



*Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο*

*Σχολή Χημικών Μηχανικών*

*Τομέας IV: Σύνθεση & Ανάπτυξη Βιομηχανικών Διαδικασιών*

*Εργαστήριο Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων*

# Ενζυμική επεξεργασία τυρογάλακτος για παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας



Ζαφείρη Ειρήνη

Επιβλέπων Καθηγητής: Ταούκης Πέτρος

**ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2020**



# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Η διπλωματική εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα 05/2019 – 01/2020, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του ΕΜΠ κ. Πέτρου Ταούκη.

Στο τέλος αυτής της διαδρομής, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Πέτρο Ταούκη για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να ασχοληθώ με τον τομέα της χημείας και τεχνολογίας τροφίμων, για την καθοδήγησή του, τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε κατά την διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να αναλάβω ένα κομμάτι από τα προγράμματα που έχει.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Μαρία Τσεβδού, Επιστημονικό Συνεργάτη του Εργαστηρίου Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ και τον Υποψήφιο Διδάκτορα κ. Αθανάσιο Λημναίο για την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη τους σε εμένα. Ευχαριστώ ακόμα τους Καθηγητές, τα μέλη ΕΔΙΠ, τους Επιστημονικούς Συνεργάτες, τους Υποψήφιους Διδάκτορες και τους συμφοιτητές μου στο Εργαστήριο Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ για τη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα καθ' όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο

Φυσικά, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους φίλους μου που είναι δίπλα μου σε κάθε στιγμή. Φίλοι, εντός και εκτός σχολής, που ζούσαν μαζί με εμένα την όμορφη αυτή κούρσα της εφηβικής και φοιτητικής ζωής, χρόνια γεμάτα γέλιο, κλάμα, ταξίδια και στιγμές. Τέλος, τα περισσότερα και μεγαλύτερα ευχαριστώ τα οφείλω στην οικογένειά μου. Τους ευχαριστώ πολύ για όλα γιατί χωρίς αυτούς δε θα μπορούσα να ονειρευτώ και να ζήσω.

*Ειρήνη Ζαφείρη*

*Φεβρουάριος 2020*



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιοποίηση του τυρογάλακτος για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών (Galactooligosaccharides, GOS). Η σύνθεση των GOS επιτυγχάνεται αξιοποιώντας την περιεχόμενη λακτόζη στο τυρόγαλα μέσω μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η ενζυμική αντίδραση πραγματοποιείται με χρήση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis* ως βιοκαταλύτη.

Σε πρώτο στάδιο έγινε ένας πλήρης χημικός χαρακτηρισμός του τυρογάλακτος αναλύοντας τα διάφορα συστατικά του. Βρέθηκε ότι ο γλυκός ορός περιέχει 5,63% w/v ( $\pm 0,08$ ) ολικά σάκχαρα εκ των οποίων η λακτόζη αποτελεί το 5,08% w/v ( $\pm 0,08$ ). Οι περιεχόμενες πρωτεΐνες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Kjeldhal, όπου το ποσοστό τους βρέθηκε ίσο με 2,93% w/w ( $\pm 0,56$ ). Τα ολικά στερεά και η τέφρα βρέθηκαν ίσα με 4,90% w/w ( $\pm 0,08$ ) και 0,46% w/w ( $\pm 0,01$ ), αντίστοιχα. Η αλατότητα του τυρογάλακτος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Mohr και προέκυψε ίση με 0,248% w/v ( $\pm 0,015$ ). Κατά την χημική ανάλυση του γλυκού ορού μετρήθηκαν τα θεϊκά ιόντα και το γαλακτικό οξύ με τη μέθοδο της νεφελομετρίας και φασματοφωτομετρίας, αντίστοιχα. Προέκυψε ότι περιέχονται 95,6mg/L ( $\pm 0,01$ )  $SO_4^{2-}$  και 1,65 g/L ( $\pm 0,06$ ) γαλακτικό οξύ. Τέλος, προσδιορίστηκαν τα κύρια μέταλλα που υπάρχουν στο τυρόγαλα με τη μέθοδο της Φασματομετρίας Ατομικής Εκπομπής με Ιοντικά Συζευγμένο Πλάσμα (ICP-AES). Τα αποτελέσματα του ICP-AES έδειξαν ότι στο τυρόγαλα περιέχονται 31,4 mM ( $\pm 1,5$ )  $K^+$ , 16,7 mM ( $\pm 1,1$ )  $Na^+$ , 8,60 mM ( $\pm 0,32$ )  $Ca^{2+}$  και 1,14 mM ( $\pm 0,08$ )  $Mg^{2+}$ .

Σε επόμενο στάδιο κρίθηκε απαραίτητο να μελετηθεί το κατά πόσο το τυρόγαλα αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα για την ενζυμική αντίδραση. Πρωταρχικά πειράματα έδειξαν ότι κατά την επώαση του τυρογάλακτος σε θερμοκρασία 40 °C, η τιμή pH του τυρογάλακτος μειωνόταν ραγδαία, γεγονός που οφειλόταν στην ύπαρξη υψηλού αρχικού μικροβιακού φορτίου. Η μείωση της τιμής pH του υποστρώματος αποτέλεσε σημαντικό παρεμποδιστικό παράγοντα για την εξέλιξη της ενζυμικής αντίδρασης, αφού το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. Lactis* δρα βέλτιστα στο εύρος τιμών pH από 6,8 έως 7,2. Συνεπώς, η μείωση της τιμής pH χαμηλότερα του 6,5 οδηγεί σε σταδιακή μείωση της ενεργότητας του ενζύμου και τελικά την πλήρη απενεργοποίησή του.

Για την αντιμετώπιση του μικροβιακού φορτίου του τυρογάλακτος δοκιμάστηκε η μέθοδος της υπερδιήθησης με χρήση μεμβράνης με ονομαστικό πορώδες 0,22  $\mu m$ . Με τη μέθοδο αυτή επιτεύχθηκε απομάκρυνση του αρχικού μικροβιακού φορτίου σε επίπεδα τέτοια ώστε, κατά την μετέπειτα επώαση του τυρογάλακτος σε θερμοκρασία 40 °C, η πτώση της τιμής του pH να είναι μικρή και εντός των ορίων της βέλτιστης δράσης του ενζύμου (6,8-7,2). Τελικά, επιλέχθηκε το

τυρόγαλα να επεξεργάζεται αρχικά με υπερδιήθηση και κατόπιν να παστεριώνεται στους 85 °C για 5 min, με στόχο την απενεργοποίηση του τυχόν υπολειμματικού μικροβιακού φορτίου, πριν χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την ενζυμική αντίδραση.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραμέτρων, όπως η αρχική συγκέντρωση σε λακτόζη του τυρογάλακτος, η θερμοκρασία και το ενζυμικό φορτίο, στην αντίδραση της ενζυμικής μετατροπής της λακτόζης του τυρογάλακτος σε GOS. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η ενζυμική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον *K. lactis* στο θερμοκρασιακό εύρος 30-50 °C και εύρος τιμών pH 6,0-8,0. Το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση από τον *K. lactis* εμφάνισε βέλτιστη δράση σε τιμή pH ίση με 7,0 και σε θερμοκρασία ίση με 30 °C. Στις συνθήκες αυτές, η ενεργότητα του χρησιμοποιούμενου ενζύμου, όπως αυτή προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ορθο-νιτροφαινυλο-β-D-γαλακτοπυρανόζη (oNPG), βρέθηκε ίση με 22,4 ( $\pm 0,1$ ) U/mL.

Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 18 ενζυμικές αντιδράσεις χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το τυρόγαλα. Μελετήθηκε τυρόγαλα αρχικής περιεκτικότητας σε λακτόζη 5, 10 και 15% w/v, ενζυμικό φορτίο 0,011, 0,022 και 0,045 U/mL, καθώς και θερμοκρασία ενζυμικής αντίδρασης 30 και 40 °C, ενώ η τιμή pH του υποστρώματος σε όλες τις αντιδράσεις ήταν ρυθμισμένη στην τιμή 7,2. Η ανάλυση των δειγμάτων της ενζυμικής αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή Δείκτη Διάθλασης (High Performance Liquid Chromatography-Refractive Index, HPLC-RI) και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση καμπυλών αναφοράς γαλακτόζης, λακτόζης και ραφινόζης.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι, αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της λακτόζης στο υπόστρωμα οδηγεί σε παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας γαλακτοολιγοσακχαριτών, καθώς και αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε μέγιστη παραγωγή GOS σε μικρότερους χρόνους ενζυμικής αντίδρασης. Αναφορικά με την επίδραση της θερμοκρασίας, στους 40 °C παρατηρήθηκαν υψηλότερες αποδόσεις σε GOS και σε μικρότερους χρόνους ενζυμικής αντίδρασης σε σχέση με τους 30 °C. Ως προς το χαρακτηρισμό των προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης, παρατηρήθηκε ότι παράγονται γαλακτοολιγοσακχαρίτες με βαθμό πολυμερισμού έως και 4. Χαρακτηριστικό για όλες τις μελετώμενες ενζυμικές αντιδράσεις αποτέλεσε το ότι μετά την επίτευξη του μέγιστου ποσοστού παραγόμενων GOS, παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των GOS στο μείγμα της αντίδρασης. Όπως αναφέρεται και βιβλιογραφικά, αυτό οφείλεται στην περαιτέρω υδρόλυση των σχηματισμένων GOS από το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης.

Για κάθε συγκέντρωση λακτόζης στο αντιδρών μείγμα επιτεύχθηκαν οι εξής μέγιστες αποδόσεις σε GOS:

- α) 10,4% μετά από 90 min ενζυμικής αντίδρασης με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,045 U/mL στους 30 °C και αρχική συγκέντρωση λακτόζης 5% w/v,
- β) 9,64% μετά από 120 min ενζυμικής αντίδρασης με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,022 U/mL στους 40 °C και αρχική συγκέντρωση λακτόζης 5% w/v,
- γ) 13,6% μετά από 420 min ενζυμικής αντίδρασης με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,011 U/mL στους 30 °C και αρχική συγκέντρωση λακτόζης 10% w/v,
- δ) 16,5% μετά από 480 min ενζυμικής αντίδρασης με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,011 U/mL στους 40 °C και αρχική συγκέντρωση λακτόζης 10% w/v,
- ε) 18,4% μετά από 420 min ενζυμικής αντίδρασης με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,045 U/mL στους 30 °C και αρχική συγκέντρωση λακτόζης 15% w/v,
- στ) 21,7% μετά από 300 min ενζυμικής αντίδρασης με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,045 U/mL στους 40 °C και αρχική συγκέντρωση λακτόζης 15% w/v.

Συμπερασματικά, η παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών, συστατικά υψηλής προστιθέμενης αξίας, από το τυρόγαλα μπορεί να αποτελέσει μια βιώσιμη εναλλακτική μέθοδο αξιοποίησης του, συμβατής με τις αρχές της κυκλικής οικονομίας. Συνδυάζει το κόστος διαχείρισης ενός σημαντικού αποβλήτου και την αντιμετώπιση ενός περιβαλλοντικού προβλήματος, μετατρέποντάς το σε μια πολύτιμη πρώτη ύλη. Η αριστοποίηση της διεργασίας καθώς και η μελέτη της σύνθεσης GOS με χρήση ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης από κάποιον άλλο μικροοργανισμό, όπως ο *Aspergillus oryzae*, εμφανίζουν ενδιαφέρον για μελλοντική έρευνα. Ακόμη, η απομόνωση και αξιοποίηση των πρωτεϊνών που περιέχονται στο γλυκό ορό, με στόχο της παραγωγή ενός πρωτεϊνούχου συμπυκνώματος σε συνδυασμό με τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες, μπορεί να είναι ένας μελλοντικός στόχος για την παρασκευή ενός συμπληρώματος με υψηλή θρεπτική και πρεβιοτική αξία.





# ENZYMATIC VALORITATION OF SWEET WHEY FROM CHEESE MANUFACTURING

---

The purpose of this diploma thesis was the study of the utilization of sweet whey, via the enzymatic conversion of the containing lactose into galactooligosaccharides (GOS). The enzymatic reaction was carried out using the enzyme  $\beta$ -galactosidase, derived from the microorganism *Kluyveromyces lactis*, as a biocatalyst.

Initially, a complete chemical characterization of the sweet whey was performed by analyzing its various constituents. It was found that the sweet whey comprises 5.63% w/v ( $\pm 0.08$ ) total sugars, of which lactose accounts for 5.08% w/v ( $\pm 0.08$ ). The protein content was determined by the Kjeldhal method and was found equal to 2.93% w/w ( $\pm 0.56$ ). The total solids and ash were found to be equal to 4.90% w/w ( $\pm 0.08$ ) and 0.46% w/w ( $\pm 0.01$ ), respectively. The salinity of sweet whey, as determined by the Mohr method, was 0.248% w/v ( $\pm 0.015$ ). The sulphates and lactic acid content of sweet whey, as they were determined by the method of nephelometry and spectrophotometry, respectively, were found to be equal to 95.6 mg/L ( $\pm 0.01$ )  $\text{SO}_4^{2-}$  and 1.65 g/L ( $\pm 0.06$ ) lactic acid. Finally, the major metals of sweet whey were determined by Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) method, and results showed that sweet whey contains 31.4 mM ( $\pm 1.5$ )  $\text{K}^+$ , 16.7 mM ( $\pm 1.1$ )  $\text{Na}^+$ , 8.60 mM ( $\pm 0.32$ )  $\text{Ca}^{2+}$ , and 1.14 mM ( $\pm 0.08$ )  $\text{Mg}^{2+}$ .

In the second part of this study, different treatments of sweet whey were studied in order to ensure that the whey can be effectively used in the above mentioned enzymatic reaction as to produce GOS. Preliminary experiments showed that during the incubation of sweet whey at 40 °C, a great reduction of its pH value was observed, indicating the presence of a high initial microbial load. This could lead to major problems during the studied enzymatic reaction, since the enzyme  $\beta$ -galactosidase from *K. lactis* exhibits optimum activity in the pH range of 6.8 to 7.2. Therefore, a pH decrease below 6.5 could result in a gradual decrease in  $\beta$ -galactosidase activity and eventually to the complete inactivation of the enzyme.

The method of ultrafiltration, using a membrane with a nominal porosity of 0.22  $\mu\text{m}$ , was tested to treat the antimicrobial load of whey. This method resulted in the removal of the initial microbial load to levels such that, upon subsequent incubation of the whey at 40 °C, the drop in pH was small and within the range of optimal enzyme activity (6.8- 7.2). Finally, the whey was selected to be first treated by ultrafiltration and then pasteurized at 85 °C for 5 min, with the aim of inactivating any residual microbial load, before being used as a substrate for the enzyme reaction.

The effect of various parameters was then studied on the enzyme conversion of lactose into GOS, such as initial lactose concentration of sweet whey, reaction temperature and enzymatic load. To this end, the enzyme activity of  $\beta$ -galactosidase from *K. lactis* was evaluated in the temperature range of 30-50 °C and pH range of 6.0-8.0. The enzyme showed an optimum activity at the pH value of 7.0 and at 30 °C, with the enzyme activity being equal to 22.4 ( $\pm 0.06$ ) U/mL, as it was determined by the method of ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranose (oNPG).

In total, 18 enzyme reactions were performed using sweet whey as a substrate. Initial whey lactose content of 5, 10 and 15% w/v, enzymatic load of 0.011, 0.022 and 0.045 U/mL, and enzyme reaction temperatures of 30 and 40 °C were tested, while the pH value of the substrate was adjusted to 7.2. The analysis of the results of the enzymatic reactions was performed with High Performance Liquid Chromatography-Refractometer detector (HPLC-RI), and the formed GOS were quantified using reference curves of galactose, lactose and raffinose.

It was observed that an increase in lactose concentration resulted in higher amount of the formed GOS, and an increase in enzymatic load led to higher GOS production at shorter reaction times. Regarding the effect of temperature, higher GOS yields and at shorter reaction times were observed at 40 °C than at 30 °C. As for the characterization of the reaction products, it was observed that the formed galactooligosaccharides had polymerization degree up to 4. It is worth noticing that, in all enzymatic reactions studied, after achieving the maximum GOS yield, a decrease in GOS concentration was observed. As previously reported by many researchers, this is due to a further hydrolysis of the formed GOS by the enzyme.

For each initial lactose concentration in the reaction system, the following maximum GOS yields were obtained:

- (a) 10.4% after 90 min of enzymatic reaction using an enzymatic load of 0.045 U/mL at 30 °C and initial lactose concentration of 5% w/v,
- (b) 9.64% after 120 min of enzymatic reaction using an enzyme load of 0.022 U/mL at 40 °C and initial lactose concentration of 5% w/v,
- (c) 13.6% after 420 min of enzymatic reaction using an enzyme load of 0.011 U/mL at 30 °C and initial lactose concentration of 10% w/v,
- (d) 16.5% after 480 min of enzymatic reaction using an enzymatic load of 0.011 U/mL at 40 °C and initial lactose concentration of 10% w/v,
- (e) 18.4% after 420 min of enzymatic reaction using an enzymatic load of 0.045 U/mL at 30 °C and initial lactose concentration of 15% w/v,
- (f) 21.7% after 300 min of enzymatic reaction using an enzymatic load of 0.045 U/mL at 40 °C and initial lactose concentration of 15% w/v.

In conclusion, the galactooligosaccharides, which are ingredients of high demand by consumers, could be possibly produced by the enzymatic conversion of sweet

whey lactose. This procedure combines the managing cost of a significant waste, turning an environmental problem into a valuable raw material with high nutritional value. The optimization of the process as well as the study of GOS synthesis using a  $\beta$ -galactosidase derived from another microorganism, such as *Aspergillus oryzae*, which exhibits optimum pH value from 4.5 to 4.8 looks promising for future research. In addition, the isolation and utilization of proteins contained in the sweet whey in order to produce a protein concentrate, in combination with GOS, may be a future target for the production of a protein supplement of high nutritional and prebiotic value.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

Πρόλογος .....	I
Περίληψη .....	III
Enzymatic valoritation of sweet whey from cheese manufacturing.....	VII
Περιεχόμενα .....	XI
Εισαγωγή.....	1
Κεφάλαιο 1. Γλυκός ορός Ή τυρόγαλα: ένας θησαυρός από τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας τυριού .....	3
1.1 Εισαγωγή .....	3
1.2 Παραγωγική διαδικασία τυριού .....	4
1.3 Συστατικά του γλυκού ορού.....	6
1.3.1 Λακτόζη .....	7
1.3.2 Πρωτεΐνες.....	8
1.3.3 Λίπη .....	8
1.3.4 Άλατα.....	9
1.3.5 Βιταμίνες.....	9
1.4 Το πρόβλημα του γλυκού ορού και η αξιοποίησή του .....	10
Κεφάλαιο 2. Η αξιοποίηση της λακτόζης μέσω ενζυμικών αντιδράσεων.....	13
2.1 Εισαγωγή .....	13
2.2 Λακτόζη.....	13
2.2.1 Εισαγωγή.....	13
2.2.2 Ανάκτηση λακτόζης από το τυρόγαλο .....	15
2.2.3 Το φαινόμενο της κρυστάλλωσης της λακτόζης.....	16
2.2.4 Δυσανεξία στη λακτόζη .....	17
2.2.5 Εφαρμογές της λακτόζης.....	18
2.3 Ενζυμική μετατροπή της λακτόζης .....	19
2.3.1 Εισαγωγή.....	19
2.3.2 β-γαλακτοζιδάση .....	20
2.3.3 Αντίδραση υδρόλυσης.....	21
2.3.4 Αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης.....	22

2.4 β-γαλακτοζιδάση από το μικροοργανισμό <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	23
2.5 Βιομηχανική αξιοποίηση της β-γαλακτοζιδάσης .....	23
Κεφάλαιο 3. Γαλακτοολιγοσακχαρίτες.....	25
3.1 Εισαγωγή .....	25
3.2 Παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών .....	25
3.2.1 Χημική σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών .....	26
3.2.2 Ενζυμική παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών.....	26
3.3 Χαρακτηρισμός γαλακτοολιγοσακχαριτών .....	30
3.4 Απομόνωση γαλακτοολιγοσακχαριτών.....	31
3.4.1 Επεξεργασία ενεργού άνθρακα .....	31
3.4.2 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους .....	31
3.4.3 Νανοδιήθηση .....	32
3.4.4 Χρωματογραφία προσομοιωμένης κινητής φάσης .....	32
3.4.5 Χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων.....	32
3.4.6 Εκχύλιση στερεάς φάσης με χρήση υπερκρίσιμου υγρού.....	32
3.4.7 Μικροβιακή ζύμωση.....	33
3.5 Τα οφέλη των γαλακτοολιγοσακχαριτών στην ανθρώπινη υγεία.....	33
3.6 Εμπορική διάθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών .....	34
Κεφάλαιο 4. Σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών –Ανασκόπηση έρευνας και Σκοπός.....	37
Κεφάλαιο 5. Υλικά & Μέθοδοι.....	39
5.1 Χημική Ανάλυση Γλυκού Ορού .....	39
5.1.1 Προσδιορισμός Στερεού Υπολείμματος & Τέφρας.....	39
5.1.2 Προσδιορισμός Θεικών Ιόντων .....	40
5.1.3 Προσδιορισμός μετάλλων τυρογάλακτος με Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής με Ιοντικά Συζευγμένο Πλάσμα (ICP-AES) .....	41
5.1.4 Προσδιορισμός Γαλακτικού Οξέος.....	42
5.1.5 Προσδιορισμός Χλωριόντων (Αλατότητας) .....	43
5.1.6 Προσδιορισμός Πρωτεϊνών .....	43
5.2 Μικροβιακή Ανάλυση Γλυκού Ορού.....	46
5.3 Ενζυμική αντίδραση .....	48
5.3.1 Ενεργότητα Ενζύμου.....	48

5.3.2 Προεπεξεργασία Γλυκού Ορού.....	49
5.3.3 Ενζυμική Αντίδραση Παραγωγής Γαλακτοολιγοσακχαριτών.....	51
5.3.4 Ανάλυση Δειγμάτων Ενζυμικής Αντίδρασης.....	53
Κεφάλαιο 6. Αποτελέσματα και Σχολιασμος.....	59
6.1 Χημική Ανάλυση Γλυκού Ορού .....	59
6.1.1 Καμπύλες αναφοράς χαρακτηριστικών γλυκού ορού .....	59
6.1.2 Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης τυρογάλακτος.....	65
6.2 Μικροβιακή Ανάλυση Γλυκού Ορού.....	65
6.3 Ενζυμική παραγωγή ολιγοσακχαριτών από γλυκό ορό.....	69
6.3.1 Ενζυμική ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	69
6.3.2 Αποτελέσματα ενζυμικών αντιδράσεων μετατροπής της λακτόζης του γλυκού ορού σε GOS .....	71
6.3.3 Σύνοψη αποτελεσμάτων ενζυμικών αντιδράσεων μετατροπής της λακτόζης του γλυκού ορού σε GOS.....	98
Κεφάλαιο 7. Σύνοψη - Συμπεράσματα.....	103
Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....	106
Βιβλιογραφία.....	109





# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

Το γάλα αποτελεί από πάντα μια εξαιρετική τροφή για τον άνθρωπο παρέχοντάς του μια ποικιλία θρεπτικών συστατικών. Ο κλάδος της τυροκομίας αναπτύχθηκε από τα πρώτα χρόνια και αξιοποιώντας το γάλα, σήμερα μπορεί κανείς να βρει πολλών ειδών τυριά. Τα τελευταία 40 χρόνια άρχισαν να εγείρονται πολλές οικολογικές ανησυχίες σχετικά με τα απόβλητα που προκύπτουν από την τυροκομία. Η διαχείριση των αποβλήτων, αυτών, αποτελεί μείζον περιβαλλοντικό θέμα, αφού κατά τις διαδικασίες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων παράγονται μεγάλες ποσότητες υγρών αποβλήτων με υψηλό οργανικό φορτίο.

Οι αρνητικές συνέπειες που προκαλούνται από την απόρριψη του τυρογάλακτος στους υδάτινους αποδέκτες οφείλονται στην περιεκτικότητα του σε οργανικές ουσίες, που αποτελούν θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Κατά την κατανάλωση του τυρογάλακτος από τους μικροοργανισμούς γίνεται παράλληλα και κατανάλωση οξυγόνου απελευθερώνοντας στο περιβάλλον διοξείδιο του άνθρακα, νερό και διάφορα άλατα. Η κατανάλωση του οξυγόνου όμως μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσής του, με αποτέλεσμα οι οργανισμοί του υγρότοπου να μην μπορούν να αναπτυχθούν και να πεθαίνουν λόγω ασφυξίας. Ευνοείται, έτσι, η ανάπτυξη αναερόβιων μικροοργανισμών αποδίδοντας στο περιβάλλον τελικά προϊόντα που καταστούν το νερό ακατάλληλο για πόση, ύδρευση και άρδευση.

Συνεπώς, η βιοτεχνολογική αξιοποίηση του τυρογάλακτος κρίνεται αναγκαία και αποτελεί αντικείμενο μελέτης από πολλούς ερευνητές. Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία της Eurostat το 2016, παράγονται ετησίως στην Ελλάδα περίπου 1350 κtn γάλακτος, εκ των οποίων το 44% είναι αγελαδινό και το υπόλοιπο 56% είναι αιγοπρόβειο γάλα. Από την ποσότητα αυτή, οι 204 κtn αξιοποιούνται στην παραγωγή τυριού, αποβάλλοντας περίπου 180 κtn τυρογάλακτος. Μετά την παραγωγή του τυριού, το τυρόγαλα μεταφέρεται και αξιοποιείται στην παρασκευή άλλων τυριών, όπως η μυζήθρα και το ανθότυρο. Επιπλέον, το τυρόγαλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ζωοτροφές νεαρών ζώων, ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθυλικής αλκοόλης, ενώ το μεγαλύτερο μέρος του χρησιμοποιείται για την παραγωγή πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων, καθαρής πρωτεΐνης ορού και κρυσταλλικής λακτόζης.

Ανάμεσα στις καινοτόμες μεθόδους αξιοποίησης του τυρογάλακτος εντοπίζεται και η ενζυμική μετατροπή της περιεχόμενης λακτόζης σε συστατικά με αποδεδειγμένη βιολειτουργικότητα. Τέτοια συστατικά είναι οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Galactooligosaccharides, GOS). Είναι σάκχαρα που αποτελούνται από μόρια γαλακτόζης και γλυκόζης και εμφανίζουν παρόμοια δράση με τους ολιγοσακχαρίτες του μητρικού γάλακτος. Αποτελούν, λοιπόν, σημαντικούς πρεβιοτικούς παράγοντες με κύρια εφαρμογή σε βρεφικές και

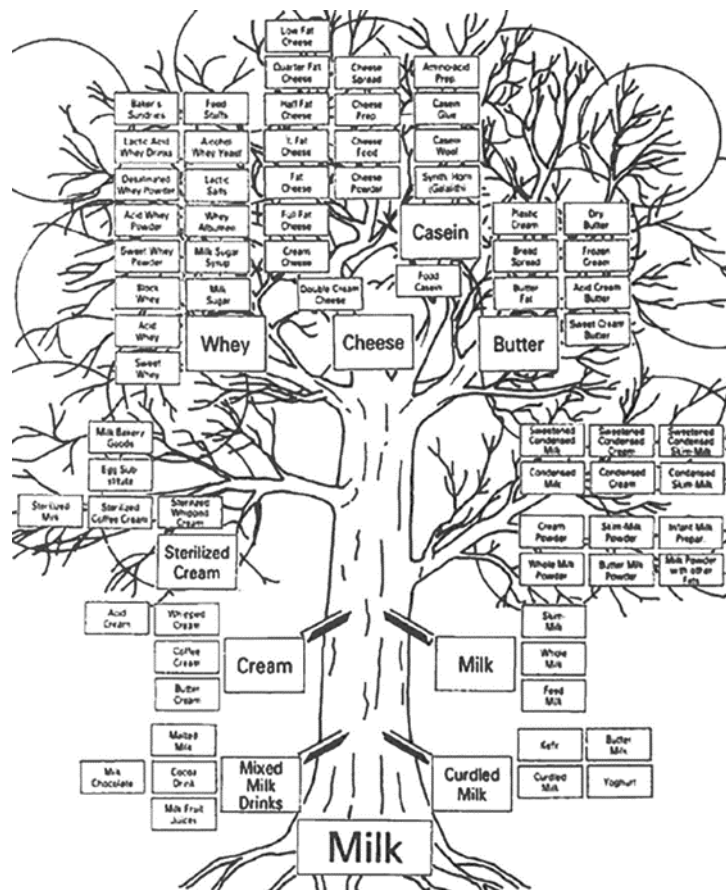
παιδικές τροφές, και παρέχουν στον ανθρώπινο οργανισμό πολλές ευεργετικές ιδιότητες.

Η σύνθεση των GOS αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης και της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Αναλυτικότερα, στο πρώτο κεφάλαιο περιγράφεται ο γλυκός ορός ή τυρόγαλα που αποτελεί και την πρώτη ύλη των πειραμάτων. Αναλύεται η παραγωγική διαδικασία του τυριού, η σύστασή του τυρογάλακτος καθώς και το πρόβλημα που δημιουργεί ως απόβλητο. Στο δεύτερο κεφάλαιο αναλύεται η δομή της λακτόζης και η ενζυμική μετατροπή αυτής. Ειδικότερα, αναλύεται το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση που αποτελεί το βασικό βιοτεχνολογικό εργαλείο, καθώς και οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την ενζυμική μετατροπή της λακτόζης σε GOS. Στο τρίτο κεφάλαιο αναλύονται οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες καθώς και οι διάφοροι τρόποι παραγωγής τους και ακολουθεί ανασκόπηση σχετικών ερευνών που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί. Στο επόμενο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην διπλωματική, αυτή, εργασία. Στο έκτο κεφάλαιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρουσιάζονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης αναλύοντας την επίδραση διαφόρων παραγόντων στη σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών από τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης. Η εργασία ολοκληρώνεται με τα βασικά συμπεράσματα και προτάσεις για μελλοντική έρευνα.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΓΛΥΚΟΣ ΟΡΟΣ Ή ΤΥΡΟΓΑΛΑ: ΕΝΑΣ ΘΗΣΑΥΡΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΤΥΡΙΟΥ

## 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η θρεπτική αξία του γάλακτος δεν άργησε να γίνει αντιληπτή από τον άνθρωπο και αποτελεί βασικό κομμάτι στην ανθρώπινη διατροφή. Είναι το έκκριμα των μαστικών αδένων θηλυκών θηλαστικών, όπως των προβάτων, κατσικιών και αγελάδων, και περιέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη του οργανισμού. Ήδη από την αρχαιότητα ο άνθρωπος εκμεταλλεύτηκε το γάλα, στη νωπή μορφή του, ενώ μέχρι και σήμερα χρησιμοποιείται για την παραγωγή μιας μεγάλης γκάμας γαλακτοκομικών προϊόντων.



Εικόνα 1.1: Το δένδρο του γάλακτος (ΠΗΓΗ: Weigand)

Η συνεχώς αυξανόμενη παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή και αποβλήτων. Στην βιομηχανία μεγάλο περιβαλλοντικό πρόβλημα αποτελεί ο ορός γάλακτος. Ως «ορός γάλακτος» καλείται το κίτρινο ημιδιαφανές κλάσμα που προκύπτει μετά την πήξη του γάλακτος και τον διαχωρισμό της καζεΐνης κατά την παραγωγική διαδικασία του τυριού και του γιαουρτιού. Υπάρχουν τέσσερεις τύποι ορού, ο όξινος, ο γλυκός, ο αλμυρός και ο φυσικός ορός (Nishanthi, Vasiljevic & Chandrapela 2017), με τους δύο πρώτους τύπους να αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής. Ο όξινος ορός προκύπτει από διεργασίες που χρησιμοποιούν τη μικροβιακή ζύμωση ή την προσθήκη οργανικών ή ανόργανων οξέων για την καταβύθιση της καζεΐνης και τη μετέπειτα πήξη του γάλακτος. Ο όξινος ορός εντοπίζεται στην παραγωγή γιαουρτιού ή νωπών τυριών, όπως το τυρί cottage και το κουάρκ (Jelen 2002). Ο γλυκός ορός, από την άλλη, προκύπτει από την πήξη της καζεΐνης του γάλακτος με χρήση πυτιάς σε τιμή pH περίπου ίση με 6,5. Συνεπώς, ο γλυκός ορός εντοπίζεται στην παραγωγή τυριού και είναι ευρέως γνωστός και ως τυρόγαλα.

Ο γλυκός και ο όξινος ορός αποτελούνται από νερό σε ποσοστό 94%, ενώ άλλα κύρια συστατικά τους είναι η λακτόζη, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος και τα μεταλλικά άλατα. Ωστόσο, παρουσιάζουν αρκετές διαφορές κυρίως ως προς την περιεκτικότητα της περιεχόμενης λακτόζης και των μεταλλικών αλάτων, τη σύνθεση των πρωτεϊνών και την οξύτητα. Ο γλυκός ορός έχει τιμή pH που κυμαίνεται από 6,0 έως 6,5, ενώ ο όξινος ορός εμφανίζει χαμηλότερη τιμή pH, η οποία είναι περίπου ίση με 4,5 λόγω της μετατροπής της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ από βακτήρια του γαλακτικού οξέος ή οργανικά και ανόργανα οξέα που προστέθηκαν κατά την διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας. Επιπλέον, ο όξινος ορός εμφανίζει υψηλή συγκέντρωση γαλακτόζης λόγω της διάσπασης της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη, ενώ παράλληλα έχει και υψηλότερη περιεκτικότητα σε ασβέστιο λόγω της χαμηλότερης τιμής pH και της διαλυτοποίησης του κολλοειδούς ασβεστίου των μικκυλίων της καζεΐνης (Fischer & Kleinschmidt 2015, Jelen 2002). Στον Πίνακα 1.1 συνοψίζεται η χημική σύσταση των δύο αυτών ορών.

## 1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΥΡΙΟΥ

Για την παρασκευή των περισσότερων ειδών τυριού ακολουθούνται τα ακόλουθα στάδια στις τυροκομικές μονάδες. Πρώτο στάδιο είναι η μεταφορά του γάλακτος από τους παραγωγούς και τους σταθμούς συγκέντρωσης στην τυροκομική μονάδα. Η μεταφορά πραγματοποιείται με βυτιοφόρα, που πληρούν τις προδιαγραφές του συστήματος υγιεινής και ασφάλειας, σε θερμοκρασία 4°C. Κατά την παραλαβή του γάλακτος στην μονάδα, το γάλα αποθηκεύεται προσωρινά σε δεξαμενές θερμοκρασίας 4°C και πραγματοποιείται ποιοτικός έλεγχός του, που περιλαμβάνει τον έλεγχο θερμοκρασίας, οξύτητας και αντιβιοτικών του γάλακτος και μετριέται η περιεκτικότητα του γάλακτος σε

λακτόζη, πρωτεΐνες, λίπη και στερεά υπολείμματα. Το γάλα μεταφέρεται στη δεξαμενή αποθήκευσης, αφού πρώτα θερμανθεί στους 35°C και φυγοκεντρηθεί με στόχο τον καθαρισμό του. Για όσο χρονικό διάστημα το γάλα παραμένει στις δεξαμενές παραλαβής είναι απαραίτητοι οι έλεγχοι για αντιβιοτικά και μικροβιακό φορτίο από εξειδικευμένο προσωπικό.

**Πίνακας 1.1:** Χημική σύσταση γλυκού και όξινου ορού (ΠΗΓΗ: Fischer & Kleinschmidt 2015)

Συστατικά	Γλυκός ορός	Όξινος ορός
<b>Ολικά σάκχαρα (g·L<sup>-1</sup>)</b>	38,7 ± 0,75	39,1 ± 1,17
<b>Γλυκόζη (g·L<sup>-1</sup>)</b>	0,30 ± 0,02	Μη ανιχνεύσιμο
<b>Γαλακτόζη (g·L<sup>-1</sup>)</b>	0,43 ± 0,05	1,10 ± 0,09
<b>Λακτόζη (g·L<sup>-1</sup>)</b>	38,0 ± 0,68	38,0 ± 1,08
<b>Ολική πρωτεΐνη (g·L<sup>-1</sup>)</b>	5,56 ± 0,08	3,02 ± 0,03
<b>Πρωτεΐνη ορού (g·L<sup>-1</sup>)</b>	5,11 ± 0,07	2,42 ± 0,70
<b>Καζεΐνη (g·L<sup>-1</sup>)</b>	0,45 ± 0,09	0,60 ± 0,18
<b>NPN (g·L<sup>-1</sup>)</b>	0,71 ± 0,02	1,63 ± 0,05
<b>Τέφρα (g·L<sup>-1</sup>)</b>	4,33 ± 0,01	7,42 ± 0,01
<b>Γαλακτικό οξύ (g·L<sup>-1</sup>)</b>	0,58 ± 0,01	8,11 ± 0,08
<b>Λίπη (g·L<sup>-1</sup>)</b>	0,47 ± 0,01	0,18 ± 0,01
<b>Na<sup>+</sup> (mM)</b>	16,5 ± 0,35	18,6 ± 0,25
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mM)</b>	2,41 ± 0,05	10,4 ± 0,25
<b>K<sup>+</sup> (mM)</b>	29,6 ± 0,95	45,2 ± 0,59
<b>Mg<sup>2+</sup> (mM)</b>	2,81 ± 0,09	4,90 ± 0,09
<b>Ca<sup>2+</sup> (mM)</b>	8,44 ± 0,22	25,5 ± 0,70
<b>Cl<sup>-</sup> (mM)</b>	21,5 ± 0,53	42,6 ± 0,56
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mM)</b>	0,81 ± 0,04	0,33 ± 0,02
<b>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mM)</b>	8,35 ± 0,19	17,6 ± 0,37
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mM)</b>	1,14 ± 0,18	0,64 ± 0,02

Επόμενο στάδιο στην παρασκευή τυριού αποτελεί η παστερίωση του γάλακτος. Σε αυτό το στάδιο, το γάλα θερμαίνεται στους 75°C για λίγα λεπτά. Στη συνέχεια, το γάλα εισέρχεται στο σύστημα ψύξης, όπου η θερμοκρασία του πέφτει γρήγορα στους 35°C, και τελικά το γάλα τροφοδοτείται στον τυρολέβητα, όπου

επιτυγχάνεται η πήξη του γάλακτος είτε με την προσθήκη πυτιάς, είτε με όξυνση του γάλακτος με χρήση οξυπαραγωγικών μικροοργανισμών. Στην πρώτη περίπτωση, το ένζυμο ρεννίνη, που περιέχεται στην πυτιά, προσβάλλει την καζεΐνη σχηματίζοντας παρα-κ-καζεΐνη και στη συνέχεια παρουσία ιόντων ασβεστίου, λόγω της προσθήκης χλωριούχου ασβεστίου, γίνεται η πήξη. Η διαδικασία αυτή διαρκεί από 20-60 min ανάλογα με τον τύπο του τυριού. Στη δεύτερη μέθοδο πήξης, οι μικροοργανισμοί που προστίθενται στο γάλα μειώνουν την τιμή pH αυτού στο ισοηλεκτρικό σημείο της καζεΐνης οδηγώντας στην πήξη. Η μέθοδος αυτή διαρκεί περισσότερη ώρα (1-2 h). Στο στάδιο αυτό παράγεται και το τυρόγαλο, το οποίο περιέχει όλη σχεδόν την ποσότητα των πρωτεϊνών ορού, τη μεγαλύτερη ποσότητα λακτόζης, τα άλατα και μικρότερη ποσότητα από το λίπος.

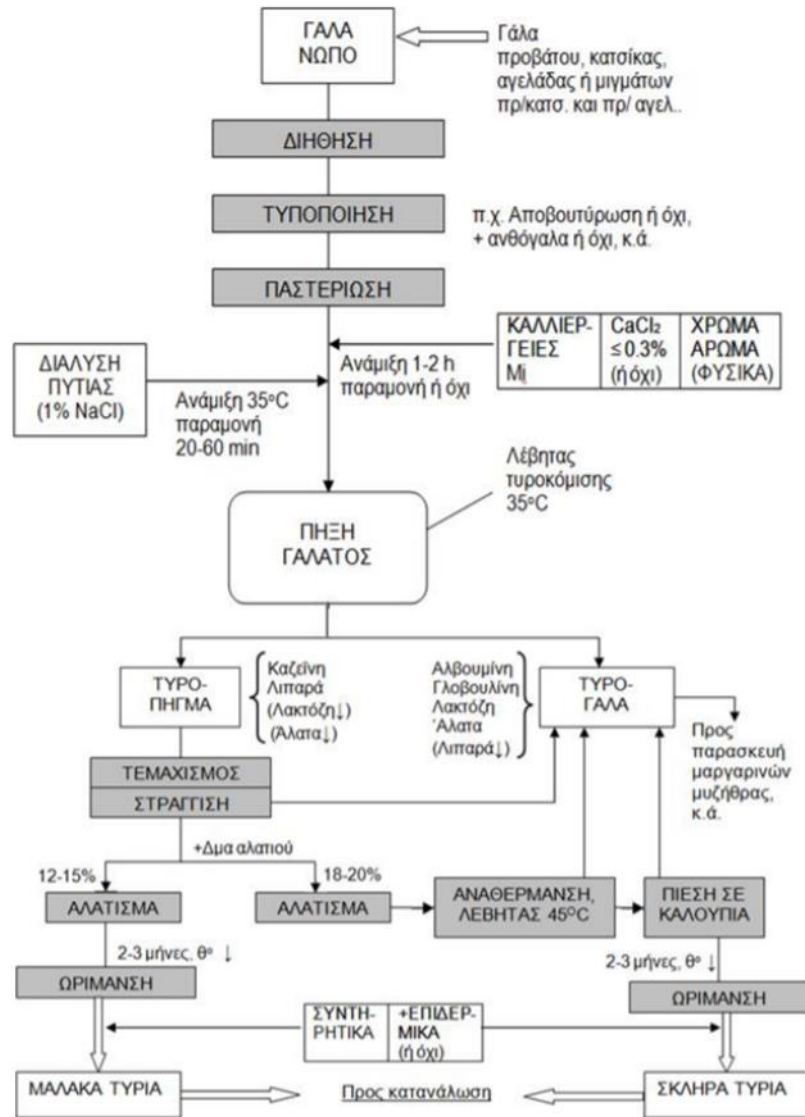
Μετά την πήξη του γάλακτος ακολουθεί ο τεμαχισμός του σχηματισμένου τυροπήγατος, όπου και διαχωρίζεται το τυρόγαλο από το τυρόπηγμα. Ακολουθεί απομάκρυνση του τυρογάλακτος με αντλία μέσα σε ανοξείδωτους σωλήνες, ενώ το τυρόπηγμα τοποθετείται σε καλούπια με πίεση για να γίνει η στράγγιση. Και στο στάδιο αυτό αποβάλλεται επιπλέον ποσότητα τυρογάλακτος. Το αλάτισμα του τυριού είναι το επόμενο βήμα στην παραγωγική διαδικασία και έχει ρυθμιστικό ρόλο. Με το αλάτισμα γίνεται έλεγχος των ενζυμικών αντιδράσεων που βελτιώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού. Σημαντικό ρόλο παίζουν η θερμοκρασία και η τιμή pH για την απορρόφηση του αλατιού, ενώ το αλάτισμα πραγματοποιείται είτε με προσθήκη κόκκων αλατιού είτε με τοποθέτηση του τυριού σε άλμη.

Τελευταίο και ίσως πιο σημαντικό στάδιο είναι η ωρίμανση του τυριού. Κατά την περίοδο ωρίμανσης το τυρί αποκτά τα μοναδικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του (οσμή, γεύση, άρωμα, υφή, χρώμα) ανάλογα με το είδος του. Στο στάδιο αυτό, οι πρωτεΐνες διασπώνται σε αμινοξέα, η λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη και το λίπος υδρολύεται σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Στο ακόλουθο σχήμα (Εικόνα 1.2) παρουσιάζεται ένα γενικό διάγραμμα της παραγωγικής διαδικασίας του τυριού.

