσκευή amino pellicon που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 17.

Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών με το σύστημα amino pellicon γίνεται σε πιέσεις που δεν ξεπερνούν τα 75 psi, και για λόγους ασφαλείας επιλέχθηκε λειτουργία του συστήματος στα 60 psi. Το σύστημα καθαριζόταν με διάλυμα

NaOH 0,1 N και οι μεμβράνες φυλάσσονταν σε δοχεία, εμβαπτισμένες σε οινόπνευμα στους 5°C και πριν την εισαγωγή του δείγματος γινόταν πλύση τους με απιονισμένο H₂O.



Εικόνα 17. Συσκευή amino pellicon

7.4.2.3 ΘΕΡΜΑΝΣΗ ΚΑΙ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

Κατά την παραμονή του ορού σε λουτρό θερμοκρασίας 50°C (Εικόνα 18) παρατηρήθηκε η δημιουργία ιζήματος, το οποίο γίνεται η υπόθεση ότι αποτελείται από άλατα. Η υπόθεση αυτή στηρίχθηκε σε δοκιμές προσδιορισμού του πρωτεϊνικού περιεχομένου του ιζήματος με τη μέθοδο Bradford, το οποίο προσδιορίστηκε ως μηδενικό. Επίσης σε ορό ελεύθερο πρωτεϊνών, ύστερα από θέρμανση σε θερμοκρασία 50°C, παρατηρήθηκε η εμφάνιση ιζήματος. Οι δύο παραπάνω ενέργειες απέρριψαν το ενδεχόμενο, η σύσταση του ιζήματος να είναι πρωτεϊνικής φύσης. Τέλος, σύμφωνα με τους Chandrapala et al. (2015), σε θερμοκρασίες άνω των 50°C, υπάρχει μια αναλογική σχέση της ανόδου της θερμοκρασίας με την μείωση των επιπέδων διαλυτότητας του ασβεστίου και των φωσφορικών αλάτων στον όξινο ορό. Θεωρήθηκε επιθυμητό να απομακρυνθεί αυτό το ίζημα ώστε η δράση του ενζύμου να μην επηρεάζεται δυσμενώς από παράγοντες που δεν συμμετέχουν στην ενζυμική αντίδραση μετατροπής της λακτόζης σε GOS. Για τον σκοπό αυτό ο ορός παρέμεινε σε σταθερή κατάσταση στους 50°C για 5 h και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 rpm για 20 min και το υπερκείμενο υγρό αποθηκεύτηκε για περαιτέρω χρήση.



Εικόνα 18. Λουτρό θέρμανσης

7.4.3 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Το κύριο στάδιο της διεργασίας είναι η ενζυμική αντίδραση (Εικόνα 19), δηλαδή η μετατροπή της λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Η αντίδραση γίνεται με το ένζυμο γαλακτοζιδάση (από *Aspergillus oryzae* στην παρούσα διπλωματική), το οποίο διασπά τον β-γλυκοζιτικό δεσμό της λακτόζης, και υπό κατάλληλες συνθήκες, διενεργεί και σχηματισμό του δεσμού, μέσω αντίδρασης τρανσγλυκοζιλίωσης.

Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε εμπορικό ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης, το οποίο παράγεται από το μύκητα *Aspergillus oryzae*.



Εικόνα 19. Ενζυμική αντίδραση σε λουτρό

Πρέπει να τονιστεί ότι το σύστημα της ενζυμικής αντίδρασης είναι δυναμικό και οι δύο μορφές δράσεις του ενζύμου πραγματοποιούνται παράλληλα. Για την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης θα πρέπει να ρυθμιστούν κάποιες παράμετροι, με σκοπό την καλύτερη απόδοση του συστήματος, οι οποίες είναι:

α) η θερμοκρασία της αντίδρασης, γνωρίζοντας ότι το εύρος θερμοκρασίας για τη βέλτιστη δράση του ενζύμου είναι 40-55°C (Fischer & Kleinschmidt 2015, Urrutia et al. 2013),

β) η τιμή pH του υποστρώματος, γνωρίζοντας ότι η βέλτιστη τιμή pH για τη δράση του ενζύμου είναι 4,00-4,50 (Fischer & Kleinschmidt 2015, Urrutia et al. 2013),

γ) η χρησιμοποιούμενη δραστηριότητα του ενζύμου,

δ) η συγκέντρωση του υποστρώματος σε λακτόζη, και

ε) ο χρόνος της αντίδρασης.

Οι παραπάνω παράμετροι πρέπει να εξεταστούν συνδυαστικά, ώστε να διεξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την βελτιστοποίηση της αντίδρασης, δηλαδή τη μέγιστη κατανάλωση λακτόζης σε συνδυασμό με τη μέγιστη παραγωγή GOS.

7.4.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι:

1. Μέθοδος προσδιορισμού των πρωτεϊνών κατά Bradford
2. Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης
3. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

7.4.4.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ BRADFORD

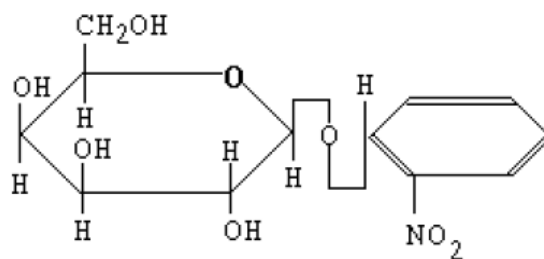
Η μέθοδος Bradford είναι μια φασματοφωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ενός διαλύματος. Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην παρατήρηση ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινες συνθήκες απορροφά στα 465 nm όταν είναι μόνη της στο διάλυμα και η απορρόφηση αυτή μετατοπίζεται στα 595 nm όταν είναι προσδεσμένη σε πρωτεΐνη. Οι ιοντικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της χρωστικής με την πρωτεΐνη δημιουργούν μια σταθερή ιονική μορφή της χρωστικής που απορροφά στα 595 nm. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη διότι ο συντελεστής απορρόφησης του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερός σε μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων. Απλά για κάθε περιοχή (χαμηλή ή υψηλή συγκέντρωση) πρέπει να γίνει διαφορετική καμπύλη αναφοράς.

Η χρωστική Bradford παρασκευάζεται ως εξής: Διαλύονται 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 σε 50 mL διαλύματος αιθανόλης (ethanol) 95% και προστίθενται 100 mL διαλύματος φωσφορικού οξέους (phosphoric acid) 85% v/v (volume/volume: όγκου κατ' όγκο). Για την φωτομέτρηση, οι αναλογίες δείγματος:χρωστικής Bradford είναι 1:50 και η φωτομέτρηση πραγματοποιείται 5 min μετά την ανάμειξη του διαλύματος της πρωτεΐνης με την χρωστική.

Για τη χρήση της μεθόδου κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη πρωτεϊνών με τη βοήθεια πρωτεϊνικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Στην παρούσα εργασία, η πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε με αλβουμίνη ορού (Bovine Serum Albumin, BSA) και η ποσοτικοποίηση έγινε μέσω μέτρησης της απορρόφησης στα 595 nm με φασματόμετρο UV-Vis. Τα πρότυπα διαλύματα πρωτεΐνης παρασκευάστηκαν με αραιώσεις μητρικού διαλύματος BSA 0,10% w/v.

7.4.4.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ

Για την μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης από *A. oryzae* χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα, αντί της λακτόζης, η ένωση ορθο-νιτροφαινόλο-β-D-γαλακτοπυρανόζη (oNPG, Εικόνα 20). Η ένωση αυτή αποτελείται από ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο ορθο-νιτροφαινόλης ενωμένα με β-D-γαλακτοζιτικό δεσμό, τον οποίο η β-γαλακτοζιδάση αναγνωρίζει και υδρολύει. Στην ουσία το μόριο της oNPG αποτελεί απομίμηση του μορίου της λακτόζης.



Εικόνα 20. Μόριο ορθο-νιτροφαινόλης (oNPG)

Για τη β-γαλακτοζιδάση, ως 1 Unit ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol ορθο-νιτροφαινόλης ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος (oNPG), σε τιμή pH 4,0 και θερμοκρασία 50°C.

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Αραίωση 1:10 του διαλύματος του ενζύμου (1 mg ενζύμου/ mL ρυθμιστικού διαλύματος τιμής pH 8)
- 2) Παρασκευή διαλυμάτων oNPG συγκέντρωσης 0,3 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα τιμής pH 4,0.
- 3) Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται 2,5 mL διαλύματος oNPG και ακολουθεί προσθήκη 0,2 mL απιονισμένου νερού για το τυφλό δείγμα και 0,2 mL ενζύμου στους υπόλοιπους. Μετά από ανάδευση, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50°C.
- 4) Μετά την πάροδο 10 min, οι σωλήνες μεταφέρονται σε παγόλουτρο και σε καθέναν από αυτούς προστίθενται 0,5 mL Na_2CO_3 30% w/v.
- 5) Φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 410nm.

Για την μέτρηση της δραστηρότητας του ενζύμου, με βάση τα παραπάνω πρέπει να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς της oNPG ώστε να μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα oNPG που απελευθερώνεται ανά λεπτό ενζυμικής αντίδρασης. Επειδή η oNPG πριν την διάσπασή της από τη β-γαλακτοζιδάση δεν απορροφά στο φασματοφωτόμετρο, για αυτό για την καμπύλη αναφοράς της χρησιμοποιείται η παρα-νιτροφαινόλη (pNP).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της pNP είναι μέσω παρασκευής πρότυπων διαλυμάτων pNP και μέτρησης της απορρόφησής τους στα 410 nm. Πιο αναλυτικά, παρασκευάστηκαν μητρικά διαλύματα pNP 0,30 g/L, τα οποία αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα p-νιτροφαινόλης τελικής συγκέντρωσης 0,05, 0,1, 0,15, 0,25 και 0,3 mM και τελικού όγκου 2 mL. Σε 2,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος τιμής pH 10 προστέθηκαν 0,5 mL από κάθε διάλυμα p-νιτροφαινόλης και τα τελικά διαλύματα ανακινήθηκαν επαρκώς. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε φωτόμετρο UV-Vis στα 410 nm και το τυφλό δείγμα ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα τιμής pH 10.

7.4.4.3 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, άρα ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Στην HPLC, το δείγμα εισάγεται στην είσοδο της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία το κύριο αναλυτικό όργανο που χρησιμοποιείται είναι η HPLC. Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι η Microsorb-MV 100 NH₂ (250 mm x 4,6 mm, R0086700C5, Agilent Technologies, Γερμανία), συνοδευόμενη από όμοιου τύπου προ-στήλη Polaris 5 NH₂ MetaGuard (50 mm x 4,6 mm, A2013MG, Agilent Technologies, Γερμανία).

Λόγω της πολυπλοκότητας των δειγμάτων, για λόγους ασφαλείας και καλής λειτουργίας της στήλης, όλα τα δείγματα πριν εισαχθούν στην HPLC φιλτράρονται με νάιλον φίλτρα πορώδους 0,22 μm. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των σακχάρων είναι τύπου RI (Refractive Index), ο οποίος βασίζεται στη μέτρηση της διαφοράς του δείκτη διάθλασης μεταξύ της καθαρής κινητής φάσης και αυτής που περιέχει μονο- ή ολιγο-σακχαρίτες.

Η επιλογή της στήλης και της μεθόδου έγινε σύμφωνα με τους Fischer & Kleinschmidt (2015), κατά την οποία ως κινητή φάση χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο/νερό σε αναλογία 70:30, η ροή του διαλύτη ρυθμίζεται στα 1,3 mL/min και η ανάλυση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (22-25°C).

Κεφάλαιο 8^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

8.1 ΧΡΟΝΟΙ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ HPLC-RI

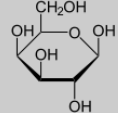
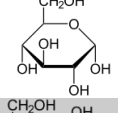
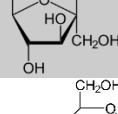
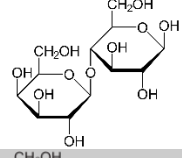
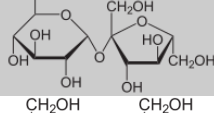
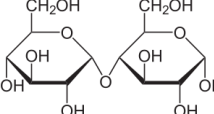
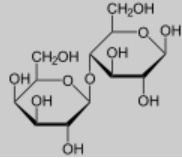
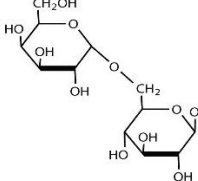
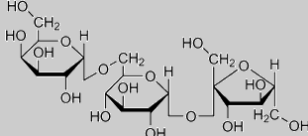
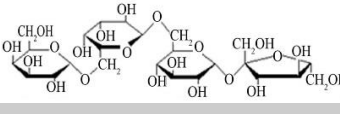
Στον Πίνακα 16 παρουσιάζεται μια ποικιλία σακχάρων, συμπεριλαμβανομένων μονοσακχαριτών και ολιγοσακχαριτών με βαθμό πολυμερισμού από 2-4, καθώς και μιγμάτων τους, και οι αντίστοιχοι χρόνοι έκλουσής τους με διαλύτη ACN:H₂O σε αναλογία 70:30. Όπως προκύπτει από τον πίνακα, με το διαλύτη και τη στήλη που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις, τα σάκχαρα φαίνεται να εκλούνται ομαδοποιημένα ανάλογα με το είδος τους. Χαρακτηριστικά, οι μονοσακχαρίτες γαλακτόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη όταν υπάρχουν και οι τρεις στο δείγμα φάνηκε να εκλούνται στον ίδιο χρόνο.

Αναφορικά με τους δισακχαρίτες παρατηρήθηκε ότι, στην περίπτωση ενώσεων που αποτελούνται από τα ίδια μονομερή σάκχαρα (λακτόζη, μελιβιόζη) αυτοί συνεκλούνται, ενώ αντίθετα στην περίπτωση ενώσεων με διαφορετικά μονομερή σάκχαρα, αυτοί εκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους. Για παράδειγμα, σε μίγμα με γλυκόζη-γαλακτόζη-λακτόζη-σακχαρόζη-μαλτόζη-τρεχαλόζη, οι μονοσακχαρίτες εκλούνται σε χρόνο 5,20 min, η λακτόζη στα 7,89 min, η σακχαρόζη στα 6,31 min και οι δισακχαρίτες με μονομερή γλυκόζης (μαλτόζη, τρεχαλόζη) στα 7,39 min. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η μαλτόζη και η τρεχαλόζη διαφέρουν ως προς το είδος του δεσμού που δημιουργείται μεταξύ των μονομερών τους σακχάρων, συμπεραίνεται ότι στο συγκεκριμένο σύστημα HPLC, η επιλεγμένη στήλη έχει την ικανότητα να διαχωρίζει τα όμοιου βαθμού σάκχαρα ανάλογα το είδος των μονομερών από τα οποία αποτελούνται, αλλά όχι και ως προς το είδος των δεσμών. Επιπλέον, είναι δυνατός ο διαχωρισμός των σακχάρων ανάλογα το βαθμό πολυμερισμού τους, τουλάχιστον μέχρι και για βαθμό 4, που ερευνήθηκε.

Με βάση τα παραπάνω και δεδομένου ότι ο τρισακχαρίτης της ραφινόζης έχει χρόνο έκλουσης περίπου στα 10 min, ενώ ο τετρασακχαρίτης της σταχυόζης στα 13,2 min, και δεδομένου ότι περιέχουν στο μόριό τους το σάκχαρο της φρουκτόζης, το συμπέρασμα που μπορεί να διεξαχθεί είναι ότι το προϊόν της αντίδρασης πιθανόν είναι ένα μίγμα GOS με βαθμό πολυμερισμού 3, αφού η σταχυόζη έχει μεγαλύτερο χρόνο έκλουσης (και περιέχει φρουκτόζη), όμως

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πίνακας 16. Σάκχαρα και χρόνοι έκλουσής τους στο σύστημα HPLC-RI με διαλύτη ACN:H₂O σε αναλογία 70:30

Ουσία	Χρόνος έκλουσης (min)	Χημική Δομή	Συμβολισμός
Γαλακτόζη (galactose)	5,50		α -Gal
Γλυκόζη (glucose)	5,17		α -Glc
Φρουκτόζη (fructose)	5,00		Fru
Λακτόζη (lactose)	7,80		Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc
Σακχαρόζη (sucrose)	6,30		Glc(α 1 \rightarrow 2 β)Fru
Μαλτόζη (maltose)	7,07		Glc(α 1 \rightarrow 4 α)Glc
Τρεχαλόζη (trehalose)	7,45		Glc(α 1 \rightarrow 1 α)Glc
Μελιβιόζη (melibiose)	7,15		Gal(α 1 \rightarrow 6)Glc
Ραφινόζη (raffinose)	9,78		Gal(α 1 \rightarrow 6 α)Glc(α 1 \rightarrow 2 β)Fru
Σταχυόζη (stachyose)	13,2		Gal(α 1 \rightarrow 6)Gal(α 1 \rightarrow 6) Glc(α 1 \rightarrow 2 β)Fru
Λακτόζη+Μελιβιόζη	6,85	-	-
Γλυκόζη+Γαλακτόζη	5,20	-	-
Γλυκόζη+Γαλακτόζη +Φρουκτόζη	4,86	-	-
Προϊόντα αντίδρασης	12,0	-	-

παραπάνω μελέτες επί του θέματος είναι αναγκαίες. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία θα γίνεται αναφορά στους «συνολικούς GOS» που ανιχνεύτηκαν στο διάλυμα της εκάστοτε αντίδρασης, ώστε να αποφύγουν τυχόν συγχύσεις επί του θέματος. Επίσης, λόγω συνέκλωσης των σακχάρων με τον ίδιο βαθμό πολυμερισμού, οι μονοσακχαρίτες επιλέχθηκε να εκφράζονται σε γαλακτόζη και οι δισακχαρίτες σε λακτόζη. Η επιλογή αυτή έγινε με βάση το γεγονός ότι στον ανεπεξέργαστο ορό ο μόνος δισακχαρίτης που υπάρχει είναι η λακτόζη, ενώ από τους μονοσακχαρίτες, ο χρόνος έκλυσης έδειξε ότι τα ποσοστά της γλυκόζης είναι πολύ μικρότερα από αυτά της γαλακτόζης αν όχι μηδαμικά ($t_{εκλ}=5,5$ min). Αυτό επιβεβαιώθηκε με την προσθήκη εσωτερικού προτύπου γαλακτόζης, αφού ο χρόνος έκλυσης δεν άλλαξε από αυτόν στην περίπτωση του δείγματος χωρίς το εσωτερικό πρότυπο.

8.2 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΖΗΣ

8.2.1 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ

Για ποσοτικό προσδιορισμό μέσω HPLC είναι απαραίτητη η κατασκευή καμπύλης αναφοράς της ουσίας που πρόκειται να μετρηθεί. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν με πρότυπη λακτόζη και νερό HPLC από μητρικά διαλύματα 1,0, 5,0 και 10,0% w/v σε λακτόζη. Τα εμβαδά απορρόφησης των πρότυπων δειγμάτων απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 1), το οποίο αποτελεί την καμπύλη αναφοράς της λακτόζης.

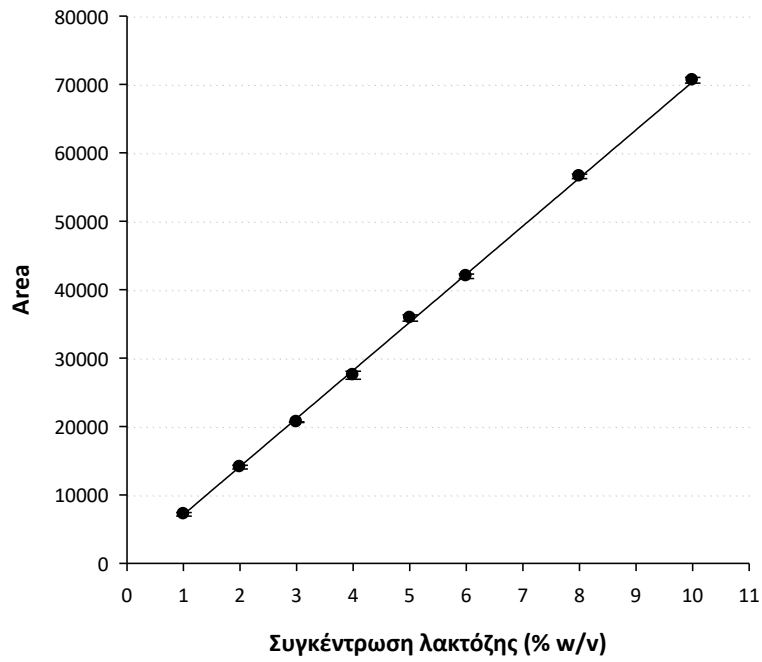
Όπως φαίνεται η καμπύλη αναφοράς της λακτόζης είναι:

$$Area = 7083,1 \cdot C_{λακτόζης} - 260,18$$

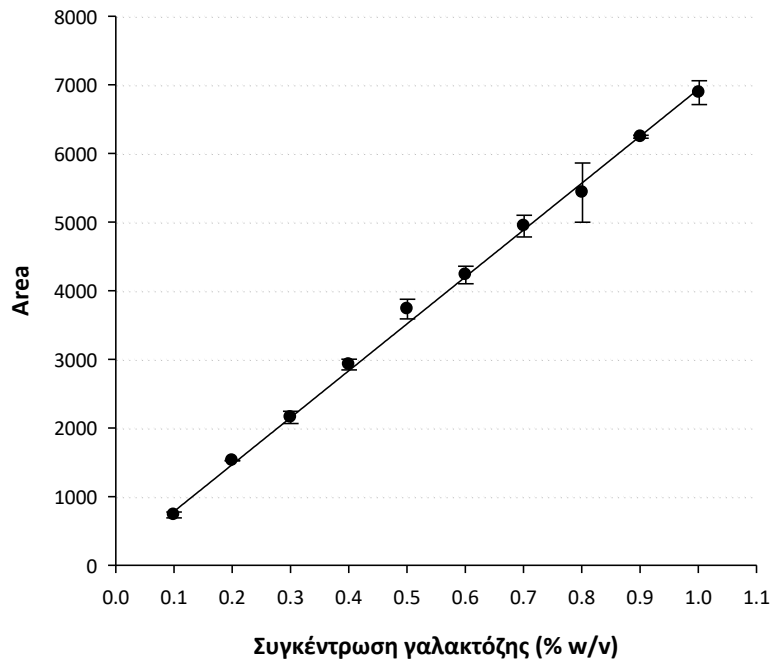
Όπου, η $C_{λακτόζης}$ αναφέρεται σε % w/v. Η εξίσωση εμφάνισε συντελεστή συσχέτισης 99,9% και σφάλμα πρόβλεψης $\pm 59,1$ (% w/v)⁻¹ και $\pm 3,79$ αντίστοιχα.

8.2.2 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΑΛΑΚΤΟΖΗΣ

Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν με πρότυπη γαλακτόζη και νερό HPLC από μητρικό διάλυμα 1,00% w/v σε γαλακτόζη. Στη συνέχεια παρατίθενται η καμπύλη αναφοράς της γαλακτόζης (Διάγραμμα 2) που προέκυψε από τις μετρήσεις των πρότυπων διαλυμάτων γαλακτόζης στην HPLC.



Διάγραμμα 1. Καμπύλη αναφοράς λακτόζης για αναλύσεις στην HPLC



Διάγραμμα 2. Καμπύλη αναφοράς γαλακτόζης για αναλύσεις στην HPLC

Όπως φαίνεται η καμπύλη αναφοράς της γαλακτόζης είναι:

$$Area = 6737,0 \cdot C_{\text{γαλακτόζης}} + 168,04$$

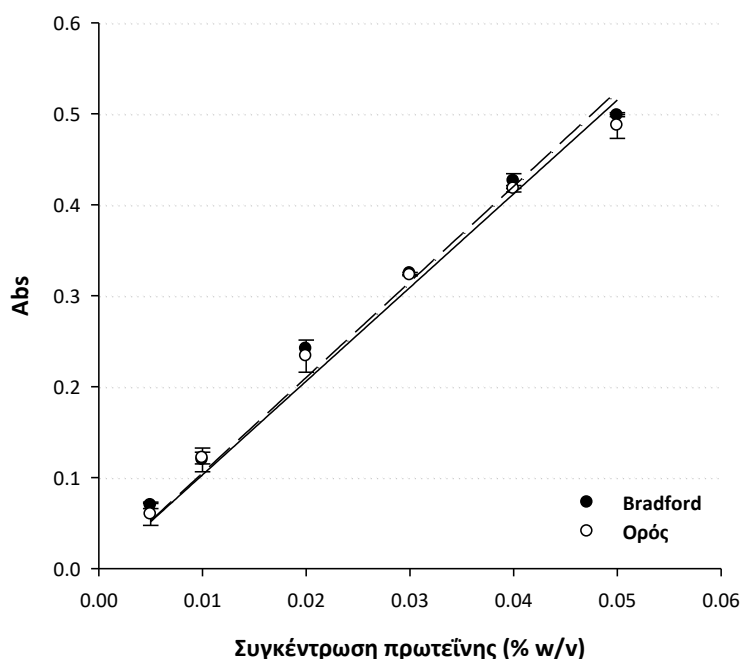
Όπου, η $C_{\text{γαλακτόζης}}$ αναφέρεται σε % w/v. Η εξίσωση εμφάνισε συντελεστή συσχέτισης 99,9% και σφάλμα πρόβλεψης $\pm 111,5$ (% w/v)⁻¹ και $\pm 7,56$ αντίστοιχα.