### 1.3 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥ ΟΡΟΥ

Ο γλυκός ορός, γνωστός και ως τυρόγαλα, είναι το υγρό υπόλειμμα από την καθίζηση της καζεΐνης στο γάλα κατά την πήξη αυτού προς σχηματισμό τυριού. Το παραπροϊόν αυτό, αποτελεί το 85-90% του όγκου του γάλακτος που χρησιμοποιείται σε κάθε παραγωγή τυριού, ενώ συγκρατεί έως και το 55% από τα θρεπτικά του συστατικά, όπως είναι για παράδειγμα το γαλακτικό οξύ. Το γαλακτικό οξύ παράγεται σε μεγάλες ποσότητες κανονικά στον οργανισμό του ανθρώπου από την βακτηριακή χλωρίδα του παχέως εντέρου. Γεγονός αποτελεί ιστορικά η χορήγηση δροσιστικού τυρογάλακτος, δηλαδή γλυκού ορού, σε ασθενείς από τον Ιπποκράτη τον 4<sup>ο</sup> π.Χ. αιώνα για τη βελτίωση της πέψης, τον καθαρισμό του αίματος, την προστασία του ήπατος και άλλες φυσικές δράσεις.

Αποτελείται κυρίως από νερό σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90%, ενώ περιέχει στερεά υπολείμματα του τυριού, καθώς και διάφορα ευδιάλυτα συστατικά, που αναλύονται ακολουθώς.



**Εικόνα 1.2:** Παραγωγική διαδικασία παρασκευής τυριού (ΠΗΓΗ: Ανδρικόπουλος Ν.Κ.)

### 1.3.1 Λακτόζη

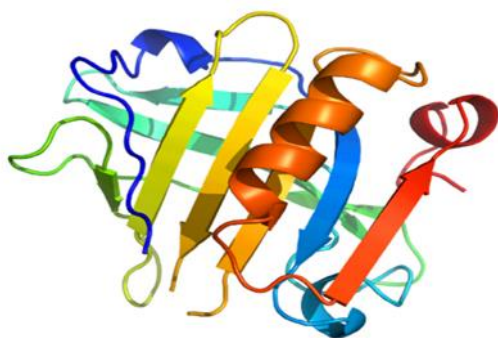
Η λακτόζη αποτελεί το κυριότερο συστατικό του γλυκού ορού και η περιεκτικότητά της είναι 4,8-5,5% w/v. Ανήκει στους δισακχαρίτες και αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο γαλακτόζης, ενωμένα μεταξύ τους με έναν β-γλυκοζιτικό δεσμό. Αποτελεί σημαντική πηγή διατροφικής αξίας, ενώ ενισχύει την απορρόφηση του ασβεστίου που βρίσκεται στα τρόφιμα. Ωστόσο, δεν μπορεί να αξιοποιηθεί απευθείας από τον οργανισμό αλλά χρειάζεται πρώτα να διασπαστεί από το ένζυμο λακτάση το οποίο εκκρίνεται από το έντερο.



Έλλειψη του ενζύμου αυτού προκαλεί τη λεγόμενη πάθηση “δυσανεξία στη λακτόζη”.

### 1.3.2 Πρωτεΐνες

Το τυρόγαλα περιέχει πρωτεΐνες σε ποσοστό 0,5-1% w/v και είναι κυρίως πρωτεΐνες ορού. Έχουν σφαιροειδή μορφή και χωρίζονται σε δύο ομάδες, κύριας και δευτερευούσης αξίας πρωτεΐνες. Η πιο διαδεδομένη πρωτεΐνη στον ορό είναι η β-γαλακτογλοβουλίνη (Εικόνα 1.3), η οποία αποτελεί το 10% των συνολικών πρωτεϊνών του γάλακτος και το 58% των πρωτεϊνών του ορού. Αποτελείται από 162 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος περίπου 18,3 kDa. Εμφανίζεται σε δύο μορφές που διαφέρουν σε έναν υποκαταστάτη. Η μορφή Α έχει ένα ασπαρτικό οξύ και η μορφή Β μια γλυκίνη. Ακόμη, το μόριο περιέχει δύο δισουλφιδικές ομάδες και μία ελεύθερη ομάδα σουλφυδρυλίου, ενώ δεν περιέχει κανένα μόριο φωσφόρου. Σε τιμή pH χαμηλότερη του 3 και υψηλότερη από 8 εμφανίζεται ως μονομερές (Kilara & Vaghela 2018, Zall 1992).



**Εικόνα 1.3:** Τρισδιάστατη δομή β-γαλακτογλοβουλίνης

Η δεύτερη πιο διαδεδομένη πρωτεΐνη είναι η α-γαλακτοαλβουμίνη (Εικόνα 1.4) και αποτελεί το 2% του συνόλου των πρωτεϊνών του γάλακτος και το 13% των πρωτεϊνών του ορού. Αποτελείται από 123 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος ίσο με 14,1 kDa. Το μόριό της περιέχει τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ δεν περιέχει καμία φωσφορική ομάδα. Έχει αποδειχθεί ότι η α-γαλακτοαλβουμίνη τροποποιεί τη δράση του ενζύμου γαλακτοζυλοτρανσφεράση. Στις δευτερεύουσας αξίας πρωτεΐνες εντάσσονται τα γλυκομακροπεπίδια, η αλβουμίνη ορού, η λακτοφερρίνη, η ανοσοσφαιρίνη και οι φωσφολιποπρωτεΐνες.

### 1.3.3 Λίπη

Στον γλυκό ορό περιέχεται λίπος σε ποσοστό 0,09-0,35% w/v και εξαρτάται από τα λιπαρά του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε (Altuntas & Hapoglu 2019, Zall 1992).





**Εικόνα 1.4:** Τρισδιάστατη δομή  $\alpha$ -γαλακτοαλβουμίνης

#### 1.3.4 Άλατα

Ο γλυκός ορός περιέχει μια ποικιλία αλάτων. Συγκεκριμένα, είναι πλούσιος σε νάτριο, κάλιο και χλώριο, ενώ περιέχονται σε αυτόν σε μικρότερη συγκέντρωση και μαγγάνιο, ασβέστιο, φωσφόρος και άλλα. Η σύστασή του εμφανίζει διαφορές από τον όξινο ορό κάτι που αποδίδεται στη διαφορετική παραγωγική τους διαδικασία (Fischer & Kleinschmidt 2015).

#### 1.3.5 Βιταμίνες

Στο τυρόγαλα μεταφέρονται οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες που δεν εγκλωβίζονται στο τυρόπηγμα κατά την παραγωγική διαδικασία. Από τη χημική ανάλυση του γλυκού ορού έχει βρεθεί ότι περιέχει θειαμίνη, φολικό οξύ, νιασίνη, ριβοφλαβίνη, χολίνη και παντοθενικό οξύ (Zall 1992). Ο κύριος ρόλος της θειαμίνης, γνωστή και ως βιταμίνη B1, είναι η μετατροπή της γλυκόζης σε ενέργεια στο αίμα, καθώς και η σωστή απελευθέρωση του υδροχλωρικού οξέος στο στομάχι. Το φολικό οξύ (βιταμίνη B9 ή φυλλικό οξύ) είναι απαραίτητο για τον μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων, για την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων και συμβάλλει στη διατήρηση της ομοκυστεΐνης. Ακόμη, η νιασίνη (βιταμίνη B3) συνδέεται με την πρόληψη της καρδιοπάθειας και της απώλειας μνήμης, διευκολύνει την πέψη και διατηρεί υγιή τα κύτταρα του δέρματος. Η ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B2) ανήκει και αυτή στο σύμπλεγμα των βιταμινών B και συμμετέχει στο σχηματισμό των απαραίτητων συνενζύμων FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) και FMN (Flavin MonoNucleotide). Η χολίνη παρότι δεν είναι βιταμίνη συμπεριλαμβάνεται στο σύμπλεγμα των βιταμινών B λόγω της παρόμοιας δράσης της. Είναι πολλή σημαντική να λαμβάνεται από μία εγκυμονούσα, διότι έχει εξέχοντα ρόλο στην εγκεφαλική ανάπτυξη και λειτουργία των εμβρύων. Τέλος, το παντοθενικό οξύ, γνωστό και ως βιταμίνη B5, είναι απαραίτητο για τη λειτουργία των επινεφριδίων και το σχηματισμό των αντισωμάτων και αποτελεί τμήμα του συνενζύμου A, το οποίο είναι υπεύθυνο για την απελευθέρωση της ενέργειας από τις τροφές.

#### 1.4 ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥ ΟΡΟΥ ΚΑΙ Η ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ

Παρόλο που ο γλυκός ορός αποτελεί ένα παραπροϊόν με υψηλή θρεπτική αξία, δυστυχώς, αποτελεί και ένα ρυπογόνο προϊόν λόγω των οργανικών και ανόργανων ουσιών που περιέχει. Ακόμη, ο τεράστιος όγκος που παράγεται, καθώς αποτελεί το 85-90% του όγκου του γάλακτος που χρησιμοποιείται στην παραγωγή τυριού, προσθέτει ένα ακόμη πρόβλημα (*Park & Oh 2010*). Η απόχυσή του στο υδάτινο περιβάλλον καθίσταται αδύνατη αφού θα έχει σοβαρές συνέπειες τόσο για το ίδιο το περιβάλλον όσο και για την έμβια ζωή γύρω από την τυροκομική μονάδα.

Η αποικοδόμηση των οργανικών ουσιών γίνεται από μικροοργανισμούς και μπορεί να πραγματοποιείται όσο η ποσότητα των οργανικών ουσιών δεν ξεπερνά τα επίπεδα ικανότητας αποικοδόμησής τους από το οικοσύστημα. Έτσι, με τη διαρκή παρουσία του οξυγόνου τα υδατοδιαλυτά συστατικά των αποβλήτων χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς ως θρεπτικά συστατικά. Τα προϊόντα της οξειδωσης απελευθερώνονται στο περιβάλλον ενώ ο πληθυσμός των μικροοργανισμών αυξάνεται μέσω της κυτταρικής διαίρεσης. Με αυτή την διαδικασία επιτυγχάνεται η μείωση των οργανικών ουσιών από τους μικροοργανισμούς με κατανάλωση οξυγόνου. Ωστόσο, για να αποφανθεί εάν πραγματοποιείται ή όχι ρύπανση του περιβάλλοντος θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η απαίτηση σε οξυγόνο. Προκειμένου να μην επηρεάζεται το οικοσύστημα θα πρέπει το οξυγόνο που απομένει στο σύστημα να είναι επαρκές για την επιβίωση των οργανισμών του συστήματος..

Ωστόσο, το οργανικό φορτίο του τυρογάλακτος δεν διαλύεται στο νερό και η βιολογική απαίτηση σε οξυγόνο είναι υψηλή. Η μέση τιμή του BOD του τυρογάλακτος είναι περίπου 44 g/L. Δεδομένου ότι η μέση κατανάλωση νερού ανά άτομο είναι περίπου 100 L ημερησίως και το αντίστοιχο BOD είναι 54 g, η χύτευση 1 L τυρογάλακτος ισοδυναμεί με την ποσότητα των αποβλήτων ενός ατόμου την ημέρα (*Altuntas & Haroglu 2019*). Από αυτή και μόνο τη σύγκριση γίνεται κατανοητό πόσο σημαντική είναι η περιβαλλοντική ρύπανση εξαιτίας της μεγάλης ποσότητας οξυγόνου που απαιτείται, ενώ η απόχυσή του θα ήταν καταστροφική για την υδρόβια ζωή και την συνέχισή της. Έτσι, λοιπόν, η σύσταση του τυρογάλακτος θα πρέπει να αξιολογείται κάθε φορά προκειμένου να μην επηρεάζονται το περιβάλλον και η υδρόβια ζωή.

Ιστορικά, το τυρόγαλα θεωρήθηκε ένα ρεύμα αποβλήτων με χαμηλή οικονομική αξία. Για το λόγο αυτό, δεν αξιοποιούνταν και προκειμένου οι γαλακτοβιομηχανίες να απαλλαγούν από αυτό είτε το ψεκάζανε σε χωράφια, το απόχυναν σε λίμνες και ποτάμια είτε το πουλούσαν ως συστατικό για ζωοτροφές. Σήμερα, η κατανόηση της σοβαρότητας της περιβαλλοντικής ρύπανσης που δημιουργούν οι παραπάνω τρόποι, καθώς και η εξέλιξη της τεχνολογίας έστρεψαν την επιστημονική κοινότητα σε νέα ερευνητικά μονοπάτια. Σήμερα, ο γλυκός ορός έχει αναλυθεί και χαρακτηριστεί πλήρως ανακαλύπτοντας τις χημικές, φυσικές,

βιολογικές και θρεπτικές ιδιότητές του, οι γαλακτοβιομηχανικές μονάδες έχουν εξελιχθεί στην επεξεργασία του και η διαρκή ανάγκη εξέλιξης στον τομέα των τροφίμων έχουν οδηγήσει στην εκμετάλλευση του τυρογάλακτος προς παραγωγή νέων συστατικών.

Η χρήση του γλυκού ορού ως υπόστρωμα σε διάφορες φυσικοχημικές και βιοτεχνολογικές διεργασίες οδηγεί στην παραγωγή πολύτιμων προϊόντων. Η περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες και λακτόζη τον καθιστούν εξαιρετική επιλογή για την παραγωγή βρεφικών τροφίμων και ροφημάτων, ενώ λόγω των ανόργανων συστατικών και της λακτόζης έχει δοκιμαστεί η παραγωγή αλκοολούχων ποτών, όπως κρασί, μύρα και σαμπάνια. Φυσικά, το τυρόγαλα μπορεί να εκμεταλλευτεί και από άλλους τομείς πέρα από τα τρόφιμα, όπως από τον τομέα των καυσίμων όπου μελετάται η χρήση του για παραγωγή βιοαερίου (*Altuntas & Hapoglu 2019, Smither 2008*).



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Η ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ ΜΕΣΩ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

---

## 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

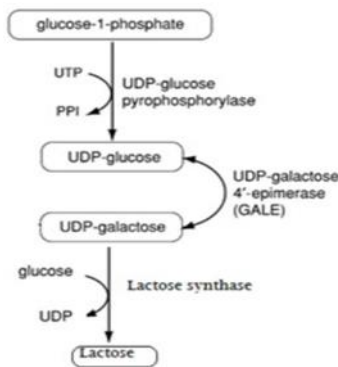
Η πρώτη αναφορά για την απομόνωση της λακτόζης δημοσιεύτηκε το 1633 από τον Ιταλό ιατρό Fabrizio Bartoletti. Ακολούθησαν δημοσιεύσεις και αναφορές για την ικανότητα της λακτόζης να ανακουφίσει πόνους από διάφορες παθήσεις, όπως συμπτώματα αρθρίτιδας. Το 1812 βρέθηκε από τον Heinrich Vogel ότι προϊόν της υδρόλυσης της λακτόζης αποτελεί η γλυκόζη και το 1856 αποκρυσταλλώθηκε και το δεύτερο προϊόν της υδρόλυσης της λακτόζης, η γαλακτόζη, από τον Luis Pasteur.

Σήμερα, η λακτόζη έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο στην ερευνητική όσο και στη βιομηχανική κοινότητα, αφού η αξιοποίησή της υπόσχεται πολλές δυνατότητες. Η λακτόζη χρησιμοποιείται σε φαρμακοβιομηχανίες, στις βιομηχανίες τροφίμων, ενώ ερευνάται και η παραγωγή βιοαερίου από αυτή. Εκτός από την εκμετάλλευση της λακτόζης για την παραλαβή της σε μορφή κρυστάλλων χρησιμοποιείται και ως υπόστρωμα για τη σύνθεση ολιγοσακχαριτών μέσω ενζυμικών αντιδράσεων. Στην ενζυμική, αυτή, αξιοποίηση της λακτόζης κυρίαρχο ρόλο έχει η β-γαλακτοζιδάση που παράγεται από διάφορους μικροοργανισμούς.

## 2.2 ΛΑΚΤΟΖΗ

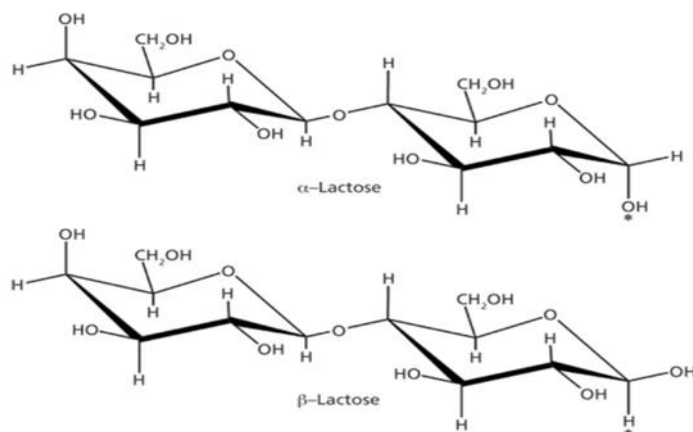
### 2.2.1 Εισαγωγή

Η λακτόζη είναι ένας φυσικός δισακχαρίτης που εντοπίζεται μόνο στο γάλα των θηλαστικών και αποτελεί μοναδική πηγή ενέργειας. Η λακτόζη συντίθεται στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού και αποτελείται από γαλακτόζη και γλυκόζη. Το μόριο της γαλακτόζης συνδέεται με το μόριο της γλυκόζης με β-(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό. Η σύνδεση των δύο μορίων αυτών καταλύεται από ένα σύμπλοκο πρωτεΐνης που ονομάζεται σύνθεση λακτάσης. Το καταλυτικό συστατικό UDP-γαλακτοζυλοτρανσφεράση καταλύει τη μεταφορά της γαλακτόζης από την UDP-γαλακτόζη στη γλυκόζη. Το μη καταλυτικό συστατικό α-γαλακτοαλβουμίνη μειώνει τη σταθερά Michaelis της τρανσφεράσης ευνοώντας τη σύνδεση των δύο μορίων (Εικόνα 2.1, *Illanes 2016*).



**Εικόνα 2.1:** Μηχανισμός σύνθεσης λακτόζης

Η λακτόζη συναντάται σε δύο μορφές ισομερών, την α-λακτόζη και τη β-λακτόζη. Η ύπαρξη των δύο αυτών ανωμερών οφείλεται στην ομάδα υδροξυλίου του C-1 άνθρακα του μορίου της γλυκόζης. Η ομάδα υδροξυλίου αυτή είναι ελεύθερη και μπορεί να υπάρξει είτε πάνω είτε κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου (Εικόνα 2.2).



**Εικόνα 2.2:** Ανωμερείς μορφές της λακτόζης

Τα δύο ανωμερή διαφέρουν στις ιδιότητές τους με κυριότερη την διαλυτότητά τους. Στους 20°C η β-λακτόζη είναι περίπου 7 φορές πιο διαλυτή από την α-λακτόζη, κάτι που σε υψηλές θερμοκρασίες αντιστρέφεται. Συχνότερα συναντάται η α-λακτόζη σε κρυσταλλική ένυδρη μορφή, ενώ η β-λακτόζη εντοπίζεται άνυδρη και κρυσταλλώνεται σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 93,5°C. Επιπλέον, τα δύο ανωμερή της λακτόζης εμφανίζουν διαφορές ως προς τον πολυμορφισμό τους και τις φυσικές τους ιδιότητες, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1. (Illanes 2016, Johnson & Conforti 2003).

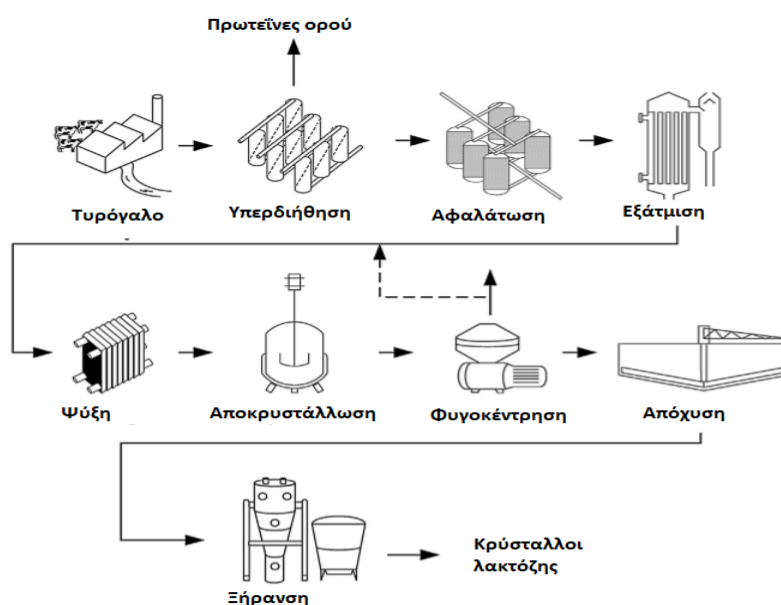
**Πίνακας 2.1:** Φυσικές ιδιότητες των ανωμερών της λακτόζης

Ιδιότητες	α-λακτόζη	β-λακτόζη
Μοριακό βάρος ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	360	342
Σημείο τήξης ( $^{\circ}\text{C}$ )	202	252
Πυκνότητα ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	1,54	1,59
Ειδική στροφική ικανότητα	+89,4	+35
Θερμότητα διαλυτοποίησης ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	- 50,2	- 9,62
Διαλυτότητα σε νερό ( $20^{\circ}\text{C}$ , $\text{g}/100\text{ mL}$ )	7,4	50

### 2.2.2 Ανάκτηση λακτόζης από το τυρόγαλο

Το γάλα των θηλαστικών αποτελεί την μοναδική πηγή λακτόζης σε σημαντικά υψηλή συγκέντρωση. Συνεπώς, το τυρόγαλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την ανάκτηση αυτής. Φυσικά, και η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι ένα πολύτιμο θρεπτικό συστατικό, το οποίο περιέχεται στο τυρόγαλο και μπορεί να παραληφθεί με τη διαδικασία της υπερδιήθησης.

Η ανάκτηση λακτόζης από το διήθημα ακολουθεί την διαδικασία που αποτυπώνεται στην Εικόνα 2.3 βασισμένη στη μέθοδο της κρυστάλλωσης.



**Εικόνα 2.3:** Βιομηχανική διαδικασία ανάκτησης της λακτόζης (ΠΗΓΗ: Illanes 2016)

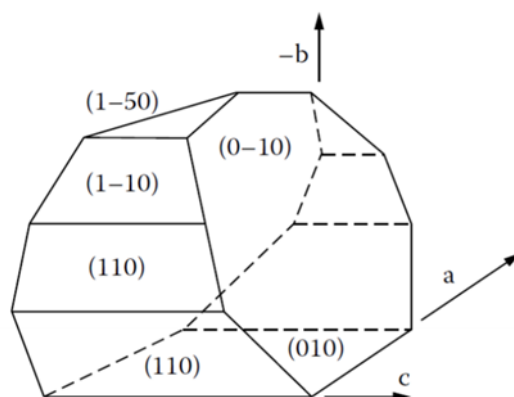
Σε πρώτο στάδιο γίνεται ρύθμιση της συγκέντρωσης με εξάτμιση πολλών σταδίων, αφού πρώτα το διήθημα προσυμπυκνωθεί με αντίστροφη ώσμωση και μερική αφαλάτωση. Στη συνέχεια, ακολουθεί η κρυστάλλωση με ψύξη του

υπερκορεσμένου διαλύματος. Οι κρύσταλλοι της λακτόζης ανακτώνται με απόχυση ή φυγοκέντρηση του υγρού. Τελικά, οι κρύσταλλοι υποβάλλονται σε ξήρανση προκειμένου να περιέχουν ποσοστό υγρασίας 5-12%. Ανάλογα με τη χρήση που προορίζονται οι κρύσταλλοι μπορεί να υποβληθούν σε κάποια επιπλέον διεργασία (Illanes 2016).

### 2.2.3 Το φαινόμενο της κρυστάλλωσης της λακτόζης

Το φαινόμενο της κρυστάλλωσης της λακτόζης έχει μελετηθεί την τελευταία δεκαετία. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές για την ανάπτυξη των κρυστάλλων της λακτόζης, καθώς η κρυστάλλωση άμορφων σακχάρων στον τομέα των τροφίμων μπορεί να ενισχύσει το τρόφιμο ως προς τη φυσική αλλά και τη χημική αλλοίωσή του. Η κρυστάλλωση της λακτόζης είναι φαινόμενο με μεγάλη σημασία για τα γαλακτοκομικά τρόφιμα με μειωμένη υγρασία, όπως οι σκόνες γάλακτος, το σακχαρούχο συμπυκνωμένο γάλα και το παγωτό.

Για την κρυστάλλωση ενός μορίου κινητήρια δύναμη είναι η διαφορά στο χημικό δυναμικό μεταξύ ενός μορίου που βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας και ενός μορίου στην υπερκορεσμένη του κατάσταση. Η κρυστάλλωση είναι μία διαδικασία δύο σταδίων, της πυρήνωσης και της πυρηνογένεσης. Ο ρυθμός αύξησης των κρυστάλλων αυξάνεται όσο αυξάνεται και ο υπερκορεσμός του διαλύματος. Ανάλογα με τις διαφορετικές φάσεις των κρυστάλλων προκύπτουν και διαφορετικά σχήματα κρυστάλλου. Τα σχήματα πυραμίδας, Tomahawk (Εικόνα 2.4) και πρίσματος είναι οι πιο κοινές μορφές κρυστάλλων. Συνεπώς, η μορφή των κρυστάλλων εξαρτάται από τον υπερκορεσμό του διαλύματος. Ο υψηλός υπερκορεσμός οδηγεί σε σχηματισμό μόνο πρισμάτων, ενώ όσο ο υπερκορεσμός μειώνεται παρατηρείται δημιουργία κρυστάλλων σε σχήματα διαμαντιού, πυραμίδας και τέλος Tomahawk.



**Εικόνα 2.4:** Μορφή Tomahawk κρυστάλλου λακτόζης



Η α-λακτόζη κρυσταλλώνεται ως α-ενυδατωμένη μορφή με προσδεμένο νερό σε ποσοστό 5%. Οι κρύσταλλοι αυτοί διατίθενται στο εμπόριο ως εμπορική λακτόζη και σχηματίζονται με τη συμπύκνωση διαλυμάτων λακτόζης σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 93°C. Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι σκληροί και διαλύονται αργά, ενώ έχουν διαφορετικά σχήματα με επικρατέστερο το σχήμα Tomahawk. Αντιθέτως, η β-λακτόζη σχηματίζει κρυστάλλους άνυδρης μορφής σε θερμοκρασία υψηλότερη των 93°C. Οι κρύσταλλοι της β-λακτόζης είναι γλυκύτεροι, πιο ευδιάλυτοι και έχουν σχήμα διαμαντιού (Roos & Karel 1992, Bhargava & Jelen 1996).

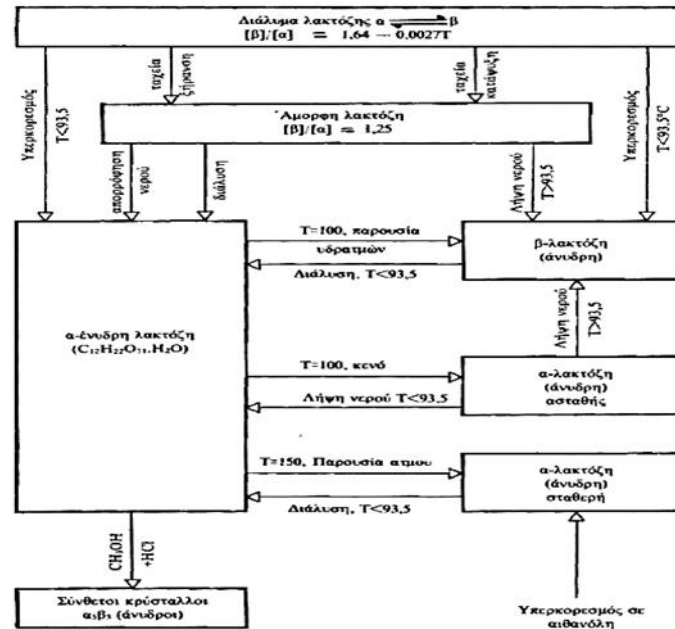
Η ανάπτυξη των κρυστάλλων λακτόζης, εκτός από τον υπερκορεσμό του διαλύματος, επηρεάζεται και από τη θερμοκρασία, την τιμή pH, το ιξώδες καθώς και την παρουσία ακαθαρσιών. Στην Εικόνα 2.5 παρουσιάζεται η σχέση μεταξύ των διαφόρων μορφών λακτόζης.

#### 2.2.4 Δυσανεξία στη λακτόζη

Η δυσανεξία στη λακτόζη μπορεί να οριστεί και ως ανάπτυξη γαστρεντερικών συμπτωμάτων μετά από κατανάλωση λακτόζης. Συμπτώματα δυσανεξίας στη λακτόζη μπορούν να εμφανίσουν όλοι οι άνθρωποι εάν η ποσότητα της λακτόζης που έχει καταναλώσει κάποιος υπερβαίνει την ικανότητα του γαστρεντερικού συστήματος να την μεταβολίσει. Η λακτόζη είναι ένας υδατάνθρακας που εμπεριέχεται σε όλα τα γαλακτοκομικά προϊόντα και αποτελείται από ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο γλυκόζης. Κατά τη βρεφική και νεαρή ηλικία η ικανότητα διάσπασης της λακτόζης είναι πολύ υψηλή λόγω της έντονης δραστηριότητας της λακτάσης, ενός ενζύμου που υπάρχει στο πεπτικό σύστημα. Κατά την ενηλικίωση η δραστηριότητα του ενζύμου αυτή μειώνεται με αποτέλεσμα να εμφανίζονται προβλήματα δυσπεψίας στη λακτόζη. Γεγονός αποτελεί ότι το 25% του ανθρώπινου πληθυσμού διατηρεί σε υψηλό επίπεδο την δραστηριότητα της λακτάσης σε όλη του τη ζωή με αποτέλεσμα να μην πάσχει από δυσανεξία σε αυτήν (Suarez et al. 2003).

Ωστόσο, τα γαλακτοκομικά προϊόντα δεν μπορούν να αφαιρεθούν από την διατροφή του ανθρώπου, διότι περιέχουν άλλα θρεπτικά συστατικά, όπως το ασβέστιο που αποτελούν και βασική πηγή αυτού. Ανεπαρκής πρόσληψη ασβεστίου, για παράδειγμα, θα οδηγούσε τελικά σε εμφάνιση οστεοπόρωσης. Τέλος, η δυσανεξία στη λακτόζη δεν θα πρέπει να συγχέεται με την αλλεργία στο γάλα. Οι άνθρωποι που εμφανίζουν αλλεργία στο γάλα σημαίνει ότι το ανοσοποιητικό τους σύστημα αντιδρά σε μία ή περισσότερες πρωτεΐνες που περιέχει αυτό. Η αλλεργία στο γάλα αναπτύσσεται συνήθως από τη βρεφική ηλικία κάτι που δεν χαρακτηρίζει την πάθηση της δυσανεξίας στη λακτόζη. Συνεπώς, η δυσανεξία στη λακτόζη αφορά στην υδρόλυση της λακτόζης, εμφανίζεται στην ενήλικη ζωή του ανθρώπου και εξαρτάται από την ποσότητα της λακτόζης που προσλαμβάνει κάποιος, τα επίπεδα δραστηριότητας του ενζύμου

λακτάση, τον γαστρεντερικό χρόνο διέλευσης αυτής και την ικανότητα της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου να ζυμώνει την λακτόζη.



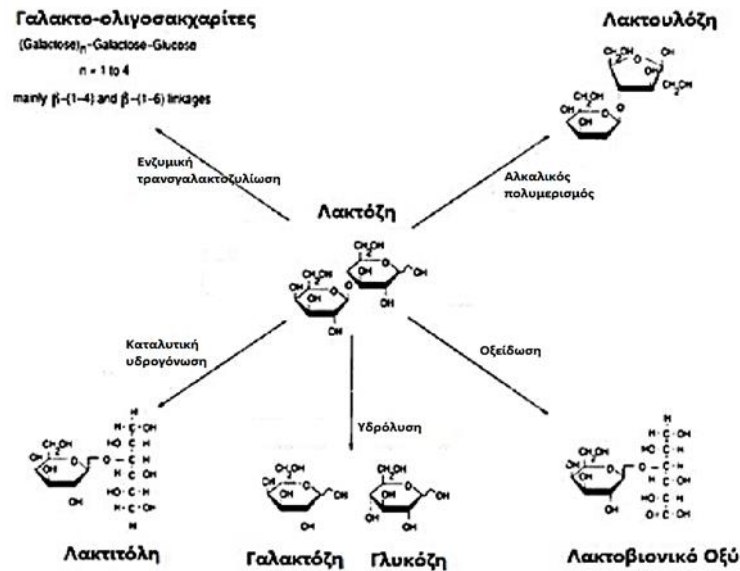
**Εικόνα 2.5:** Σχέση μεταξύ διάφορων μορφών λακτόζης (ΠΗΓΗ: Δημήτριος Γιώτσας 2011)

### 2.2.5 Εφαρμογές της λακτόζης

Η ήπια γεύση της λακτόζης σε συνδυασμό με την ευκολία στη διαχείρισή της, την καταστούν ιδανική ως φορέα και σταθεροποιητή αρωμάτων και φαρμακευτικών προϊόντων. Στη φαρμακευτική βιομηχανία, η λακτόζη χρησιμοποιείται με τη μορφή της α-λακτόζης ως μία αδρανής ουσία που προστατεύει και ενισχύει τη βιολογική διαθεσιμότητα και αξία του φαρμάκου. Επίσης, βρίσκει εφαρμογή σε διαβητικά προϊόντα, γλυκαντικά χαμηλής θερμιδικής αξίας καθώς και σε προϊόντα αδυνατίσματος.

Στα τρόφιμα δεν προστίθεται απευθείας λόγω της χαμηλής της διαλυτότητας σε σχέση με άλλα σάκχαρα, με εξαίρεση τα βρεφικά τρόφιμα, όπου χρησιμοποιείται λόγω της ομοιότητάς της με τη σύνθεση του μητρικού γάλακτος, αυξάνοντάς την θρεπτική αξία τους. Δεσμεύει τις γεύσεις και τα αρώματα των τροφίμων, ενώ παράλληλα αυξάνει και τη διάρκεια αποθήκευσής τους. Ακόμη, χρησιμοποιείται στη διαδικασία της ζυθοποιίας για να προσδώσει έντονη γλυκιά γεύση. Τέλος, στη βιομηχανία τροφίμων, εκμεταλλεζόμενοι την αντίδραση Maillard, χρησιμοποιούν τη λακτόζη σε προϊόντα αρτοποιίας προκειμένου να προσδώσει το επιθυμητό τελικό χρώμα (Johnson & Conforti 2003).

Η λακτόζη βρίσκει εφαρμογή και στον τομέα των καυσίμων, καθώς με τη χρήση ειδικών ζυμών μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική πηγή ενέργειας. Χρησιμοποιώντας τον γλυκό ορό ως πρώτη ύλη μπορεί να παραχθεί βιοαέριο, βιοαιθανόλη καθώς και άλλα προϊόντα ζύμωσης. Στην Εικόνα 2.6 παρουσιάζονται διάφορα προϊόντα που παράγονται από την λακτόζη ως πρώτη ύλη (Illanes 2016).



Εικόνα 2.6: Τα παράγωγα της λακτόζης (ΠΗΓΗ: Yang & Silva 1995)

## 2.3 ENΖΥΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΤΗΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ

### 2.3.1 Εισαγωγή

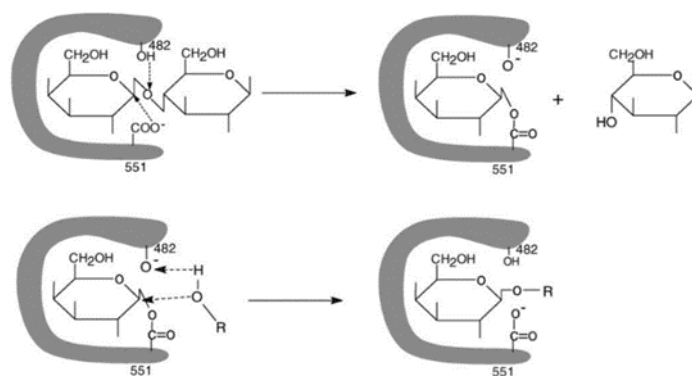
Η ενζυμική σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών (Galactooligosaccharides, GOS) χρησιμοποιώντας λακτόζη ως υπόστρωμα και ελεύθερη  $\beta$ -γαλακτοζιδάσης ως ένζυμο περιλαμβάνει δύο βασικές αντιδράσεις, την υδρόλυση και την τρανσγαλακτοζυλίωση. Κατά την πρώτη αντίδραση πραγματοποιείται η υδρόλυση του μορίου της λακτόζης απελευθερώνοντας στο διάλυμα ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο γλυκόζης. Ακολουθεί η αντίδραση της τρανσγαλακτοζυλίωσης όπου συντίθενται τελικά οι GOS. Στην Εικόνα 2.7 παρουσιάζονται σχηματικά οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα.



εμφανίζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν βέλτιστη δράση σε τιμή pH από 6 έως 7 και χρησιμοποιούνται κατά κόρον σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα ένζυμα β-γαλακτοζιδάσης που προέρχονται από ευρωτομύκητες εμφανίζουν βέλτιστη δράση σε τιμή pH από 2,5 έως 5,5, είναι εξαιρετικά σταθερά και χρησιμοποιούνται κυρίως στην υδρόλυση της λακτόζης αλλά και στην απομάκρυνση υπολειμμάτων γαλακτόζης από ολιγοσακχαρίτες. Τέλος, έχει βρεθεί ότι η β-γαλακτοζιδάση απαντάται και σε ορισμένα καρποφόρα δένδρα, όπως οι ροδακινιές και οι μηλιές. Η δράση του ενζύμου στα φυτά συνδέεται με την ωρίμανση πολλών καρπών μειώνοντας τις γαλακτοζυλομάδες του κυτταρικού τοιχώματος (Gosling et al. 2010, Liu et al. 2017).

### 2.3.3 Αντίδραση υδρόλυσης

Η ενζυμική υδρόλυση του γλυκοζιτικού δεσμού της λακτόζης πραγματοποιείται με όξινη κατάλυση παρουσία ενός δότη πρωτονίων και ενός πυρηνόφιλου. Ο μηχανισμός περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τον Wellenfels, ο οποίος χρησιμοποίησε τη λακτάση από τον μικροοργανισμό *E. coli*. Στον μηχανισμό αυτό, η κυστόνη και η ιστιδίνη λειτουργούν ως δότης πρωτονίων και ως θέση πυρηνόφιλου, αντίστοιχα. Ωστόσο, σήμερα, έχει γίνει γνωστό ότι η χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από μικροοργανισμούς παρέχει το πλεονέκτημα να δρα και στις δύο θέσεις. Έτσι, κατά την ενζυμική αντίδραση η β-γαλακτοζιδάση δρα ως δότης πρωτονίων αλλά και ως θέση πυρηνόφιλου λόγω των δύο γλουταμινικών οξέων που διαθέτει.



**Εικόνα 2.9:** Μηχανισμός δύο σταδίων υδρόλυσης της λακτόζης με χρήση β-γαλακτοζιδάσης

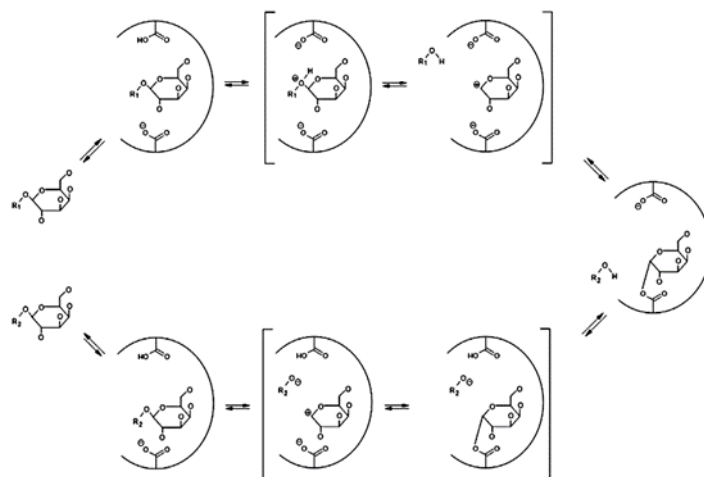
Κατά το πρώτο στάδιο σχηματίζεται ένα σύμπλοκο ενζύμου - γαλακτοζυλίου, και ταυτόχρονα απελευθερώνεται ένα μόριο γλυκόζης. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο μεταφέρεται και προσδένεται σε έναν δέκτη που περιέχει μια ομάδα υδροξυλίου. Ο δέκτης πρόσδεσης στο δεύτερο στάδιο εξαρτάται από τη σύσταση του

διαλύματος. Εάν στο διάλυμα η περιεκτικότητα της λακτόζης είναι υψηλή, τότε υπάρχουν περισσότερες πιθανότητες να προσδεθεί η λακτόζη στο σύμπλοκο με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένας ολιγοσακχαρίτης. Εάν, όμως, η περιεκτικότητα της λακτόζης είναι χαμηλή και στο διάλυμα δεν περιέχονται άλλα σάκχαρα, τότε σχηματίζεται γαλακτόζη και απελευθερώνεται από το ένζυμο (Εικόνα 2.9, Zhou & Chen 2001).

### 2.3.4 Αντίδραση τρανσγαλακτοζυλίωσης

Αν και η κύρια δράση της β-γαλακτοζιδάσης είναι η υδρόλυση της λακτόζης, σε κατάλληλες συνθήκες ευνοείται και η αντίδραση της τρανσγαλακτοζυλίωσης. Μετά την υδρόλυση της λακτόζης, στο υπόστρωμα πλέον υπάρχει εναπομένονσα λακτόζη και μονοσακχαρίτες (γαλακτόζη και γλυκόζη). Πλέον ως δέκτης γαλακτοζυλομάδας μπορεί να γίνει είτε κάποιο από τα μονοσάκχαρα, είτε η λακτόζη, με αποτέλεσμα να συντίθενται μια σειρά δισακχαριτών, τρισακχαριτών αλλά και μεγαλύτερου πολυμερισμού σάκχαρα.

Η απόδοση της τρανσγαλακτοζυλίωσης εξαρτάται από την περιεκτικότητα της λακτόζης στο διάλυμα και τις ιδιότητες του ενζύμου. Το ένζυμο πρέπει να έχει την ικανότητα να απομακρύνει από τη θέση πρόσδεσης τα μόρια νερού και να επιτρέπει τη σύνδεση του συμπλόκου με πυρηνόφιλο σάκχαρο. Καθώς, η αντίδραση προχωράει η περιεκτικότητα της λακτόζης στο διάλυμα μειώνεται, ενώ οι GOS αυξάνονται. Όταν παρατηρηθεί η μέγιστη συγκέντρωση GOS, ο ρυθμός σύνθεσης των γαλακτοολιγοσακχαριτών ισούται με την υδρόλυση αυτών. Τότε αρχίζει να εμφανίζεται εντονότερα η υδρόλυση GOS μέχρι να επανέλθει η θερμοδυναμική ισορροπία στο διάλυμα. Στην Εικόνα 2.10 φαίνεται ο μηχανισμός αντίδρασης της β-γαλακτοζιδάσης με γλυκοζίδια (Gosling et al. 2010).



**Εικόνα 2.10:** Μηχανισμός αντίδρασης για τη δράση της β-γαλακτοζιδάσης σε γαλακτοζίδια



#### 2.4 Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟ *KLUYVEROMYCES LACTIS*

Η γενετική και δράση των *Kluyveromyces* spp. έχει μελετηθεί εκτενώς από τους βιολόγους. Οι *Kluyveromyces* είναι ένα γένος ασκομυκήτων ζυμών της οικογένειας *Saccharomycetaceae*. Χρησιμοποιούνται συνήθως σε γενετικές μελέτες και βιομηχανικές εφαρμογές. Το όνομά τους προέρχεται από την ικανότητα να αφομοιώνουν τη λακτόζη και να την μετατρέπουν σε γαλακτικό οξύ.

Ο ζυμομύκητας *Kluyveromyces lactis* είναι μεσόφιλος και αποτελεί την κυριότερη εμπορική πηγή της β-γαλακτοζιδάσης. Η ζύμη *K. lactis* αξιοποιεί τη λακτόζη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Η λακτόζη υδρολύεται με τη βοήθεια της ενδοκυτταρικής β-γαλακτοζιδάσης. Έχει δοκιμαστεί η απελευθέρωση της β-γαλακτοζιδάσης με επεξεργασία της ετερόλογης πρωτεΐνης που την εμπεριέχει. Ακόμη, και μετά την επεξεργασία η πρωτεΐνη παρέμενε περιπλασματική λόγω της υψηλής μοριακής της μάζα, με αποτέλεσμα να εμποδίζει την απελευθέρωση του ενζύμου (R. Dickson, L. Dickson & Markin 1979, Johnson & Echavarri-Erasun 2011).

Έχουν διεξαχθεί διάφορες μελέτες για το χαρακτηρισμό της β-γαλακτοζιδάσης από τον *K. lactis*, στις οποίες αναφέρεται ότι το ένζυμο δρα βέλτιστα στη θερμοκρασία των 40°C και τιμή pH ίση με 6,8. Μελέτες ακόμη έδειξαν ότι εάν το ένζυμο αυτό ακινητοποιηθεί σε επιφάνεια γραφίτη αυξάνεται η θερμική σταθερότητά του και η βέλτιστη τιμή δράσης του μετατοπίζεται σε αλκαλικότερη τιμή κατά 1 μονάδα. Παράλληλα, φάνηκε ότι η σταθερά Michaelis-Menten αυξάνεται κατά 5 φορές στην ακινητοποιημένη μορφή της β-γαλακτοζιδάσης (Zhou & Chen, 2001).

#### 2.5 ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ

Η β-γαλακτοζιδάση χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία σε μία πληθώρα εφαρμογών. Στον τομέα των τροφίμων χρησιμοποιείται στην επεξεργασία γαλακτοκομικών προϊόντων και είναι τόσο βακτηριακής όσο και μυκητιακής προέλευσης. Χρησιμοποιείται για την υδρόλυση της λακτόζης προκειμένου το τελικό προϊόν να έχει λιγότερη συγκέντρωση αυτής, δημιουργώντας προϊόντα κατάλληλα για όσους εμφανίζουν δυσανεξία στη λακτόζη. Επιπλέον, η βιομηχανία εκμεταλλεύεται την ικανότητα του ενζύμου να καταλύει την αντίδραση της τρανσγαλακτοζυλίωσης συνθέτοντας ολιγοσακχαρίτες. Προσθήκη των GOS σε γαλακτοκομικά προϊόντα προσφέρουν στον καταναλωτή ένα προϊόν με πρεβιοτικές ιδιότητες και υψηλή θρεπτική αξία. Μία ακόμη εφαρμογή του ενζύμου αποτελεί η παρεμπόδιση του φαινομένου της κρυστάλλωσης της λακτόζης, το οποίο είναι ζητούμενο σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως στα παγωτά και τα συμπυκνωμένα γάλατα.

Η β-γαλακτοζιδάση βρίσκει εφαρμογή και στη φαρμακοβιομηχανία. Χρησιμοποιείται σε προϊόντα που λαμβάνονται πριν από την κατανάλωση γάλακτος, διατηρώντας την τιμή του pH του στομάχου σε χαμηλό επίπεδο. Επιπλέον, μελέτες έχουν αναδείξει τη δυνατότητα χρήσης της β-γαλακτοζιδάσης για παραγωγή βιοαερίου, βιοαιθανόλης και βιοαισθητήρων.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΓΑΛΑΚΤΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ

---

### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Galactooligosaccharides, GOS) έχουν γίνει το επίκεντρο στο τομέα των λειτουργικών τροφίμων. Λόγω της αναγνωρισμένης θρεπτικής τους αξίας και των οφελών τους στην υγεία του ανθρώπου αξιοποιούνται ως συστατικά τροφίμων στη βιομηχανία των τροφίμων και χρησιμοποιούνται ευρέως σε βρεφικά σκευάσματα, ως γλυκαντικά σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής, καθώς και σε προϊόντα αρτοποιίας και ποτά.

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες αποτελούν ενώσεις που προέρχονται από την υδρόλυση της λακτόζης και παράγονται από παράλληλες αντιδράσεις τρανσγαλακτοζύλιωσης. Συντίθενται από μόρια γαλακτόζης και γλυκόζης, εμφανίζοντας παρόμοια δομή με τους ολιγοσακχαρίτες που εντοπίζονται στο μητρικό γάλα. Είναι μη εύπεπτοι και οι πρεβιοτικές τους ιδιότητες τους καθιέρωσαν στην επιστημονική κοινότητα. Μέσα από την αντίδραση τρανσγαλακτοζύλιωσης παράγονται διάφορα ολιγομερή διαφορετικών βαθμών πολυμερισμού. Το τελικό προϊόν που προκύπτει εξαρτάται από το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε, τη συγκέντρωση της λακτόζης και τις συνθήκες αντίδρασης, δηλαδή την τιμή pH του συστήματος και τη θερμοκρασία της ενζυμικής αντίδρασης (Coulter *et al.* 2009).

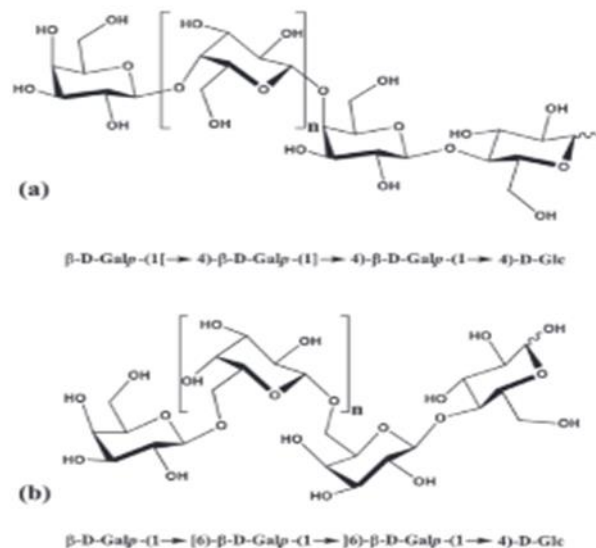
Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες δρουν κυρίως με δύο είδη μηχανισμών, την επιλεκτική ανάπτυξη ευεργετικών βακτηρίων στην περιοχή της εντερικής μικροχλωρίδας και την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας. Λόγω των ευεργετικών τους ιδιοτήτων και την ενίσχυση του οργανισμού, η ζήτησή τους έχει αυξηθεί. Έτσι, τα τελευταία χρόνια ο τομέας των τροφίμων έχει αναθεωρήσει τη στρατηγική του με αποτέλεσμα θέματα που σχετίζονται τους GOS, όπως νομοθεσία, ασφάλεια, σύνθεση, ιδιότητες και σταθερότητα αυτών, να εξελίσσονται ακόμη.

### 3.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ

Η παραγωγή των γαλακτοολιγοσακχαριτών μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους, είτε χρησιμοποιώντας χημικές μεθόδους είτε μέσω ενζυμικών αντιδράσεων. Ο δεύτερος τρόπος αποτελεί και τον ευρέως εφαρμόσιμο στην βιομηχανία, διότι με τη χημική σύνδεση δεν μπορεί να καθοριστεί το τελικό προϊόν.

### 3.2.1 Χημική σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών

Οι ολιγοσακχαρίτες μπορούν να σχηματιστούν χημικά από μονοσακχαρίτες με τη δράση κάποιου ανόργανου οξέος. Η διαδικασία είναι γνωστή ως “αναστροφή” και παρατηρήθηκε κατά την όξινη υδρόλυση της λακτόζης στις αρχές της δεκαετίας του 1950. Μέσω αυτής της χημικής διαδικασίας παρατηρήθηκε ότι σχηματίζεται ένα σύνθετο μείγμα δισακχαριτών και τρισακχαριτών, με συνδέσεις  $\alpha$ - και  $\beta$ -ανωμερών διαμορφώσεων (Εικόνα 3.1), καθώς και άνυδρων σακχάρων. Η μέθοδος της χημικής σύνθεσης πραγματοποιείται σε πολλαπλά στάδια αντιδράσεων προκειμένου να προστατευτούν οι ομάδες υδροξυλίων, αντιδράσεις κατά τις οποίες εκλύονται προς το περιβάλλον διάφορες χημικές ουσίες. Η αδυναμία σύνθεσης ειδικού προϊόντος και οι έντονες συνθήκες που απαιτούνται στη διαδικασία αυτή καταστύουν τη μέθοδο ακατάλληλη για παραγωγή ολιγοσακχαριτών σε μεγάλη κλίμακα (Torres 2010).



**Εικόνα 3.1:** Χημική παραγωγή ολιγοσακχαριτών, (α)  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) δεσμός και (β)  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) δεσμός

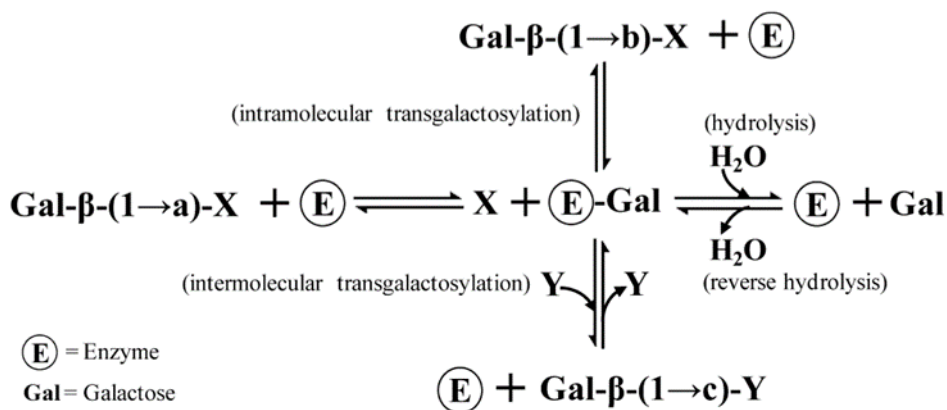
### 3.2.2 Ενζυμική παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών

Τα προβλήματα της χημικής σύνθεσης γαλακτοολιγοσακχαριτών ξεπερνιούνται με τη χρήση ενζύμων για την παραγωγή GOS. Η τεχνική της ενζυμικής αντίδρασης αποτελεί μία εφικτή και οικονομική διεργασία χωρίς να εμφανίζει αντίκτυπο στο περιβάλλον. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι γλυκοζυλοτρανσφεράσες και γλυκοζιτικές υδρολάσες. Οι δεύτερες χρησιμοποιούνται περισσότερο από την βιομηχανία λόγω της εμπορικής τους διαθεσιμότητας και της χαμηλότερης τιμής τους.

Η ενζυμική αντίδραση σύνθεσης γαλακτοολιγοσακχαριτών πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, το οποίο είναι μη αναστρέψιμο, σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο προϊόν γαλακτοζυλομάδας-ενζύμου. Στο στάδιο αυτό

απελευθερώνεται μία ομάδα γλυκόζης που υπάρχει πλέον ελεύθερη στο διάλυμα. Το ομοιοπολικό ενδιάμεσο προϊόν, στη συνέχεια, υδρολύεται πάλι με αναστροφή μέσω ενός καταλυτικού μηχανισμού οξέος-βάσης. Στο δεύτερο στάδιο το μόριο της γαλακτόζης μεταφέρεται σε ένα νουκλεόφιλο, πιθανότερα σάκχαρο αντί για νερό, προκειμένου να παραχθεί ένας ολιγοσακχαρίτης. Ο παραπάνω μηχανισμός περιγράφεται και σχηματικά στην Εικόνα 3.2.

Συνεπώς, η μετατροπή της λακτόζης σε GOS από β-γαλακτοζιδάσες αποτελεί μία κινητικά ελεγχόμενη αντίδραση που ανταγωνίζονται η υδρόλυση και η τρανσγαλακτοζυλίωση. Κατά τη διάρκεια αυτής της μετατροπής, η θερμοδυναμική ευνοούμενη υδρόλυση της λακτόζης σε D-γαλακτόζη και D-γλυκόζη ανταγωνίζεται την δραστηριότητα της τρανσφεράσης που παράγει ένα σύνθετο μείγμα ολιγοσακχαριτών. Επομένως, είναι αναγκαία η γνώση της χρονικής πορείας της μετατροπής της λακτόζης προκειμένου να προσδιοριστεί το σημείο μέγιστης απόδοσης GOS. Η τρανσγαλακτοζυλίωση περιλαμβάνει τόσο τις ενδομοριακές όσο και τις διαμοριακές αντιδράσεις. Κατά την ενδομοριακή μεταφορά της γαλακτόζης αποδίδονται τα ισομερή της λακτόζης, ενώ κατά την διαμοριακή τρανσγαλακτοζυλίωση σχηματίζονται οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Torres et al. 2010).



**Εικόνα 3.2:** Αντιδράσεις υδρόλυσης της λακτόζης και τρανσγαλακτοζυλίωσης με χρήση ενζύμου (Torres et al. 2010)

Η προέλευση του ενζύμου προσδιορίζει την ικανότητα και την προτίμηση του κατά την αντίδραση της τρανσγαλακτοζυλίωσης, δηλαδή τη σύνδεση της γαλακτόζης με κάποιο άλλο σάκχαρο. Τέλος, η αρχική συγκέντρωση της λακτόζης αυξάνει την πιθανότητα το μόριο αποδέκτη να είναι η λακτόζη και όχι το νερό, κάτι που θα οδηγούσε στην υδρόλυση. Κάποιες φορές, ωστόσο, οι GOS που έχουν ήδη σχηματιστεί δρουν ως υπόστρωμα και υδρολύονται πάλι κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Ακόμη, η θερμοκρασία και η τιμή pH του συστήματος θα πρέπει να βρίσκονται σε ένα εύρος τιμών, όπου το ένζυμο δρα και είναι επαρκώς σταθερό (Fischer & Kleinschmidt 2018). Η θερμοκρασία επηρεάζει τόσο τη σταθερότητα του ενζύμου όσο και τη διαλυτότητα της λακτόζης, με

αποτέλεσμα να επηρεάζεται και η ταχύτητα της αντίδρασης. Γενικά ισχύει ότι με αύξηση της θερμοκρασίας ευνοείται και αυξάνεται η παραγωγή των γαλακτοολιγοσακχαριτών, αφού υπάρχει μεγαλύτερη διαλυτότητα της λακτόζης και αύξηση του ρυθμού της αντίδρασης. Ωστόσο, η αύξηση της θερμοκρασίας θα πρέπει να μην αδρανοποιεί και συνεπώς καταστέλλει την δράση του ενζύμου. Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται οι βέλτιστες συνθήκες μερικών ενζύμων που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανική παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών.

Σχετικά με το σχεδιασμό της διεργασίας, στη βιομηχανία έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο αντιδραστήρες διαλείποντος έργου όσο και συνεχούς. Στους αντιδραστήρες διαλείποντος έργου η αντίδραση ολοκληρώνεται με θέρμανση, προκειμένου να αδρανοποιηθεί το ένζυμο μετά το επιθυμητό χρόνο αντίδρασης. Σε αυτόν τον τύπο αντιδραστήρα έχει παρατηρηθεί αναστολή της παραγωγής των GOS από τους μονοσακχαρίτες, τη γαλακτόζη και τη γλυκόζη. Αντιθέτως, στους αντιδραστήρες συνεχούς έργου μείγμα γλυκόζης και γαλακτόζης διαχωρίζεται συνεχώς από το μέσο με αποτέλεσμα να εμποδίζεται λιγότερο η παραγωγή των GOS. Ωστόσο, κατά τον σχεδιασμό των βιοαντιδραστήρων συνεχούς έργου θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος παραμονής, ο ρυθμός ροής της τροφοδοσίας και ο ρυθμός συλλογής του διηθήματος (Panesar 2018).

### 3.2.2.1 Παραγωγή GOS με χρήση ολόκληρων κυττάρων

Η χρήση ολόκληρων κυττάρων στις βιομηχανικές αντιδράσεις παραγωγής GOS πλεονεκτεί ως προς την εύκολη διαθεσιμότητά τους, το χαμηλό κόστος τους και τη σταθερότητά τους. Με την τεχνική αυτή μπορεί να ξεπεραστεί το εμπόδιο του καθαρισμού των ενζύμων. Φυσικά, λόγω της χαμηλής διαπερατότητας του κυτταρικού περιβλήματος από το υπόστρωμα, και συγκεκριμένα από τη λακτόζη, παρατηρούνται χαμηλοί ρυθμοί αντίδρασης. Έχουν δοκιμαστεί ολόκληρα κύτταρα από τους *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus plantarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri* και *Pseudozyma tsukubaensis* (Panesar 2018, Fischer & Kleinschmidt 2018).

### 3.2.2.2 Παραγωγή GOS με χρήση ελεύθερης β-γαλακτοζιδάσης

Οι συνηθέστεροι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως πηγή β-γαλακτοζιδάσης είναι οι *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* και *Kluyveromyces fragilis*. Το είδος των συντιθέμενων γαλακτοολιγοσακχαριτών εξαρτάται από τον μικροοργανισμό που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή β-γαλακτοζιδάσης. Έχει παρατηρηθεί παραγωγή τετρασακχαριτών και πεντασακχαριτών με χρήση του *B. circulans*, ενώ με τη χρήση *A. oryzae* και *Kluyveromyces* spp. παράγονται κυρίως τρισακχαρίτες και σε μικρότερο ποσοστό τετρασακχαρίτες (Panesar 2018, Fischer & Kleinschmidt 2018).

**Πίνακας 3.1: Χαρακτηριστικές ιδιότητες ενζύμων (Park & Oh 2010)**

Είδος Ενζύμου	Ένζυμο - πηγή	Θερμοκρασία (°C)	pH	Χρόνος ημιζωής (min)	Ενεργότητα (U·mg <sup>-1</sup> )
<b>Ψυχρόφιλα</b>	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	10	8,0	60 (30°C)	20
	<i>Aspergillus aculeatus</i>	55-60	5,4	–	24
	<i>Aspergillus oryzae</i>	30	4,8	10 (70°C)	40
	<i>Bacillus circulans</i>	50	5,0-6,0	–	5,1
	<i>Bacillus megaterium</i>	40	6,0-9,0	–	60
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	50	6,0	10 (50°C)	526
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	37	6,5	240 (45°C)	–
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	50-60	7,5	120 (60°C)	569
	<i>Bullera singularis</i>	50	5,0	120 (45°C)	56
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	58	4,3	10 (58°C)	12
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	37-40	7,5-8,0	–	–
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	30	6,5	300 (40°C)	–
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	37-40	6,6-7,0	–	–
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	55	6,5-8,0	2.880 (37°C)	230
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	50	6,0-8,0	–	180
<b>Μεσόφιλα</b>	<i>Sporobolomyces singularis</i>	30	4,0	–	8,7
	<i>Sterigmatomyces el.viae</i>	85	4,5-5,0	60 (80°C)	20
	<i>Streptococcus pneumonia</i>	30	5,5-7,5	–	–
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70	7,0	540 (70°C)	125
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	65	6,5	–	0,5
	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	60	6,5-7,2	240 (60°C)	–
	<i>Thermus spp.</i>	70	6,5	1.200 (70°C)	–
	<i>Thermus aquaticus</i>	80	5,5	–	5,7
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	75	6,5	180 (85°C)	116
	<i>Thermotoga maritima</i>	80-85	6,5	16 (90°C)	70
<b>Υπερθερμόφιλα</b>					

### 3.2.2.3 Παραγωγή GOS με χρήση ακινητοποιημένης β-γαλακτοζιδάσης

Η ακινητοποίηση του ενζύμου έχει φέρει νέα δεδομένα στο πεδίο της έρευνας αφού παρέχει τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του ενζύμου, και το ένζυμο είναι αρκετά σταθερό, χαρακτηριστικά που κάνουν τη συγκεκριμένη τεχνική να πλεονεκτεί των άλλων τεχνικών και να συμβάλλει στη μείωση του κόστους της διεργασίας. Με αυτή την τεχνική, επιτρέπεται η συνεχής παραγωγή GOS βελτιώνοντας την καθαρότητα, την ποιότητα και την ποσότητα του τελικού προϊόντος. Η ακινητοποίηση του ενζύμου επιτυγχάνεται με προσρόφηση, εγκλεισμό, ομοιοπολική δέσμευση ή διασταυρωμένη σύνδεση, με τις δύο πρώτες τεχνικές να είναι οι πιο διαδεδομένες (Panesar 2018, Fischer & Kleinschmidt 2018).

#### Προσρόφηση

Η προσρόφηση αποτελεί μία απλή τεχνική ακινητοποίησης ενζύμων μεγιστοποιώντας την απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης με ευκολία και χαμηλό κόστος. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε κατά την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών σε αντιδραστήρα συνεχούς έργου ενισχυμένο με βαμβακερό ύφασμα χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένη β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae*. Παρατηρήθηκε 20% μετατροπή της λακτόζης σε τρισακχαρίτες, και σε μικρότερη συγκέντρωση συντέθηκαν και τετρασακχαρίτες, πεντασακχαρίτες και εξασακχαρίτες. Το βαμβακερό ύφασμα εμφανίζει μεγάλο πορώδες, υψηλή μηχανική αντοχή και χαμηλή πίεση με αποτέλεσμα να μεγιστοποιεί την απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης.

#### Εγκλεισμός

Ο εγκλεισμός έχει μελετηθεί στην ακινητοποίηση της β-γαλακτοζιδάσης σε διαφορετικές μήτρες, όπως μήτρα sol-gel, καψάκια πολυβινυλικής αλκοόλης (PVA). Η απόδοση σε μήτρα PVA παρατηρήθηκε ίση με  $344 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , με τρισακχαρίτες και τετρασακχαρίτες να είναι τα κύρια προϊόντα της αντίδρασης.

### 3.2.2.4 Παραγωγή GOS με χρήση άλλων ενζύμων

Έχει γίνει προσπάθεια να μελετηθεί η απόδοση της τρανσγαλακτοζυλίωσης με χρήση άλλων ενζύμων, όπως της β-γλυκοζιδάσης από διάφορους μικροοργανισμούς.

## 3.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ

Κατά την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών παράγεται μείγμα ολιγοσακχαριτών. Η ανάλυση των σύνθετων αυτών μειγμάτων αποτέλεσε πρόκληση στον τομέα της αναλυτικής χημείας. Λόγω της φύσης τους και τα χαρακτηριστικά σύνθεσής τους, τα μείγματα των ολιγοσακχαριτών μπορεί να περιέχουν εκατοντάδες μεμονωμένες ενώσεις μαζί με τα ισομερή τους. Οι ενώσεις

αυτές μπορούν να διαφέρουν ως προς τον τύπο, τον αριθμό και τη σειρά των μονομερών στην αλυσίδα καθώς και τη σύνδεσή τους. Η επιλογή της τεχνικής ανάλυσης εξαρτάται από το βαθμό λεπτομέρειας που επιζητείται, τον τύπο του ολιγοσακχαρίτη που αναλύεται και τη διαθεσιμότητά του. Κάποιες από τις αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζονται σήμερα είναι Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους (Size Exclusion Chromatography, SEC), Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD), Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Ανιχνευτή Μάζας (High Performance Anion Exchange Chromatography with Mass Spectroetry, HPAEC-MS), Υγρή Χρωματογραφία Υδρόφιλης Αλληλεπίδρασης (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) και Ανάλυση Μεθυλίωσης (Methylation Analysis) (Coulter 2009, Hernandez – Hernandez 2011).

### 3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ

Κατά την παραγωγή των γαλακτοολιγοσακχαριτών το τελικό προϊόν που παραλαμβάνεται δεν είναι καθαρό. Στο προϊόν υπάρχουν οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες που συντέθηκαν, μείγμα γαλακτόζης και γλυκόζης, δισακχαρίτες που παράγονται από την υδρόλυση της λακτόζης, καθώς και ποσότητα λακτόζης που δεν υδρολήθηκε. Επομένως, κρίνεται αναγκαία η απομόνωση των GOS πριν ενταχθούν σε κάποιο τρόφιμο. Διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια και αναλύονται ακολούθως, ενώ η αποτελεσματικότητά τους κρίνεται από την απόδοσή τους, την ευκολία στο χειρισμό καθώς και το κόστος τους (Panesar 2018).

#### 3.4.1 Επεξεργασία ενεργού άνθρακα

Κατά την μέθοδο αυτή το μείγμα μεταφέρεται σε στήλη ενεργού άνθρακα, η οποία έχει εξισορροπηθεί με νερό. Η στήλη ξεκινά να διαρρέεται από αιθανόλη, η ροή της οποίας αυξάνεται κλιμακωτά. Τα σάκχαρα, αρχικά, προσροφούνται στον ενεργό άνθρακα και στη συνέχεια εκλύονται με την αιθανόλη. Ο διαχωρισμός εξαρτάται από τον ρυθμό έκλυσης της αιθανόλης.

#### 3.4.2 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

Εμπορικά διαθέσιμοι GOS διαχωρίζονται με χρήση στήλης Bio-Gel P-2 και ανιχνευτή RI-72. Μπορεί να επιτευχθεί διαχωρισμός μονοσακχαριτών έως και οκτασακχαριτών με βαθμό ανάκτησης έως 92%. Η στήλη αυτή επιτρέπει τον διαχωρισμό ενώσεων που έχουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 100-1800 Da.



### 3.4.3 Νανοδιήθηση

Η τεχνική της νανοδιήθησης βασίζεται στη χρήση διαφόρων μεμβρανών όξινης κυτταρίνης, όπως η CA-77,5 και η CA-80. Ο συνδυασμός της τεχνικής αυτής με την τεχνολογία της υπερδιήθησης ενισχύει την απόδοση του διαχωρισμού των γαλακτοολιγοσακχαριτών από το υπόλοιπο μείγμα, εφαρμόζοντας τις κατάλληλες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Η τεχνική εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης, το ιξώδες του διαλύματος, παράμετροι οι οποίες έχουν μεγάλη επίδραση στην καθαρότητα και την απόδοση των απομονωμένων γαλακτοολιγοσακχαριτών.

### 3.4.4 Χρωματογραφία προσομοιωμένης κινητής φάσης

Με τη χρήση της χρωματογραφίας προσομοιωμένης κινητής φάσης έχουν διαχωριστεί διαφορετικά κλάσματα γαλακτοολιγοσακχαριτών. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αντίθετη ροή της κινητής και στατικής φάσης. Από τη ροή αυτή εξαρτάται και η απόδοση του διαχωρισμού των GOS από τη γαλακτόζη, τη γλυκόζη και τη μη υδρολυμένη λακτόζη. Η απόδοση αυτή μπορεί να φτάσει μέχρι και το 98%. Με την τεχνική αυτή εξοπλισμένη με οκτώ στήλες Na (250x20 mm) συνδεδεμένες σε σειρά και σε θερμοκρασία των 60°C έχει παρατηρηθεί η μέγιστη απόδοση διαχωρισμού.

### 3.4.5 Χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων

Οι ρητίνες κατιόντων χρησιμοποιούνται συχνά για τον διαχωρισμό υδατανθράκων, όπως οι ολιγοσακχαρίτες, οι εξόζες και οι πεντόζες. Η τεχνική αυτή έχει δώσει αποδόσεις μεγαλύτερες από 90%, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί διανομέας κατιόντων Diaion UBK 530, με νερό ως μέσον έκλουσης και ακετόνη ή δεξτράνη ως διαλυτή ανιχνευτής σε θερμοκρασία 30°C καθώς και εναλλάκτης κατιόντων Dowex 50WX4-400 σε θερμοκρασία 25°C.

### 3.4.6 Εκχύλιση στερεάς φάσης με χρήση υπερκρίσιμου υγρού

Έχει επιτευχθεί διαχωρισμός γαλακτοολιγοσακχαριτών από τα υπόλοιπα σάκχαρα εφαρμόζοντας την τεχνολογία υπερκρίσιμου υγρού με ποσοστό ανάκτησης έως 94%. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν είναι συνεχής ροή διοξειδίου του άνθρακα και χρήση διαλυτών αιθανόλης και νερού. Η τεχνολογία αυτή έχει πολλές δυνατότητες να αξιοποιηθεί στον διαχωρισμό των GOS με βάση τον βαθμό πολυμερισμού.



### 3.4.7 Μικροβιακή ζύμωση

Ο διαχωρισμός των GOS από το μείγμα σακχάρων έχει επιτευχθεί και με την τεχνική της μικροβιακής ζύμωσης με απομάκρυνση των μονοσακχαριτών και δισακχαριτών. Έχει γίνει χρήση των ενζύμων *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* και *Lactobacillus helveticus*.

## 3.5 ΤΑ ΟΦΕΛΗ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ

Οι τομείς των τροφίμων και της υγείας είναι άρρηκτα συνδεδεμένοι. Ένα τρόφιμο μπορεί να θεωρηθεί λειτουργικό εάν έχει αποδεδειγμένη ευεργετική δράση σε μία ή περισσότερες φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού, προσφέρει την απαραίτητη θρεπτική αξία και συμβάλλει στην βελτίωση και ενίσχυση της υγείας του ανθρώπου. Με βάση τον ορισμό αυτό, οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες αποτελούν μια νέα κατηγορία λειτουργικών συστατικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μία μεγάλη ποικιλία τροφίμων.

Τα προϊόντα που προορίζονται για βρέφη και παιδιά αποτελούν τα κυριότερα τρόφιμα που παράγονται με χρήση GOS στην βιομηχανία των τροφίμων. Ο σημαντικότερος λόγος, που συντέλεσε στην ένταξη των GOS στα βρεφικά και παιδικά τρόφιμα, είναι η δομική και λειτουργική ομοιότητα αυτών με τους ολιγοσακχαρίτες που βρίσκονται φυσικά στο μητρικό γάλα. Οι ολιγοσακχαρίτες του μητρικού γάλακτος έχουν μια μοναδική και πολύπλοκη δομή υδατανθράκων. Το μητρικό γάλα περιέχει περισσότερα από 200 διαφορετικά είδη ολιγοσακχαριτών που αποτελούνται από πέντε κύριες δομικές μονάδες, τη γαλακτόζη, τη γλυκόζη, τη φουκόζη, το σιαλικό οξύ και την N-ακετυλογλυκοζαμίνη (Bode & Jantscher-Kren 2012). Ο ρόλος τους είναι να θρέφουν επιλεκτικά και να διεγείρουν την ανάπτυξη των καλών βακτηρίων του γαστρεντερικού συστήματος, να αποτρέπουν την προσκόλληση παθογόνων μικροοργανισμών στην επιφάνεια του εντερικού βλεννογόνου και να ενισχύουν το αναπτυσσόμενο ανοσοποιητικό σύστημα των βρεφών με στόχο την αντιμετώπιση μολύνσεων.

Οι βιομηχανικά παραγόμενοι GOS περιέχουν δύο από τις δομικές μονάδες των μητρικών GOS, τη γαλακτόζη και τη γλυκόζη, εμφανίζοντας, έτσι, παρόμοια δομή με αποτέλεσμα να δρουν όπως οι ολιγοσακχαρίτες του μητρικού γάλακτος. Πέρα από την πρόληψη και την αντιμετώπιση γαστρεντερικών διαταραχών από παθογόνα μικρόβια, τοξίνες και λοιμώξεις, συμβάλλουν επιπλέον στην πρόληψη αλλεργιών στα βρέφη. Ακόμη, βοηθούν στην απορρόφηση του ασβεστίου. Γεγονός αποτελεί ότι τα βρέφη απορροφούν έως και το 75% του ασβεστίου από το ανθρώπινο γάλα, κάτι που δεν παρατηρείται στα υπόλοιπα γάλατα, αφού το ποσοστό απορρόφησης δεν είναι ούτε το μισό (Leusen et al. 2014). Το ασβέστιο είναι ένα μέταλλο απαραίτητο για τα οστά και τη σωστή λειτουργία του εγκεφάλου, της καρδιάς και των μυών. Τέλος, έχει παρατηρηθεί μείωση της

χοληστερόλης στο αίμα και μείωση της συχνότητας εμφάνισης ορισμένων τύπου καρκίνου.

Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες χρησιμοποιούνται ευρέως σε τυποποιημένους και πρώιμους τύπους παρασκευασμάτων (γάλατα) για βρέφη, παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας (γάλατα, κρέμες, γιαούρτια) και άλλα είδη τροφίμων για ενήλικες. Χαρακτηρίζονται ως πρεβιοτικά, διότι προάγουν την ανάπτυξη ωφέλιμων βακτηρίων στο έντερο. Χρησιμοποιούνται παγκοσμίως όπως στις Ευρωπαϊκές χώρες, στις ΗΠΑ, στη Νότια Κορέα, στην Κίνα, στη Μαλαισία, στην Ινδία, στο Μεξικό και στην Αυστραλία. Φυσικά, σε κάθε χώρα τηρούνται και τα αντίστοιχα νομοθετικά πλαίσια.

### 3.6 ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΔΙΑΘΕΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ

Αν και στο παρελθόν, οι ολιγοσακχαρίτες δεν ήταν ευρέως διαδεδομένοι, σήμερα λόγω των ερευνών και των μελετών γύρω από αυτούς αυτό έχει αλλάξει καταστρώντας τους ένα χρυσό συστατικό. Η ένταξή τους σε πολλά τρόφιμα και η αυξημένη ζήτησή τους από τους καταναλωτές έχουν οδηγήσει τις βιομηχανίες στην αύξηση της παραγωγής τους. Η ετήσια παγκόσμια παραγωγή των GOS στα μέσα της δεκαετίας του '90 εκτιμάται στους 12-14 ktn, ενώ το 2009 είχε αυξηθεί στις 21 ktn (*Panesar 2018*). Οι ιαπωνικές εταιρείες διατηρούν τον κυρίαρχο ρόλο στην παγκόσμια παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών, ενώ η Ευρώπη είχε το μεγαλύτερο μερίδιο της αγοράς το 2015 σύμφωνα με την Grand View Research Inc των ΗΠΑ. Εταιρείες, συνεχώς, λανσάρουν νέα προϊόντα στην αγορά με ενσωματωμένους γαλακτοολιγοσακχαρίτες, όπως το γιαούρτι, η ζάχαρη, το γάλα, ενώ οι βρεφικές κρέμες και τα βρεφικά γάλατα συνεχίζουν να αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των προϊόντων. Έτσι, η μεγάλη ζήτηση από τους ανθρώπους για προϊόντα πλούσια σε GOS οδηγεί τις εταιρείες τροφίμων σε ανάπτυξη νέων τροφίμων και αύξηση παραγωγής των ήδη υπάρχοντων προϊόντων με GOS, που με τη δικιά τους σειρά απαιτούν αυξημένη παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών από τις εταιρείες παραγωγής. Για τα περισσότερα από τα προϊόντα GOS που παράγονται παγκοσμίως, χρησιμοποιούνται διαδικασίες κατά παρτίδες με ποσοστό απόδοσης 30-77%, που αντιστοιχεί σε μετατροπή της λακτόζης σε ποσοστό από 45-95%. Σε αυτές τις διεργασίες, είτε χρησιμοποιούνται ένζυμα που εξάγονται από μικροβιακά κύτταρα μικροοργανισμών, που καλλιεργούνται σε μέσα που εμπεριέχουν λακτόζη, είτε κύτταρα ηρεμίας ενός μικροοργανισμού που χρησιμοποιεί γαλακτόζη και δρα ως λεγόμενος ενζυμικός σάκος. Στον Πίνακα 3.2 αναφέρονται μερικές από τις μεγαλύτερες εταιρείες παραγωγής GOS παγκοσμίως (*Leusen 2014*).

Πίνακας 3.2: Εμπορικά διαθέσιμοι γαλακτοολιγοσακχαρίτες

Εταιρεία	Εμπορικό όνομα GOS	Συγκέντρωση GOS (%)	Πηγή ενζύμου
<b>Nissin Sugar Co, Ιαπωνία</b>	Cup-Oligo	70	<i>Crypcoccus laurentii</i>
<b>Yakult Honsha Co, Ιαπωνία</b>	Oligomate 55	55	<i>Sporobolomyces singularisand, Kluyveromyces lactis</i>
<b>Clasado Biosciences, Ηνωμένο Βασίλειο</b>	Bimuno	50	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<b>Corn Products Int, Κορέα</b>	Purimune	90	<i>Bacillus circulans</i>
<b>New Francisco Biotechnology Corporation, Κίνα</b>	KingPrebiotics series:		
	GOS570-S	57	<i>Bacillus circulans</i>
	GOS700-S	70	
	GOS900-S	90	
<b>Friesland Campina Domo, Ολλανδία</b>	Vivinel. GOS	60	<i>Bacillus circulans</i>
<b>FirstMilk, Ηνωμένο Βασίλειο</b>	Promovita GOS	35	<i>Aspergillus oryzae</i>
<b>Ingredient, Κορέα</b>	Bioligo GL 5700 IMF	57	



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ – ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ

---

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η αξιοποίηση του τυρογάλακτος ως υπόστρωμα για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών. Το τυρόγαλο αποτελεί σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα, καθώς παράγεται σε μεγάλη ποσότητα από τις τυροκομικές μονάδες. Γεγονός αποτελεί ότι από την αρχική ποσότητα γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τυριού το 85-90% στο τέλος αποτελεί το τυρόγαλο. Η περιεκτικότητα σε λακτόζη καθιστά το τυρόγαλο ιδανικό υπόστρωμα για να παραχθούν βιομηχανικά GOS. Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες παρουσιάζουν αυξημένη ζήτηση από τους καταναλωτές λόγω των πρεβιοτικών τους ιδιοτήτων. Η ανάγκη του ανθρώπου να τρέφεται σωστά οδήγησε τις εταιρείες τροφίμων να αναπτύξουν νέες στρατηγικές και να λανσάρουν νέα προϊόντα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, όπως είναι και οι GOS. Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη της έρευνας ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του '90 με αρκετές μελέτες να έχουν δημοσιευτεί.

Οι Palai, Mitra και Bhattacharya (2012) μελέτησαν την κινητική σχέση της μετατροπής της λακτόζης σε GOS χρησιμοποιώντας ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης εμπορικής προέλευσης. Χρησιμοποιήθηκε β-γαλακτοζιδάση από *Bacillus circulans* (Biolacta FN5). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες ελευθέρων ενζύμων, αρχική περιεκτικότητα λακτόζης εύρους 55-525 g/L, ενζυμική συγκέντρωση από 0,05-1,575 g/L, θερμοκρασία από 30-50 °C και τιμή pH από 5-6. Η μέγιστη σύνθεση GOS επιτεύχθηκε για συγκέντρωση ενζύμου 525 g/L στους 50°C και σε τιμή pH ίση με 5, μετατρέποντας το 60% της αρχικής λακτόζης. Συντέθηκαν τρισακχαρίτες, τετρασακχαρίτες και πεντασακχαρίτες σε ποσοστό 24%, 12% και 3%, αντίστοιχα.

Οι Fischer και Kleinschmidt (2015) μελέτησαν τη σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών χρησιμοποιώντας γλυκό και όξινο ορό ως υπόστρωμα. Χρησιμοποιώντας ως πηγή β-γαλακτοζιδάσης τον *Aspergillus oryzae* σε αρχική συγκέντρωση λακτόζης 38 g/L προέκυψε απόδοση 10,9% σε υπόστρωμα διαλύματος λακτόζης, 10,9% σε γλυκού ορού και 11,4% σε όξινο ορό. Με τον μύκητα αυτό δεν φαίνεται η προέλευση του υποστρώματος να επιδρά στη σύνθεση των GOS, αντίθετα χρησιμοποιώντας *Kluyveromyces lactis* ως πηγή ενζύμου τα αποτελέσματα ήταν απόδοση 10,9% σε διάλυμα λακτόζης, 4,3% στον γλυκό ορό και 10,6% στον όξινο ορό με αρχική συγκέντρωση λακτόζης πάλι 38 g/L. Για τον γλυκό ορό, η απόδοση ήταν περίπου 2,5 φορές μικρότερη. Αυτό οφείλεται στην ευαισθησία του *Kluyveromyces lactis* στην περιεκτικότητα του ορού σε κατιόντα και άλατα.

Οι Santibanez, Fernandez-Arrojo, Guerrero, Plou και Illanes (2016) μελέτησαν την απομάκρυνση της λακτόζης από ακατέργαστους γαλακτοολιγοσακχαρίτες με χρήση β-γαλακτοζιδάση από *Kluyveromyces lactis*. Για το σκοπό της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές εμπορικά διαθέσιμες β-γαλακτοζιδάσες από *Kluyveromyces lactis*. Η λακτάση NL επιλέχθηκε ως το καλύτερο ένζυμο με υδρολυτική ικανότητα ίση με 286 IU/mg και χρόνο ημιζωής 9 h στους 35°C παρουσία 1 mM Mn<sup>2+</sup>. Σε συνθήκες υδρόλυσης 35°C, 50% αρχική συγκέντρωση σακχάρων και 135 IU/mg, η λακτόζη μειώθηκε κατά 70% στους ακατέργαστους GOS αυξάνοντας την περιεκτικότητα των μονοσακχαριτών και των GOS κατά 48% και 30%, αντίστοιχα.

Οι Fischer και Kleinschmidt (2018) μελέτησαν τη χρήση δύο ενζύμων της β-γαλακτοζιδάσης για την σύνθεση GOS. Χρησιμοποιήθηκαν συνδυασμοί ενζύμων από *Cryptococcus laurenti* με *Aspergillus oryzae* και *Aspergillus oryzae* με *Kluyveromyces lactis*, με στόχο να μελετηθεί η επίδραση της προέλευσης των ενζύμων στην απόδοση και σύνθεση των γαλακτοολιγοσακχαριτών. Μελετήθηκαν η συνεχής και η ταυτόχρονη σύνθεση των GOS με *Cryptococcus laurenti* με *Aspergillus oryzae*, όπου δεν οδήγησε σε ιδιαίτερη αύξηση της απόδοσης των GOS, αλλά λόγω της διαφορετικής εκλεκτικότητας των δύο ενζύμων στη δημιουργία του γλυκοζιτικού δεσμού παρατηρήθηκε ποικιλία των τελικών προϊόντων-γαλακτοολιγοσακχαριτών. Η χρήση συνδυαστικά των ενζύμων β-γαλακτοζιδάση από *Aspergillus oryzae* με *Kluyveromyces lactis* οδήγησε σε αύξηση της συνολικής απόδοσης κατά 9% περίπου σχηματίζοντας κυρίως δισακχαρίτες. Συνεπώς, η αύξηση της απόδοσης είναι εφικτό να αυξηθεί μειώνοντας και την περιεκτικότητα της λακτόζης που απομένει στο υπόστρωμα, ενώ ενδιαφέρον εμφανίζει η ποικιλία των γαλακτοολιγοσακχαριτών που συντίθενται εάν στην αντίδραση χρησιμοποιηθούν παραπάνω του ενός ενζύμου από διαφορετικούς μικροοργανισμούς.

Στην παρούσα διπλωματική μελετάται η απόδοση της παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών από τυρόγαλα, με χρήση βιομηχανικά διαθέσιμης β-γαλακτοζιδάσης από το μικροοργανισμό *K. lactis* λαμβάνοντας υπόψη τη θερμοκρασία της αντίδρασης, το ενζυμικό φορτίο και την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός της πρώτης ύλης του τυρογάλακτος, ενώ μελετήθηκε και η απαιτούμενη προεπεξεργασία του τυρογάλακτος, προκειμένου να αποτελέσει κατάλληλο υπόστρωμα για τη μελετώμενη ενζυμική αντίδραση.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

---

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφονται αναλυτικά οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη χημική ανάλυση της σύστασης και τον προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου του τυρογάλακτος, καθώς και η προεπεξεργασία αυτού για τη χρήση του ως υπόστρωμα της ενζυμικής μετατροπής της περιεχόμενης λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Στη συνέχεια, αναλύεται η μέθοδος προσδιορισμού της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης, ο σχεδιασμός των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, καθώς και οι τεχνικές ανάλυσης των δειγμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων. Τέλος, να αναφερθεί ότι χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλα αιγοπρόβειας προέλευσης από τυροκομικές μονάδες της περιφέρειας της Ηπείρου. Το τυρόγαλο ήταν μη επεξεργασμένο και χωρίς λιπαρά. Το ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης που χρησιμοποιείται είναι από τον μικροοργανισμό *K. lactis* με εμπορική ονομασία Biolactase L20 (Kerry, Ιρλανδία). Από την εταιρεία δίνεται ότι το ένζυμο εμφανίζει ελάχιστη δράση 20000 GU/mL.

### 5.1 ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΛΥΚΟΥ ΟΡΟΥ

#### 5.1.1 Προσδιορισμός Στερεού Υπολείμματος & Τέφρας

Για την επαναληψιμότητα των μετρήσεων χρησιμοποιούνται 3 κάψες πορσελάνης. Αρχικά, οι κάψες καθαρίζονται καλά και τοποθετούνται για ξήρανση σε πυριατήριο, το οποίο λειτουργεί στους 102 °C, για 24 h. Στη συνέχεια, οι κάψες μεταφέρονται σε ξηραντήρα, μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί η ζύγισή τους ( $m_{\text{κάψας}}$ ) σε αναλυτικό ζυγό ακρίβειας 4 δεκαδικών ψηφίων του γραμμαρίου. Στη συνέχεια, προστίθενται σε κάθε κάψα περίπου 40 mL δείγματος γλυκού ορού. Οι κάψες ζυγίζονται ξανά και καταγράφεται το τελικό τους βάρος ( $m_{\text{μικτό}}$ ). Οι κάψες με τον γλυκό ορό τοποθετούνται εκ νέου στο πυριατήριο, για 48 h. Ύστερα, οι κάψες μεταφέρονται ξανά σε ξηραντήρα, μέχρι να θερμοστατήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος, και ακολουθεί η ζύγισή τους στον αναλυτικό ζυγό ( $m_{\text{ξηρό}}$ ). Στη συνέχεια, για τον προσδιορισμό της τέφρας οι κάψες με τα ξηρά δείγματα γλυκού ορού τοποθετούνται σε κάμινο, η οποία λειτουργεί στους 550 °C, για 12-16 h. Μετά το πέρας της αποτέφρωσης, οι κάψες μεταφέρονται σε ξηραντήρα και μόλις θερμοστατήσουν, ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό.