8.3 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ

Για να ανταποκρίνεται η καμπύλη αυτή στις πρωτεΐνες του ορού, κρίθηκε σκόπιμο να επιβεβαιωθεί ότι οι πρωτεΐνες του ορού προσδένονται στο αντιδραστήριο Bradford. Για το σκοπό αυτό μετρήθηκαν οι περιεχόμενες πρωτεΐνες του ορού (0,01% w/v) και πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αναμίξεις με πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης BSA 0,10% w/v (0,2-0,5% w/v) και αραιώσεις (0,05% w/v). Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η μέθοδος Bradford. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3, οι πρωτεΐνες που περιέχονται στον ορό εκφράζονται άριστα από την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε. Για μεγαλύτερη ακρίβεια χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των κλίσεων των δύο ευθειών και τελικά η περιεκτικότητα του ορού σε πρωτεΐνες εκφράστηκε μέσω της εξίσωσης:

$$Abs = 10,4 \cdot C_{\text{πρωτεΐνης}}$$

Όπου, Abs η μετρούμενη απορρόφηση και η $C_{\text{πρωτεΐνης}}$ αναφέρεται σε % w/v. Η εξίσωση εμφάνισε συντελεστή συσχέτισης 98,5% και σφάλμα πρόβλεψης $\pm 0,15$ (% w/v)⁻¹.



Διάγραμμα 3. Καμπύλη αναφοράς πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και επιβεβαίωση ανταπόκρισής της στις πρωτεΐνες του ορού

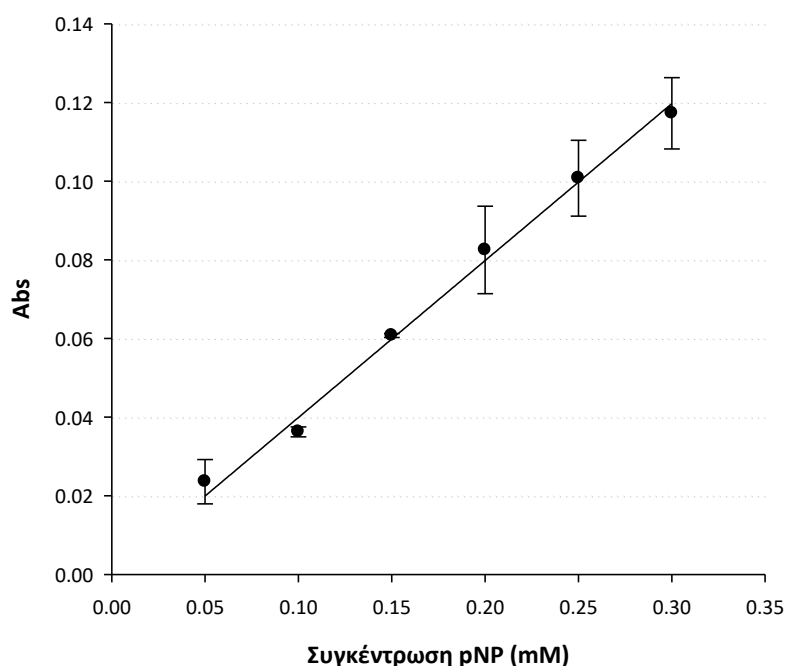
8.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟ *A. ORYZAE*

Όπως, προαναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο (παράγραφος 7.4.4.2), για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας είναι απαραίτητη η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης προσδιορισμού της παρα-νιτροφαινόλης (Διάγραμμα 4).

Όπως φαίνεται η απορρόφηση στα 410 nm σχετίζεται με τη συγκέντρωση της παρα-νιτροφαινόλης μέσω της σχέσης:

$$Abs = 0,399 \cdot C_{pNP}$$

Όπου, *Abs* η μετρούμενη απορρόφηση και η C_{pNP} αναφέρεται σε mM. Η εξίσωση εμφάνισε συντελεστή συσχέτισης 99,45% και σφάλμα πρόβλεψης $\pm 0,006 \text{ mM}^{-1}$.



Διάγραμμα 4. Καμπύλη αναφοράς pNPG

Οι τιμές των απορροφήσεων αντιστοιχίζονται σε τιμές συγκέντρωσης oNPG, καθώς θεωρείται ότι η καμπύλη αναφοράς της oNPG ταυτίζεται με αυτή της pNP. Από τον ορισμό για τη δραστηριότητα της β-γαλακτοζιδάσης ως 1 Unit ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol ορθο-νιτροφαινόλης ανά λεπτό, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος, σε pH 4,5 και θερμοκρασία 50°C. Με βάση, επομένως, τα παραπάνω αλλά και τις απαραίτητες μετατροπές (χρόνος αντίδρασης 10 min και αναγωγή των Units ανά mg σκόνης ενζύμου), υπολογίστηκε η ενζυμική δραστηριότητα της χρησιμοποιούμενης β-γαλακτοζιδάσης και βρέθηκε ίση προς 28,6 ($\pm 1,25$) Units/mg.

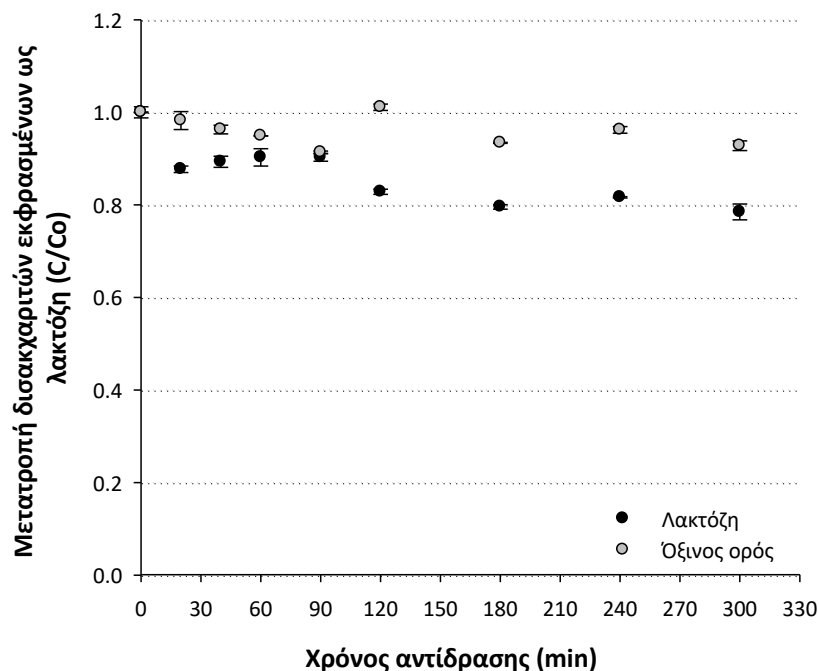
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**8.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ**

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων ομαδοποιημένα ως προς τη μετατροπή των δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη, τη μετατροπή των μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη και την παραγωγή προϊόντων. Στην έναρξη της αντίδρασης, ο μόνος δισακχαρίτης που υπάρχει στο σύστημα είναι η λακτόζη. Στη συνέχεια και με τη πάροδο του χρόνου είναι πιθανόν η β-γαλακτοζιδάση να σχηματίζει άλλου είδους δεσμό μεταξύ γαλακτόζης και γλυκόζης και έτσι να υπάρχει ένα διαφορετικό μόριο δισακχαρίτη στο σύστημα, όπως είναι η αλλολακτόζη (ισομερές της λακτόζης).

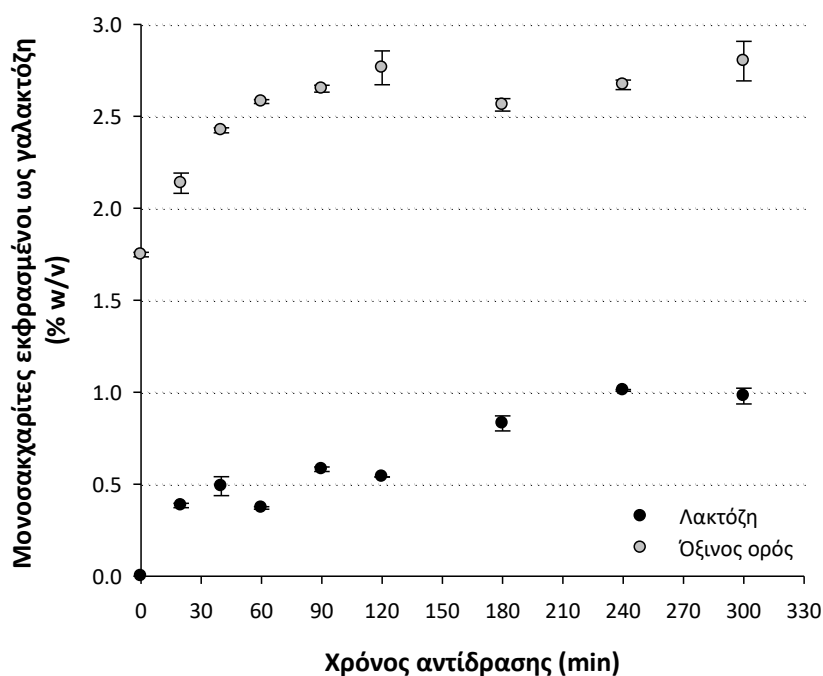
Όσον αφορά στην παραγωγή GOS, στην περίπτωση υποστρώματος όξινου ορού, δεν παρουσιάστηκε κάποια κορυφή πλην αυτής των μονοσακχαριτών και των δισακχαριτών, επομένως δεν υπήρξε κάποια παραγωγή. Αντιθέτως, στην περίπτωση υποστρώματος πρότυπου διαλύματος λακτόζης, παρουσιάστηκε μία νέα κορυφή, η οποία εκλούεται κοντά στα 12 min στο σύστημα HPLC-RI. Η κορυφή αυτή δεν θα μπορούσε να είναι παρά προϊόν της αντίδρασης, και συγκεκριμένα γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Το αν η κορυφή αποτελεί ένα είδος GOS ή μίγμα αυτών δεν είναι σαφές, όμως εικάζεται ότι ο βαθμός πολυμερισμού του προϊόντος είναι 3 (βλ. παράγραφο 8.1). Ωστόσο στη συνέχεια θα αναφέρεται ως Προϊόν. Για διευκόλυνση των συμπερασμάτων, κατά την παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται η παραδοχή ότι όλες οι μετρήσεις που αφορούν το προϊόν βρίσκονται στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης αναφοράς του, ώστε να μπορεί να γίνει η αναγωγή των μετρήσεων στο διάλυμα της αντίδρασης γραμμικά.

Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα (Διαγράμματα 5-7), οι δύο ενζυμικές αντιδράσεις παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Αρχικά, στην αντίδραση που ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα λακτόζης, παράχθηκε προϊόν, ενώ στην αντίστοιχη ενζυμική αντίδραση με υπόστρωμα όξινο ορό, δεν εμφανίστηκε προϊόν. Ακόμα, η μετατροπή της λακτόζης παρ' ότι βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα και στις δύο περιπτώσεις, φαίνεται ότι στην περίπτωση του πρότυπου διαλύματος λακτόζης είναι μεγαλύτερη ενώ στην περίπτωση του ορού σχεδόν αμελητέα. Τέλος, όσον αφορά στους μονοσακχαρίτες, οι οποίοι αποτελούν το σύνολο της γλυκόζης και γαλακτόζης στο διάλυμα της αντίδρασης, παρά το γεγονός ότι αποτελούν τη βάση για τη σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών και στην περίπτωση του όξινου ορού προϋπάρχουν στο υπόστρωμα ενώ στο πρότυπο διάλυμα λακτόζης όχι, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια επίδραση ως προς τη σύνθεση προϊόντος, αφού στην πρώτη περίπτωση δεν εμφανίστηκε, ενώ στην δεύτερη εμφανίστηκε. Ως προς τους μονοσακχαρίτες δεν μπορεί να εξαχθεί

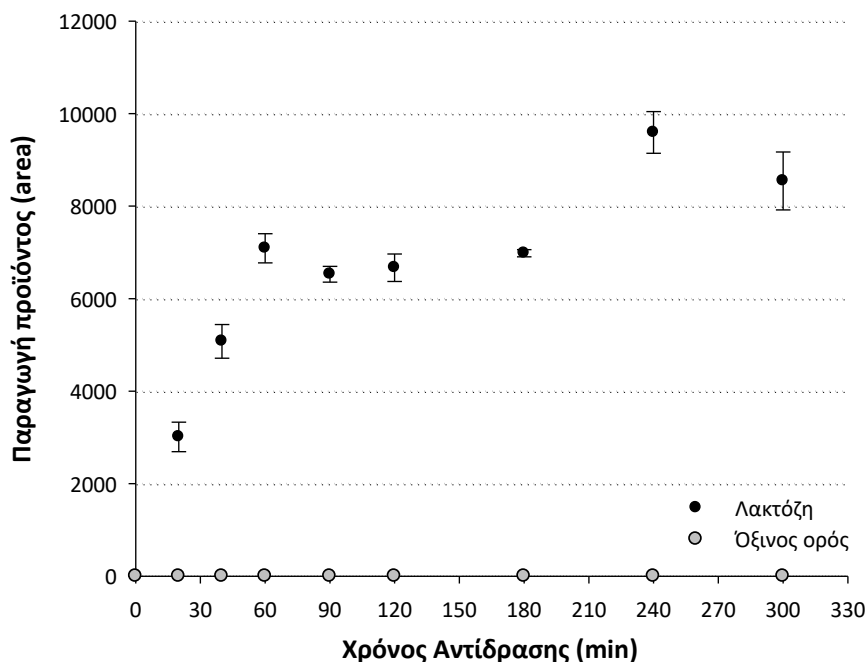
κάποιο άλλο σαφές συμπέρασμα εκτός του ότι τα επίπεδα των μονοσακχαριτών στο διάλυμα της αντίδρασης του ορού είναι εμφανώς μεγαλύτερα.



Διάγραμμα 5. Μετατροπή δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζης ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 6. Περιεκτικότητα διαλυμάτων αντίδρασης σε μονοσακχαρίτες εκφρασμένους ως γαλακτόζη, ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

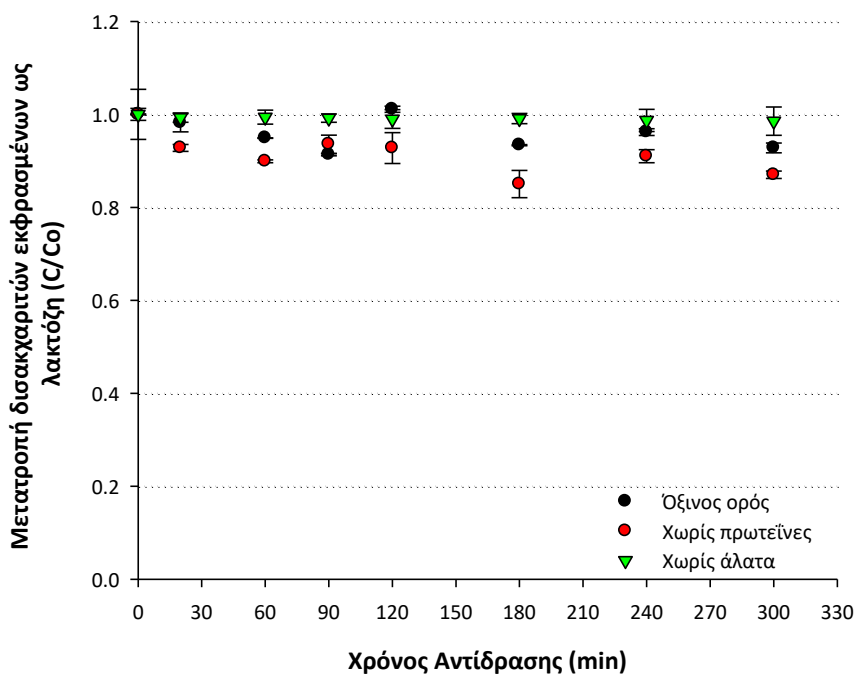


Διάγραμμα 7. Παραγωγή προϊόντος ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

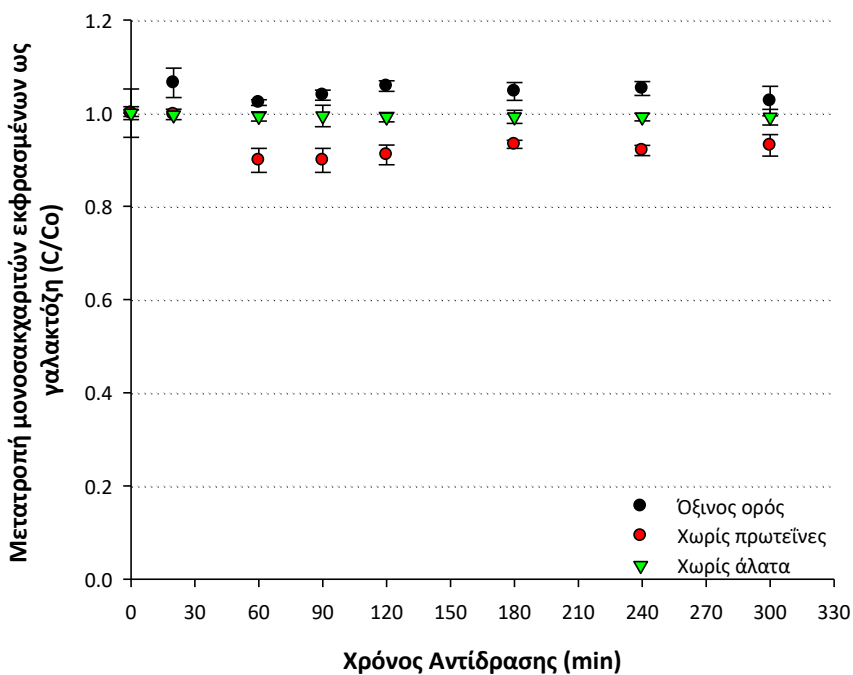
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η προέλευση του ορού επηρεάζει την ενζυμική αντίδραση με κάποιο είδος παρεμπόδισης. Για να ελεγχθεί το κατά πόσο η σύσταση του ορού επηρεάζει την πορεία της ενζυμικής αντίδρασης, πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές αντιδράσεις για τη μελέτη της πιθανής επίδρασης των αλάτων και των πρωτεϊνών του ορού στη δράση του ενζύμου.

8.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των αλάτων και των πρωτεϊνών στην δραστηριότητα του ενζύμου, πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές αντιδράσεις σε ορό με απομακρυσμένες πρωτεΐνες και σε ορό με απομακρυσμένα τα άλατα. Στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγράμματα 8-9) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων σε σχέση με τα αποτελέσματα της ενζυμικής αντίδρασης στον ορό που δεν έχει πραγματοποιηθεί απομάκρυνση κάποιου από τα συστατικά του. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχουν διαφοροποιήσεις στις τρεις ενζυμικές αντιδράσεις, καθώς δεν παρατηρήθηκε η εμφάνιση προϊόντος και παράλληλα, η μετατροπή των δισακχαριτών ήταν αμελητέα. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και ως προς τη μετατροπή των μονοσακχαριτών, με μια ελαφρά αύξηση της μετατροπής τους στον όξινο ορό, η οποία όμως δε φάνηκε να είναι σημαντική.



Διάγραμμα 8. Μετατροπή δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



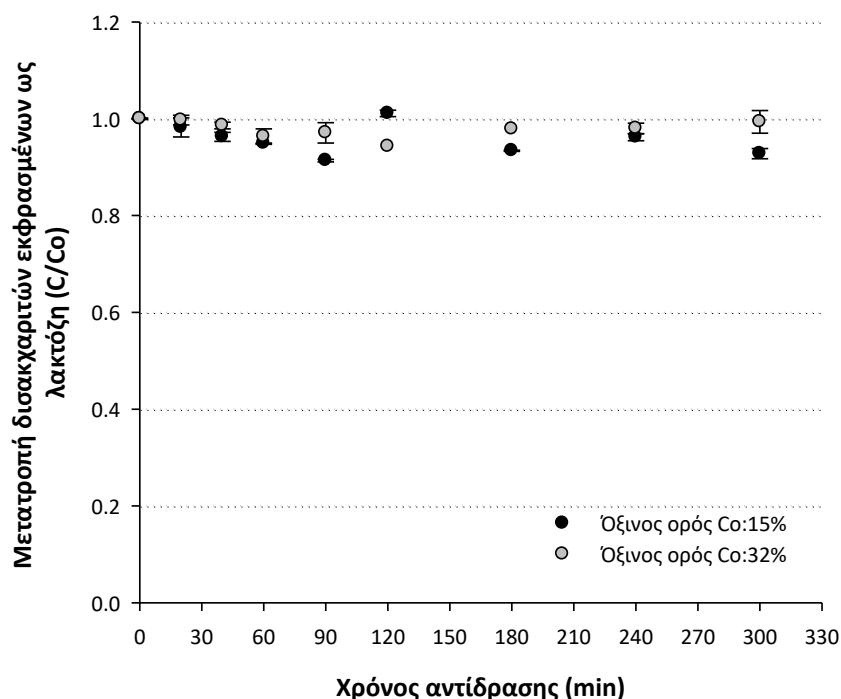
Διάγραμμα 9. Μετατροπή μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Με βάση τα παραπάνω μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα άλατα και οι πρωτεΐνες του ορού δεν αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Ωστόσο υπάρχει

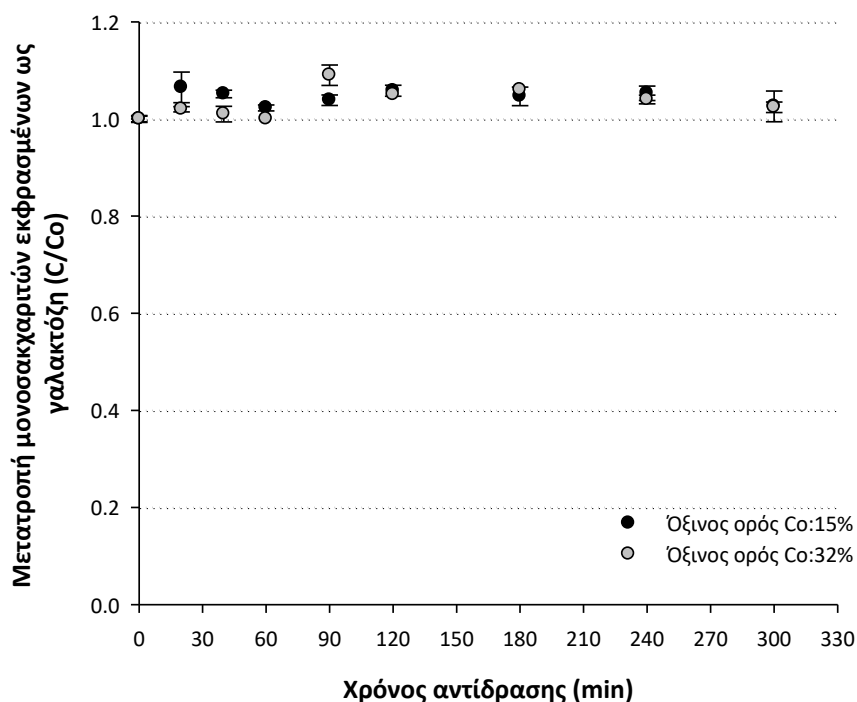
το ενδεχόμενο της μικτής επίδρασης των πρωτεϊνών και των αλάτων στη δράση του ενζύμου, όπως και το ενδεχόμενο του να μην είναι αρκετή η ποσότητα της λακτόζης στο υπόστρωμα της αντίδρασης (15% w/v σε λακτόζη στις παραπάνω αντιδράσεις). Για αυτό το λόγο μελετάται στην επόμενη ενότητα η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ενζυμική αντίδραση σε υπόστρωμα όξινο ορό με απομακρυσμένο τόσο το πρωτεϊνικό περιεχόμενο, όσο και το περιεχόμενο σε άλατα.

8.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα όξινο ορό με περιεκτικότητα 15% w/v σε λακτόζη στη μία περίπτωση, ενώ στη δεύτερη περίπτωση το υπόστρωμα είναι όξινος ορός 32% w/v σε λακτόζη και απομακρυσμένες τόσο τις πρωτεΐνες όσο και τα περιεχόμενα άλατα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ενζυμική αντίδραση δεν είχε σημαντικές διαφορές, καθώς σε καμία από τις εξεταζόμενες περιπτώσεις δε φάνηκε να λαμβάνει χώρα παραγωγή προϊόντος. Όσον αφορά στις μετατροπές των δισακχαριτών και των μονοσακχαριτών, αυτές δε φάνηκε να διαφοροποιούνται σε σχέση με την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη (Διαγράμματα 10-11).