**Εικόνα 5.1:** Τέφρα (1) και Στερεό Υπόλειμμα (2) γλυκού ορού

Ο υπολογισμός του στερεού υπολείμματος και της τέφρας γίνεται με εφαρμογή του ακόλουθου τύπου:

$$\% \text{ ολικά στερεά ή τέφρα} = \frac{w_3 - w_1}{w_2 - w_1} * 100$$

Όπου,  $w_1$ , το βάρος της άδειας κάψας πορσελάνης,  $w_2$ , το βάρος της κάψας πορσελάνης και δείγματος, και  $w_3$ , το βάρος της κάψας πορσελάνης και βάρος στερεού υπολείμματος ή τέφρας

### 5.1.2 Προσδιορισμός Θεικών Ιόντων

Για τον προσδιορισμό των θεικών ιόντων ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) στο τυρόγαλα επιλέχθηκε η μέθοδος EPA Method 9038 (United States Environmental Protection Agency). Αρχή της μεθόδου είναι η μετατροπή των θεικών ιόντων σε αιώρημα θεικού βαρίου, υπό κατάλληλες συνθήκες. Η θολότητα που προκύπτει στο εξεταζόμενο δείγμα αναλύεται σε θολωσίμετρο ή φασματοφωτόμετρο. Για να είναι αξιόπιστη η μέθοδος πρέπει η περιεκτικότητα των  $\text{SO}_4^{2-}$  στο δείγμα να μην ξεπερνά τα 40 mg/L.

Για την μέτρηση των  $\text{SO}_4^{2-}$  παρασκευάζεται διάλυμα συντήρησης, όπου σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl) περιεκτικότητας 15% w/v προστίθενται 20 mL ισοπροπανόλης υπό ανάδευση. Ακολουθεί προσθήκη 30 mL πυκνού υδροχλωρίου (HCl) με αργό ρυθμό και 10 mL γλυκερόλης υπό συνεχή ανάδευση, μέχρι την πλήρη διάλυση των συστατικών.

Το δείγμα τυρογάλακτος που θα αναλυθεί πρέπει να είναι όγκου 100 mL και κατάλληλης αραιώσης. Το δείγμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 250 mL που βρίσκεται σε μαγνητικό αναδευτήρα. Γίνεται προσθήκη 5 mL διαλύματος συντήρησης. Καθώς γίνεται η ανάδευση του διαλύματος προστίθενται περίπου



0,5 g κρυστάλλων χλωριούχου βαρίου ( $\text{BaCl}_2$ ). Η ανάδευση συνεχίζεται σε μέση ταχύτητα για ακριβώς 1 min μετά την προσθήκη των κρυστάλλων. Αμέσως μετά την πάροδο του 1 min, 3 mL διαλύματος λαμβάνεται με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας και μεταφέρονται σε κυψελίδα χαλαζία όγκου 3,5 mL. Το δείγμα φασματοφωτομετρείται για χρονικό διάστημα 4 min, με χρήση φασματοφωτομέτρου UV-Vis (Helios Unicam, Γερμανία). Καταγράφεται η μέγιστη απορρόφηση που παρατηρήθηκε στα 410 nm. Η απορρόφηση αυτή μετατρέπεται σε περιεκτικότητα  $\text{SO}_4^{2-}$  με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς, που έχει ήδη κατασκευαστεί με πρότυπα διαλύματα περιεκτικότητας σε  $\text{SO}_4^{2-}$  από 0 mg/L έως 40 mg/L.

### 5.1.3 Προσδιορισμός μετάλλων τυρογάλακτος με Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής με Ιοντικά Συζευγμένο Πλάσμα (ICP-AES)

Δείγματα τυρογάλακτος αραιώθηκαν κατάλληλα (1:500) σε διάλυμα νιτρικού οξέος περιεκτικότητας 5% w/v, σε τελικό όγκο 50 mL. Οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, για λόγους επαναληψιμότητας. Τα αραιωμένα δείγματα διηθήθηκαν με χρήση φίλτρου σύριγγας με πορώδες 0,45  $\mu\text{m}$  και μεταφέρθηκαν σε κωνικά φιαλίδια Falcon® όγκου 50 mL. Κατόπιν, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην είσοδο του συστήματος Φασματομετρίας Ατομικής Εκπομπής με Ιοντικά Συζευγμένο Πλάσμα (Εικόνα 5.2, Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry, Optima Series 7000, Perkin-Elmer, ΗΠΑ), βυθίζοντας τον σωλήνα αναρρόφησης της περισταλτικής αντλίας του συστήματος στο εκάστοτε φιαλίδιο. Μετά τη νεφελοποίηση του δείγματος από το σύστημα ICP-AES, καταγραφόταν ο αριθμός των κτύπων στον ανιχνευτή, για το εκάστοτε μήκος κύματος στο οποίο εκπέμπει το κάθε μέταλλο που αναλύθηκε. Τα μελετώμενα μέταλλα εκπέμπουν στα ακόλουθα μήκη κύματος:  $\text{K}^+ \rightarrow 766,490 \text{ nm}$ ,  $\text{Na}^+ \rightarrow 589,592 \text{ nm}$ ,  $\text{Ca}^{2+} \rightarrow 422,673 \text{ nm}$ ,  $\text{Mg}^{2+} \rightarrow 285,213 \text{ nm}$ . Οι τιμές αυτές μετατράπηκαν σε συγκεντρώσεις κατασκευάζοντας την καμπύλη αναφοράς καθενός μετάλλου, χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ , συγκεντρώσεων 200 – 1000ppb.

Η ICP-AES είναι μία αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση χημικών στοιχείων. Χρησιμοποιεί το επαγωγικώς συζευγμένο πλάσμα για την παραγωγή διεγερμένων ατόμων και ιόντων. Το κάθε στοιχείο εκπέμπει σε μήκη κύματος ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που είναι χαρακτηριστικό αυτού. Το πλάσμα είναι μία πηγή υψηλής θερμοκρασίας ιονισμένου αερίου, ενώ η θερμοκρασία της πηγής κυμαίνεται από 6000 έως 10000 K. Η ένταση των εκπομπών από τα διάφορα μήκη κύματος είναι ανάλογη των συγκεντρώσεων των στοιχείων του δείγματος.



**Εικόνα 5.2:** Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής με Ιοντικά Συζευγμένο Πλάσμα (ICP-AES)

#### 5.1.4 Προσδιορισμός Γαλακτικού Οξέος

Το γαλακτικό οξύ παράγεται από βακτήρια σε ζυμωμένα τρόφιμα. Όπως και ο γλυκός ορός, παραπροϊόν του τυριού, ενός τρόφιμου που παράγεται από ζύμωση βακτηρίων περιέχει γαλακτικό οξύ.

Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα τριχλωριούχου σιδήρου ( $\text{FeCl}_3$ ) περιεκτικότητας 0,2% w/v. Εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 mL μεταφέρονται 0,3333 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  και η φιάλη πληρείται με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί το άλας. Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του γαλακτικού οξέος παρασκευάζεται αρχικά μητρικό διάλυμα περιεκτικότητας 1% w/v σε γαλακτικό οξύ. Εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 mL μεταφέρονται 1,1765 g DL-γαλακτικού οξέος 85% w/v και η φιάλη πληρείται με απιονισμένο νερό. Η φιάλη ανακινείται καλά. Από το μητρικό διάλυμα παρασκευάζονται διαλύματα με περιεκτικότητες 0,1 έως 0,5% w/v σε γαλακτικό οξύ με τις κατάλληλες αραιώσεις. Για καθένα από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα μεταφέρονται εις τριπλούν εντός δοκιμαστικού σωλήνα 2 mL διαλύματος  $\text{FeCl}_3$  και προστίθενται 50  $\mu\text{L}$  πρότυπου διαλύματος γαλακτικού οξέος. Το περιεχόμενο των σωλήνων αναδεύεται έντονα με τη βοήθεια συσκευής Vortex. Καταγράφεται η απορρόφηση του διαλύματος στα 390 nm εντός 15 min από την ανάμειξη, με την βοήθεια φασματοφωτομέτρου UV-Vis (Helios Unicam, German) και κυψελίδας χαλαζία, όγκου 1,75 mL. Τέλος, κατασκευάζεται το διάγραμμα της απορρόφησης σαν συνάρτηση της περιεκτικότητας του γαλακτικού οξέος και προσδιορίζεται η βέλτιστη ευθεία που διέρχεται από τα πειραματικά σημεία.

Για την μέτρηση του γαλακτικού οξέος στο δείγμα γλυκού ορού απαιτείται κατάλληλη αραιώση, ούτως ώστε η περιεκτικότητα γαλακτικού οξέος να ευρίσκεται εντός του εύρους των τιμών για τις οποίες η καμπύλη αναφοράς είναι

γραμμική. Εντός δοκιμαστικού σωλήνα μεταφέρονται 2 mL διαλύματος  $\text{FeCl}_3$  και προστίθενται 50  $\mu\text{L}$  αραιωμένου δείγματος. Το περιεχόμενο των σωλήνων αναδεύεται έντονα με τη βοήθεια συσκευής Vortex. Καταγράφεται η απορρόφηση του διαλύματος στα 390 nm εντός 15 min από την ανάμειξη. Με βάση την καμπύλη αναφοράς υπολογίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε γαλακτικό οξύ. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται εις τριπλούν.

### 5.1.5 Προσδιορισμός Χλωριόντων (Αλατότητας)

Τα ιόντα χλωρίου ( $\text{Cl}^-$ ) ενός διαλύματος μπορούν να προσδιοριστούν με τιτλοδότηση χρησιμοποιώντας διάλυμα  $\text{AgNO}_3$  (Μέθοδος Mohr). Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό λευκού ιζήματος κατά την αντίδραση και δέσμευση των  $\text{Cl}^-$  από τα  $\text{Ag}^+$ . Το τέλος της αντίδρασης γίνεται αντιληπτό με τη βοήθεια δείκτη  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  που αρχικά χρωματίζει το διάλυμα με κίτρινο χρώμα και στο τέλος μεταβάλλεται σε κεραμέρυθρο, σηματοδοτώντας και την ολοκλήρωση της τιτλοδότησης.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης χλωριόντων στον γλυκό ορό, μεταφέρονται 2 mL δείγματος γλυκού ορού σε κωνική φιάλη των 100 mL. Στη συνέχεια, προστίθενται 25 mL απιονισμένου νερού, προκειμένου να αυξηθεί ο όγκος του διαλύματος, και να διευκολυνθεί η ανάδευση και η ανάγνωση του τελικού σημείου. Ακολουθεί προσθήκη 0,5 g  $\text{CaCO}_3$  και 4–5 σταγόνες δείκτη  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . Ακολουθεί τιτλοδότηση με χρήση προχοϊδας των 25 mL και τίτλο διάλυμα  $\text{AgNO}_3$  0,1 N και καταγράφεται ο καταναλωθείς όγκος. Η αναγωγή του καταναλωθέντος για την τιτλοδότηση διαλύματος  $\text{AgNO}_3$  σε συγκέντρωση χλωριόντων γίνεται με χρήση της παρακάτω σχέσης:

$$S = \frac{T * N * 0,05845 * 100}{V}$$

Όπου, S, η αλατότητα, T, ο όγκος του  $\text{AgNO}_3$  που καταναλώθηκε σε mL, N, η κανονικότητα του διαλύματος  $\text{AgNO}_3$ , V, ο όγκος του δείγματος σε mL, 0,05845, παράγοντας μετατροπής σε NaCl που αντιδρά με 1 mL κανονικού  $\text{AgNO}_3$ , 100, παράγοντας μετατροπής αποτελεσμάτων σε % κατά βάρος ή όγκο

### 5.1.6 Προσδιορισμός Πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ενός διαλύματος μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους. Τα κριτήρια για την επιλογή της μεθόδου σε κάθε περίπτωση είναι η διαθέσιμη ποσότητα πρωτεΐνης και η συμβατότητά της με τη μέθοδο, η ευαισθησία και η αξιοπιστία της μεθόδου, η παρουσία ουσιών που μπορεί να δρουν ανασταλτικά στη μέτρηση καθώς και η ευκολία εφαρμογής της μεθόδου. Στην παρούσα διπλωματική εργασία

εφαρμόστηκε η μέθοδος Kjeldhal για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος.

Η μέθοδος Kjeldhal αποτελεί την πιο αξιόπιστη και διαδεδομένη τεχνική για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών στα τρόφιμα. Εκμεταλλευόμενη το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες αποτελούν τα κύρια αζωτούχα συστατικά των τροφίμων προσδιορίζει το συνολικού ποσό αζώτου, θεωρώντας ότι οι μη πρωτεϊνικές ενώσεις του αζώτου στα τρόφιμα βρίσκονται σε χαμηλά ποσοστά. Αρχή της μεθόδου είναι η καύση του δείγματος με περίσσεια πυκνού θειικού οξέος, παρουσία μεταλλικών καταλυτών και αλάτων καλίου ή νατρίου. Το οργανικό δεσμευμένο άζωτο μετατρέπεται σε αμμωνία, η οποία απομακρύνεται με απόσταξη και δεσμεύεται σε περίσσεια διαλύματος θειικού οξέος γνωστής συγκέντρωσης. Ακολουθεί τιτλοδότηση με αλκαλικό διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης. Από την ποσότητα της αμμωνίας υπολογίζεται η εκατοστιαία περιεκτικότητα του δείγματος σε άζωτο που ανάγεται σε εκατοστιαία περιεκτικότητα πρωτεϊνών.

Για τον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών του γλυκού ορού με την μέθοδο Kjeldhal απαιτείται προηγουμένως η ξήρανση του δείγματος, η οποία πραγματοποιήθηκε σε συσκευή λυοφυλίωσης (Freeze Drying Christ / Alpha 1-4DL – Martin Christ, Γερμανία).

Η μέθοδος Kjeldhal αποτελείται από 3 στάδια. Το 1<sup>ο</sup> στάδιο είναι η υγρή πέψη ή χώνευση αζώτου. Χρησιμοποιούνται 4 φιάλες Kjeldhal, όγκου 500 mL. Στις 3 καθαρές και στεγνές φιάλες Kjeldhal τοποθετούνται από 1,5 g ποσότητας ξηρού γλυκού ορού, ενώ στην τέταρτη φιάλη δεν τοποθετείται δείγμα, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως τυφλό. Και στις 4 φιάλες προστίθενται 1 g ένυδρου  $\text{CuSO}_4$ , 10 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  και 25 mL πυκνού  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (95–98 % v/v), με τη βοήθεια σιφωνίου πληρώσεως, καθώς και πυρήνες βρασμού. Έπειτα, οι φιάλες τοποθετούνται στη συσκευή καύσης Kjeldhal (Εικόνα 5.3, Büchi 425 Digestor, Büchi, Ελβετία), όπου αρχικά θερμαίνονται ήπια, μέχρι να αφρίσουν, και στη συνέχεια ακολουθεί έντονος βρασμός, μέχρι το διάλυμα να διαυγάσει. Κατά τον αφρισμό, το διάλυμα αποκτά ένα μαύρο χρώμα που κατά την έντονη θέρμανση εξαφανίζονται τα απανθρακωμένα υπολείμματα και το διάλυμα αποκτά το διαυγές κυανοπράσινο χρώμα. Τέλος, οι φιάλες αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Εικόνες 5.3 & 5.4).



**Εικόνα 5.3:** Συσκευή καύσης Kjeldhal



**Εικόνα 5.4:** Υγρή πέψη ή χώνευση αζώτου

Το 2<sup>ο</sup> στάδιο περιλαμβάνει την απόσταξη της αμμωνίας. Η συσκευή απόσταξης Kjeldhal (Εικόνα 5.5, Büchi K-350, Büchi, Ελβετία) συνδέεται με δεξαμενές για απιονισμένο νερό και διάλυμα NaOH 32% w/w. Η φιάλη Kjeldhal προσαρμόζεται στη συσκευή απόσταξης και στην απόληξη του ψυκτήρα τοποθετείται κωνική φιάλη των 250 mL, η οποία περιέχει 50 mL προτύπου διαλύματος  $H_2SO_4$  0,5 N. Η συσκευή απόσταξης τίθεται σε λειτουργία, όπου στη φιάλη διαβιβάζονται αυτόματα 75 mL απιονισμένου νερού και 125 mL NaOH 32% w/w από τις αντίστοιχες δεξαμενές. Η απόσταξη διαρκεί 5 min και συλλέγεται στην κωνική φιάλη απόσταγμα όγκου 150 mL.



**Εικόνα 5.5:** Συσκευή απόσταξης Kjeldhal

Τέλος, ακολουθεί ο προσδιορισμός της αμμωνίας που αποτελεί και το 3<sup>ο</sup> στάδιο. Σε κάθε κωνική φιάλη προστίθενται 2-3 σταγόνες δείκτη ερυθρό μεθυλίου-μπλε μεθυλενίου και ακολουθεί τιτλοδότηση του υπολειπόμενου θεικού οξέος, χρησιμοποιώντας προχοΐδα των 50 mL και διάλυμα NaOH 0,5 N ως τίτλο. Παρατηρείται μεταβολή του χρώματος από ροζ σε πράσινο. Καταγράφεται ο καταναλωθείς όγκος του NaOH 0,5 N. Η αναγωγή του καταναλωθέντος για την τιτλοδότηση διαλύματος NaOH σε ποσοστό πρωτεϊνών γίνεται με χρήση της παρακάτω σχέσης:

$$\% w/w \text{ πρωτεΐνες} = 6,28 * \frac{1,4007 * (V_1 - V_2) * N}{\beta}$$

Όπου, 6,28, παράγοντας μετατροπής % αζώτου σε % πρωτεϊνών στα τρόφιμα,  $V_1$ , ο καταναλωθέν όγκος πρότυπου διαλύματος NaOH στο διάλυμα δείγματος,  $V_2$ , ο καταναλωθέν όγκος πρότυπου διαλύματος NaOH στο τυφλό διάλυμα, N, η κανονικότητα του πρότυπου διαλύματος NaOH,  $\beta$ , το βάρος του δείγματος

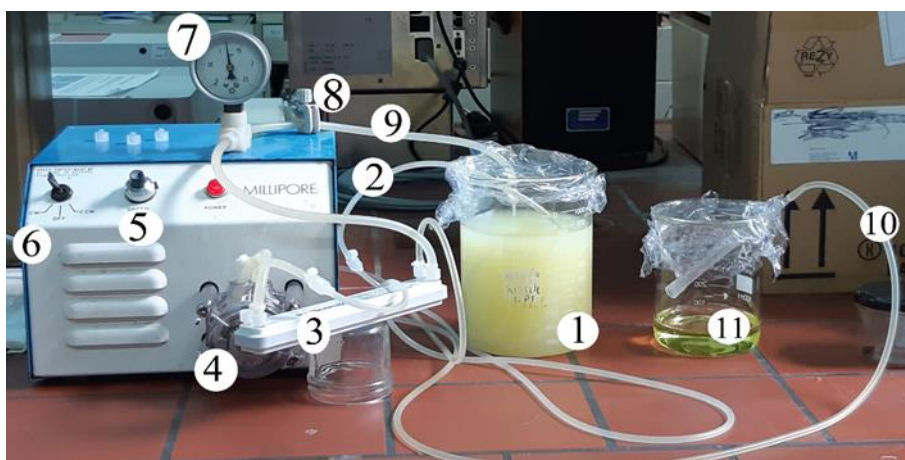
## 5.2 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΛΥΚΟΥ ΟΡΟΥ

Κατά την επώαση γλυκού ορού σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 40 °C παρατηρήθηκε ραγδαία μείωση του pH, το οποίο αρχικά είχε ρυθμιστεί στην τιμή 7. Αυτό αποτέλεσε εμπόδιο στην επικείμενη διεξαγωγή των ενζυμικών αντιδράσεων, διότι η μείωση του pH κατέστρεψε τη δράση του ενζύμου και κατ' επέκταση την ενζυμική αντίδραση. Με μικροβιολογικό έλεγχο προέκυψε ότι η πτώση του pH οφειλόταν στο αρχικό μικροβιακό φορτίο του ορού. Για την αντιμετώπιση και εξάλειψη του μικροβιακού φορτίου δοκιμάστηκε η μέθοδος της υπερδιήθησης.

Υπερδιήθηση ονομάζεται η διαδικασία διαχωρισμού των μεγαλομορίων ενός διαλύματος από τα μικρά μόρια με τη βοήθεια πορώδους μεμβράνης. Οι μεμβράνες υπερδιήθησης δεν επιτρέπουν τη διέλευση σωματιδίων μεγαλύτερων από τη διάμετρο των πόρων της μεμβράνης. Για τον διαχωρισμό απαιτείται η εφαρμογή πίεσης 0,5-5 bar. Στο σύστημα υπάρχουν 3 ρεύματα. Το ρεύμα τροφοδοσίας, που διαβιβάζεται στη μεμβράνη παράλληλα και διαπερνά την μεμβράνη, το ρεύμα συμπυκνώματος που επιστρέφει στο δοχείο της τροφοδοσίας μέχρι τον πλήρη διαχωρισμό και το ρεύμα απομάκρυνσης που συλλέγεται σε ξεχωριστό δοχείο και είναι αυτό που έχει διαχωριστεί πλήρως. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η κασετίνα Pellicon XL50 με μεμβράνη Durapore 0.22  $\mu\text{m}$  C screen 50  $\text{cm}^2$ . Η διάμετρος των πόρων της μεμβράνης είναι 0,22  $\mu\text{m}$ , ενώ στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 5.6) απεικονίζονται με αριθμούς τα επιμέρους τμήματα του συστήματος της υπερδιήθησης:

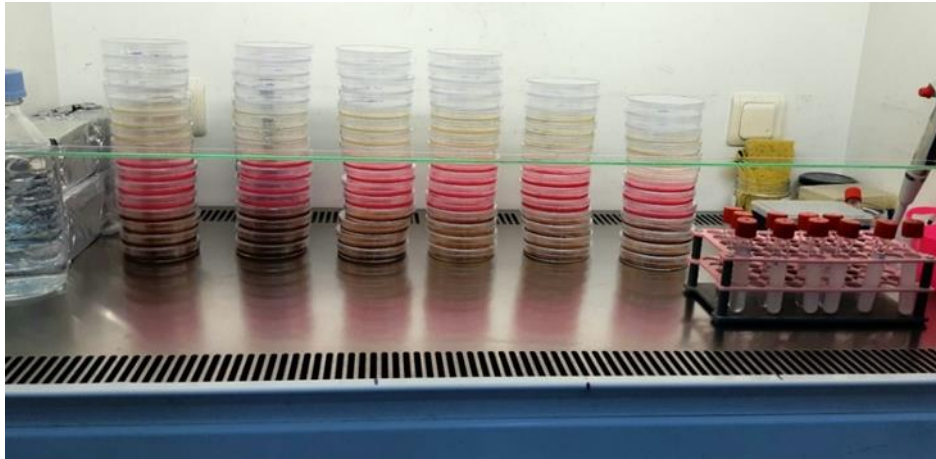


1. Δοχείο τροφοδοσίας με γλυκό ορό
2. Ρεύμα τροφοδοσίας
3. Κασετίνα μεμβράνης με διάμετρο πόρων 0,22  $\mu\text{m}$
4. Περισταλτική αντλία
5. Ρυθμιστής ταχύτητας
6. Διακόπτης έναρξης περιστροφής
7. Μανόμετρο
8. Σφικκτήρας για ρύθμιση πίεσης
9. Ρεύμα ανακύκλωσης
10. Ρεύμα απομάκρυνση διαχωρισμένου ορού
11. Δοχείο συλλογής διαχωρισμένου υγρού



**Εικόνα 5.6:** Διαδικασία υπερδιήθησης γλυκού ορού

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τον μικροβιακό έλεγχο των δειγμάτων ήταν επιφανειακή ανάπτυξη αποικιών σε τρυβλία petri. Για τον προσδιορισμό του ολικού μικροβιακού φορτίου χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA, 1.05463, Merck, Γερμανία) και η καταμέτρηση των τρυβλίων πραγματοποιήθηκε μετά από αερόβια επώαση στους 25 °C για 48-72 h. Για τον προσδιορισμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό De Man, Rogosa & Sharpe Agar (MRS Agar, 1.10660, Merck, Γερμανία) και η καταμέτρηση των τρυβλίων πραγματοποιήθηκε μετά από αναερόβια επώαση στους 37 °C για 72 h, καθώς πρόκειται για αναερόβια, θερμοφιλά βακτήρια. Η δειγματοληψία κάθε φορά γινόταν σε ασηπτικές συνθήκες, εντός θαλάμου νηματικής ροής (NUVE MN120, Τουρκία), για να μην επιμολυνθεί το δείγμα κατά την διαδικασία παραλαβής του, ενώ το δείγμα ήταν κάθε φορά όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικό και ο χρόνος για τη μικροβιακή επίστρωση ήταν σύντομος, προκειμένου να μην μεταβληθεί ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός. Για την προετοιμασία των δειγμάτων ενοφθαλμισμού ακολουθήθηκε η τεχνική των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων, σε αποστειρωμένο ορό Ringer's (Ringer's tablets, 1.15525, Merck, Γερμανία).

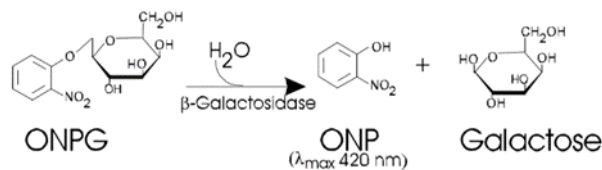


**Εικόνα 5.7:** Εξοπλισμένος θάλαμος για μικροβιακή ανάλυση

### 5.3 ENΖΥΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

#### 5.3.1 Ενεργότητα Ενζύμου

Για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης που χρησιμοποιήθηκε για τις ενζυμικές αντιδράσεις μετατροπής της λακτόζης του γλυκού ορού σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες, έγινε χρήση της ορθο-νιτροφαινυλο-β-D-γαλακτοπυραζόνης (oNPG) ως πρότυπο υποστρώμα. Η μέθοδος βασίζεται στην αντικατάσταση της λακτόζης από την ένωση oNPG, η οποία αποτελείται από ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο ορθο-νιτροφαινόλης (oNP), συνδεδεμένα με β-D-γλυκοζιτικό δεσμό, ο οποίος υδρολύεται από τη β-γαλακτοζιδάση. Η oNPG χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση της δραστηριότητας της β-γαλακτοζιδάσης φασματοφωτομετρικά. Το διάλυμα της oNPG είναι άχρωμο, αλλά με την υδρόλυσή της oNPG και την απελευθέρωση της oNP, το διάλυμα αποκτά κίτρινο χρώμα, σε αλκαλικές τιμές pH.



**Εικόνα 5.8:** Αντίδραση oNPG παρουσία β - γαλακτοζιδάσης

Η ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης μετρείται σε U και 1 Unit ορίζεται ως το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol oNP ανά λεπτό, σε συνθήκες περίσσειας υποστρώματος oNPG, σε pH ίσο με 7 και θερμοκρασία 37 °C.

Για την ποσοτικοποίηση της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης, κατασκευάζεται αρχικά η καμπύλη αναφοράς της ορθο-νιτροφαινόλης. Παρασκευάζονται 7



πρότυπα διαλύματα οNP συγκεντρώσεων 0,05-0,6 mM. Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 2,7 mL απιονισμένου νερού και 0,5 mL διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  30% w/v. Το προκύπτον διάλυμα (τυφλό) αναδεύεται καλά με τη βοήθεια συσκευής Vortex. Εντός δοκιμαστικών σωλήνων προστίθενται 2,7 mL από κάθε πρότυπο διάλυμα οNP και 0,5 mL διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  30% w/v. Τα προκύπτοντα διαλύματα αναδεύονται καλά με τη βοήθεια συσκευής Vortex. Για λόγους επαναληψιμότητας, τα παραπάνω διαλύματα παρασκευάζονται εις τριπλούν. Το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων φασματοφωτομετρείται στα 410 nm, με την βοήθεια φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού (Helios a, Unicam, Γερμανία) και κυψελίδας χαλαζία όγκου 3,5 mL. Υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση της οNP στο φωτομετρούμενο διάλυμα και κατασκευάζεται το διάγραμμα της απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης οNP. Προσαρμόζεται στα πειραματικά σημεία ευθεία γραμμή τάσης, η εξίσωση της οποίας αποτελεί την ζητούμενη καμπύλη αναφοράς.

Στη συνέχεια, μετριέται η ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*, η οποία χρησιμοποιήθηκε στις ενζυμικές αντιδράσεις μετατροπής της λακτόζης του γλυκού ορού σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Στην παρούσα διπλωματική εργασία η ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis* μελετήθηκε σε εύρος θερμοκρασιών 30-50 °C και τιμών pH 6,0-8,0.

Τοποθετούνται τρεις δοκιμαστικοί σωλήνες σε παγόλουτρο. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 2,5 mL διαλύματος οNPG συγκέντρωσης 0,3 mM, σε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  με την επιθυμητή τιμή pH. Στον έναν δοκιμαστικό σωλήνα, που χρησιμοποιείται ως τυφλό, προστίθενται 0,2 mL απιονισμένου νερού. Στους άλλους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0,2 mL ενζύμου, κατάλληλης αραίωσης ώστε το υπόστρωμα οNPG να βρίσκεται σε περίσσεια (επιθυμείται τελική απορρόφηση φασματοφωτόμετρου έως 0,300). Το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων αναδεύεται με τη βοήθεια συσκευής Vortex και οι σωλήνες τοποθετούνται εντός υδατόλουτρου, το οποίο λειτουργεί στην επιθυμητή θερμοκρασία. Μετά την πάροδο ακριβώς 10 min, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφαιρούνται από το υδατόλουτρο και μεταφέρονται στο παγόλουτρο, όπου προστίθεται σε αυτούς 0,5 mL διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  30% w/v. Το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων αναδεύεται με τη βοήθεια συσκευής Vortex και φασματοφωτομετρείται στα 410 nm.

### 5.3.2 Προεπεξεργασία Γλυκού Ορού

Η προεπεξεργασία του γλυκού ορού περιλαμβάνει την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης λακτόζης στο υπόστρωμα και τη ρύθμιση του pH του ορού.

### 5.3.2.1 Συμπύκνωση

Ο γλυκός ορός που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα αυτής της διπλωματικής εργασίας προέρχεται από τυροκομική μονάδα της περιφέρειας Ηπείρου και ήταν αιγοπρόβειας προέλευσης. Η αρχική περιεκτικότητα του ορού σε λακτόζη ήταν 5 % w/v. Ωστόσο, για τις ανάγκες της εργασίας και για μια ολοκληρωμένη μελέτη χρειάστηκε να συμπυκνωθεί ο ορός, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της περιεκτικότητας της λακτόζης στην ενζυμική αντίδραση παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών. Οι περιεκτικότητες που μελετήθηκαν είναι 5 (μη συμπυκνωμένος ορός), 10 και 15% w/v (συμπυκνωμένος ορός). Για τη συμπύκνωση του ορού χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός εξατμιστήρας υπό κενό (Heidolph, Γερμανία). Στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 5.9) αριθμούνται τα επιμέρους τμήματα του συστήματος συμπύκνωσης που χρησιμοποιήθηκε:

1. Εκχυλιστική χοάνη που λειτουργεί ως τροφοδοσία γλυκού ορού στο σύστημα
2. Υδατόλουτρο που είναι τοποθετημένη η φιάλη εξατμίσεως και συλλογής του συμπυκνωμένου ορού. Η θερμοκρασία του λουτρού ρυθμίζεται κατάλληλα ενώ η φιάλη αναδεύεται προκειμένου όλα τα σημεία να βρίσκονται στην ίδια θερμοκρασία και να αποφευχθούν φαινόμενα βρασμού.
3. Φιάλη εξατμίσεως και συλλογής συμπυκνωμένου ορού
4. Ρυθμιστής θερμοκρασίας
5. Ρυθμιστής ρυθμού ανάδευσης φιάλης
6. Αντλία κενού
7. Φιάλη συλλογής νερού που εξατμίζεται
8. Ψυκτήρας
9. Παροχή νερού στον ψυκτήρα



**Εικόνα 5.9:** Σύστημα συμπύκνωσης γλυκού ορού

### 5.3.2.2 Ρύθμιση της τιμής pH του υποστρώματος

Πριν την έναρξη των ενζυμικών αντιδράσεων, γίνεται ρύθμιση της τιμής pH του υποστρώματος στην τιμή 7 με προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 4 M. Η μέτρηση του pH πραγματοποιείται με πεχάμετρο υψηλής ακριβείας (AMEL 338, AMEL Instruments, Ιταλία) και χρήση γυάλινου ηλεκτροδίου (HI1131, Hanna Instruments, ΗΠΑ).

### 5.3.3 Ενζυμική Αντίδραση Παραγωγής Γαλακτοολιγοσακχαριτών

Βασικός άξονας της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μετατροπή της λακτόζης που περιέχεται στον γλυκό ορό σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες, μέσω ενζυμικής αντίδρασης. Η αντίδραση πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*. Η β-γαλακτοζιδάση καταλύει τη διάσπαση του β-γλυκοζιτικού δεσμού της λακτόζης, απελευθερώνοντας ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο γαλακτόζης, ενώ παράλληλα καταλύει την σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών μέσω αντιδράσεων τρανσγαλακτοζυλίωσης, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 3.

Σε τέσσερις κωνικές φιάλες των 100 mL με εσφυρισμένο χείλος και πώμα μεταφέρονται 90 mL γλυκού ορού με ρυθμισμένη τιμή pH. Οι τρεις φιάλες χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση ενζυμικών αντιδράσεων, ενώ η τέταρτη χρησιμοποιείται προκειμένου να παρακολουθείται το pH του γλυκού ορού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο με ανάδευση (Εικόνα 5.10), στην επιθυμητή θερμοκρασία αντίδρασης. Ακολουθεί προσθήκη του ενζύμου από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis* στις 3 κωνικές.



**Εικόνα 5.10:** Λουτρό ανάδευσης

Μελετήθηκε η δράση του ενζύμου για τρεις διαφορετικές τιμές ενζυμικού φορτίου (Πίνακας 5.1), γι' αυτό σε κάθε κωνική προστίθενται 45, 90 και 180  $\mu\text{L}$  ενζυμικού διαλύματος, επιτυγχάνοντας ενζυμικό φορτίο 0,011, 0,022 και 0,045 U/mL, αντίστοιχα. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα γίνεται δειγματοληψία 4 mL από κάθε κωνική που μεταφέρονται σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες με βιδωτό πώμα. Ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου, τοποθετώντας τους δοκιμαστικούς σωλήνες αμέσως σε νερό με έντονο βρασμό για 10 min. Μετά το πέρας των 10 min, οι σωλήνες τοποθετούνται σε παγόλουτρο. Τέλος, τα δείγματα μεταφέρονται σε μικροσωληνίσκους φυγοκεντρήσεως και αποθηκεύονται στην κατάψυξη μέχρι να αναλυθούν.

**Πίνακας 5.1:** Σχεδιασμός πειραμάτων ενζυμικής αντίδρασης

Περιεκτικότητα λακτόζης (% w/v)	Ενζυμικό φορτίο (U/mL)	Θερμοκρασία T (oC)	pH
5	0,011	30	7
	0,022		
	0,045		
	0,011	40	
	0,022		
	0,045		
10	0,011	30	
	0,022		
	0,045		
	0,011	40	
	0,022		
	0,045		
15	0,011	30	
	0,022		
	0,045		
	0,011	40	
	0,022		
	0,045		

### 5.3.4 Ανάλυση Δειγμάτων Ενζυμικής Αντίδρασης

#### 5.3.4.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Η ανάλυση όλων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Η HPLC ανήκει στην κατηγορία των χρωματογραφικών τεχνικών. Σαν χρωματογραφική μέθοδος συνδυάζει 2 φάσεις, την στατική και την κινητή φάση. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσεως. Η κινητή φάση προωθείται στην στήλη μέσω της αντλίας, όπου όταν φτάσει στη θέση εισαγωγής του δείγματος διέρχεται από τον βρόγχο και προωθεί ποσοτικά το δείγμα στη στήλη. Τα συστατικά του δείγματος κινούνται κάθε φορά με μορφή ζωνών και εκκλύονται το ένα μετά το άλλο. Λόγω της διαφορετικής κατανομής των ουσιών μεταξύ στατικής και κινητής φάσης, παρατηρούνται διαφορετικές ταχύτητες μετακίνησής τους στη στήλη. Κατά την έξοδό τους από τη στήλη καταλήγουν διαδοχικά σε έναν ανιχνευτή, ο οποίος με βάση μία ιδιότητα του συστατικού προσδιορίζει την ποσότητα του συστατικού στο δείγμα που αναλύεται.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC (HPLC System Agilent series 1100, Γερμανία) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Refraction Index, RI, Hewlett Packard 1047A, Ιαπωνία) και αντλίας (Iso pump G1310A Agilent series 1100, Γερμανία), προκειμένου να προσδιοριστούν τα συστατικά των δειγμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Microsorb-MV 100 NH<sub>2</sub> (Agilent Technologies, Γερμανία), συνδεδεμένη με μία προ-στήλη όμοιου τύπου Polaris 5 NH<sub>2</sub> MetaGuard (Agilent Technologies, Γερμανία) για την κατακράτηση πιθανών ακαθαρσιών. Ως κινητή φάση (διαλύτης έκλυσης) χρησιμοποιήθηκε ακετονιτριλίο-νερό σε αναλογία 70:30. Ο διαλύτης απαεωνόταν αρχικά για χρονικό διάστημα 1 h, με την βοήθεια λουτρού υπερήχων (degasser Hewlett Packard series 1200 G1379B, Ιαπωνία). Η ροή του διαλύτη ρυθμίστηκε στα 1,3 mL/min και η ανάλυση πραγματοποιούνταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για την ομαλή λειτουργία της στήλης αλλά και την προστασία της, όλα τα δείγματα αρχικά φιλτράρονταν με φίλτρα πορώδους 0,22 μm.



**Εικόνα 5.11:** Σύστημα HPLC με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (HPLC-RI)

#### 5.3.4.2 Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή

Η Χρωματογραφία Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή (High Performance Anion-Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD) (Εικόνα 5.13) ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης που αναπτύχθηκε για τον διαχωρισμό υδατανθράκων. Η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται την ασθενώς όξινη φύση των υδατανθράκων αποδίδοντας εξαιρετικά επιλεκτικούς διαχωρισμούς σε υψηλή τιμή pH εφαρμόζοντας ισχυρή ανταλλαγή ανιόντων στη στατική φάση. Η χρήση των παλμών (PAD) επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των ουσιών σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης έως και της τάξεως των picomole.



**Εικόνα 5.12:** Σύστημα HPAEC-PAD



Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα HPAEC-PAD με ηλεκτρόδιο εργασίας χρυσού και ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl, η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η CarboPac PA1 Analytical (ThermoScientific, ΗΠΑ) συνδεδεμένη με όμοιου τύπου προ-στήλη CarboPac PA1 Guard (ThermoScientific, ΗΠΑ). Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαλύτες και ένα πρόγραμμα διαβάθμισης αυτών. Οι διαλύτες είναι 12,5 mM NaOH (A), 125 mM NaOH (B) και 125 mM NaOH/500 mM CH<sub>3</sub>COONa (C). Το πρόγραμμα διαβάθμισης διαλυτών διαρκεί 80 min και παρουσιάζεται εκτενώς στον Πίνακα 5.2.

**Πίνακας 5.2:** Πρόγραμμα διαβάθμισης διαλυτών του συστήματος HPAEC-PAD

Χρόνος (min)	%A	%B	%C
0,0	95	5	0
20,1	95	5	0
35,0	0	100	0
55,0	0	100	0
55,1	0	0	100
65,0	0	0	100
65,1	95	5	0
80,0	95	5	0

#### 5.3.4.3 Μαθηματική Περιγραφή Αποτελεσμάτων

Για τον προσδιορισμό της απόδοσης της αντίδρασης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες χρησιμοποιείται ο τύπος:

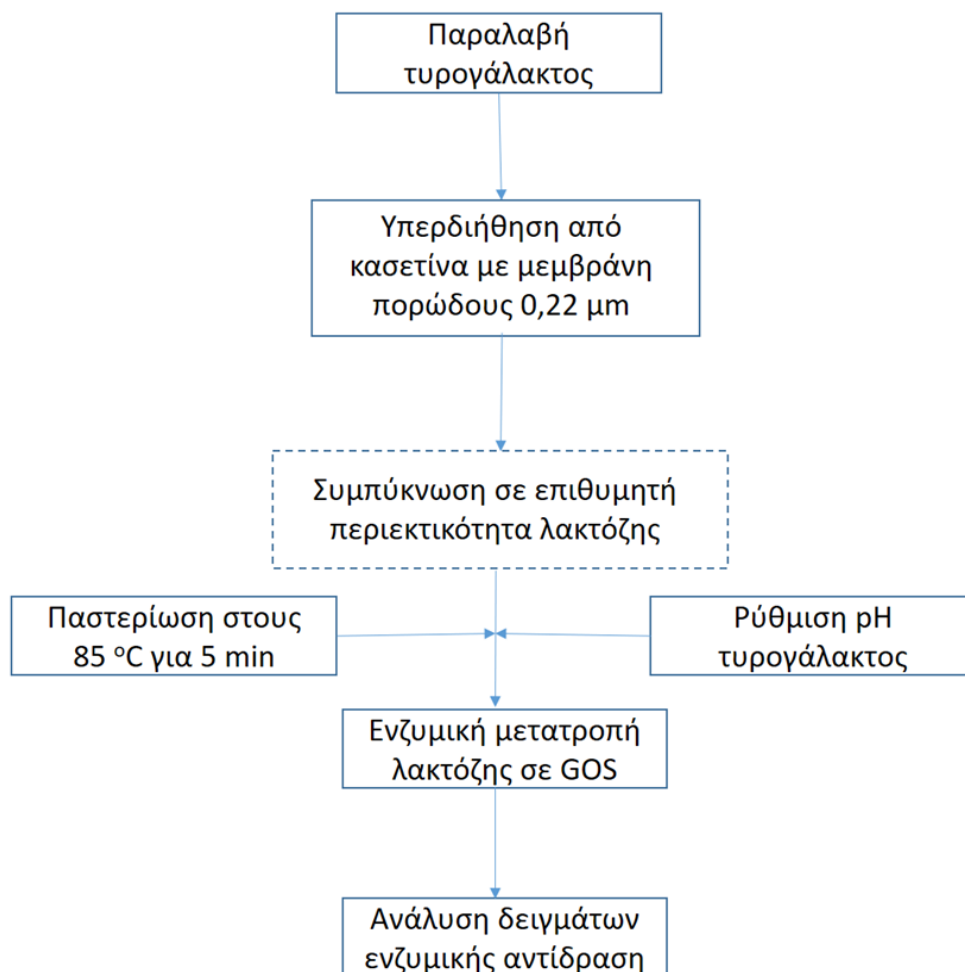
$$\% y_{GOS} = \frac{C_{GOS}}{C_{lac(0)}} * 100\%$$

Όπου % Y<sub>GOS</sub>, η απόδοση σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες, C<sub>GOS</sub>, η συγκέντρωση των γαλακτοολιγοσακχαριτών που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς και C<sub>lac(0)</sub>, η συγκέντρωση της λακτόζης που βρίσκεται αρχικά στο αντιδρών μείγμα.

Σημειώνεται ότι ως συγκέντρωση ολιγοσακχαριτών έχει ληφθεί υπόψη το σύνολο των δισακχαριτών πλην της λακτόζης και οι λοιποί ολιγοσακχαρίτες με βαθμό πολυμερισμού έως και 4.