Διάγραμμα 10. Μετατροπή δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



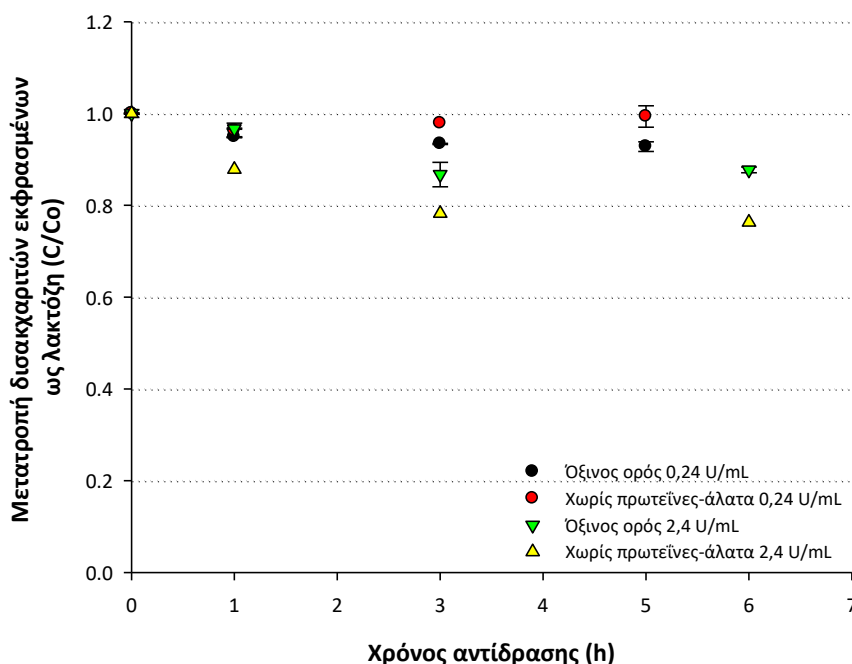
Διάγραμμα 11. Μετατροπή μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των αλάτων από τον όξινο ορό δεν επηρεάζει την πορεία της αντίδρασης και συνεπώς δεν είναι αναγκαία αυτή η προεργασία, καθώς προσθέτει επιπλέον στάδια στην διεργασία. Επίσης, η αύξηση της περιεκτικότητας του υποστρώματος σε λακτόζη δεν οδήγησε σε αλλαγή των μέχρι τώρα αποτελεσμάτων. Συνεπώς, θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο ορός δεν χρειάζεται να υποστεί ιδιαίτερη επεξεργασία για να μετατραπεί σε κατάλληλο υπόστρωμα. Επόμενο βήμα της μελέτης είναι η επίδραση της δραστηριότητας του ενζύμου στο σύστημα της αντίδρασης, καθώς και η εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασία της αντίδρασης.

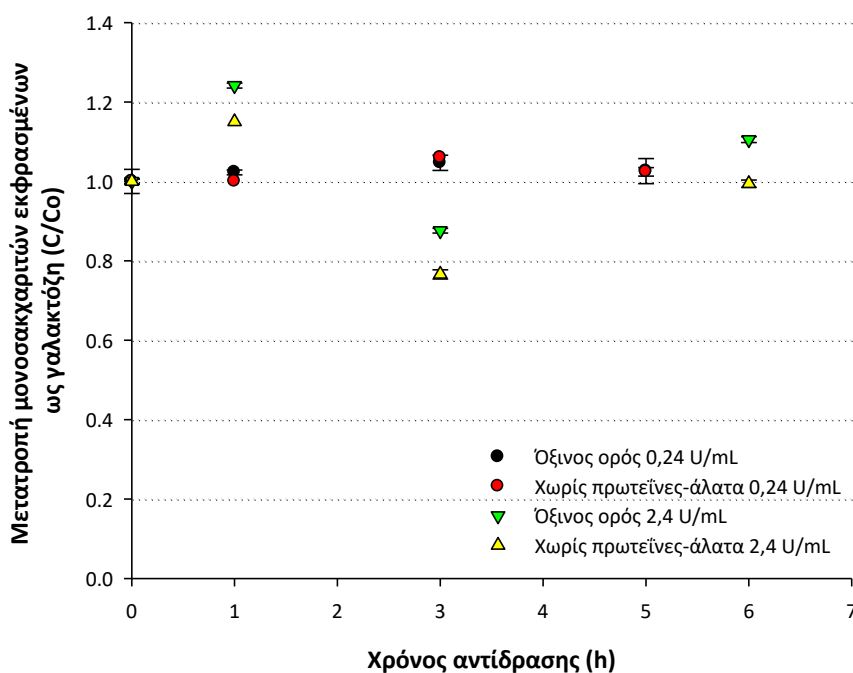
Αναφορικά με την υπόθεση ότι πιθανόν να είναι απαραίτητη η χρήση υψηλότερης ενζυμικής δραστηριότητας, ελέγχεται η ενζυμική αντίδραση σε συστήματα όξινου ορού 15% w/v σε λακτόζη, με ή χωρίς απομάκρυνση των συστατικών του, και με χρησιμοποιούμενες δραστηριότητες ενζύμου 0,24 και 2,4 U/mL αντίδρασης.

Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγράμματα 12-14) και όπως είναι αντιληπτό επιβεβαιώνεται ότι οι διεργασίες απομάκρυνσης των πρωτεϊνών και απομάκρυνσης των αλάτων από τον ορό δεν τον καθιστούν πιο κατάλληλο υπόστρωμα για την ενζυμική αντίδραση. Επίσης, τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων με χρήση 2,4 U/mL αντίδρασης του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae*, δείχνουν ότι υψηλή δραστηριότητα

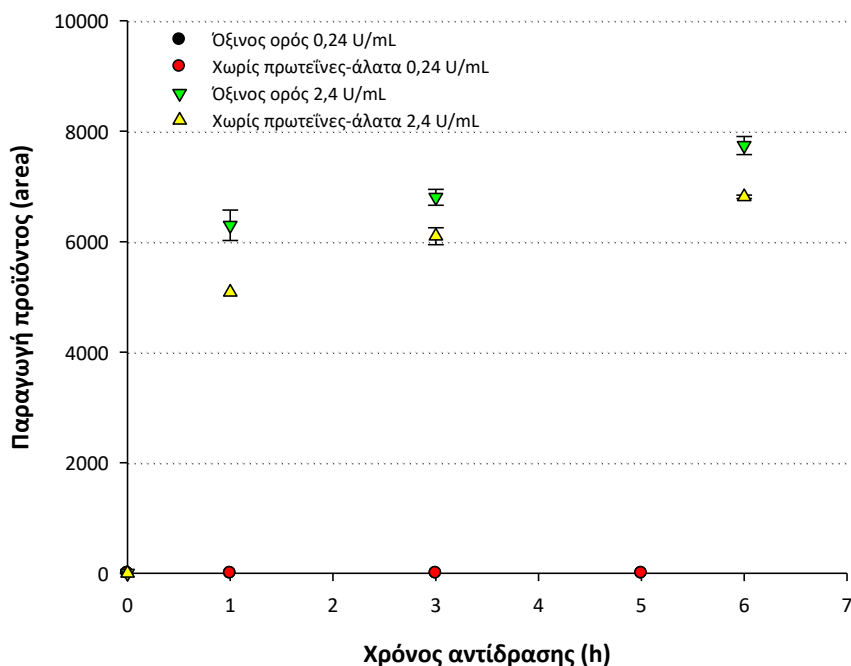
ενζύμου (2,4 U/mL) οδηγεί σε μετατροπή της λακτόζης σε GOS (Διάγραμμα 14). Συμπερασματικά λοιπόν, το συγκεκριμένο ένζυμο δρα διαφορετικά σε υπόστρωμα πρότυπου διαλύματος λακτόζης από ότι σε υπόστρωμα όξινου ορού, με την περίπτωση του όξινου ορού να απαιτεί μεγαλύτερες δραστικότητες ενζύμου για την επιτυχή επεξεργασία του.



Διάγραμμα 12. Μετατροπή δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 13. Μετατροπή μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 14. Παραγωγή προϊόντος ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Με βάση τα παραπάνω, για την παραγωγή GOS και αφού μελετήθηκε η επίδραση της σύστασης του ορού στην δράση του ενζύμου, στη συνέχεια μελετάται η δραστηριότητα του ενζύμου στο διάλυμα της αντίδρασης, σε ένα εύρος ενζυμικής δραστηριότητας από 2,4-9,6 U/mL αντίδρασης, καθώς λόγω της φύσης του υποστρώματος, μπορεί οι απαιτήσεις σε ένζυμο να είναι μεγαλύτερες για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών ακόμα και σε σχέση με αυτή που παρουσιάστηκε προηγουμένα (2,4 U/mL). Επίσης ερευνάται η θερμοκρασία της αντίδρασης, καθώς βιβλιογραφικά υπάρχει ένα εύρος προτεινόμενων θερμοκρασιών (40-55°C) για τη βέλτιστη δράση του ενζύμου.

8.8 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ GOS

Ο έλεγχος της επίδρασης της δραστηριότητας του ενζύμου στο διάλυμα της αντίδρασης αλλά και της θερμοκρασίας προς την παραγωγή GOS έγινε μέσω μιας σειράς δοκιμών, όπως αυτές αναφέρθηκαν προηγουμένα (στην ενότητα 7.2- ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ). Προκειμένου να γίνει όσο το δυνατόν πιο διεξοδική ανάλυση της επίδρασης της χρησιμοποιούμενης ενζυμικής δραστηριότητας και της θερμοκρασίας στην πορεία της μελετώμενης ενζυμικής αντίδρασης, ακολουθείται ξεχωριστή παρουσίαση και σχολιασμός των αποτελεσμάτων ως προς τις παραπάνω επιδράσεις.

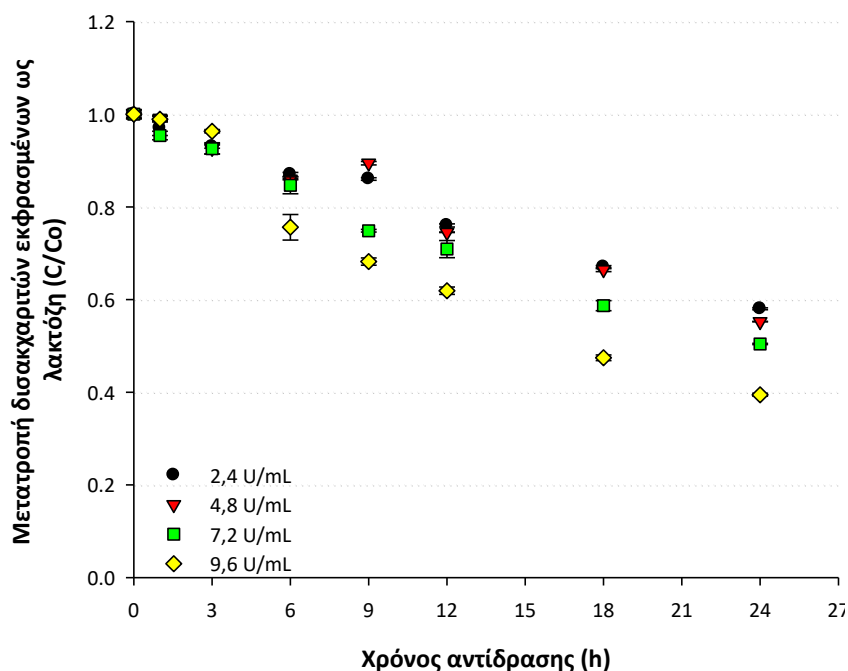
Όταν αναφέρεται ο όρος μετατροπή δισακχαριτών εννοείται το σύνολο των δισακχαριτών που έχουν ως μονομερή τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη, αλλά συνδεδεμένα με διαφορετικούς δεσμούς. Πιο αναλυτικά το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae* διαθέτει την ικανότητα να συνθέτει τους γλυκοζιτικούς δεσμούς β-(1→3), β-(1→4) και β-(1→6), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το μόριο της γαλακτόζης. Αυτό σημαίνει ότι το μόριο της γλυκόζης αποτελεί το τερματικό μόριο του πολυμερισμού. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έχει την ικανότητα να διαχωρίζει τους δισακχαρίτες με διαφορετικά μονομερή, αλλά όχι αυτούς που αποτελούνται από τα ίδια μονομερή συνδεδεμένα με διαφορετικούς δεσμούς. Έτσι παρακάτω, ο όρος δισακχαρίτες αναφέρεται στο σύνολο των δισακχαριτών με μονομερή ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο γαλακτόζης, καθώς δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία άλλων δισακχαριτών στα διαλύματα των ενζυμικών αντιδράσεων (και συγκεκριμένα δισακχαριτών της γαλακτόζης γιατί το ένζυμο που χρησιμοποιείται δε διαθέτει την ικανότητα να συνθέσει διμερή της γλυκόζης).

Η μετατροπή των μονοσακχαριτών δε φαίνεται να ακολουθεί μια σαφή πορεία, κάτι που δείχνει ότι το σύστημα είναι δυναμικό. Η πορεία των μονοσακχαριτών είναι λογική αν λάβει κανείς υπόψη του ότι αποτελούν ένα ενδιάμεσο προϊόν της μετατροπής της λακτόζης σε GOS. Έτσι δεν γίνεται περαιτέρω σχολιασμός της αύξησης ή μείωσης της μετατροπής των μονοσακχαριτών στο διάλυμα της αντίδρασης και δε μπορεί να εξαχθεί ένα σαφές συμπέρασμα ως προς την πορεία της αντίδρασης, καθώς μια αύξηση σημαίνει παραγωγή μονοσακχαριτών χωρίς να σημαίνει ότι δεν γίνεται σύνθεση GOS και μια μείωση σημαίνει παραγωγή GOS, χωρίς να σημαίνει ότι δεν παράγονται μονομερή. Έτσι τα επίπεδα αυξομείωσης δεν μπορούν να χαρακτηριστούν, καθώς είναι επιθυμητή η παραγωγή των μονομερών που είναι το πρώτο βήμα για τη σύνθεση GOS, που είναι και ο στόχος της ενζυμικής αντίδρασης, για την οποία πραγματοποιείται κατανάλωση μονομερών,

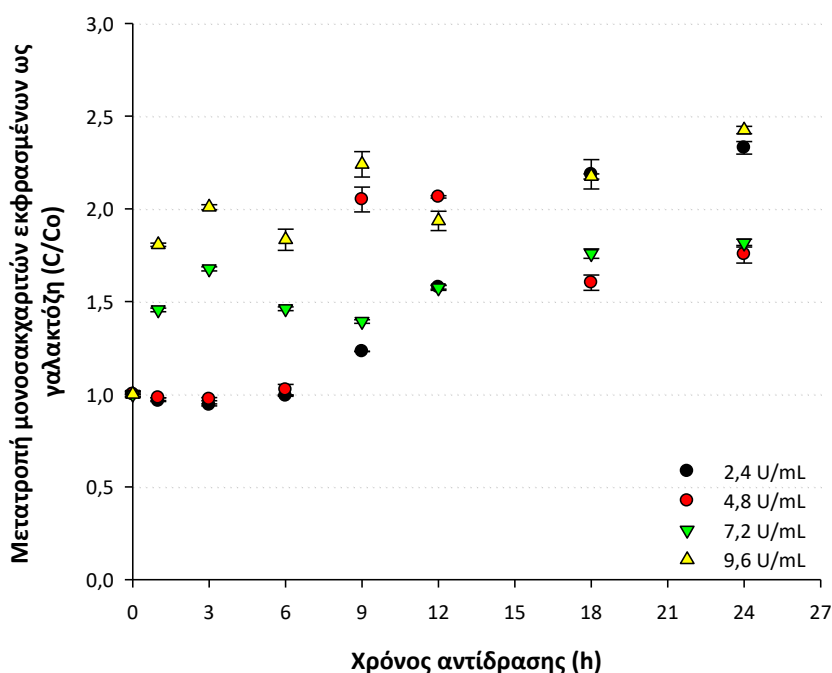
8.8.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

8.8.1.1 Ενζυμική αντίδραση στους 40°C

Στα Διαγράμματα 15-17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν στους 40°C, με χρήση διαφορετικής δραστηριότητας του ενζύμου. Από το Διάγραμμα 15, φαίνεται ότι αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας, ιδίως πάνω από τα 4,8 U/mL, οδηγεί σε αύξηση της μετατροπής των δισακχαριτών.



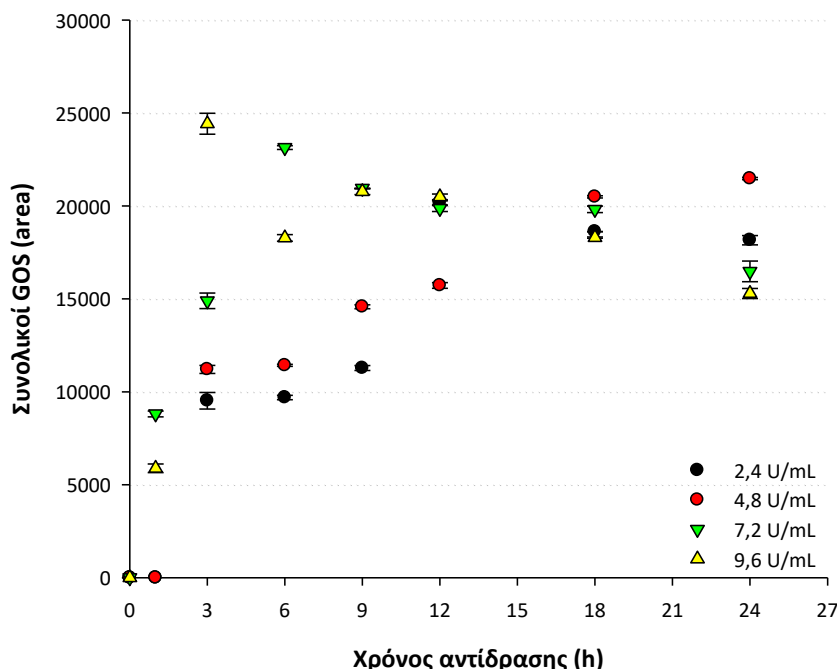
Διάγραμμα 15. Μετατροπή δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 16. Μετατροπή μονοσακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 16, η μετατροπή των μονοσακχαριτών ακολουθεί μια πορεία αυξομείωσης, που πιθανά υποδηλώνει ότι το σύστημα βρίσκεται σε μια δυναμική κατάσταση. Παρόλα αυτά, στην αντίδραση με χρησιμοποιούμενη δραστηκότητα ενζύμου 9,6 U/mL αντίδρασης, τα επίπεδα των

μονοσακχαριτών είναι μεγαλύτερα από ότι στις υπόλοιπες περιπτώσεις. Επιπλέον, στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν 2,4 και 4,8 U/mL αντίδρασης, η μετατροπή των μονοσακχαριτών φαίνεται να εμφανίζει υστέρηση, γεγονός που πιθανόν να σχετίζεται και με αντίστοιχη υστέρηση στην παραγωγή GOS.



Διάγραμμα 17. Παραγωγή προϊόντος ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Όσον αφορά στην παραγωγή των GOS, φαίνεται η περιεκτικότητά τους να είναι μέγιστη στην αντίδραση με δραστικότητα ενζύμου 9,6 U/mL, και παράλληλα τα μέγιστα επίπεδα GOS να επιτυγχάνονται σε αυτή την περίπτωση πιο γρήγορα (3 h) από ότι για τις υπόλοιπες χρησιμοποιούμενες δραστικότητες ενζύμου. Η δραστικότητα ενζύμου 7,2 U/mL αντίδρασης φαίνεται να είναι η αμέσως επόμενη καλύτερη συνθήκη για την παραγωγή GOS στους 40°C με ελαφρώς χαμηλότερα επίπεδα GOS και χρόνο παραγωγής τους τις 6 h, αντίστοιχα. Στις περιπτώσεις των αντιδράσεων με ενζυμική δραστικότητα 4,8 και 2,4 U/mL, φαίνεται τα επίπεδα παραγωγής GOS να είναι αρκετά χαμηλότερα και ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη της μέγιστης παραγωγής τους να είναι αρκετά μεγαλύτερος, φτάνοντας τις 24 και 18 h αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, στους 40°C τα βέλτιστα αποτελέσματα της αντίδρασης της μετατροπής της λακτόζης σε GOS επιτυγχάνονται με ενζυμική δραστικότητα 9,6 U/mL. Ταυτόχρονα αύξηση της ενζυμικής δραστικότητας οδηγεί σε καλύτερες αποδόσεις στη μετατροπή της λακτόζης σε GOS, με τα αποτελέσματα της μετατροπής των δισακχαριτών να συμφωνούν με τα αντίστοιχα για την παραγωγή GOS.

Στον Πίνακα 17 παρουσιάζονται οι βέλτιστες μετατροπές των δισακχαριτών στους 40°C και οι μέγιστες παραγωγές GOS με τους αντίστοιχους χρόνους επίτευξής τους, για κάθε χρησιμοποιούμενη ενζυμική δραστηριότητα.

Πίνακας 17. Βέλτιστη μετατροπή δισακχαριτών και παραγωγή GOS και αντίστοιχοι χρόνοι επίτευξής τους για τους 40°C

Ενζυμική Δραστηριότητα (U/mL)	Δισακχαρίτες		GOS	
	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)
2,4	0,58±0,00 ^d	24	7741±163 ^a	6
4,8	0,55±0,00 ^c	24	21470±58 ^b	24
7,2	0,50±0,00 ^b	24	23138±100 ^c	6
9,6	0,38±0,00^a	24	24417±563^d	3

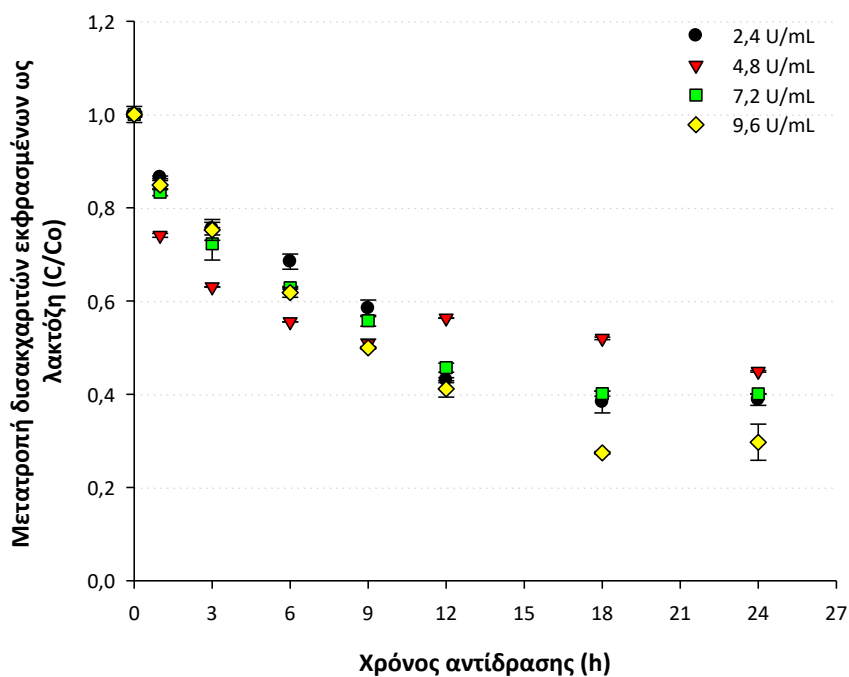
*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

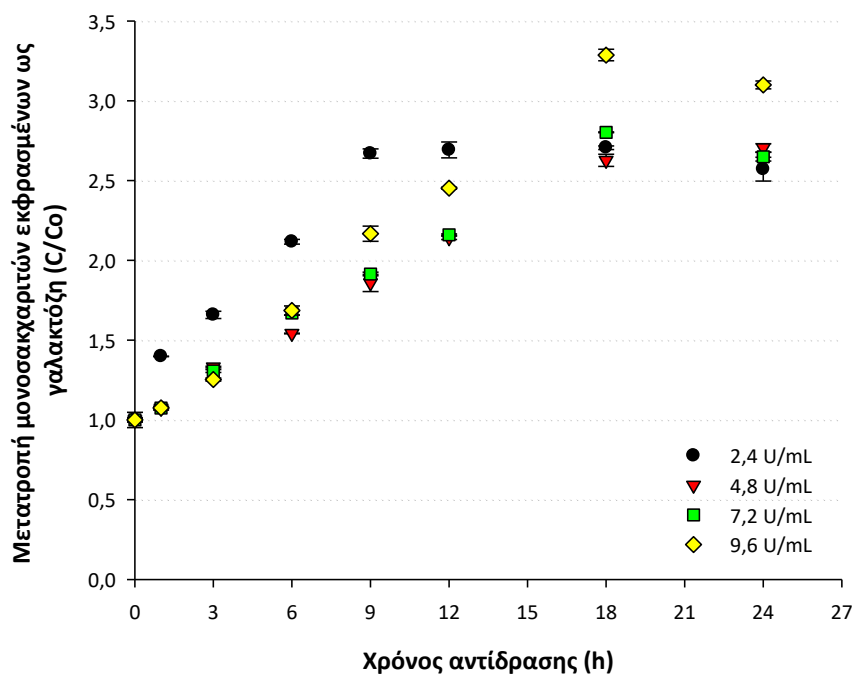
Όπως προέκυψε από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, η ενζυμική δραστηριότητα έχει σημαντική ($p < 0,001$) επίδραση τόσο στη μετατροπή των δισακχαριτών όσο και την παραγωγή GOS. Και από τη στατιστική επεξεργασία επιβεβαιώθηκε ότι με αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας, μειώνεται η περιεκτικότητα του διαλύματος της αντίδρασης σε δισακχαρίτες και αυξάνεται η περιεκτικότητά του σε GOS.

8.8.1.2 Ενζυμική αντίδραση στους 45°C

Στα παρακάτω Διαγράμματα (18-20) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων που αφορούν στους 45°C. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 18, μεγαλύτερη κατανάλωση δισακχαριτών παρατηρείται στην περίπτωση με χρησιμοποιούμενη ενζυμική δραστηριότητα 9,6 U/mL αντίδρασης. Ωστόσο, τα επίπεδα μετατροπής δισακχαριτών στις περιπτώσεις των αντιδράσεων με 7,2 και 2,4 U/mL φαίνεται να μην παρουσιάζουν ιδιαίτερη διαφοροποίηση μεταξύ τους. Τέλος, στην αντίδραση με ενζυμική δραστηριότητα 4,8 U/mL φαίνεται να λαμβάνει χώρα η μικρότερη κατανάλωση δισακχαριτών, με μέγιστη όμως μετατροπή τους να συμβαίνει ταχύτερα από ότι στις υπόλοιπες περιπτώσεις.