#### 5.3.4.4 Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας

Στο Διάγραμμα 5.1 απεικονίζεται το διάγραμμα ροής της διαδικασίας που ακολουθήθηκε κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων της ενζυμικής αντίδρασης. Κατά την παραλαβή του τυρογάλακτος τα δοχεία αποθηκεύονται σε καταψύκτες και πριν από κάθε χρήση τους αφήνονται να ξεψυχθούν. Ακολουθεί η υπερδιήθηση του τυρογάλακτος από κασετίνα Pellicon XL50 με μεμβράνη Durapore 0.22  $\mu\text{m}$  C screen 50  $\text{cm}^2$ . Στα πειράματα που απαιτούσαν υψηλότερη περιεκτικότητα λακτόζης πραγματοποιείται συμπύκνωση του ορού. Στη συνέχεια, ο υπερδιηθημένος ορός παστεριώνεται σε συνθήκες θερμοκρασίας 85  $^{\circ}\text{C}$  για χρονικό διάστημα 5 min προκειμένου να απενεργοποιηθεί τυχόν υπολειμματικό μικροβιακό φορτίο. Ακολουθεί ρύθμιση της τιμής του pH στο 7,2 με χρήση NaOH 4M. Πραγματοποιείται η ενζυμική μετατροπή της λακτόζης του επεξεργασμένου ορού σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες και τα δείγματα, τέλος, αναλύονται με την τεχνική της HPLC-RI και της HPAEC-PAD.



**Διάγραμμα 5.1:** Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας



#### 5.3.4.5 Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Κατά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μελετήθηκε η σημαντικότητα της επίδρασης των παραγόντων στο μέγιστο βαθμό απόδοσης σε GOS. Τα πειραματικά δεδομένα υποβλήθηκαν σε γραμμική παραμετρική ανάλυση διακύμανσης (Factorial ANOVA) με παράλληλη σύγκριση των μέσων όρων μέσω της δοκιμής Duncan (Duncan's means post hoc comparison test), με στόχο να εντοπιστούν οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ανά είδος σχεδιαστικής παραμέτρου στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως στάθμη σημαντικότητας την τιμή  $\alpha=0,95$  ( $p\text{-value}=0,05$ ). Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

---

## 6.1 ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΛΥΚΟΥ ΟΡΟΥ

Πρώτη ενότητα της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η πλήρης χημική ανάλυση του γλυκού ορού, προκειμένου να είναι γνωστές οι συγκεντρώσεις όλων των συστατικών που περιέχονται στο υπόστρωμα, το οποίο αξιοποιήθηκε στη συνέχεια για την ενζυμική παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS) από την περιεχόμενη λακτόζη του τυρογάλακτος. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν σταθμικά το στερεό υπόλειμμα και η τέφρα του γλυκού ορού, μέσω ανάλυσης Υψηλής Απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας οι συγκεντρώσεις των ολικών σακχάρων και της λακτόζης, φασματοφωτομετρικά οι συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος και θεικών ανιόντων και τιτλοδοτικά η συγκέντρωση χλωριόντων με την μέθοδο Mohr. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα του τυρογάλακτος στα βασικά μεταλλικά ιόντα ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) μέσω Φασματοφωτομετρίας Ατομικής Εκπομπής με Ιοντικά Συζευγμένο Πλάσμα (ICP-AES). Τέλος, η συγκέντρωση τόσο των ολικών πρωτεϊνών, όσο και των πρωτεϊνών ορού προσδιορίστηκαν με την μέθοδο Kjeldahl, μέθοδος η οποία εφαρμόζεται ευρέως στη βιβλιογραφία σε γαλακτοκομικά προϊόντα.

### 6.1.1 Καμπύλες αναφοράς χαρακτηριστικών γλυκού ορού

Για την ποσοτικοποίηση ορισμένων από τα χαρακτηριστικά του τυρογάλακτος ήταν αναγκαία η κατασκευή καμπυλών αναφοράς. Συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό του γαλακτικού οξέος, των θεικών ιόντων καθώς και των μετάλλων κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς, οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω.

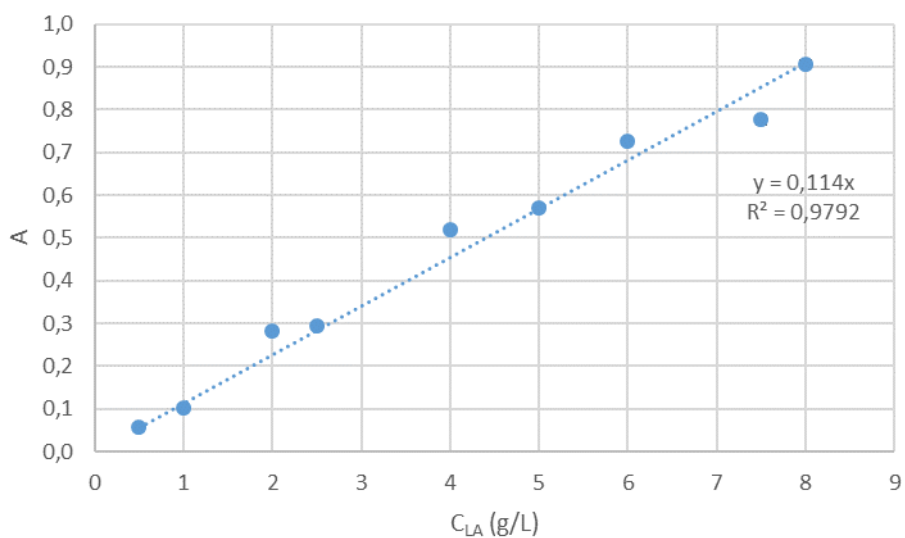
#### 6.1.1.1 Καμπύλη αναφοράς γαλακτικού οξέος

Στο Διάγραμμα 6.1 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς του γαλακτικού οξέος, όπως κατασκευάστηκε με την μέθοδο που αναφέρεται στην ενότητα 5.1.4.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, που συνδέει την απορρόφηση στα 390 nm ( $A$ ) με τη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος ( $c_{LA}$ ) είναι:

$$A = 0,114 \cdot c_{LA}$$

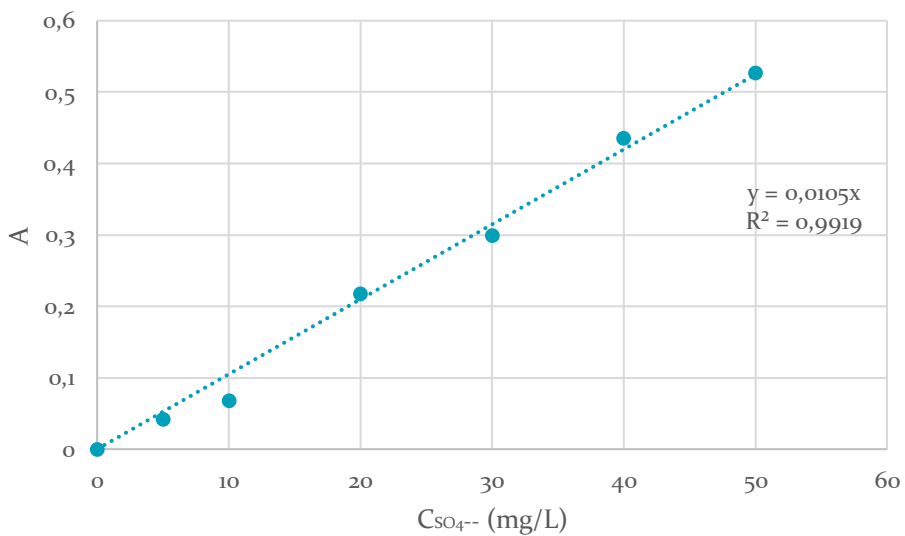
όπου η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος αναφέρεται σε g/L.



**Διάγραμμα 6.1.** Καμπύλη αναφοράς γαλακτικού οξέος.

#### 6.1.1.2 Καμπύλη αναφοράς θεικών ανιόντων ( $SO_4^{2-}$ )

Στο Διάγραμμα 6.2 παρατίθεται η καμπύλη αναφοράς των θεικών ανιόντων, όπως κατασκευάστηκε με την μέθοδο που αναφέρεται στην ενότητα 5.1.2.



**Διάγραμμα 6.2.** Καμπύλη αναφοράς θεικών ιόντων.

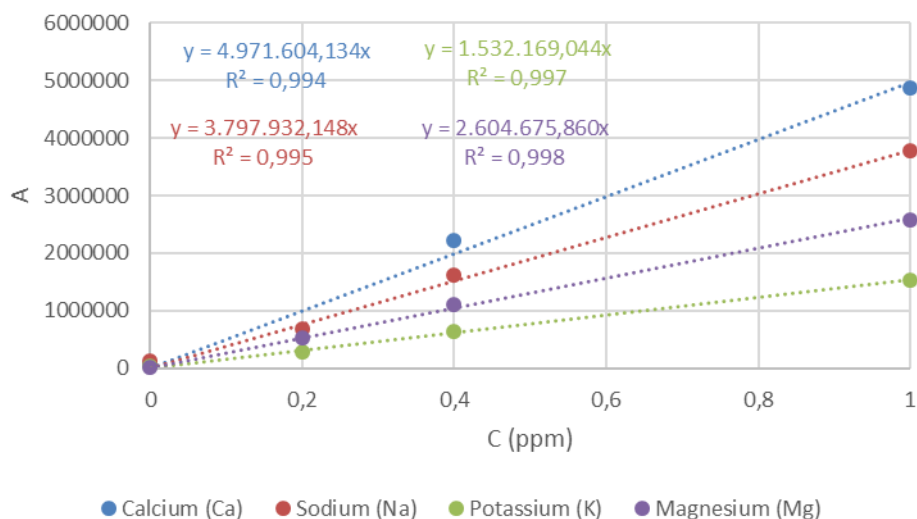
Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, που συνδέει την απορρόφηση στα 410 nm (A) με τη συγκέντρωση των θεικών ιόντων ( $c_{SO_4^{2-}}$ ) είναι:

$$A = 0,0105 \cdot c_{SO_4^{2-}}$$

όπου η συγκέντρωση των θεικών ιόντων αναφέρεται σε mg/L.

### 6.1.1.3 Καμπύλη αναφοράς μεταλλικών ιόντων ( $K^+$ , $Na^+$ , $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ )

Στο Διάγραμμα 6.3 παρατίθεται η καμπύλη αναφοράς των μεταλλικών ιόντων, όπως κατασκευάστηκε με την μέθοδο που αναφέρεται στην ενότητα 5.1.3.



**Διάγραμμα 6.3:** Καμπύλη αναφοράς μετάλλων

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, που συνδέει τον αριθμό των κτύπων στον ανιχνευτή του συστήματος ICP-AES (A) με τη συγκέντρωση των μεταλλικών ιόντων ( $c_i$ ) είναι:

$$A = 1.532.169 \cdot c_{K^+}$$

$$A = 3.797.932 \cdot c_{Na^+}$$

$$A = 4.971.604 \cdot c_{Ca^{2+}}$$

$$A = 2.604.675 \cdot c_{Mg^{2+}}$$

όπου η συγκέντρωση των μεταλλικών ιόντων αναφέρεται σε ppm.

### 6.1.1.4 Καμπύλες αναφοράς σακχάρων

Για την ποσοτικοποίηση μέσω της μεθόδου Υψηλής Απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας (HPLC) των σακχάρων που περιέχονται στον γλυκό ορό, αλλά και των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων που συντέθηκαν, όπως θα αναφερθεί παρακάτω, ήταν απαραίτητη η κατασκευή καμπύλης αναφοράς αυτών. Τα πρότυπα διαλύματα των σακχάρων παρασκευάστηκαν με περιεκτικότητα 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 2%, 4%, 6%, 8% και 10% w/v και κατόπιν αναλύθηκαν με την βοήθεια του συστήματος HPLC, όπως περιγράφεται στην ενότητα 5.3.4.

Στον Πίνακα 6.1 παρουσιάζονται οι χρόνοι έκλουσης των προτύπων σακχάρων που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Στα δείγματα που αναλύθηκαν περιέχονταν τόσο μόρια γαλακτόζης όσο και μόρια γλυκόζης. Ωστόσο, με το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε προκύπτει ότι τα σάκχαρα

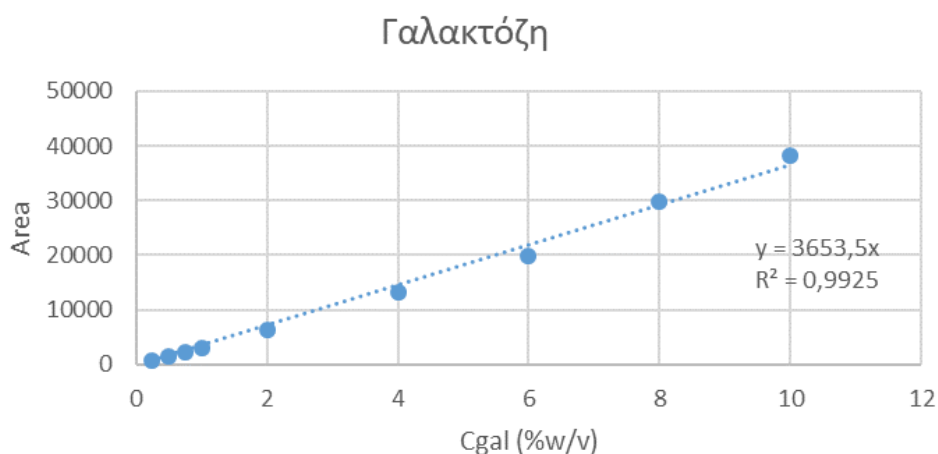
εκλούνται ομαδοποιημένα, ανάλογα με τον βαθμό πολυμερισμού τους. Επομένως, οι μονοσακχαρίτες εκλούνται στον ίδιο χρόνο χωρίς να διαχωρίζονται πλήρως. Έτσι, σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν, οι δύο μονοσακχαρίτες θα αναφέρονται εφεξής από κοινού, χωρίς να διαχωρίζεται η γλυκόζη από τη γαλακτόζη. Η ποσοτικοποίηση των μονοσακχαριτών έγινε με βάση πρότυπα διαλύματα γλυκόζης.

Η συγκέντρωση των γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS) που συντίθενται κατά τις ενζυμικές αντιδράσεις που θα αναλυθούν παρακάτω ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως πρότυπο σάκχαρο τη ραφινόζη. Γαλακτοολιγοσακχαρίτες εντοπίζονται στο χρωματογράφημα που προκύπτει από το σύστημα HPLC στον ίδιο χρόνο έκλυσης με τη ραφινόζη αλλά και σε χρόνο μεταγενέστερο. Επιπλέον, στην ποσότητα των GOS συμπεριλαμβάνεται και το εμβαδόν μιας κορυφής που προκύπτει μετά τον χρόνο έκλυσης της λακτόζης, πριν από αυτή της ραφινόζης.

**Πίνακας 6.1.** Χρόνοι έκλυσης πρότυπων σακχάρων στην HPLC-RI με χρήση διαλύτη ACN:H<sub>2</sub>O αναλογίας 70:30

<b>Σάκχαρο</b>	<b>Χρόνος έκλυσης (min)</b>
<b>Γλυκόζη (glucose)</b>	6,45
<b>Γαλακτόζη (galactose)</b>	6,78
<b>Λακτόζη (lactose)</b>	11,4
<b>Ραφινόζη (raffinose)</b>	15,5

Στα ακόλουθα διαγράμματα παρατίθενται οι καμπύλες αναφοράς για τα πρότυπα σάκχαρα που αναλύθηκαν στο σύστημα HPLC.

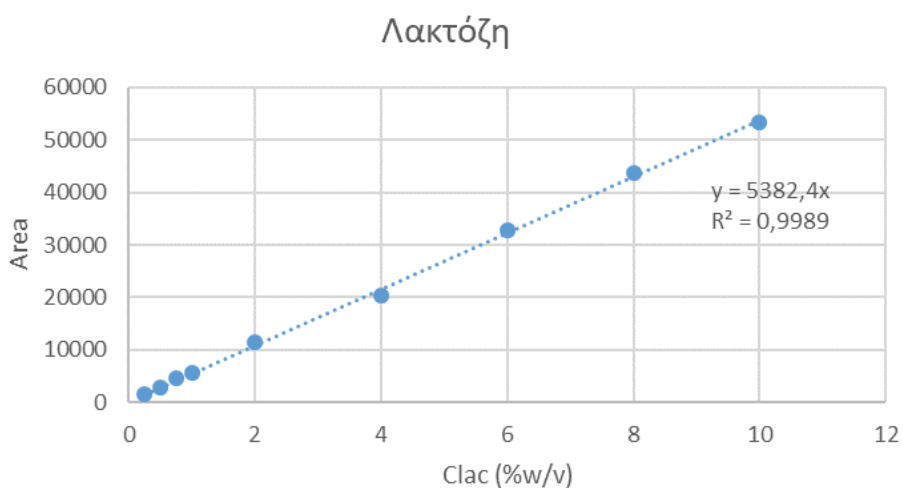


**Διάγραμμα 6.4.** Καμπύλη αναφοράς γαλακτόζης.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, που συνδέει το εμβαδόν της καμπύλης έκλουσης της γαλακτόζης στο χρωματογράφημα, που προκύπτει από το σύστημα HPLC, (A) με τη συγκέντρωση της γαλακτόζης στα πρότυπα διαλύματα ( $c_{gal}$ ) είναι:

$$A = 3653,5 \cdot c_{gal}$$

όπου η συγκέντρωση της γαλακτόζης αναφέρεται % w/v.

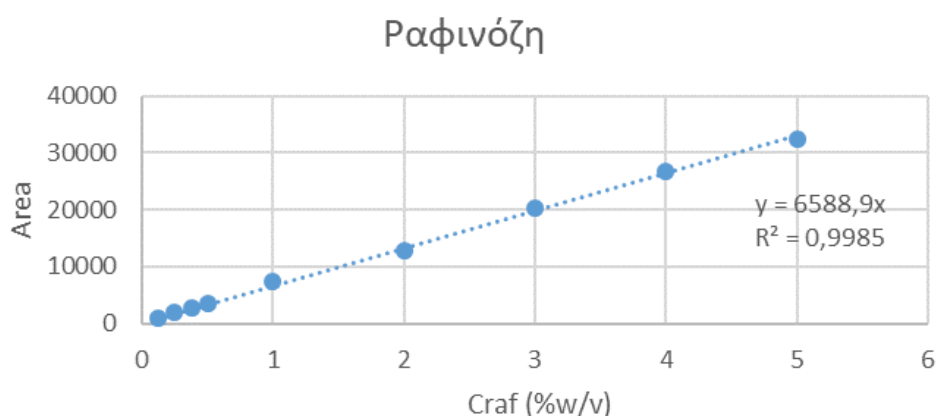


**Διάγραμμα 6.5.** Καμπύλη αναφοράς λακτόζης.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, που συνδέει το εμβαδόν της καμπύλης έκλυσης της λακτόζης στο χρωματογράφημα, που προκύπτει από το σύστημα HPLC, (A) με τη συγκέντρωση της γαλακτόζης στα πρότυπα διαλύματα ( $c_{lac}$ ) είναι:

$$A = 5382,4 \cdot c_{lac}$$

όπου η συγκέντρωση της λακτόζης αναφέρεται % w/v.

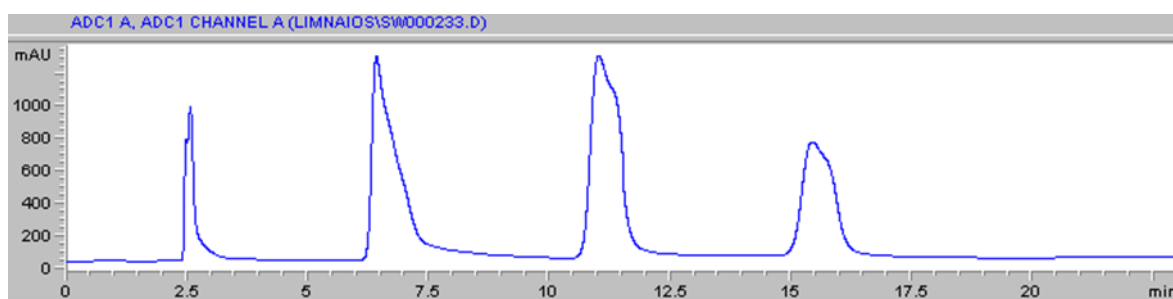


**Διάγραμμα 6.6.** Καμπύλη αναφοράς ραφινόζης.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, που συνδέει το εμβαδόν της καμπύλης έκλυσης της λακτόζης στο χρωματογράφημα, που προκύπτει από το σύστημα HPLC, (A) με τη συγκέντρωση της ραφινόζης στα πρότυπα διαλύματα ( $c_{raf}$ ) είναι:

$$A = 6588,9 \cdot c_{raf}$$

όπου η συγκέντρωση της ραφινόζης αναφέρεται % w/v.



**Εικόνα 6.1.** Χρωματογράφημα δειγμάτων πρότυπων σακχάρων συστήματος HPLC-RI



### 6.1.2 Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης τυρογάλακτος

Με βάση τις μεθόδους που περιεγράφηκαν στην ενότητα 5.1 και χρησιμοποιώντας τις καμπύλες αναφοράς που παρουσιάζονται στην ενότητα 6.1.1, όπου απαιτούνταν, πραγματοποιήθηκε η πλήρης χημική ανάλυση του τυρογάλακτος που παρελήφθη. Οι συγκεντρώσεις των κυριότερων συστατικών του γλυκού ορού παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2.

*Πίνακας 6.2. Συστατικά γλυκού ορού.*

<b>Ολικά σάκχαρα (%w/v)</b>	5,63 ± 0,08
<b>Λακτόζη (%w/v)</b>	5,08 ± 0,08
<b>Πρωτεΐνες (%w/w)</b>	2,93 ± 0,56
<b>Ολικά στερεά (%w/w)</b>	4,90 ± 0,02
<b>Τέφρα (%w/w)</b>	0,456 ± 0,010
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mg/L)</b>	95,6 ± 0,010
<b>Cl<sup>-</sup> (%w/v)</b>	0,248 ± 0,015
<b>Na<sup>+</sup> (mM)</b>	16,7 ± 1,1
<b>K<sup>+</sup> (mM)</b>	31,4 ± 1,5
<b>Ca<sup>2+</sup> (mM)</b>	8,60 ± 0,32
<b>Mg<sup>2+</sup> (mM)</b>	1,14 ± 0,08
<b>Γαλακτικό οξύ (g/L)</b>	1,65 ± 0,06

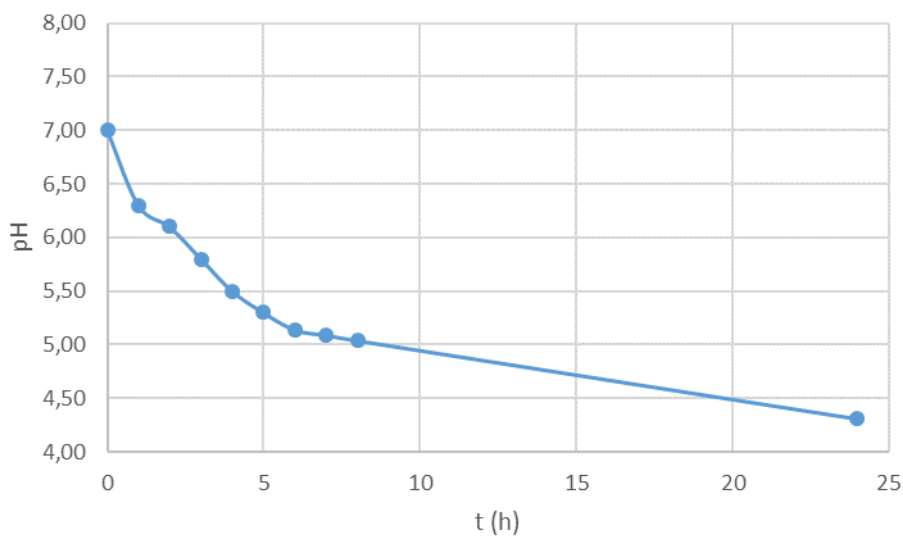
### 6.2 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΛΥΚΟΥ ΟΡΟΥ

Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 5, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ο γλυκός ορός ως υπόστρωμα για την ενζυμική μετατροπή της περιεχόμενης λακτόζης σε GOS, θα πρέπει να επεξεργαστεί καταλλήλως, με πρωταρχικό στόχο τη σταθεροποίηση της τιμής του pH στα επιθυμητά επίπεδα. Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί ότι το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης από το μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis* δρα βέλτιστα σε συνθήκες pH από 6,8 έως 7,2. Σε πιο όξινο περιβάλλον, η δράση του συγκεκριμένου ενζύμου μειώνεται σταδιακά μέχρι την πλήρη απενεργοποίησή του.

Σε πρωταρχικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, διαπιστώθηκε ότι σε πολύ πρώιμους χρόνους της ενζυμικής αντίδρασης, η απόδοση σε GOS ήταν αρκετά χαμηλή και παρέμενε σταθερή, γεγονός που υποδείκνυε ότι τόσο οι αντιδράσεις

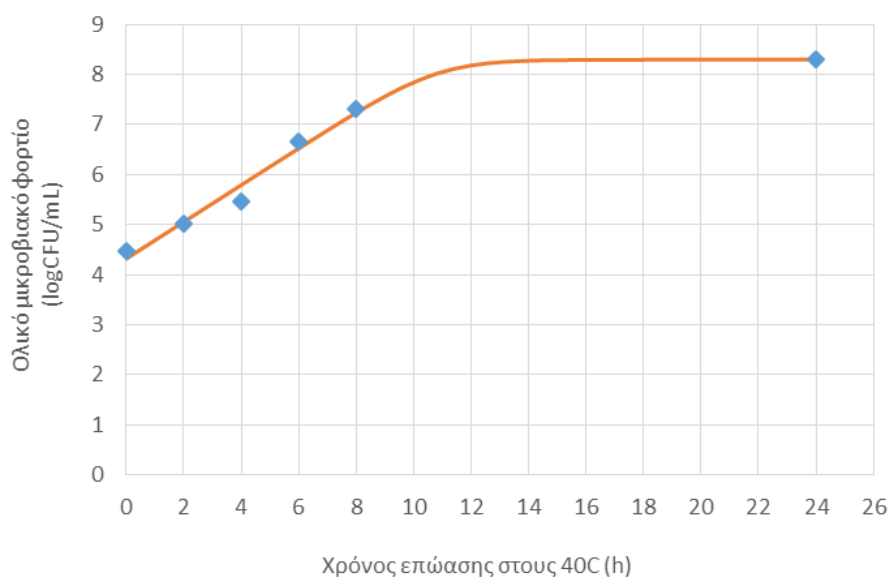
υδρόλυσης όσο και τρανσγαλακτοζυλίωσης δεν εξελίσσονταν και συνεπώς για κάποιο λόγο η δράση του ενζύμου καταστέλλόταν.

Ο πρώτος παράγοντας που ελέγχθηκε ήταν η μεταβολή της τιμής του pH, σε συνδυασμό με έλεγχο του μικροβιακού φορτίου του τυρογάλακτος. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με επώαση του τυρογάλακτος σε θερμοκρασία 40 °C, με αρχική ρύθμιση της τιμής του pH στο 7,0 και συχνότητα δειγματοληψιών ανά μία ώρα, για τις πρώτες 8 h, και μετά από 24 h. Τα αποτελέσματα έδειξαν ραγδαία μείωση της τιμής του pH ήδη από την 1<sup>η</sup> ώρα επώασης, ενώ μετά από 8 h η τιμή του pH ήταν στο 5,04 (Διάγραμμα 6.7).

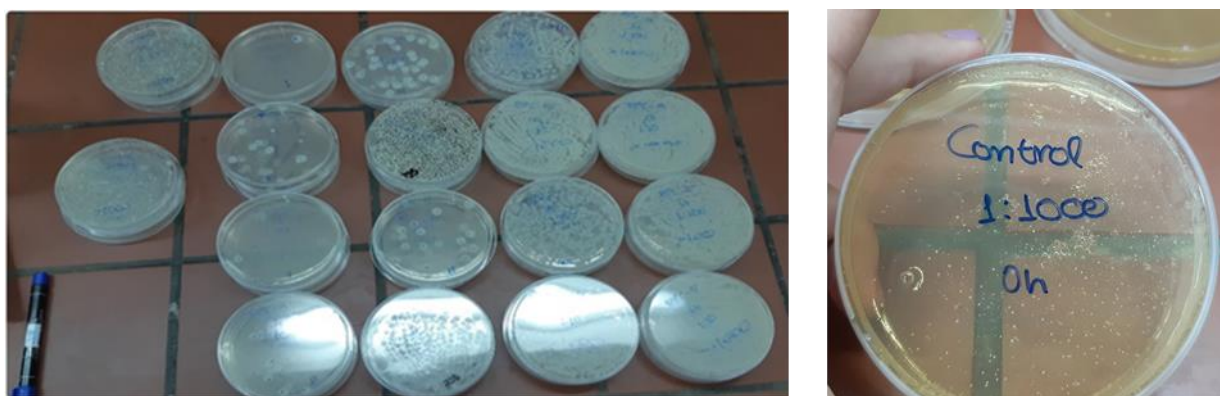


**Διάγραμμα 6.7:** Μεταβολή της τιμής του pH δείγματος τυρογάλακτος κατά την επώασή του στους 40 °C

Από την μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων φάνηκε ότι το αρχικό μικροβιακό φορτίο του τυρογάλακτος ήταν αρκετά υψηλό και συγκεκριμένα, βρέθηκε ίσο με 4,47 και 2,43 logCFU/mL για την ολική μικροβιακή χλωρίδα και τα γαλακτικά βακτήρια, αντίστοιχα (Εικόνα 6.2). Δεδομένου ότι στο τυρόγαλα μεταφέρονται θερμοφιλοι μικροοργανισμοί της καλλιέργειας εκκίνησης των τυριών, αυτό είχε σαν αποτέλεσμα οι μικροοργανισμοί καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης να συνεχίζουν να αναπτύσσονται, αφού οι συνθήκες θερμοκρασίας και pH του δείγματος ήταν ευνοϊκές για την ανάπτυξή τους, και η περιεχόμενη στο τυρόγαλα λακτόζη χρησιμοποιούταν ως θρεπτικό υπόστρωμα για τους μικροοργανισμούς (Διάγραμμα 6.8). Επομένως, κρίθηκε αναγκαίο να βρεθεί τρόπος ώστε να μειωθεί το μικροβιακό φορτίο του γλυκού ορού στα χαμηλότερα δυνατά επίπεδα.



**Διάγραμμα 6.8:** Μεταβολή του ολικού μικροβιακού φορτίου τυρογάλακτος κατά την επώασή του στους 40 °C

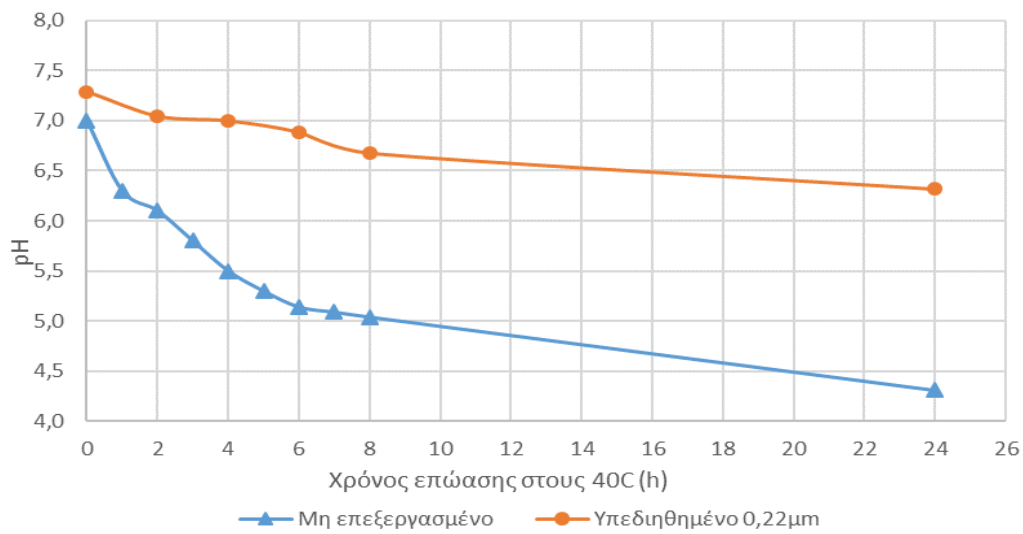


**Εικόνα 6.2:** Τρυβλία petri από τον έλεγχο του μικροβιακού φορτίου του τυρογάλακτος κατά την επώασή του στους 40 °C

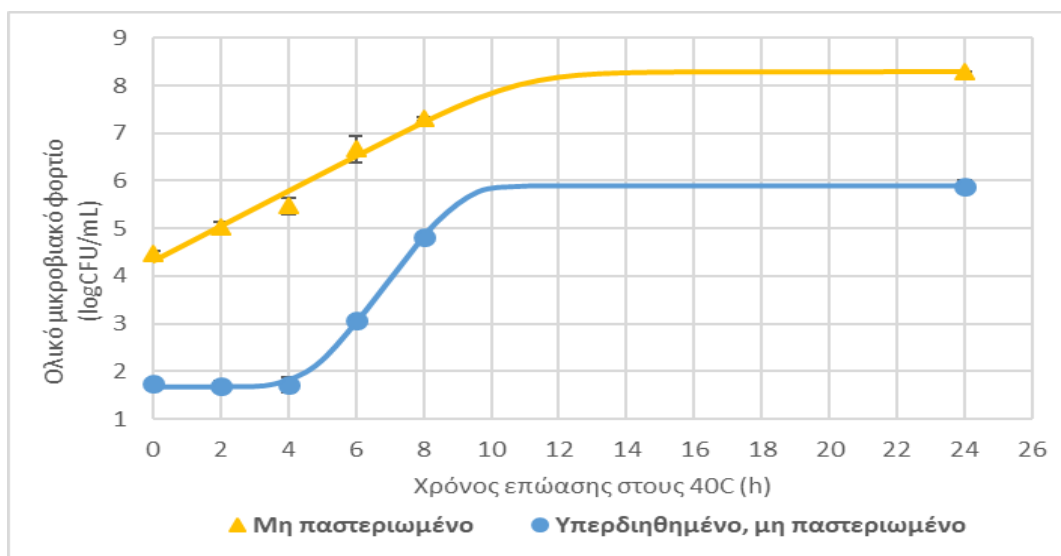
(Αριστερά: Ολικό Μικροβιακό Φορτίο, Δεξιά: Γαλακτικά Βακτήρια)

Για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου του τυρογάλακτος εφαρμόστηκε η διεργασία της υπερδιήθησης. Συνεπώς, ελέγχθηκε το κατά πόσο με υπερδιήθηση του τυρογάλακτος από μεμβράνη με πορώδες 0,22 μm, θα μειωνόταν ο μικροβιακός πληθυσμός σε επίπεδα μη ικανά να οδηγήσουν σε περαιτέρω μείωση της τιμής pH του τυρογάλακτος (Διάγραμμα 6.9), διατηρώντας ταυτόχρονα την αρχική δομή του. Μετά την υπερδιήθηση, τα δείγματα τυρογάλακτος εμφάνισαν χαμηλότερα φορτία ολικής μικροβιακής χλωρίδας (Διάγραμμα 6.10) και γαλακτικών βακτηρίων, με τα δεύτερα να είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης της

μεθόδου (Πίνακας 6.3) καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης του δείγματος στους 40 °C.



**Διάγραμμα 6.9:** Μεταβολή τιμής του pH συναρτήσει χρόνου για τα δείγματα μη επεξεργασμένου και υπερδιηθημένου τυρογάλακτος



**Διάγραμμα 6.10:** Μεταβολή του ολικού μικροβιακού φορτίου τυρογάλακτος κατά την επώασή του στους 40 °C για τα μη επεξεργασμένο και υπερδιηθημένο δείγματα τυρογάλακτος

**Πίνακας 6.3:** Μικροβιακό φορτίο σε γαλακτικά βακτήρια (logCFU/mL)

t (h)	Μη επεξεργασμένο	Υπερδιηθημένο, μη παστεριωμένο
0	2,43 ± 0,05	Δ.Α.
2	2,77 ± 0,10	Δ.Α.
4	4,37 ± 0,04	Δ.Α.
6	6,03 ± 0,06	Δ.Α.
8	6,96 ± 0,17	Δ.Α.
24	7,41 ± 0,02	Δ.Α.

Δ.Α.: Δεν ανιχνεύτηκαν

Συνεπώς, από τη συνολική αξιολόγηση των παραπάνω αποτελεσμάτων, επιλέχθηκε η επεξεργασία της υπερδιήθησης του γλυκού ορού, με χρήση της κασετίνας Pellicon XL50 με μεμβράνη Durapore 0.22 μm C screen 50 cm<sup>2</sup>, με μετέπειτα παστερίωση του στους 85 °C για 5 min. Η παστερίωση λάμβανε χώρα μετά από οποιαδήποτε άλλη επεξεργασία του υπερδιηθημένου ορού (π.χ. συμπύκνωση), πριν την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης.

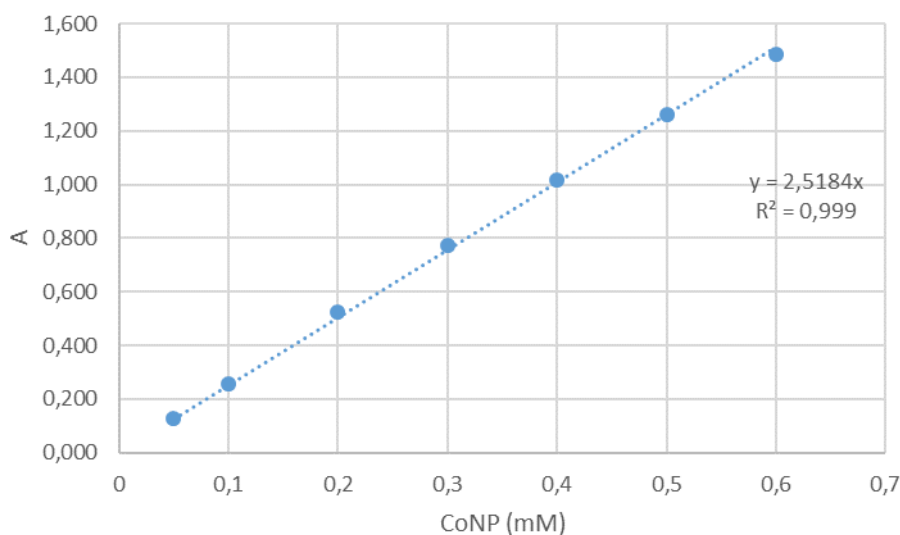
### 6.3 ENΖΥΜΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΑΠΟ ΓΛΥΚΟ ΟΡΟ

Μετά την πλήρη χημική ανάλυση του γλυκού ορού που παρελήφθη και αφού επιτεύχθηκε η σταθεροποίηση της τιμής του pH του τυρογάλακτος στην επιθυμητή περιοχή, με την προκατεργασία που περιγράφεται στην ενότητα 5.3.2, ακολούθησαν οι ενζυμικές αντιδράσεις παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών, αξιοποιώντας τη λακτόζη του τυρογάλακτος. Στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων, όπως το ενζυμικό φορτίο, η συγκέντρωση λακτόζης στο υπόστρωμα και η θερμοκρασία διεξαγωγής της ενζυμικής αντίδρασης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στις ακόλουθες παραγράφους.

#### 6.3.1 Ενζυμική ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*

Πριν την διεξαγωγή των ενζυμικών αντιδράσεων, ήταν απαραίτητη η μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική, καθώς και η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών δράσης αυτού.

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης που χρησιμοποιήθηκε κατασκευάστηκε αρχικά η καμπύλη αναφοράς, με τη χρήση της ορθο-νιτροφαινόλης (oNP), όπως περιγράφεται στην ενότητα 5.3.2.



**Διάγραμμα 6.11:** Καμπύλη αναφοράς oNP

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, που συνδέει την απορρόφηση στα 410 nm (A) με τη συγκέντρωση ορθο-νιτροφαινόλης ( $c_{oNP}$ ) είναι:

$$A = 2,5184 \cdot c_{oNP}$$

όπου η συγκέντρωση της oNP αναφέρεται σε mM.

Η ενεργότητα του ενζύμου μετράται σε U. 1 Unit ορίζεται ως το ποσό ενζύμου που απελευθερώνει 1  $\mu\text{mol}$  ορθο-νιτροφαινόλης ανά λεπτό αντίδρασης, υπό συνθήκες περίσσειας υποστρώματος oNPG, σε καθορισμένο pH και θερμοκρασία.

Προκειμένου για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών δράσης της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*, μελετήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου σε εύρος θερμοκρασιών 30-50 °C και τιμών pH 6-8. Στον Πίνακα 6.4 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της ενεργότητας β-γαλακτοζιδάσης.

**Πίνακας 6.4:** Ενεργότητα β – γαλακτοζιδάσης από *K. lactis*

Θερμοκρασία, T (°C)	pH	Ενεργότητα, U/mL
30	7,0	22,4 ± 0,1
	6,0	0,365 ± 0,018
	6,5	1,47 ± 0,02
40	7,0	2,87 ± 0,01
	7,5	1,80 ± 0,01
	8,0	0,302 ± 0,001
50	7,0	1,18 ± 0,01

Από την παραπάνω μελέτη βρέθηκε ότι το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση από *K. Lactis* εμφανίζει βέλτιστη δράση σε τιμή pH ίση με 7 και στη θερμοκρασία των 30 °C με την ενεργότητα του ενζύμου στις βέλτιστες συνθήκες να είναι 22,4 ± 0,1 U/mL.

Βιβλιογραφικά, ως βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου αναφέρονται οι 40 °C, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Για τον λόγο αυτόν, επιλέχθηκε οι ενζυμικές αντιδράσεις παραγωγής GOS να πραγματοποιηθούν και στις δύο θερμοκρασίες και να συγκριθούν τα αποτελέσματα.

### 6.3.2 Αποτελέσματα ενζυμικών αντιδράσεων μετατροπής της λακτόζης του γλυκού ορού σε GOS

Στις επόμενες παραγράφους αναφέρονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων παραγωγής GOS με υπόστρωμα τον γλυκό ορό και η επίδραση τόσο του ενζυμικού φορτίου, όσο και της συγκέντρωσης λακτόζης στο τυρόγαλα στην απόδοση των αντιδράσεων.

#### 6.3.2.1 Επίδραση του ενζυμικού φορτίου της β-γαλακτοζιδάσης στην ενζυμική αντίδραση

Ο πρώτος παράγοντας που μελετήθηκε ήταν η επίδραση του ενζυμικού φορτίου της β-γαλακτοζιδάσης στην ενζυμική αντίδραση μετατροπής της λακτόζης του γλυκού ορού σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Έτσι, σε πρώτη φάση θα παρουσιασθούν τα αποτελέσματα από τη σκοπιά της επίδρασης του ενζυμικού φορτίου για κάθε τιμή συγκέντρωσης λακτόζης στο υπόστρωμα, για τις 2 τιμές θερμοκρασίας στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι ενζυμικές αντιδράσεις. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με υπόστρωμα γλυκού ορού

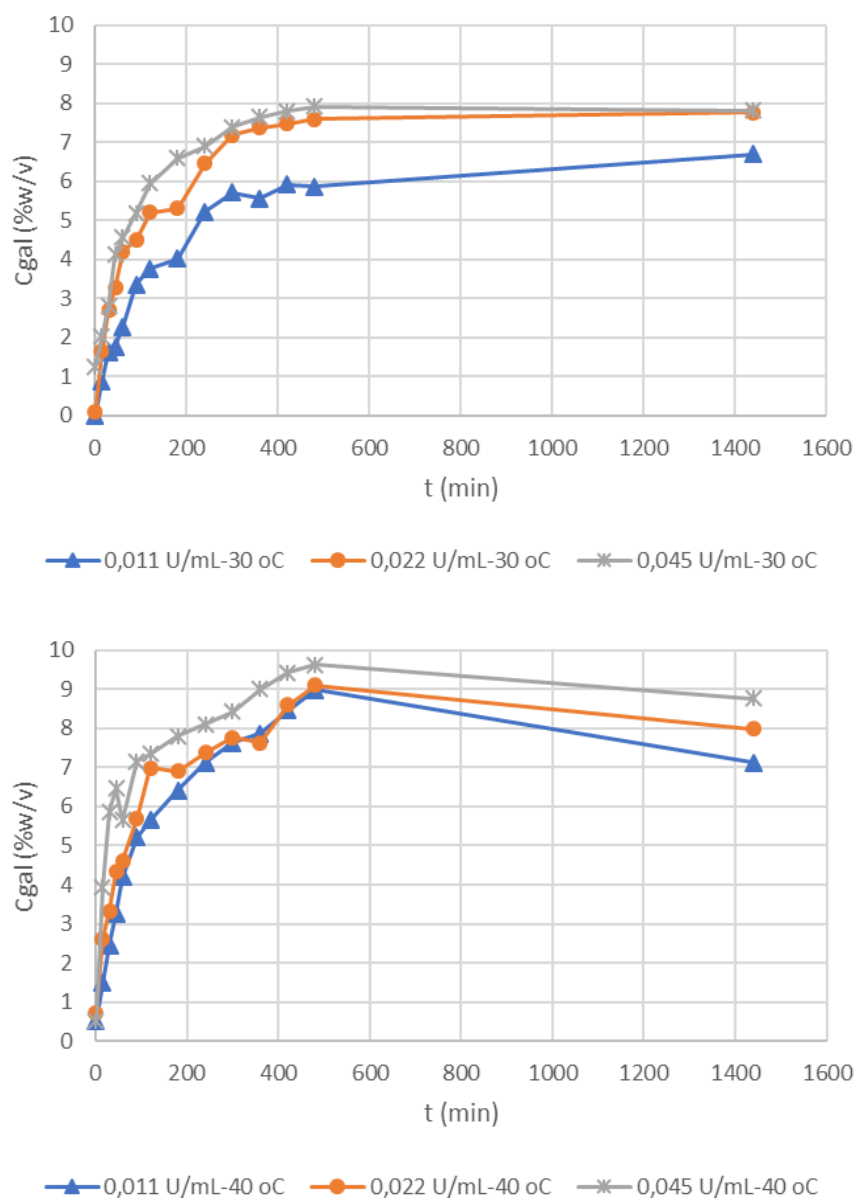
περιεκτικότητας σε λακτόζη 5, 10 και 15% w/v και σε όλες τις αντιδράσεις το υπόστρωμα είχε τιμή pH ίση με 7,0.

Μελετήθηκε η δράση του ενζύμου για ενζυμικό φορτίο 0,011, 0,022 και 0,045 U/mL. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο θερμοκρασίες, 30 και 40 °C, όπως προαναφέρθηκε. Σύμφωνα με την μελέτη της δραστηριότητας του ενζύμου συναρτήσει της θερμοκρασίας και της τιμής του pH, άριστη δράση παρουσιάστηκε σε θερμοκρασία 30 °C και pH=7. Οι παραπάνω τιμές ενεργότητας, λοιπόν, αναφέρονται στις συνθήκες βέλτιστης δράσης του ενζύμου. Για λόγους σύγκρισης, στις ενζυμικές αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν επιδιώχθηκε να προστίθεται η ίδια συγκέντρωση ενζύμου (ενζυμικό φορτίο) κάθε φορά, ανεξαρτήτως της ενεργότητας του ενζύμου στις εκάστοτε θερμοκρασίες. Έτσι, στις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 40 °C χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ενζυμικό φορτίο, υπό την έννοια της ποσότητας του ενζύμου ανά mL αντιδρώντος συστήματος, παρόλο που η τιμή της ενζυμικής ενεργότητας διαφέρει. Έτσι, εφεξής οι παραπάνω τιμές ενζυμικής ενεργότητας θα χρησιμοποιούνται και για τους 30 °C και για τους 40 °C και θα αφορούν σε αντίστοιχο ενζυμικό φορτίο, με τις αναφερόμενες τιμές ενεργότητας να αφορούν στις βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου.

#### 6.3.2.1.1 Μεταβολή συγκέντρωσης μονοσακχαριτών

Αρχικά, παρουσιάζονται τα διαγράμματα μεταβολής της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών στο αντιδρών μείγμα συναρτήσει του χρόνου, για θερμοκρασίες αντίδρασης 30 και 40 °C. Η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών είναι εκφρασμένη ως γαλακτόζη (Διαγράμματα 6.12 έως 6.14). Από τα διαγράμματα παρατηρείται, γενικά, αύξηση στη συγκέντρωση των μονοσακχαριτών στο μείγμα με την πάροδο του χρόνου. Αυτή η τάση προκύπτει από την υδρολυτική δράση του ενζύμου, ενώ γενικά αύξηση του ενζυμικού φορτίου προκαλεί υψηλότερο ποσοστό υδρόλυσης της λακτόζης, άρα μεγαλύτερη συγκέντρωση μονοσακχαριτών στο πέρας της αντίδρασης.

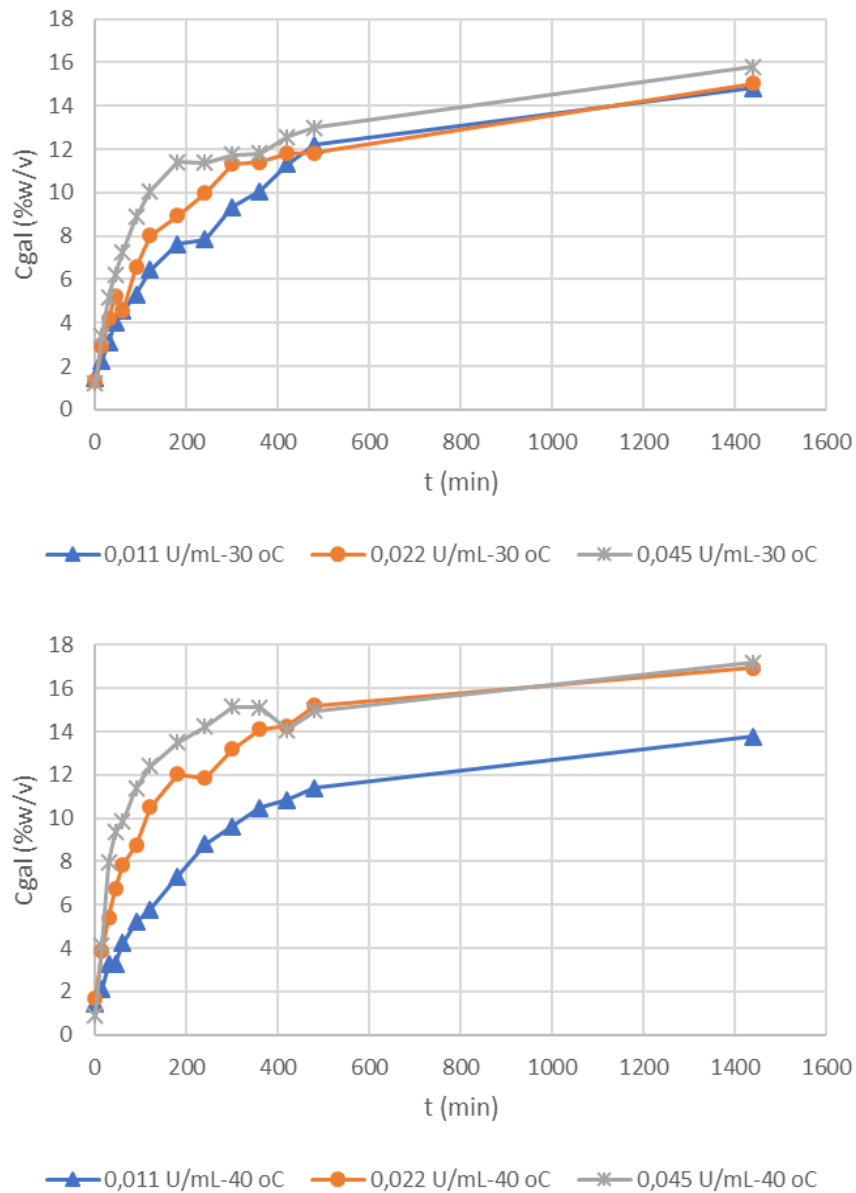




**Διάγραμμα 6.12.** Μεταβολή της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική περιεκτικότητα γλυκού ορού σε λακτόζη 5 % w/v και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση γλυκού ορού με αρχική περιεκτικότητα λακτόζης 5 % w/v παρατηρείται και για τις 2 θερμοκρασίες αντίδρασης συνεχής αύξηση της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών, με μειούμενη κλίση, μέχρι και τις 8 h, ενώ έπειτα παρατηρείται σχεδόν σταθερή συγκέντρωση, μέχρι τις 24 h. Αυτό υποδηλώνει ότι, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης λακτόζης στο υπόστρωμα, αυτή εξαντλείται γρήγορα, οπότε η ενζυμική αντίδραση τερματίζεται σύντομα. Η μέγιστη συγκέντρωση μονοσακχαριτών παρατηρείται για ενεργότητα 0,045 U/mL και είναι 7,92% w/v για την περίπτωση αντίδρασης στους 30 °C και 9,64 % w/v για την περίπτωση αντίδρασης στους 40 °C, στο πέρας της αντίδρασης. Η

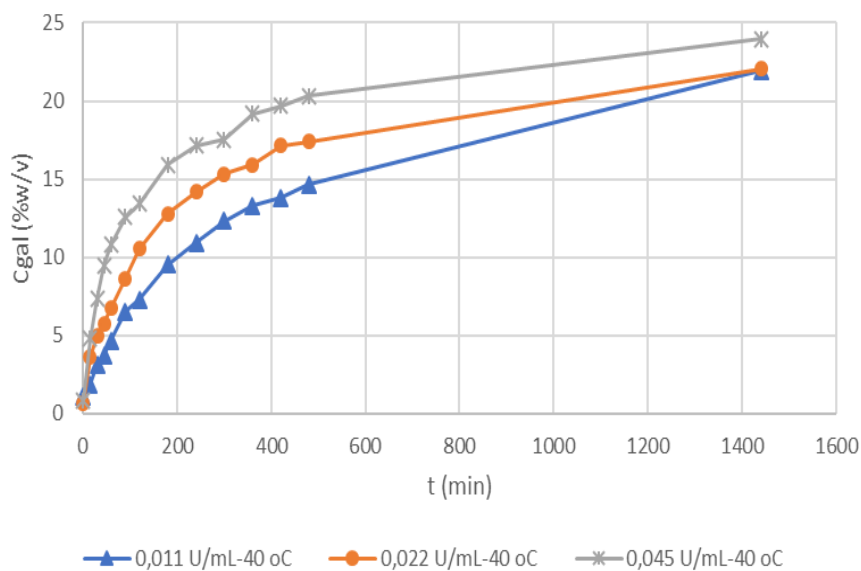
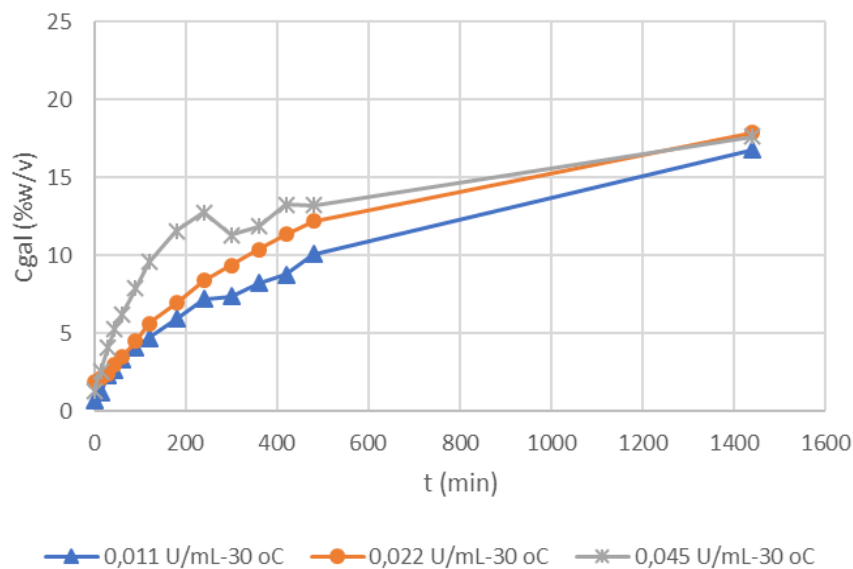
υψηλότερη τελική συγκέντρωση μονοσακχαριτών στην περίπτωση των 40 °C οφείλεται στην υψηλότερη αρχική συγκέντρωση λακτόζης στο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε, λόγω της αναπόφευκτης διακύμανσης από παρτίδα σε παρτίδα τυρογάλακτος.



**Διάγραμμα 6.13.** Μεταβολή της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική περιεκτικότητα γλυκού ορού σε λακτόζη 10 % w/v και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

Αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης στο υπόστρωμα σε 10 % w/v οδήγησε σε μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση μονοσακχαριτών σε σχέση με τα δείγματα που είχαν αρχική συγκέντρωση 5 % w/v, καθώς περισσότερη λακτόζη ήταν διαθέσιμη να αντιδράσει. Ωστόσο, στην περίπτωση αρχικής περιεκτικότητας του ορού σε λακτόζη ίση με 10 % w/v παρατηρείται ότι η

συγκέντρωση των μονοσακχαριτών δεν σταθεροποιείται στις 8 h αντίδρασης, αλλά αυξάνεται ελαφρώς, μέχρι τις 24 h, καθώς λακτόζη εξακολουθεί να είναι διαθέσιμη να αντιδράσει. Μέγιστη συγκέντρωση μονοσακχαριτών παρατηρείται για τη μέγιστη τιμή ενζυμικού φορτίου που χρησιμοποιήθηκε, ίση με 15,8 % w/v για την περίπτωση αντίδρασης στους 30 °C και 17,2% w/v για την περίπτωση αντίδρασης στους 40 °C, στο πέρας της αντίδρασης.



**Διάγραμμα 6.14.** Μεταβολή της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική περιεκτικότητα γλυκού ορού σε λακτόζη 15 % w/v και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

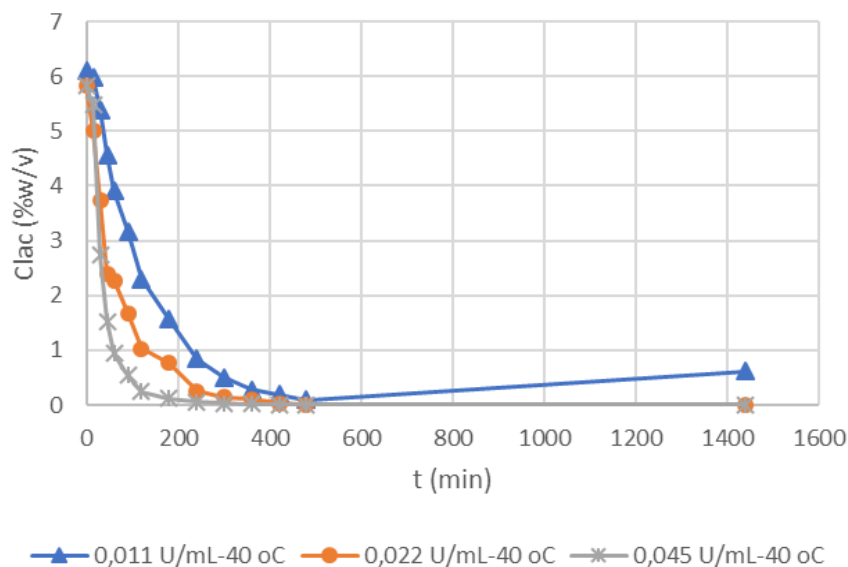
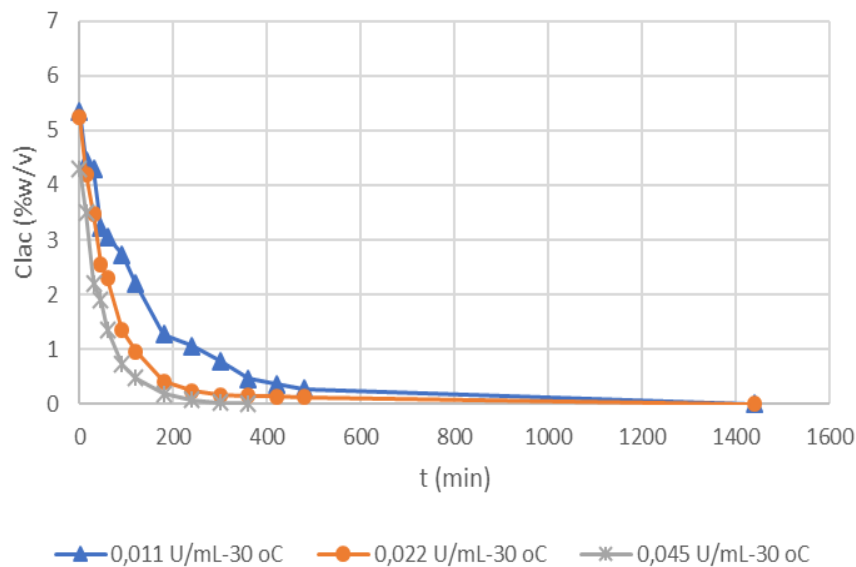
Με περαιτέρω αύξηση της περιεκτικότητας του τυρογάλακτος σε λακτόζη σε 15 % w/v, η τελική συγκέντρωση μονοσακχαριτών ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τα δείγματα που είχαν αρχική συγκέντρωση 5% w/v και 10% w/v. Αυτό ήταν αναμενόμενο, διότι όσο περισσότερη λακτόζη περιέχεται αρχικά στο υπόστρωμα, τόσο περισσότεροι μονοσακχαρίτες θα προκύψουν από την υδρόλυσή της. Επίσης, για τις 24 h που διήρκεσαν οι ενζυμικές αντιδράσεις, η συγκέντρωση μονοσακχαριτών αυξανόταν διαρκώς, γεγονός που δηλώνει ότι το υπόστρωμα δεν εξαντλήθηκε πριν τις 24 h, καθώς η αρχική του συγκέντρωση ήταν ιδιαιτέρως υψηλή. Όμως, σε κάθε περίπτωση, υψηλότερο ενζυμικό φορτίο οδήγησε σε ταχύτερη παραγωγή μονοσακχαριτών, καθώς η κλίση της καμπύλης είναι γενικά μεγαλύτερη, για υψηλότερη τιμή ενζυμικού φορτίου. Για ενεργότητα 0,045 U/mL παρατηρήθηκε μέγιστη τελική συγκέντρωση μονοσακχαριτών, ίση με 17,6% w/v για την περίπτωση αντίδρασης στους 30 °C και 24,0 % w/v για την περίπτωση αντίδρασης στους 40 °C, στο πέρας της αντίδρασης<sup>1</sup>.

#### 6.3.2.1.2 Μεταβολή συγκέντρωσης λακτόζης

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα διαγράμματα μεταβολής της λακτόζης στο αντιδρών μείγμα συναρτήσει του χρόνου, για θερμοκρασίες αντίδρασης 30 °C και 40 °C (Διαγράμματα 6.15 έως 6.17). Από τα διαγράμματα παρατηρείται, γενικά, εκθετική μείωση της συγκέντρωσης της λακτόζης στο μείγμα με τον χρόνο. Αυτό υποδηλώνει την υδρολυτική δράση του ενζύμου ενώ αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου προκαλεί γρηγορότερη υδρόλυση της λακτόζης. Στην έναρξη της αντίδρασης ο μόνος δισακχαρίτης που υπάρχει στο αντιδρών μείγμα είναι η λακτόζη, η οποία αποτελεί και το υπόστρωμα της ενζυμικής αντίδρασης.

Για αρχική περιεκτικότητα του τυρογάλακτος σε λακτόζη ίση με 5% w/v παρατηρείται ταχεία ελάττωση της λακτόζης στο αντιδρών μείγμα, η οποία είτε υδρολύεται προς παραγωγή γαλακτόζης και γλυκόζης, είτε ολιγομερίζεται, μέσω αντιδράσεων τρανσγαλακτοζυλίωσης, προς παραγωγή GOS. Συγκεκριμένα, για την αντίδραση στους 30 °C και για ενζυμικά φορτία 0,045 U/mL και 0,022 U/mL παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης της λακτόζης κάτω από 1% w/v σε χρονικό διάστημα 90 και 120 min, αντίστοιχα, ενώ για ενεργότητα 0,011 U/mL η συγκέντρωση της λακτόζης μειώνεται κάτω από 1% w/v μετά από 5 h αντίδρασης. Γίνεται, λοιπόν, φανερό ότι υψηλότερο ενζυμικό φορτίο οδηγεί σε ταχύτερη εξέλιξη της ενζυμικής αντίδρασης. Αντίστοιχα, στην περίπτωση ενζυμικής αντίδρασης στους 40 °C, παρατηρείται ότι, για αντίστοιχες τιμές ενζυμικού φορτίου, η λακτόζη του υποστρώματος καταναλώνεται ταχύτερα, καθώς για ενζυμικά φορτία 0,011 U/mL, 0,022 U/mL και 0,045 U/mL, η συγκέντρωση λακτόζης μειώνεται κάτω από 1 % w/v σε χρόνους 180 min, 120 min και 45 min, αντίστοιχα. Πάντως, και στις δύο περιπτώσεις θερμοκρασίας αντίδρασης, η λακτόζη έχει, σχεδόν, εξαντληθεί στις πρώτες 8 h αντίδρασης, για

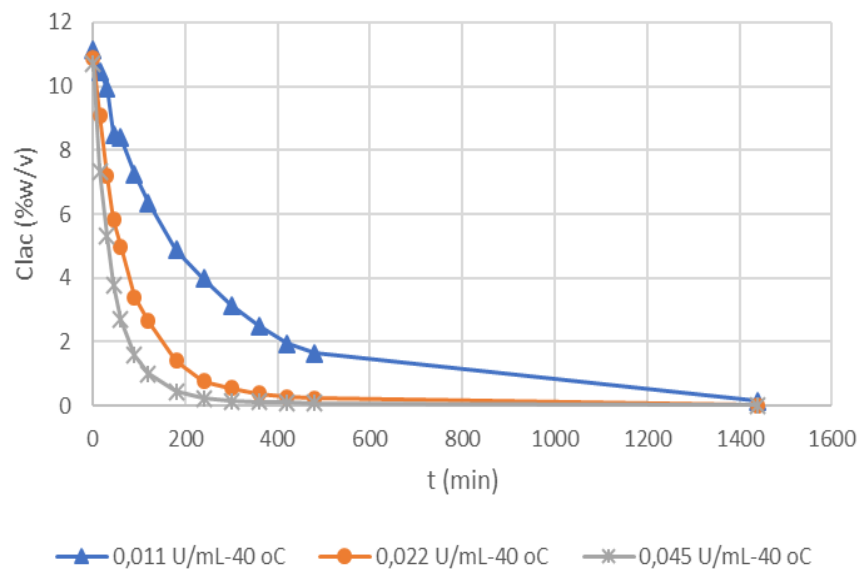
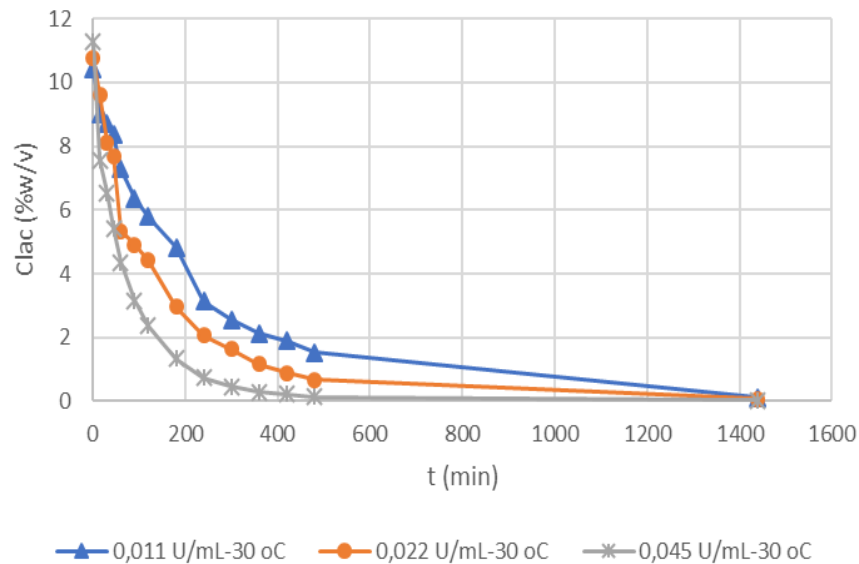
κάθε τιμή ενζυμικού φορτίου, γεγονός που δικαιολογεί την σταθεροποίηση της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών που παρατηρήθηκε παραπάνω.



**Διάγραμμα 6.15.** Μεταβολή της συγκέντρωσης λακτόζης συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική περιεκτικότητα γλυκού ορού σε λακτόζη 5 % w/v και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

Με αύξηση της αρχικής περιεκτικότητας του γλυκού ορού σε λακτόζη σε 10 % w/v, λόγω μεγαλύτερης ποσότητας λακτόζης αρχικά στο μείγμα η αντίδραση διαρκεί περισσότερο χρόνο σε σχέση με την περίπτωση αρχικής περιεκτικότητας σε λακτόζης ίση με 5% w/v. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση ενζυμικής αντίδρασης στους 30 °C παρατηρείται εκθετική μείωση της συγκέντρωσης

περιεχόμενης λακτόζης στον ορό, η οποία επιταχύνεται με την αύξηση του ενζυμικού φορτίου. Για παράδειγμα, μετά από 4 h περιέχεται λακτόζη ίση με 3,10 % w/v, 2,10 % w/v και 0,74 % w/v στο αντιδρών μείγμα, με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,011 U/mL, 0,022 U/mL και 0,045 U/mL, αντίστοιχα.

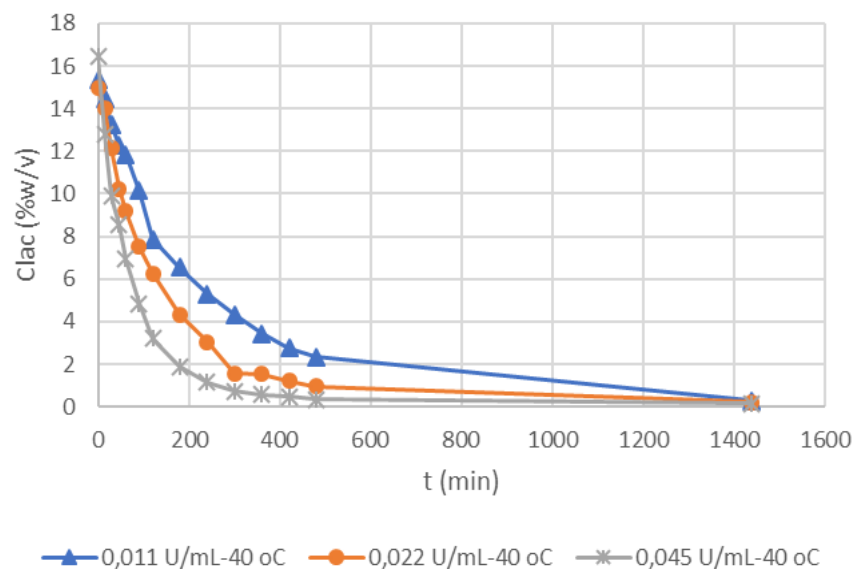
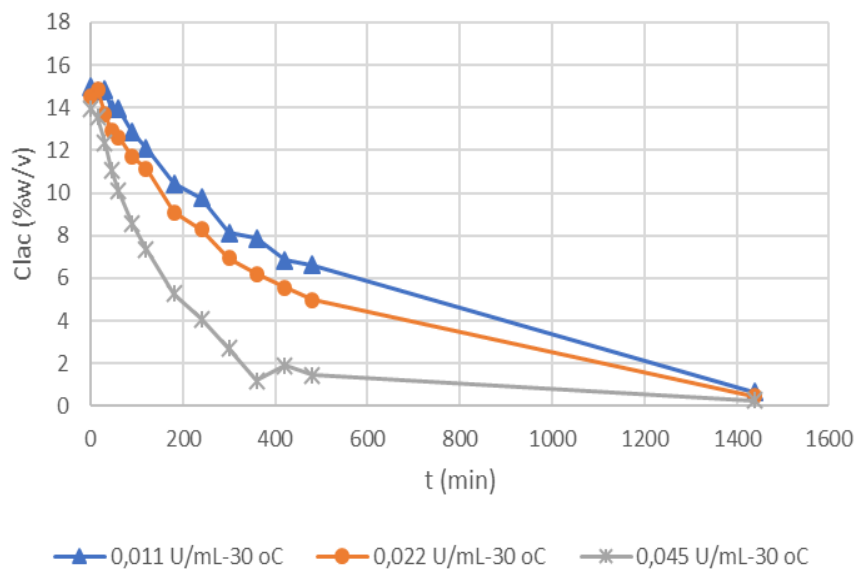


**Διάγραμμα 6.16.** Μεταβολή της συγκέντρωσης λακτόζης συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική περιεκτικότητα γλυκού ορού σε λακτόζη 10 % w/v και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται και στην περίπτωση πραγματοποίησης της ενζυμικής αντίδρασης σε θερμοκρασία 40 °C, όπου αύξηση του ενζυμικού φορτίου επιφέρει αντίστοιχη επιτάχυνση της κατανάλωσης της

λακτόζης. Ωστόσο, στους 40 °C η κατανάλωση της λακτόζης φαίνεται να διεξάγεται ταχύτερα, για αντίστοιχες τιμές ενζυμικού φορτίου με αυτές στους 30 °C. Ενδεικτικά, μετά από 4 h αντίδρασης έχει απομείνει στο αντιδρών σύστημα 4,00 % w/v, 0,77 % w/v και 0,23 % w/v λακτόζη.

Στην περίπτωση αρχικής περιεκτικότητας του γλυκού ορού σε λακτόζη ίση με 15 % w/v παρατηρείται ότι με διεξαγωγή της ενζυμικής αντίδρασης στους 30 °C, η περιεχόμενη λακτόζη στον γλυκό ορό δεν εξαντλείται πριν τις 8 h αντίδρασης, για τις δεδομένες τιμές ενζυμικού φορτίου που χρησιμοποιήθηκαν.



**Διάγραμμα 6.17.** Μεταβολή της συγκέντρωσης λακτόζης συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική περιεκτικότητα γλυκού ορού σε λακτόζη 15 % w/v και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

Μετά από 8 h αντίδρασης, η περιεχόμενη λακτόζη στο αντιδρών σύστημα μειώθηκε σε 6,63% w/v, 4,97 % w/v και 1,45% w/v, για τιμές ενζυμικού φορτίου 0,011 U/mL, 0,022 U/mL και 0,045 U/mL, αντίστοιχα.

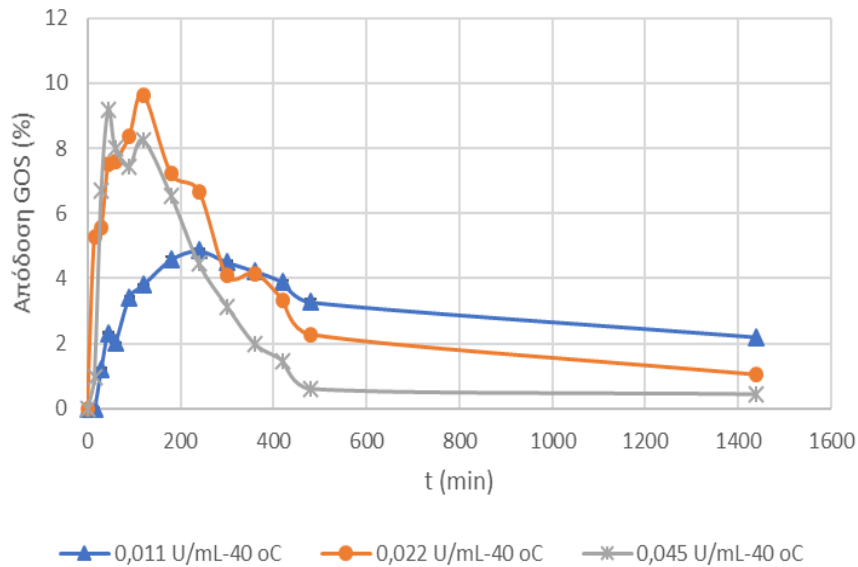
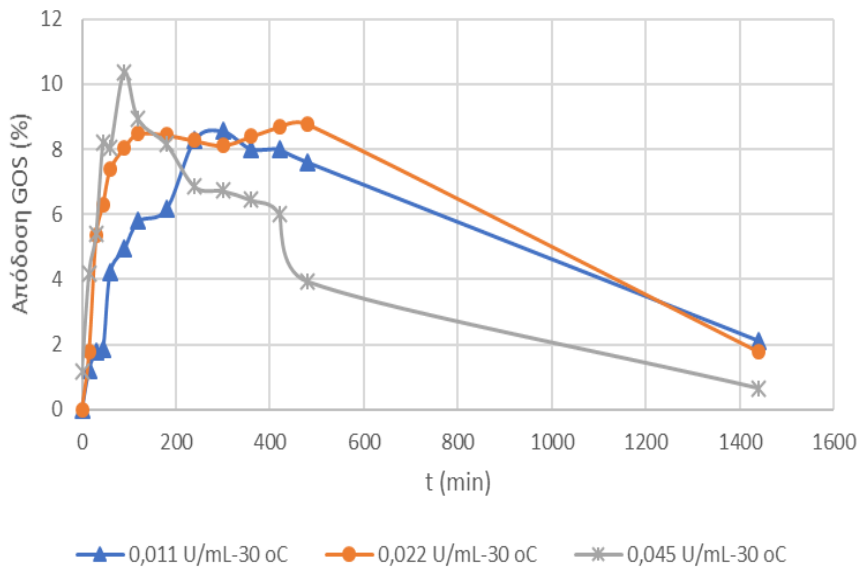
Από την άλλη, στην περίπτωση διεξαγωγής της ενζυμικής αντίδρασης στους 40 °C φάνηκε η λακτόζη να καταναλώνεται ταχύτερα, η οποία σχεδόν εξαντλείται μέχρι τις 8 h αντίδρασης, για την μέγιστη τιμή ενζυμικού φορτίου που μελετήθηκε. Μετά από 8 h αντίδρασης, η περιεχόμενη λακτόζη στο αντιδρών σύστημα μειώθηκε σε 2,33% w/v, 0,96 % w/v και 0,34% w/v, για τιμές ενζυμικού φορτίου 0,011 U/mL, 0,022 U/mL και 0,045 U/mL, αντίστοιχα.

#### 6.3.2.1.3 Μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)

Ολοκληρώνοντας την πρώτη ενότητα των αποτελεσμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων, παρουσιάζονται τα διαγράμματα μεταβολής της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης, για θερμοκρασίες αντίδρασης 30 °C και 40 °C (Διαγράμματα 6.18 έως 6.20). Με την πάροδο του χρόνου αντίδρασης, η β-γαλακτοζιδάση εκτός από την αντίδραση υδρόλυσης της λακτόζης, καταλύει παράλληλα και την αντίδραση σχηματισμού γαλακτοολιγοσακχαριτών (τρανσγαλακτοζυλίωση). Ως γαλακτοολιγοσακχαρίτες λαμβάνονται δισακχαρίτες διαφορετικοί της λακτόζης, τρισακχαρίτες, τετρασακχαρίτες και πεντασακχαρίτες. Από τα διαγράμματα παρατηρείται συνεχής αύξηση της απόδοσης των GOS στο μείγμα μέχρι μια μέγιστη τιμή. Από τη στιγμή που το σύστημα φτάσει στη μέγιστη απόδοση ακολουθεί μείωση αυτής. Η πτωτική αυτή τάση της απόδοσης των γαλακτοολιγοσακχαριτών οφείλεται στην περαιτέρω υδρόλυση των σχηματιζόμενων GOS από τη β-γαλακτοζιδάση. Γενικά, αύξηση του ενζυμικού φορτίου στο αντιδρών σύστημα οδήγησε είτε σε αύξηση της μέγιστης απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS, είτε σε μείωση του απαιτούμενου χρόνου για την επίτευξη αυτής της απόδοσης, είτε, σε πολλές περιπτώσεις, και στα δύο, συνδυαστικά.

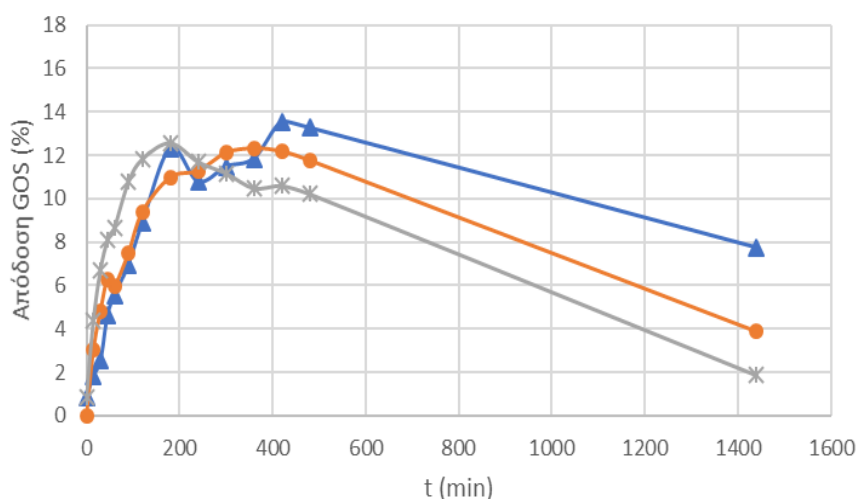
Για αρχική περιεκτικότητα του τυρογάλακτος σε λακτόζη ίση με 5% w/v και αντίδραση στους 30 °C παρατηρείται μέγιστη απόδοση σε GOS ίση με 8,56% έπειτα από 5 h, για ενζυμικό φορτίο 0,011 U/mL. Αύξηση του ενζυμικού φορτίου σε 0,022 U/mL συνεπάγεται παρόμοια απόδοση σε GOS (8,47%), η οποία, όμως επιτυγχάνεται μετά από 2 h αντίδρασης. Διπλασιασμός, δηλαδή, του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε μείωση του απαιτούμενου χρόνου για την επίτευξη της μέγιστης απόδοσης σε GOS κατά 2,5 φορές. Περαιτέρω αύξηση του ενζυμικού φορτίου, σε 0,045 U/mL οδήγησε τόσο σε αύξηση της μέγιστης απόδοσης σε GOS σε 10,4%, όσο και σε μείωση του απαιτούμενου χρόνου αντίδρασης για την επίτευξη αυτής της τιμής σε 90 min.



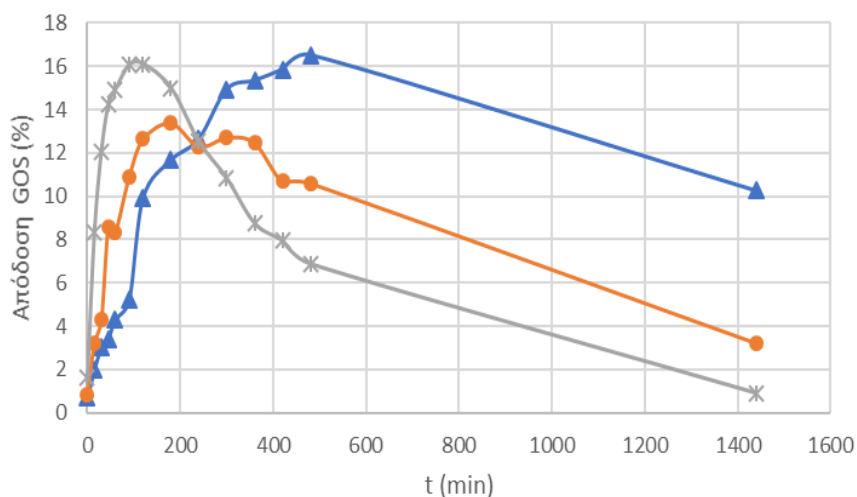


**Διάγραμμα 6.18.** Μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική περιεκτικότητα γλυκού ορού σε λακτόζη 5 % w/v και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

Όσον αφορά τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 40 °C, παρατηρείται ότι για ενζυμικό φορτίο ίσο με 0,011 U/mL επιτεύχθηκε μέγιστη απόδοση σε GOS ίση με 4,86 %, έπειτα από 4 h αντίδρασης. Με διπλασιασμό του ενζυμικού φορτίου σε 0,022 U/mL, η μέγιστη απόδοση σε GOS διπλασιάστηκε, ανερχόμενη σε 9,64 % και επιτεύχθηκε έπειτα από 2 h αντίδρασης. Περαιτέρω αύξηση του ενζυμικού φορτίου σε 0,045 U/mL οδήγησε σε παρόμοια απόδοση σε GOS (9,18 %), ωστόσο ο χρόνος επίτευξης αυτής μειώθηκε στα 30 min.



—▲— 0,011 U/mL-30 °C    —●— 0,022 U/mL-30 °C    —\*— 0,045 U/mL-30 °C



—▲— 0,011 U/mL-40 °C    —●— 0,022 U/mL-40 °C    —\*— 0,045 U/mL-40 °C

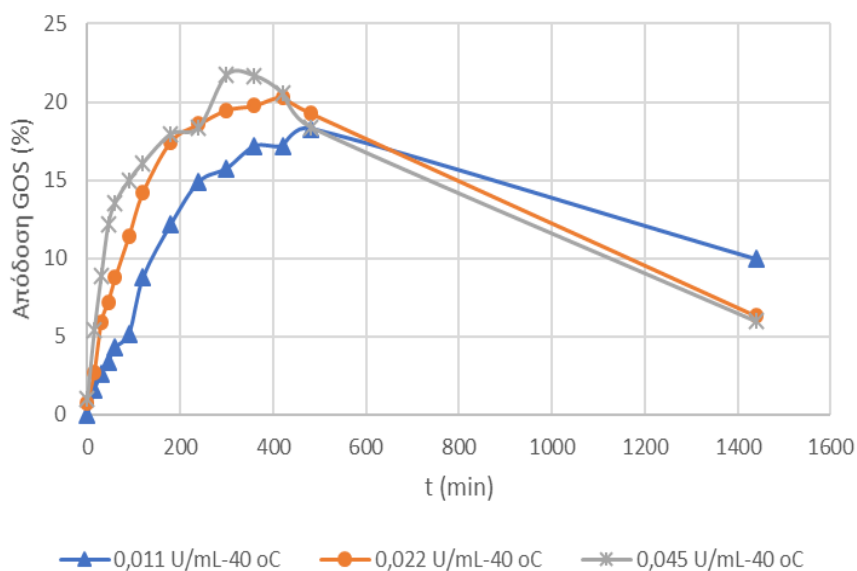
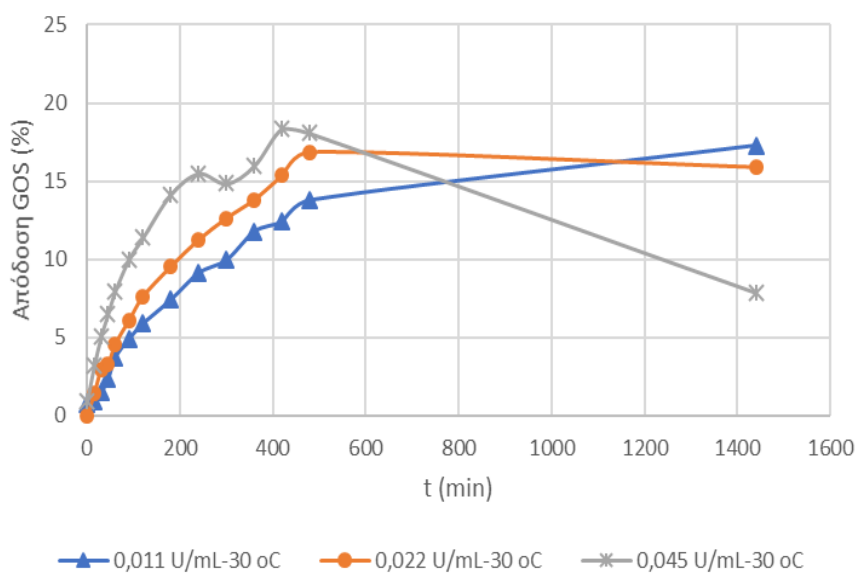
**Διάγραμμα 6.19.** Μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική περιεκτικότητα γλυκού ορού σε λακτόζη 10 % w/v και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

Στην περίπτωση αρχικής περιεκτικότητας του γλυκού ορού σε λακτόζη ίση με 10 % w/v παρατηρείται ότι με την πραγματοποίηση των ενζυμικών αντιδράσεων στους 30 °C και με ενζυμικό φορτίο 0,011 U/mL, μέγιστη απόδοση σε GOS ίση με 13,6 % προέκυψε έπειτα από 7 h αντίδρασης. Με διπλασιασμό (0,022 U/mL) και τετραπλασιασμό (0,045 U/mL) του ενζυμικού φορτίου η απόδοση σε GOS δεν μεταβλήθηκε σημαντικά (12,3 και 12,6%, αντίστοιχα), ωστόσο μειώθηκε ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη της μέγιστη απόδοσης σε GOS σε 6 και 3 h, αντίστοιχα.