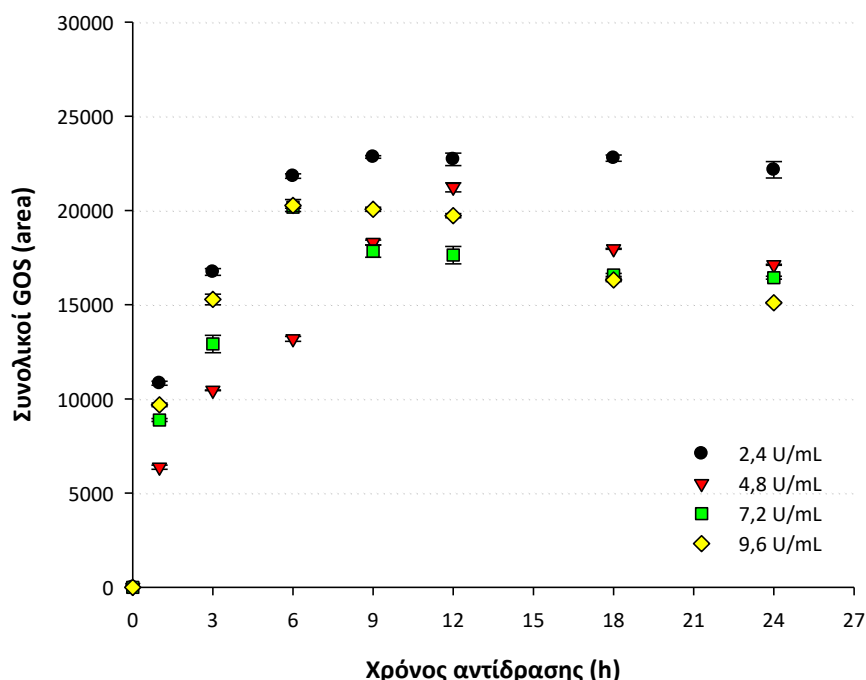


Διάγραμμα 18. Μετατροπή δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 19. Μετατροπή μονοσακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Όσον αφορά στους μονοσακχαρίτες, παρατηρείται ότι στην αντίδραση με ενζυμική δραστικότητα 2,4 U/mL, τα μέγιστα επίπεδα μονοσακχαριτών επιτυγχάνονται πιο νωρίς (6 h), ενώ στις περιπτώσεις των 9,6, 7,2 και 4,8 U/mL τα επίπεδα μέγιστων επιτυγχάνονται αργότερα (12 h).



Διάγραμμα 20. Παραγωγή προϊόντος ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Όσον αφορά στην παραγωγή των GOS, παρατηρήθηκε ότι αυξανόμενης της ενζυμικής δραστικότητας, μειώθηκε η παραγωγή των GOS, χωρίς να παρουσιάζεται σημαντική διαφορά στα μέγιστα της παραγωγής GOS στις αντιδράσεις με ενζυμική δραστικότητα 7,2 και 9,6 U/mL. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι μετά την επίτευξη της μέγιστης παραγωγής GOS, η συγκέντρωσή τους φάνηκε να μειώνεται για τις περισσότερες από τις μελετώμενες περιπτώσεις. Λαμβάνοντας υπόψη και τη μετατροπή των δισακχαριτών, μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η πραγματοποίηση ενός επιπλέον πολυμερισμού των GOS, σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από αυτές που είναι ικανές να ανιχνευτούν στη στήλη. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει και τις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των διαφορετικών δραστικοτήτων του ενζύμου. Αναφορικά με τη μείωση της συγκέντρωσης των GOS με το χρόνο, μία ακόμα πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι ένα μέρος των GOS, αυτό που αποτελείται από μονομερή συνδεδεμένα με β -(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό, υδrolύεται από το ίδιο το ένζυμο που τους παράγει.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 18), παρουσιάζονται οι βέλτιστες αποδόσεις των ενζυμικών αντιδράσεων για κάθε ενζυμική δραστικότητα, καθώς

και ο χρόνος που απαιτείται ώστε να επιτευχθούν τα αντίστοιχα βέλτιστα αποτελέσματα για τη μετατροπή των δισακχαριτών και την παραγωγή των GOS.

Πίνακας 18. Βέλτιστη μετατροπή δισακχαριτών και παραγωγή GOS και αντίστοιχοι χρόνοι επίτευξής τους για τους 45°C

Ενζυμική Δραστητικότητα (U/mL)	Δισακχαρίτες		GOS	
	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)
2,4	0,38±0,02 ^b	18	22840±68 ^c	9
4,8	0,45±0,00 ^c	24	21231±241 ^b	12
7,2	0,40±0,00 ^b	24	20176±50 ^a	6
9,6	0,27±0,00^a	18	20265±316 ^a	6

*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

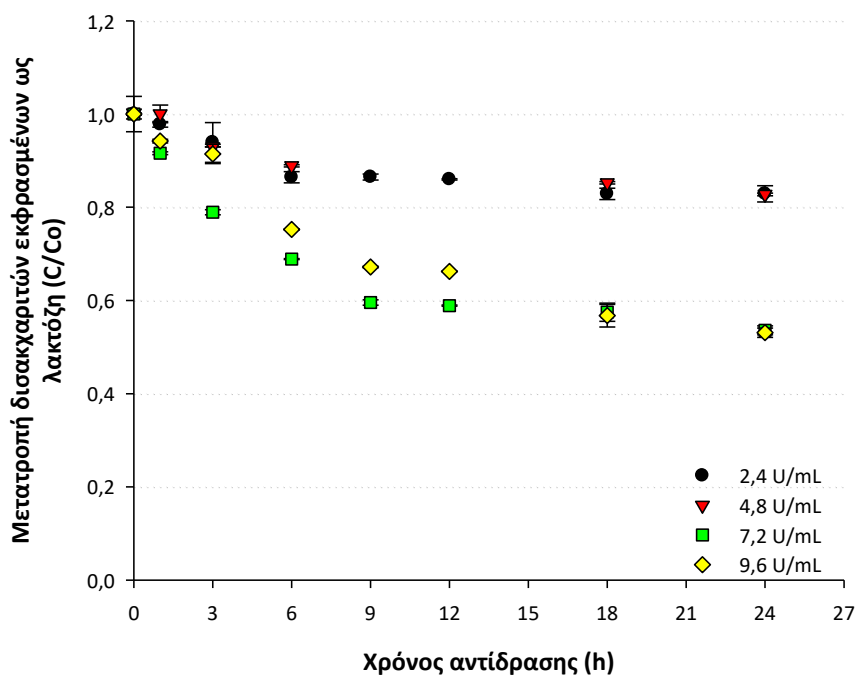
Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

Η μετατροπή των δισακχαριτών και η παραγωγή GOS φάνηκε να επηρεάζονται σημαντικά ($p < 0,001$) από την ενζυμική δραστηριότητα. Από τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan προέκυψε ότι, η μέγιστη κατανάλωση δισακχαριτών παρατηρείται στην αντίδραση με ενζυμική δραστηριότητα 9,6 U/mL. Τα αμέσως καλύτερα αποτελέσματα εμφανίστηκαν στις περιπτώσεις με 7,2 και 2,4 U/mL χωρίς να παρουσιάζεται σημαντική διαφορά στα επίπεδα των δισακχαριτών. Τέλος, η μικρότερη κατανάλωση των δισακχαριτών παρουσιάστηκε στην αντίδραση με δραστηριότητα ενζύμου 4,8 U/mL. Αναφορικά με την παραγωγή GOS, αυτή δε φάνηκε να διαφοροποιείται για τις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν 9,6 και 7,2 U/mL αντίδρασης, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της συγκεντρώσεώς τους καθώς μειώθηκε η χρησιμοποιούμενη ενζυμική δραστηριότητα από τα 4,2 στα 2,8 U/mL.

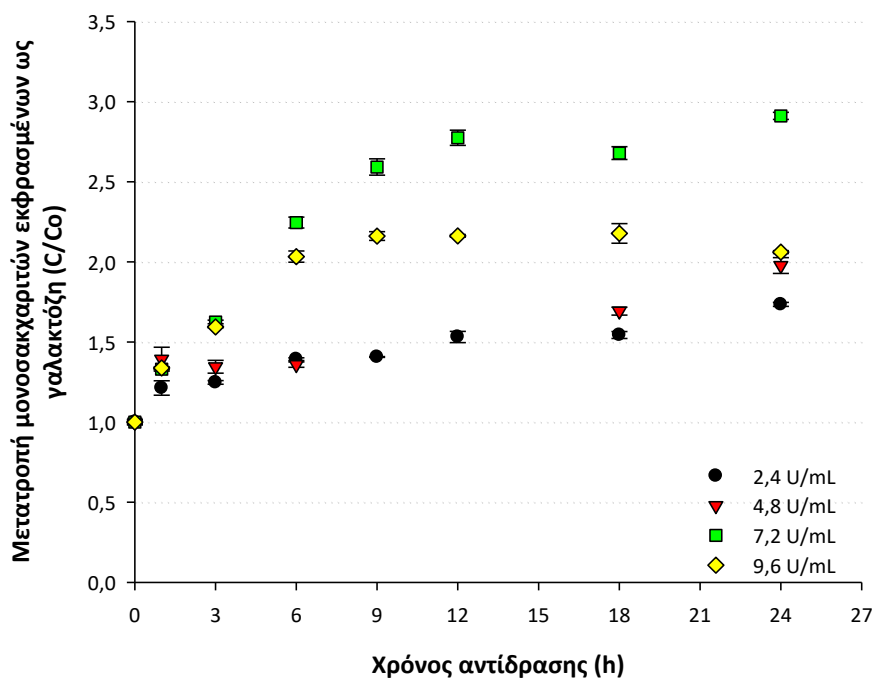
8.8.1.3 Ενζυμική αντίδραση στους 50°C

Στα Διαγράμματα 21-23 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων που αφορούν στους 50°C. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 21, οι μετατροπές των δισακχαριτών ομαδοποιούνται στις αντιδράσεις με ενζυμική δραστηριότητα 2,4 και 4,8 U/mL και στις αντιδράσεις με ενζυμική δραστηριότητα 7,2 και 9,6 U/mL αντίδρασης αντίστοιχα, με την δεύτερη ομάδα να παρουσιάζει τις χαμηλότερες τελικές συγκεντρώσεις δισακχαριτών στα διαλύματα των αντιδράσεων.

Όσον αφορά στη μετατροπή των μονοσακχαριτών στα διαλύματα των αντιδράσεων (Διάγραμμα 22), τα αποτελέσματα είναι παρόμοια για τις περιπτώσεις με ενζυμική δραστικότητα 2,4 και 4,8 U/mL, παρουσιάζοντας και τις χαμηλότερες περιεκτικότητες σε μονοσακχαρίτες. Η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών εμφανίστηκε μεγαλύτερη για την περίπτωση των 7,2 U/mL, ενώ ενδιάμεσες συγκεντρώσεις μονοσακχαριτών παρατηρήθηκαν στην περίπτωση των 9,6 U/mL αντίδρασης.

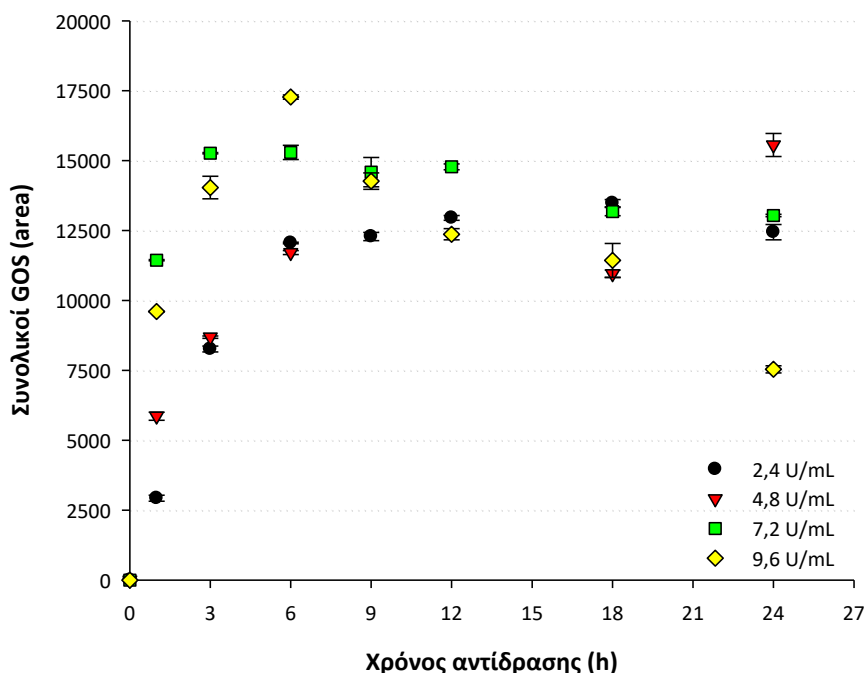


Διάγραμμα 21. Μετατροπή δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 22. Μετατροπή μονοσακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Αναφορικά με την παραγωγή των GOS (Διάγραμμα 23), η μέγιστη παραγωγή GOS επιτυγχάνεται στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκαν 9,6 U/mL αντίδρασης σε χρόνο 6 h, ενώ μετά τα επίπεδα των GOS φάνηκε να πέφτουν. Η αντίδραση με δραστηριότητα ενζύμου 7,2 U/mL και η αντίστοιχη με 4,8 U/mL φαίνεται να επιτυγχάνουν τα ίδια μέγιστα επίπεδα GOS, σε διαφορετικούς όμως χρόνους (6 και 24 h αντίστοιχα). Τέλος, η αντίδραση με ενζυμική δραστηριότητα 2,4 U/mL φαίνεται να παρουσιάζει τη μικρότερη παραγωγή GOS, η οποία επιτεύχθηκε σε χρόνο 12 h και κατόπιν δεν μεταβλήθηκε.



Διάγραμμα 23. Παραγωγή προϊόντος ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Στον Πίνακα 19 παρουσιάζονται οι μέγιστες μετατροπές δισακχαριτών, οι μέγιστες παραγωγές GOS καθώς και οι αντίστοιχοι χρόνοι επίτευξής τους για κάθε ενζυμική δραστηριότητα.

Όπως παρατηρείται, οι μετατροπές των δισακχαριτών ομαδοποιούνται σε ζεύγη, όπως διακρίθηκε και στο διάγραμμα 21, με μικρότερες περιεκτικότητες σε δισακχαρίτες στα διαλύματα των αντιδράσεων με ενζυμική δραστηριότητα 7,2 και 9,6 U/mL. Ωστόσο, η ίδια ομαδοποίηση δεν παρουσιάζεται και στη συγκέντρωση των GOS, αφού η μεγαλύτερη εντοπίζεται στο διάλυμα της αντίδρασης με 9,6 U/mL, η μικρότερη στο διάλυμα της αντίδρασης με τα 2,4 U/mL, και οι αντιδράσεις με ενζυμική δραστηριότητα 7,2 και 4,8 U/mL αντίδρασης δεν εμφανίζουν σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Παρόλα αυτά, στην περίπτωση των 7,2 U/mL η μέγιστη παραγωγή GOS επιτεύχθηκε σε χρόνο 6 h, ενώ στην αντίδραση με τα 4,8 U/mL σε χρόνο 24 h.

Πίνακας 19. Βέλτιστη μετατροπή δισακχαριτών και παραγωγή GOS και αντίστοιχοι χρόνοι επίτευξής τους για τους 50°C

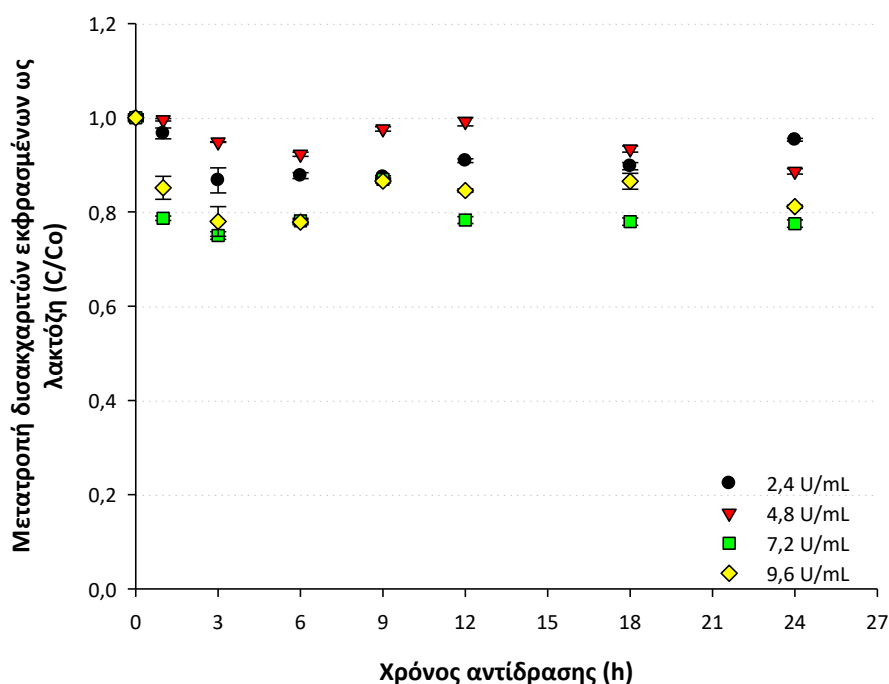
Ενζυμική Δραστητικότητα (U/mL)	Δισακχαρίτες		GOS	
	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)
2,4	0,83±0,01 ^b	18	12954±84 ^a	12
4,8	0,83±0,00 ^b	24	15559±411 ^b	24
7,2	0,54±0,01 ^a	24	15295±252 ^b	6
9,6	0,53±0,01^a	24	17274±77^c	6

*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

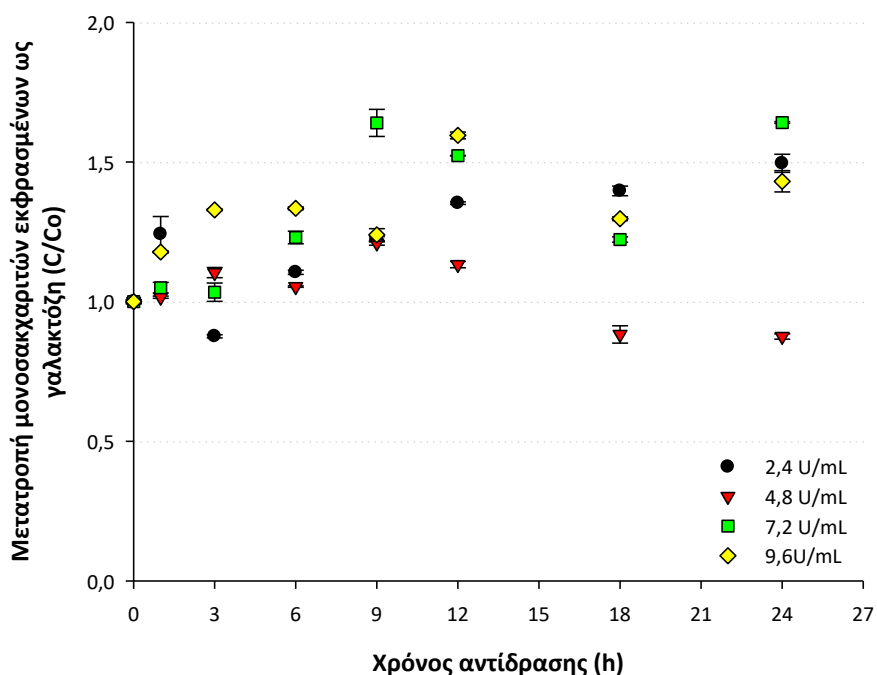
Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

8.8.1.4 Ενζυμική αντίδραση στους 55°C

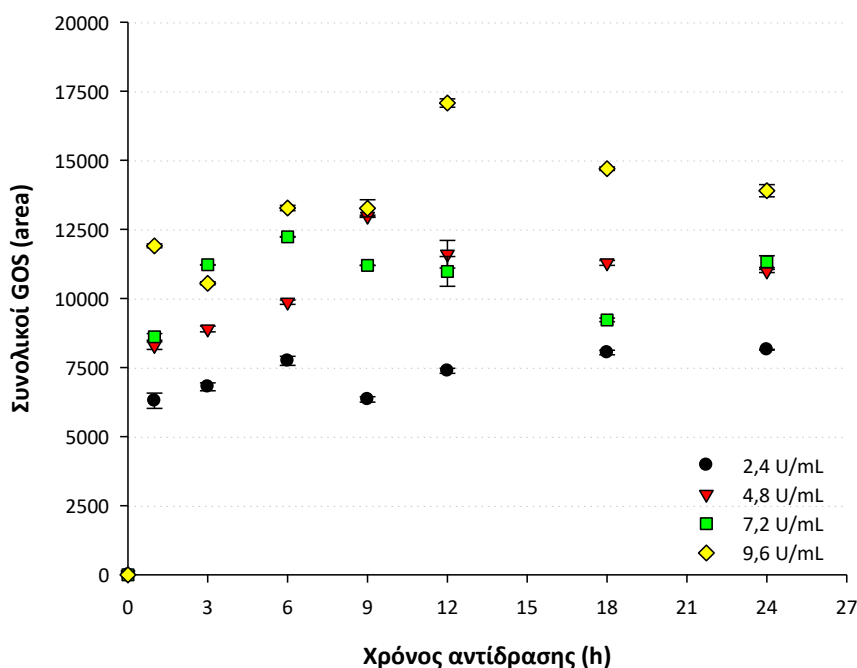
Στα Διαγράμματα 24-26 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων που αφορούν στους 55°C. Σε αυτή τη θερμοκρασία αντίδρασης, οι μετατροπές των δισακχαριτών φαίνεται να μην είναι μεγάλες, ενώ δεν παρατηρείται συγκεκριμένη τάση ως προς τη μετατροπή των μονοσακχαριτών ή/και την παραγωγή GOS, η οποία φαίνεται να λαμβάνει χώρα ταχύτατα (μέχρι τις 6 h) και στις τέσσερις περιπτώσεις. Όσον αφορά στη μετατροπή των δισακχαριτών (Διάγραμμα 24), μέγιστη κατανάλωση φαίνεται να πραγματοποιείται στην αντίδραση με ενζυμική δραστητικότητα 7,2 U/mL, και ακολουθούν η αντίδραση με 9,6 U/mL και αυτές με 4,8 και 2,4 U/mL αντίστοιχα.



Διάγραμμα 24. Μετατροπή δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 25. Μετατροπή μονοσακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 26. Παραγωγή προϊόντος ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Αναφορικά με την παραγωγή των GOS (Διάγραμμα 26), παρατηρείται ότι μέγιστη παραγωγή λαμβάνει χώρα στην αντίδραση με χρησιμοποιούμενη

ενζυμική δραστηριότητα 9,6 U/mL και μικρότερη στην αντίδραση με 2,4 U/mL. Στις αντιδράσεις με 7,2 και 4,8 U/mL φαίνεται ότι, κατά τις πρώτες ώρες της αντίδρασης, τα επίπεδα των GOS στο διάλυμα της αντίδρασης είναι μεγαλύτερα για την περίπτωση των 7,2 U/mL, όμως από τις 9 h και μετά, παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση GOS για την περίπτωση των 4,8 U/mL.

Στον Πίνακα 20 παρουσιάζονται οι βέλτιστες μετατροπές των δισακχαριτών και οι μέγιστες παραγωγές GOS με τους αντίστοιχους χρόνους επίτευξής τους. Η ενζυμική δραστηριότητα φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά ($p<0,001$) τόσο την μετατροπή των δισακχαριτών όσο και την αντίστοιχη παραγωγή GOS.

Πίνακας 20. Βέλτιστη μετατροπή δισακχαριτών και παραγωγή GOS και αντίστοιχοι χρόνοι επίτευξής τους για τους 55°C

Ενζυμική Δραστηριότητα (U/mL)	Δισακχαρίτες		GOS	
	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)
2,4	0,87±0,03 ^c	3	8146±14 ^a	24
4,8	0,89±0,01 ^c	24	12974±39 ^c	9
7,2	0,75±0,01^a	3	12230±10 ^b	6
9,6	0,78±0,01 ^b	6	17071±152^d	12

*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

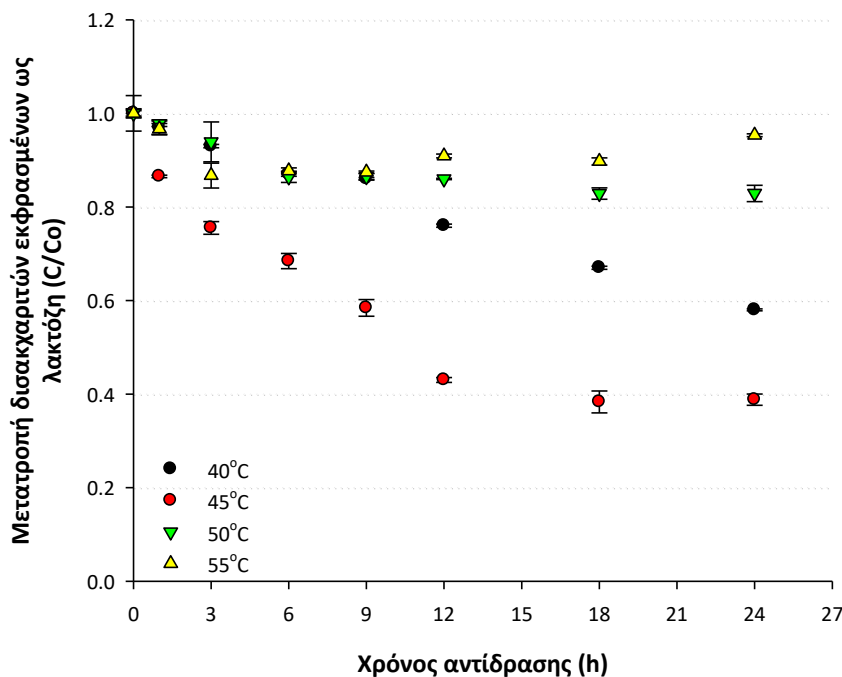
Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

Όπως παρατηρείται, οι μετατροπές των δισακχαριτών ομαδοποιούνται στις περιπτώσεις των αντιδράσεων με ενζυμική δραστηριότητα 2,4 και 4,8 U/mL, εμφανίζοντας τη μικρότερη μετατροπή δισακχαριτών. Ωστόσο, μεγαλύτερη μετατροπή δισακχαριτών φαίνεται να πραγματοποιείται στο διάλυμα της αντίδρασης με ενζυμική δραστηριότητα 7,2 U/mL. Στην παραγωγή των GOS φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά σε όλες τις αντιδράσεις μεταξύ τους, με τις συγκεντρώσεις των GOS να αυξάνονται όσο αυξάνεται η χρησιμοποιούμενη ενζυμική δραστηριότητα.

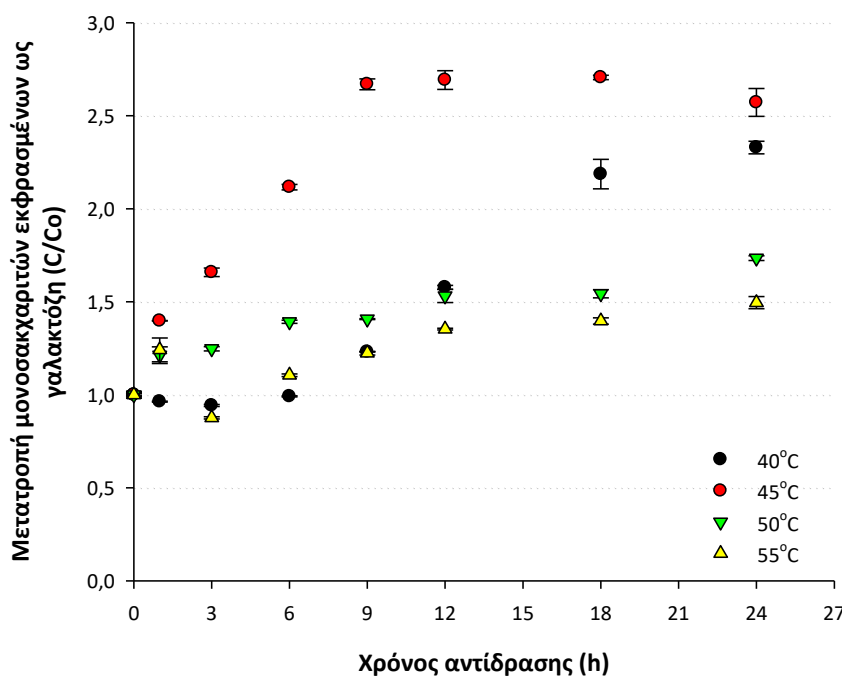
8.8.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ

8.8.2.1 Ενζυμικές αντιδράσεις με 2,4 U/mL β-γαλακτοζιδάσης

Στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγράμματα 27-29) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν με 2,4 U/mL ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης.

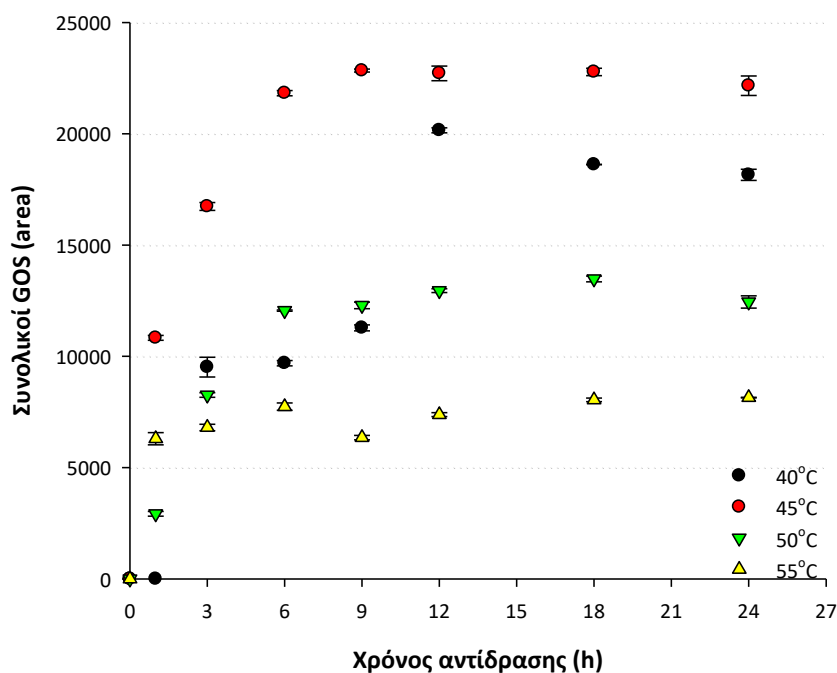


Διάγραμμα 27. Μετατροπή δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 28. Μετατροπή μονοσακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Όπως φαίνεται σε αυτή τη δραστηριότητα ενζύμου, η βέλτιστη θερμοκρασία αντίδρασης είναι οι 45°C με βέλτιστη μετατροπή δισακχαριτών (Διάγραμμα 27) και βέλτιστη παραγωγή GOS (Διάγραμμα 29). Επιπρόσθετα, στους 45°C το διάλυμα της αντίδρασης έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα και σε μονοσακχαρίτες σε σχέση με τα διαλύματα των αντιδράσεων στις υπόλοιπες θερμοκρασίες.



Διάγραμμα 29. Παραγωγή προϊόντος ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Στον Πίνακα 21 παρουσιάζονται οι βέλτιστες μετατροπές των δισακχαριτών και οι μέγιστες παραγωγές GOS με τους αντίστοιχους χρόνους επίτευξής τους, στις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν με ενζυμική δραστηριότητα 2,4 U/mL σε θερμοκρασίες 40-55°C. Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων φάνηκε ότι η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά ($p < 0,001$) τόσο τη μετατροπή των δισακχαριτών όσο και την παραγωγή των GOS.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θερμοκρασία στην οποία επιτυγχάνεται η μέγιστη μετατροπή των δισακχαριτών ταυτίζεται με αυτή στην οποία παρατηρείται και η μέγιστη παραγωγή GOS, δηλαδή οι 45°C. Η αμέσως πιο ευνοϊκή θερμοκρασία φαίνεται να είναι οι 40°C, και ακολουθούν αυτές των 50 και 55°C αντίστοιχα, με την αντίδραση στους 55°C θερμοκρασία να παρουσιάζει τα χειρότερα αποτελέσματα.

Πίνακας 21. Βέλτιστη μετατροπή δισακχαριτών και παραγωγή GOS και αντίστοιχοι χρόνοι επίτευξής τους για ενζυμική δραστικότητα 2,4 U/mL

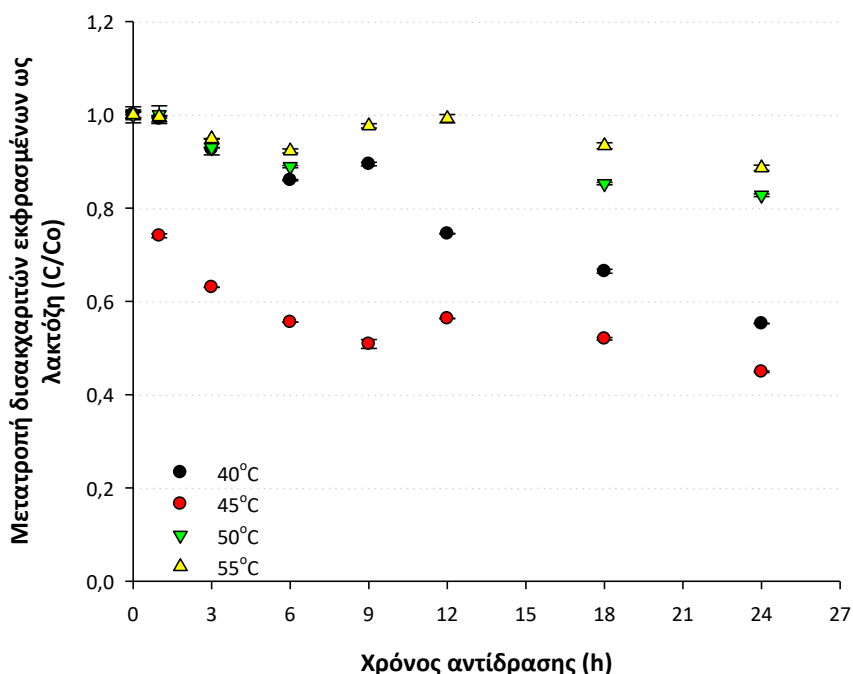
Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)	Δισακχαρίτες		GOS	
	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)
40	0,58±0,00 ^b	24	20159±113 ^c	12
45	0,38±0,02^a	18	22840±68^d	9
50	0,83±0,01 ^c	18	12954±84 ^b	12
55	0,88±0,01 ^d	24	7741±163 ^a	6

*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

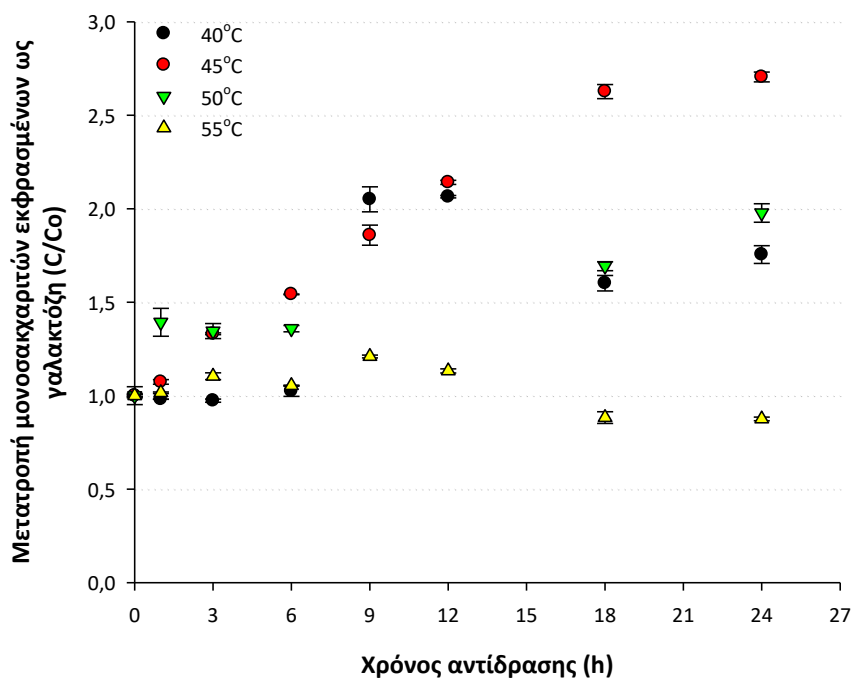
Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

8.8.2.2 Ενζυμικές αντιδράσεις με 4,8 U/mL β-γαλακτοζιδάσης

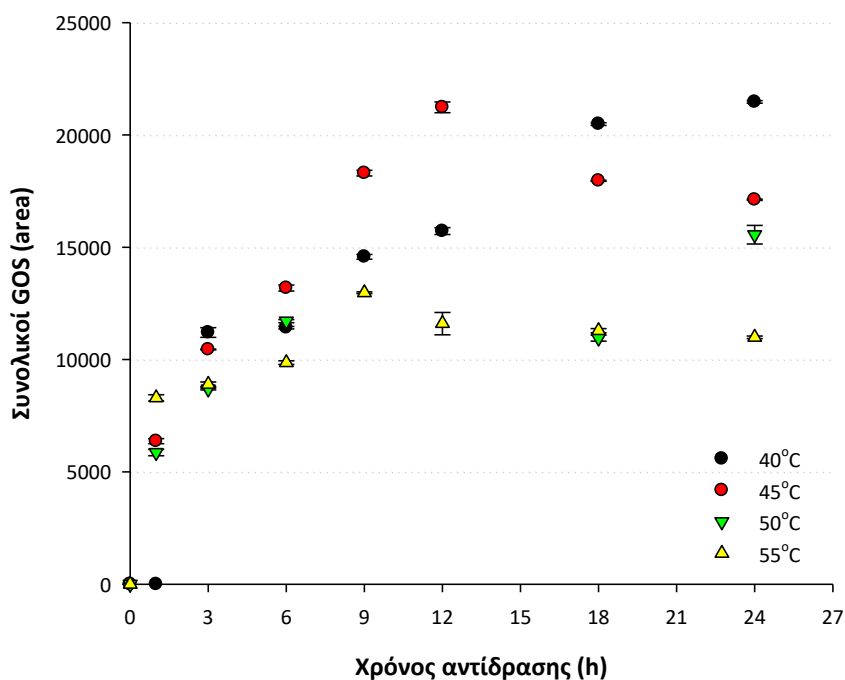
Στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγράμματα 30-32) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών που πραγματοποιήθηκαν με 4,8 U/mL ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης. Όπως φαίνεται σε αυτή τη δραστικότητα ενζύμου, η βέλτιστη θερμοκρασία αντίδρασης φάνηκε να είναι και πάλι οι 45°C.



Διάγραμμα 30. Μετατροπή δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 31. Μετατροπή μονοσακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 32. Παραγωγή προϊόντος ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Στον Πίνακα 22 παρουσιάζονται οι βέλτιστες μετατροπές των δισακχαριτών και οι μέγιστες παραγωγές GOS με τους αντίστοιχους χρόνους επίτευξής τους,

στις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν με ενζυμική δραστηριότητα 4,8 U/mL στις διάφορες θερμοκρασίες. Όπως προέκυψε από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά ($p < 0,001$) τόσο τη μετατροπή των δισακχαριτών όσο και την παραγωγή των GOS.

Πίνακας 22. Βέλτιστη μετατροπή δισακχαριτών και παραγωγή GOS και αντίστοιχοι χρόνοι επίτευξής τους με ενζυμική δραστηριότητα 4,8 U/mL

Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)	Δισακχαρίτες		GOS	
	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)
40	0,55±0,00 ^b	24	21470±58 ^c	24
45	0,45±0,00^a	24	24231±241^c	12
50	0,83±0,00 ^c	24	15559±411 ^b	24
55	0,89±0,01 ^d	24	12974±39 ^a	9

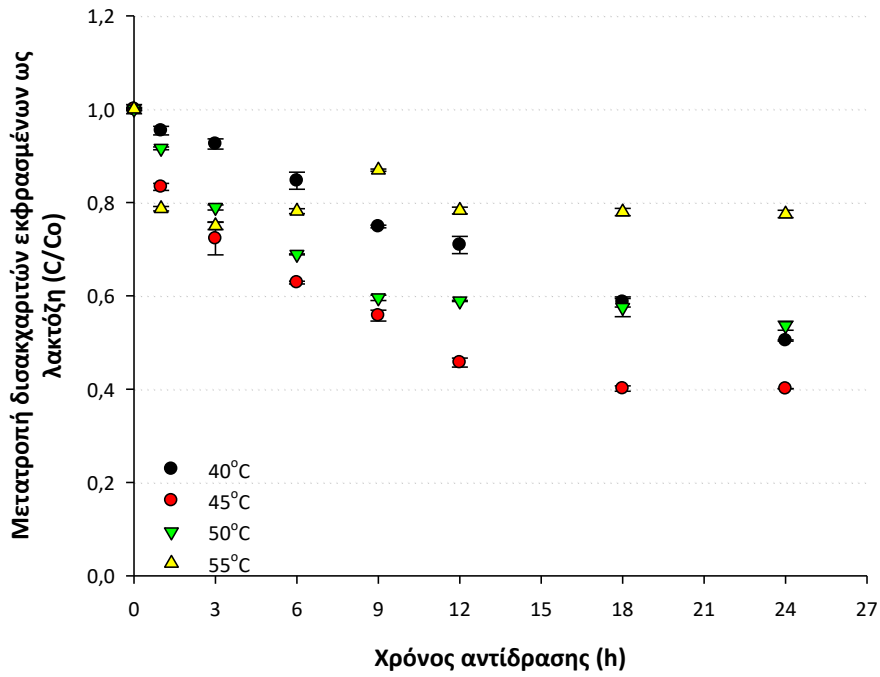
*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

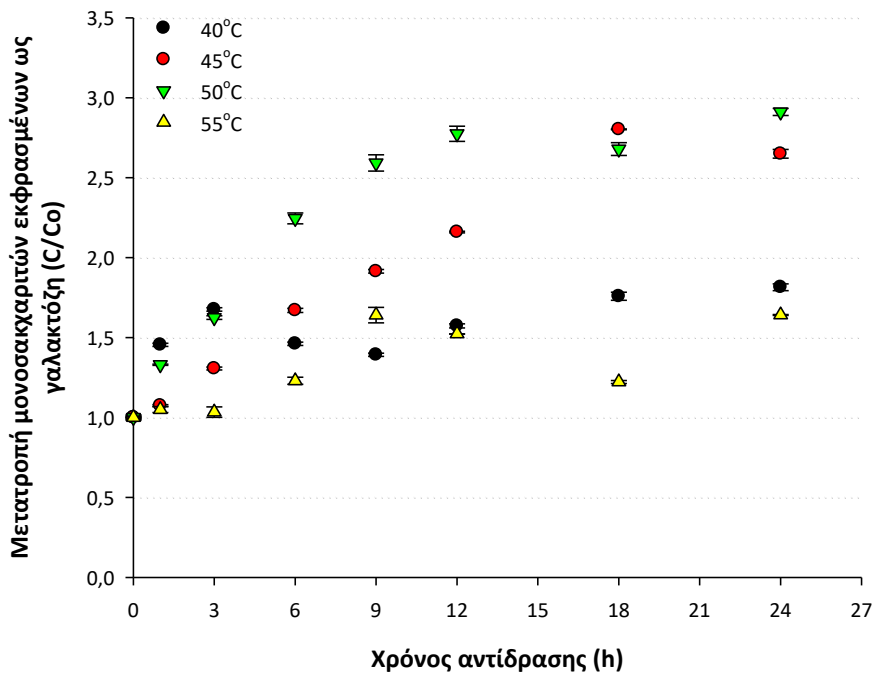
Όπως παρατηρείται από τα αποτελέσματα του πίνακα, η μέγιστη μετατροπή των δισακχαριτών λαμβάνει χώρα στην ίδια θερμοκρασία με αυτή για τη μέγιστη παραγωγή GOS, με βέλτιστη θερμοκρασία αυτή των 45°C. Σημειώνεται ότι, όσον αφορά στη μέγιστη παραγωγή των GOS δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των 40 και 45°C, με τη διαφοροποίηση όμως ότι η μέγιστη παραγωγή GOS στους 45°C επιτυγχάνεται ταχύτερα (12 h) σε σχέση με τους 40°C (24 h).

8.8.2.3 Ενζυμικές αντιδράσεις με 7,2 U/mL β-γαλακτοζιδάσης

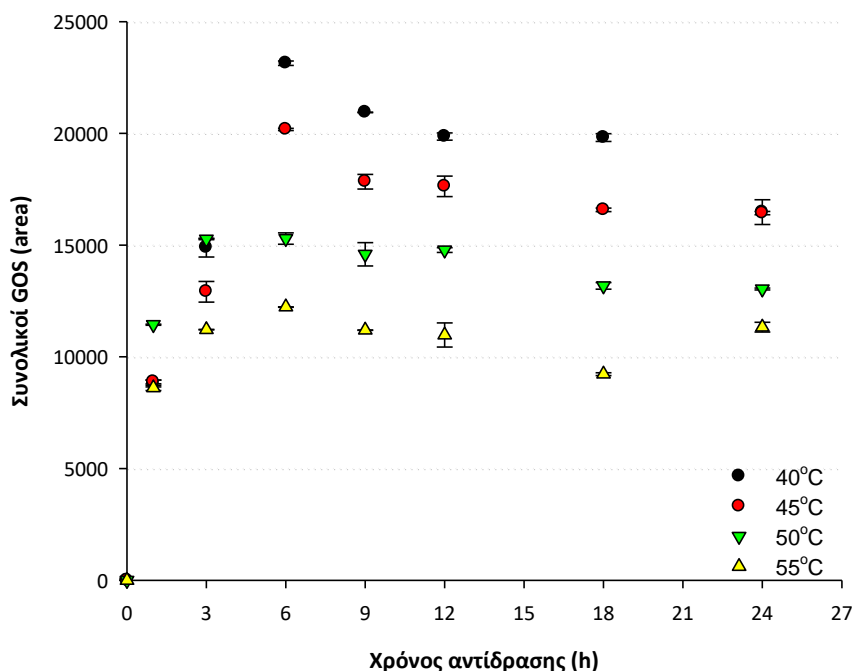
Στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγράμματα 33-35) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν με 7,2 U/mL ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης από *A. oryzae*. Όπως φαίνεται σε αυτή τη δραστηριότητα ενζύμου, η βέλτιστη μετατροπή δισακχαριτών πραγματοποιείται σε θερμοκρασία αντίδρασης 45°C (Διάγραμμα 33), ενώ η βέλτιστη παραγωγή προϊόντος παρατηρείται στους 40°C (Διάγραμμα 35).



Διάγραμμα 33. Μετατροπή δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 34. Μετατροπή μονοσακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 35. Παραγωγή προϊόντος ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Στον Πίνακα 23 παρουσιάζονται οι βέλτιστες μετατροπές των δισακχαριτών και οι μέγιστες παραγωγές GOS με τους αντίστοιχους χρόνους επίτευξής τους, στις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν με ενζυμική δραστηριότητα 7,2 U/mL στις διάφορες θερμοκρασίες.

Πίνακας 23. Βέλτιστη μετατροπή δισακχαριτών και παραγωγή GOS και αντίστοιχοι χρόνοι επίτευξής τους με ενζυμική δραστηριότητα 7,2 U/mL

Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)	Δισακχαρίτες		GOS	
	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)
40	0,50±0,00 ^b	24	23138±100 ^d	6
45	0,40±0,00 ^a	24	20176±50 ^c	6
50	0,54±0,01 ^c	24	15295±252 ^b	6
55	0,75±0,01 ^d	3	12230±10 ^a	6

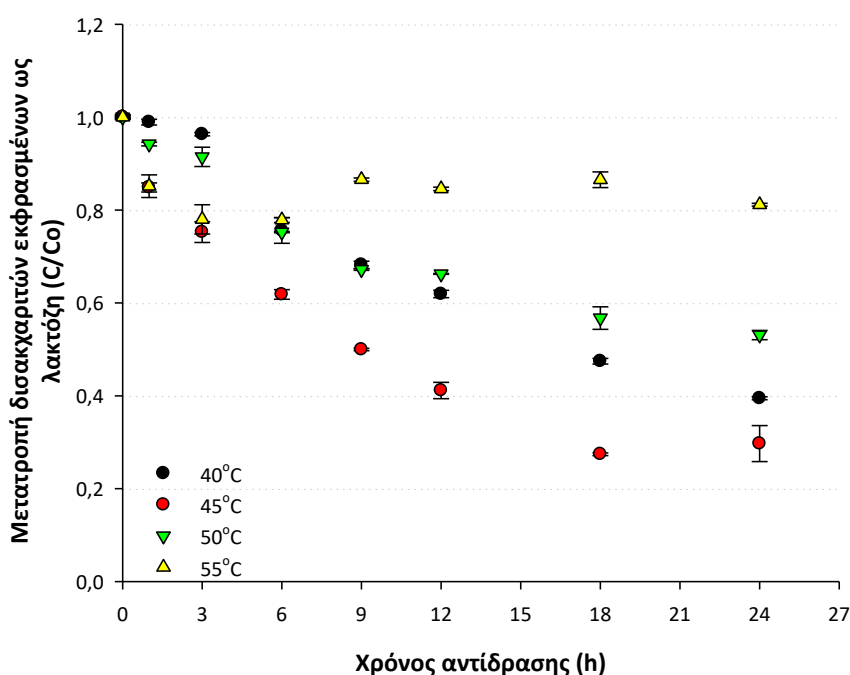
*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

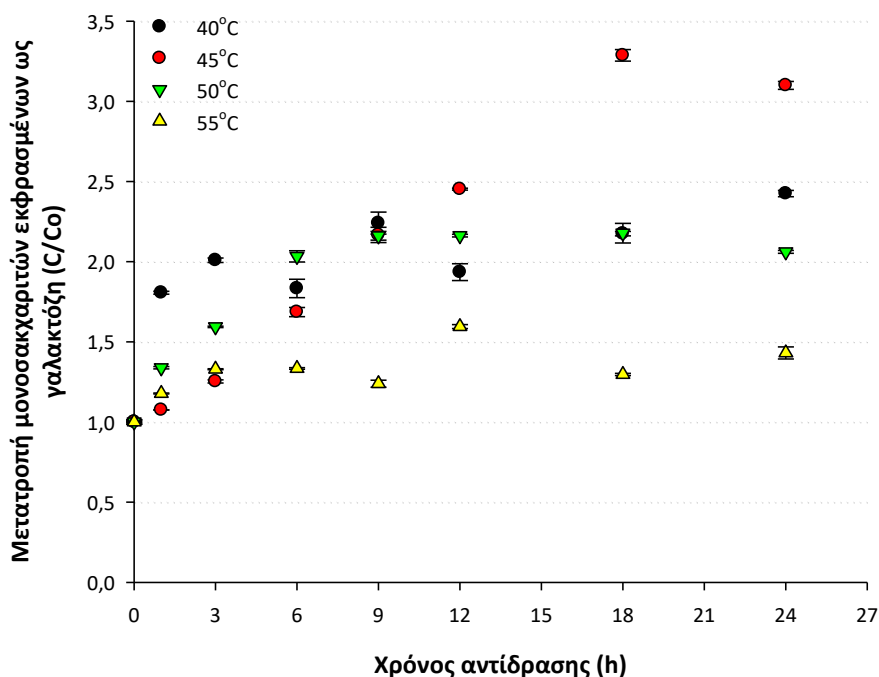
Στις αντιδράσεις με δραστικότητα ενζύμου 7,2 U/mL, η μέγιστη κατανάλωση των δισακχαριτών φαίνεται να εμφανίζεται στους 45°C, αμέσως επόμενη καλύτερη θερμοκρασία αντίδρασης φαίνεται να είναι οι 40°C, και ακολουθούν οι αντιδράσεις στους 50 και 55°C, με την αντίδραση στους 55°C να παρουσιάζει τα χειρότερα αποτελέσματα. Όσον αφορά στη μέγιστη παραγωγή των GOS, χειρότερη θερμοκρασία αντίδρασης φαίνεται να είναι οι 55°C, αμέσως καλύτερη οι 50°C, ενώ τα καλύτερα αποτελέσματα για την παραγωγή GOS φαίνεται να επιτυγχάνονται στους 40°C και όχι στους 45°C, παρά το γεγονός ότι η αντίδραση στη δεύτερη θερμοκρασία εμφανίζει μεγαλύτερη μετατροπή δισακχαριτών.