Αντίστοιχα, στην περίπτωση πραγματοποίησης των ενζυμικών αντιδράσεων στους 40 °C παρατηρήθηκαν υψηλότεροι βαθμοί απόδοσης σε GOS, συγκριτικά με τους 30 °C. Συγκεκριμένα, για ενζυμικό φορτίο 0,011 U/mL επιτεύχθηκε μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS ίσος με 16,5%, έπειτα από 8 h αντίδρασης. Με αύξηση του ενζυμικού φορτίου σε 0,022 U/mL ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS που επιτεύχθηκε ήταν μικρότερος (13,4%), εμφανίστηκε, όμως, έπειτα από 3 h αντίδρασης. Με επιπλέον αύξηση του ενζυμικού φορτίου σε 0,045 U/mL, ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS ήταν αντίστοιχος αυτού που επιτεύχθηκε με ενζυμικό φορτίο 0,011 U/mL (16,1%), επιτεύχθηκε, όμως, σε μόλις 2 h, χρόνος μικρότερος κατά 6 φορές από τον αντίστοιχο για την μικρότερη τιμή ενζυμικού φορτίου.

Με αύξηση της περιεκτικότητας του τυρογάλακτος σε λακτόζη σε 15 % w/v παρατηρήθηκε, σε όλες τις συνθήκες, υψηλότερες τιμές μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS, ενώ αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδήγησε σε αύξηση του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS. Συγκεκριμένα, για την περίπτωση ενζυμικής αντίδρασης στους 30 °C και για ενζυμικό φορτίο ίσο με 0,011 U/mL ο βαθμός απόδοσης σε GOS αυξανόταν καθ' όλη τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης, χωρίς να παρατηρηθεί κάποια μέγιστη τιμή και έπειτα μείωση, μέχρι τις 24 h αντίδρασης. Ο βαθμός απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS ήταν, έπειτα από 24 h αντίδρασης, ίσος με 17,3%. Αυξάνοντας το ενζυμικό φορτίο σε 0,022 U/mL παρατηρήθηκε αύξηση του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS σε 16,9% στις 8 h αντίδρασης, ενώ μετά από 24 h αντίδρασης παρατηρήθηκε ελαφρά μείωση του βαθμού απόδοσης σε 15,9%. Με περαιτέρω αύξηση του ενζυμικού φορτίου στα 0,045 U/mL επιτεύχθηκε ακόμα υψηλότερος μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS, ίσος με 18,4%, έπειτα από 7 h, ενώ στις 24 h αντίδρασης ο βαθμός απόδοσης σε GOS μειώθηκε σε 7,88%.

Στην περίπτωση της ενζυμικής αντίδρασης στους 40 °C παρατηρήθηκαν ακόμα υψηλότεροι μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS, συγκριτικά με αυτούς στους 30 °C, οι οποίοι επιτεύχθηκαν και σε μικρότερους χρόνους αντίδρασης. Συγκεκριμένα, για ενζυμικό φορτίο ίσο με 0,011 U/mL παρατηρήθηκε μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS ίσος με 18,3% έπειτα από 8 h αντίδρασης. Στην περίπτωση χρήσης ενζυμικού φορτίου ίσο με 0,022 U/mL, ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS αυξήθηκε σε 20,3%, έπειτα από 7 h αντίδρασης, ενώ με αύξηση του ενζυμικού φορτίου σε 0,045 U/mL, ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS ανήλθε σε 21,7%, έπειτα από 5 h αντίδρασης. Και στις τρεις συνθήκες ενζυμικού φορτίου, οι παραγόμενοι γαλακτοολιγοσακχαρίτες υδρολύονταν μετά την επίτευξη της μέγιστης συγκέντρωσή τους, μέχρι τις 24 h αντίδρασης.



**Διάγραμμα 6.20.** Μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική περιεκτικότητα γλυκού ορού σε λακτόζη 15 % w/v και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

Συγκρίνοντας τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, προκύπτει ότι οι ενζυμικές αντιδράσεις σχηματισμού γαλακτοολιγοσακχαριτών στους 40 °C είναι περισσότερο αποδοτικές, σε σύγκριση με αυτές στους 30 °C, για αντίστοιχες τιμές ενζυμικού φορτίου. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται, εκ πρώτης όψευς, σε αντίθεση με την μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας συναρτήσει της θερμοκρασίας που παρουσιάστηκε στην ενότητα 6.3.1 καθώς από την μελέτη αυτή προέκυψε βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου οι 30 °C, με την ενεργότητα να υποδεκαπλασιάζεται στους

40 °C. Ήταν, λοιπόν, αναμενόμενο στους 40 °C που ίδια ποσότητα ενζύμου (ενζυμικό φορτίο) παρουσιάζει χαμηλότερη ενεργότητα, η εξέλιξη των ενζυμικών αντιδράσεων να είναι αντίστροφη αυτής που προέκυψε, αποδίδοντας λιγότερο σε GOS. Ωστόσο, αυτή η απόκλιση των αποτελεσμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων με την μελέτη της δραστηριότητας του ενζύμου οφείλεται, πιθανώς, στο γεγονός ότι στην περίπτωση μελέτης της ενζυμικής ενεργότητας χρησιμοποιείται η οNPG ως υπόστρωμα και μετριέται το προϊόν της αντίδρασης υδρόλυσης αυτής, ενώ στην περίπτωση της μελέτης της παραγωγής GOS μετρώνται τα προϊόντα των αντιδράσεων ολιγομερισμού της λακτόζης (τρανσγαλακτοζυλίωση), αντιδράσεις οι οποίες, εκ του αποτελέσματος, φαίνεται να είναι περισσότερο αποδοτικές στους 40 °C.

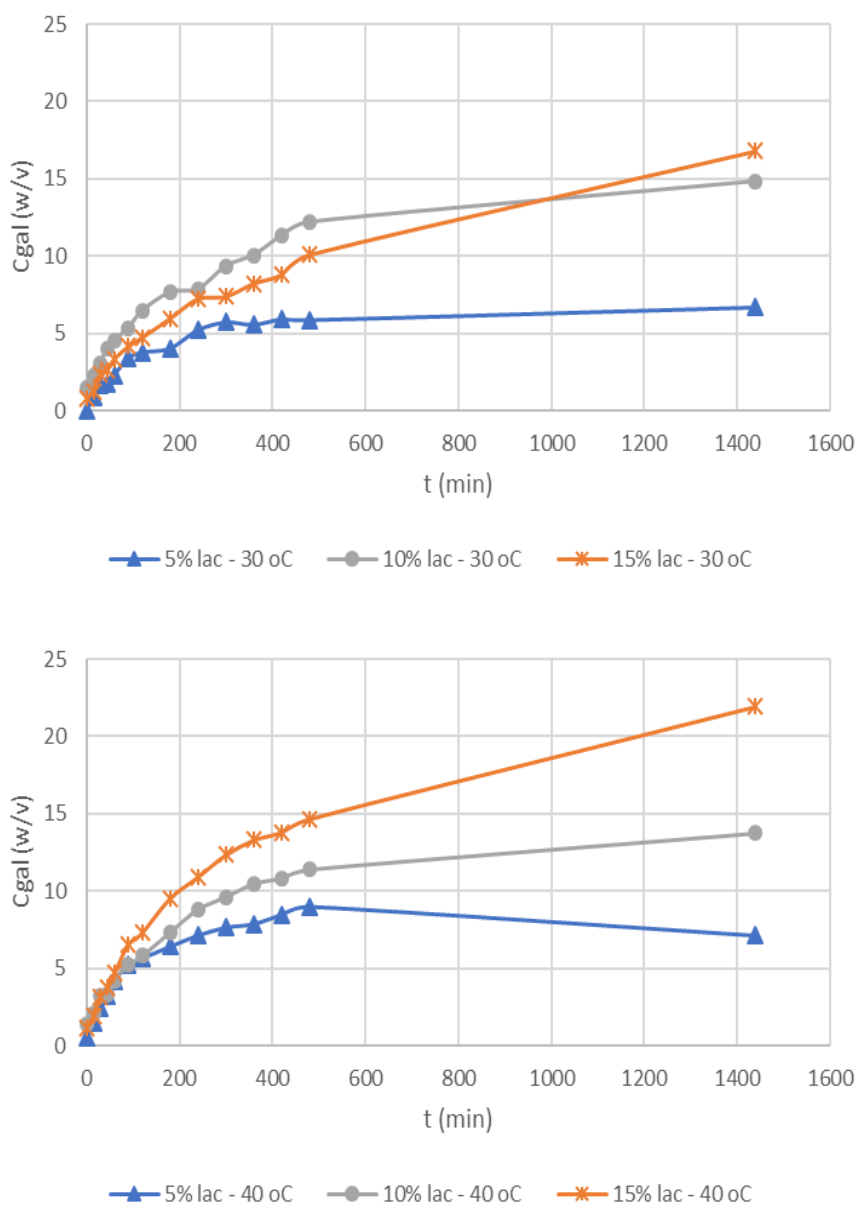
### *6.3.2.2 Επίδραση της συγκέντρωσης της λακτόζης στην ενζυμική αντίδραση*

Σε δεύτερη φάση, θα παρουσιασθούν και θα σχολιασθούν τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων από τη σκοπιά της επίδρασης της αρχικής περιεκτικότητας του γλυκού ορού σε λακτόζη σε αυτές, για κάθε τιμή ενζυμικού φορτίου β-γαλακτοζιδάσης, για τις 2 τιμές θερμοκρασίας στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι ενζυμικές αντιδράσεις. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με ενζυμικό φορτίο β-γαλακτοζιδάσης 0,011 U/mL, 0,022 U/mL και 0,045 U/mL και σε όλες τις αντιδράσεις το υπόστρωμα είχε τιμή pH ίση με 7,0.

Μελετήθηκε η δράση του ενζύμου για αρχικές περιεκτικότητες τυρογάλακτος σε λακτόζη ίση με 5%, 10% και 15% w/v. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο θερμοκρασίες, 30 και 40 °C, όπως προαναφέρθηκε.

#### *6.3.2.1.1 Μεταβολή συγκέντρωσης μονοσακχαριτών*

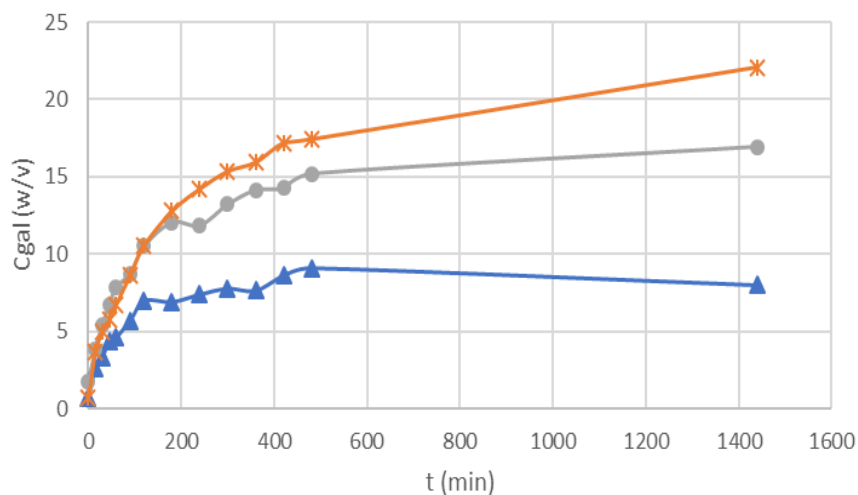
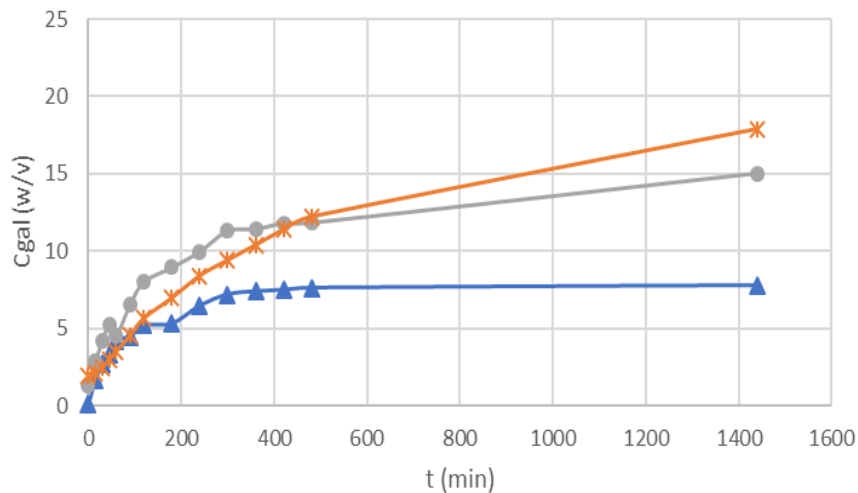
Αρχικά, παρουσιάζονται τα διαγράμματα μεταβολής της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών στο αντιδρών μείγμα συναρτήσει του χρόνου, για θερμοκρασίες αντίδρασης 30 και 40 °C. Η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών είναι εκφρασμένη ως γαλακτόζη (Διαγράμματα 6.21 έως 6.23). Από τα διαγράμματα παρατηρείται, γενικά, αύξηση του ενζυμικού φορτίου προκαλεί υψηλότερο ποσοστό υδρόλυσης της λακτόζης, άρα και μεγαλύτερη συγκέντρωση μονοσακχαριτών στο πέρας της αντίδρασης. Ακόμη, αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης στο αντιδρών μείγμα οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών στο μείγμα με την πάροδο του χρόνου. Αυτή η τάση προκύπτει από την υδρόλυση περισσότερης ποσότητας λακτόζης απελευθερώνοντας στο μείγμα περισσότερα μόρια γαλακτόζης και γλυκόζης.



**Διάγραμμα 6.21.** Μεταβολή της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμικό φορτίο 0,011 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση γλυκού ορού με ενζυμικό φορτίο 0,011 U/mL παρατηρείται και στις 2 θερμοκρασίες συνεχής αύξηση της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών. Στα πειράματα με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 5% w/v λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης λακτόζης στο υπόστρωμα η ενζυμική αντίδραση τερματίζεται συντομότερα, σε αντίθεση με τα πειράματα αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης 10% και 15% w/v που η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών αυξάνεται αισθητά μέχρι και τις 24 h. Ακόμη, παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση μονοσακχαριτών καθ' όλη τη χρονική διάρκεια της αντίδρασης στους 40 °C σε

σχέση με τους 30 °C. Η μέγιστη συγκέντρωση μονοσακχαριτών παρατηρείται για συγκέντρωση λακτόζης 15% w/v και είναι 16,8 % w/v για την περίπτωση αντίδρασης στους 30 °C και 21,9 % w/v για την περίπτωση αντίδρασης στους 40 °C, στο πέρας της αντίδρασης.

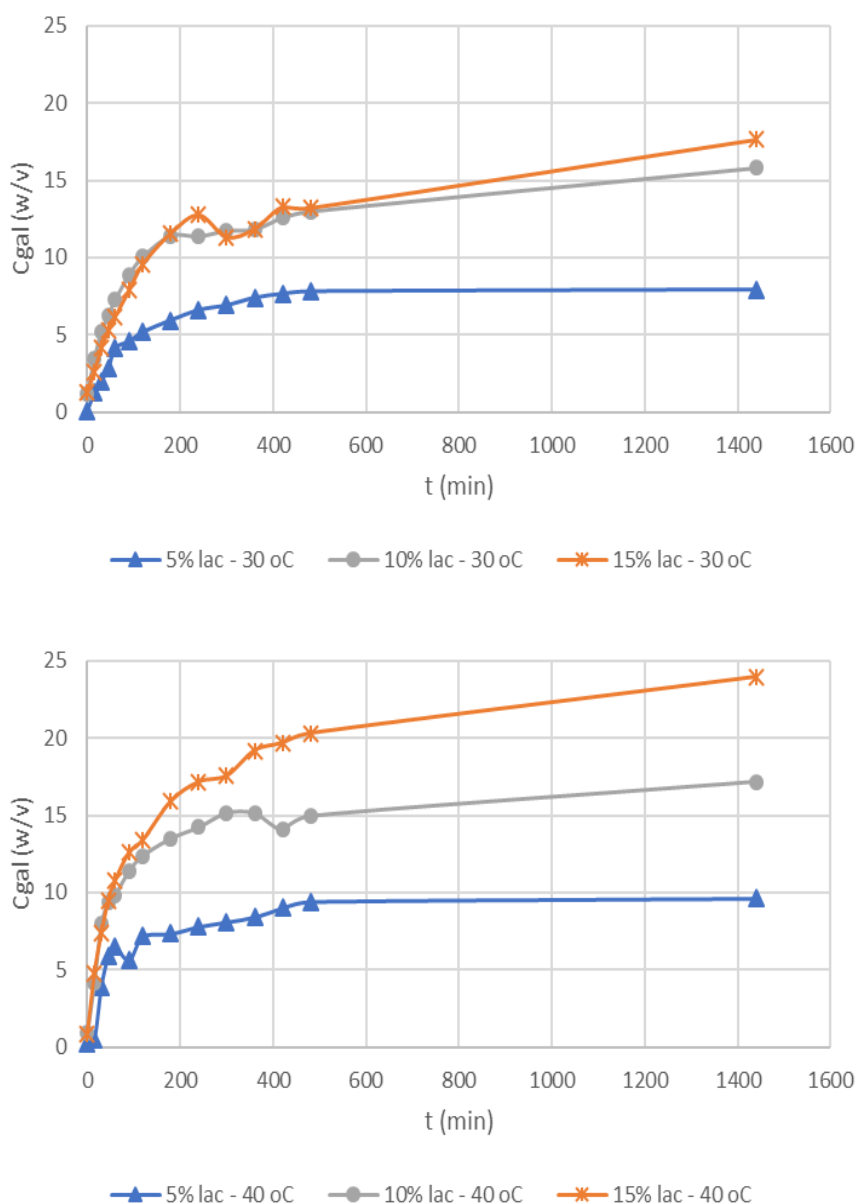


**Διάγραμμα 6.22.** Μεταβολή της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμικό φορτίο 0,022 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

Αύξηση του ενζυμικού φορτίου, και συγκεκριμένα διπλασιασμός του, σε 0,022 U/mL, οδήγησε σε ίδια επίπεδα συγκέντρωσης μονοσακχαριτών σε σχέση με τα δείγματα που είχαν ενζυμικό φορτίο ίσο με 0,011 U/mL. Ωστόσο, παρατηρείται επίτευξη υψηλών συγκεντρώσεων μονοσακχαριτών σε γρηγορότερο χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, για την αντίδραση στους 30 °C και για ενζυμικό φορτίο 0,022 U/mL για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 10% και 15% w/v παρατηρείται συγκέντρωση μονοσακχαριτών πάνω από 10% w/v σε χρονικό διάστημα 4 και 3 h, αντίστοιχα, ενώ για ενεργότητα 0,011 U/mL η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών είναι πάνω από 10% w/v σε χρονικό διάστημα 6 και 8 h, αντίστοιχα. Ομοίως, στην περίπτωση ενζυμικής αντίδρασης στους 40 °C και για ενζυμικό φορτίο 0,022 U/mL για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 15% w/v παρατηρείται συγκέντρωση μονοσακχαριτών πάνω από 10% w/v σε χρονικό διάστημα 2 h, ενώ για ενεργότητα 0,011 U/mL η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών είναι πάνω από 10% w/v σε χρονικό διάστημα 4 h. Γίνεται, λοιπόν, φανερό ότι υψηλότερο ενζυμικό φορτίο οδηγεί σε ταχύτερη εξέλιξη της ενζυμικής αντίδρασης και υψηλότερη συγκέντρωση λακτόζης στο αρχικό αντιδρών μείγμα οδηγεί σε υψηλότερη παραγωγή μονοσακχαριτών. Επιπλέον, παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση μονοσακχαριτών καθ' όλη τη χρονική διάρκεια της αντίδρασης στους 40 °C σε σχέση με τους 30 °C.

Με ακόμη μεγαλύτερη αύξηση του ενζυμικού φορτίου σε 0,045 U/mL η ενζυμική αντίδραση πραγματοποιείται πιο γρήγορα από τις περιπτώσεις που το ενζυμικό φορτίο ήταν 0,011 και 0,022 U/mL. Συγκεκριμένα, για συγκέντρωση λακτόζης 15% επιτυγχάνεται συγκέντρωση μονοσακχαριτών μεγαλύτερη από 10% w/v σε χρονικό διάστημα 1 h για ενζυμικό φορτίο 0,045 U/ml σε αντίθεση με 2 και 4 h που απαιτούνται όταν το ενζυμικό φορτίο είναι 0,022 και 0,011 U/mL αντίστοιχα. Επιπλέον, περαιτέρω αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης στον γλυκό ορό οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση μονοσακχαριτών. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς περισσότερα μόρια λακτόζης υδρολύονται απελευθερώνοντας στο μείγμα περισσότερα μόρια μονοσακχαριτών. Στην περίπτωση γλυκού ορού με αρχική περιεκτικότητα λακτόζης 5 % w/v παρατηρείται και για τις 2 θερμοκρασίες αντίδρασης συνεχής αύξηση της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών μέχρι και τις 8 h, ενώ μέχρι τις 24 h η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών παραμένει σταθερή. Αυτό υποδηλώνει ότι, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης λακτόζης στο υπόστρωμα, αυτή εξαντλείται γρήγορα, οπότε η ενζυμική αντίδραση τερματίζεται σύντομα. Τέλος, και σε αυτό το ενζυμικό φορτίο παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση μονοσακχαριτών καθ' όλη τη χρονική διάρκεια της αντίδρασης στους 40 °C σε σχέση με τους 30 °C.



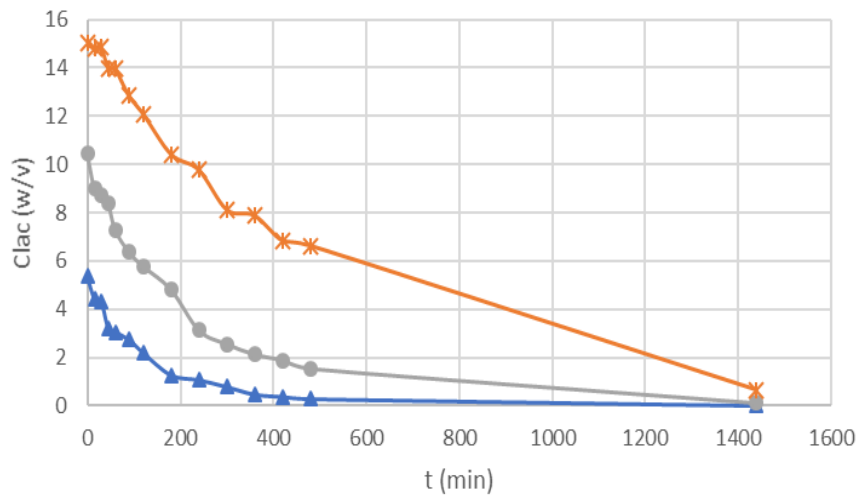


**Διάγραμμα 6.23.** Μεταβολή της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών εκφρασμένων ως γαλακτόζη συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμικό φορτίο 0,045 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

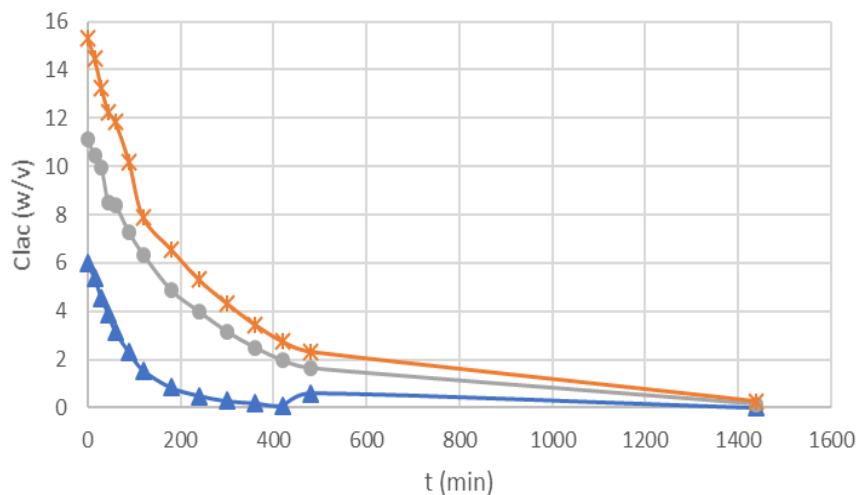
#### 6.3.2.1.2 Μεταβολή συγκέντρωσης λακτόζης

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα διαγράμματα μεταβολής της λακτόζης στο αντιδρών μείγμα συναρτήσει του χρόνου, για θερμοκρασίες αντίδρασης 30 °C και 40 °C (Διαγράμματα 6.24 έως 6.26). Από τα διαγράμματα παρατηρείται, γενικά, εκθετική μείωση της συγκέντρωσης της λακτόζης στο μείγμα με τον χρόνο. Αυτό υποδηλώνει την υδρολυτική δράση του ενζύμου ενώ αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου προκαλεί γρηγορότερη υδρόλυση της λακτόζης και αύξηση της αρχικής

συγκέντρωσης λακτόζης οδηγεί σε μεγαλύτερη συνολική διάρκεια αντίδρασης. Στην έναρξη της αντίδρασης ο μόνος διασακχαρίτης που υπάρχει στο αντιδρών μείγμα είναι η λακτόζη, η οποία αποτελεί και το υπόστρωμα της ενζυμικής αντίδρασης.



▲ 5% lac - 30 °C    ● 10% lac - 30 °C    ✱ 15% lac - 30 °C

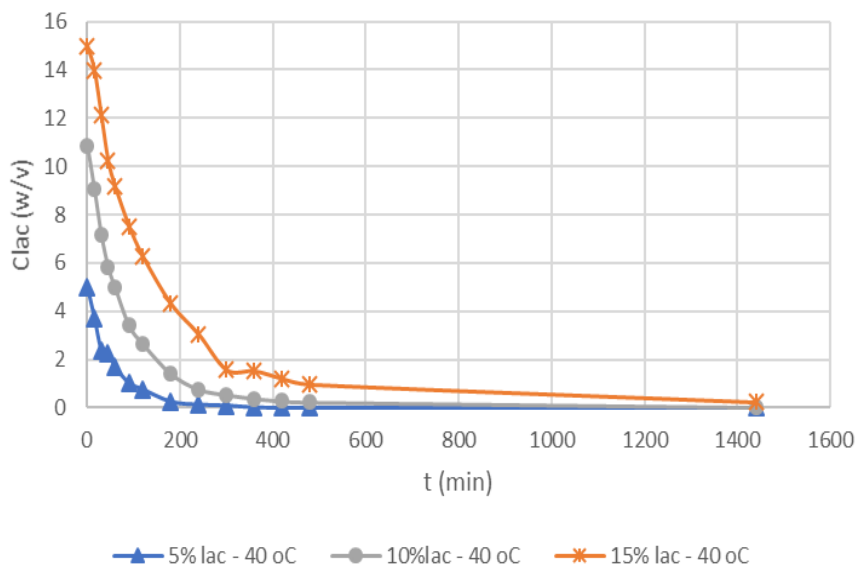
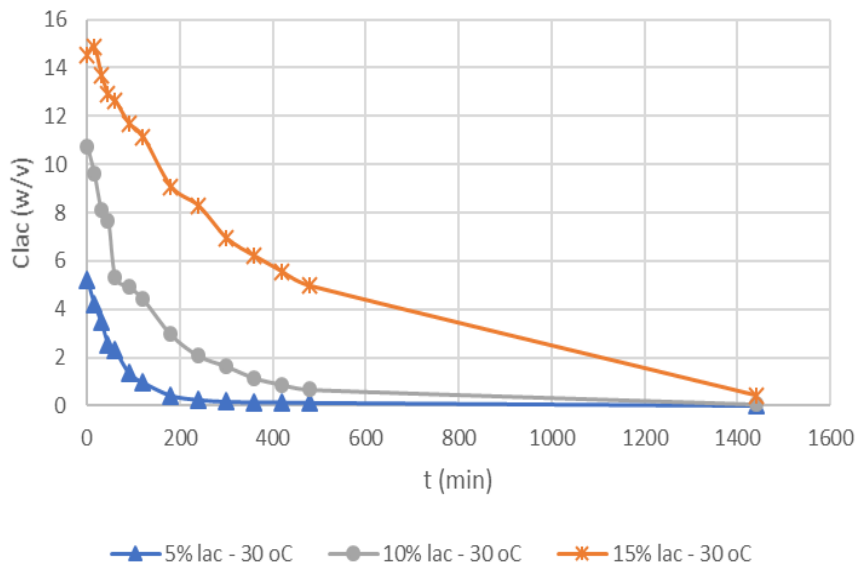


▲ 5% lac - 40 °C    ● 10% lac - 40 °C    ✱ 15% lac - 40 °C

**Διάγραμμα 6.24.** Μεταβολή της συγκέντρωσης λακτόζης συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμικό φορτίο 0,011 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

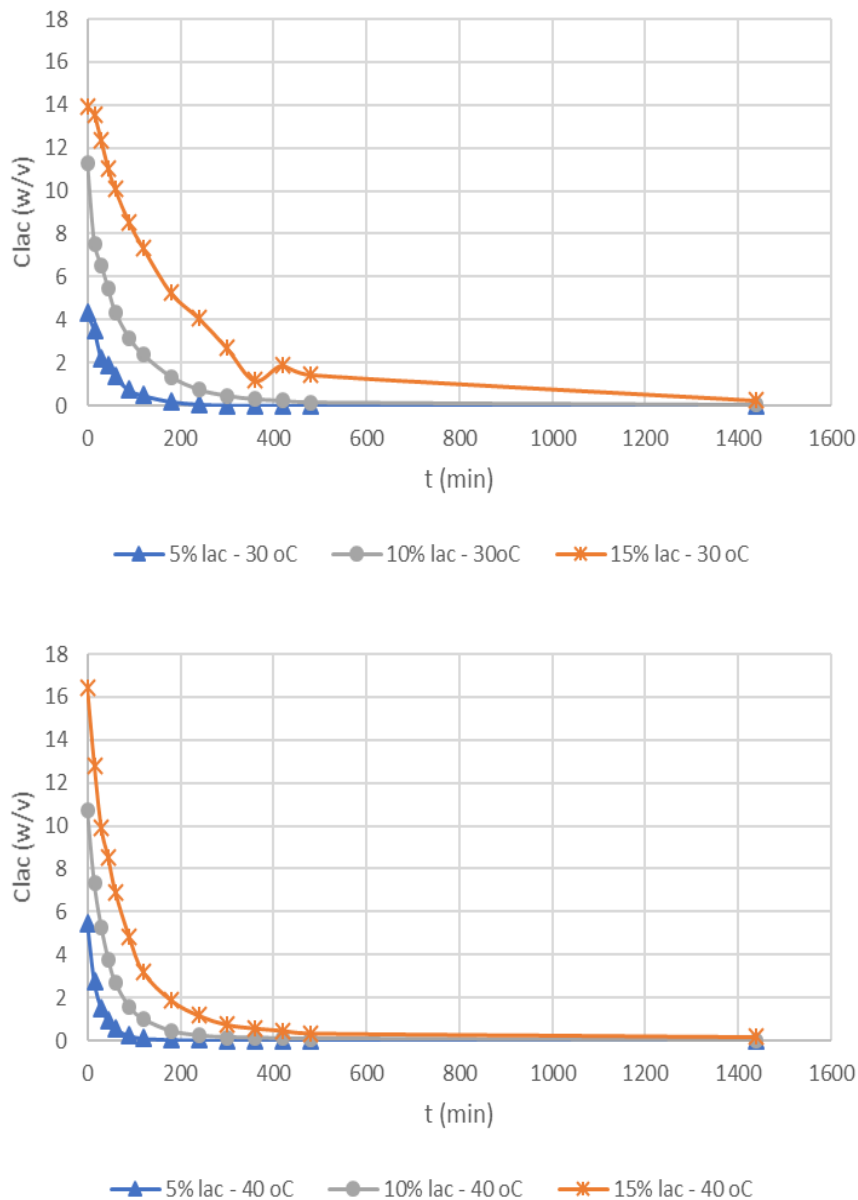
Για ενζυμικό φορτίο 0,011 U/mL παρατηρείται αργή μείωση της λακτόζης στο αντιδρών μείγμα, η οποία είτε ολιγομερίζεται προς παραγωγή GOS είτε υδρολύεται προς παραγωγή γαλακτόζης και γλυκόζης. Επιπλέον, παρατηρείται

για συγκέντρωση λακτόζης 5% w/v η ενζυμική αντίδραση να τερματίζει σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα σε σχέση με τις περιπτώσεις που η αρχική λακτόζη στο αντιδρών μείγμα ήταν 10% και 15% w/v. Αυτό είναι αναμενόμενο λόγω της ποσότητας της λακτόζης. Τέλος, η κλίση των καμπυλών στους 40 °C είναι πιο απότομη σε σχέση με τους 30 °C. Αυτό σημαίνει ότι η αντίδραση προχωράει πιο γρήγορα στην υψηλότερη θερμοκρασία.



**Διάγραμμα 6.25.** Μεταβολή της συγκέντρωσης λακτόζης συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμικό φορτίο 0,022 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

Αύξηση του ενζυμικού φορτίου σε 0,022 U/mL, λόγω μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου στο μείγμα, η αντίδραση διαρκεί λιγότερο χρονικό διάστημα απ' ότι εάν το ενζυμικό φορτίο ήταν 0,011 U/mL. Συγκεκριμένα στους 30 °C παρατηρείται υποδιπλασιασμός της συγκέντρωσης της λακτόζης σε 1 h και 3 h για ενζυμικό φορτίο 0,022 U/mL και 0,011 U/mL, αντίστοιχα, όταν η αρχική συγκέντρωση λακτόζης είναι 10% w/v και σε 1 h και 3 h για ενζυμικό φορτίο 0,022 U/mL και 0,011 U/mL, αντίστοιχα, όταν η αρχική συγκέντρωση λακτόζης είναι 5% w/v.



**Διάγραμμα 6.26.** Μεταβολή της συγκέντρωσης λακτόζης συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμικό φορτίο 0,045 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

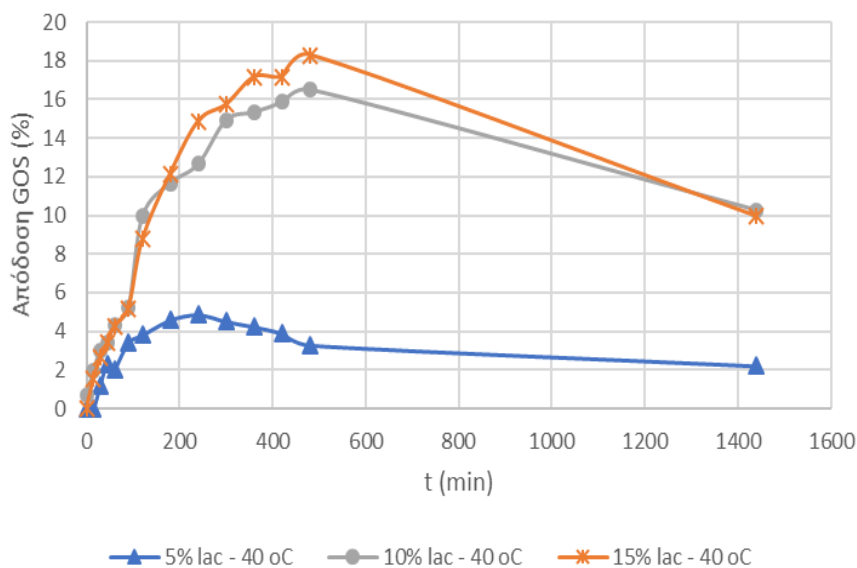
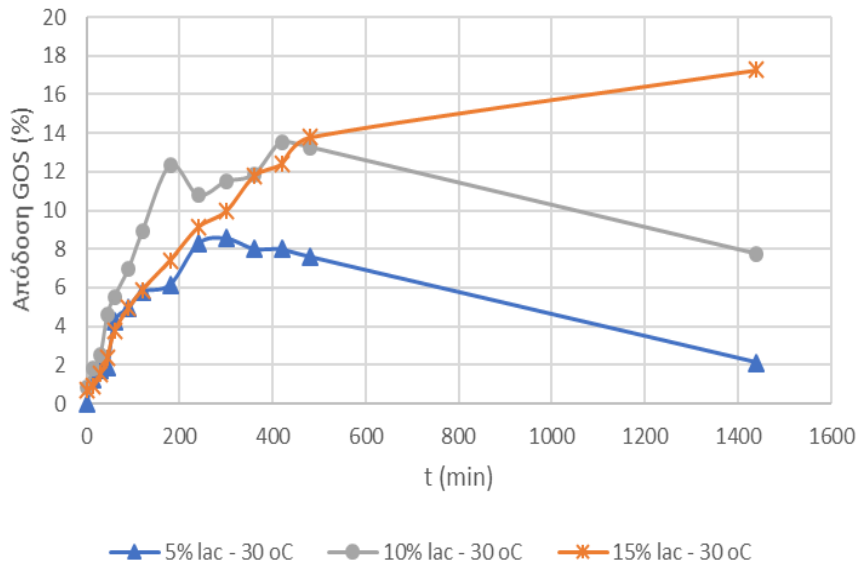
Παρόμοια τάση εμφανίζεται και στους 40 °C, όπου ο υποδιπλασιασμός της συγκέντρωσης της λακτόζης εμφανίζεται σε 1 h και 3 h για ενζυμικό φορτίο 0,022 U/mL και 0,011 U/mL, αντίστοιχα, όταν η αρχική συγκέντρωση λακτόζης είναι 10% w/v και σε 45 min και 90 min για ενζυμικό φορτίο 0,022 U/mL και 0,011 U/mL, αντίστοιχα, όταν η αρχική συγκέντρωση λακτόζης είναι 5% w/v. Ακόμη, για το υψηλότερο σε συγκέντρωση λακτόζης υπόστρωμα (15% w/v) παρατηρείται ότι μετά το πέρας των 24 h περιέχεται στο μείγμα μη υδρολυμένη λακτόζη. Συγκεκριμένα, στους 30 °C η εναπομείνασα συγκέντρωση λακτόζης είναι 0,65% w/v και στους 40 °C είναι 0,23% w/v. Τέλος, η κλίση των καμπυλών είναι πιο απότομη στους 40 °C σε σχέση με τους 30 °C υποδηλώνοντας ότι η δράση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση στην αντίδραση της υδρόλυσης της λακτόζης είναι εντονότερη στους 40 °C.

Στην περίπτωση του υψηλότερου ενζυμικού φορτίου η κατανάλωση της λακτόζης εμφανίζει την ίδια εκθετική τάση. Αύξηση του ενζυμικού φορτίου σε 0,045 U/mL, λόγω μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου στο μείγμα, η υδρόλυση της λακτόζης πραγματοποιείται σε συντομότερο χρονικό διάστημα απ' ότι εάν το ενζυμικό φορτίο ήταν 0,011 και 0,022 U/mL. Συγκεκριμένα, για αρχική συγκέντρωση λακτόζης η αντίδραση τερματίζει μετά από 3 h τόσο στους 30 όσο και στους 40 °C. Για συγκέντρωση λακτόζης αρχικά 10% w/v μετά από 3 h αντίδρασης εναπομένουν στο αντιδρών μείγμα 1,34% και 0,44% w/v λακτόζης στους 30 και 40 °C Τέλος, για το υψηλότερο σε συγκέντρωση λακτόζης υπόστρωμα (15% w/v) παρατηρείται ότι μετά από χρονικό διάστημα 3 h περιέχεται στο μείγμα μη υδρολυμένη λακτόζη σε ποσοστό 5,26% και 1,88% w/v στους 30 και 40 °C, αντίστοιχα.

#### 6.3.2.1.3 Μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)

Ολοκληρώνοντας την δεύτερη ενότητα των αποτελεσμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων, παρουσιάζονται τα διαγράμματα μεταβολής της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης, για θερμοκρασίες αντίδρασης 30 °C και 40 °C (Διαγράμματα 6.27 έως 6.29). Με την πάροδο του χρόνου αντίδρασης, η β-γαλακτοζιδάση εκτός από την αντίδραση υδρόλυσης της λακτόζης, καταλύει παράλληλα και την αντίδραση σχηματισμού γαλακτοολιγοσακχαριτών (τρανσγαλακτοζυλίωση). Ως γαλακτοολιγοσακχαρίτες λαμβάνονται δισακχαρίτες διαφορετικοί της λακτόζης, τρισακχαρίτες, τετρασακχαρίτες και πεντασακχαρίτες. Από τα διαγράμματα παρατηρείται συνεχής αύξηση της απόδοσης των GOS στο μείγμα μέχρι μια μέγιστη τιμή. Από τη στιγμή που το σύστημα φτάσει στη μέγιστη απόδοση ακολουθεί μείωση της απόδοσης. Η πτωτική αυτή τάση της απόδοσης των γαλακτοολιγοσακχαριτών οφείλεται στην περαιτέρω υδρόλυση των σχηματιζόμενων GOS από τη β-γαλακτοζιδάση. Γενικά, αύξηση της

περιεκτικότητας του υποστρώματος σε λακτόζη στο αντιδρών σύστημα οδήγησε σε αύξηση της μέγιστης απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS και σε αύξηση του απαιτούμενου χρόνου για την επίτευξη αυτής της απόδοσης.



**Διάγραμμα 6.27.** Μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμικό φορτίο 0,011 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

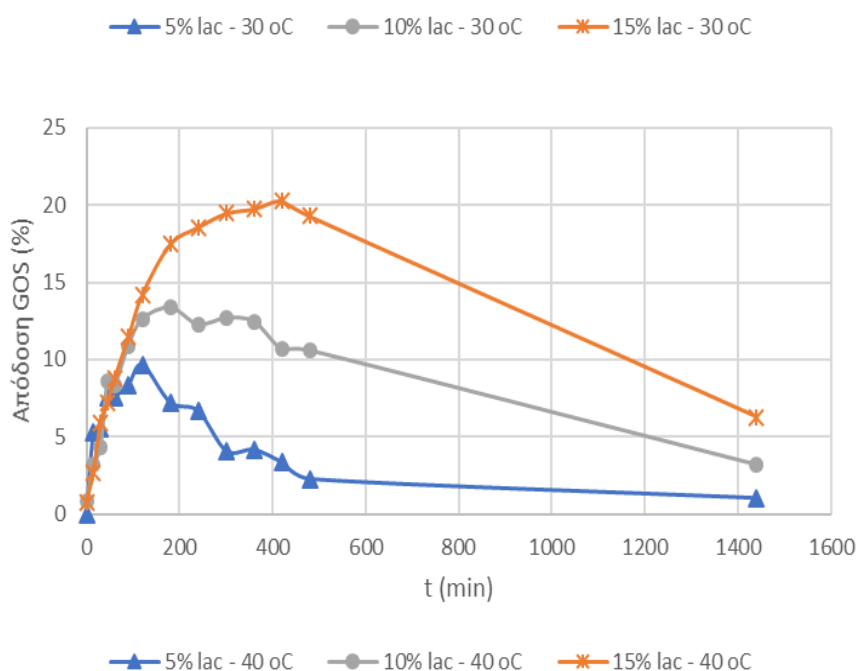
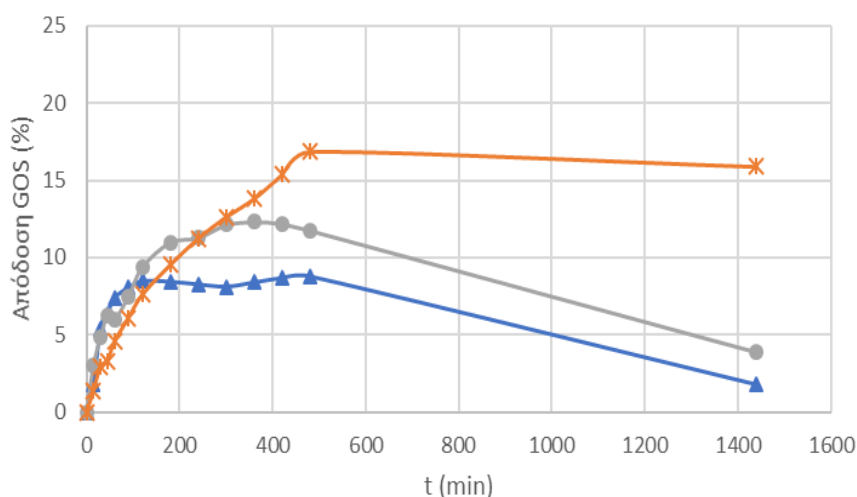
Για ενζυμικό φορτίο 0,011 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C παρατηρείται μέγιστη απόδοση σε GOS ίση με 8,56% έπειτα από 5 h, για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 5% w/v. Αύξηση συγκέντρωσης της λακτόζης στο αντιδρών μείγμα σε 10% w/v συνεπάγεται υψηλότερη απόδοση σε GOS (13,6%),

η οποία, όμως επιτυγχάνεται μετά από 7 h αντίδρασης. Ωστόσο, παρόμοια απόδοση σε GOS (8,90%) επιτυγχάνεται 2 h. Διπλασιασμός, δηλαδή, της συγκέντρωσης λακτόζης οδηγεί σε μείωση του απαιτούμενου χρόνου για την επίτευξη της παρόμοιας απόδοσης σε GOS κατά 2,5 φορές ενώ επιτυγχάνεται μέγιστη απόδοση σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Περαιτέρω αύξηση της περιεκτικότητας της λακτόζης σε 15% w/v οδήγησε τόσο σε αύξηση της μέγιστης απόδοσης σε GOS σε 17,25%, που επιτεύχθηκε στις 24 h ενώ παρόμοια απόδοση σε GOS (9,11%) επιτεύχθηκε σε 4 h.