8.8.2.4 Ενζυμικές αντιδράσεις με 9,6 U/mL β-γαλακτοζιδάσης

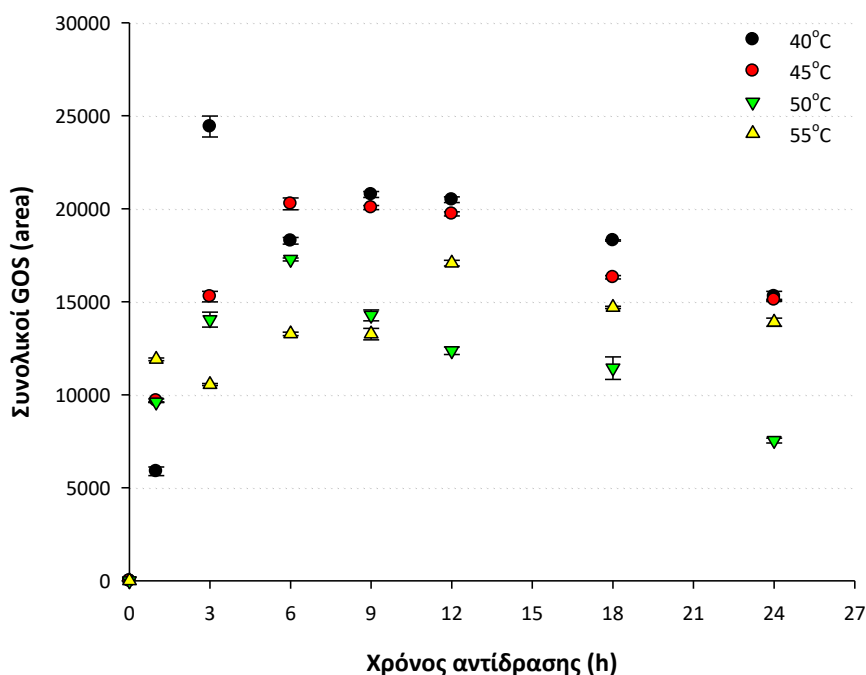
Στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγράμματα 36-38) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν με 9,6 U/mL ενζύμου β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae*. Η βέλτιστη μετατροπή δισακχαριτών πραγματοποιείται σε θερμοκρασία αντίδρασης 45°C (Διάγραμμα 36), ενώ η βέλτιστη παραγωγή GOS παρατηρείται στους 40°C (Διάγραμμα 38).



Διάγραμμα 36. Μετατροπή δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 37. Μετατροπή μονοσακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης



Διάγραμμα 38. Παραγωγή προϊόντος ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης

Στον Πίνακα 23 παρουσιάζονται οι βέλτιστες μετατροπές των δισακχαριτών και οι μέγιστες παραγωγές GOS με τους αντίστοιχους χρόνους επίτευξής τους,

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

στις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν με ενζυμική δραστηριότητα 7,2 U/mL στις διάφορες θερμοκρασίες.

Πίνακας 24. Βέλτιστη μετατροπή δισακχαριτών και παραγωγή GOS και αντίστοιχοι χρόνοι επίτευξής τους με ενζυμική δραστηριότητα 9,6 U/mL

Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)	Δισακχαρίτες		GOS	
	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)	Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)
40	0,38±0,00 ^b	24	24417±563 ^d	3
45	0,27±0,00 ^a	18	20265±316 ^c	6
50	0,53±0,01 ^c	24	17274±077 ^b	6
55	0,78±0,01 ^d	6	17071±152 ^a	12

*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

Όπως φαίνεται από τον πίνακα, στις ενζυμικές αντιδράσεις με δραστηριότητα ενζύμου 9,6 U/mL αντίδρασης, τα αποτελέσματα για τη μέγιστη κατανάλωση των δισακχαριτών φαίνεται να εμφανίζονται στους 45°C, αμέσως επόμενη καλύτερη θερμοκρασία αντίδρασης φαίνεται να είναι οι 40°C, και ακολουθούν οι αντιδράσεις στους 50 και 55°C, με την αντίδραση στους 55°C να παρουσιάζει τα χειρότερα αποτελέσματα. Όσον αφορά στη μέγιστη παραγωγή των GOS χειρότερη θερμοκρασία αντίδρασης φαίνεται να είναι οι 55°C, αμέσως καλύτερη οι 50°C, ενώ καλύτερα αποτελέσματα στους GOS φαίνεται να επιτυγχάνονται στους 40°C, και όχι στους 45°C, παρά το γεγονός ότι η αντίδραση στη δεύτερη θερμοκρασία εμφανίζει μεγαλύτερη μετατροπή δισακχαριτών.

8.9 ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 25) παρουσιάζονται ομαδοποιημένες οι βέλτιστες μετατροπές των δισακχαριτών, καθώς και η μέγιστη παραγωγή των GOS όλων των πειραμάτων που παρουσιάστηκαν στις παραπάνω ενότητες, ώστε να διεξαχθεί ένα σαφές συμπέρασμα για τη βέλτιστη θερμοκρασία αντίδρασης και τη βέλτιστη δραστηριότητα ενζύμου για την αντίδραση μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS.

Πίνακας 25. Συνολικός πίνακας βέλτιστων αποτελεσμάτων για τη μετατροπή των δισακχαριτών και την παραγωγή των GOS για κάθε συνθήκη της αντίδρασης

Ενζυμική Δραστητικότητα (U/mL)	Θερμοκρασία Αντίδρασης (°C)	Δισακχαρίτες		GOS	
		Μετατροπή (C/Co)	Χρόνος (h)	Παραγωγή (area)	Χρόνος (h)
2,4 U/mL	40	0,58±0,00 ^h	24	7741±163 ^a	6
	45	0,38±0,02 ^b	18	22840±68 ⁱ	9
	50	0,83±0,01 ^k	18	12954±84 ^d	12
	55	0,87±0,03 ^l	3	8146±14 ^b	24
4,8 U/mL	40	0,55±0,00 ^g	24	21470±58 ^h	24
	45	0,45±0,00 ^d	24	21231±241 ^h	12
	50	0,83±0,00 ^k	24	15559±411 ^e	24
	55	0,89±0,01 ^m	24	12974±39 ^d	9
7,2 U/mL	40	0,50±0,00 ^e	24	23138±100 ⁱ	6
	45	0,40±0,00 ^c	24	20176±50 ^g	6
	50	0,54±0,01 ^{fg}	24	15295±252 ^e	6
	55	0,75±0,01 ⁱ	3	12230±10 ^c	6
9,6 U/mL	40	0,38±0,00 ^b	24	24417±563^j	3
	45	0,27±0,00^a	18	20265±316 ^g	6
	50	0,53±0,01 ^f	24	17274±77 ^f	6
	55	0,78±0,01 ^j	6	17071±152 ^f	12

*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι τόσο η θερμοκρασία της αντίδρασης όσο και η δραστητικότητα του χρησιμοποιούμενου ενζύμου επηρεάζουν σημαντικά ($p < 0,001$) την πορεία της αντίδρασης. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι, οι βέλτιστες συνθήκες για την υδρόλυση της λακτόζης είναι ο συνδυασμός θερμοκρασίας 45°C και ενζυμικής δραστητικότητας 9,6 U/mL αντίδρασης, ενώ για τη σύνθεση των GOS ο συνδυασμός θερμοκρασίας 40°C με ενζυμική δραστητικότητα 9,6 U/mL αντίδρασης. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω επιπλέον πολυμερισμού των GOS που ανιχνεύονται στην περίπτωση των 45°C προς GOS μεγαλύτερου βαθμού πολυμερισμού, που όμως βρίσκονται σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από αυτές που ήταν δυνατόν να ανιχνευτούν στο σύστημα. Επομένως, ως βέλτιστη θερμοκρασία θα μπορούσαν να επιλεγθούν και οι 40°C, που δίνουν άλλωστε και τη 2^η καλύτερη μετατροπή δισακχαριτών. Ως δραστητικότητα ενζύμου επιλέγονται τα 9,6 U/mL αντίδρασης. Συμπερασματικά,

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

λοιπόν, η βέλτιστη μετατροπή της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS με το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης από το μικροοργανισμό *A. oryzae* κρίνεται ότι επιτεύχθηκε στους 40°C με 9,6 U ενζύμου ανά mL της αντίδρασης.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ

Πέρα από την απεικόνιση των μετρήσεων για την διεξαγωγή συμπερασμάτων, σημαντική είναι και η μαθηματική περιγραφή των φαινομένων που παρατηρούνται, ώστε να μπορούν να γίνουν προβλέψεις για τιμές που δεν έχουν προσδιοριστεί πειραματικά, καθώς και εκτιμήσεις βέλτιστων χρόνων παραγωγής προϊόντος.

8.10 ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΤΩΝ ΔΙΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ & ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ GOS ΑΠΟ ΤΟ ΧΡΟΝΟ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Η μετατροπή των δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου της ενζυμικής αντίδρασης ακολούθησε την εκθετική εξίσωση:

$$C/C_0 = 1 + a \cdot [1 - \exp(-b \cdot t)] \quad (\text{Εξ. 1})$$

όπου, C είναι η % w/v περιεκτικότητα των δισακχαριτών εκφρασμένων ως λακτόζη στον χρόνο αντίδρασης t , C_0 η % w/v περιεκτικότητα των δισακχαριτών τη χρονική στιγμή μηδέν, b η σταθερά του ρυθμού μετατροπής των δισακχαριτών σε h^{-1} , και a παράμετρος της εξίσωσης (αδιάστατο μέγεθος),

και η παραγωγή των GOS ακολούθησε την εκθετική εξίσωση:

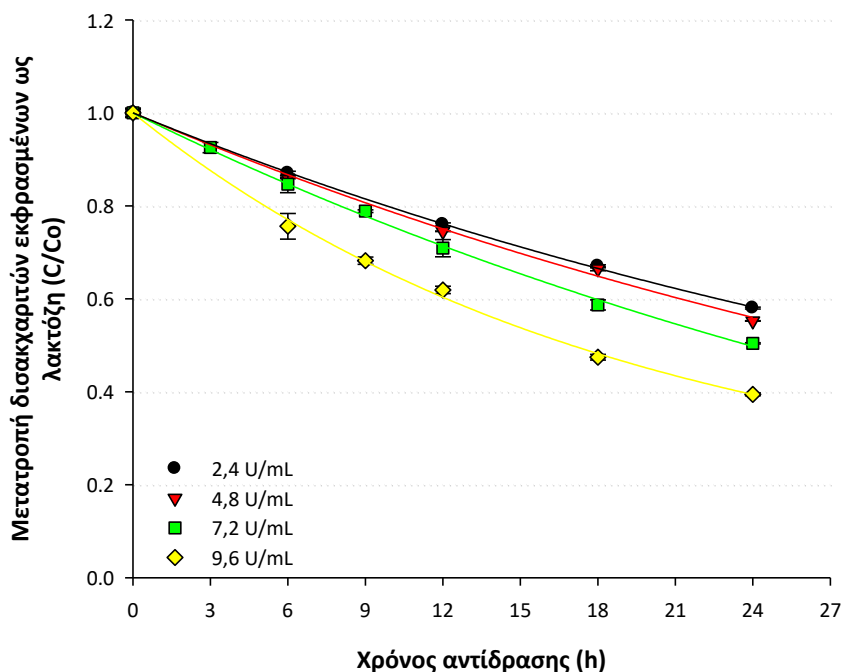
$$\text{Συνολικοί GOS} = a \cdot [1 - \exp(-b \cdot t)] \quad (\text{Εξ. 2})$$

όπου, οι *συνολικοί GOS* είναι εκφρασμένοι με βάση το εμβαδό απόκρισης του συστήματος HPLC-RI που ανταποκρίνεται στην κορυφή έκλυσης του προϊόντος σε χρόνο αντίδρασης t , b είναι η σταθερά του ρυθμού παραγωγής των GOS σε h^{-1} , και a παράμετρος της εξίσωσης (αδιάστατο μέγεθος).

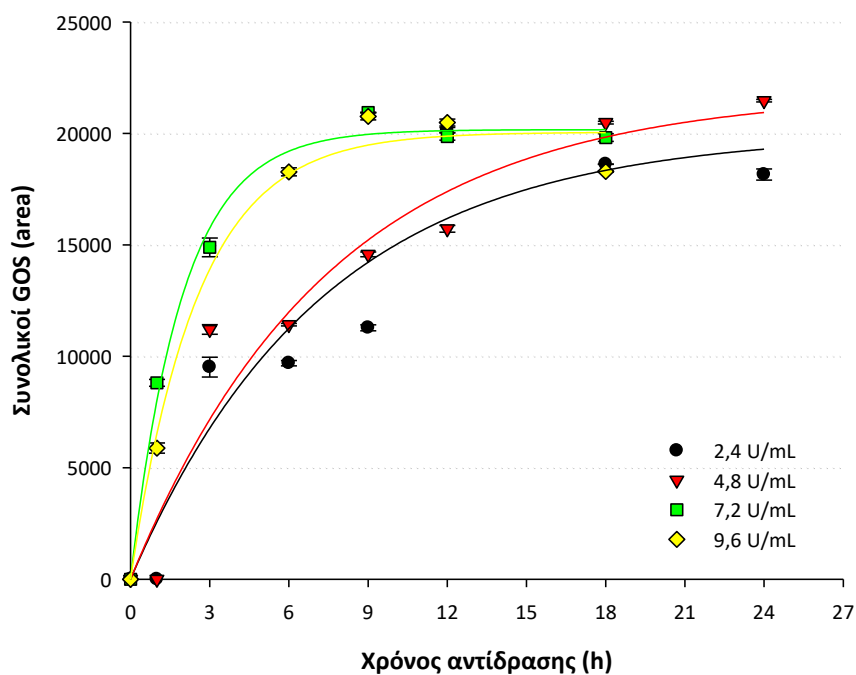
Η κατασκευή των μαθηματικών μοντέλων πραγματοποιήθηκε για όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες (40-55°C) και ενζυμικές δραστηρότητες (2,4-9,6 U/mL). Ως προς τη μετατροπή των μονοσακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου της αντίδρασης, τα αποτελέσματα σε πολλούς από τους μελετώμενους συνδυασμούς θερμοκρασίας-ενζυμικής δραστηρότητας δε φάνηκαν να ακολουθούν μία συγκεκριμένη τάση, είτε αυξητικής είτε μειούμενης μετατροπής τους ως συνάρτηση του χρόνου της αντίδρασης. Αυτό πιθανόν να μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι μονοσακχαρίτες βρίσκονται σε μία ιδιαιτέρως δυναμική κατάσταση λόγω της συνεχούς υδρόλυσης της λακτόζης αλλά και της παραγωγής GOS, με αποτέλεσμα τα μονομερή σάκχαρα να παρουσιάζουν μία εναλλάξ αύξηση ή μείωση της συγκέντρωσής τους αντίστοιχα. Με βάση τα παραπάνω, κρίθηκε σκόπιμο να μην πραγματοποιηθεί μαθηματική περιγραφή της συμπεριφοράς των μονοσακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου της ενζυμικής αντίδρασης.

8.10.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΤΟΥΣ 40°C

Στα Διαγράμματα 39 και 40 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν στους 40°C και οι αντίστοιχες καμπύλες που προκύπτουν από την προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων στις Εξ. 1 και 2 αντίστοιχα.



Διάγραμμα 39. Προσαρμογή της Εξ. 1 στα πειραματικά σημεία της μετατροπής των δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου της αντίδρασης



Διάγραμμα 40. Προσαρμογή της Εξ. 2 στα πειραματικά σημεία της παραγωγής GOS ως συνάρτηση του χρόνου της αντίδρασης

Στους Πίνακες 26 και 27 παρουσιάζονται οι παράμετροι των μοντέλων, οι συντελεστές συσχέτισης, καθώς και το χρονικό εύρος της αντίδρασης στο οποίο ισχύουν τα προτεινόμενα μαθηματικά μοντέλα.

Πίνακας 26. Παράμετροι μοντέλων μετατροπής δισακχαριτών ως συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης στους 40°C

Ενζυμική Δραστητικότητα (U/mL)	Παράμετροι		R^2	Χρονικό εύρος ισχύος (h)
	α	b (h ⁻¹)		
2,4	-0,958±0,064	0,024±0,002 ^a	0,999	0-24
4,8	-1,053±0,244	0,023±0,006 ^a	0,997	0-24
7,2	-1,170±0,163	0,023±0,004 ^a	0,998	0-24
9,6	-0,840±0,005	0,053±0,005 ^b	0,998	0-24

*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα πρόβλεψης.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

Πίνακας 27. Παράμετροι μοντέλων παραγωγής GOS ως συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης στους 40°C

Ενζυμική Δραστητικότητα (U/mL)	Παράμετροι		R^2	Χρονικό εύρος ισχύος (h)
	α	b (h ⁻¹)		
2,4	20032±2880	0,138±0,051 ^a	0,903	0-24
4,8	21846±2432	0,133±0,037 ^a	0,941	0-24
7,2	20169±448	0,506±0,051 ^c	0,993	0-18
9,6	20055±736	0,394±0,059 ^b	0,986	0-18

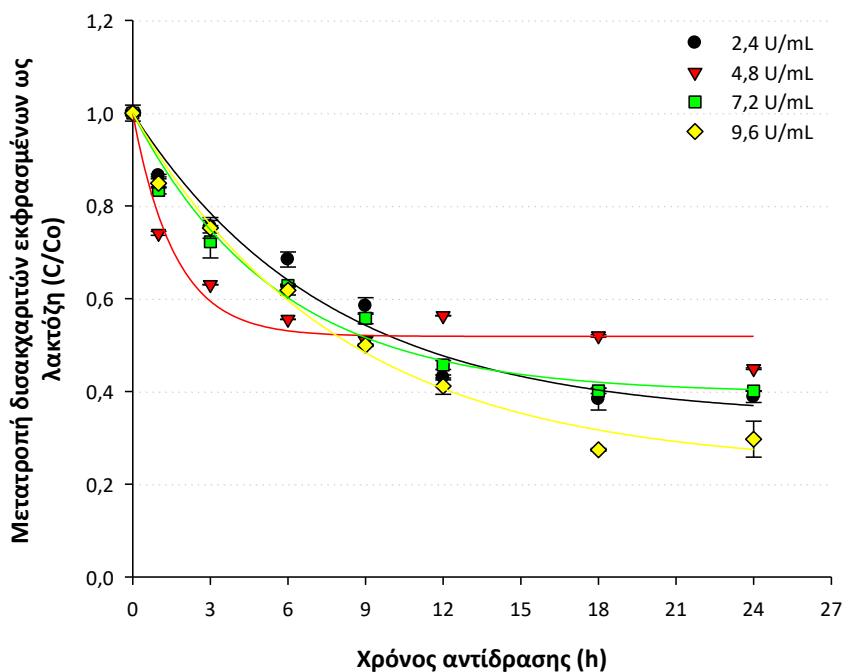
*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα πρόβλεψης.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

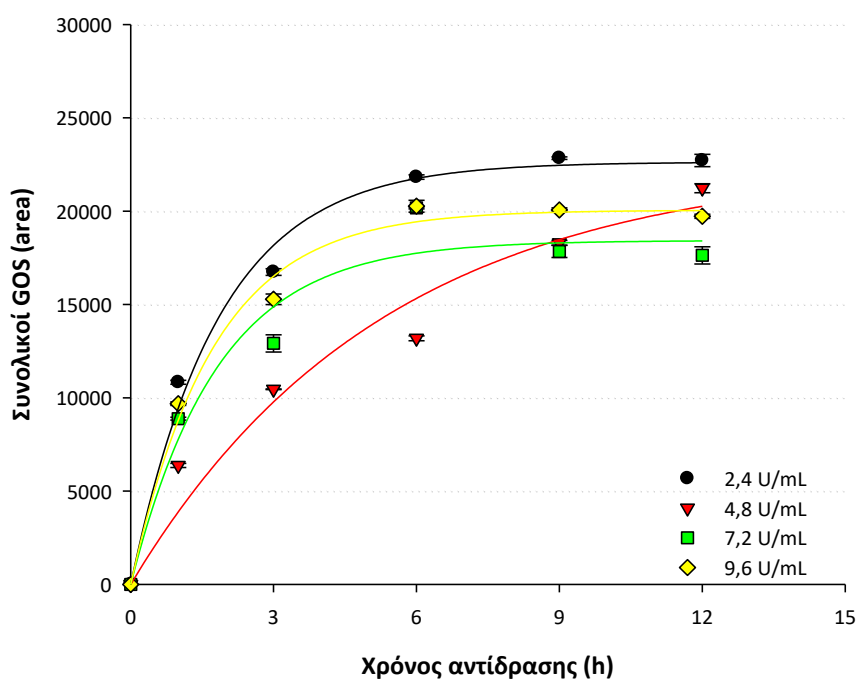
Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 27, η μοντελοποίηση των GOS γίνεται για το χρονικό διάστημα αντίδρασης από 0-18 h για τις αντιδράσεις με χρησιμοποιούμενη ενζυμική δραστητικότητα 7,2 και 9,6 U/mL αντίδρασης, καθώς από αυτό το σημείο της αντίδρασης και μετά παρατηρείται είτε σταθεροποίηση, είτε πτώση των επιπέδων των GOS στα διαλύματα των αντιδράσεων.

8.10.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΤΟΥΣ 45°C

Στα Διαγράμματα 41 και 42 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν στους 45°C και οι αντίστοιχες καμπύλες που προκύπτουν από την προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων στις Εξ. 1 και 2 αντίστοιχα.



Διάγραμμα 41. Προσαρμογή της Εξ. 1 στα πειραματικά σημεία της μετατροπής των δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου της αντίδρασης



Διάγραμμα 42. Προσαρμογή της Εξ. 2 στα πειραματικά σημεία της παραγωγής GOS ως συνάρτηση του χρόνου της αντίδρασης

Στους Πίνακες 28 και 29 παρουσιάζονται οι παράμετροι των μοντέλων, οι συντελεστές συσχέτισης, καθώς και το χρονικό εύρος της αντίδρασης στο οποίο ισχύουν τα προτεινόμενα μαθηματικά μοντέλα.

Πίνακας 28. Παράμετροι μοντέλων μετατροπής δισακχαριτών ως συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης στους 45°C

Ενζυμική Δραστηριότητα (U/mL)	Παράμετροι		R ²	Χρονικό εύρος ισχύος (h)
	α	b (h ⁻¹)		
2,4	-0,658±0,471	0,132±0,023 ^a	0,972	0-24
4,8	-0,481±0,019	0,616±0,133 ^b	0,953	0-24
7,2	-0,604±0,031	0,180±0,027 ^a	0,971	0-24
9,6	-0,762±0,041	0,126±0,017 ^a	0,986	0-24

*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα πρόβλεψης.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

Πίνακας 29. Παράμετροι μοντέλων περιεκτικότητας GOS ως συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης στους 45°C

Ενζυμική Δραστηριότητα (U/mL)	Παράμετροι		R ²	Χρονικό εύρος ισχύος (h)
	α	b (h ⁻¹)		
2,4	22629±667	0,541±0,066 ^b	0,990	0-12
4,8	22607±3297	0,189±0,063 ^a	0,960	0-12
7,2	18428±1122	0,549±0,139 ^b	0,958	0-12
9,6	20052±563	0,578±0,069 ^b	0,990	0-12

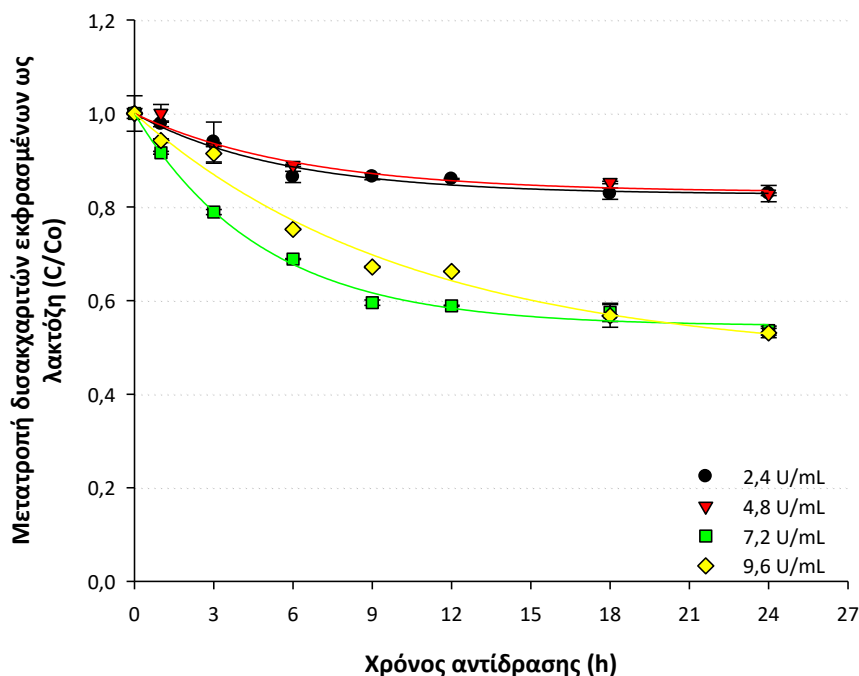
*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα πρόβλεψης.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

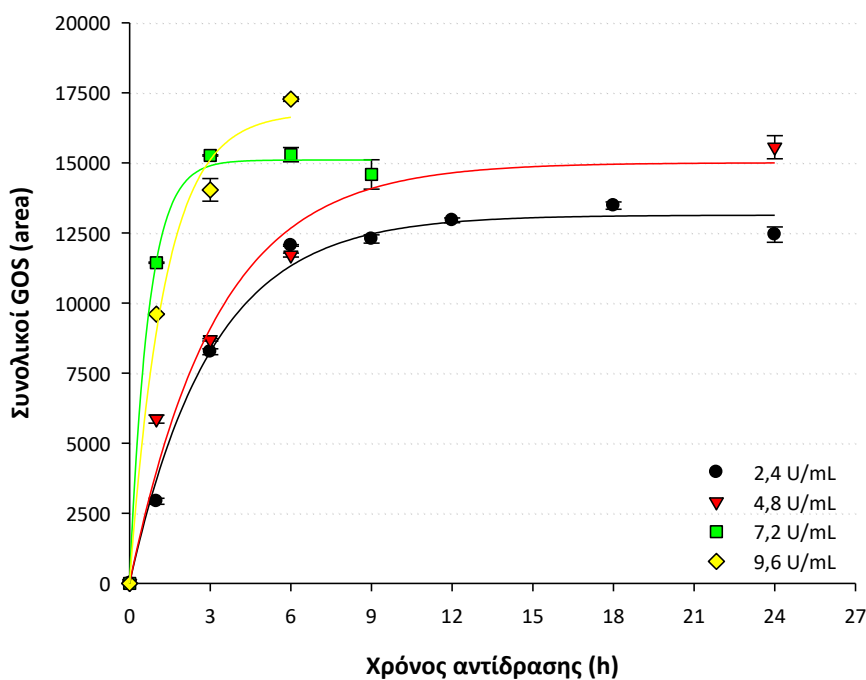
Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 28, η μοντελοποίηση των GOS γίνεται για το χρονικό διάστημα αντίδρασης από 0-12 h, καθώς από αυτό το σημείο της αντίδρασης και μετά παρατηρείται είτε σταθεροποίηση, είτε πτώση των επιπέδων των GOS στα διαλύματα των αντιδράσεων.

8.10.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΤΟΥΣ 50°C

Στα Διαγράμματα 43 και 44 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν στους 50°C και οι αντίστοιχες καμπύλες που προκύπτουν από την προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων στις Εξ. 1 και 2 αντίστοιχα.



Διάγραμμα 43. Προσαρμογή της Εξ. 1 στα πειραματικά σημεία της μετατροπής των δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου της αντίδρασης



Διάγραμμα 44. Προσαρμογή της Εξ. 2 στα πειραματικά σημεία της παραγωγής GOS ως συνάρτηση του χρόνου της αντίδρασης

Στους Πίνακες 30 και 31 παρουσιάζονται οι παράμετροι των μοντέλων, οι συντελεστές συσχέτισης, καθώς και το χρονικό εύρος της αντίδρασης στο οποίο ισχύουν τα προτεινόμενα μαθηματικά μοντέλα.

Πίνακας 30. Παράμετροι μοντέλων μετατροπής δισακχαριτών ως συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης στους 50°C

Ενζυμική Δραστητικότητα (U/mL)	Παράμετροι		R ²	Χρονικό εύρος ισχύος (h)
	α	b (h ⁻¹)		
2,4	-0,173±0,009	0,179±0,030 ^b	0,974	0-24
4,8	-0,169±0,014	0,159±0,040 ^b	0,966	0-24
7,2	-0,455±0,010	0,206±0,015 ^b	0,995	0-24
9,6	-0,524±0,042	0,096±0,016 ^a	0,984	0-24

*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα πρόβλεψης.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

Πίνακας 31. Παράμετροι μοντέλων περιεκτικότητας GOS ως συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης στους 50°C

Ενζυμική Δραστητικότητα (U/mL)	Παράμετροι		R ²	Χρονικό εύρος ισχύος (h)
	α	b (h ⁻¹)		
2,4	13136±311	0,330±0,032 ^a	0,990	0-24
4,8	15008±896	0,310±0,063 ^a	0,965	0-24
7,2	15102±233	1,435±0,121 ^c	0,997	0-9
9,6	16797±990	0,766±0,152 ^b	0,989	0-9

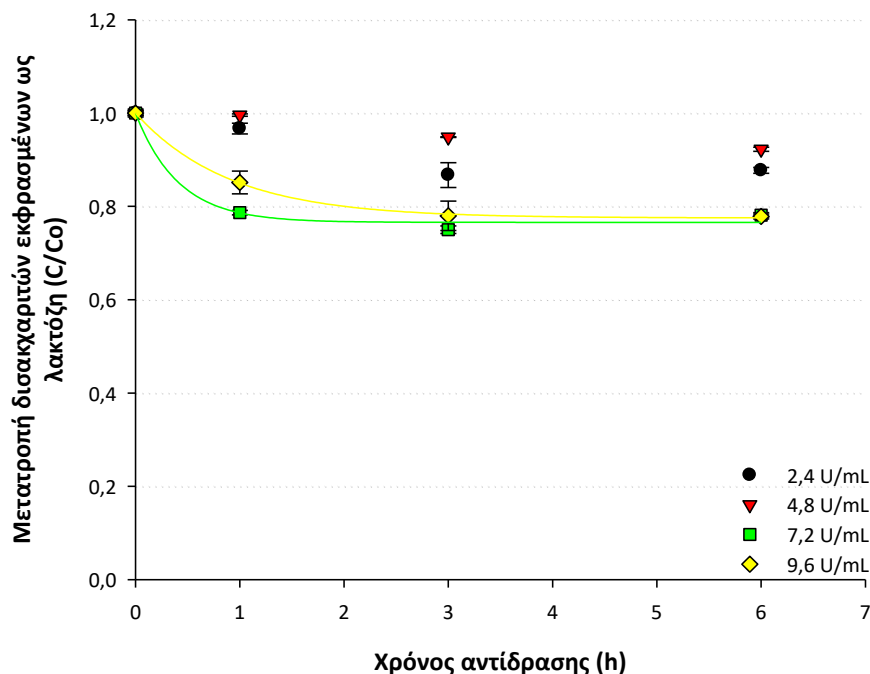
*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα πρόβλεψης.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

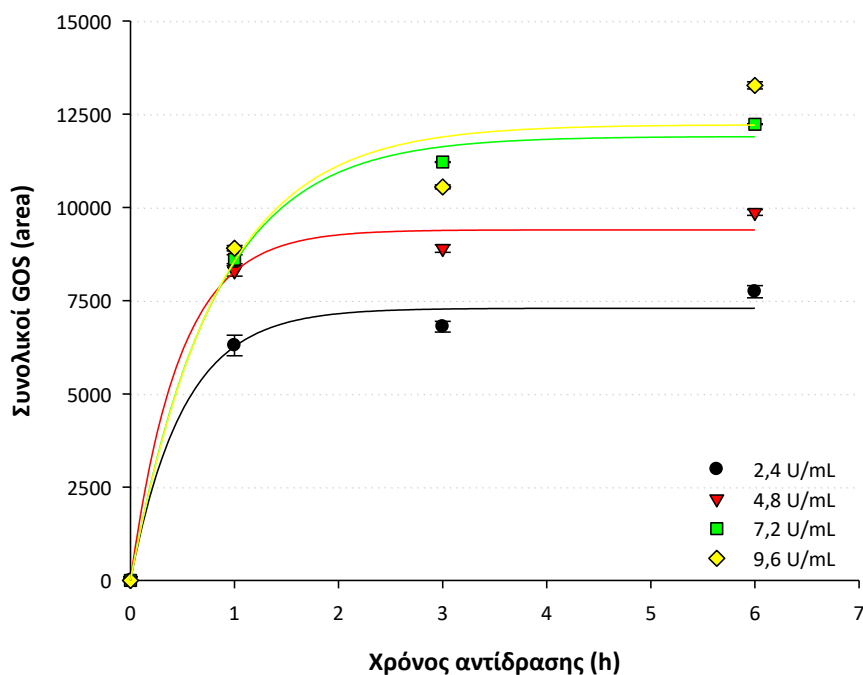
Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 31, η μοντελοποίηση των GOS γίνεται για το χρονικό διάστημα αντίδρασης από 0-9 h για την αντίδραση με ενζυμική δραστητικότητα 7,2 U/mL αντίδρασης και από 0-6 h για την αντίδραση με ενζυμική δραστητικότητα 9,6 U/mL αντίδρασης, καθώς από αυτό το σημείο της αντίδρασης και μετά παρατηρείται είτε σταθεροποίηση, είτε πτώση των επιπέδων των GOS στα διαλύματα των αντιδράσεων.

8.10.4 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΤΟΥΣ 55°C

Στα Διαγράμματα 45 και 46 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν στους 55°C και οι αντίστοιχες καμπύλες που προκύπτουν από την προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων στις Εξ. 1 και 2 αντίστοιχα.



Διάγραμμα 45. Προσαρμογή της Εξ. 1 στα πειραματικά σημεία της μετατροπής των δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου της αντίδρασης



Διάγραμμα 46. Προσαρμογή της Εξ. 2 στα πειραματικά σημεία της παραγωγής GOS ως συνάρτηση του χρόνου της αντίδρασης

Στους Πίνακες 32 και 33 παρουσιάζονται οι παράμετροι των μοντέλων, οι συντελεστές συσχέτισης, καθώς και το χρονικό εύρος της αντίδρασης στο οποίο ισχύουν τα προτεινόμενα μαθηματικά μοντέλα.

Πίνακας 32. Παράμετροι μοντέλων μετατροπής δισακχαριτών ως συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης στους 55°C

Ενζυμική Δραστητικότητα (U/mL)	Παράμετροι		R ²	Χρονικό εύρος ισχύος (h)
	α	b (h ⁻¹)		
2,4	-	-	-	-
4,8	-	-	-	-
7,2	-0,234±0,011	2,440±0,926 ^a	0,986	0-6
9,6	-0,225±0,003	1,099±0,055 ^a	0,999	0-6

*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα πρόβλεψης.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

Όσον αφορά στη μετατροπή των δισακχαριτών, η μοντελοποίηση δεν είναι δυνατή για τις αντιδράσεις με ενζυμική δραστητικότητα 2,4 και 4,8 U/mL, καθώς οι αντίστοιχες μετατροπές είναι πολύ χαμηλές.

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 33, η μοντελοποίηση των GOS γίνεται για το χρονικό διάστημα αντίδρασης από 0-6 h για όλες τις αντιδράσεις, καθώς από αυτό το σημείο της αντίδρασης και μετά παρατηρείται είτε σταθεροποίηση, είτε πτώση των επιπέδων των GOS στα διαλύματα των αντιδράσεων.

Πίνακας 33. Παράμετροι μοντέλων περιεκτικότητας GOS ως συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης στους 55°C

Ενζυμική Δραστητικότητα (U/mL)	Παράμετροι		R ²	Χρονικό εύρος ισχύος (h)
	α	b (h ⁻¹)		
2,4	7295±334	1,961±0,536 ^{ab}	0,974	0-24
4,8	9398±344	2,123±0,509 ^a	0,966	0-24
7,2	11903±302	1,256±0,136 ^b	0,995	0-24
9,6	12218±992	1,206±0,409 ^b	0,984	0-24

*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα πρόβλεψης.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι, οι σταθερές του ρυθμού μετατροπής των δισακχαριτών (Πίνακες 26, 28, 30 και 32) υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας, δεν παρουσιάζουν στην πλειοψηφία τους σημαντική εξάρτηση από την χρησιμοποιούμενη δραστικότητα του ενζύμου. Παρόμοια συμπεριφορά ως προς την επίδραση της ενζυμικής δραστικότητας εμφανίζουν και οι σταθερές του ρυθμού παραγωγής των GOS (Πίνακες 27, 29, 31 και 33).

8.11 ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΕΞΙΣΩΣΕΩΝ

Η μετατροπή των δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου της ενζυμικής αντίδρασης φάνηκε να ακολουθεί την παρακάτω εξίσωση

$$C/C_0 = 1 + a \cdot [1 - \exp(-b \cdot t)]$$

η μορφή της οποίας δεν ταυτίζεται με τις εξισώσεις που περιγράφουν την κατανάλωση αντιδρώντων σε κινητική πρώτης τάξης:

$$C = C_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$$

αλλά φαίνεται να σχετίζεται με κινητικές διαδοχικών ή παράλληλων αντιδράσεων, γεγονός που επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση ότι το σύνολο των δισακχαριτών αποτελεί ένα μίγμα αντιδρώντων και παραγόμενων σακχάρων. Έτσι, η παράμετρος b σε αυτή την περίπτωση φαίνεται να σχετίζεται τόσο από τη θερμοκρασία (στατικοί μέσοι όροι του b : 0,031, 0,160, 0,264 και 1,770 σε θερμοκρασία 40, 45, 50 και 55°C αντίστοιχα) όσο και από την ενζυμική δραστικότητα (στατικοί μέσοι όροι του b : 0,112, 0,266, 0,136 και 0,092 με χρησιμοποιούμενη ενζυμική δραστικότητα 2,4, 4,8, 7,2 και 9,6 U/mL αντίστοιχα), και συνεπώς δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελεί σταθερά του ρυθμού μετατροπής της λακτόζης σε GOS (Πίνακας 34).

Η β-γαλακτοζιδάση κατά την αντίδραση μετατροπής της λακτόζης παράγει ένα μίγμα GOS, του οποίου δεν κατέστη δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός, με τη στήλη που χρησιμοποιήθηκε. Παρόλα αυτά, κατά τη μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων που αναφέρονται στους «Συνολικούς GOS», η παραγωγή των προσδιοριζόμενων σακχάρων φάνηκε να ακολουθεί τάση η οποία θα μπορούσε να περιγραφεί από κινητική πρώτης τάξης. Σύμφωνα, λοιπόν, με την κινητική αντιδράσεων πρώτης τάξης, τα προϊόντα της αντίδρασης ακολουθούν ένα μαθηματικό μοντέλο της μορφής:

$$\text{Συνολικοί GOS} = a \cdot [1 - \exp(-b \cdot t)]$$

όπου, το a εκφράζει την ποσότητα των GOS σε άπειρο χρόνο αντίδρασης, ενώ το b είναι η σταθερά του ρυθμού αντίδρασης, k (h^{-1}), η οποία εξαρτάται μόνο από τη θερμοκρασία, την πίεση και τη φύση του υποστρώματος.

Πίνακας 34. Συγκεντρωτικός πίνακας παραμέτρου b για τη μετατροπή των δισακχαριτών

Ενζυμική δραστηριότητα (U/mL)	Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)	Παράμετρος b μετατροπής δισακχαριτών (h^{-1})
2,4 U/mL	40	0,024±0,002 ^a
	45	0,132±0,023 ^{cd}
	50	0,179±0,030 ^d
	55	-
4,8 U/mL	40	0,023±0,006 ^a
	45	0,616±0,133 ^e
	50	0,159±0,040 ^{cd}
	55	-
7,2 U/mL	40	0,023±0,004 ^a
	45	0,180±0,027 ^d
	50	0,206±0,015 ^d
	55	2,440±0,926 ^f
9,6 U/mL	40	0,053±0,005 ^{ab}
	45	0,126±0,017 ^{bcd}
	50	0,096±0,016 ^{abc}
	55	1,099±0,055 ^f

*Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα πρόβλεψης.

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

Εφόσον θεωρείται ότι η παράμετρος b σχετίζεται με τη σταθερά του ρυθμού της ενζυμικής δράσης, αυτό συνεπάγεται ότι η σταθερά αυτή θα πρέπει να είναι ανεξάρτητη της ενζυμικής δραστηριότητας και να εξαρτάται μόνο από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Όπως προκύπτει από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για τις τιμές της παραμέτρου b , αυτές φαίνεται να επηρεάζονται μόνο από τη θερμοκρασία ($p < 0,001$) και όχι από τη δραστηριότητα του ενζύμου (στατικοί μέσοι όροι του b : 0,743, 0,689, 0,937 και 0,736 με χρησιμοποιούμενη ενζυμική δραστηριότητα 2,4, 4,8, 7,2 και 9,6 U/mL αντίστοιχα), γεγονός που συνάδει με την υπόθεση ότι η παράμετρος b , αναφέρεται στη σταθερά του ρυθμού ($b=k$). Η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού της αντίδρασης, k , από τη θερμοκρασία, ακολουθεί κινητική Arrhenius:

$$k = k_{ref} \cdot \exp\left[-\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] \quad (\text{Εξ. 3})$$

όπου, k είναι η σταθερά του ρυθμού παραγωγής GOS (h^{-1}) σε θερμοκρασία T (K), k_{ref} η σταθερά του ρυθμού παραγωγής GOS (h^{-1}) σε θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} (K) η οποία και ορίστηκε ίση προς 318K, E_a η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης (J/mol), και R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8,314 J/mol·K).

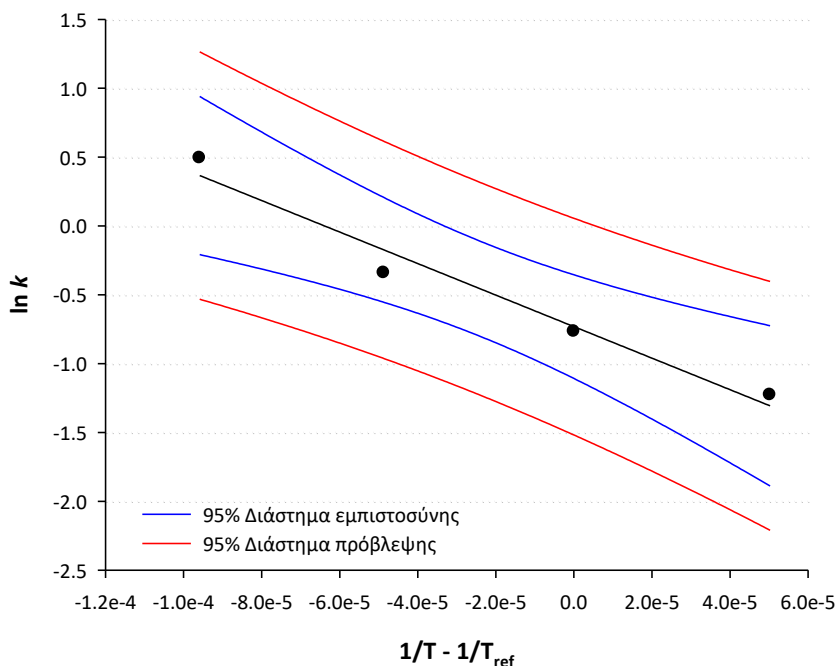
Προκειμένου να εξαχθεί ένα συνολικό μοντέλο της εξάρτησης της σταθεράς του ρυθμού της παραγωγής των GOS από τη θερμοκρασία της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή της σταθεράς b , όπως αυτή υπολογίστηκε από τις επιμέρους τιμές για διαφορετικές ενζυμικές δραστηριότητες αλλά σταθερή θερμοκρασία από το στατικό πρόγραμμα, ώστε σε κάθε θερμοκρασία να εξαχθεί η τιμή που ανταποκρίνεται καλύτερα στα δείγματα που μελετήθηκαν, λαμβάνοντας υπόψη τα σφάλματα και τις διασπορές των μετρήσεων (Πίνακας 35). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι, παρόλο που στις θερμοκρασίες 40 και 45°C, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά των τιμών των σταθερών b , προκειμένου να προταθεί ένα όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστο μοντέλο (προσαρμογή γραμμής τάσης σε τέσσερα σημεία αντί για τρία), χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα από όλες τις μελετώμενες θερμοκρασίες της αντίδρασης.

Πίνακας 35. Ρυθμοί παραγωγής GOS σε αντιδράσεις σταθερής θερμοκρασίας αντίδρασης

Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)	Σταθερά του ρυθμού παραγωγής GOS (h^{-1})
40	0,293 ^a
45	0,464 ^a
50	0,710 ^b
55	1,637 ^c

Τα διαφορετικά γράμματα μεταξύ των γραμμών των όμοιων στηλών δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων με βάση τη δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων του Duncan (Duncan's mean values post hoc comparison test).

Από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στη γραμμικοποιημένη μορφή της Εξ. 3 (Διάγραμμα 47) προέκυψε ότι η ενέργεια ενεργοποίησης, E_a , της μελετώμενης ενζυμικής αντίδρασης είναι ίση προς $95,2 \pm 12,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, και η σταθερά του ρυθμού παραγωγής των GOS σε θερμοκρασία αναφοράς 45°C, k_{ref} , υπολογίστηκε ίση προς $0,483 \pm 0,042 \text{ h}^{-1}$ (με συντελεστή συσχέτισης R^2 ίσο προς 0,968).



Διάγραμμα 47. Εξάρτηση του ρυθμού παραγωγής των GOS από τη θερμοκρασία της ενζυμικής αντίδρασης

Με βάση τα συνολικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, θα μπορούσαν να γίνουν και οι επιπλέον παρατηρήσεις:

- Η μελέτη μιας ενζυμικής αντίδρασης λαμβάνοντας υπόψη την ενζυμική δραστικότητα και τη θερμοκρασία φαίνεται λογική αναφορικά με την εύρεση των συνθηκών για τη βέλτιστη παραγωγή προϊόντος (π.χ. GOS), κυρίως στο κομμάτι της οικονομίας του καταλύτη (οικονομία του ενζύμου), ώστε η απόδοση της αντίδρασης να είναι ικανοποιητική και ταυτόχρονα με όσο το δυνατόν μικρότερη ποσότητα χρησιμοποιούμενο καταλύτη. Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι μια αντίδραση φτάνει σε χημική ισορροπία όπως ορίζει η θερμοδυναμική, και το ένζυμο ως καταλύτης επιταχύνει την αντίδραση, όσο ένζυμο προστίθενται τόσο πιο πολύ προϊόν θα παραλαμβάνεται σε μια δεδομένη χρονική στιγμή, και συνεπώς όσον αφορά στην ενζυμική δραστικότητα, το μελετώμενο εύρος δεν φάνηκε να περιλαμβάνει το σημείο κορεσμού της χρησιμοποιούμενης ενζυμικής δραστικότητας.
- Αναφορικά με τη θερμοκρασία, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι 50°C φαίνεται να αποτελούν τη θερμοκρασία-καμπή για τη μελετώμενη αντίδραση. Επομένως, ανεξαρτήτως της χρησιμοποιούμενης ενζυμικής δραστικότητας, ο έλεγχος της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου ήταν απαραίτητος. Χαρακτηριστικό είναι, ότι αν είχε ελεγχθεί η αντίδραση,

με βάση την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη μόνο στους 55°C, η οποία και προτάθηκε αρχικά, με χρησιμοποιούμενη ενζυμική δραστηριότητα 0,24 U/mL αντίδρασης, τα αποτελέσματα θα ήταν αποθαρρυντικά, αφού σε υπόστρωμα όξινου ορού, ως βέλτιστη θερμοκρασία αντίδρασης, ως προς την παραγωγή GOS, κρίθηκαν οι 40°C, ενώ οι 55°C φαίνεται να δίνουν τα χειρότερα αποτελέσματα.

- Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η παράμετρος που παίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στη μέγιστη μετατροπή του υποστρώματος όσο και στην παραγωγή του προϊόντος σε μία ενζυμική αντίδραση, είναι αυτή της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Αν και μία τέτοια μελέτη αποτέλεσε βασικό στοιχείο του αρχικού πειραματικού σχεδιασμού της παρούσας εργασίας (μελέτη συγκεντρώσεων λακτόζης στο εύρος 10-40% w/v), χρονικοί περιορισμοί αλλά και προβλήματα που δημιουργήθηκαν σχετικά με εξοπλισμό της HPLC, δεν κατέστησαν κάτι τέτοιο εφικτό.

Κεφάλαιο 9^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο όξινος ορός αποτελεί ένα περιβαλλοντικό πρόβλημα, του οποίου η διαχείριση είναι δύσκολη κυρίως λόγω της χαμηλής του τιμής pH. Ένα πεδίο έρευνας, το οποίο και διαφαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενο προς την αξιοποίηση αυτού του αποβλήτου, είναι η χρήση των συστατικών του ορού προς παραγωγή ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Προς την κατεύθυνση αυτή, η αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού προς παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών, η οποία και μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία, φαίνεται ότι είναι εφικτή και να έχει πολλές προοπτικές.

Από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, φάνηκε ότι το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης από το μικροοργανισμό *Aspergillus oryzae* δρα διαφορετικά σε υπόστρωμα όξινου ορού από ότι σε υπόστρωμα πρότυπου διαλύματος λακτόζης. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι οι πρωτεΐνες και τα άλατα, που περιέχονται στον όξινο ορό, δε δρουν παρεμποδιστικά στη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου. Συνεπώς, ένα διάγραμμα ροής των διεργασιών που απαιτούνται για τη μετατροπή της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS με το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae* θα μπορούσε να περιλαμβάνει τα στάδια που απεικονίζονται στην Εικόνα 21.



Εικόνα 21. Διάγραμμα ροής ενζυμικής μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS με β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae*

Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (High Performance Liquid Chromatography-RI detector, HPLC-RI detector), και η στήλη που χρησιμοποιήθηκε φάνηκε να μην έχει την ικανότητα να διαχωρίζει τους

μονοσακχαρίτες γαλακτόζη και γλυκόζη, καθώς και τους δισακχαρίτες που αποτελούνται από τα ίδια μονομερή, αλλά συνδέονται με διαφορετικούς δεσμούς. Συνεπώς όταν αναφέρεται ο όρος μονοσακχαρίτες, εννοείται το σύνολο της περιεχόμενη γλυκόζης και γαλακτόζης του αντίστοιχου διαλύματος, εκφρασμένων και των δύο ως γαλακτόζη. Στην περίπτωση δισακχαριτών με διαφορετικά μονομερή, φάνηκε να πραγματοποιείται ο διαχωρισμός τους με επιτυχία. Αντίστοιχα ο όρος σύνολο δισακχαριτών αναφέρεται στο σύνολο των δισακχαριτών με μονομερή τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη ενωμένων με β -(1→3), β -(1→4) ή β -(1→6) γλυκοζιτικό δεσμό, εκφρασμένων ως λακτόζη. Το σύνολο αυτών των δισακχαριτών είναι το μόνο που ανιχνεύθηκε και οι πιθανοί δεσμοί μεταξύ των μονομερών προκύπτουν από το γεγονός ότι ο ορός περιέχει λακτόζη (μονομερή ενωμένα με β -(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό), ενώ η β -γαλακτοζιδάση από *A. oryzae* έχει την ικανότητα να συνθέτει β -(1→3), β -(1→4) ή β -(1→6) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Τέλος, ο όρος GOS αναφέρεται στους συνολικούς γαλακτοολιγοσακχαρίτες που ανιχνεύθηκαν μέσω του συστήματος HPLC-RI. Πιο αναλυτικά εντοπίστηκε μία κορυφή έκλυσης γαλακτοολιγοσακχαριτών, και με βάση την ανάλυση διαλυμάτων πρότυπων ουσιών και την κατάταξή τους με βάση το χρόνο έκλυσης, εικάζεται ότι οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες που παράγονται κατά τη μελετώμενη ενζυμική αντίδραση έχουν βαθμό πολυμερισμού 3. Περισσότερες μελέτες όμως είναι απαραίτητες για τη διεξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές αντιδράσεις με χρησιμοποιούμενη ενζυμική δραστηριότητα από 2,4-9,6 U/mL και σε ένα εύρος θερμοκρασιών 40-55°C με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και της ενζυμικής δραστηριότητας στην αντίδραση, καθώς και την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών πραγματοποίησής της. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων έδειξαν ότι η θερμοκρασία και η ενζυμική δραστηριότητα έχουν σημαντική επίδραση στην μετατροπή της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας υπό σταθερή θερμοκρασία οδήγησε σε μεγαλύτερη κατανάλωση δισακχαριτών, ιδίως για ενζυμικές δραστηριότητες πάνω από τα 7,2 U/mL, καθώς επίσης και υψηλότερη παραγωγή GOS ή μείωση του απαιτούμενου χρόνου επίτευξης της μέγιστης παραγωγής τους. Αναφορικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική αντίδραση, παρατηρήθηκε ότι αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από 45°C οδήγησε σε μείωση τόσο της κατανάλωσης των δισακχαριτών στο σύστημα, όσο και της παραγωγής GOS. Αντίθετα, στο θερμοκρασιακό εύρος των 40-45°C, παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη κατανάλωση των δισακχαριτών επιτεύχθηκε στους 45°C, ενώ η βέλτιστη παραγωγή GOS επιτεύχθηκε στους 40°C για όλες τις χρησιμοποιούμενες ενζυμικές δραστηριότητες, πλην των 2,4 U/mL. Παρόλα αυτά, και στους 45°C, η παραγωγή GOS ήταν αρκετά υψηλή. Έτσι, με βάση τα παραπάνω, ως βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης επιλέχθηκαν η θερμοκρασία των 40°C και η ενζυμική δραστηριότητα των 9,6 U/mL. Αυτή η επιλογή έγινε διότι

σε αυτές τις συνθήκες παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή GOS, που αποτελεί και το ζητούμενο της παρούσας μελέτης, και παράλληλα αποτέλεσε και τη δεύτερη καλύτερη επιλογή ως προς τη μετατροπή των δισακχαριτών.

Η μετατροπή των δισακχαριτών και η παραγωγή των GOS ως συνάρτηση του χρόνου της αντίδρασης φάνηκε να ακολουθούν εκθετικές εξισώσεις, ενώ για την περίπτωση των μονοσακχαριτών δεν πραγματοποιήθηκε μαθηματική περιγραφή της εξέλιξής τους ως συνάρτηση του χρόνου, δεδομένου ότι το σύστημα κρίθηκε ιδιαίτερος δυναμικό και παρατηρήθηκαν συνεχόμενες αυξομειώσεις στις συγκεντρώσεις τους, γεγονός που ήταν αναμενόμενο αφού αποτελούν ενδιάμεσο προϊόν της αντίδρασης το οποίο παράγεται κατά την υδρόλυση της λακτόζης αλλά και καταναλώνεται ταυτόχρονα κατά τη σύνθεση των GOS.

Η μετατροπή των δισακχαριτών ως συνάρτηση του χρόνου της ενζυμικής αντίδρασης ακολούθησε την εκθετική εξίσωση:

$$C/C_0 = 1 + a \cdot [1 - \exp(-b \cdot t)]$$

και η παραγωγή των GOS ακολούθησε κινητική πρώτης τάξης σύμφωνα με τη σχέση:

$$\text{Συνολικοί GOS} = a \cdot [1 - \exp(-b \cdot t)]$$

όπου, b είναι η σταθερά του ρυθμού παραγωγής των GOS σε h^{-1} .

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων φάνηκε ότι, η παράμετρος b της εξίσωσης που περιγράφει την μετατροπή των δισακχαριτών φάνηκε να εξαρτάται σημαντικά τόσο από τη θερμοκρασία όσο και από τη χρησιμοποιούμενη ενζυμική δραστηριότητα. Αντίθετα, η παράμετρος b της εξίσωσης που περιγράφει την παραγωγή των GOS φάνηκε να επηρεάζεται μόνο από τη θερμοκρασία και όχι από τη δραστηριότητα του ενζύμου, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για τη σταθερά του ρυθμού παραγωγής τους. Η εξάρτηση της σταθεράς αυτής από τη θερμοκρασία ακολούθησε κινητική Arrhenius, και υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης της ενζυμικής αντίδρασης ίση προς $95,2 \pm 12,3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Συμπερασματικά, η ενζυμική αξιοποίηση της περιεχόμενης λακτόζης του όξινου ορού για την παραγωγή GOS, αποτελεί ένα θέμα ενδιαφέρουσας μελέτης που φαίνεται να οδηγεί σε θετικά αποτελέσματα, σχετικά με την επίλυση των περιβαλλοντικών προβλημάτων που δημιουργούνται από τα απόβλητα της βιομηχανίας γιαουρτιού. Ωστόσο, οι μελέτες αυτές φαίνεται να βρίσκονται ακόμα σε αρκετά πρώιμο στάδιο και κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνησή τους.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Όσον αφορά στις μεθόδους παρακολούθησης των μεταβολών που πραγματοποιούνται κατά την ενζυμική αντίδραση, αρχικά θα πρέπει να αναζητηθούν πιο αξιόπιστοι τρόποι ανάλυσης των δειγμάτων από αυτό του συστήματος HPLC που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία. Μια προτεινόμενη αναλυτική τεχνική είναι αυτή που βασίζεται στη χρήση Χρωματογραφίας Ιοντοεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με παλλόμενο αμπερομετρικό ανιχνευτή (High Performance Anion-Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD), ενός οργάνου που χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ευαισθησία, καλύτερη επαναληψιμότητα και μικρότερα όρια ανίχνευσης, το οποίο με την κατάλληλη στήλη μπορεί να διαχωρίσει τα σάκχαρα με βάση τα μονομερή τους, τον βαθμό πολυμερισμού και τους περιεχόμενους δεσμούς τους. Επιπλέον, κρίνεται απαραίτητη η πραγματοποίηση μελετών που αφορούν στο προϊόν, ώστε να επιβεβαιωθεί η υδατανθρακική του φύση και να προσδιοριστεί επακριβώς η σύστασή του. Κάτι τέτοιο είναι δυνατόν να επιτευχθεί μέσω της παραπάνω μεθόδου (HPAEC-PAD) και με χρήση κατάλληλων πρότυπων ουσιών.

Αναφορικά με τις συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης, κρίνεται σκόπιμο να πραγματοποιηθούν επιπλέον μελέτες σχετικά με την επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε λακτόζη, καθώς και της τιμής pH του υποστρώματος στην παραγωγή των GOS. Επίσης, θα πρέπει να διερευνηθούν οι επιδράσεις τόσο της ενζυμικής δραστηριότητας, της θερμοκρασίας και της τιμής pH, όσο και της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε λακτόζη σε σχέση με τη σύσταση των παραγόμενων GOS, αφού είναι πολύ πιθανόν σε διαφορετικές συνθήκες να ευνοείται η παραγωγή διαφορετικών GOS, ως προς το βαθμό πολυμερισμού τους και τους περιεχόμενους δεσμούς τους.

Η ενζυμική αντίδραση είναι άμεσα συνδεδεμένη με το μικροοργανισμό προέλευσης του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση. Ανάλογα με την προέλευσή του, το ένζυμο δρα σε διαφορετικές συνθήκες και συνθέτει διαφορετικού είδους GOS, ως προς τον βαθμό πολυμερισμού και το είδος των δεσμών σύνθεσης των μονομερών μεταξύ τους. Ακόμα, υπάρχει η πιθανότητα εμφάνισης παρεμποδιστικής ή υποκινητικής δράσης από κάποιο από τα συστατικά του υποστρώματος (πιο πιθανόν από κατιόντα ή ανιόντα αλάτων). Η δράση ενζύμων από διαφορετικούς μικροοργανισμούς προέλευσης χρήζει επιπλέον μελέτης, ώστε να επιλεγεί η βέλτιστη πηγή προέλευσης του ενζύμου για τη μετατροπή της λακτόζης σε GOS, λαμβάνοντας υπόψη τόσο την ευκολία όσο και το κόστος παραγωγής, απομόνωσης και καθαρισμού του.

Ένα ακόμα πεδίο έρευνας αποτελεί η ενζυμική σύνθεση της λακτουλόζης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον όξινο ορό. Σε αυτό το πλαίσιο, θα πρέπει να διερευνηθούν τόσο οι συνθήκες της αντίδρασης (θερμοκρασία, τιμή pH,

συγκέντρωση της λακτόζης στο υπόστρωμα του ορού και ενζυμική δραστηριότητα), όσο και η συγκέντρωση της φρουκτόζης που θα προστεθεί στο υπόστρωμα. Η παραγωγή της λακτουλόζης θα μπορούσε να πραγματοποιείται στο διάλυμα της αντίδρασης παράλληλα με την παραγωγή των GOS, ή και κατ' αποκλειστικότητα, κάτι το οποίο φαίνεται να σχετίζεται με την αναλογία λακτόζης/φρουκτόζης στο σύστημα. Και στις δύο περιπτώσεις, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για την απομόνωση και τον καθαρισμό των προϊόντων από το διάλυμα του ενζυμικής αντίδρασης, ώστε τόσο οι παραγόμενοι GOS όσο και η λακτουλόζη να μετατραπούν σε εμπορεύσιμα αγαθά ή σε συστατικά ασφαλή για ακόλουθη προσθήκη τους στα τρόφιμα.

Τέλος, προκειμένου να είναι δυνατή η αξιοποίηση του όξινου ορού βιομηχανικά, οι προτεινόμενες διεργασίες (Εικόνα 21) θα πρέπει να σχεδιαστούν και να διερευνηθούν και σε βιομηχανική κλίμακα, και να πραγματοποιηθεί μία οικονομοτεχνική μελέτη ώστε αξιολογηθεί η δυνατότητα εφαρμογής και η οικονομική βιωσιμότητα των προτεινόμενων διεργασιών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adamczak M., Charubin D., Włodzimierz B. (2009). Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared from whey permeate. *Chemical Papers*, 63, 111-116.
- Aider M. & Halleux D. (2007). Isomerization of lactose and lactulose production: review. *Trends in Food Science & Technology Journal*, 18, 356-364.
- Alonso S., Herrero M., Rendueles M., Diaz M. (2010). Residual yoghurt whey for lactic acid production. *Biomass and Bioenergy Journal*, 34, 931-938.
- Astley M. (2014). Greek yogurt wast 'acid whey' a concern for USDA: Jones Laffin. Dairy reporter web, 1-2. (<http://www.dairyreporter.com/Regulation-Safety/Greek-yogurt-waste-acid-whey-a-concern-for-USDA-Jones-Laffin>)
- Beadle J.R, Saunders J.P., Wadja T.J. (1992). Process for manufacturing tagatose. Biospherics Inc. US patent Number 5.078.796.
- Ben X.M., Li J., Feng Z.T., Shi S.Y., Lu Y.D., Chen R., Zhou X.-Y. (2005). Low level of galacto-oligosaccharide in infant formula stimulates growth of intestinal Bifidobacteria and Lactobacilli. *World Journal of Gastroenterology*, 14, 6564-6568.
- Ben X.M., Zhou X.Y., Zhao W.H., Yu W.L., Pan W., Zhang W.L., Wu S.M., Van Beusekom C.M., Schaafsma A. (2004). Supplementation of milk formula with galacto-oligosaccharides improves intestinal micro-flora and fermentation in term infants. *Chinese Medical Journal*, 117, 927-931.
- Biswas A. & Roy M. (2015). Green products: an exploratory study on the consumer behaviour in emerging economies of the East. *Journal of Cleaner Production*, 87, 463-468.
- Bruzzese E., Volpicelli M., Squaglia M., Tartaglione A., Guarino A. (2006). Impact of prebiotics on human health. *Digestive and Liver Disease*, 38, S283-S287.
- Bylund, G. (1995). Dairy Processing Handbook. Tetrapak Processing Systems, AB, Sweden.
- Chandrapala J., Duke M. C., Gray S. R., Zisu B., Weeks M., Palmer M., Vasiljevic T. (2015). Properties of acid whey as a function of pH and temperature.

- Chiu C.K. & Etzel M.R. (1997). Fractionation of Lactoperoxidase and Lactoferrin from Bovine Whey Using a Cation Exchange Membrane. *Journal of Food Science*, 96, 996-1000. *Journal of Dairy Science*, 98, 4352-5363
- Clemens M. (2010). Enzymatic synthesis and investigation of novel galacto-oligosaccharides. Master of Science thesis, Supervisor: Dr. C.K. Peterbauer, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, 1-90.
- Collins M.D. & Gibson G.R. (2016). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 1052S-1057S.
- Dam B.Van, Revallier-Warffemius J.G., Dam-Schermerhorn, L.C.Van. (1950). Preparation of lactase from *Saccharomyces fragilis*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 4, 96-114.
- Elliott J. (2013). Whey Too Much: Greek Yogurt's Dark Side. Modern farmer website.
(<http://modernfarmer.com/2013/05/whey-too-much-greek-yogurts-dark-side>)
- Ferreira L.S., Souza Jr M.B., Trierweiler J.O., Hitzman B., Folly R.O.M. (2003). Analysis of experimental biosensor/FIA lactose measurements. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20, 7-13.
- Fischer C. & Kleinschmidt T. (2015). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*, 48, 15-22.
- Flores M.V., Ertola R.J., Voget C.E. (1996). Effect of Monovalent Cations on the Stability and Activity of *Kluyveromyces lactis* α -Galactosidase. *Food Science and Technology*, 29, 503-506.
- Ghaly A.E. & Kamal M.A. (2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*, 38, 631-644.
- Gordon S. (2008). Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *European Journal of Immunology*, 38, 3257-3264.
- Guerrero C., Vera C., Acevedo F., Illanes A. (2015). Simultaneous synthesis of mixtures of lactulose and galacto-oligosaccharides and their selective fermentation. *Journal of Biotechnology*, 209, 31-40.
- Harju M., Kallioinen H., Tossavainen O. (2012). Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*, 22, 104-109.

- Harper W. J. (1992). Lactose and lactose derivatives. In: *Whey and Lactose Processing* (Ch. 9). Zadow J.G. (Ed.), Springer Netherlands publications, 317-360.
- Heavey P.M., Savage S.A., Parrett A., Cecchini C., Edwards C.A., Rowland I.R. (2003). Protein-degradation products and bacterial enzyme activities in faeces of breast-fed and formula-fed infants. *British Journal of Nutrition*, 89, 509-515.
- Iqbal S., Nguyen T.-H., Nguyen T.T., Maischberger T., Haltrich D. (2010). β -Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 34, 1408-1416.
- Kellam S. (1998). The Manufacture of lactose. In: Chemical Processes in New Zealand (Ch. 3). Parker J. E., Robertson J., Wansbrough H. *New Zealand Institute of Chemistry*, Vol 1, New Zealand, 1-7
- Kim S.H., Lim K.P., Kim H.S. (1997). Differences in the hydrolysis of lactose and other substrates by β -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Dairy Science*, 80, 2264-2269.
- Kim Y.-S., Park C.-S., Oh D.-K. (2006). Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 903-908.
- Konrad G., Kleinschmidt T., Faber W. (2012). Ultrafiltration flux of acid whey obtained by lactic acid fermentation. *International Dairy Journal*, 22, 73-77.
- Maduko C.O. & Park Y.W. (2011). Production of Infant Formula Analogs by Membrane Fractionation of Caprine Milk: Effect of Temperature Treatment on Membrane Performance. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 1-9.
- Mahoney R.R. (1997). Lactose: Enzymatic Modification. In: *Advanced dairy chemistry. Lactose, water, salts and vitamins* (Vol. 3). Fox P.F., London, Chapman & Hall, UK, 77-125.
- Mariotti M.P., Yamanaka H., Araujo A.R., Trevisan H.C. (2008). Hydrolysis of Whey Lactose by Immobilized β -Galactosidase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51, 1233-1240.
- Matvievsky V.Y. (1979). Investigation of process for lactose/lactulose syrup production for infantile food. Master of Science thesis. Uglich Institute, Russia.
- Mavropoulou I.P. & Kosikowski F.V. (1972). Composition, Solubility, and Stability of Whey Powders. *Journal of Dairy Science*, 5, 1128-1134.

- Mawson A.J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology*, 47, 195-203.
- Mlichová Z. & Rosenberg M. (2006). Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45, 47-54.
- Morganti P., Cornelli U., Gazzaniga G. (2014). Probiotics and Preiotics to save human microbiota enhancing health and well-being. *Agro Food Industry Hi Tech Journal*, 25, 10-14.
- Nizamuddin S., Sridevi A., Narasimha G. (2008). Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 7, 1096-1100.
- Otieno D.O. (2010). Synthesis of β -Galactooligosaccharides from Lactose Using Microbial β -Galactosidases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Journal*, 9, 471-482.
- Pal P. & Nayak J. (2016). Development and analysis of a sustainable technology in manufacturing acetic acid and whey protein from waste cheese whey. *Journal of Cleaner Production*, 112, 59-70.
- Panesar P.S. & Kumari S. (2011). Lactulose: Production, purification and potential applications. *Biotechnology Advances Journal*, 29, 940-948.
- Pearce R.J. (1992). Whey Protein Recovery and Whey Protein Fractionation. In: *Whey and Lactose Processing* (Ch. 8). Zadow J.G. (Ed.), Springer Netherlands publications, 271-316.
- Reuter S., Nygaard A.N., Zimmermann W. (1999). β -Galactooligosaccharide synthesis with β -galactosidases from *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus oryzae*, and *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 509-516.
- Rodriguez-Colinas B., Fernandez-Arrojo L., O. Ballesteros A.O., Plou F.J. (2014). Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk. *Food Chemistry*, 145, 388-394.
- Sangwan V., Tomar S.K., Singh R.R., Singh A.K., Ali B. (2011). Galactooligosaccharides: Novel Components. *Journal of Food Science*, 76, R103-111.
- Schaafsma G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18, 458-465.
- Scholten R.H.J., Peet-Schweringa C.M.C., Verstegenb M.W.A., den Hartoga L.A., Schrama J.W., Vesseura P.C. (1999). Fermented co-products and fermented compound diets for pigs: a review. *Animal Feed Science and Technology Journal*, 82, 1-19.

- Schumann C. (2002). Medical, nutritional and technological properties of lactulose - An update. *European Journal of Nutrition*, 4, 17-25.
- Seo Y.H., Sung M., Han J.I. (2016). Lactulose production from cheese whey using recyclable catalyst ammonium carbonate. *Food Chemistry*, 197, 664-669.
- Sitangganga A.B., Drews A., Kraumea M. (2016). Development of a continuous membrane reactor process for enzyme-catalyzed lactulose synthesis. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 65-80.
- Smithers, G.W. (2015). Whey-ing up the options: Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2-14.
- Song Y.S., Lee H.U., Park C., Kim S.W. (2013). Optimization of lactulose synthesis from whey lactose by immobilized b-galactosidase and glucose isomerase. *Carbohydrate Research Journal*, 369, 1-5.
- Splechtna B., Nguyen T.-H., Haltrich D. (2007). Comparison between Discontinuous and Continuous Lactose Conversion Processes for the Production of Prebiotic Galacto-oligosaccharides Using α -Galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6772-6777.
- Szkaradkiewicz A.K. & Karpinski T.M. (2013). Probiotics and prebiotics. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 3, M42-M47.
- Tabatabaie F. & Mortazavi A. (2008). Influence of Lactulose on the Survival of Probiotic Strains in Yoghurt. *World Applied Sciences Journal*, 3, 88-90.
- Torres D.P.M., Gonçalves M.P.F., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. (2012). Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 438-454.
- Urrutia P., Rodriguez-Colinas B., Fernandez-Arrojo L., Ballesteros A.O., Wilson L., Illanes A., Plou F.J. (2013). Detailed Analysis of Galactooligosaccharides Synthesis with β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1081-1087.
- Van den Broek L.A.M., Hinz S.W.A., Beldman G., Vincken J.-P., Voragen A.G.J. (2008). *Bifidobacterium* carbohydrases: their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. *Molecular Nutrition Food Research*, 52, 146-163.
- Van den Heuvel E.G., Muijs T., Van Dokkum W., Schaafsma G. (1999). Lactulose stimulates calcium absorption in postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14, 1211-1216.

- Van der Bruggen B., Curcio E., Drioli E. (2004). Process intensification in the textile industry: the role of membrane technology. *Journal of Environmental Management*, 73, 267-274.
- Veereman-Wauters G. (2005). Application of prebiotics in infant foods. *British Journal of Nutrition*, 93, 57-60.
- Yang S.T. & Silva E.M. (1995). Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. *Journal of Dairy Science*, 78, 2541-2562.
- Zadow J.G. (1986). Lactose hydrolysed dairy products. *Journal of Food Technology in Australia*, 39, 460-462.
- Zadow J.G. (1992). Lactose Hydrolysis. In: *Whey and Lactose Processing* (Ch. 8). Zadow J.G. (Ed.), Springer Netherlands publications, 361-408.
- Zadow J.G. (1984). Lactose: properties and uses. *Journal of Dairy Science*, 67, 2654-2679
- Καλογεράς Ε. (1999). Μελέτη του συστήματος των κυτταρινάσων και ημικυτταρινάσων του μύκητα *Thermoascus aurantiacus* σε ζύμωση στερεάς κατάστασης. Βάση δεδομένων διδακτορική διατριβών, ΕΜΠ.
- Κλώνης Ι. (2012). Εφαρμοσμένη ενζυμική κινητική. Ενζυμική Βιοτεχνολογία, Κεφ. 2, 2η αναθεωρημένη έκδοση, 13-32.