Όσον αφορά στις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 40 °C, παρατηρείται ότι για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 5% w/v επιτεύχθηκε μέγιστη απόδοση σε GOS ίση με 4,86 %, έπειτα από 4 h αντίδρασης. Με διπλασιασμό, της αρχικής συγκέντρωσης σε λακτόζη (10% w/v) η μέγιστη απόδοση σε GOS ανέρχεται σε 16,52% και επιτεύχθηκε έπειτα από 8 h αντίδρασης. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης σε 15% w/v οδήγησε σε ελαφρώς υψηλότερη απόδοση σε GOS (18,29 %) με ίδιο χρόνο επίτευξης (8 h).

Στην περίπτωση που το ενζυμικό φορτίο διπλασιάστηκε (0,022 U/mL) και για θερμοκρασία αντίδρασης τους 30 °C παρατηρείται μέγιστη απόδοση σε GOS ίση με 8,47%, έπειτα από 2 h, για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 5% w/v. Αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδήγησε σε παρόμοια απόδοση GOS σε χρόνο μικρότερο κατά 2,5 φορές. Αύξηση συγκέντρωσης της λακτόζης στο αντιδρών μείγμα σε 10% w/v συνεπάγεται υψηλότερη απόδοση σε GOS (12,33%), η οποία, όμως επιτυγχάνεται μετά από 6 h αντίδρασης ενώ παρόμοια απόδοση σε GOS (7,48%) επιτεύχθηκε σε 1,5 h. Διπλασιασμός, δηλαδή, της συγκέντρωσης λακτόζης οδηγεί σε μείωση του απαιτούμενου χρόνου για την επίτευξη της παρόμοιας απόδοσης σε GOS. Περαιτέρω αύξηση της περιεκτικότητας της λακτόζης σε 15% w/v οδήγησε τόσο σε αύξηση της μέγιστης απόδοσης σε GOS σε 16,9%, που επιτεύχθηκε στις 8 h ενώ παρόμοια απόδοση σε GOS (7,61%) επιτεύχθηκε σε 2 h.

Όσον αφορά στις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 40 °C, παρατηρείται ότι για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 5% w/v επιτεύχθηκε μέγιστη απόδοση σε GOS ίση με 9,64%, έπειτα από 2 h αντίδρασης. Με διπλασιασμό, της αρχικής συγκέντρωσης σε λακτόζη (10% w/v) η μέγιστη απόδοση σε GOS ανέρχεται σε 13,4% και επιτεύχθηκε έπειτα από 3 h αντίδρασης. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης σε 15% w/v οδήγησε σε υψηλότερη απόδοση σε GOS (20,3 %) με χρόνο επίτευξης τις 7 h.

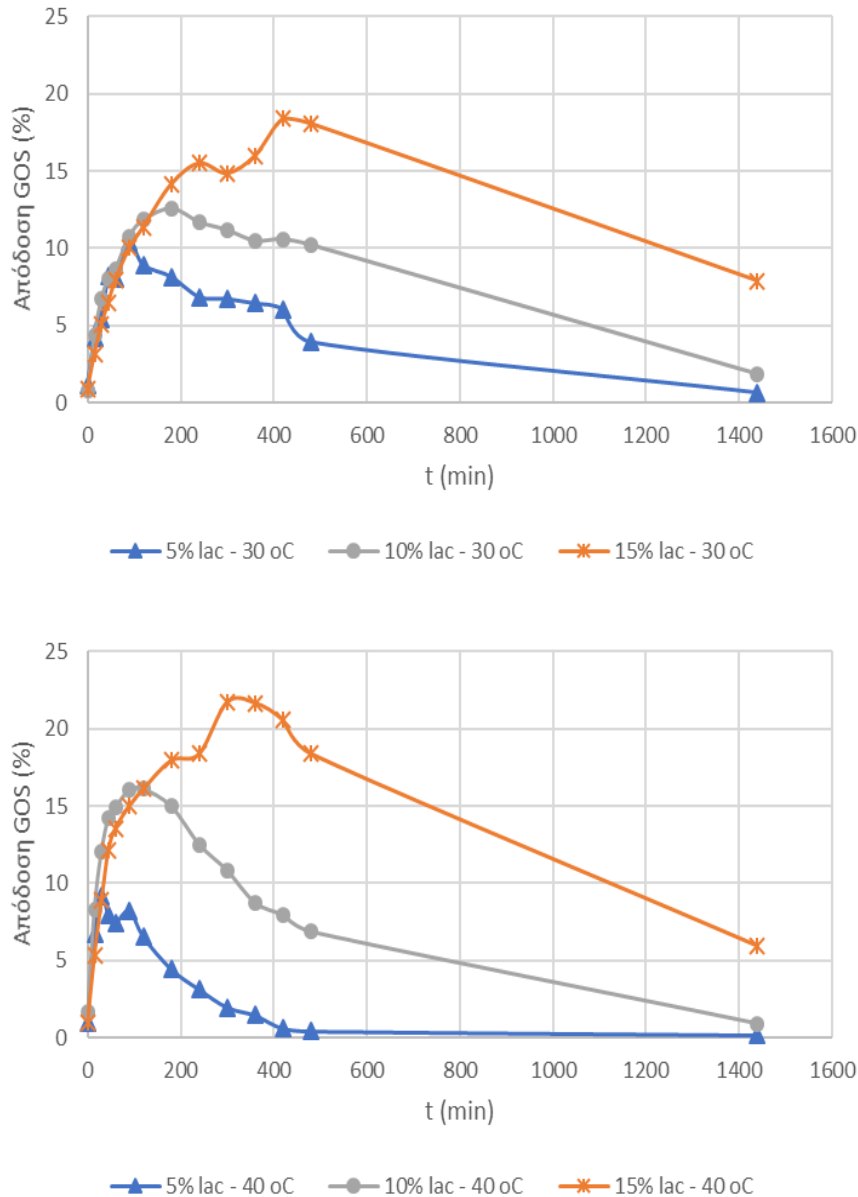


**Διάγραμμα 6.28.** Μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμικό φορτίο 0,022 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

Με αύξηση του ενζυμικού φορτίου σε 0,045 U/mL υψηλότερες τιμές μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS σε σχετικά μικρότερο χρόνο αντίδρασης. Συγκεκριμένα, για την περίπτωση ενζυμικής αντίδρασης στους 30 °C παρατηρείται μέγιστη απόδοση σε GOS ίση με 10,4%, έπειτα από 1,5 h, για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 5% w/v. Αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδήγησε σε υψηλότερη απόδοση GOS σε χρόνο μικρότερο κατά 0,5 h και 3,5 h για ενζυμικό φορτίο 0,022 και 0,011 U/mL, αντίστοιχα. Αύξηση συγκέντρωσης της λακτόζης στο αντιδρών μείγμα σε 10% w/v συνεπάγεται παρόμοια απόδοση σε GOS (12,6%), η οποία,



όμως επιτυγχάνεται μετά από 3 h αντίδρασης ενώ παρόμοια απόδοση σε GOS (8,07%) επιτεύχθηκε σε 45 min. Διπλασιασμός, δηλαδή, της συγκέντρωσης λακτόζης οδηγεί σε μείωση του απαιτούμενου χρόνου για την επίτευξη της παρόμοιας απόδοσης σε GOS. Περαιτέρω αύξηση της περιεκτικότητας της λακτόζης σε 15% w/v οδήγησε τόσο σε αύξηση της μέγιστης απόδοσης σε GOS σε 18,4%, που επιτεύχθηκε στις 7 h ενώ παρόμοια απόδοση σε GOS (7,93%) επιτεύχθηκε σε 1 h.



**Διάγραμμα 6.29.** Μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμικό φορτίο 0,045 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C και 40 °C.

Όσον αφορά στις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 40 °C, παρατηρείται ότι για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 5% w/v επιτεύχθηκε μέγιστη απόδοση σε GOS ίση με 9,18%, έπειτα από 45 min αντίδρασης. Με διπλασιασμό, της αρχικής συγκέντρωσης σε λακτόζη (10% w/v) η μέγιστη απόδοση σε GOS ανέρχεται σε 16,1% και επιτεύχθηκε έπειτα από 2 h αντίδρασης. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης σε 15% w/v οδήγησε σε υψηλότερη απόδοση σε GOS (21,7 %) με χρόνο επίτευξης τις 5 h.

Συγκρίνοντας τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, προκύπτει ότι οι ενζυμικές αντιδράσεις σχηματισμού γαλακτοολιγοσακχαριτών στους 40 °C είναι περισσότερο αποδοτικές, σε σύγκριση με αυτές στους 30 °C, για αντίστοιχες τιμές ενζυμικού φορτίου. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται, εκ πρώτης όψεως, σε αντίθεση με την μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας συναρτήσεως της θερμοκρασίας που παρουσιάστηκε στην ενότητα 6.3.1 καθώς από την μελέτη αυτή προέκυψε βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου οι 30 °C, με την ενεργότητα να υποδεκαπλασιάζεται στους 40 °C. Ήταν, λοιπόν, αναμενόμενο στους 40 °C που ίδια ποσότητα ενζύμου (ενζυμικό φορτίο) παρουσιάζει χαμηλότερη ενεργότητα, η εξέλιξη των ενζυμικών αντιδράσεων να είναι αντίστροφη αυτής που προέκυψε, αποδίδοντας λιγότερο σε GOS. Ωστόσο, αυτή η απόκλιση των αποτελεσμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων με την μελέτη της δραστηριότητας του ενζύμου οφείλεται, πιθανώς, στο γεγονός ότι στην περίπτωση μελέτης της ενζυμικής ενεργότητας χρησιμοποιείται η οNPG ως υπόστρωμα και μετριέται το προϊόν της αντίδρασης υδρόλυσης αυτής, ενώ στην περίπτωση της μελέτης της παραγωγής GOS μετρούνται τα προϊόντα των αντιδράσεων ολιγομερισμού της λακτόζης (τρανσγαλακτοζυλίωση), αντιδράσεις οι οποίες, εκ του αποτελέσματος, φαίνεται να είναι περισσότερο αποδοτικές στους 40 °C.

### 6.3.3 Σύνοψη αποτελεσμάτων ενζυμικών αντιδράσεων μετατροπής της λακτόζης του γλυκού ορού σε GOS

Στον Πίνακα 6.5 παρουσιάζονται συνολικά οι μέγιστες αποδόσεις γαλακτοολιγοσακχαριτών και για τις 18 ενζυμικές αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία αξιοποιώντας το τυρόγαλα ως υπόστρωμα των αντιδράσεων αυτών.

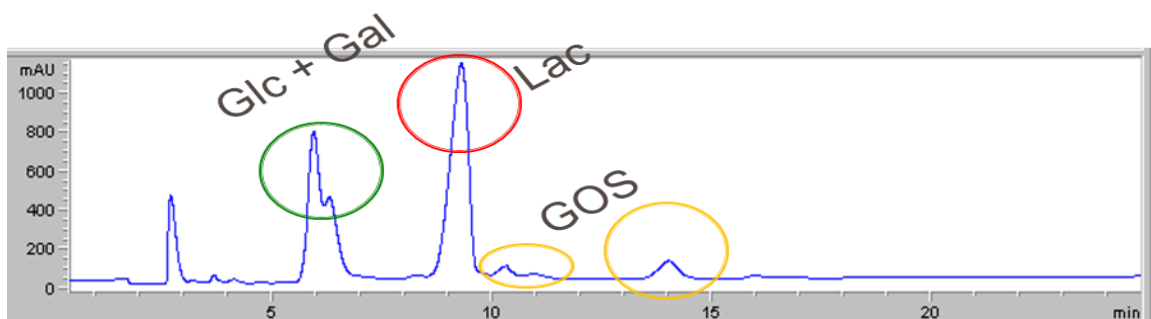
Με βάση τα αποτελέσματα του ακόλουθου πίνακα προκύπτει ότι μέγιστη απόδοση σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες είναι για υπόστρωμα αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης 15% w/v με ενεργότητα ενζυμικό φορτίο β-γαλακτοζιδάσης ίσο με 0,045 U/mL σε θερμοκρασία αντίδρασης 40 °C και τιμή pH ίση με 7. Σε αυτές τις συνθήκες επιτεύχθηκε βαθμός απόδοσης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες ίσος με 21,7% ( $\pm 0,23$ ) σε χρονικό διάστημα 6 h.

**Πίνακας 6.5:** Αποτελέσματα μέγιστης απόδοσης σε GOS των ενζυμικών αντιδράσεων

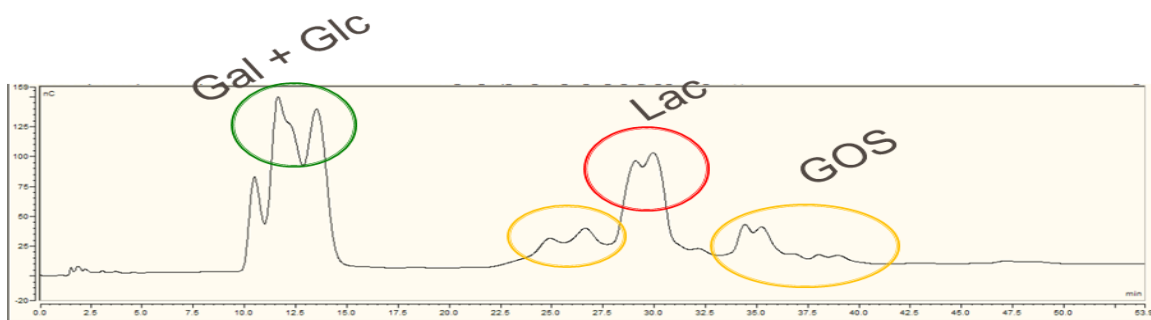
Περιεκτικότητα λακτόζης (% w/v)	Ενζυμικό φορτίο (U/mL)	Θερμοκρασία (οC)	pH	Μέγιστη απόδοση GOS (%)	Χρόνος μέγιστης απόδοσης (min)
5	0,011	30	7	8,56 <sup>b</sup> (±0,40)	300
	0,022			8,47 <sup>b</sup> (±0,56)	120
	0,045			10,4 <sup>d</sup> (±0,3)	90
	0,011	40		4,86 <sup>a</sup> (±0,11)	240
	0,022			9,64 <sup>cd</sup> (±1,09)	120
	0,045			9,18 <sup>bc</sup> (±0,97)	30
10	0,011	30	13,6 <sup>g</sup> (±0,3)	420	
	0,022		12,3 <sup>e</sup> (±0,7)	360	
	0,045		12,6 <sup>ef</sup> (±0,2)	180	
	0,011	40	16,5 <sup>hi</sup> (±0,7)	480	
	0,022		13,5 <sup>fg</sup> (±0,3)	180	
	0,045		16,1 <sup>h</sup> (±0,5)	120	
15	0,011	30	17,3 <sup>i</sup> (±0,6)	1440	
	0,022		16,9 <sup>hi</sup> (±0,3)	480	
	0,045		18,4 <sup>j</sup> (±0,4)	420	
	0,011	40	18,3 <sup>j</sup> (±0,5)	480	
	0,022		20,3 <sup>k</sup> (±0,3)	420	
	0,045		21,7 <sup>l</sup> (±0,2)	300	

Η στατιστική μελέτη που πραγματοποιήθηκε αφορούσε την επίδραση κάθε παράγοντα ξεχωριστά αλλά και συνδυαστικά. Κατά την μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης λακτόζης στο αντιδρών μείγμα διατηρώντας τις άλλες παραμέτρους σταθερές προέκυψε ότι η συγκέντρωση της λακτόζης εμφανίζει στατιστικά σημαντική επίδραση με σταθμικούς μέσους όρους απόδοσης σε GOS 8,56, 14,08 και 18,8% για συγκέντρωση λακτόζης 5%, 10% και 15% w/v αντίστοιχα. Η επίδραση του ενζυμικού φορτίου διατηρώντας τους παράγοντες συγκέντρωσης λακτόζης στο αντιδρών μείγμα και θερμοκρασία προέκυψε ότι για ενζυμικό φορτίο 0,011 και 0,022 U/mL η επίδρασή τους δεν έχει σημαντική στατιστική διαφορά με σταθμικούς μέσους όρους 13,2 και 13,5% αντίστοιχα. Αντιθέτως για ενζυμικό φορτίο 0,045 U/mL εμφανίζουν τα δεδομένα σημαντική στατιστική επίδραση με σταθμικό μέσο ίσο με 14,7%. Τέλος, η θερμοκρασία αντίδρασης επιδρά σημαντικά στην παραγωγή των γαλακτοολιγοσακχαριτών με σταθμικούς μέσους όρους απόδοσης σε GOS 13,2 και 14,5% στους 30 και 40 °C αντίστοιχα.

Όπως αναφέρθηκε, ήδη τα δείγματα των ενζυμικών αντιδράσεων αναλύθηκαν με την τεχνική της HPLC, ενώ με την τεχνική HPAEC-PAD πραγματοποιήθηκε μια πιο ποιοτική ανάλυση. Η διαφορά των δυο τεχνικών αυτών είναι η διαχωριστική τους ικανότητα με την τεχνική της HPAEC-PAD να εμφανίζει καλύτερη διαχωριστική ικανότητα των επιμέρους σακχάρων, όπως παρατηρείται στα χρωματογραφήματα στις Εικόνες 6.2-6.3.



**Εικόνα 6.2:** Χρωματογράφημα HPLC-RI δείγματος ενζυμικής αντίδρασης



**Εικόνα 6.3:** Χρωματογράφημα HPAEC-PAD δείγματος ενζυμικής αντίδρασης

Στο χρωματογράφημα της HPLC καταγράφονται 5 κορυφές εκ των οποίων οι 4 αποτυπώνουν τα σάκχαρα του δείγματος, ενώ η πρώτη κορυφή σε χρόνο 3 min

αντιστοιχεί στον διαλύτη. Η διπλή κορυφή στο 5,56 min αντιστοιχεί στους μονοσακχαρίτες (γαλακτόζη και γλυκόζη), η δεύτερη κορυφή είναι για χρόνο 9,10 min και αντιστοιχεί στην μη υδρολυμένη λακτόζη και οι κορυφές σε χρόνους 10,3 και 14,0 min αντιστοιχούν στους σχηματιζόμενους γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Αντιθέτως, στο χρωματογράφημα της HPAEC-PAD παρατηρούνται 11 κορυφές. Σε χρόνο από 10 έως 15 min καταγράφονται 2 κορυφές που αντιστοιχούν στην γαλακτόζη και στη γλυκόζη. Οι υπόλοιπες 8 κορυφές καταγράφονται σε χρόνους από 22,5 έως 42,5 min και αντιστοιχούν στη μη υδρολυμένη λακτόζη και στους σχηματιζόμενους γαλακτοολιγοσακχαρίτες. Είναι εμφανές ότι η HPAEC-PAD κατάφερε να διαχωρίσει πλήρως τόσο τους μονοσακχαρίτες όσο και τα σχηματιζόμενα GOS.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΥΝΟΨΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το τυρόγαλα, παραπροϊόν της τυροκομίας, αποτελεί ένα μεγάλο περιβαλλοντικό πρόβλημα για τη γαλακτοβιομηχανία. Η διαχείρισή του είναι δύσκολη λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου που εμφανίζει. Η αξιοποίησή του έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών. Μία από τις σύγχρονα προτεινόμενες λύσεις είναι η παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS) από την περιεχόμενη λακτόζη του γλυκού ορού. Η δυνατότητα ενζυμικής παραγωγής GOS μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία με υποσχόμενα θετικά αποτελέσματα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραγόντων στη σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την περιεχόμενη λακτόζη του τυρογάλακτος. Η σύνθεση των GOS επιτεύχθηκε μέσω ενζυμικής αντίδρασης χρησιμοποιώντας το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces lactis*. Αρχικά προσδιορίστηκε η σύσταση του τυρογάλακτος, στη συνέχεια αυτό επεξεργάστηκε καταλλήλως ώστε να μπορέσει να αποτελέσει κατάλληλο υπόστρωμα για την ενζυμική αντίδραση, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του χρησιμοποιούμενου ενζύμου και τελικά μελετήθηκε η απόδοση της ενζυμικής μετατροπής της λακτόζης του τυρογάλακτος σε GOS συναρτήσει διαφόρων παραγόντων, όπως η συγκέντρωση της λακτόζης στο χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα, το ενζυμικό φορτίο της β-γαλακτοζιδάσης και η θερμοκρασία της αντίδρασης.

Από τη χημική ανάλυση του τυρογάλακτος βρέθηκε ότι ο γλυκός ορός περιέχει 5,63% w/v ( $\pm 0,08$ ) ολικά σάκχαρα, εκ των οποίων η λακτόζη αποτελεί το 5,08% w/v ( $\pm 0,08$ ), και 2,93% w/w ( $\pm 0,56$ ) ολικές πρωτεΐνες. Τα ολικά στερεά και η τέφρα υπολογίστηκαν ίσα με 4,90% w/w ( $\pm 0,08$ ) και 0,46% w/w ( $\pm 0,01$ ), αντίστοιχα. Η αλατότητα του τυρογάλακτος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Mohr και προέκυψε ίση με 0,248% w/v ( $\pm 0,015$ ). Κατά την χημική ανάλυση του γλυκού ορού μετρήθηκαν επίσης τα θεϊκά ιόντα και το γαλακτικό οξύ και βρέθηκαν ίσα με 95,6mg/L ( $\pm 0,01$ ) και 1,65 g/L ( $\pm 0,06$ ), αντίστοιχα. Τέλος, προσδιορίστηκαν ορισμένα μέταλλα που υπάρχουν στο τυρόγαλα με τη μέθοδο της Φασματομετρίας Ατομικής Εκπομπής με Ιοντικά Συζευγμένο Πλάσμα (ICP-AES). Τα αποτελέσματα του ICP-AES έδειξαν ότι στο τυρόγαλα περιέχονται 31,4 mM ( $\pm 1,50$ ) K<sup>+</sup>, 16,7 mM ( $\pm 1,11$ ) Na<sup>+</sup>, 8,60 mM ( $\pm 0,32$ ) Ca<sup>2+</sup> και 1,14 mM ( $\pm 0,08$ ) Mg<sup>2+</sup>.

Στη συνέχεια, προκειμένου το τυρόγαλα να αποτελέσει κατάλληλο υπόστρωμα για την ενζυμική αντίδραση, έπρεπε να αντιμετωπιστεί το υψηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο που περιείχε και οδηγούσε σε μείωση της τιμής του pH, σε περιοχές όπου το χρησιμοποιούμενο ένζυμο εμφανίζει χαμηλές δραστηριότητες. Η μείωση του αρχικού μικροβιακού φορτίου σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που θα προκαλούσαν περαιτέρω μείωση της τιμής pH του τυρογάλακτος επιτεύχθηκε

με υπερδιήθηση του γλυκού ορού με χρήση μεμβράνης με ονομαστικό πορώδες 0,22  $\mu\text{m}$  και στη συνέχεια παστερίωση του υπερδιηθημένου ορού στους 85 °C για χρονικό διάστημα 5 min.

Για τη μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων, όπως η συγκέντρωση σε λακτόζη του τυρογάλακτος, η θερμοκρασία και το ενζυμικό φορτίο, στην αντίδραση της ενζυμικής μετατροπής της λακτόζης του τυρογάλακτος σε GOS, αρχικά μελετήθηκε η ενζυμική ενεργότητα της  $\beta$ -γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. Lactis* για θερμοκρασίες από 30 έως 50 °C και τιμή pH από 6,0 έως 8,0. Το ένζυμο  $\beta$ -γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *K. Lactis* εμφανίζει βέλτιστη δράση σε τιμή pH ίση με 7,0 και σε θερμοκρασία ίση με 30 °C. Στις συνθήκες αυτές η ενεργότητα του χρησιμοποιούμενου ενζύμου βρέθηκε ίση με 22,4 ( $\pm$  0,06) U/mL, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ορθο-νιτροφαινυλο- $\beta$ -D-γαλακτοπυρανόζης (oNPG).

Πραγματοποιήθηκαν 18 ενζυμικές αντιδράσεις με χρησιμοποιούμενο ενζυμικό φορτίο 0,011, 0,022 και 0,045 U/mL και αρχική συγκέντρωση λακτόζης στον γλυκό ορό 5, 10 και 15% w/v. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο θερμοκρασίες, 30 °C και 40 °C, ενώ η τιμή του pH για όλες τις αντιδράσεις ήταν σταθερά ρυθμισμένη στην τιμή 7,2. Η ανάλυση των δειγμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων, και συνεπώς ο προσδιορισμός των παραγόμενων προϊόντων, πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με χρήση ανιχνευτή Δείκτη Διάθλασης (High Performance Liquid Chromatography- RI detector, HPLC-RI). Αξίζει να σημειωθεί ότι, η στήλη που χρησιμοποιήθηκε δεν έχει την ικανότητα να διαχωρίζει τους μονοσακχαρίτες γαλακτόζη και γλυκόζη, συνεπώς ο όρος μονοσακχαρίτες αναφέρεται στο σύνολο των μορίων γαλακτόζης και γλυκόζης στο δείγμα, εκφρασμένο ως συγκέντρωση της γαλακτόζης. Στην περίπτωση των δισακχαριτών, η στήλη διαχωρίζει τη λακτόζη από τους υπόλοιπους δισακχαρίτες που σχηματίζονται. Έτσι, με τον όρο συγκέντρωση λακτόζης εννοούνται τα μόρια της λακτόζης που υπάρχουν στο δείγμα, ενώ οι υπόλοιποι σχηματιζόμενοι δισακχαρίτες συμπεριλαμβάνονται στη συγκέντρωση των GOS. Τέλος, με τον όρο GOS εννοείται το σύνολο των γαλακτοολιγοσακχαριτών που συντίθενται κατά τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης και είναι εκφρασμένοι ως συγκέντρωση ραφινόζης.

Όσον αφορά στην επίδραση του ενζυμικού φορτίου της  $\beta$ -γαλακτοζιδάσης στο βαθμό απόδοσης της ενζυμικής διεργασίας σε GOS υπό σταθερές συνθήκες συγκέντρωσης υποστρώματος σε λακτόζη, θερμοκρασίας και τιμής pH προέκυψε ότι για χαμηλά ενζυμικά φορτία (0,011 και 0,022 U/mL) δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση της αύξησης του ενζυμικού φορτίου στο βαθμό απόδοσης σε GOS, ενώ περαιτέρω αύξηση του ενζυμικού φορτίου (0,045 U/mL) επιδρά σημαντικά ( $p < 0,001$ ) στο βαθμό απόδοσης σε GOS. Για κάθε μελετώμενο ενζυμικό φορτίο, οι μέγιστοι βαθμοί απόδοσης σε GOS παρατηρήθηκαν για συγκέντρωση υποστρώματος 15% w/v σε λακτόζη, θερμοκρασία 40 °C και βρέθηκαν ίσοι με:



- α) 18,4% ( $\pm 0,53$ ) μετά από 480 min ενζυμικής αντίδρασης με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,011 U/mL,  
β) 20,3% ( $\pm 0,34$ ) μετά από 420 min ενζυμικής αντίδρασης με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,022 U/mL, και  
γ) 21,7% ( $\pm 0,23$ ) μετά από 300 min ενζυμικής αντίδρασης με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,045 U/mL.

Αναφορικά με την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του τυρογάλακτος σε λακτόζη προκύπτει ότι ο παράγοντας αυτός έχει σημαντική επίδραση ( $p < 0,001$ ) στο βαθμό απόδοσης σε GOS. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της λακτόζης στο αντιδρών σύστημα οδηγεί στην απελευθέρωση μεγαλύτερου αριθμού μονομερών γαλακτόζης και γλυκόζης, τα οποία με τη σειρά τους μέσω της αντίδρασης τρανσγαλακτοζυλίωσης θα οδηγήσουν στη σύνθεση περισσότερων μορίων γαλακτοολιγοσακχαριτών. Για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 5% w/v, η μέγιστη απόδοση σε GOS βρέθηκε ίση με 10,4% ( $\pm 0,26$ ) με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,045 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 30 °C μετά από 90 min. Για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 10% w/v, η μέγιστη απόδοση σε GOS βρέθηκε ίση με 16,5% ( $\pm 0,69$ ) με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,011 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 40 °C μετά από 480 min. Για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 15% w/v, η μέγιστη απόδοση σε GOS βρέθηκε ίση με 21,71% ( $\pm 0,233$ ) με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,045 U/mL και θερμοκρασία αντίδρασης 40 °C μετά από 300 min.

Αναφορικά με την επίδραση της θερμοκρασίας της ενζυμικής αντίδρασης στο βαθμό απόδοσης σε GOS παρατηρήθηκε ότι, ο μέγιστος βαθμός επιτυγχάνεται στους 40 °C για αρχική περιεκτικότητα του γλυκού ορού σε λακτόζη 15% w/v και με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,045 U/mL μετά από 300 min ( $Y_{GOS} = 21,7\% \pm 0,23$ ). Από την στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι η θερμοκρασία επιδρά σημαντικά ( $p < 0,001$ ) στο βαθμό απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης. Σύμφωνα όμως με την μελέτη της δραστηριότητας του ενζύμου προέκυψε ότι εμφανίζει βέλτιστη δράση στη θερμοκρασία των 30 °C, ενώ στη θερμοκρασία των 40 °C η ενεργότητα υποδεκαπλασιάζεται. Η αντίθεση των αποτελεσμάτων αυτών έγκειται στο γεγονός ότι η μελέτη της ενζυμικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκε σε οNPG ως υπόστρωμα και προσδιορίστηκε το προϊόν υδρόλυσης αυτού. Αντιθέτως, κατά την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών μετρούνται τα προϊόντα των αντιδράσεων ολιγομερισμού της λακτόζης (τρανσγαλακτοζυλίωση), αντιδράσεις οι οποίες φαίνεται να είναι περισσότερο αποδοτικές στους 40 °C.

Συνοψίζοντας, συμπεραίνεται ότι ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS από την ενζυμική μετατροπή της λακτόζης του γλυκού ορού με χρήση β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* επιτεύχθηκε για αρχική συγκέντρωση του τυρογάλακτος σε λακτόζη 15% w/v, ενζυμικό φορτίο 0,045 U/mL, θερμοκρασία αντίδρασης 40 °C και τιμή pH ίση με 7,2, ο οποίος και βρέθηκε ίσος με 21,7% ( $\pm 0,23$ ).

Σχετικά με την περαιτέρω ταυτοποίηση των παραγόμενων γαλακτοολιγοσακχαριτών, πραγματοποιήθηκε ένας ποιοτικός προσδιορισμός τους με την τεχνική της Χρωματογραφίας Ανιονεναλλαγής Υψηλής Απόδοσης με Παλμικό Αμπερομετρικό Ανιχνευτή (High Performance Anion-Exchange Chromatography - Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD). Από τα χρωματογραφήματα επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη γαλακτόζης και γλυκόζης στο σύνολο των μονοσακχαριτών, μη υδρολυμένης λακτόζης και επιπλέον 8 κορυφές που υποδηλώνουν τη σύνθεση 8 διαφορετικών γαλακτοολιγοσακχαριτών, με βαθμό πολυμερισμού από 2 έως και 4.

Συμπερασματικά, η παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών, συστατικά υψηλής προστιθέμενης αξίας, από το τυρόγαλα μπορεί να αποτελέσει μι βιώσιμη εναλλακτική μέθοδο αξιοποίησης του, συμβατής με τις αρχές της κυκλικής οικονομίας. Συνδυάζει το κόστος διαχείρισης ενός σημαντικού αποβλήτου και την αντιμετώπιση ενός περιβαλλοντικού προβλήματος, μετατρέποντάς το σε μια πολύτιμη πρώτη ύλη. Η αριστοποίηση της διεργασίας καθώς και η μελέτη της σύνθεσης GOS με χρήση ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης από κάποιον άλλο μικροοργανισμό, όπως ο *Aspergillus oryzae*, εμφανίζουν ενδιαφέρον για μελλοντική έρευνα. Ακόμη, η απομόνωση και αξιοποίηση των πρωτεϊνών που περιέχονται στο γλυκό ορό, με στόχο της παραγωγή ενός πρωτεϊνούχου συμπυκνώματος σε συνδυασμό με τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες, μπορεί να είναι ένας μελλοντικός στόχος για την παρασκευή ενός συμπληρώματος με υψηλή θρεπτική και πρεβιοτική αξία.

### Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Σε συνέχεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας κρίνεται σκόπιμη η ανάλυση των υπάρχοντων δειγμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων με το σύστημα HPAEC-PAD με στόχο την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των γαλακτοολιγοσακχαριτών χρησιμοποιώντας πρότυπα σάκχαρα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης από κάποιον άλλο μικροοργανισμό. Ένας τέτοιος μικροοργανισμός είναι ο *Aspergillus oryzae*, το ένζυμο του οποίου χρησιμοποιείται βιομηχανικά και εμφανίζει βέλτιστη δράση σε τιμές pH από 4,5 έως 4,8. Επίσης, κρίνεται σκόπιμη η ανάπτυξη ενός καινοτόμου ενζύμου, το οποίο θα παρουσιάζει θερμοάντοχες ιδιότητες και να ευνοεί τη σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών από την περιεχόμενη λακτόζη του τυρογάλακτος (τρανσγαλακτοζυλίωση) έναντι της υδρόλυσης αυτής. Ένα τέτοιο καινοτόμο ένζυμο είναι η β-γαλακτοζιδάση *TbGal1*, το οποίο προέρχεται από τον θερμόφιλο μικροοργανισμό *Thermothielavioides terrestris* και αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ. Το ένζυμο αυτό παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε θερμοκρασία 50 °C και τιμή pH 4,5 και εμφανίζει αρκετά υψηλούς βαθμούς απόδοσης σε GOS.

Άλλη μία παράμετρος της διεργασίας μετατροπής της λακτόζης του γλυκού ορού σε GOS, που πρέπει να μελετηθεί, αποτελεί το φαινόμενο κρυστάλλωσης της λακτόζης. Το φαινόμενο αυτό εξαρτάται τόσο από τη θερμοκρασία όσο και από την συγκέντρωση άλλων συστατικών στο αντιδρών σύστημα και οδηγεί στην ανάπτυξη κρυσταλλικών δομών της λακτόζης, στις οποίες δεν μπορεί να δράσει το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης. Επομένως, το φαινόμενο αυτό αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στη βέλτιστη αξιοποίηση της λακτόζης του τυρογάλακτος για τη σύνθεση GOS και θα πρέπει να διερευνηθεί η αντιμετώπιση αυτού.

Τέλος, προτείνεται η αριστοποίηση της διεργασίας και η αξιοποίηση άλλων συστατικών του γλυκού ορού, όπως οι πρωτεΐνες. Ο γλυκός ορός είναι πλούσιος σε πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η απομάκρυνσή τους και η παρασκευή συμπυκνώματος πρωτεΐνης που με συνδυασμό με τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες μπορεί να αποτελέσει τη βάση ενός πρωτεϊνούχου σκευάσματος με υψηλή θρεπτική και πρεβιοτική αξία.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Akal, C. (2017). Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan. Chapter 28: Benefits of Whey Proteins on Human Health, Elsevier Inc.
- Altuntas, S., Hapoglu, H. (2019). Kefir-type drinks from whey, In Grumezescu, A., Holban, A.M. *Trends in Non-alcoholic Beverages, Elsevier*, 185–226
- Antonopoulou, A., Stamatelatou, K., Venetsaneas, N., Kornaros, M., Lyberatos, G. (2008). Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 47, 5227–5233
- Athes, V., Combes D. (1998). Effect of high hydrostatic pressure on enzyme stability. *Stability and Stabilization of Biocatalysts*, 205-210.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Scieberle P. (2018). Χημεία Τροφίμων, εκδ. Τζιόλα, 4<sup>η</sup> έκδοση, 550-560.
- Bhargava, A., Jelen, P. (1996). Lactose Solubility and Crystal Growth as Affected by Mineral Impurities. *Journal of Food Science*, 61, No. 1
- Blaschek, K.M., Wendorff, W.L., Rankin, S.A. (2007). Survey of Salty and Sweet Whey Composition from Various Cheese Plants in Wisconsin, *J. Dairy Sci.*, 90, 2029–2034.
- Bode, L., Jantscher-Kren, E. (2012). Structure-Function Relationships of Human Milk Oligosaccharides. *American Society for Nutrition, Adv. Nutr.* 3, 383–391.
- Borshchevskaya, L.N., Gordeeva, T.L., Kalinina, A.N., Sineokii, S.P. (2016). Spectrophotometric Determination of Lactic Acid. *Journal of Analytical Chemistry*, 71, No. 8, 755–758.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bras, N.F., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. (2010). QM/MM Studies on the  $\alpha$ -Galactosidase Catalytic Mechanism: Hydrolysis and Transglycosylation Reactions, *J. Chem. Theory Comput.*, 6, 421–433.
- Coulier, L., Timmermans, J., Bas, R., Van Den Dool, E., Haaksman, I., Klarenbeek, B., Slaghek, T., Van Dongen, W. (2009). In-Depth Characterization of Prebiotic Galactooligosaccharides by a Combination of Analytical Techniques. *J. Agric. Food Chem.* 57, 8488–8495.

Dickson, R.C., Dickson, L.R., Markin, J.S. (1979). Purification and Properties of an Inducible  $\beta$ -Galactosidase Isolated from the Yeast *Kluyveromyces lactis*, *Journal of Bacteriology*, 51-61.

EPA Method 9038, United States Environmental Protection Agency

Fan, F., Roos, Y.H. (2017). Structural strength and crystallization of amorphous lactose in food model solids at various water activities, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 40, 27–34.

Fischer, C., Kleinschmidt, T. (2015). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*, 48, 15-22.

Fischer, C., Kleinschmidt, T. (2018). Synthesis of Galactooligosaccharides in Milk and Whey: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Vol.17

Gosling, A., Stevens, G.W., Barber, A.R., Kentish, S.E., Gras, S.L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 121, 307-318.

Guerrero, C., Vera, C., Conejeros, R., Illanes, A. (2015) Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of  $\beta$ -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 70, 9-17.

Hernández-Hernández, O., Montanés, F., Clemente, A., Moreno, F.J., Sanz, M.L. (2011). Characterization of galactooligosaccharides derived from lactulose, *Journal of Chromatography*, 1218, 7691–7696.

Illanes A. (2016). Lactose-Derived Prebiotics. Chapter 1: Lactose: Production and Upgrading

Jelen, P. (2002). Utilization and Products, *Whey Processing*, 2739-2745.

Johnson, E.A., Echavarri-Erasun, C. (2011). The Yeasts, a Taxonomic Study, Chapter 3: Yeast Biotechnology

Johnson, J.M., Conforti, F.D. (2003). Lactose, *Elsevier Science*, 3472-3476.

Kilara, A., Vaghela, M.N. (2018). Proteins in Food Processing, Chapter 4: Whey Proteins, Elsevier Ltd

Kim, C.S., Ji, E.S., Oh, D.K. (2003). Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 25, 1769–1774.

Korhonen, H., Pihlanto – Leppälä, A., Rantamäki, P., Tupasela, T. (1998). The functional and biological properties of whey proteins prospects for the

development of functional foods, *Agricultural and Food Science in Finland*, Vol. 7, 283-296.

Lacy, L.R., Dickson, R.C. (1981). Transcriptional Regulation of the *Kluyveromyces lactis*,  $\beta$ -Galactosidase Gene, *Molecular and Cellular Biology*, 629-634.

Leusen, E., Torringa, E., Groenink, P., Kortleve, P., Geene, R., Schoterman, M., Klarenbeek B. (2014). Industrial Applications of Galactooligosaccharides, Food Oligosaccharides: Production, *Analysis and Bioactivity*, 1<sup>st</sup> edition, John Wiley & Sons, Ltd

Lievore, P., Simões, D.R.S., Silva, K.M., Drunkler, N.L., Barana, A.C., Nogueira, A., Demiate I.M. (2013). Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *Journal of Food and Science Technology*

Liua, Y., Chenb, Z., Jianga, Z., Yanb, Q., Yanga, S. (2017). Biochemical characterization of novel  $\beta$ -galactosidase from *Paenibacillus barengoltzii* suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1055-1063.

Lu, L., Xiao, M., Li, Z., Li, U., Wang, F.S. (2009). A novel transglycosylating  $\beta$ -galactosidase from *Enterobacter cloacae* B5. *Process Biochemistry*, 44, 232–236.

Manera, A.P., de Almeida Costa, F.A., Rodrigues, M.I., Kalil, S.J., Filho, F.M. (2010). Galacto-oligosaccharides Production Using Permeabilized Cells of *Kluyveromyces marxianus*. *International Journal of Food Engineering*, 6(6), 4.

Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M.D., Besson, T. (2003). Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, *Biotechnology Letters*, 25, 623–629.

Neri, D.F.M, Balcãoa, V.M., Costaa, R.C., Rochaa, I.C.A.P., Ferreiraa, E.M.F.C., Torres, D.P.M., Rodriguesa, L.R.M., Carvalho Jr., L.B., Teixeiraa, J.A. (2009). Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane–polyvinyl alcohol. *Food Chemistry*, 115, 92–99.

Nishanthi, M., Vasiljevic, T., Chandrapala, J. (2017). Properties of whey proteins obtained from different whey streams. *International Dairy Journal*, 66, 76-83.

Panesar, P.S., Kaur, R., Singh, R.S., Kennedy, J.F. (2018). Biocatalytic strategies in the production of galactooligosaccharides and its global status. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 667-679.

Palai, T., Mitra, S., Bhattacharya, P.K., (2012). Kinetics and design relation for enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides using commercial grade  $\beta$ -galactosidase, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 114 No. 4, 418-423.

- Park, A.R, Oh, D.K. (2010). Galacto-oligosaccharide production using microbial  $\beta$ -galactosidase: current state and perspectives. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 85, 1279–1286.
- Roos, Y.R., Karel, M. (1991). Plasticizing Effect of Water on Thermal Behavior and Crystallization of Amorphous Food Models. *Journal of Food Science*, Volume 56, No. 1
- Roos, Y.R., Karel, M. (1992). Crystallization of Amorphous Lactose. *Journal of Food Science*, Volume 57, No. 3
- Santibáñez, L., Fernández-Arrojob, L., Guerrero, C., Ploub, F.J., Illanes, A. (2016). Removal of lactose in crude galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, 85 – 91.
- Singh, R., Geetanjali (2016). Protein By-products, Chapter 16: Whey Proteins and Their Value-Added Applications, Elsevier Inc.
- Smithers G.W. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’, *International Dairy Journal*, 18, 695-704.
- Splechtna, B., Nguyen, T., Steinböck, M., Kulbe, K.D., Lorenz, W., Haltrich D. (2006). Production of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides from Lactose Using  $\beta$ -Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4999-5006.
- Suarez, F., Shannon, C., Hertzler, S., Savaiano, D. Lactose Intolerance. *Food Intolerance*, 2634-2642
- Tallapragada, P., Rayavarapu, B. (2019). Milk-based Beverages, Chapter 5: Recent Trends and Developments in Milk-Based Beverages, Elsevier Inc.
- Torres, D.P.M., do Pilar F. Goncalves, M., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. (2010). Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Vol.9
- Verma, M. (2013). HPAE-PAD for the Analysis of Carbohydrates. *Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA*
- Zall, R.R. (1992). Sources and Composition of Whey and Permeate, In Zadow, J.G. *Whey and Lactose Processing, Elsevier Science Publishers*, 2–72
- Zhou, Q.Z.K., Chen, X.D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\beta$ - galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, *Biochemical Engineering Journal*, 9, 33–40.



Γαλάνη Ι. Ε. (2016), Παραγωγή συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας από τα απόβλητα της βιομηχανίας γιαουρτιού, Διπλωματική Εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Τσίκα Ε. (2019), Αξιοποίηση όξινου ορού γιαουρτιού για παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών με χρήση βιοκαταλυτών, Διπλωματική Εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο