



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

**Μελέτη θερμοάντοχης β-γαλακτοζιδάσης για τη σύνθεση πρεβιοτικών  
γαλακτοολιγοσακχαριτών**



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΝΑΥΣΙΚΑ ΚΟΡΙΑΛΟΥ**

**Επιβλέπων Καθηγητής: ΠΕΤΡΟΣ ΤΑΟΥΚΗΣ**



*Στους φίλους μου,  
που έκαναν τα φοιτητικά μου χρόνια πιο όμορφα.*



# Ευχαριστίες

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ κατά το χρονικό διάστημα 02/2020-02/2021, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κ. Πέτρου Ταούκη.

Στο τέλος αυτού του ταξιδιού, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Πέτρο Ταούκη για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με τον τομέα της χημείας και τεχνολογίας τροφίμων, την εμπιστοσύνη του, καθώς και όλες τις γνώσεις που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των σπουδών μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Μαρία Τσεβδού, Επιστημονικό Συνεργάτη του Εργαστηρίου Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ και τον Υποψήφιο Διδάκτορα κ. Αθανάσιο Λημναίο για τη συνεχή καθοδήγηση, στήριξη και εμπιστοσύνη που μου έδειξαν. Ευχαριστώ θερμά τους Καθηγητές, τα μέλη ΕΔΙΠ, τους Επιστημονικούς Συνεργάτες, τους Υποψήφιους Διδάκτορες και τους συμφοιτητές μου στο Εργαστήριο Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ για την άψογη συνεργασία μας και το όμορφο κλίμα εντός του Εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους κοντινούς μου ανθρώπους που ήταν δίπλα μου στη μεγάλη αυτή διαδρομή, χωρίς αυτούς δεν θα βρισκόμουν ούτε στα μισά. Τους φίλους μου, εντός και εκτός σχολής, την Άννα, την Μαρία Γ., την Φίλιππα, την Χλόη, την Μαρίνα, τη Φαίδρα, τη Σοφία, την Αλίκη, τη Βάσια, τη Γεωργία, τη Δανάη, την Μαρία Γ., την Μαρία Χ., τον Γιάννη, τον Κωνσταντίνο για όλα τα γέλια, τους τσακωμούς, για όλους τους τσακωμούς που έγιναν γέλια, κυρίως το τελευταίο. Ευχαριστώ τους γονείς μου και τον αδελφό μου, που μου έμαθαν να παλεύω για ό,τι αγαπώ.

*Κοριαλού Ναυσικά*

*Φεβρουάριος 2021*



# Περίληψη

---

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη της αξιοποίησης του όξινου ορού στραγγιστού γιαουρτιού για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών (Galactooligosaccharides, GOS), αξιοποιώντας την περιεχόμενη σε αυτόν λακτόζη. Οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, τα τελευταία χρόνια, καθώς εμφανίζουν πρεβιοτική δράση, με αποτέλεσμα να αποτελούν προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η σύνθεση των GOS πραγματοποιήθηκε μέσω της ενζυμικής αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης, με χρήση του ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης (*Ttbgal1*). Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το ανασυνδυασμένο γονιδίωμα του μικροοργανισμού *Thermothielavioides terrestris*, ετερόλογα εκφρασμένο στη ζύμη *Pichia pastoris*. Σε πρώτο στάδιο, αναλύθηκαν τα συστατικά του όξινου ορού, ακολούθησε ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών δράσης του ενζύμου σε πρότυπο υπόστρωμα ορθο-νιτοφαινυλο-β-D-γαλακτοπυρανόζης (oNPG) και τελικά μελετήθηκε η απόδοση της ενζυμικής μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS. Από τη χημική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, υπολογίστηκε πως στον όξινο ορό περιέχονται  $2,84 \pm 0,36\%$  w/v ολικά σάκχαρα, λακτόζη ίση με  $2,83 \pm 0,11\%$  w/v και γαλακτόζη ίση με  $0,70 \pm 0,01\%$  w/v. Τα ολικά στερεά υπολογίστηκαν ίσα με  $5,13 \pm 0,01\%$  w/w και η τέφρα ίση με  $0,71 \pm 0,04\%$  w/w. Η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών του ορού υπολογίστηκε με την μέθοδο Kjeldhal και είχε τιμή ίση με  $0,35 \pm 0,05\%$  w/w, ενώ τα λιπαρά του ορού υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Rose-Gottlieb με τιμή ίση με  $0,05 \pm 0,02\%$  w/v. Η αλατότητα του όξινου ορού προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Mohr και προέκυψε ίση με  $0,92 \pm 0,13\%$  w/v. Τα θειικά ιόντα και το γαλακτικό οξύ βρεθήκαν ίσα με  $94,02 \pm 5,08$  mg/L και  $1,32 \pm 0,06$  g/L, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ενζυμική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης *Ttbgal1* σε θερμοκρασιακό εύρος 30-70 °C και εύρος pH 3,0-9,0. Το ένζυμο εμφάνισε βέλτιστη δράση σε τιμή pH 4,5 και θερμοκρασία 50 °C. Ακολούθησαν συνολικά 15 ενζυμικές αντιδράσεις σε ενζυμικές ενεργότητες 0,5-4 U/mL και αρχική συγκέντρωση λακτόζης του ορού 2,83-23% w/v. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στη θερμοκρασία των 50 °C και τιμή pH 4,5, ίδια με αυτή του όξινου ορού. Η διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης ήταν 24 h. Η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με χρήση ανιχνευτή Δείκτη Διάθλασης (HPLC-RI). Οι παράγοντες που μελετήθηκαν αφορούσαν την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης στο αντιδρών σύστημα, καθώς και την επίδραση της ενζυμικής ενεργότητας στο βαθμό απόδοσης της ενζυμικής σύνθεσης σε GOS, συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης.

Συνοπτικά, για κάθε συγκέντρωση λακτόζης στο αντιδρών σύστημα επιτεύχθηκαν οι εξής μέγιστες αποδόσεις σε GOS:

- 21,8% μετά από 60 min ενζυμικής αντίδρασης, ενζυμικής ενεργότητας 4 U/mL, για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 2,83% w/v.
- 19,2% μετά από 1440 min ενζυμικής αντίδρασης, ενζυμικής ενεργότητας 2 U/mL, για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 10% w/v.

- 38,0% μετά από 600 min ενζυμικής αντίδρασης, ενζυμικής ενεργότητας 4 U/mL, για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 10% w/v.
- 17,5% μετά από 1440 min ενζυμικής αντίδρασης, ενζυμικής ενεργότητας 2 U/mL, για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 15% w/v.
- 32,7% μετά από 1440 min ενζυμικής αντίδρασης, ενζυμικής ενεργότητας 4 U/mL, για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 15% w/v.

Συνοψίζοντας, οι βέλτιστες συνθήκες της ενζυμικής μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS με χρήση του ενζύμου *TtbGal1*, για τις συνθήκες που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, επιτεύχθηκαν σε υπόστρωμα όξινου ορού αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης 10% w/v, με ενζυμική ενεργότητα 4 U/mL, θερμοκρασία 50°C και τιμή pH 4,5. Η μέγιστη απόδοση σε GOS λαμβάνει τιμή ίση με 38,0%, έπειτα από 600 min αντίδρασης.

Εν κατακλείδι, η παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών από όξινο ορό γιαουρτιού, με τη χρήση του ενζύμου *TtbGal1*, μπορεί να αποτελέσει μια βιώσιμη εναλλακτική μέθοδο αξιοποίησης, του κύριου παραπροϊόντος της γαλακτοβιομηχανίας.



# Application of a thermo-stable $\beta$ -galactosidase for the synthesis of prebiotic galacto-oligosaccharides

---

Aim of this study was the utilization of lactose from acid whey of strained Greek yogurt for the production of galactooligosaccharides (GOS). GOS are substances of high added value, due to their prebiotic activity, and therefore are beneficial for human health. The synthesis of GOS was performed via an enzymatic reaction called transgalactosylation, and the enzyme that was used for this purpose was  $\beta$ -galactosidase (*Ttbgal1*). This enzyme was produced from the recombinant genome of the microorganism *Thermothielavioides terrestris*, heterologously expressed in the yeast *Pichia pastoris*. Firstly, the components of acid whey of strained yoghurt were analyzed. The next step was the determination of the optimal conditions of the enzyme on a standard ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranose substrate (oNPG). Finally, the conversion of lactose from the acid whey to GOS was studied and quantified. From the chemical analysis performed, we measured that the acid whey contained  $2.84 \pm 0.36\%$  w/v total carbohydrates,  $2.83 \pm 0.11\%$  w/v lactose and  $0.70 \pm 0.01\%$  w/v galactose. The total solids were calculated equal to  $5.13 \pm 0.01\%$  w/w and the ash equal to  $0.71 \pm 0.04\%$  w/w. Whey protein concentrations were calculated using Kjeldahl method and were found equal to  $0.35 \pm 0.05\%$  w/w, while whey fats were calculated using the Rose-Gottlieb method and were found equal to  $0.05 \pm 0.02\%$  w/v. The salinity of the acid whey was  $0.92 \pm 0.13\%$  w/v and was determined using the Mohr method. Sulfur ions and lactic acid were found to be  $94.02 \pm 5.08$  mg/L and  $1.32 \pm 0.06$  g/L, respectively.

In addition, the enzymatic activity of  $\beta$ -galactosidase *Ttbgal1* was studied for different temperatures (ranging from 30 °C to 70 °C) and different pH values (ranging from 3.0 to 9.0). The optimal enzyme activity was observed for pH=4.5 and for a temperature of 50 °C. Under these conditions, the activity of the enzyme, as determined by the oNPG method, was found to be 400 U/mL. In these conditions, 15 enzymatic reactions were performed using different enzymatic activities (from 0.5 U/mL to 4 U/mL) and different initial whey lactose concentrations (from 2.83% w/v to 20% w/v). The above-mentioned reactions were performed at 50 °C and pH=4.5, the same pH as that of the acid whey. The duration of the enzymatic reactions was 24 h. High Performance Liquid Chromatography coupled with a Refractive Index Detector (HPLC-RI) was the method selected for the analysis of the products. The effect of the initial concentration of lactose on the reaction system, as well as the effect of enzyme activity on the synthesis rate of GOS, was studied as a function of the reaction time.

In short, for each concentration of lactose in the reaction system the maximum GOS yields that were achieved were:

- 21.8% after 60 min of enzymatic reaction, with enzyme activity of 4 U/mL, and with an initial lactose concentration of 2.83% w/v.
- 19.2% after 1440 min of enzymatic reaction, with enzyme activity of 2 U/mL, and with an initial lactose concentration of 10% w/v.

- 38% after 600 min of enzymatic reaction, with enzyme activity of 4 U/mL, and with an initial lactose concentration of 10% w/v.
- 17.5% after 1440 min enzymatic reaction, with enzyme activity of 2 U/mL, and with an initial lactose concentration of 15% w/v.
- 32.7% after 1440 min of enzymatic reaction, with enzyme activity of 4 U/mL, and with an initial lactose concentration of 15% w/v.

We can conclude that the optimal conditions for the enzymatic conversion of acid whey lactose to GOS, using the enzyme *Ttbgal1*, and for the conditions studied in the present dissertation, were achieved on an acid whey substrate of initial lactose concentration of 10% w/v, enzyme activity equal to 4 U/mL, temperature 50 °C and pH=4.5. The maximum production of GOS is equal to 38%, after 600 minutes of reaction. In this way, the production of GOS from Greek yogurt acid whey, using the enzyme *Ttbgal1*, can be a viable alternative method of utilizing the main by-product of the dairy industry.

# Περιεχόμενα

---

<b>Κεφάλαιο 1. Όξινος ορός, απόβλητο χρυσός της Γαλακτοβιομηχανίας</b>	<b>1</b>
1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Ορός γάλακτος	3
1.2.1. Γλυκός και όξινος ορός	3
1.2.2. Συστατικά ορού	4
Λακτόζη	5
Πρωτεΐνες ορού	6
Δευτερεύουσας αξίας πρωτεΐνες	7
Μέταλλα	7
Βιταμίνες	7
Λίπη	7
1.3 Τεχνικές διαχείρισης ορού	7
1.3.1. Παραλαβή λακτόζης από ορό	8
Εφαρμογές λακτόζης	9
1.3.2. Εναλλακτικές τεχνολογίες χρήσης και αναβάθμισης του ορού	9
1.3.2.1. Αναερόβια χώνευση	9
Βιοαέριο	9
1.3.2.2. Ζύμωση & Προϊόντα ζύμωσης	10
Βιοαιθανόλη	10
Βιοβουτανόλη	10
Γαλακτικό οξύ	11
Άλλα προϊόντα ζύμωσης	11
<b>Κεφάλαιο 2. Αξιοποίηση της λακτόζης μέσω ενζυμικών αντιδράσεων</b>	<b>13</b>
2.1. β-γαλακτοζιδάση	13
2.1.1. Πηγές β-γαλακτοζιδάσης	13
Βακτηριακές πηγές	13
Μυκητιακές πηγές	14
2.1.2 Παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης	15

Μέθοδος βυθισμένης ζύμωσης	15
Απομόνωση β-γαλακτοζιδάσης	16
2.1.3. Ψυχρόφιλη και θερμοσταθερή β-γαλακτοζιδάση	17
2.2. Ενζυμική υδρόλυση	17
2.2.1. Εφαρμογές ενζυμικής υδρόλυσης	18
2.2.2. Δυσανεξία στην λακτόζη	18
2.3 Αντίδραση μεταγαλακτοζυλίωσης	19
<b>Κεφάλαιο 3. Γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS) &amp; Βελτιστοποίηση της αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης</b>	21
3.1 Εισαγωγή	21
3.2. Γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)	21
3.3. Απόδοση παραγωγής GOS & βελτιστοποίηση των συνθηκών αντίδρασης	23
3.3.1. Απόδοση	23
3.3.2. Αρχική συγκέντρωση λακτόζης	23
3.3.3. Χρόνος σύνθεσης GOS	23
3.3.4. Θερμοκρασία	24
3.3.5. Πηγές ενζύμου	25
3.3.6. Βαθμοί πολυμερισμού και γλυκοζιδικοί δεσμοί σε μείγματα GOS	27
3.4. Είδη βιοκαταλυτών στη σύνθεση GOS	28
3.4.1. Σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών με ολόκληρο κύτταρο	28
3.4.2. Ελεύθερες γαλακτοζιδάσες	28
3.4.3. Ακίνητοποίηση β-γαλακτοζιδάσης	29
3.4.4. Ανασυνδυασμένες β-γαλακτοζιδάσες	30
3.5. Παγκόσμια αγορά GOS	30
3.6. Στόχοι & υφιστάμενες επιστημονικές μελέτες της ενζυμικής βιομετατροπής της λακτόζης σε GOS	32
<b>Κεφάλαιο 4. Υλικά, μέθοδοι &amp; πειραματική διαδικασία</b>	36
4.1. Χημική ανάλυση όξινου ορού	37
4.1.1. Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος & τέφρας	37
4.1.2 Προσδιορισμός γαλακτικού οξέος	38
Κατασκευή καμπύλης αναφοράς γαλακτικού οξέος	39

Μέτρηση γαλακτικού οξέος σε άγνωστο δείγμα	39
4.1.3. Προσδιορισμός αλατότητας ( Μέθοδος Mohr)	40
4.1.4. Προσδιορισμός πρωτεϊνών (Μέθοδος Kjeldhal)	41
4.1.5. Προσδιορισμός λίπους (Μέθοδος Rose-Gottlieb)	43
4.1.6. Προσδιορισμός ολικών σακχάρων με την μέθοδο φαινόλης και θειικού οξέος	45
4.1.7. Προσδιορισμός θειικών ιόντων ( $SO_4^{2-}$ )	46
Σχηματισμός θολότητας θειικού βαρίου	47
Προετοιμασία της καμπύλης βαθμονόμησης	47
4.2. Ενζυμική αντίδραση	47
4.2.1. Ενεργότητα ενζύμου	47
Κατασκευή καμπύλης αναφοράς	48
Προσδιορισμός βέλτιστης ενεργότητας ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης	48
4.2.2. Προεπεξεργασία όξινου ορού	48
4.2.2.1. Συμπύκνωση υπό κενό	49
4.2.2.2 Καμπύλες αναφοράς των σακχάρων	50
4.2.3. Ενζυμική αντίδραση παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών	51
4.2.4. Ανάλυση δειγμάτων ενζυμικής αντίδρασης	51
<b>Κεφάλαιο 5. Συζήτηση αποτελεσμάτων</b>	61
5.1. Χημική ανάλυση του ορού	61
5.1.1. Καμπύλες αναφοράς	61
5.1.1.1 Καμπύλη αναφοράς του γαλακτικού οξέος	61
5.1.1.2 Καμπύλη αναφοράς των θειικών ανιόντων	62
5.1.1.3. Καμπύλη αναφοράς των ολικών σακχάρων	62
5.1.1.4 Καμπύλες αναφοράς των σακχάρων	63
5.1.2. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης του όξινου ορού γιαουρτιού	66
5.2. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας του ενζύμου <i>Ttbgal1</i> από το μικροοργανισμό <i>Thermothielavioides terrestris</i>	66
5.3. Αποτελέσματα ενζυμικών αντιδράσεων	68
5.3.1. Επίδραση του ενζυμικού φορτίου της β-γαλακτοζιδάσης στην παραγωγή των GOS	

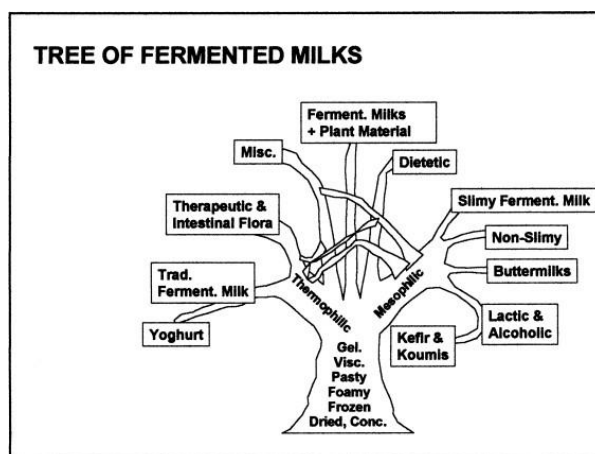
5.3.1.1 Όξινος ορός με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 2,83% w/v	69
Μεταβολή συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών	69
Μεταβολή συγκέντρωσης των δισακχαριτών	70
Απόδοση σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)	71
5.3.1.2 Όξινος ορός με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 10% w/v	72
Μεταβολή συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών	72
Μεταβολή συγκέντρωσης των δισακχαριτών	73
Απόδοση σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)	74
5.3.1.3 Όξινος ορός με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 15% w/v	75
Μεταβολή συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών	75
Μεταβολή συγκέντρωσης των δισακχαριτών	76
Απόδοση σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)	77
5.3.1.4 Όξινος ορός με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 23% w/v	77
Μεταβολή συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών	78
Μεταβολή συγκέντρωσης των δισακχαριτών	79
Απόδοση σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)	80
5.3.2. Επίδραση της συγκέντρωσης της λακτόζης στην παραγωγή των GOS	80
Μεταβολή συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών	81
Μεταβολή συγκέντρωσης των δισακχαριτών	83
Απόδοση σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)	85
<b>Κεφάλαιο 6. Σύνοψη-Συμπεράσματα</b>	88
Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	95
<b>Βιβλιογραφία</b>	95

# Κεφάλαιο 1. Όξινος ορός, απόβλητο χρυσός της γαλακτοβιομηχανίας

## 1.1 Εισαγωγή

Η παρασκευή γιαουρτιού ξεκινά λόγω της εξελικτικής μετάβασης της ανθρώπινης δραστηριότητας από τη συλλογή και την αποθήκευση στην παραγωγή τροφίμων. Σε παγκόσμιο επίπεδο, το γάλα, το γιαούρτι και τα υπόλοιπα γαλακτοκομικά προϊόντα συνεισφέρουν στο 5% της συνολικής προσλαμβανόμενης ενέργειας του μέσου ανθρώπου και θεωρούνται τρόφιμα υψηλής θρεπτικής αξίας. Το γάλα αποτελεί τη βάση για όλα τα γαλακτοκομικά προϊόντα και το γιαούρτι θεωρείται το πιο ευρέως ζυμωμένο προϊόν γάλακτος σε όλο τον κόσμο. Παρασκευάζεται με την προσθήκη μαγιάς, ή αλλιώς πυτιάς, είτε με την προσθήκη ειδικών βακτηριακών στελεχών στο γάλα, τα οποία ζυμώνουν την λακτόζη, που είναι η κυριάρχη μορφή υδατανθράκων στο γάλα. Παραδοσιακά, το γιαούρτι παράγεται από τα θερμοφιλά οξυγαλακτικά βακτήρια *Treptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* και *Lactobacillus acidophilus* που αναπτύσσονται σε συνέργεια με το γάλα. Η διεργασία της ζύμωσης διεξάγεται σε θερμοκρασίες 30-43 ° C για περίοδο 2,5-20 h (Yildiz, 2009).

Χρησιμοποιώντας διαφορετικούς τύπους μικροοργανισμών μπορούν να κατασκευαστούν και διαφορετικά είδη προϊόντων όπως το *villi*, το οποίο είναι δημοφιλές στη Φινλανδία ή το *koumiss* και *kefir* με το συνδυασμό της γαλακτικής και αλκοολικής ζύμωσης. Στη δεκαετία του 1980, ο Kurmann (1984) προσπάθησε να ταξινομήσει τις ποικιλίες ζυμωμένου γάλακτος σε ένα «οικογενειακό δέντρο», το οποίο βασίστηκε στις βέλτιστες απαιτήσεις ανάπτυξης των καλλιεργειών εκκίνησης (π.χ. μεσοφιλική και θερμοφιλική μικροχλωρίδα (Tamime, 2002).



**Εικόνα 1.** «Οικογενειακό δέντρο» ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (Kurman, 1984).

Ο Tamime (2002) αναφέρει 400 ονομασίες, οι οποίες εφαρμόστηκαν σε παραδοσιακά και βιομηχανοποιημένα προϊόντα που αφορούσαν μόνο τα γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση. Ως εκ τούτου, η σύνθεση του γάλακτος και του γιαουρτιού μπορεί να είναι τόσο μεταβλητή

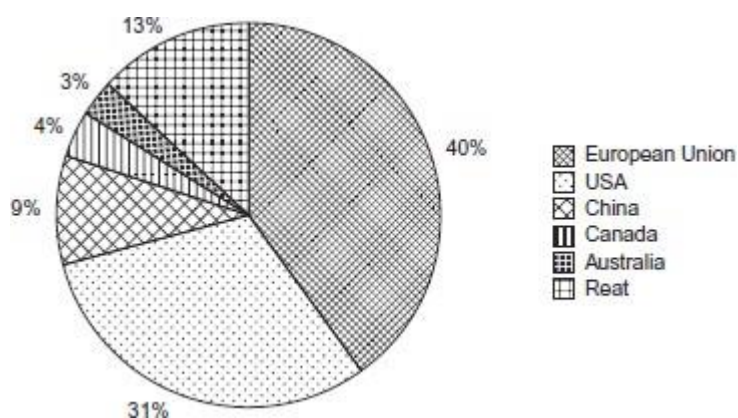
όσο η ποικιλία των προϊόντων αυτών. Σήμερα, υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία γαλακτοκομικών προϊόντων με διαφορετικές ιδιότητες σε βιταμίνες και μέταλλα, η οποία μπορεί να περιέχει φρούτα, ξηρούς καρπούς ή δημητριακά καθώς και διάφορες μορφές ζωντανών βακτηρίων (Yildiz, 2009). Τα μακροθρεπτικά συστατικά διαφόρων ειδών γαλακτοκομικών προϊόντων παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Μακροθρεπτικά συστατικά διαφόρων τύπων γιαουρτιού και ποτών γάλακτος που έχουν υποστεί ζύμωση (ανά 100g βρώσιμης μερίδας) (Yildiz, 2009).

Είδος γαλακτοκομικών	Ενέργεια (kcal)	Νερό (g)	Υδατάνθρακες (g)	Λιπή (g)	Λιπαρά οξέα(g)	Χοληστερόλη (g)	Πρωτεΐνη (g)
Γιαούρτι πλήρους γάλακτος	79	81,9	7,8	3	2,8	11	5,7
Γιαούρτι με χαμηλά λιπαρά	56-63	87,2	7,0-7,4	1,0-1,6	0,9	1	3,0-4,8
Γιαούρτι χωρίς λιπαρά με φρούτα	54	86,9	8,2	0,2	0,2	δεν ανιχνεύτηκε	5,4
Γιαούρτι χωρίς λιπαρά με φρούτα	47	85,4	7	0,2	0,2	δεν ανιχνεύτηκε	4,8
Γιαούρτι αγελαδινού γάλακτος με φυτοστερόλες και φράουλες (Becel)	62	δεν ανιχνεύτηκε	7,0	0,9	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε	6,5
Γιαούρτι αγελαδινού γάλακτος με δημητριακά για παιδιά με πρεβιότικά και προβιοτικά (Fage)	122	δεν ανιχνεύτηκε	17,0	3,8	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε	4,9
Γιαούρτι αγελαδινού γάλακτος με δαμάσκηνα και προβιοτικά (Danone)	102	δεν ανιχνεύτηκε	15,1	2,6	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε	δεν ανιχνεύτηκε
Drinking γιαούρτι	62	84,4	13,1	Ίχνος	Ίχνος	Ίχνος	3,1
Γιαούρτι πρόβειου γάλακτος	92	80,9	5,0	6,0	6,0	14	4,8
Λάσση (γλυκαντική)	62	83,3	11,6	0,9	0,8	δεν ανιχνεύτηκε	2,6
Κεφίρ	65	87,5	4	3,5	δεν ανιχνεύτηκε	13	3,3
Παγωτό τύπου cornetto (σοκολάτα και ξηροί καρποί)	284	42,5	28,8	17,8	17,7	15	4,0
Παγωτό μπάρα (με επικάλυψη σοκολάτας)	311	33,1	21,8	23,3	22,3	δεν ανιχνεύτηκε	5,0
Γαλακτοκομική βανίλια παγωτού	177	62,5	19,8	9,8	9,8	24	3,6



Το ελληνικό γιαούρτι, γνωστό και ως στραγγιστό γιαούρτι, θεωρείται σήμερα από τα ταχύτερα αναπτυσσόμενα προϊόντα στη γαλακτοβιομηχανία. Λαμβάνεται μετά την αποστράγγιση του ορού γάλακτος. Λόγω της διαδικασίας αποστράγγισης, το στραγγιστό γιαούρτι παρουσιάζει υψηλότερα ολικά στερεά, χαμηλότερη λακτόζη και άρα υψηλότερη θρεπτική αξία σε σύγκριση με άλλους τύπους γιαουρτιού. Λόγω της αυξημένης παραγωγής του, η οποία πιθανότατα οφείλεται στη μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών σε θέματα διατροφής, παρατηρείται αυξημένη παραγωγή του ορού γάλακτος. Η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων, κυρίως του όξινου ορού, έχει επιφέρει οικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Bong & Moragu, 2014), (Smithers, 2015). Ο όξινος ορός δεν μπορεί χρησιμοποιηθεί άμεσα από τη βιομηχανία τροφίμων. Η υψηλή ζήτηση σε βιολογικό οξυγόνο, καθώς και το χαμηλό pH του (<4,5), περιορίζουν την χρήση του (Gyawali & Ibrahim, 2016). Αναγκαία λοιπόν κρίνεται, η περαιτέρω έρευνα από την επιστημονική κοινότητα για την αναζήτηση λύσεων που σχετίζονται με την διάθεση ή την αξιοποίηση του ορού.

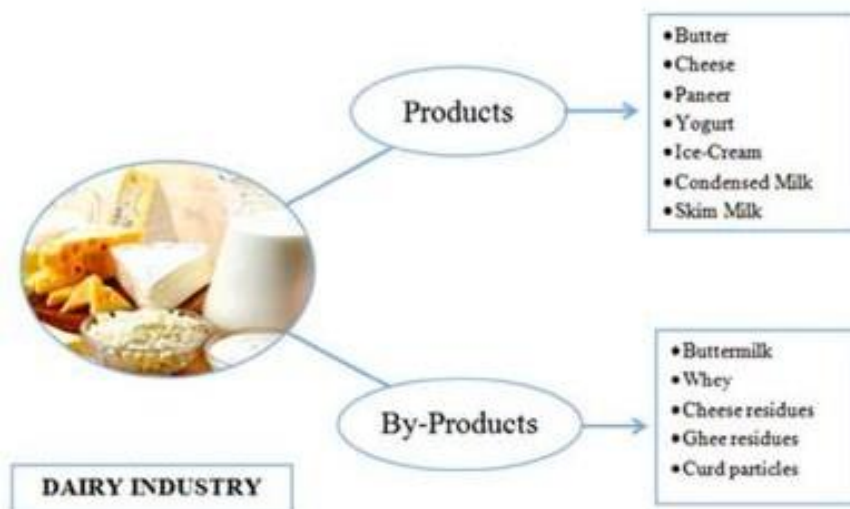


**Εικόνα 2.** Παγκόσμια παραγωγή ορού (modified from FAO, 2018), (P. S. Panesar et al., 2006).

## 1.2 Ορός Γάλακτος

### 1.2.1. Γλυκός και όξινος ορός

Ορός γάλακτος ορίζεται το υγρό γαλακτοκομικό παραπροϊόν, το οποίο λαμβάνεται κατά την πήξη του γάλακτος κατά την παρασκευή τυριού, γιαουρτιού, καζεΐνης ή παρόμοιων γαλακτοκομικών προϊόντων και διαχωρίζεται από τη σάρπη (τυρόπηγμα) μετά την πήξη του γάλακτος ή/και των προϊόντων που λαμβάνονται από γάλα. Θεωρείται το κύριο παραπροϊόν της βιομηχανίας γάλακτος και ο τύπος και η σύνθεσή του εξαρτάται κυρίως από τις τεχνικές επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται για την καταβύθιση της καζεΐνης στο γάλα (Nishanthi et al., 2017).



**Εικόνα 3.** Σχηματική αναπαράσταση προϊόντων και παραπροϊόντων της γαλακτοκομικής βιομηχανίας (Kaur et al., 2020).

Οι δύο συνηθέστεροι και σε μεγαλύτερη παραγωγή τύποι ορού είναι ο γλυκός και ο όξινος ορός. Ο γλυκός ορός, γνωστός και ως τυρόγαλα, προέρχεται από την παραγωγή τυριού (σκληρό τυρί, όπως το τυρί Cheddar) ή ορισμένων προϊόντων τυριού όπου η επεξεργασία βασίζεται στην πήξη της καζεΐνης με πυτιά (P. Panesar et al., 2007). Έχει τιμή pH 6-6,5. Ο όξινος ορός προκύπτει από διεργασίες ζύμωσης του γάλακτος προς την παραγωγή γιαουρτιού ή νωπών τυριών όπως το τυρί κρέμας, Cottage, Tvorog, το Fromage frais και το τυρί Ricotta (Tunick et al., 2008), (Jelen, 2002). Η διαδικασία πήξης των παραπάνω προϊόντων προέρχεται κυρίως από την πτώση του pH, λόγω της μετατροπής της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ με βακτήρια γαλακτικού οξέος ή με την προσθήκη οργανικών ή ανόργανων οξέων. Ως απόρροια των παραπάνω, ο όξινος ορός συναντάται σε χαμηλότερα pH σε τιμή 4-4,5. Η παρουσία του γαλακτικού οξέος, το σαφώς χαμηλότερο pH, καθώς και η υψηλότερη συγκέντρωση μεταλλικών ενώσεων καθιστούν τον όξινο ορό λιγότερο κατάλληλο για επεξεργασία, από τον αντίστοιχο της πυτιάς, με αποτέλεσμα να μελετάται ακόμη ως προς τις προοπτικές αξιοποίησης του (Illanes, 2016). Τα συστατικά του ορού, μπορούν να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά τροφίμων ή άλλων προϊόντων. Μεγάλο ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η χρήση τους ως πρώτη ύλη για την παραγωγή άλλων συστατικών, όπως οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες.

### 1.2.2. Συστατικά ορού

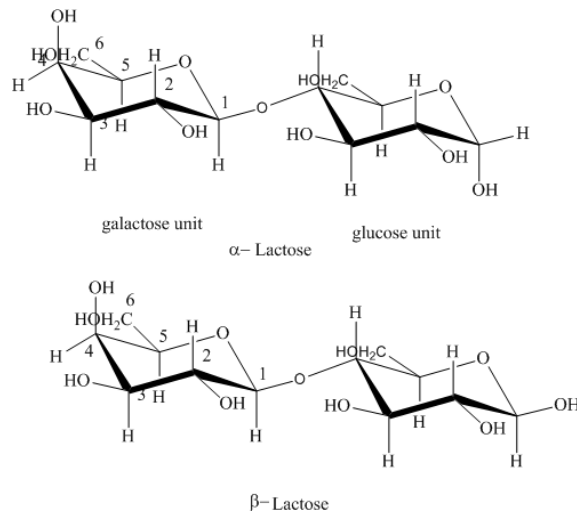
Τα κύρια συστατικά του ορού είναι το νερό σε ποσοστό 93% w/v, η λακτόζη σε ποσοστό 70 - 72% w/w επί των συνολικών στερεών, οι πρωτεΐνες γάλακτος σε ποσοστό 8 - 10% w/w επί των συνολικών στερεών και τα μέταλλα σε ποσοστό 12-15% w/w επί των συνολικών στερεών (Jelen, 2002). Οι κύριες διαφορές των δύο τύπων ορού αφορούν την περιεκτικότητα σε μέταλλα, την οξύτητα και το κλάσμα πρωτεϊνών του ορού. Οι διαφορές αυτές αν και θεωρούνται σχετικά, ελάχιστονο σημασίας, επηρεάζουν σημαντικά τον τρόπο επεξεργασίας του ορού ως παραπροϊόν .

**Πίνακας 2.** Συστατικά Γλυκού και Όξινου ορού (Fischer & Kleinschmidt, 2015).

Συστατικά	Γλυκός ορός	Όξινος ορός
Ολικά στερεά (g·L <sup>-1</sup> )	38,7 ± 0,75	39,1 ± 1,17
Γλυκόζη (g·L <sup>-1</sup> )	0,30 ± 0,02	Δεν ανιχνεύτηκε
Γαλακτόζη (g·L <sup>-1</sup> )	0,43 ± 0,05	1,10 ± 0,09
Λακτόζη (g·L <sup>-1</sup> )	38,0 ± 0,68	38,0 ± 1,08
Συνολική πρωτεΐνη (g·L <sup>-1</sup> )	5,56 ± 0,08	3,02 ± 0,03
Πρωτεΐνη ορού (g·L <sup>-1</sup> )	5,11 ± 0,07	2,42 ± 0,70
Καζεΐνη (g·L <sup>-1</sup> )	0,45 ± 0,09	0,60 ± 0,18
NPN (g·L <sup>-1</sup> )	0,71 ± 0,02	1,63 ± 0,05
Τέφρα (g·L <sup>-1</sup> )	4,33 ± 0,01	7,42 ± 0,01
Γαλακτικό οξύ (g·L <sup>-1</sup> )	0,50 ± 0,01	8,11 ± 0,08
Λίπη (g·L <sup>-1</sup> )	0,47 ± 0,01	0,18 ± 0,01
<b>Na<sup>+</sup></b> (Mm)	16,5 ± 0,35	18,6 ± 0,25
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> (Mm)	2,41 ± 0,05	10,4 ± 0,25
<b>K<sup>+</sup></b> (Mm)	29,6 ± 0,95	45,2 ± 0,59
<b>Mg<sup>2+</sup></b> (Mm)	2,81 ± 0,09	4,90 ± 0,09
<b>Ca<sup>2+</sup></b> (Mm)	8,44 ± 0,22	25,5 ± 0,70
<b>Cl<sup>-</sup></b> (Mm)	21,5 ± 0,53	42,6 ± 0,75
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> (Mm)	0,81 ± 0,04	0,33 ± 0,02
<b>PO<sub>4</sub><sup>-2</sup></b> (Mm)	8,35 ± 0,19	17,6 ± 0,37
<b>SO<sub>4</sub><sup>-2</sup></b> (Mm)	1,14 ± 0,18	0,64 ± 0,02

### Λακτόζη

Η λακτόζη αποτελεί το κύριο συστατικό του ορού. Πρόκειται για έναν φυσικό δισακχαρίτη, ο οποίος αποτελεί το μοναδικό σάκχαρο του γάλακτος των θηλαστικών. Συντίθεται στο επιθηλιακά κύτταρα του μαστού από τους μονοσακχαρίτες γλυκόζη και γαλακτόζη που απορροφώνται από το αίμα και συνδέονται μεταξύ τους με τον β-(1→4) γαλακτοζιτικό δεσμό. Ανήκει στα αναγωγικά σάκχαρα και υπάρχει στο γάλα με τους α- και β-ανωμερείς τύπους σε ισορροπία, οι οποίοι διαφέρουν ως προς τη θέση των -OH και -H του άνθρακα στη θέση 1 (C-1). Και τα δύο ανωμερή διαφέρουν ως προς τις ιδιότητές τους, με κύρια διαφορά αυτής της διαλυτότητας στο νερό: Το β-ανωμερές είναι περίπου επτά φορές πιο διαλυτό από το α-ανωμερές στους 20 °C (500 g / L έναντι 70 g / L), αλλά η διαλυτότητα του τελευταίου εξαρτάται από τη θερμοκρασία, με αποτέλεσμα στους 93,5 ° C να γίνεται πιο διαλυτό από το β-ανωμερές (Illanes, 2016).



**Εικόνα 4.** Δομή α- και β-λακτόζης (Illanes, 2016).

### *Πρωτεΐνες ορού*

Οι πρωτεΐνες του ορού, οι οποίες παραμένουν διαλυτές μετά από την καταβύθιση της πυτιάς ή του οξέος, αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% της συνολικής περιεκτικότητας πρωτεϊνών στο γάλα και η βιολογική τους αξία εκτιμάται, πως είναι ισάξια με αυτή των πρωτεϊνών αυγού (Illanes, 2016). Το κλάσμα πρωτεΐνης του ορού, που περιέχεται στο βόειο γάλα, αποτελείται από τέσσερις κύριες πρωτεΐνες: τη β-γαλακτογλοβουλίνη σε ποσοστό 50%, την α-γαλακταλβουμίνη σε ποσοστό 20%, την αλβουμίνη ορού σε ποσοστό 10% και τις ανοσοσφαιρίνες σε ποσοστό 10% επί τη βάση των συνολικών πρωτεϊνών ορού (Fox, 2001). Είναι τυπικά σφαιρικές πρωτεΐνες και μετουσιώνονται κατά τη θέρμανση. Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος περιέχουν ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι συμβάλλουν στη σταθερή δομή των μορίων και επηρεάζουν τη δομή και τις ρεολογικές ιδιότητες των πηκτών γάλακτος. Στη βιομηχανία τροφίμων τα συμπύκνωματα πρωτεΐνης ορού γάλακτος (WPC, WPI) χρησιμοποιούνται εκτενώς λόγω των θρεπτικών και λειτουργικών ιδιοτήτων τους. Πέρα από τη θρεπτική τους αξία, οι πρωτεΐνες ορού συμβάλλουν θετικά στο μεταβολισμό με σημαντικά αντιμικροβιακά και αντιοξειδωτικά αποτελέσματα, αντικαρκινογόνο δράση, μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων και ενίσχυση των μυών και των οστών. Αυτές οι ιδιότητες αποδίδονται κυρίως στις πρωτεΐνες γαλακτοσφαιρίνη και γαλακτοαλβουμίνη (Gyawali & Ibrahim, 2016), (Illanes, 2016).

**Πίνακας 3.** Βιολογική αξία (BV) και πρωτεϊνικός βαθμός Διόρθωσης Αμινοξέων (PDCAAS) κοινών διατροφικών πρωτεϊνικών πηγών.

Πρωτεΐνες	BV	PDCAAS
Γάλα	91	1
Καζεΐνη	77	1
Πρωτεΐνη ορού	104	1
Πρωτεΐνη αβγού	100	1
Πρωτεΐνη σόγιας	74	0,25
Γλουτένη από σιτάρι	64	0,92
Κρέας	80	0,52

#### *Δευτερεύουσας αξίας πρωτεΐνες*

Ο ορός περιέχει και πρωτεΐνες δευτερεύουσας αξίας. Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν ένζυμα (περίπου 60), ένζυμα αναστολείς, πρωτεΐνες δέσμησης μετάλλων (ειδικά την λακτοφερίνη και την οστεοποντίνη), πρωτεΐνες δέσμησης βιταμινών και αρκετούς αυξητικούς παράγοντες (Fox, 2001). Παρότι οι δευτερεύουσες πρωτεΐνες δεν αποτελούν σημαντικά συστατικά στα περισσότερα γαλακτοκομικά προϊόντα, οι ιδιότητες τους έχουν προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως ουδετεροφάρμακα.

#### *Μέταλλα*

Ο ορός αποτελεί μια καλή πηγή ηλεκτρολυτών συμπεριλαμβανομένου του νατρίου και του καλίου. Μέταλλα όπως το ασβέστιο, το μαγνήσιο και ο φωσφόρος ανιχνεύονται και αυτά στο διάλυμα, εν μέρει δεσμευμένα σε πρωτεΐνες. Ίχνη ψευδαργύρου έχουν επίσης εντοπιστεί. Έχει επίσης παρατηρηθεί πως η λακτόζη ενισχύει την απορρόφηση ιόντων  $Mg^{+}$  και  $Zn^{+}$ , τα οποία εντοπίζονται σε ίχνη.

#### *Βιταμίνες*

Κατά τη διαδικασία παραλαβής του ορού από το γιαούρτι, οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες μεταφέρονται από το γιαούρτι στον ορό. Συγκεκριμένα, οι βιταμίνες που μεταφέρονται στον όξινο ορό, αποτελούν το 40-70% της βιταμίνης B12, το 55-75% της βιταμίνης B6 και του παντοθενικού οξέος (B5), το 70-80% της ριβοφλαβίνης (B2) και βιοτίνης (B7) και το 80-90% των θειαμίνης (B1), νικοτινικού, φολικού και ασκορβικού οξέος του γάλακτος από το οποίο παράγεται. Παρατηρείται λοιπόν ότι ο ορός περιέχει μεγάλο ποσοστό των συνολικών βιταμινών του γιαουρτιού, επιβεβαιώνοντας τη δυνατότητα αξιοποίησης του λόγω της θρεπτικότητάς του (Macwan et al., 2016).

#### *Λίπη*

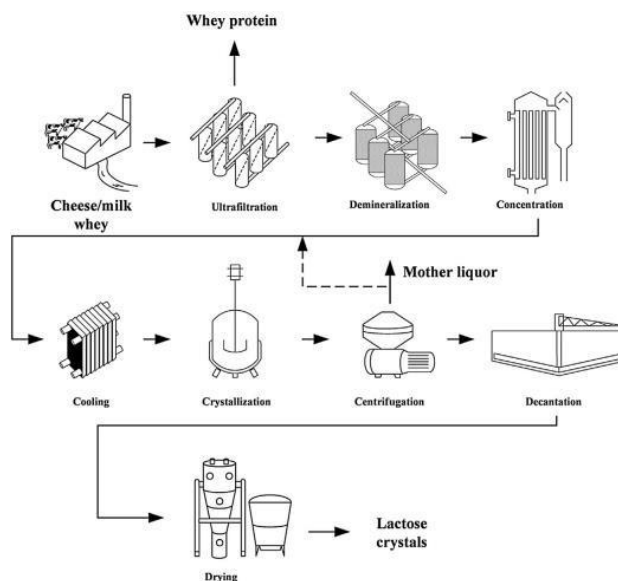
Η περιεκτικότητα σε λιπαρά εξαρτάται από το γάλα που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για την παραγωγή γιαουρτιού. Συγκεκριμένα, κατά τον διαχωρισμό του πηγματος, τα λιπαρά που δεν έχουν εγκλωβιστεί στην στερεά δομή μεταφέρονται στον υπερκείμενο ορό. Από εκεί και έπειτα, μπορούν να διαχωριστούν από τον ορό με φυγοκέντρηση (αποκορύφωση) για περαιτέρω χρήση.

### 1.3 Τεχνικές διαχείρισης ορού

Τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται συνήθως για την αποτελεσματική διαχείριση του ορού. Η πρώτη προσέγγιση βασίζεται στην εφαρμογή διαφορετικών φυσικοχημικών τεχνικών (καθίζηση, κροκίδωση, υπερδιήθηση, αντίστροφη όσμωση) για την ανάκτηση πολύτιμων ενώσεων, όπως οι πρωτεΐνες και η λακτόζη. Η δεύτερη προσέγγιση περιλαμβάνει την βιολογική επεξεργασία, όπως η αναερόβια και αερόβια χώνευση και ζύμωση για την αξιοποίηση του ορού. Η τρίτη μέθοδος, η οποία θα αναλυθεί εκτενέστερα στο επόμενο κεφάλαιο, περιλαμβάνει τη μετατροπή του ορού σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας, χρησιμοποιώντας βιοτεχνολογικές μεθόδους (Kaur et al., 2020).

#### 1.3.1. Παραλαβή λακτόζης από ορό γάλακτος

Ο ορός γάλακτος μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία, ως πρώτη ύλη, για την παραγωγή λακτόζης.



Εικόνα 5. Σχηματικό διάγραμμα παραγωγής λακτόζης από ορό γάλακτος (Illanes, 2016).

Οι φυσικές διεργασίες για την απομόνωση της λακτόζης από τον ορό παρουσιάζονται παρακάτω:

**Συμπύκνωση:** Συνήθως γίνεται με εξαμιστήρες πολλαπλών βαθμίδων. Σε ορισμένες περιπτώσεις το διήθημα συμπυκνώνεται με αντίστροφη όσμωση και προ-συμπύκνωση μαζί με μερική αφαλάτωση, η οποία μπορεί να γίνει με νανοδιήθηση.

**Κρυστάλλωση:** Με ψύξη μέχρι το διάλυμα να καταστεί υπέρκορο. Εναλλακτικά, καταβύθιση με μέταλλα αλκαλικών γαιών (διαδικασία Steffen) και αλκοόλες.

**Ανάκτηση:** Οι κρύσταλλοι λακτόζης ανακτώνται με απόχυση ή φυγοκέντρηση. Το μητρικό υγρό, που περιέχει τα περισσότερα από τα μέταλλα και περίπου το 20% της λακτόζης, απορρίπτεται, καθώς η ανάκτηση της λακτόζης από αυτό δεν είναι ελκυστική εάν δεν εκτελεστεί ξανά αφαλάτωση του υγρού.

**Ξήρανση:** Οι κρύσταλλοι λακτόζης που περιέχουν 5-12% υγρασία ξηραίνονται σε εξατμιστήρα φλας ή ρευστοποιημένες κλίνες.

**Καθαρισμός:** Ανάλογα με τη μετέπειτα χρήση της λακτόζης, ενδέχεται να απαιτείται περαιτέρω διύλιση. Η λακτόζη Foodgrade δεν απαιτεί εργασίες στίλβωσης, αλλά για τη φαρμακευτική λακτόζη, απαιτείται ραφινάρισμα. Ακολουθεί δηλαδή, επαναδιάλυση των κρυστάλλων λακτόζης, επεξεργασία του διαλύματος με ενεργό άνθρακα, απομάκρυνση υπολειμμάτων πρωτεϊνών και ανακρυστάλλωση.

### **Εφαρμογές λακτόζης**

Η καθαρή λακτόζη μετά τον καθαρισμό της μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό τροφίμων, συστατικό σε βρεφικές κρέμες, συστατικό για φαρμακευτική χρήση, καθώς και πρώτη ύλη για παράγωγα λακτόζης. Μπορεί επίσης να προστεθεί για την αύξηση της γλυκύτητας αρωματισμένων τροφίμων όπως η σοκολάτα γάλακτος. Η λακτόζη, αν και συχνά κρυσταλλώνεται στα τρόφιμα προκαλώντας "αμμώδη" στοματική αίσθηση, έχει χρησιμοποιηθεί για την καθυστέρηση της κρυστάλλωσης άλλων σακχάρων, όπως η σακχαρόζη. Τέλος, οι άνυδρες μορφές της λακτόζης μπορούν να παγιδέψουν πτητικά συστατικά, δρώντας ως φορείς γεύσης, όπως συμβαίνει με τον στιγμιαίο καφέ. Η λακτόζη στα φαρμακευτικά προϊόντα χρησιμοποιείται κυρίως ως υλικό πλήρωσης και ως φορέας φαρμάκου. Πολλά δισκία είναι περιστασιακά καλυμμένα με επικαλύψεις λακτόζης. Η λακτόζη έχει χρησιμοποιηθεί επίσης ως πηγή άνθρακα σε πολλές ζυμώσεις, συμπεριλαμβανομένης και της παραγωγής πενικιλίνης τον πρώτο καιρό παραγωγής της στη βιομηχανία αντιβιοτικών, καθώς και ως πρώτη ύλη για πολλά χρήσιμα παράγωγα στα τρόφιμα και σε φαρμακευτικές εφαρμογές (Yang & Silva, 1995).

## **1.3.2. Εναλλακτικές τεχνολογίες χρήσης και αναβάθμισης του ορού γάλακτος**

### **1.3.2.1. Αναερόβια χώνευση**

#### **Βιοαέριο**

Το βιοαέριο είναι ένα αέριο πλούσιο σε μεθάνιο που παράγεται με τη διαδικασία της αναερόβιας πέψης με κύριο στόχο την αξιοποίηση και ασφαλή απόρριψη βιομηχανικών αποβλήτων (P. S. Panesar & Kennedy, 2012). Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την παραγωγή βιοαερίου με χρήση ορού γάλακτος. Ως υπόστρωμα λαμβάνεται η λακτόζη, η οποία ζυμώνεται επιτυχώς από μικρόβια, με απουσία οξυγόνου (Kaur et al., 2020). Ωστόσο, οι μελέτες αυτές κρίνουν αναποτελεσματική την άμεση αναερόβια πέψη του ορού, λόγω της αστάθειας των αντιδραστήρων, της χαμηλής παραγωγικότητας του βιοαερίου και της χαμηλής απόδοσης μεθανίου, που πιθανόν οφείλεται στο χαμηλό pH του ορού. Προσπάθειες για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας έχουν πραγματοποιηθεί με τη προσθήκη στον ορό διαφορετικών τύπων κοπριάς, όπως αυτής των πουλερικών, η οποία

οδήγησε στην αύξηση της απόδοσης του μεθανίου (Carlini et al., 2015). Παρόλα αυτά, η παραγωγή βιοαερίου στοχεύει κυρίως στη μείωση του πλεονάσματος του ορού και κατά επέκταση, στη μείωση των αποβλήτων της γαλακτοβιομηχανίας. Η συνεισφορά ενέργειας για την εκπλήρωση των απαιτήσεων των εγκαταστάσεων παραγωγής είναι μικρή, με αποτέλεσμα να μην αποτελεί προς το παρόν μια κερδοφόρα διεργασία (Illanes, 2016).

### 1.3.2.2. Ζύμωση & προϊόντα ζύμωσης

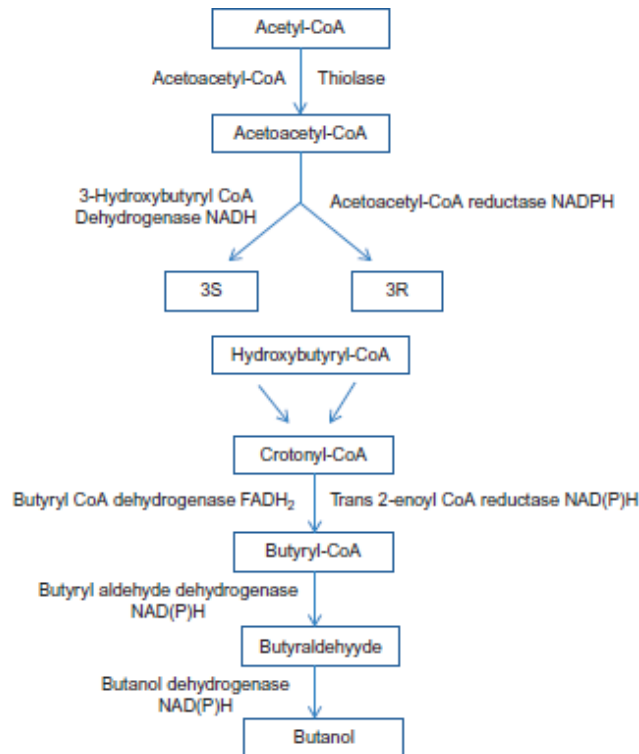
#### Βιοαιθανόλη

Η βιοαιθανόλη θεωρείται από τα σημαντικότερα βιοκαύσιμα και χρησιμοποιείται ευρέως σε όλο τον κόσμο (Kaur et al., 2020). Μια ενδιαφέρουσα και απλή εκτίμηση που έγινε από τους Guimarães et al., (Guimarães et al., 2010), κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το παγκόσμιο δυναμικό παραγωγής βιοαιθανόλης από πλεόνασμα ορού γάλακτος ανέρχεται σε 2,3 εκατομμύρια κυβικά μέτρα, το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου το 3,5% της παγκόσμιας παραγωγής αιθανόλης (Illanes, 2016). Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί για παραγωγή βιοαιθανόλης, όπως οι μύκητες *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida pseudotropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torula cremori* καθώς και ο *Kluyveromyces marxianus*, ο οποίος κρίθηκε ο πιο κατάλληλος για τη διαδικασία ζύμωσης λόγω της θερμοανθεκτικότητας του και του υψηλού ρυθμού ανάπτυξης του (Kaur et al., 2020), (Guimarães et al., 2010). Αν και η βιοαιθανόλη προερχόμενη από ορό γάλακτος δεν οδηγεί σε κάποιο ιδιαίτερο ενεργειακό κέρδος, σε σύγκριση με τη βιοαιθανόλη πρώτης γενιάς, δεν αποτελεί κάποια περιβαλλοντική απειλή, με αποτέλεσμα η βελτίωση της ζύμωσης της λακτόζης και των οργανισμών ζύμωσης να αποτελεί πρόκληση για την βιομηχανία (Illanes, 2016).

#### Βιοβουτανόλη

Η βιοβουτανόλη έχει προσελκύσει την προσοχή τα τελευταία χρόνια για τις δυνατότητές της ως καύσιμο μεταφοράς. Η παραδοσιακή οδός παραγωγής βουτανόλης αποτελείται από μια αναερόβια διαδικασία γνωστή ως ζύμωση ακετόνης-βουτανόλης-αιθανόλης (ABE), χρησιμοποιώντας το στέλεχος *Clostridium sp.*, που παράγει ακετόνη, βουτανόλη και αιθανόλη ως τελικά προϊόντα (Ndaba et al., 2015). Ο ορός γάλακτος έχει χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοβουτανόλης με το στέλεχος *C. Acetobutylicum*. Εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης λακτόζης στον ορό γάλακτος, η παραγωγή των προϊόντων δρα παρεμποδιστικά στην ποσότητα λακτόζης που καταναλώνεται, με αποτέλεσμα να οδηγούμαστε σε χαμηλές αποδόσεις βιοβουτανόλης. Ωστόσο, λόγω της ικανότητας των ειδών *Clostridium* να ζυμώνουν άμεσα τη λακτόζη, έχουν καταβληθεί προσπάθειες για τη βελτίωση της απόδοσης της διεργασίας, χρησιμοποιώντας μια ποικιλία βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων, όπως αυτή της τροποποίησης του *Clostridia sp.* μέσω της γενετικής και μεταβολικής μηχανικής (Zhang et al., 2016).





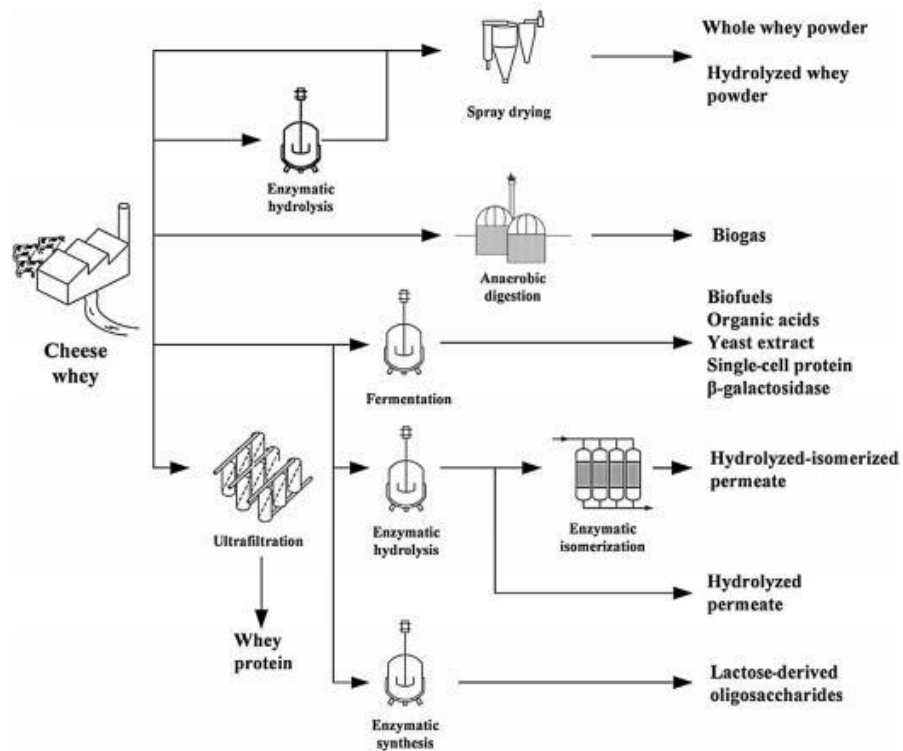
**Εικόνα 6.** Σχηματική αναπαράσταση της μεταβολικής οδού της σύνθεσης βιοβουτανόλης με το στέλεχος *Clostridia sp.* (Kaur et al., 2020).

#### Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως στη Βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Η διαθεσιμότητα των υδατανθράκων της λακτόζης στον ορό, καθώς και η παρουσία άλλων απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, καθιστούν το ορό το κατάλληλο υπόστρωμα για την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Επιπλέον, η συμπλήρωση ορού γάλακτος με διάφορα άλλα θρεπτικά συστατικά όπως το εκχύλισμα μαγιάς, η πεπτόνη ή η μελάσα είναι χρήσιμα για την αύξηση της απόδοσης γαλακτικού οξέος (Mistry et al., 1987).

#### Άλλα προϊόντα ζύμωσης

Η λακτόζη έχει επίσης δοκιμαστεί ως υπόστρωμα για την παραγωγή άλλων οργανικών οξέων όπως το κιτρικό οξύ, το προπιονικό, το ηλεκτρικό, το γλυκονικό και το οξικό οξύ. Άλλα πολύτιμα προϊόντα ζύμωσης, όπως η γλυκερόλη, το κόμμι ξανθάνης, βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, πλαστικά, καρτενοειδή και δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν παραχθεί επίσης από ορό γάλακτος, αξιοποιώντας τη λιγότερο κατασταλτική δράση της λακτόζης σε σύγκριση με τις περισσότερα ευκόλως ζυμωμένα σάκχαρα που υπάρχουν σε άλλες βιομηχανικές πρώτες ύλες (Kaur et al., 2020).



**Εικόνα 7.** Εναλλακτικές τεχνολογίες για τη χρήση και αναβάθμιση του ορού γάλακτος (Illanes, 2016).

Το δεύτερο κεφάλαιο, που ακολουθεί, εξειδικεύεται στην βιοτεχνολογική αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού γιαουρτιού μέσω ενζυμικών αντιδράσεων. Η αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού με τη χρήση ενζύμου αποτελεί και το κύριο θέμα του πειραματικού μέρους της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

## Κεφάλαιο 2. Αξιοποίηση της λακτόζης του ορού μέσω ενζυμικών αντιδράσεων

### 2.1 β-γαλακτοζιδάση

Τα ένζυμα είναι βιοκαταλύτες πρωτεϊνικής φύσης. Καταλύουν χημικές αντιδράσεις ελαττώνοντας την ενέργεια ενεργοποίηση τους, επιταχύνοντας τις αντιδράσεις  $10^8$ - $10^{20}$  φορές χωρίς ουσιαστικά να παίρνουν μέρος σε αυτές. Οι εφαρμογές τους στη βιομηχανία τροφίμων είναι πολυάριθμες.



Εικόνα 8. Ένζυμο β-γαλακτοζιδάσης.

Το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση ή εμπορικώς ονομαζόμενο λακτάση χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά σε γαλακτοκομικές εφαρμογές το 1950, ενώ το υδρολυμένο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί υδρόλυση, βρίσκονταν υπό ανάπτυξη από τη δεκαετία του '70, όταν οι πρώτες γαλακτοζιδάσες ήταν διαθέσιμες στο εμπόριο. Σήμερα, η λακτάση θεωρείται ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ένζυμα στη Βιομηχανία Τροφίμων (Harju et al., 2012). Η ενζυμική υδρόλυση της λακτόζης θεωρείται επίσης από τις πιο σημαντικές βιοτεχνολογικές διεργασίες. Η λακτάση καταλύει την υδρόλυση των β-1,4-D-γαλακτοζιδικών δεσμών διασπώντας το υπόστρωμα της λακτόζης στους δύο μονοσακχαρίτες που τη δομούν, τη γαλακτόζη και τη γλυκόζη (Anisha, 2017).

#### 2.1.1. Πηγές β-γαλακτοζιδάσης

Η β-γαλακτοζιδάση εντοπίζεται ευρέως στη φύση και μπορεί να απομονωθεί από διαφορετικές πηγές, όπως φυτά (αμύγδαλα, ροδάκινα, βερίκοκα, μήλα) και ζωικούς οργανισμούς (ζύμες, βακτήρια και μύκητες) (Richmond et al., 1981). Ωστόσο, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες πηγές για παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης, σε εμπορική κλίμακα είναι από μικροοργανισμούς (Harju et al., 2012).

#### Βακτηριακές πηγές

Ένας μεγάλος αριθμός βακτηρίων παράγει το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση σε υψηλή δραστηριότητα, μεγάλη σταθερότητα καθώς και με μεγάλη ευκολία ζύμωσης. Ωστόσο, λίγα είδη βακτηριακών ενζύμων αναγνωρίζονται ως ασφαλείς πηγές β-γαλακτοζιδάσης στα

τρόφιμα. Εξαιρέση αποτελούν τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB), που περιλαμβάνουν μια μεγάλη ομάδα γαλακτόκοκκων, στρεπτόκοκκων και γαλακτοβακίλλων και χρησιμοποιούνται εκτενώς για την παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης λόγω του GRAS status τους, το οποίο προσφέρει τη δυνατότητα χρήσης των ενζύμων που προκύπτουν χωρίς εκτεταμένο καθαρισμό. Ο *Streptococcus thermophilus* και *Bacillus stearothermophilus* ανήκουν σε αυτή την ομάδα βακτηρίων και έχουν χρησιμοποιηθεί κατά πλειονότητα στην παραγωγή β-γαλακτοζιδάσων. Ο *Pyrococcus woesei* και ο *Bacillus stearothermophilus* έχουν αναφερθεί για την παραγωγή θερμοσταθερής β-γαλακτοζιδάσης, καθώς επίσης και οι εξής μικροοργανισμοί: *Bacillus megateriu*, *Bacillus circulans*, *Beijerinckia indica*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Streptococcus thermophilus*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Kluyveromyces lactis* (Anisha, 2017), (P. S. Panesar et al., 2006).

### **Μυκητιακές πηγές**

Τα ένζυμα που παράγονται από μύκητες έχουν βέλτιστο pH στην όξινη περιοχή 2,5–5,4, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα για την επεξεργασία του όξινου ορού γάλακτος. Παρουσιάζουν βέλτιστες θερμοκρασίες σε υψηλές τιμές έως 50 °C (P. S. Panesar et al., 2006). Είναι εξωκυτταρικά και θερμοσταθερά ένζυμα, ωστόσο είναι ευαίσθητα στην αναστολή από τελικά προϊόντα, κυρίως από τα προϊόντα της γαλακτόζης. Γνωστότερες πηγές μυκήτων για την παραγωγή της β-γαλακτοζιδάσης είναι οι εξής: Ο *Aspergillus niger*, ο *Teratosphaeria acidotherma*, ο *Aspergillus oryza*, ο *Aspergillus aculeatus*, ο *Penicillium expansum*, ο *Penicillium chrysogenum* και ο *Paecilomyces aeruginus* (Anisha, 2017). Από βιομηχανικής άποψης, η μαγιά έχει θεωρηθεί η πιο σημαντική πηγή της β-γαλακτοζιδάσης. Με βέλτιστη δράση σε ουδέτερα pH, η μαγιά κρίνεται κατάλληλη για την υδρόλυση της λακτόζης στο γάλα και θεωρείται ασφαλής πηγή για την χρήση της στα τρόφιμα (P. S. Panesar et al., 2006). Οι β-γαλακτοζιδάσες ζύμης είναι ενδοκυτταρικά ένζυμα. Μια σημαντική εμπορική πηγή της β-γαλακτοζιδάσης είναι η ζύμη *Kluyveromyces lactis*, η οποία αναπτύσσεται στο γαλακτοκομικό περιβάλλον. Έχει υψηλή ικανότητα υδρόλυσης της λακτόζης και ως εκ τούτου χρησιμοποιείται εμπορικά για την παραγωγή γάλακτος μειωμένης λακτόζης. Μία άλλη σημαντική πηγή β-γαλακτοζιδάσης είναι ο *Kluyveromyces marxianus*, ο οποίος είναι ικανός να αναπτύσσεται σε διάφορα υποστρώματα συμπεριλαμβανομένης της λακτόζης (Anisha, 2017).

**Πίνακας 4.** Ιδιότητες μικροβιακών β-γαλακτοζιδασών (Anisha, 2017).

Πηγή	Μοριακό Βάρος (x10 <sup>3</sup> )	Βέλτιστο pH	Βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος (°C)	Εκκινητές	Ιοντικοί Αναστολείς
<i>Aspergillus niger</i>	124	3,0-4,0	55-60	-	OXI
<i>Aspergillus oryzae</i>	90	5,0-6,2	50-55	-	OXI
<i>Kluveromyces lactis</i>	228	6,5-7,3	35	K,Mg,Mn	Ca,Na
<i>Kluveromyces fragillis</i>	201	6,6	37	K,Mg,Mn	Ca,Na
<i>Escherichia coli</i>	464	7,2	40	Na,K,Mg	-
<i>Bacillus circulans</i>	240	6	60	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	88	6,5-7,0	50	-	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	116	5,8-6,4	65	Mg	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	540	6,2-6,6	55	Mg	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	464	7,1	55	Na,K,Mg	Ca

### 2.1.2. Παραγωγή β-γαλακτοζιδάσης

#### *Μέθοδος βυθισμένης ζύμωσης*

Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος ζύμωσης για την παραγωγή της β-γαλακτοζιδάσης είναι αυτή της βυθισμένης ζύμωσης. Αυτό συμβαίνει επειδή στις περισσότερες περιπτώσεις η β-γαλακτοζιδάση παράγεται ενδοκυτταρικά και όχι εξωκυτταρικά με αποτέλεσμα να απαιτούνται εναλλακτικές μέθοδοι παραγωγής. Στον Πίνακα 5, παρατίθενται διάφορες μικροβιακές πηγές β-γαλακτοζιδάσης καθώς και η ενζυμική απόδοσή τους.

**Πίνακας 5.** Μικροοργανισμοί που παράγουν β-γαλακτοζιδάση σε βυθισμένη ζύμωση (Anisha, 2017).

Μικροοργανισμοί	Τοποθεσία	Υπόστρωμα/Επαγωγέας	Ενζυμική απόδοση
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ATCC 11842	Εξωκυτταρική	Αποβουτυρωμένο γάλα	5,491 U/mL
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ATCC 11842	Εξωκυτταρική	Μέσο μέσα σε ορό γαλακτος συμπλ. με MRS	3,091 U/mL
<i>Yeast spp.</i>	Εξωκυτταρική	Λακτόζη	96,8 U/mL
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bb12</i>	Ενδοκυτταρική	Ορός	6,8 U/mL
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ATCC 11842	Ενδοκυτταρική	Ορός	7,77 U/mL
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Ενδοκυτταρική	Ορός	7,76 U/mL
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	Δεν υπάρχει αναφορά	Ορός τυριού	21,99 U/mL

#### Απομόνωση β-γαλακτοζιδάσης

Ένα σημαντικό εμπόδιο στη βιομηχανική παραγωγή της β-γαλακτοζιδάσης είναι το υψηλό κόστος απομόνωσής της, το οποίο σχετίζεται με την ενδοκυτταρική της φύση. Είναι γνωστό ότι τα περισσότερα ένζυμα παράγονται στο εσωτερικό των κυττάρων και αν δεν συντρέχει κάποιος ιδιαίτερος λόγος παραμένουν μέσα σε αυτό σε όλη την διάρκεια της ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Η δυσκολία που προκαλείται μπορεί να ξεπεραστεί είτε χρησιμοποιώντας ολόκληρα κύτταρα ως πηγή β-γαλακτοζιδάσης, είτε προκαλώντας την απελευθέρωση ενδοκυτταρικού ενζύμου με τη διάρρηξη κυττάρων με μηχανικές, φυσικές, χημικές ή ενζυμικές μεθόδους. Το κύριο μειονέκτημα στη χρήση ολόκληρων κυττάρων ως πηγής της β-γαλακτοζιδάσης είναι η χαμηλή διαπερατότητα των μικροβιακών κυτταρικών τοιχωμάτων. Αρκετές μελέτες έχουν προσανατολιστεί στην απελευθέρωση της β-γαλακτοζιδάσης από μικροβιακά κύτταρα, μέσω της αύξησης της διαπερατότητας τους χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες όπως το τολουόλιο, το χλωροφόρμιο και την αιθανόλη. Η αποτελεσματικότητα των χημικών αυτών μεθόδων εξαρτάται κυρίως από τον χρόνο επώασης, την θερμοκρασία επώασης και τη συγκέντρωση των διαλυτών. Η ενζυμική λύση αποτελεί, επίσης, μία ήπια μέθοδο κυτταρικής διάνοιξης με σημαντικό αριθμό εφαρμογών. Οι μηχανικές μέθοδοι που υιοθετήθηκαν για τη διάσπαση των μικροβιακών κυττάρων περιλαμβάνουν υπερήχους, ομογενοποιητές υψηλής πίεσης, σφαιρόμυλους και

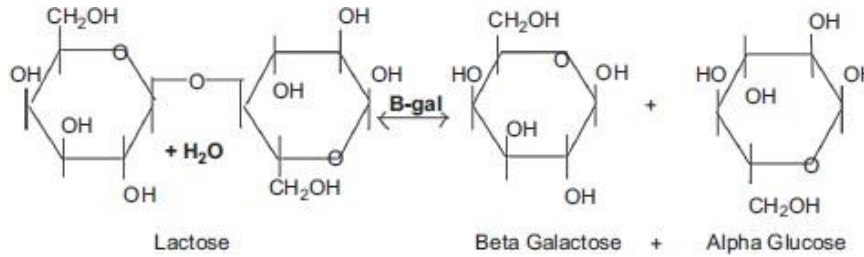
πρέσσες. Αυτό που πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά τη χρήση μιας μηχανικής μεθόδου είναι ότι θα πρέπει να υπάρξει αποτελεσματική διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών χωρίς ωστόσο να προκληθεί μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Η χρήση υπερήχων για την διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών βασίζεται στο φαινόμενο της σπηλαίωσης. Το φαινόμενο αυτό συνίσταται στο συνεχή σχηματισμό φυσαλίδων αερίων ή ατμών με την εφαρμογή συχνοτήτων πάνω από το ανθρώπινο όριο ακουστικότητας μέσα σε ένα κυτταρικό αιώρημα. Η χρήση υπερήχων στην απομόνωση ενδοκυτταρικών προϊόντων είναι περιορισμένη. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στη χαμηλή οικονομικότητα της μεθόδου, εξ' αιτίας της μεγάλης κατανάλωσης ενέργειας ανά μονάδα όγκου, καθώς και στο ότι η ένταση της ακτινοβολίας υπερήχων μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα ή την αδράνεια του ενζύμου που απελευθερώνεται ή να τροποποιήσει τη δομή και τη λειτουργία των βιολογικών μορίων.

### **2.1.3. Ψυχρόφιλη και θερμοσταθερή β-γαλακτοζιδάση**

Από βιομηχανικής άποψης, οι πιο σημαντικοί τύποι ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης είναι αυτοί της ψυχρόφιλης και της θερμοσταθερής. Η ψυχρόφιλη β-γαλακτοζιδάση παρουσιάζει υψηλό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον ως βιομηχανικό ένζυμο τροφίμων, καθώς μπορεί να υδρολύσει τη λακτόζη από το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα σε χαμηλές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα να διατηρείται η γεύση και η θρεπτικής τους αξία. Οι ψυχρόφιλες β-γαλακτοζιδάσες απομονώνονται από ψυχροφιλικές ζύμες, χρησιμοποιώντας τη λακτόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα σε χαμηλή θερμοκρασία και υπό όξινες συνθήκες. Οι θερμοσταθερές β-γαλακτοζιδάσες έχουν υψηλές ταχύτητες αντίδρασης, μειωμένο κίνδυνο μόλυνσης, μεγάλο χρόνο ημιζωής, χαμηλή αναστολή προϊόντος, υψηλή διαλυτότητα υποστρωμάτων και υψηλές αποδόσεις. Βρίσκουν εφαρμογές στην επεξεργασία προϊόντων που περιλαμβάνουν παστερίωση και είναι γενικά χρήσιμες σε διαλυτή και ακινητοποιημένη μορφή σε βιομηχανίες τροφίμων στις οποίες προτιμάται ταυτόχρονη θερμική επεξεργασία και χαμηλή υδρόλυση λακτόζης. Από την άποψη αυτή, οι θερμοσταθερές β-γαλακτοζιδάσες είναι μια επιτυχημένη εναλλακτική λύση στη βιομηχανική επεξεργασία γαλακτοκομικών προϊόντων, όταν απαιτείται και ταυτόχρονη θερμική επεξεργασία αποστείρωσης για τη μείωση της μικροβιακής μόλυνσης.

## **2.2. Ενζυμική υδρόλυση**

Η αντίδραση της υδρόλυσης της λακτόζης, όπως προαναφέρθηκε, αφορά την κατάλυση της υδρόλυσης των β-1,4-D-γλυκοζιδικών δεσμών του υπόστρωματος της λακτόζης, από το ένζυμο λακτάση, με αποτέλεσμα την διάσπαση της λακτόζης στους δύο μονοσακχαρίτες της, τη γαλακτόζη και τη γλυκόζη (Anisha, 2017).



**Εικόνα 9.** Υδρόλυση της δισακχαριτικής λακτόζης σε δύο μονοσακχαρίτες, γαλακτόζη και γλυκόζη, από το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση (b-gal) (Anisha, 2017).

### 2.2.1. Εφαρμογές ενζυμικής υδρόλυσης

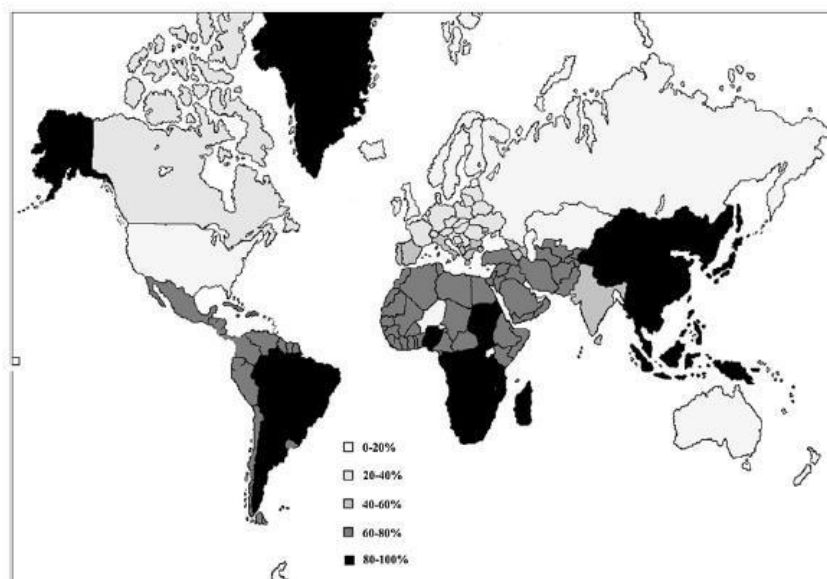
Η ενζυμική υδρόλυση της λακτόζης εφαρμόζεται συχνά στην τεχνολογία τροφίμων. Η υψηλή συγκέντρωση λακτόζης σε γαλακτοκομικά προϊόντα που δεν έχουν υποστεί ζύμωση, όπως το παγωτό και το συμπυκνωμένο γάλα, μπορεί να οδηγήσει σε έντονη κρυστάλλωση, με αποτέλεσμα τα τελικά προϊόντα να έχουν λιπαρή, αμμώδη ή χαλικώδη υφή. Η υδρόλυση της λακτόζης σε παγωτά και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα βελτιώνουν την εμφάνιση, την κρεμώδη υφή, καθώς επίσης τα καθιστούν και πιο εύπεπτα. Σε σύγκριση με τη λακτόζη, οι μονοσακχαρίτες που σχηματίζονται με την υδρόλυση της λακτόζης, η γλυκόζη και η γαλακτόζη, ζυμώνονται πιο εύκολα, με αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου σταθεροποίησης στο επιθυμητό pH ορισμένων προϊόντων κατά την διαδικασία παραγωγής τους, όπως το τυρί cottage και τα γιαούρτια. Επιπλέον, η γλυκόζη και η γαλακτόζη αυξάνουν σημαντικά τη γλυκύτητα των προϊόντων (περίπου 50%), με αποτέλεσμα η ποσότητα πρόσθετων γλυκαντικών σε γιαούρτι να είναι μειωμένη άρα και οι θερμίδες του τελικού προϊόντος λιγότερες. Η β-γαλακτοζιδάση μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την υδρόλυση λακτόζης στον ορό γάλακτος. Σημαντικότερες εφαρμογές είναι η μετατροπή της λακτόζης του ορού σε γλυκό σιρόπι ή σε γλυκαντικά προϊόντα όπως τα κονσερβοποιημένα σιρόπια φρούτων, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στις βιομηχανίες ζαχαροπλαστικής, αρτοποιίας και αναψυκτικών. Επιπλέον, η υδρόλυση της λακτόζης του ορού μπορεί να βοηθήσει στην επίλυση των προβλημάτων που προκαλούνται εξαιτίας της διάθεσης του ορού ως απόβλητο (Illanes, 2016). Τέλος, η υδρόλυση της λακτόζης συμβάλει στην ανάπτυξη προϊόντων μειωμένης λακτόζης, τα οποία είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σε περιπτώσεις δυσανεξίας της λακτόζης, φαινόμενο που συναντάται σε περισσότερο από το ήμισυ του παγκόσμιου πληθυσμού.

### 2.2.2. Δυσανεξία στη λακτόζη

Η δυσανεξία στη λακτόζη ορίζεται ως η ανεπάρκεια λακτάσης, hypolactasia, ή η πλήρης απουσία λακτάσης, alactasia. Ως αποτέλεσμα της ανεπαρκούς παραγωγής λακτάσης, η λακτόζη που εισέρχεται στο λεπτό έντερο δεν διασπάται. Υπάρχουν τρεις τύποι δυσανεξίας στη λακτόζη: Η συγγενική, η πρωτοπαθής και η δευτεροπαθής. Η συγγενική δυσανεξία στη λακτόζη είναι σπάνια με συμπτώματα που εμφανίζονται αμέσως μετά τη γέννηση. Η πρωτοπαθής αφορά τη μείωση της λακτάσης που υπάρχει στο λεπτό έντερο (Parker & Watson, 2017) και θεωρείται ο πιο κοινός τύπος. Εμφανίζεται ως μια φυσιολογική διαδικασία σε άτομα ηλικίας μεταξύ 2 και 20 ετών. Η δευτεροπαθής είναι η μειωμένη δραστηριότητα λακτάσης, λόγω βλάβης του λεπτού εντέρου που προκαλείται από ιογενείς ή βακτηριακές λοιμώξεις, χημειοθεραπείες καρκίνου, αλλεργίες ή αυτοάνοσες συνθήκες.



Τα συμπτώματα υποχωρούν μόλις αντιμετωπιστεί η κύρια ασθένεια. Η λακτόζη που φτάνει στο παχύ έντερο μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα όπως φούσκωμα, κοιλιακό πόνο, κράμπες και διάρροια. Η εμφάνιση ανεπάρκειας της λακτάσης εξαρτάται από τη φυλετική ομάδα του πληθυσμού. Οι περισσότεροι Ασιάτες (πάνω από 90%), Αφρικανοί (80–100%), ιθαγενείς Αμερικανοί (πάνω από 90%), οι Νότιοι Ευρωπαίοι (πάνω από 80%) έχουν δυσανεξία στη λακτόζη. Από την άλλη πλευρά, η δυσανεξία στη λακτόζη περιορίζεται κυρίως στους ανθρώπους των οποίων η προέλευση βρίσκεται στη Βόρεια Ευρώπη (συμπεριλαμβανομένων Σουηδία, Μεγάλη Βρετανία, Ολλανδία, Γερμανία κ.λπ. (λιγότερο από 5%) λόγω του φαινομένου της «ανθεκτικότητας στη λακτάση». Συγκεκριμένα, οι Βορειο-Ευρωπαίοι δεν έχουν δυσανεξία στη λακτόζη, γιατί χρειάζονται το γάλα για την πρόσληψη βιταμίνης D, σε αντίθεση με τους λαούς του Νότου που προσλαμβάνουν τη βιταμίνη αυτή από τον ήλιο. Άνθρωποι με δυσανεξία στη λακτόζη συνιστάται αποφεύγουν την κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς μπορούν να αφομοιώσουν μικρή ποσότητα γάλακτος (περίπου 200 ml). Προτιμάται η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση (όπως γιαούρτια), και τυριά (σκληρά και ημίσκληρα) που περιέχουν μόνο μικρές ποσότητες λακτόζης .

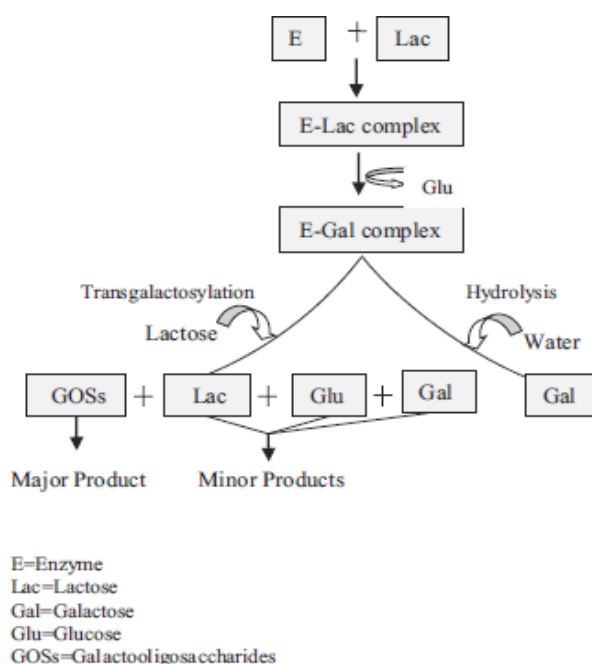


**Εικόνα 10.** Παγκόσμια κατανομή της δυσανεξίας στη λακτόζη ενηλίκων (% της δυσανεξίας του πληθυσμού) (Illanes, 2016).

### 2.3 Αντίδραση μεταγαλακτοζυλίωσης

Παρόλο που οι β-γαλακτοζιδάσες έχουν παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί για την υδρόλυση της λακτόζης, το ένζυμο μπορεί να καταλύσει ταυτόχρονα την αντίδραση μεταγαλακτοζυλίωσης (Illanes, 2016). Η αντίδραση μεταγαλακτοζυλίωσης, λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα με την αντίδραση υδρόλυσης και προκαλεί μετατροπή των μορίων της λακτόζης σε μεγαλύτερα ολιγομερή μόρια, τους γαλακτοολιγοσακχαρίτες. (Mano et al., 2019). Συγκεκριμένα, η β-γαλακτοζιδάση προσβάλλει το ανωμερικό άκρο της γαλακτόζης της λακτόζης, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο γαλακτοζυλίου-ενζύμου ενώ, ταυτόχρονα, απελευθερώνει ένα μόριο γλυκόζης. Το επόμενο βήμα εξαρτάται από το υπόστρωμα δέκτη: εάν ο δέκτης είναι νερό, το σύμπλοκο γαλακτοζυλίου-ενζύμου υδρολύεται και

απελευθερώνεται ένα επιπλέον μόριο γαλακτόζης, ενώ εάν ο δέκτης είναι η λακτόζη, ένας μονοσακχαρίτης ή ένας ολιγοσακχαρίτης, σχηματίζονται γαλακτοολιγοσακχαρίτες ως προϊόντα μεταγαλακτοζυλίωσης (Sabater et al., 2019). Όσο λοιπόν η γαλακτόζη μεταφέρεται σε ήδη συντιθέμενο γαλακτοολιγοσακχαρίτη, τόσο το μήκος της αλυσίδας των γαλακτοολιγοσακχαριτών αυξάνεται, με αποτέλεσμα υψηλότερο βαθμό πολυμερισμού. Η απόδοση των γαλακτοολιγοσακχαριτών εξαρτάται κυρίως από την πηγή ενζύμου, την αρχική συγκέντρωση λακτόζης και τον χρόνο αντίδρασης (Fischer & Kleinschmidt, 2015). Παρόλο που οι αντιδράσεις υδρόλυσης και μεταγαλακτοζυλίωσης πραγματοποιούνται ταυτόχρονα, η δεύτερη μπορεί να ευνοηθεί από τις συνθήκες της αντίδρασης. Υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις λακτόζης, μέτριες θερμοκρασίες και χαμηλή ενεργότητα νερού τείνουν να ευνοούν τη μεταγαλακτοζυλίωση έναντι της υδρόλυσης. Επιπλέον, η τελική σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών και η συνολική απόδοση τους τείνει να επηρεάζεται έντονα από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της αρχικής συγκέντρωση λακτόζης, της πηγής του ενζύμου, του pH, της θερμοκρασία και του χρόνου αντίδρασης. Η πολυπλοκότητα της συνολικής διεργασίας για την παραγωγή β-γαλακτοζιδασών, συνίσταται στο ότι οι διαφορετικές αυτές αντιδράσεις απαιτούν διαφορετικά υποστρώματα και πραγματοποιούνται σε διαφορετικούς ρυθμούς. Αυτό δυσχεραίνει τη χρήση διαφόρων προσεγγίσεων που απαιτούνται για την ανάλυση και βελτιστοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης (González-Delgado et al., 2016). Η βιομηχανική χρήση των γαλακτοολιγοσακχαριτών, καθώς και η προσπάθεια βελτιστοποίησης της παραπάνω αντίδρασης θα συζητηθεί εκτενέστερα στο τρίτο κεφάλαιο.



**Εικόνα 11.** Η αντίδραση της μεταγαλακτοζυλίωσης και της υδρόλυσης της λακτόζης με χρήση ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης.

# Κεφάλαιο 3. Γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS) & βελτιστοποίηση της αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης

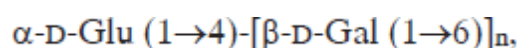
---

## 3.1 Εισαγωγή

Είναι γνωστό, πως τα μικρόβια στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα επηρεάζουν την υγεία του ξενιστή. Ένας τρόπος να διασφαλιστεί η υγεία του εντέρου, κυρίως του παχέους, καθώς και των βακτηρίων που προάγουν την υγεία στο έντερο και κυριαρχούν έναντι των επιβλαβών μικροβίων είναι η κατανάλωση πρεβιοτικών. Πρεβιοτικά ορίζονται ως τα επιλεκτικά ζυμωμένα συστατικά που επιτρέπουν συγκεκριμένες αλλαγές στη σύνθεση και στη δραστηριότητα των γαστρεντερικών μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα την διασφάλιση της υγείας και της ευεξίας του ξενιστή. Οποιοσδήποτε υδατάνθρακας τροφίμων, ιδιαίτερα οι ολιγοσακχαρίτες, μπορούν να θεωρηθούν πρεβιοτικά εάν φτάσουν στο κόλον άθικτοι, μετά από αντίσταση στη γαστρική οξύτητα, στην υδρόλυση στο λεπτό έντερο και στη γαστρεντερική απορρόφηση, και εφόσον έχουν την ικανότητα να διεγείρουν επιλεκτικά την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των βακτηρίων που προάγουν την υγεία στο παχύ έντερο. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα κριτήρια, μόνο η ινουλίνη, οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες, η λακτουλόζη και οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες, θεωρούνται αναγνωρισμένα πρεβιοτικά. Οι ισομαλτοολιγοσακχαρίτες, οι ξυλοολιγοσακχαρίτες, οι μαννοολιγοσακχαρίτες, οι ολιγοσακχαρίτες σόγιας και οι γλυκοολιγοσακχαρίτες είναι αναδυόμενα πρεβιοτικά, τα οποία βρίσκονται υπό διεξαγωγή ερευνών (Sabater et al., 2019).

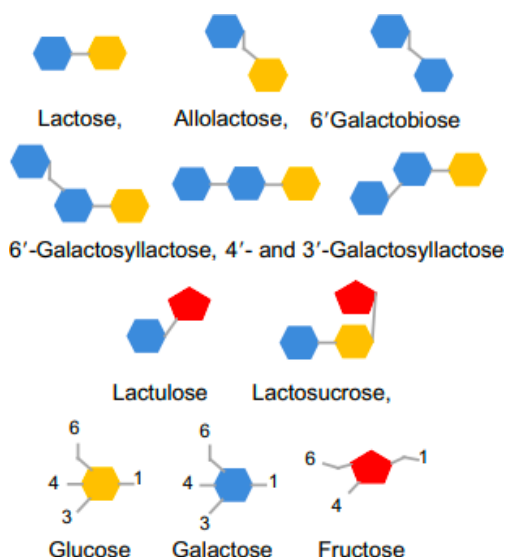
## 3.2 Γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)

Ο όρος γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS), αναφέρεται σε ολιγοσακχαρίτες των οποίων τα μονομερή συνδέονται με β-γλυκοζιδικό δεσμό και έχουν βαθμό πολυμερισμού (DP) 2-9. Αποτελούνται από γλυκόζη ή γαλακτόζη στο αναγωγικό άκρο και εκτείνονται με μια αλυσίδα μορίων γαλακτόζης συνδεδεμένων με β-γλυκοζιδικό δεσμό (Gänzle, 2019). Παρουσιάζουν την ακόλουθη μοριακή δομή (Rastall, 2012):

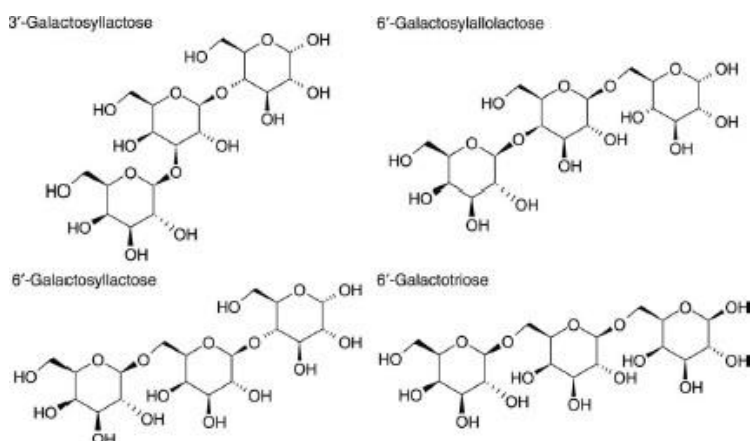


Αποτελούν προϊόντα της αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης, η οποία πραγματοποιείται παράλληλα με την αντίδραση της υδρόλυσης της λακτόζης με καταλύτη το ένζυμο λακτάση. Η ποσοτική τους αφθονία μειώνεται όσο προχωράμε σε ολιγοσακχαρίτες μεγαλύτερου βαθμού πολυμερισμού: δι-, τρι-, τετρα- και υψηλότερου βαθμού πολυμερισμού. Οι κύριοι γαλακτοδισακχαρίτες είναι η αλλολακτόζη ( $\beta\text{-D-Gal (1} \rightarrow \text{6) -D-Glc}$ ) και η γαλακτοβιόζη ( $\beta\text{-D-Gal (1} \rightarrow \text{6) -D-Gal}$ ). Σχηματίζονται άμεσα από μονοσακχαρίτες των οποίων η συγκέντρωση αυξάνεται καθώς η λακτόζη υδρολύεται, ή από την αποικοδόμηση των τρισακχαριτών.

Άλλοι δι- και υψηλότερου βαθμού πολυμερισμού ολιγοσακχαρίτες σχηματίζονται σε υψηλότερη αρχική συγκέντρωση λακτόζης (Martin et al., 1975).



**Εικόνα 12.** Σχηματική αναπαράσταση της δομής της λακτόζης και των γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS) (Gänzle, 2019).



**Εικόνα 13.** Δομές τρισακχαριτών GOS.

Οι GOS εμφανίζονται φυσιολογικά στο γάλα ορισμένων θηλαστικών ή αποτελούν δευτερεύοντα συστατικά του γάλακτος και των προϊόντων του, όπως το γιαούρτι. Ο κύριος λόγος που έχουν προσεγγίσει το εμπορικό ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός, πως παρουσιάζουν ομοιότητες με τους ολιγοσακχαρίτες που υπάρχουν φυσικά στο ανθρώπινο μητρικό γάλα (Human Milk Oligosaccharides, HMO). Περισσότεροι από 200 ολιγοσακχαρίτες ανθρώπινου γάλακτος (HMO) έχουν ταυτοποιηθεί στο μητρικό γάλα του ανθρώπου και εκτελούν πολλές λειτουργίες στην υγεία και την ανάπτυξη του νεογνού. Εκτός από την

παροχή θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη του εγκεφάλου, οι ΗΜΟ, συμβάλλουν στη διαμόρφωση της εντερικής ανοσίας και στην ανάπτυξη ευεργετικών βακτηρίων του εντέρου (Bode, 2012), (Bultema et al., 2017) (Fischer & Kleinschmidt, 2015)

**Πίνακας 6.** Σύνθεση εμπορικών GOS (Mahoney, 1998).

Σύνθεση εμπορικών GOS	Κλάσμα GOS
Συστατικά	
Δισακχαρίτες ( εκτός λακτόζης)	0,33
Τρισακχαρίτες	0,39
Τετρασακχαρίτες	0,18
Πεντασακχαρίτες	0,07
Εξα-, Επτα-,Οκτασακχαρίτες	0,03

### 3.3 Απόδοση Παραγωγής GOS & Βελτιστοποίηση των συνθηκών αντίδρασης

#### 3.3.1. Απόδοση

Η ποσοτική μετατροπή της λακτόζης σε GOS επιτυγχάνει θεωρητική απόδοση 75% ως προς την αρχική ποσότητα λακτόζης, με την παραδοχή πως όλη η λακτόζη χρησιμοποιείται με το 50% της να χρησιμεύει ως δότης γαλακτοζυλίου με ταυτόχρονη απελευθέρωση γλυκόζης, ενώ η απομένουσα να συμμετέχει στην αντίδραση μεταγαλακτοζυλίωσης. Στην πραγματικότητα, οι αποδόσεις περιορίζονται σε παραγωγή των GOS σε ποσοστό 10-40% της αρχικής λακτόζης επειδή το νερό, η γλυκόζη και οι GOS ανταγωνίζονται τη λακτόζη ως δέκτες γαλακτοζυλίου. Επιπλέον, οι GOS υποβαθμίζονται από τη β-γαλακτοζιδάση και συσσωρεύονται ως ενδιάμεσα προϊόντα προτού υδρολυθούν σε γλυκόζη και γαλακτόζη κατά την εξάντληση της λακτόζης. Εμπορικά παρασκευάσματα GOS περιέχουν υπολείμματα γλυκόζης, λακτόζης και άλλων δισακχαριτών. Η απόδοση του GOS από τη λακτόζη, μπορεί να βελτιωθεί με στρατηγικές που στοχεύουν την επιλογή των κατάλληλων βιοκαταλυτών και τη βελτιστοποίηση των συνθηκών αντίδρασης.

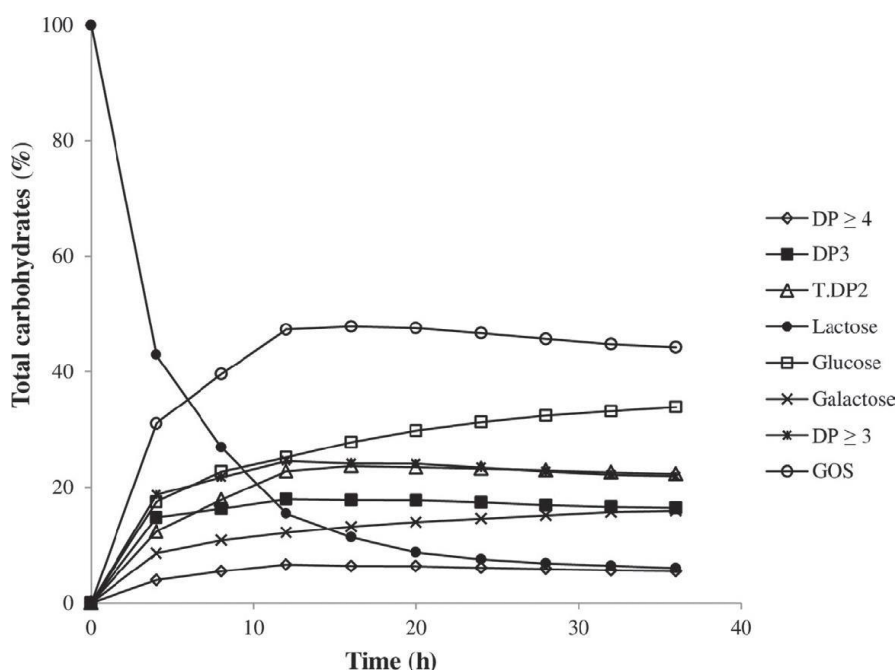
#### 3.3.2. Αρχική συγκέντρωση λακτόζης

Η αρχική συγκέντρωση λακτόζης είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση των GOS. Η αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης διασφαλίζει ότι λιγότερα μόρια νερού και περισσότερα μόρια λακτόζης και άλλων μορίων σακχάρων δρουν ως αποδέκτες του τμήματος γαλακτοζυλίου. Έτσι, κατά την έναρξη της αντίδρασης, η υψηλή συγκέντρωση λακτόζης ευνοεί την αντίδραση της μεταγαλακτοζυλίωσης, μεγιστοποιώντας έτσι την απόδοση σε GOS. Όμως με το πέρασμα του χρόνου, παράλληλα με την σύνθεση των GOS ευνοείται και η αντίδραση της υδρόλυσης μειώνοντας τελικά την τελική απόδοση. Είναι εμφανές λοιπόν, πως η εύρεση της βέλτιστης απόδοσης σε GOS εξαρτάται από ένα πλήθος παραμέτρων. Ο χρόνος της αντίδρασης αποτελεί ένα από τους πιο κρίσιμους παράγοντες για να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση σε GOS (Torres et al. 2010).

#### 3.3.3. Χρόνος σύνθεσης GOS

Η σύνθεση των GOS ακολουθεί συνήθως την πορεία της Εικόνας 14. Η συγκέντρωση λακτόζης μειώνεται ταχέως στην αρχή της αντίδρασης με ταυτόχρονη αύξηση των

αποδόσεων GOS, της γλυκόζης και της γαλακτόζης. Η αύξηση της απόδοσης παραγωγής GOS συνεχίζεται έως ότου να επιτευχθεί το μέγιστο ποσοστό μετατροπής της λακτόζης, το οποίο διαφέρει στην κάθε β-γαλακτοζιδάση. Στη συνέχεια, η αντίδραση εισέρχεται σε ένα στάδιο όπου παρατηρείται ισορροπία μεταξύ της μεταγαλακτοζυλίωσης και της υδρόλυσης (Osman et al., 2010). Τέλος, κυριαρχεί η υδρόλυση GOS στα πιο θερμοδυναμικά προτιμώμενα προϊόντα, τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη. Επομένως, πρέπει να δοθεί προσοχή για να προσδιοριστεί το καλύτερο χρονικό διάστημα που θα διακοπεί η αντίδραση, προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση των GOS (Osman et al., 2010), (Albayrak & Yang, 2002).



**Εικόνα 14.** Χρονική πορεία αντίδρασης σύνθεσης GOS που διεξήχθη στους 55 ° C και 43% (w/w) αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης χρησιμοποιώντας 1g βιοκαταλύτη ανά 100g διαλύματος σύνθεσης (Osman et al., 2010).

### 3.3.4.Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία αποτελεί επίσης έναν σημαντικό παράγοντα για τη σύνθεση των GOS. Επηρεάζει τη διαλυτότητα της λακτόζης, το ρυθμό αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης, το ρυθμό αντίδρασης υδρόλυσης και τη σταθερότητα της β-γαλακτοζιδάσης. Η διαλυτότητα της λακτόζης είναι 18,9% (g / 100 g νερού) στους 25 ° C, 25,2% στους 40 ° C και 37,2% στους 60 ° C (Machado et al., 2000). Επομένως, η σύνθεση των GOS σε υψηλές θερμοκρασίες έχει το πλεονέκτημα της χρήσης πολύ συμπυκνωμένων διαλυμάτων λακτόζης και θα αναμενόταν να ευνοείται η αντίδραση μεταγαλακτοζυλίωσης έναντι της υδρόλυσης. Ωστόσο, η ξεχωριστή μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στο ρυθμό υδρόλυσης και στον ρυθμό μεταγαλακτοζυλίωσης είναι δύσκολο να επιτευχθεί. Από την μία, πολλές μελέτες δείχνουν ότι οι υψηλές αποδόσεις GOS (υψηλότερος ρυθμός μεταγαλακτοζυλίωσης έναντι του ρυθμού υδρόλυσης) ελήφθησαν με αύξηση της θερμοκρασίας της αντίδρασης. Από την άλλη, οι αντιδράσεις Maillard, που πραγματοποιούνται μεταξύ των αμινοπλευρικών αλυσίδων της β-γαλακτοζιδάσης και των αναγωγικών σακχάρων, επιταχύνονται σε υψηλές θερμοκρασίες.

Αυτό έχει αποδειχθεί ότι απενεργοποιεί σημαντικά τη χρησιμοποιημένη β-γαλακτοζιδάση (Maitin & Rastall, 2004). Η αρνητική επίδραση των υψηλών θερμοκρασιών στη σταθερότητα του ενζύμου εντοπίζεται και ανεξάρτητα από τις αντιδράσεις Maillard. Η σύνθεση GOS πάνω από ορισμένες θερμοκρασίες καθίσταται ανέφικτη λόγω της απότομης απώλειας δραστηριότητας του ενζύμου. Παραδείγματα αποτελούν η απότομη απενεργοποίηση των *BbgIII* και *BbgIV*, δύο β-γαλακτοζιδασών από το *B. bifidum* NCIMB 41171 σε  $T > 65\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Osman et al., 2012) και η απενεργοποίηση των β-γαλακτοζιδασών από *B. longum* BCRC 15708 σε  $T > 55\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Lee, 2002). Η αστάθεια και η απενεργοποίηση των β-γαλακτοζιδασών κατά τη διάρκεια της σύνθεσης GOS συνήθως ξεπερνιούνται με την ακινητοποίηση ενζύμων, τη χρήση θερμοσταθερών ενζύμων καθώς και την αξιοποίηση διαφόρων εργαλείων ενζυμικής μηχανικής (Rabiu et al., 2001).

### 3.3.5. Πηγές ενζύμου

Οι β-γαλακτοζιδάσες από διαφορετικές πηγές έχουν διαφορετικούς βαθμούς επιλεκτικότητας όσον αφορά τη χρήση του νερού ή άλλων μορίων ως αποδέκτες γαλακτοζυλίου. Επομένως, χρησιμοποιώντας διαφορετικές β-γαλακτοζιδάσες παράγονται διαφορετικές αποδόσεις GOS με διαφορετικούς βαθμούς πολυμερισμού και τύπους γλυκοζιδικών δεσμών. Οι διαφορετικές πηγές β-γαλακτοζιδάσης καθορίζουν επίσης διαφορετικές βέλτιστες παραμέτρους (θερμοκρασία, pH κ.λπ.) που απαιτούνται για τη σύνθεση των GOS. Για παράδειγμα, οι μυκητιακές β-γαλακτοζιδάσες δρουν βέλτιστα σε τιμές όξινου pH, ενώ η σύνθεση GOS χρησιμοποιώντας β-γαλακτοζιδάσες από βακτήρια και ζύμες πραγματοποιείται συνήθως σε ουδέτερες τιμές pH. Οι θερμόφιλες β-γαλακτοζιδάσες μπορούν να λειτουργήσουν αποτελεσματικά σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε μπορούν να είναι ελκυστικοί βιοκαταλύτες σύνθεσης GOS, υπό την προϋπόθεση ότι διαθέτουν υψηλή δραστηριότητα μεταγαλακτοζυλίωσης. Παραδείγματα θερμοσταθερών β-γαλακτοζιδάσεων που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση GOS παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

**Πίνακας 7.** Θερμοσταθερές β-γαλακτοζιδάσες που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση GOS.

<b>Πηγές ενζύμου</b>	<b>Συνθήκες αντίδρασης</b>	<b>Αποδόσεις GOS (% w/w)</b>
<i>Aspergillus oryzae</i>	200, 400g/L λακτόζη, 40 °C, pH 4,5	21,26
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	600 g/L λακτόζη, 80 °C, pH 6	52,5
<i>A.oryzae</i>	500 g/L λακτόζη, 40 °C, pH 4,5	52
<i>Bullera singularis</i>	180 g/L λακτόζη , 50 °C, pH 6	50
<i>Lactobacillus longum</i>	205 g/L λακτόζη, 37 °C, pH 6,5	38
<i>Bifidobacterium longum</i>	400 g/L λακτόζη, 45 °C, pH 6,8	32,5
<i>Kluyveromyces lactis</i>	400 g/L λακτόζη, 40 °C, pH 7	24,8
<i>Thermotoga maritime</i>	500 g/L λακτόζη, 80 °C, pH 6	19
<i>Bifidobacterium bifidum</i> NCIMB 41171	450-500 g/L λακτόζη, 40 °C pH 6,2, 6,8	36-43 ( λακτόζη μετατρεπόμενη σε GOS )
<i>Rhodotorula minuta</i> IFO879	200 g/L λακτόζη, 60 °C, pH 6	38
<i>Streirgmatomyces elvia</i> CBS8119	200 g/L λακτόζη, 60 °C, pH 5	39
<i>S.elvia</i> CBS8119	360 g/L λακτόζη, 60 °C, pH 6	63
<i>Saccharopolyspora rectivirgular</i> strain V2-2	1,75 M λακτόζη , 70 °C, Ph 7	41
<i>Talaromyces thermophilus</i> CBS236.58	200g/L λακτόζη, 40 °C, pH 6,5	40
<i>Thermus sp.</i> Z-1	0,88 M λακτόζη, 70 °C, pH 7	40
BbgI from <i>B.bifidum</i> NCIMB41171	43%(w/w) λακτοζη, 55 °C, pH 6,8	41,6
BbgII from <i>B.bifidum</i> NCIMB41171	43%(w/w) λακτοζη, 55 °C, pH 6,8	25,4
BbgIII from <i>B.bifidum</i> NCIMB 41171	43%(w/w) λακτοζη, 65 °C, pH 6,8	50,2
BbgIV from <i>B.bifidum</i> NCIMB 41171	43%(w/w) λακτοζη, 65 C, pH 6,8	54,8
<i>A.oryzae</i>	1,67 M λακτόζη, 40 °C, pH 4,5	31
<i>K.Lactis</i>	25% (w/v) λακτόζη, 40 °C, pH 4,5	30



### 3.3.6. Βαθμοί πολυμερισμού και γλυκοζιδικό δεσμοί σε μείγματα GOS

Ο βαθμός πολυμερισμού (DP) στα μείγματα GOS εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πηγή της χρησιμοποιημένης β-γαλακτοζιδάσης και τις συνθήκες αντίδρασης. Για παράδειγμα, οι GOS που παράγονται από β-γαλακτοζιδάση από τον *Bacillus Circulans* αποτελούνται από δισακχαρίτες έως και εξασακχαρίτες (Mozaffar et al., 1986), (Sako et al., 1999), ενώ μια β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae* παράγει κυρίως τρισακχαρίτες (López Leiva & Guzman, 1995), (Yanahira et al., 1992) και μια μικρή ποσότητα τετρασακχαριτών (Iwasaki et al., 1996). Επίσης, κυρίως τρισακχαρίτες και σε μικρότερο βαθμό, τετρασακχαρίτες εντοπίζονται χρησιμοποιώντας β-γαλακτοζιδάση από τον *Bifidobacterium longum BRCRC 15708* (Hsu et al., 2007). Οι Osman et al. (2012), ανέφεραν ότι οι β-γαλακτοζιδάσες από το *B. bifidum NCIMB 41171* παρήγαγαν κυρίως τρανσγαλακτοζυλιωμένους δισακχαρίτες (~ 46-55% του μείγματος GOS) και τρισακχαρίτες (~36-42% του μείγματος GOS), ενώ η περιεκτικότητα των GOS με DP  $\geq 4$  ήταν χαμηλή (~ 9-13% του μείγματος GOS).

Οι συνθήκες αντίδρασης επηρεάζουν επίσης σημαντικά το βαθμό DP σε μείγματα GOS. Η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης στην περίπτωση της β-γαλακτοζιδάσης από *B. circulans* και *A. oryzae* οδήγησε σε μείγματα GOS με υψηλότερο ποσοστό DP  $\geq 3$  σε σύγκριση με τους τρανσγαλακτοζυλιωμένους δισακχαρίτες (Boon et al., 2000). Η θερμοκρασία έχει δείξει επίσης σημαντική επίδραση στο DP σε μείγματα GOS. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης σε ολιγοσακχαρίτες με DP  $\geq 3$  σε μείγμα GOS, που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας β-γαλακτοζιδάσες από το *B. bifidum NCIMB 41171*, όταν η θερμοκρασία αντίδρασης αυξήθηκε από τους 40 ° C έως τους 60 ° C (Osman et al., 2010). Το περιεχόμενο των GOS με DP 3 και DP 4 αυξήθηκε επίσης σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (μέχρι 47 °C) χρησιμοποιώντας β-γαλακτοζιδάση από τον *A. oryzae* (Chen et al., 2002). Επιπλέον, η β-γαλακτοζιδάση από *Aspergillus aculeatus* παρήγαγε υψηλό ποσοστό GOS με DP  $\geq 3$  και χαμηλό ποσοστό GOS με DP 2 με την αύξηση της θερμοκρασίας αντίδρασης (Cardelle-Cobas et al., 2008). Το ίδιο ένζυμο παρήγαγε υψηλότερη περιεκτικότητα GOS με DP 3 σε pH 6,5 σε σύγκριση με τιμές pH 4,5, 5,5 και 7,5, ενώ οι GOS με DP 2 και DP > 3 παρέμειναν σταθεροί με την αλλαγή του pH (Cardelle-cobas et al., 2008). Ο χρόνος αντίδρασης έχει επίσης επίδραση στο DP σε μείγματα GOS. Συνήθως, οι τρισακχαρίτες είναι οι πρώτοι σχηματιζόμενοι GOS, ακολουθούμενοι από τετρασακχαρίτες και μετά από υψηλότερους ολιγοσακχαρίτες. Αυτό συμβαίνει επειδή οι τρισακχαρίτες πρέπει να είναι παρόντες για να ενεργούν ως γαλακτοζυλικοί αποδέκτες για να σχηματίσουν τετρασακχαρίτες. Επομένως, οι μέγιστες αποδόσεις των GOS με DP 3, DP 4 και DP > 4 λαμβάνονται συνήθως σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σύνθεσης (Albayrak & Yang, 2002), (Neri et al., 2009). Οι διαφορετικές πηγές β-γαλακτοζιδάσης παράγουν ολιγοσακχαρίτες με διαφορετικούς γλυκοζιδικούς δεσμούς. Για παράδειγμα, η β-γαλακτοζιδάση από τον *Lactobacillus reuteri* ευνόησε τον σχηματισμό β-(1 → 3) και β-(1 → 6) δεσμών (Maischberger et al., 2010), ενώ σχηματίστηκαν κυρίως β-(1 → 4) δεσμοί χρησιμοποιώντας τη β-γαλακτοζιδάση από τον *Cryptococcus laurentii* (Ohtsuka et al., 1990) και τον *B. circulans* (Mozaffar et al., 1986). Επιπλέον, η β-γαλακτοζιδάση από *A. oryzae* ευνόησε τον σχηματισμό δεσμών β-(1 → 6), ενώ οι GOS που παράχθηκαν από το *B. bifidum NCIMB 41171* σχημάτισαν κυρίως β-(1 → 3) δεσμούς, με λιγότερες ποσότητες β-(1 → 4) και β-(1 → 6) δεσμών.

Οι διαφορετικοί DP και γλυκοζιδικοί δεσμοί στα μείγματα GOS ενδέχεται να επηρεάσουν την πρεβιοτική αποτελεσματικότητά τους. Έχουν ήδη μελετηθεί *in vitro* ότι ορισμένα είδη *Bifidobacterium* μεταβολίζουν κατά προτίμηση GOS με DP 3 και 4 έναντι τρανσγαλακτοζυλιωμένων δισακχαριτών (Gopal et al., 2001). Οι διαφορετικοί γλυκοζιδικοί δεσμοί αποδείχθηκαν επίσης ότι επηρεάζουν διαφορετικά την ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων (Depeint et al., 2008), (Sanz et al., 2006a), (Sanz et al., 2006b). Οι δοκιμές σε ανθρώπους, για παράδειγμα, επιβεβαίωσαν ότι οι GOS που παράχθηκαν χρησιμοποιώντας το *B. bifidum* NCIMB 41171, το οποίο συνίσταται κυρίως σε συνδέσεις β-(1→3) και σε μικρότερο βαθμό συνδέσεις β-(1→4) και β-(1→6), είχε καλύτερη πρεβιοτική δράση σε σύγκριση με μείγμα GOS που περιείχε κυρίως β-(1 → 4) και β-(1 → 6) δεσμούς (Depeint et al., 2008).

### 3.4 Είδη Βιοκαταλυτών στη σύνθεση GOS

#### 3.4.1. Σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών με ολόκληρο κύτταρο

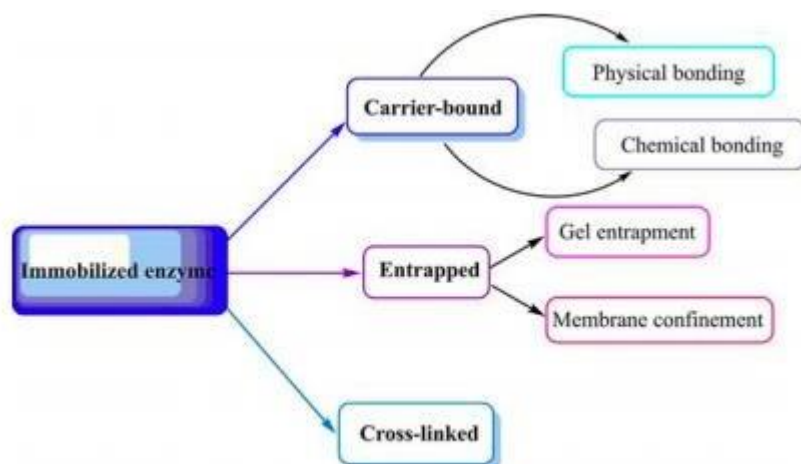
Η χρήση ολόκληρων κυττάρων φαίνεται πλεονεκτική για τη σύνθεση των GOS όταν η β-γαλακτοζιδάση είναι ενδοκυτταρική ή δεσμευμένη στα κύτταρα, καθώς έτσι αποφεύγεται η απομόνωση του ενζύμου από το κύτταρο παραγωγής του, που περιλαμβάνει διεργασίες εκχύλισης και καθαρισμού, οι οποίες είναι αρκετά δαπανηρές. Στην περίπτωση που τα κύτταρα είναι μεταβολικά ενεργά, ένα επιπλέον όφελος είναι ότι η γαλακτόζη και η γλυκόζη μπορούν να καταναλωθούν κατά την ανάπτυξη των κυττάρων, μειώνοντας τη συγκέντρωσή τους στο τελικό προϊόν και περιορίζοντας την αναστολή της β-γαλακτοζιδάσης στον σχηματισμό GOS, αλλά με το μειονέκτημα της ταυτόχρονης παραγωγής μεταβολιτών κατά τη ζύμωση, όπως η γλυκερόλη και η αιθανόλη (Osman, 2016).

#### 3.4.2. Ελεύθερες γαλακτοζιδάσες

Η χρήση ελεύθερων β-γαλακτοζιδασών μπορεί, σε μεγάλο βαθμό, να παρακάμψει όλα τα μειονεκτήματα που παρατηρούνται κατά τη χρήση βιοκαταλυτών ολόκληρων κυττάρων. Η χρήση τους συνήθως αυξάνει τους ρυθμούς αντίδρασης και συνεπώς μειώνει τους χρόνους που απαιτούνται για τη λήψη της μέγιστης απόδοσης σε GOS. Κάτι τέτοιο παρατηρήθηκε όταν οι β-γαλακτοζιδάσες *Bbgl*, *BbglIII* και *BbglIV* χρησιμοποιήθηκαν ελεύθερα σε διάλυμα αντί να χρησιμοποιηθούν ολόκληρα τα κύτταρα του στελέχους *B. bifidum* NCIMB 41171 (Osman et al., 2012). Η χρήση ελεύθερων β-γαλακτοζιδασών εξασφαλίζει καλύτερο έλεγχο της αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης σε σύγκριση με τη χρήση ολόκληρων κυττάρων. Με τη χρήση ελεύθερων γαλακτοζιδασών, μειώνεται η πιθανότητα απρόβλεπτων παρενεργειών σε αντίθεση με τα ολόκληρα κύτταρα που περιέχουν πολλαπλές β-γαλακτοζιδάσες με διαφορετικά βιοχημικά χαρακτηριστικά, με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολος ο έλεγχος της σύνθεσης GOS. Πέρα από τα παραπάνω πλεονεκτήματα, η χρήση ελεύθερων β-γαλακτοζιδασών στη σύνθεση GOS απαιτεί την απομόνωση του ενζύμου είτε από τον μικροοργανισμό είτε από το μέσο καλλιέργειας. Και στις δύο περιπτώσεις, η διαδικασία απομόνωσης είναι δαπανηρή καθώς οι β-γαλακτοζιδάσες βρίσκονται φυσικά σε χαμηλές ποσότητες και εντοπίζονται κυρίως ενδοκυτταρικά, κυρίως στις περιπτώσεις των βακτηριακών β-γαλακτοζιδασών (Osman, 2016).

### 3.4.3. Ακίνητοποίηση β-γαλακτοζιδάσης

Η ακίνητοποίηση είναι μια διαδικασία που μετατρέπει το ένζυμο σε μια μορφή που περιορίζεται φυσικά ή το ένζυμο εντοπίζεται σε ένα ορισμένο σημείο του χώρου, εμποδίζοντας έτσι την κινητικότητα του αλλά διατηρώντας ταυτόχρονα την καταλυτική του δράση. Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του ενζύμου (π.χ. προφίλ pH και θερμοκρασίας, σταθερότητα και δραστικότητα), οι ιδιότητες του φορέα (π.χ. μέγεθος σωματιδίων και σχήμα, εμβαδόν επιφάνειας, γραμμομοριακή αναλογία υδρόφιλου σε υδρόφοβες ομάδες, μηχανικές ιδιότητες), η τεχνική και οι συνθήκες καθορίζουν τις τελικές ιδιότητες του ακίνητοποιημένου ενζύμου και τον βαθμό στον οποίο η διαδικασία σύνθεσης των GOS μπορεί να αναπτυχθεί. Οι ακίνητοποιημένες β-γαλακτοζιδάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν επανειλημμένα και συνεχώς σε μια ποικιλία βιοαντιδραστήρων. Εκτός αυτού, η σταθερότητα τους αυξάνεται μετά την ακίνητοποίηση. Κάτι τέτοιο οδηγεί στην αύξηση του χρόνου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ίδια μάζα ενζύμου, μειώνοντας έτσι το κόστος της διαδικασίας σύνθεσης των GOS. Επιπλέον, ο εύκολος διαχωρισμός της ακίνητοποιημένης β-γαλακτοζιδάσης από το μέσο αντίδρασης μπορεί σε μεγάλο βαθμό να διασφαλίσει ότι το τελικό προϊόν δεν περιέχει ένζυμο. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν πολλά μειονεκτήματα που σχετίζονται με τη χρήση ακίνητοποιημένων β-γαλακτοζιδασών. Η δραστηριότητα τους μπορεί μερικές φορές να μειωθεί μετά την ακίνητοποίηση, λόγω των απωλειών που προκαλούνται από τη διαδικασία δέσμησης. Κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη προσβασιμότητα των μορίων υποστρώματος στη δραστική θέση της β-γαλακτοζιδάσης με αποτέλεσμα τη χαμηλότερη απόδοση στη διαδικασία σύνθεσης GOS. Ωστόσο, αυτό το μειονέκτημα μπορεί να αντισταθμιστεί από την αυξημένη σταθερότητα των ακίνητοποιημένων β-γαλακτοζιδάσεων. Ένα άλλο μειονέκτημα είναι η εκρόφηση της ακίνητοποιημένης β-γαλακτοζιδάσης από το υπόστρωμα μήτρα σε περίπτωση ακίνητοποίησης με φυσική προσρόφηση και η διαρροή της από τη μήτρα πηκτής στην περίπτωση της ακίνητοποίησης με παγίδευση. Αυτό το μειονέκτημα ξεπερνιέται συνήθως χρησιμοποιώντας συνδυαστικά αντιδραστήρια με φυσική προσρόφηση και παγίδευση.



Εικόνα 15. Μέθοδοι ακίνητοποίησης β-γαλακτοζιδάσης.

#### 3.4.4. Ανασυνδυασμένες β-γαλακτοζιδάσες

Η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA προσφέρει τη δυνατότητα έκφρασης και βελτιστοποίησης της παραγωγής β-γαλακτοζιδάσης με ενδιαφέρουσες βιοχημικές ιδιότητες για τη σύνθεση GOS. Συγκεκριμένα, τα τελευταία χρόνια, γίνεται χρήση μικροβιακών ξενιστών που παράγουν αποτελεσματικά ετερόλογες πρωτεΐνες. Σε σύγκριση με τις φυσικές β-γαλακτοζιδάσες, η χρήση ανασυνδυασμένων β-γαλακτοζιδασών προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα όπως η παραγωγή μεγάλης κλίμακας, η ευκολία καθαρισμού λόγω των υψηλών αποδόσεων έκφρασης και η βελτίωση της δραστηριότητας και της σταθερότητας του ενζύμου (Ji et al., 2005). Τα συστήματα βακτηριακής έκφρασης έχουν προτιμηθεί για την παραγωγή ανασυνδυασμένων β-γαλακτοζιδασών, καθώς έχουν την δυνατότητα γρήγορης ανάπτυξης σε υψηλές πυκνότητες χρησιμοποιώντας φθηνά υποστρώματα. Επιπλέον, έχουν καλά χαρακτηρισμένη γενετική και διατίθεται μεγάλος αριθμός φορέων κλωνοποίησης και μεταλλαγμένων στελεχών ξενιστών. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα βακτήρια για την παραγωγή β-γαλακτοζιδασών είναι το *E. coli* και το *Bacillus subtilis*. Η πρόοδος στην κατανόηση της μεταγραφής, της μετάφρασης και της αναδίπλωσης πρωτεϊνών στο *E. coli* σε συνδυασμό με τη διαθεσιμότητα σύγχρονων γενετικών εργαλείων έχει καταστήσει το *E. coli* ένα πολύτιμο εργαλείο για την έκφραση πρωτεϊνών (Baneyx, 1999), (Sørensen & Mortensen, 2005). Τα στελέχη ζύμης έχουν επίσης χαρακτηριστεί πλήρως γενετικά και είναι γνωστό ότι εκτελούν πολλές μεταφραστικές τροποποιήσεις. Τα δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενα στελέχη ζύμης είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* και το *Pichia pastoris* (Demain & Vaishnav, 2009). Τα πλεονεκτήματα των συστημάτων έκφρασης ζύμης περιλαμβάνουν την υψηλή πυκνότητα κυττάρων, την υψηλή απόδοση και παραγωγικότητα των πρωτεϊνών, τη καλή σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας, την ανθεκτικότητα και τα σταθερά επίπεδα παραγωγής, καθώς και την ύπαρξη γενετικά καλά χαρακτηρισμένων στελεχών που είναι γνωστό ότι εκτελούν πολλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Buckholz & Gleeson, 1991), (Porro et al., 2005), (Demain & Vaishnav, 2009). Ο *S. cerevisiae* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ζυμώσεις στη βιομηχανία και έχει τη δυνατότητα να εκκρίνει ετερόλογες πρωτεΐνες στο μέσο καλλιέργειας όταν στα δομικά του γονίδια συνδεθούν κατάλληλες αλληλουχίες σήματος (Demain and Vaishnav, 2009; Yin et al., 2007; Porro et al., 2005). Ο *P. pastoris* θεωρείται επίσης ένας ελκυστικός ξενιστής για τη βιομηχανική παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, καθώς οι υποκινητές που ελέγχουν την γονιδιακή του έκφραση, θεωρούνται μεταξύ των ισχυρότερων και των πιο αυστηρά ρυθμιζόμενων στους ζυμομύκητες (Demain & Vaishnav, 2009),(Yin et al., 2007), (Porro et al., 2005).

### 3.5 Παγκόσμια Αγορά GOS

Η ευαισθητοποίηση των καταναλωτών σε θέματα υγείας, οδήγησε στην αύξηση της ζήτησης πρεβιοτικών, με αποτέλεσμα την αντίστοιχη αύξηση της ετήσιας παραγωγή των GOS. Σύμφωνα με εκτίμηση που έγινε το 1994-1995, η ετήσια παγκόσμια παραγωγή GOS ανερχόταν σε 12.000–14.000 τόνους και αυξήθηκε περαιτέρω σε 21.000 τόνους μέχρι το τέλος του 2009. Στην Ιαπωνία και την Ευρώπη, τα GOS χρησιμοποιούνται ως συστατικά τροφίμων τα τελευταία 30 χρόνια και οι εφαρμογές τους επεκτείνονται συνεχώς. Σε γενικά πλαίσια, οι ιαπωνικές εταιρείες κυριαρχούν στην παγκόσμια παραγωγή GOS. Ωστόσο, η έκθεση της Grand View Research Inc. που πραγματοποιήθηκε στις ΗΠΑ αποκάλυψε ότι η Ευρώπη είχε το μεγαλύτερο μερίδιο αγοράς το 2015 στην παραγωγή βρεφικών παρασκευασμάτων. Επιπλέον, εκτιμήθηκε ότι η ζήτηση για κατανάλωση και παραγωγή GOS στην αγορά της Κίνας φτάνει τους 10.000 τόνους ετησίως. Σύμφωνα με την έκθεση της αγοράς των παγκόσμιων αναλυτών βιομηχανίας, η αξία των πρεβιοτικών στην αγορά έφτασε τα 1,17 δισεκατομμύρια δολάρια το 2015 λόγω της υψηλής ζήτησης πρεβιοτικών, ιδίως GOS. Επιπλέον, η παραγωγή ολιγοσακχαριτών υπολογίστηκε σε 50.000-80.000 τόνους ετησίως, εκ των οποίων οι GOS είχαν το 40% μερίδιο στην ετήσια παραγωγή πρεβιοτικών. Παρόλο που η Ευρώπη και η Ιαπωνία ηγούνται της παγκόσμιας αγοράς παραγωγής GOS, η απαίτηση για GOS στη Βόρεια Αμερική έχει επίσης αυξηθεί λόγω της αύξησης της κατανάλωσης γαλακτοκομικών προϊόντων με χαμηλά λιπαρά, γιαουρτιού, τσαγιού με χαμηλά λιπαρά και καφέ. Διαφορετικές εταιρίες έχουν δοκιμάσει νέα προϊόντα και έχουν διαμορφώσει νέες στρατηγικές για την ενσωμάτωση των GOS σε διάφορα προϊόντα διατροφής, όπως το γιαούρτι και το αρωματισμένο γάλα. Ανάμεσα στις πιο γνωστές εταιρείες που παράγουν GOS είναι οι Yakult Honsha (Τόκιο, Ιαπωνία), Nissin Sugar Manufacturing Company (Τόκιο, Ιαπωνία), Snow Brand Milk Products (Τόκιο, Ιαπωνία), Friesland Foods Domo, πρώην Borculo Domo ingredients (Ολλανδία) και η Clasado Ltd. (ΗΠΑ). Οι GOS που κατασκευάζονται σε αυτές τις εταιρείες έχουν κυρίως τη μορφή σκόνης και / ή σιροπιών (P. S. Panesar et al., 2018).

Bioligo GL 5700 IMF, ονομάζεται ένας εμπορικός γαλακτοολιγοσακχαρίτης, με συγκέντρωση καθαρής ουσίας σε GOS 57% σε ξηρή βάση. Κατασκευάζεται και εισάγεται στην αγορά από την εταιρεία Ingredion Inc., μια εταιρεία με έδρα τη Νότια Κορέα. Η Friesland Campina, ο κατασκευαστής του Vivinal GOS και της Glycosyn που εδρεύουν στις ΗΠΑ έχουν συγχωνευθεί για την ανάπτυξη νέων βρεφικών προϊόντων. Επιπλέον, η Dairy Crest's Functional Ingredient Business στο Ηνωμένο Βασίλειο έχει ξεκινήσει μία βρεφική φόρμουλα που αποτελείται από απομεταλλωμένο ορό γάλακτος ως πηγή πρωτεϊνών, υδατανθράκων και GOS με την επωνυμία "SureStart" σε συνεργασία με την Fonterra. Άλλα προϊόντα με την επωνυμία «Promovita» και «Nutrabioc» έχουν κατασκευαστεί και πωλούνται για τη διατροφή ανθρώπων και ζώων, αντίστοιχα. Εκτός αυτού, άλλες βιομηχανίες, όπως η Nestle και η Loblaw έχουν επίσης αναδυθεί στο πεδίο της βρεφικής διατροφής, με την κυκλοφορία των Nestle Good Start 2 και των Omega + Infant Powder Formula αντίστοιχα. Η ενσωμάτωση των GOS σε βρεφικές κρέμες, καθώς και τα συμπληρώματα GOS, διατίθενται σε φακελάκια ή σε μορφή σκόνης. Το Bimuno σε μορφή σκόνης, που κατασκευάζεται από την Clasado Biosciences, στο Ηνωμένο Βασίλειο είναι ένα συμπλήρωμα καθημερινής

διατροφής που διατίθεται σε φακελάκια και αποτελείται από GOS μαζί με λακτόζη, γλυκόζη και γαλακτόζη. Παρομοίως, ένα άλλο προϊόν, το Galactomune, που κατασκευάζεται από την Klair Labs, USA και αποτελείται από γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες και β-γλυκάνη (P. S. Panesar et al., 2018).

**Πίνακας 8.** Κύριες εταιρείες παρασκευής GOS (P. S. Panesar et al., 2018).

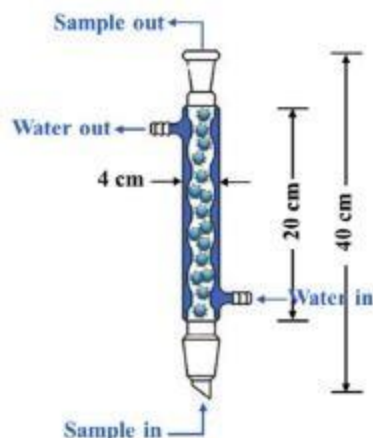
Εμπορικό όνομα GOS	Μορφή GOS	Προμηθευτής	Συγκέντρωση GOS (%)
Oligomate 55	Σιρόπι/ Σκόνη	Yakult Honsha Co. Ltd. Japan	55
Cup-Oligo	Υγρή/ Σκόνη	Nissin Sugar Co. Ltd. Japan	70
Vivinal GOS	Σιρόπι		59-72
Vivinal GOS	Σκόνη		69
Vivinal GOS Powder WPC/Vivinal GOS Powder Maltodextrin	Σκόνη	Friesland Campina Domo, Netherlands	29
Bimuno	Σκόνη	Clasado Biosciences Ltd., UK	>80
Bimuno	Σιρόπι		>57
Promovita	Σιρόπι	Dairy Crest limited, UK	-
Biologo GL 5700IMF	Σιρόπι	Ingredion Inc., Korea	57
GOS-570-S	Σιρόπι	Biotechnology Corporation, China	57
Purimune	-	Corn Products International Inc., USA	90

### 3.6 Στόχοι & υφιστάμενες επιστημονικές μελέτες της ενζυμικής βιομετατροπής της λακτόζης σε GOS

Κύριο θέμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS) από όξινο ορό γιαουρτιού. Οι GOS αποτελούν ολιγομερή μόρια λακτόζης με πρεβιοτική δράση, γεγονός που έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς τα καθιστά προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Ο όξινος ορός αποτελεί παραπροϊόν της γαλακτοβιομηχανίας και είναι πλούσιος σε λακτόζη, πρωτεΐνες και μέταλλα, που όμως η αξιοποίηση του καθίσταται προβληματική λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε χημικά ( $> 35,000 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1}$ ) και βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο ( $\sim 80,000 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1}$ ), σε γαλακτικό οξύ ( $6,4 \text{ g L}^{-1}$ ) και επομένως της ιδιαίτερα χαμηλής τιμής pH του (Jelen, 2011), (Fischer & Kleinschmidt 2015.), (Smithers, 2015). Η αξιοποίηση ενός παραπροϊόντος της βιομηχανίας, για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, αποτελεί την κύρια ιδέα πίσω από την παρούσα διπλωματική εργασία. Η εισαγωγή μιας τέτοιας καινοτομίας στη Βιομηχανία είναι πολλά υποσχόμενη και αποτελεί αφενός λύση στην αντιμετώπιση του προβλήματος συσσώρευσης αποβλήτων στη

Βιομηχανία γάλακτος, αφετέρου δίνει την δυνατότητα στη βιομηχανία να χρησιμοποιεί τα απόβλητα της προκειμένου να παράξει προστιθέμενης αξίας προϊόντα, και κατά επέκταση να αυξήσει το κέρδος της. Παρακάτω, αναφέρονται οι πιο πρόσφατες μελέτες σχετικά με την αξιοποίηση της λακτόζης για τον σχηματισμό γαλακτοολιγοσακχαριτών.

Οι Fischer και Kleinschmidt (2021), χρησιμοποίησαν διαφορετικά είδη ορού γάλακτος, συγκεκριμένα γλυκού ορού, ορού γάλακτος από την παραδοσιακή ελληνική παραγωγή γιαουρτιού και συμπυκνωμένου όξινου ορού, με στόχο την αξιολόγηση τους στη σύνθεση γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS). Χρησιμοποιήθηκε η β-γαλακτοζιδάση από *Cryptococcus laurentii* με τη μορφή ολόκληρου κυττάρου και χαρακτηρίστηκε σε σχέση με τη βέλτιστη θερμοκρασία και pH, τη σταθερότητα του ενζύμου, τη συγγένεια του υποστρώματος και την επίδραση διαφόρων κατιόντων. Η απόδοση της μεταγαλακτοζυλίωσης συγκρίθηκε με εκείνη της β-γαλακτοζιδάσης από *Aspergillus oryzae*. Με το *C. laurentii*, επιτεύχθηκαν υψηλές αποδόσεις GOS 34,6% –36,1%, ενώ η απόδοση με *A. oryzae* κυμάνθηκε από 8,8% έως 19,6%. Χρησιμοποιώντας το *C. laurentii*, ο τύπος ορού γάλακτος επηρέασε τη σύνθεση των GOS, καθώς το ένζυμο αυτό ήταν σε θέση να χρησιμοποιεί γαλακτόζη, η οποία υπάρχει στο ελληνικό γιαούρτι, ως υποστρώμα δέκτη. Το ένζυμο *B-gal42* από το στέλεχος *Pantoea anthophila*, το οποίο απομονώθηκε από το tejuino, ένα παραδοσιακό ποτό που έχει υποστεί ζύμωση καλαμποκιού στο Μεξικό και εκφράστηκε γενετικά από το στέλεχος *E. coli*, χρησιμοποιήθηκε από τους Yañez-Ñeco et al. (2021), για τη σύνθεση GOS, είτε από καθαρό διάλυμα λακτόζης, είτε από διάλυμα ορού γάλακτος. Εκχυλίσματα ακατέργαστων ενζύμων χωρίς κύτταρα παρουσίασαν υψηλή σταθερότητα και χρησιμοποιήθηκαν για αντιδράσεις σύνθεσης GOS. Σε αντιδράσεις με 400 g / L λακτόζης, η μέγιστη απόδοση GOS ήταν 40% (w/v) μετρούμενη με HPAEC-PAD. Το ένζυμο αυτό, σχημάτισε κυρίως GOS με β (1 → 6) και β (1 → 3) γαλακτοζυλικούς δεσμούς. Συγκρίνοντας τη σύνθεση GOS μεταξύ ορού γάλακτος και καθαρής λακτόζης, και τα δύο υποστρώματα σε συγκέντρωση 300 g / L οδήγησαν σε απόδοση 38% (60% μετατροπής λακτόζης) με το ίδιο προφίλ προϊόντος, έτσι όπως καθορίστηκε από το HPAEC-PAD. Η μετατροπή των διηθημάτων ορού γάλακτος σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS) μελετήθηκε με την ενζυμική δράση της β-γαλακτοζιδάσης από τον *Aspergillus oryzae* σε αντιδραστήρα συνεχούς ροής από τους Eskandarloo & Abbasroutrad, (2018). Η νέα αυτή μέθοδος ακινητοποίησης του ενζύμου που περιλαμβάνει την ομοιοπολική ακινητοποίηση της β-γαλακτοζιδάσης σε τροποποιημένα γυάλινα σφαιρίδια 3-αμινοπροπυλο τριαιθοξυσιλανίου (3-APTES), αναπτύχθηκε με τη μέθοδο διασταύρωσης. Η εξάρτηση από το pH και τη θερμοκρασία στην αποτελεσματικότητα του ενζύμου που είναι ακινητοποιημένο με γυάλινες σφαιρίδια συγκρίθηκε με εκείνη του ελεύθερου ενζύμου. Παρατηρήθηκε αυξημένο pH και θερμική σταθερότητα για το ακινητοποιημένο ένζυμο έναντι του ελεύθερου ενζύμου. Μελετήθηκε η ευκολία του ενζυμικού αντιδραστήρα σταθερής κλίσης και μόνο το 4,6% της απόδοσης GOS χάθηκε μετά από οκτώ επαναχρησιμοποιήσεις. Επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις κύκλου πραγματοποιήθηκαν επίσης για τη βελτίωση του σχηματισμού GOS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο σχηματισμός GOS αυξήθηκε και επιτεύχθηκε μέγιστη απόδοση GOS 39,3% με 56,4% μετατροπή λακτόζης μετά τον 2<sup>ο</sup> κύκλο.



**Εικόνα 16.** Αντιδραστήρα συνεχούς ροής, σταθερής κλίνης για μετατροπή λακτόζης (Eskandarloo & Abbaspourrad, 2018).

Τέλος, οι Gonzalez-Delgado et al. (2016) ασχολήθηκαν με τη βελτιστοποίηση της σύνθεσης γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS) που καταλύεται από την εμπορική β-γαλακτοζιδάση από *Kluyveromyces lactis*. Συγκεκριμένα, μελέτησαν την επίδραση των κύριων παραγόντων όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση ενζύμου, το pH, την αρχική συγκέντρωση λακτόζης και το χρόνο αντίδρασης, ως προς την παραγωγή των πλέον επιθυμητών γαλακτοολιγοσακχαριτών. Βρέθηκε ότι η μέγιστη απόδοση σε GOS που επιτεύχθηκε ήταν ίση με 12,2% σε θερμοκρασία 40°C, ενεργότητα ενζύμου 5 U/mL, pH 7,0, αρχική συγκέντρωση λακτόζης 250 g/L και χρόνο αντίδρασης 3h. Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας προέκυψε ότι το pH είναι μια κρίσιμη παράμετρος που επηρεάζει τόσο την απόδοση της μεταγαλακτοζυλίωσης, όσο και της υδρόλυσης, ανάλογα με την ενεργότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται.

Από προηγούμενες διπλωματικές εργασίες του εργαστηρίου Τροφίμων έχει μελετηθεί η αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού, χρησιμοποιώντας β-γαλακτοζιδάση από τον ευρωτομύκητα *A. oryzae* (Γαλάνη, 2016) και από το ζυμομύκητα *Kluyveromyces lactis* (Τσίκα, 2019). Έχει επίσης μελετηθεί η αξιοποίηση της λακτόζης τυρογάλακτος χρησιμοποιώντας β-γαλακτοζιδάση από το ζυμομύκητα *K. Lactis* (Ζαφείρη, 2020). Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των προγενέστερων αυτών μελετών. Όσον αφορά της αξιοποίηση λακτόζης όξινου ορού χρησιμοποιώντας β-γαλακτοζιδάση από τον *A. Oryzae*, βασικό αντικείμενο της μελέτης, αποτέλεσε ο προσδιορισμός της επίδρασης της περιεκτικότητας σε λακτόζη του υποστρώματος και της ενεργότητας του ενζύμου στο βαθμό απόδοσης σε GOS. Οι βέλτιστες συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης με χρήση β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *A. oryzae* ήταν όξινος ορός με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 14% w/v, θερμοκρασία 40°C και ενεργότητα ενζύμου ίση με 9,6 U/mL (Γαλάνη, 2016). Ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS, επιτεύχθηκε σε θερμοκρασία 45°C, ενζυμική ενεργότητα 9,6 U/mL, τιμή pH υποστρώματος 4,5 και είχε τιμή  $23,1 \pm 0,25\%$ . Όσον αφορά την αξιοποίηση λακτόζης όξινου ορού χρησιμοποιώντας β-γαλακτοζιδάση από τον *K. Lactis* βασικό αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε και εδώ ο προσδιορισμός της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης του υποστρώματος και της ενεργότητας του ενζύμου στο βαθμό απόδοσης σε GOS.



Χρησιμοποιήθηκε όξινο ορόσ συγκέντρωσης λακτόζης 3,5%, 9%, 14% και 17% w/v και ενζυμική ενεργότητα 0,013, 0,026 και 0,052 U/mL, στις βέλτιστες συνθήκες δράσης του χρησιμοποιούμενου ενζύμου, pH 7,0 και θερμοκρασία 37°C με βάση τη βιβλιογραφία, σε δώδεκα σειρές ενζυμικών αντιδράσεων. Οι βέλτιστες συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης με χρήση β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis* για την επίτευξη του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS ήταν υπόστρωμα όξινου ορού περιεκτικότητας 14% w/v σε λακτόζη, θερμοκρασία 37°C, ενεργότητα ενζύμου ίση με 0,052 U/mL και τιμή pH υποστρώματος 7. Στις συνθήκες αυτές, ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS είχε τιμή 37,0± 1,06%. Όσον αφορά την αξιοποίηση της λακτόζης από τυρογάλα χρησιμοποιώντας β-γαλακτοζιδάση από τον *K. Lactis* διερευνήθηκε η επίδραση διαφόρων παραμέτρων, όπως η αρχική συγκέντρωση σε λακτόζη του τυρογάλακτος, η θερμοκρασία και το ενζυμικό φορτίο στην ενζυμική αντίδραση μετατροπής της λακτόζης του τυρογάλακτος σε GOS. Το τυρογάλα μελετήθηκε σε αρχικές συγκεντρώσεις λακτόζης 5, 10 και 15% w/v, ενζυμικό φορτίο 0,011, 0,022 και 0,045 U/mL, θερμοκρασία ενζυμικής αντίδρασης 30 και 40 °C, ενώ η τιμή pH του υποστρώματος σε όλες τις αντιδράσεις ήταν ρυθμισμένη στην τιμή 7,2. Στις συνθήκες αυτές ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS είχε τιμή 21,7% μετά από 300 min ενζυμικής αντίδρασης με χρήση ενζυμικού φορτίου 0,045 U/mL στους 40 °C και αρχική συγκέντρωσή λακτόζης 15% w/v.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η αξιοποίηση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης του όξινου ορού γάλακτος για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS). Η σύνθεση των GOS πραγματοποιήθηκε μέσω της ενζυμικής αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης με τη χρήση του ενζύμου *Ttbgal1* προερχόμενο από το ανασυνδυασμένο γονιδίωμα του μικροοργανισμού *Thermothielavioides terrestris* ετερόλογα εκφρασμένο στη ζύμη *Pichia pastoris*. Αρχικά προσδιορίστηκαν τα συστατικά του όξινου ορού, ακολούθησε ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών δράσης του ενζύμου, ενώ τελικά μελετήθηκε η απόδοση της ενζυμικής μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS.



## Κεφάλαιο 4. Υλικά, μέθοδοι & πειραματική διαδικασία

---

Ο όξινος ορός, που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, παραλήφθηκε από ελληνική γαλακτοβιομηχανία παραγωγής στραγγιστού γιαουρτιού. Αρχικά, μέσω συγκεκριμένων χημικών μεθόδων προσδιορίστηκαν τα συστατικά του και στη συνέχεια ακολούθησε η προεπεξεργασία του, ώστε να αποτελέσει το κατάλληλο υπόστρωμα για την παραγωγή GOS, μέσω ενζυμικής αντίδρασης. Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται μια εκτενής περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τη χημική ανάλυση της σύστασης του όξινου ορού γιαουρτιού. Στη συνέχεια, παρουσιάζεται αναλυτικά η προεπεξεργασία του ορού, με στόχο να αποτελέσει το κατάλληλο υπόστρωμα για την ενζυμική μετατροπή της περιεχόμενης στον ορό λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS). Η ενζυμική αντίδραση σύνθεσης GOS ονομάζεται μεταγαλακτοζυλίωση και πραγματοποιείται παράλληλα με την υδρόλυση της λακτόζης. Το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται *Ttbgal1* και προέρχεται από το ανασυνδυασμένο γονιδίωμα του μικροοργανισμού *Thermothielavioides terrestris*, ετερόλογα εκφρασμένο στη ζύμη *Pichia pastoris*. Το συγκεκριμένο ένζυμο πλεονεκτεί έναντι άλλων, καθώς παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε τιμή pH ίδια με αυτήν του όξινου ορού. Τέλος, ακολουθεί η ανάλυση των μεθόδων προσδιορισμού της β-γαλακτοζιδάσης, ο σχεδιασμός των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν καθώς επίσης και οι τεχνικές ανάλυσης των δειγμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων.

### 4.1. Χημική ανάλυση όξινου ορού

#### 4.1.1. Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος & τέφρας

*Όργανα, Σκεύη και Συσκευές*

- Κάψες πορσελάνης
- Ζυγός Ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
- Πυριατήριο
- Κάμινος
- Ξηραντήρας

*Πειραματική Διαδικασία*

30 mL όξινου ορού, μετρηθέντα ακριβώς με σιφώνιο, φέρονται μέσα σε προζυγισμένη κάψα πορσελάνης. Για λόγους επαναληψιμότητας, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και χρησιμοποιήθηκαν 3 προζυγισμένες κάψες πορσελάνης. Να διευκρινιστεί πως οι κάψες είχαν προηγουμένως πλυθεί, καθαριστεί και τοποθετηθεί προς ξήρανση στο πυριατήριο, σε θερμοκρασία 102 °C για χρονικό διάστημα 24 h και στην συνέχεια είχαν τοποθετηθεί σε ξηραντήρα μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι κάψες με τον ορό ζυγίζονται ξανά και καταγράφεται το τελικό τους βάρος.

Στη συνέχεια, τοποθετούνται εκ νέου στο πυριατήριο, για 48 h και μεταφέρονται ξανά σε ξηραντήρα, μέχρις ότου έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί ζύγισή τους στον αναλυτικόζυγό.



**Εικόνα 17.** Κάψες πορσελάνης με στερεό υπόλειμμα όξινου ορού.

Τέλος, για τον προσδιορισμό της τέφρας οι κάψες με το στερεό υπόλειμμα του όξινου ορού μεταφέρονται στην κάμινο, η οποία λειτουργεί στους 550 °C, για 12-16 h. Μετά το πέρας της αποτέφρωσης, οι κάψες μεταφέρονται ξανά σε ξηραντήρα και μόλις φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ζυγίζονται εκ νέου σε αναλυτικό ζυγό.



**Εικόνα 18.** Κάψες πορσελάνης με τέφρα όξινου ορού.

Το στερεό υπόλειμμα καθώς και η τέφρα του όξινου ορού υπολογίζονται από τους παρακάτω τύπους:

$$\%ολικά\ στερικά = \frac{w_3 - w_1}{w_2 - w_1} \times 100\%$$

$$\%τέφρα = \frac{w_4 - w_1}{w_2 - w_1} \times 100\%$$

Όπου:

$w_1$ : το βάρος της άδειας κάψας πορσελάνης

$w_2$ : το βάρος της κάψας πορσελάνης και δείγματος

$w_3$ : το βάρος της κάψας πορσελάνης και βάρος στερεού υπολείμματος

$w_4$ : το βάρος της κάψας πορσελάνης και το βάρος της τέφρας

## 4.1.2 Προσδιορισμός γαλακτικού οξέος

### Όργανα, Σκεύη και Συσκευές

- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού
- Κυψελίδα χαλαζία πλάτους 1 cm και χωρητικότητας 1,75 mL
- 2 ογκομετρικές φιάλες των 100 mL
- Δοκιμαστικοί σωλήνες

### Χημικά Αντιδραστήρια

- Χλωριούχος σίδηρος III (  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  )
- DL-γαλακτικό οξύ 85% w/w

### Κατασκευή καμπύλης αναφοράς γαλακτικού οξέος

Αρχικά, γίνεται παρασκευή διαλύματος τριχλωριούχου σιδήρου ( $\text{FeCl}_3$ ) 0,2% w/v. Μετρηθέντα 0,3333 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  μεταφέρονται εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 mL. Στη συνέχεια η φιάλη πληροίται με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να επέλθει η διάλυση του άλατος. Αρχικά, για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του γαλακτικού οξέος παρασκευάζεται αρχικό μητρικό διάλυμα περιεκτικότητας 1% w/v σε γαλακτικό οξύ. Συγκεκριμένα, 1,1765 g DL-γαλακτικού οξέος 85% w/v φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100mL και στη συνέχεια η φιάλη πληροίται μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό και ανακινείται καλά. Χρησιμοποιώντας ως βάση το μητρικό διάλυμα και κάνοντας τις κατάλληλες αραιώσεις κατασκευάζονται διαλύματα περιεκτικότητας 0,1% w/v, 0,2% w/v, 0,3% w/v 0,4% w/v και 0,5% w/v σε γαλακτικό οξύ. Το 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. Εντός 15 min από την ανάμειξη, καταγράφεται η απορρόφηση των διαλυμάτων στα 390 nm με την χρήση φασματοφωτομέτρου UV-Vis (Helios Unicam, German) και κυψελίδας χαλαζία, όγκου 1,75 mL. Τέλος, κατασκευάζεται το διάγραμμα απορρόφησης συναρτήσεως της περιεκτικότητας του γαλακτικού οξέος και προσδιορίζεται η βέλτιστη ευθεία που διέρχεται από τα πειραματικά σημεία.

### Μέτρηση γαλακτικού οξέος σε άγνωστο δείγμα

Το άγνωστο δείγμα του όξινου ορού γιαουρτιού αραιώνεται κατάλληλα έτσι ώστε η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος να βρίσκεται εντός 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 και στη συνέχεια εντός 15 min, καταγράφεται η απορρόφηση του διαλύματος στα 390 nm. Με βάση την καμπύλη αναφοράς υπολογίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε γαλακτικό οξύ. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται εις τριπλούν.



**Εικόνα 19.** Φασματοφωτομέτρου UV-Vis (Helios Unicam, German).

#### 4.1.3. Προσδιορισμός αλατότητας (Μέθοδος Mohr)

##### Αντιδραστήρια

- $K_2CrO_4$  (δείκτης) (5 g σε 100 mL απιονισμένου νερού)
- $AgNO_3$  0.1 N (16.99 g σε 1000 mL απιονισμένου νερού)
- $CaCO_3$

##### Πειραματική Διαδικασία

Ο προσδιορισμός της αλατότητας του όξινου ορού πραγματοποιείται μέσω του προσδιορισμού των ιόντων χλωρίου ( $Cl^-$ ) του. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται τιτλοδότηση χρησιμοποιώντας διάλυμα  $AgNO_3$ , γνωστή και ως μέθοδος Mohr. Η μέθοδος αυτή, βασίζεται στο σχηματισμό λευκού ιζήματος κατά την αντίδραση και δέσμευσή των  $Cl^-$  από τα  $Ag^+$ . 2 mL δείγματος του όξινου ορού φέρονται σε κωνική φιάλη των 100 mL. Στη συνέχεια, προστίθενται 25 mL απιονισμένου νερού, ώστε να αυξηθεί ο όγκος του διαλύματος και να γίνει ευκολότερη ανάδευσή και ανάγνωσή του τελικού σημείου. Στη συνέχεια, προστίθενται 0,5 g  $CaCO_3$  και 4–5 σταγόνες δείκτη  $K_2CrO_4$  που χρωματίζει το διάλυμα με κίτρινο χρώμα. Ακολουθεί τιτλοδότηση με χρήση προχοϊδας των 25 mL και τιτλοδότηση με διάλυμα  $AgNO_3$  0,1 N έως ότου το χρώμα να μεταβληθεί σε κεραμέρυθρο. Στο σημείο αλλαγής του χρώματος του δείκτη, η τιτλοδότηση σταματά.

Η αλατότητα υπολογίζεται από την εξής σχέση :

$$S = \frac{T \times N \times 0.05845 \times 100}{V}$$

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: ο παράγοντας μετατροπής σε NaCl που αντιδρά με 1 mL κανονικού  $\text{AgNO}_3$

100: ο παράγοντας μετατροπής αποτελεσμάτων σε % κατά βάρος ή όγκο.

#### 4.1.4. Προσδιορισμός πρωτεϊνών (Μέθοδος Kjeldhal)

##### Πειραματική Διαδικασία

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του όξινου ορού πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Kjeldhal. Η μέθοδος αυτή αποτελεί την πιο αξιόπιστη και διαδεδομένη τεχνική για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών στα τρόφιμα. Εκμεταλλεύομενη το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες αποτελούν τα κύρια αζωτούχα συστατικά των τροφίμων προσδιορίζει τις συνολικές πρωτεΐνες του ορού σε συνολικό ποσοστό αζώτου, θεωρώντας ότι οι μη πρωτεϊνικές ενώσεις του αζώτου στα τρόφιμα βρίσκονται σε πολύ χαμηλά ποσοστά και άρα είναι μη ανιχνεύσιμες. Αρχή της μεθόδου αποτελεί η καύση του δείγματος με περίσσεια πυκνού θειικού οξέος, παρουσία μεταλλικών καταλυτών και αλάτων καλίου ή νατρίου. Το οργανικά 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 όξινου ορού με την μέθοδο Kjeldhal απαιτείται προηγουμένως η ξήρανση του δείγματος, η οποία πραγματοποιείται σε συσκευή λυοφιλίωσης (Freeze Drying Christ / Alpha 1-4DL – Martin Christ, Γερμανία). Η μέθοδος Kjeldhal αποτελείται από τρία στάδια, τα οποία αναλύονται στη συνέχεια.

Το πρώτο στάδιο αφορά στην υγρή πέψη ή χώνευση του αζώτου. Χρησιμοποιούνται 4 φιάλες Kjeldhal, όγκου 300 mL. Εντός κάθε σωλήνα των 300 mL (πλην ενός) φέρονται 1-2 g ζυγισμένα δείγματα ορού σε ξηρή μορφή, σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων. Στην τέταρτη φιάλη, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως φιάλη σύγκρισης, δεν τοποθετείται δείγμα. Σε κάθε σωλήνα της συσκευής Kjeldhal 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 χρήση σιφωνίου πληρώσεως, καθώς και πυρήνες βρασμού. Οι σωλήνες της συσκευής Kjeldhal τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις στο μανδύα θέρμανσης του συστήματος Kjeldhal και το σύστημα σφραγίζεται, ενώ τίθεται σε εφαρμογή το σύστημα κενού (σύστημα Venturi) .



**Εικόνα 20.** Συσκευή Kjeldhal Büchi 425 Digestor, Büchi, Ελβετία.

Αρχικά το σύστημα θερμαίνεται ήπια για 20 min, μέχρις ότου το μελανόχρωμο νεφέλωμα που έχει αναπτυχθεί να σκάσει και να αρχίσει να υποχωρεί. Ακολουθεί ήπιος βρασμός για περίπου 15 min μέχρι να διαυγάσει το περιεχόμενο των σωλήνων και ακολουθεί έντονος βρασμός για 30 min. Στο τέλος του βρασμού, οι σωλήνες πρέπει να έχουν λάβει ένα χαρακτηριστικό σμαραγδένιο χρώμα. Τέλος, οι φιάλες αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



**Εικόνα 21.** Συσκευή απόσταξης Kjeldhal.

Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την απόσταξη της αμμωνίας. Κάθε σωλήνας προσαρμόζεται στη συσκευή απόσταξης Kjeldhal και τα δοχεία του συστήματος απόσταξης πληρούνται με απιονισμένο νερό και διάλυμα NaOH 32 % w/w. Συγκεκριμένα για κάθε δείγμα απαιτούνται 75 mL H<sub>2</sub>O και 125 mL NaOH. Για κάθε δείγμα, συμπεριλαμβανομένου του τυφλού, προετοιμάζεται μία κωνική φιάλη των 250 mL, εντός της οποίας προστίθενται 50 mL διαλύματος H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 N. Ενεργοποιείται το σύστημα απόσταξης και το απόσταγμα συλλέγεται εντός της κωνικής φιάλης για 5 min, οπότε συλλέγονται περίπου 200 mL αποστάγματος.



Το τρίτο στάδιο αφορά στον προσδιορισμό της αμμωνίας, ο οποίος πραγματοποιείται, μέσω της έμμεσης τιτλοδότησης του εναπομείναντος θειικού οξέος στο απόσταγμα, με την χρήση διαλύματος NaOH 0,5 N και δείκτη ερυθρού μεθυλίου-κυανού μεθυλενίου.



**Εικόνα 22.** Έμμεση τιτλοδότηση του εναπομείναντος θειικού οξέος στο απόσταγμα με διάλυμα NaOH 0,5 N και δείκτη ερυθρού μεθυλίου-κυανού μεθυλενίου.

Η αναγωγή του καταναλωθέντος για την τιτλοδότηση διαλύματος NaOH σε ποσοστό πρωτεϊνών γίνεται με χρήση της παρακάτω σχέσης:

$$\%N = 1,40007 \times \frac{V_s - V_b}{w}$$

Όπου:

$V_s$ : ο καταναλωθέν όγκος πρότυπου διαλύματος NaOH στο διάλυμα δείγματος

$V_b$ : η καταναλωθέν όγκος πρότυπου διαλύματος NaOH στο τυφλό διάλυμα

$N$ : η κανονικότητα του πρότυπου διαλύματος NaOH που χρησιμοποιήθηκαν κατά την τιτλοδότηση

$w$ : το βάρος το δείγματος που αναλύθηκε (g).

#### 4.1.5. Προσδιορισμός λίπους με τη μέθοδο Rose-Gottlieb

*Όργανα, Σκεύη, Συσκευές*

- Διαχωριστική χοάνη των 500 mL με πώμα
- Σφαιρική φιάλη των 500 mL
- Σφαιρική φιάλη των 100 mL
- Περιστροφικός εξατμιστήρας υπό κενό
- Φούρνος κενού
- Πυριατήριο
- Ζυγός Ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

*Χημικά αντιδραστήρια*

- Αμμωνία
- Αιθανόλη 96% v/v
- Διαιθυλαιθέρας
- Πετρελαικός αιθέρας

### Πειραματική Διαδικασία

Σφαιρική φιάλη των 100 mL ξηραίνεται σε πυριατήριο που λειτουργεί στους 102 °C και μετριέται το καθαρό της βάρος, με τη χρήση ζυγού ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια, φέρονται εντός διαχωριστικής χοάνης 30g δείγματος. Στη διαχωριστική χοάνη, προστίθενται επιπλέον 4,5 mL δείγματος αμμωνίας ( πυκνότητας 0,88g/mL ), προκειμένου να διαλυτοποιηθεί τυχόν καζείνη του δείγματος και 30 mL αιθανόλης 96% v/v για την διάσπαση του γαλακτώματος του λίπους και την διευκόλυνση της εκχύλισης των λιπιδίων. Η διαχωριστική χοάνη πωματίζεται και ανακινείται ελαφρώς. Εντός της χοάνης προστίθενται επιπλέον 75mL διαιθυλαιθέρα , για την εκχύλιση του μη γαλακτοποιημένου λίπους και 75 mL πετρελαϊκού αιθέρα, για την βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης, μειώνοντας τη διαλυτότητα του νερού, της λακτόζης και της αιθανόλης στο διαιθυλαιθέρα. Η χοάνη πωματίζεται και ανακινείται αρκετές φορές, έτσι ώστε να εκχυλιστούν τα λιπαρά στην οργανική φάση. Η χοάνη αφήνεται σε ηρεμία για 30 min έως ότου να σχηματιστεί μια διαυγής υπερκείμενη υδατική φάση. Η υποκείμενη υδατική φάση μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως και η υπερκείμενη οργανική φάση σε σφαιρική φυάλη των 500 mL. Η υδατική φάση μεταφέρεται εκ νέου εντός της διαχωριστικής χοάνης και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της εκχύλισης με επιπλέον προσθήκη 75mL διαιθυλαιθέρα και 75mL πετρελαϊκού αιθέρα άλλες 2 φορές. Στο τέλος η υδατική φάση απορρίπτεται.



**Εικόνα 23.** Σταδιο διαχωρισμού υδατικής και οργανικής φάσης.

Οι οργανικοί διαλύτες του μίγματος εντός της σφαιρικής φιάλης των 500mL εξατμίζονται πλήρως, με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα υπό κενό. Έπειτα, το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης αναδιαλύεται σε 50mL διαιθυλαιθέρα και το μίγμα μεταφέρεται εντός σφαιρικής φιάλης των 100mL και ο διαιθυλαιθέρας εξατμίζεται πλήρως, με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα υπό κενό. Κατόπιν η σφαιρική φιάλη ξηραίνεται σε πυριατήριο

που λειτουργεί στους 102 °C. Η σφαιρική φιάλη με το ξηρό λίπος ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και καταγράφεται το μικτό βάρος της φιάλης του λίπους. Από την διαφορά μικτού και καθαρού βάρους υπολογίζεται σταθμικά η περιεκτικότητα του δείγματος σε λίπος.

#### 4.1.6. Προσδιορισμός ολικών υδατανθράκων με την μέθοδο φαινόλης και θειικού οξέος

##### *Όργανα, Σκεύη, Συσκευές*

- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού που δέχεται πλάκες μικροτιτλοδότησης
- Πλάκα μικροτιτλοδότησης με κάλυμμα
- Υδατόλουτρο
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου 20-100 μL και 100-1000μL

##### *Χημικά αντιδραστήρια*

- Πυκνό θειικό οξύ 95 % w/v
- Φαινόλη
- Γλυκόζη

##### *Πειραματική Διαδικασία*

Εντός απαγωγού στρώνεται ένα φύλλο διηθητικού χαρτιού και τοποθετείται επάνω σε αυτό μία πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 φρεάτων. Σε κάθε φρέαρ της πλάκας μικροτιτλοδότησης προστίθενται 50mL δείγματος κατάλληλης αραιώσης. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται τέσσερις επαναλήψεις. Παράλληλα σε τέσσερα φρέατα προστίθενται 50 mL απιονισμένου νερού (τυφλό δείγμα). Σε κάθε φρέαρ που περιέχει δείγμα ή απιονισμένο νερό προστίθενται με την χρήση πιπέτας μεταβλητού όγκου 150 mL διαλύματος πυκνού θειικού οξέος 95% w/v. Το οξύ εγχέεται ταχέως ούτως ώστε να επιτευχθεί κατάλληλη ανάμειξη.

Σε καθένα από τα παραπάνω φρέατα προστίθενται, με τη χρήση πιπέτας μεταβλητού όγκου 30 mL υδατικού διαλύματος φαινόλης 5% w/v και με την βοήθεια του ρύγχους της πιπέτας αναμειγνύεται καλά το περιεχόμενο του κάθε φρέατος. Η πλάκα μικροτιτλοδότησης αφήνεται να επιπλεύσει σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 90°C για 10 min. Στη συνέχεια, η πλάκα μικροτιτλοδότησης αφαιρείται από το υδατόλουτρο και τοποθετείται σε απαγωγό, καλύπτεται και αφήνεται να ψηθεί για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, η πλάκα μικροτιτλοδότησης τοποθετείται σε φασματόμετρο υπεριώδους-ορατού και μετράται η απορρόφηση σε κάθε φρέαρ σε μήκος κύματος 490nm. Για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς, ακολουθείται η ακριβώς από πάνω πειραματική διαδικασία αντικαθιστώντας τον όγκο του δείγματος με ίσο όγκο προτύπων διαλυμάτων γλυκόζης συγκεντρώσεων 0, 0,625 mM , 0,125 mM , 0,25 mM , 0,5 mM και 1 mM.



**Εικόνα 24.** Πλάκα μικροτιλοδότησης 96 φρεάτων.

#### 4.1.7. Προσδιορισμός θεικών ιόντων ( $\text{SO}_4^{2-}$ )

Η μέθοδος προσδιορισμού θεικών, είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό μεγάλου εύρους συγκεντρώσεων θεικών ανιόντων ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), με μεγαλύτερη αξιοπιστία σε δείγματα συγκεντρώσεων μέχρι και  $40 \text{ mg / L SO}_4^{2-}$  και ελάχιστο ανιχνεύσιμο όριο περίπου  $1 \text{ mg / L SO}_4^{2-}$ . Τα θεικά ιόντα μετατρέπονται σε εναιώρηματα θεικού βαρίου υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Η προκύπτουσα θολότητα μετριέται σε φασματοφωτόμετρο και η ζητούμενη συγκέντρωση προσδιορίζεται από την καμπύλη πρότυπων θεικών διαλυμάτων.

##### *Συσκευές και Υλικά*

- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Φασματοφωτόμετρο: Για χρήση στα 420 nm με φωτεινή διαδρομή

##### *Αντιδραστήρια*

- Αντιδραστήριο προετοιμασίας
- Χλωριούχο βάριο ( $\text{BaCl}_2$ ): Κρύσταλλοι, 20-30 mesh.
- Διάλυμα ανθρακικού Νατρίου ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ : (περίπου 0,05 N, 2,5g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  αραιωμένα 1L απιονισμένου νερού).
- Πρότυπα θειικά διαλύματα

##### *Πειραματική Διαδικασία*

Για τον προσδιορισμό των θεικών ιόντων παρασκευάζεται διάλυμα συντήρησης. Συγκεκριμένα για την παρασκευή του, προστέθηκαν σε ποτήρι ζέσεως 150 mL απιονισμένου νερού, ακολούθησε αργή προσθήκη 15 mL συμπυκνωμένου HCl, προσθήκη 50 mL 95% αιθανόλης, 37,5 g NaCl, 25 mL γλυκερόλης υπό συνεχή ανάδευση με χρήση συσκευής ανάμιξης Vortex μέχρι την διάλυση των συστατικών.

### Σχηματισμός θολότητας θειικού βαρίου

100 mL δείγματος αραιωμένου ορού μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 250 mL. Ακολουθεί η προσθήκη αντιδραστήριου προετοιμασίας και ανάμιξη σε συσκευή ανάδευσης (Vortex). Ενώ το διάλυμα αναδεύεται, προστίθενται μια μετρούμενη κουταλιά κρυστάλλων BaCl<sub>2</sub>. Από εκείνη τη χρονική στιγμή και ύστερα ξεκινά η μέτρηση του χρονοδιαγράμματος. Το διάλυμα αναδεύεται ακριβώς 1min σε σταθερή ταχύτητα, με τη χρήση της συσκευής ανάμιξης Vortex. Μετά τη λήξη της περιόδου ανάδευσης λαμβάνονται 3 mL διαλύματος με χρήση 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). Τέλος καταγράφεται τη μέγιστη ένδειξη που λήφθηκε κατά την περίοδο των 4 λεπτών. Η απορρόφηση αυτή μετατρέπεται σε περιεκτικότητα SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς, που έχει ήδη κατασκευαστεί με πρότυπα διαλύματα περιεκτικότητας σε SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> από 0 mg/L έως 40 mg/L.

### Προετοιμασία της καμπύλης βαθμονόμησης

Για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> διαλύθηκαν 147,9 mg άνυδρου Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σε ογκομετρική φιάλη του 1L και ακολούθησε η συμπλήρωση με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Το παραπάνω διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ως μητρικό για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων θειικού άλατος. Τα πρότυπα διαλύματα θειικού άλατος κατασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 5 mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 10 mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 20 mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 30 mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 40 mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> και για την μέτρηση τους επαναλήφθηκε η παραπάνω πειραματική διαδικασία.

## 4.2. Ενζυμική αντίδραση

Με την ολοκλήρωση της χημικής ανάλυσης του ορού, ακολούθησε η προετοιμασία του δείγματος για την πραγματοποίηση αντιδράσεων μεταγαλακτοζυλίωσης. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται παράλληλα με την υδρόλυση της λακτόζης του ορού με χρήση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης *Ttbgal1* προερχόμενο από το ανασυνδυασμένο γονιδίωμα του μικροοργανισμού *Thermothielavioides terrestris*, ετερόλογα εκφρασμένο στη ζύμη *Pichia pastoris*. Πρέπει να τονιστεί ότι το σύστημα της ενζυμικής αντίδρασης είναι δυναμικό και οι δύο μορφές δράσεις του ενζύμου πραγματοποιούνται παράλληλα. Για την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης απαραίτητη κρίνεται η ρύθμιση παραμέτρων, με σκοπό την καλύτερη απόδοση του συστήματος. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν δύο: η ενεργότητα του ενζύμου και η συγκέντρωση λακτόζης του ορού. Οι παραπάνω παράμετροι εξετάζονται διεξοδικά προκειμένου να διεξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την βελτιστοποίηση της αντίδρασης, δηλαδή τη μέγιστη κατανάλωση λακτόζης σε συνδυασμό με τη μέγιστη παραγωγή GOS.

### 4.2.1. Ενεργότητα ενζύμου

Για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης, έγινε χρήση της ένωσης ορθο-νιτροφαινυλο-β-D-γαλακτοπυραζόνης (oNPG) ως πρότυπο υπόστρωμα. Η ένωση αυτή αποτελείται από ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο ορθο-νιτροφαινόλης ενωμένα με β-D-γαλακτοζιδικό δεσμό. Η β-γαλακτοζιδάση αναγνωρίζει και υδρολύει το δεσμό αυτό. Το

διάλυμα της oNPG είναι άχρωμο, αλλά με την υδρολυση της oNPG και την απελευθέρωση της oNP, το διάλυμα αποκτά κίτρινο χρώμα, σε αλκαλικές τιμές pH και έτσι είναι δυνατό να ανιχνευθεί η δραστηριότητα της β-γαλακτοζιδάσης φασματομετρικά, κάτι το οποίο δεν μπορεί να συμβεί με το άχρωμο διάλυμα της λακτόζης. Για τη β-γαλακτοζιδάση, ως 1 U ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol oNP ανά λεπτό, σε συνθήκες περίσσειας υποστρώματος oNPG, σε pH 4,5 και θερμοκρασία 50 °C.

#### ***Κατασκευή καμπύλης αναφοράς***

Αρχικά, για την ποσοτικοποίηση της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης, κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς της ορθο-νιτροφαινόλης. Συγκεκριμένα, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα oNP συγκεντρώσεων 0,05-0,6 mM. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 2,7 mL από κάθε πρότυπο διάλυμα oNP και 0,5 mL διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 30% w/v. Για την παρασκευή του τυφλού διαλύματος εντός δοκιμαστικού σωλήνα προστίθενται 2,7 mL απιονισμένου νερού και 0,5 mL διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 30% w/v. Τα προκύπτοντα διαλύματα αναδεύονται καλά με τη βοήθεια συσκευής ανάμιξης Vortex. Για λόγους επαναληψιμότητας, τα παραπάνω διαλύματα παρασκευάζονται εις τριπλούν. Το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων φασματοφωτομετρείται στα 410 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού (Helios a, Unicam, Γερμανία) και κυψελίδας χαλαζία όγκου 3,5 mL. Υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση της oNP στο φωτομετρούμενο διάλυμα και κατασκευάζεται το διάγραμμα της απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσής oNP. Από την προσαρμογή των πειραματικών σημείων σε ευθεία γραμμή τάσης, κατασκευάζεται η ζητούμενη καμπύλη αναφοράς.

#### ***Προσδιορισμός βέλτιστης ενεργότητας ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης***

Στην παρούσα διπλωματική εργασία η ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης *Ttbga1* μελετήθηκε σε εύρος θερμοκρασιών 30-70 °C και τιμών pH 3,0-9,0. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες που τοποθετούνται σε παγόλουτρο προστίθενται 2,5 ml διαλύματος oNPG συγκέντρωσης 0,3 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού ή φωσφορικών με την εκάστοτε τιμή pH. Στο δοκιμαστικό σωλήνα που χρησιμοποιείται ως τυφλό προστίθενται 0,2 ml απιονισμένου νερού και στους υπόλοιπους 0,2 mL ενζύμου, κατάλληλης αραιώσης, έτσι ώστε το υπόστρωμα oNPG να βρίσκεται σε περίσσεια (επιθυμείται η τελική απορρόφηση του φασματοφωτόμετρου να μην ξεπερνά την τιμή 0,300). Μετά την ανάμειξη τους, με τη χρήση της συσκευής Vortex, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο επιθυμητής θερμοκρασίας και με την πάροδο ακριβώς 10 min οι σωλήνες τοποθετούνται ξανά σε πάγο και σε καθέναν από αυτούς προστίθενται 0,5 mL άλατος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 30% w/v. Η χρήση άλατος έχει διττή χρησιμότητα. Αφενός χρησιμοποιείται προκειμένου να μετατοπιστεί το pH του διαλύματος σε τιμή 11 και έτσι να σταματήσει η αντίδραση, αφετέρου διότι το oNP χρωματίζεται κίτρινο σε αλκαλικές περιοχές pH και έτσι υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης του στο φασματοφωτόμετρο. Τελικά, το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων αναδεύεται με τη χρήση συσκευής Vortex και φασματοφωτομετρείται στα 410 nm.

#### 4.2.2. Προεπεξεργασία όξινου ορού

Η προεπεξεργασία του ορού περιλαμβάνει την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης λακτόζης στο υπόστρωμα ορού, καθώς και την κατασκευή των κατάλληλων καμπυλών αναφοράς των σακχάρων. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

##### 4.2.2.1. Συμπύκνωση υπο κενό

Ο όξινος ορός που παραλήφθηκε συμπυκνώθηκε, μέσω του συστήματος συμπύκνωσης με εξάτμιση υπό κενό, (Rotavapor RE 111, Buchi, Ελβετία) σε υποστρώματα υψηλότερης περιεκτικότητας σε λακτόζη. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν 5 διαφορετικές περιεκτικότητες ορού, συμπεριλαμβανομένου και του ανεπεξέργαστου. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δείγματα όξινου ορού περιεκτικότητας λακτόζης 2,83 % w/v, 10% w/v, 15% w/v και 23% w/v.



**Εικόνα 25.** Σύστημα συμπύκνωσης όξινου ορού.

Η πειραματική διάταξη του συστήματος συμπύκνωσης με εξάτμιση υπό κενό, παρουσιάζεται στην παραπάνω εικόνα και αποτελείται από τα εξής μέρη :

- Χοάνη που λειτουργεί ως συνεχής τροφοδοσία του δείγματος στο σύστημα
- Λουτρό του οποίου η θερμοκρασία ρυθμίζεται κατάλληλα για την εξάτμιση του δείγματος, στο οποίο είναι τοποθετημένη η φιάλη συλλογής του συμπυκνώματος
- Ρυθμιστής θερμοκρασίας λουτρού
- Ρυθμιστής ανάδευσης της φιάλης συλλογής του συμπυκνώματος
- Αντλία κενού

- Φιάλη συλλογής ατμού
- Ψυκτήρας τύπου Dimroth
- Παροχή νερού
- Φιάλη συλλογής συμπυκνώματος. Η φιάλη βρίσκεται υπό ανάδευση προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη επιφάνεια επαφής του όξινου ορού με το νερό θέρμανσης και ο βρασμός να είναι ομοιόμορφος.

Το σύστημα λειτουργεί υπό κενό, έτσι ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η συμπύκνωση σε χαμηλές θερμοκρασίες. Στην παρούσα εργασία, ο συμπυκνωτήρας εξάτμισης λειτούργησε υπό κενό σε θερμοκρασία 45°C και με συνεχή ανάδευση στα 100 rpm. Η προτίμηση χαμηλών θερμοκρασιών και υψηλής πίεσης, δικαιολογείται λόγω της θερμοευαισθησίας των συστατικών του ορού (πρωτεΐνες), καθώς και προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανή κρυστάλλωση της λακτόζης. Το κενό δημιουργείται μέσω μιας αντλίας, η οποία είναι συνδεδεμένη με τον ψυκτήρα. Ο ψυκτήρας τύπου Dimroth διαθέτει μια στρόφιγγα, η οποία ανάλογα με τη θέση στην οποία βρίσκεται, επιτυγχάνεται ή όχι το κενό. Ο ψυκτήρας επικοινωνεί μέσω σωλήνα με τη χοάνη, από όπου το δείγμα εισέρχεται στο σύστημα λόγω διαφοράς πίεσης, και καταλήγει στη φιάλη συλλογής του συμπυκνώματος.

#### **4.2.2.2. Καμπύλες αναφοράς σακχάρων**

Για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των περιεχόμενων σακχάρων του ορού με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC), αλλά και των GOS που συντέθηκαν με την ολοκλήρωση της ενζυμικής αντίδρασης, απαραίτητη κρίθηκε η κατασκευή των καμπυλών αναφοράς αυτών. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα γλυκόζης, λακτόζης και ραφινόζης σε περιεκτικότητες 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 και 8% w/v γλυκόζης και λακτόζης και 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4 και 6% w/v ραφινόζης και στη συνέχεια αναλύθηκαν με τη βοήθεια του συστήματος HPLC. Πρέπει να διευκρινιστεί ότι το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε εκκλύει τα σάκχαρα σε διαφορετικό χρόνο ομαδοποιημένα, ανάλογα με τον βαθμό πολυμερισμού τους. Τα σάκχαρα μικρότερου βαθμού πολυμερισμού είναι αυτά τα οποία εκκλύονται σε μικρότερο χρόνο, λόγω του μικρότερου μοριακού τους βάρους. Ακολουθούν σάκχαρα μεγαλύτερου βαθμού πολυμερισμού και επομένως μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Γίνεται λοιπόν, αντιληπτό ότι η ποσοτικοποίηση της κάθε ουσίας ξεχωριστά στο συγκεκριμένο σύστημα HPLC, είναι αδύνατη. Ωστόσο, η ικανότητα διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης των σακχάρων ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού τους, αρκεί για την ανάλυση αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Με βάση τα παραπάνω, διευκρινίζεται πως οι μονοσακχαρίτες, γλυκόζη και γαλακτόζη, εκκλύονται συγχρόνως και θα αναφέρονται μαζί από κοινού. Επίσης, ο δισακχαρίτης του ορού, η λακτόζη, εκκλύεται ταυτόχρονα με γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS) με βαθμό πολυμερισμού 2, όταν και αν αυτοί συντεθούν. Για την ποσοτικοποίηση των GOS με βαθμό πολυμερισμού 3, χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα του τρισακχαρίτη ραφινόζης. Για την ποσοτικοποίηση των GOS βαθμού πολυμερισμού μεγαλύτερου του 3, οι οποίοι εμφανίζονται σε μεταγενέστερο χρόνο από το χρόνο έκλυσης της ραφινόζης, χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς της ραφινόζης. Οι GOS με μεταγενέστερο βαθμό έκλυσης προσμετρήθηκαν τελικά στις συγκεντρώσεις GOS βαθμού πολυμερισμού 3.



#### 4.2.3. Ενζυμική αντίδραση παραγωγής γαλακτοολιγοσακχαριτών

Σε 3 κωνικές φιάλες των 100 mL με εσφυρισμένο χείλος και πώμα φέρονται 60 mL όξινου ορού pH. Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο με ανάδευση, στην επιθυμητή θερμοκρασία αντίδρασης των 60 °C. Ακολουθεί η προσθήκη του ενζύμου για τις τρεις διαφορετικές τιμές ενζυμικής ενεργότητας. Στα χρονικά διαστήματα 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min, 360 min, 420 min, 480 min, 540 min, 600 min και 1440 min πραγματοποιείται δειγματοληψία 3 mL από κάθε κωνική. Τα δείγματα μεταφέρονται σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες με βιδωτό πώμα. Για την απενεργοποίηση του ενζύμου ακολουθεί έντονος βρασμός των δειγμάτων για 10 min. Μετά το πέρας των 10min, οι σωλήνες τοποθετούνται σε παγόλουτρο. Τέλος, τα δείγματα μεταφέρονται σε μικρούς σωλήνες φυγοκεντρήσεως (Eppendorf) και αποθηκεύονται στην κατάψυξη, για την καλύτερη διατήρηση τους μέχρι να αναλυθούν. Οι ενζυμικές ενεργότητες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε συγκέντρωση λακτόζης παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 9.** Σχεδιασμός πειραμάτων ενζυμικής αντίδρασης.

Συγκέντρωση λακτόζης (%w/v)	Ενεργότητα ενζύμου (U/mL)	Θερμοκρασία (T°C)	pH
<b>2,83</b>	1	50	4,5
	1,5		
	2		
	4		
<b>10</b>	0,5		
	1		
	2		
	4		
<b>15</b>	0,5		
	1		
	2		
	4		
<b>23</b>	0,5		
	1		
	2		

#### 4.2.4. Ανάλυση δειγμάτων ενζυμικής αντίδρασης



**Εικόνα 26.** Σύστημα HPLC με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (HPLC-RI).

Οι χρωματογραφικές τεχνικές είναι οι κύριες τεχνικές για τον διαχωρισμό ουσιών με παρόμοιες χημικές ιδιότητες. Ωστόσο πέρα από την διαχωριστική τους ικανότητα, προσφέρονται και για ποσοτική ανάλυση και για το λόγο αυτό οφείλεται και η μεγάλη εξάπλωση τους. Η μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), η οποία και επιλέχθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων του όξινου ορού της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αποτελεί τη πιο δημοφιλή αναλυτική τεχνική για τον διαχωρισμό και τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό σακχάρων στα τρόφιμα. Σαν χρωματογραφική μέθοδος συνδυάζει 2 φάσεις, την στατική φάση ή πληρωτικό υλικό και την κινητή φάση. Η επιτυχία ενός υγρού χρωματογραφικού διαχωρισμού εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δείγματος, ακίνητης φάσης και διαλύτη έκλουσης. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη έκλουσης γίνεται με βάση τη δύναμη ( solvent strength ) και την εκλεκτικότητα (selectivity) του διαλύτη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με την εισαγωγή βελόνας σύριγγας σε περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσης. Η κινητή φάση προωθείται στην στήλη από την αντλία, 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 μετακίνησης 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. Επειδή τα σάκχαρα δεν έχουν χρωμοφόρες ομάδες, δεν απορροφούν επομένως στο UV-VIS χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής το διαθλασίμετρο. Το διαθλασίμετρο είναι πολύ ευαίσθητο στις θερμοκρασιακές αλλαγές και στις αλλαγές σύστασης του διαλύτη και για το λόγο αυτό αποφεύγεται η σταδιακή έκλυση και προτιμάται η ισοκρατική.

Στην διπλωματική εργασία αυτή, χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC (HPLC System Agilent series 1100, Γερμανία) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Refraction Index, RI, Hewlett Packard 1047A, Ιαπωνία) και αντλία (Iso pump G1310A Agilent series 1100, Γερμανία). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Microsorb-MV 100 NH<sub>2</sub> (Agilent Technologies, Γερμανία), συνδεδεμένη με μία προσθήκη ομοίου τύπου Polaris 5 NH<sub>2</sub> MetaGuard (Agilent

Technologies, Γερμανία) για την κατακράτηση πιθανών ακαθαρσιών. Η επιλογή της στήλης και της μεθόδου έγινε σύμφωνα με τους Fischer & Kleinschmidt, (2015), κατά την οποία ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης ακετονιτρίλιο/νερό σε αναλογία 70:30, η ροή του διαλύτη ρυθμίστηκε στα 1,3 mL/min και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Fischer & Kleinschmidt, 2015). Πριν από κάθε σειρά αναλύσεων, γίνεται απαέρωση του διαλύτη σε λουτρό υπερήχων (degasser Hewlett Packard series 1200 G1379B, Ιαπωνία) για χρονικό διάστημα 1 h. Για την ομαλή λειτουργία της στήλης αλλά και την προστασία της, όλα τα δείγματα αρχικά φιλτράρονταν με φίλτρα πορώδους 0,22μm και αραιώνονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις, προκειμένου να μην καταπονείται η στήλη.



## Κεφάλαιο 5. Συζήτηση αποτελεσμάτων

### 5.1. Χημική ανάλυση του ορού

Πρώτη ενότητα της πειραματικής διαδικασίας της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η χημική ανάλυση του όξινου ορού. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε το στερεό υπόλειμμα και η τέφρα του όξινου ορού, οι συγκεντρώσεις των ολικών σακχάρων, των περιεχόμενων σακχάρων (γαλακτόζη, λακτόζη), του γαλακτικού οξέος, των θειικών ανιόντων ( $SO_4^{2-}$ ), των χλωριόντων ( $Cl^-$ ), των ολικών πρωτεϊνών και η περιεκτικότητα του όξινου ορού σε λιπαρά. Οι μέθοδοι, που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό καθενός από τα προαναφερθέντα συστατικά, έχουν περιγραφεί αναλυτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο.

#### 5.1.1. Καμπύλες αναφοράς

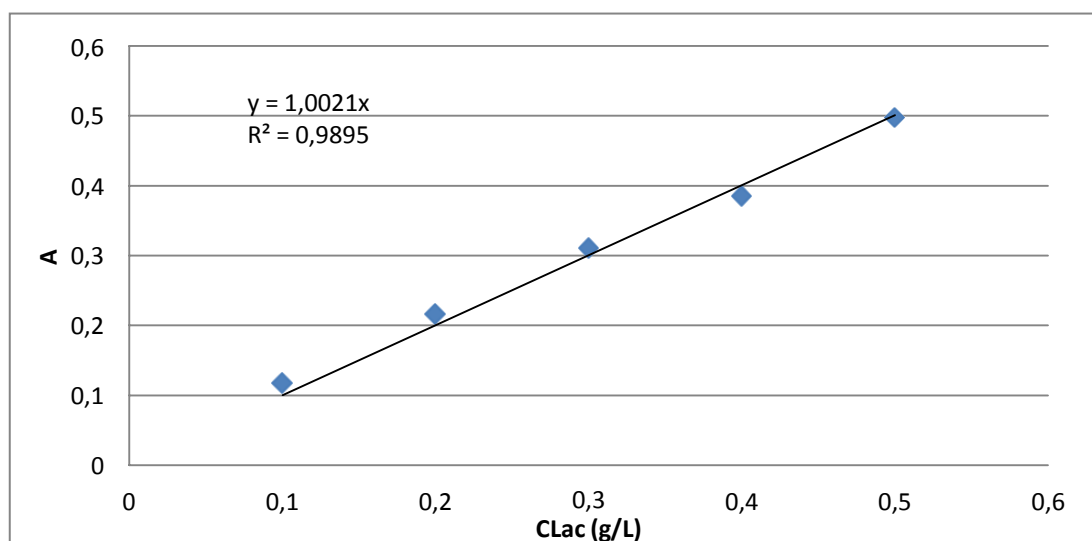
Σε πρώτο στάδιο παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς, οι οποίες κατασκευάστηκαν για την ποσοτικοποίηση των συγκεντρώσεων των συστατικών του όξινου ορού.

##### 5.1.1.1 Καμπύλη αναφοράς του γαλακτικού οξέος

Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς του γαλακτικού οξέος, η οποία κατασκευάστηκε με βάση την τιτλοδοτική μέθοδο που περιγράφηκε στην ενότητα 4. Η εξίσωση που προέκυψε και παρουσιάζεται στη συνέχεια, συνδέει την απορρόφηση στα 390 nm (A) με την συγκέντρωσή γαλακτικού οξέος ( $C_{Lac}$ ):

$$A = 1,0021 \times C_{Lac}$$

Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος αναφέρεται σε g/L.



**Διάγραμμα 1.** Καμπύλη Αναφοράς γαλακτικού οξέος (Lac).

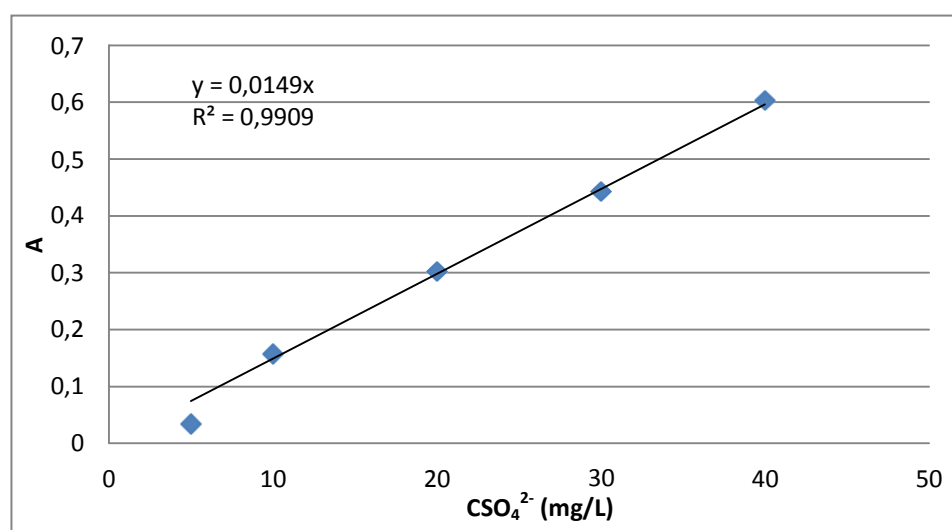
### 5.1.1.2 Καμπύλη αναφοράς των θειικών ανιόντων ( $SO_4^{2-}$ )

Στο διάγραμμα 2 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς των θειικών ανιόντων ( $SO_4^{2-}$ ), η οποία κατασκευάστηκε με βάση την τιτλοδοτική μέθοδο που περιγράφηκε στην ενότητα 4.

Η εξίσωση που προέκυψε συνδέει την απορρόφηση στα 410 nm (A) με τη συγκέντρωση των θειικών ιόντων ( $C_{SO_4^{2-}}$ ):

$$A = 0,0149 \times C_{SO_4^{2-}}$$

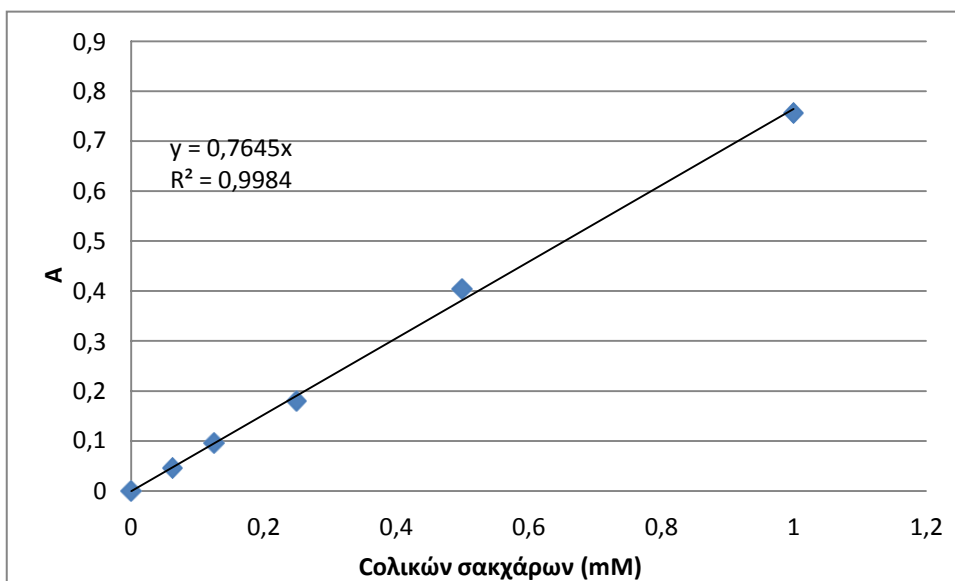
Η συγκέντρωση των θειικών ιόντων αναφέρεται σε mg/L.



**Διάγραμμα 2.** Καμπύλη αναφοράς θειικών ανιόντων ( $SO_4^{2-}$ ).

### 5.1.1.3. Καμπύλη αναφοράς των ολικών σακχάρων

Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς ολικών σακχάρων, όπως αυτοί προσδιορίστηκαν με την φασματοφωτομετρική μέθοδο φαινόλης & θειικού οξέος που περιγράφηκε στην ενότητα 4.



**Διάγραμμα 3.** Καμπύλη αναφοράς ολικών σακχάρων.

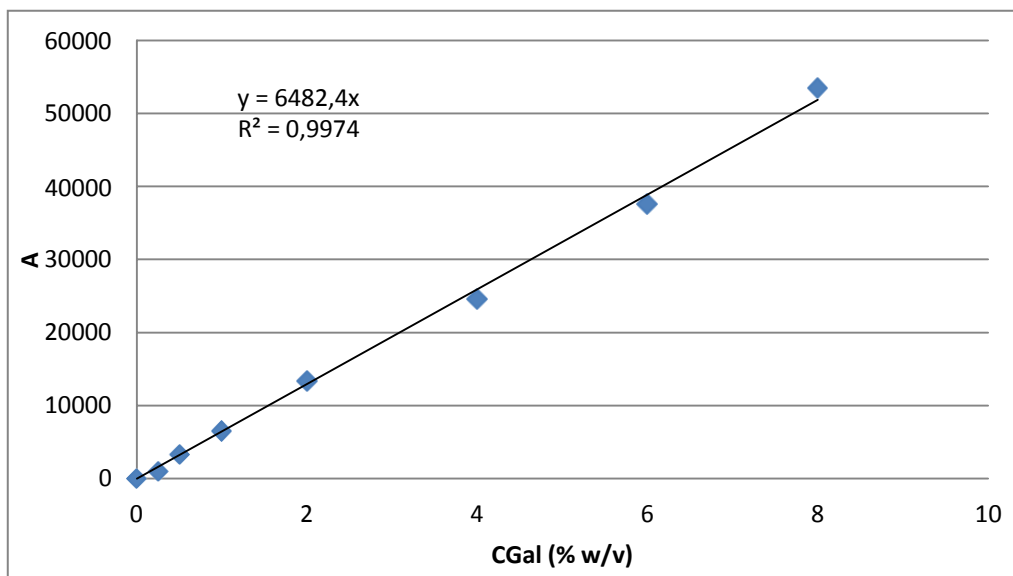
Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, που συνδέει την απορρόφηση στα 490 nm (A) με τη συγκέντρωση ολικών σακχάρων ( $C_{\text{ολικά Σάκχαρα}}$ ), είναι η εξής :

$$A = 0,7645 \times C_{\text{ολικά Σάκχαρα}}$$

Η συγκέντρωση αναφέρεται σε mM.

#### 5.1.1.4 Καμπύλες αναφοράς σακχάρων

Για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των περιεχόμενων σακχάρων του ορού με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC), αλλά και των GOS που συντέθηκαν με την ολοκλήρωση της ενζυμικής αντίδρασης, απαραίτητη κρίθηκε η κατασκευή των καμπυλών αναφοράς αυτών. Οι καμπύλες αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων, καθώς και οι χρόνοι έκλουσης αυτών, παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω. Διευκρινίζεται πως η καμπύλη αναφοράς των μονοσακχαριτών αναφέρεται ως καμπύλη αναφοράς γαλακτόζης, η καμπύλη αναφοράς δισακχαριτών αναφέρεται ως καμπύλη αναφοράς λακτόζης, ενώ η καμπύλη αναφοράς σακχαριτών μεγαλύτερου βαθμού πολυμερισμού αναφέρεται ως καμπύλη αναφοράς ραφινόζης.

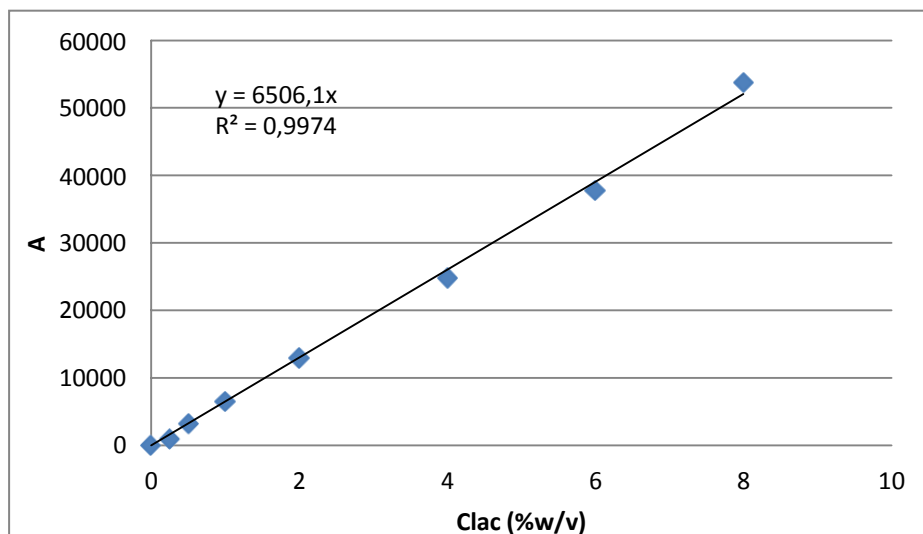


**Διάγραμμα 4.** Καμπύλη αναφοράς γαλακτόζης (Gal).

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που συνδέει το εμβαδόν της καμπύλης έκλουσης της γαλακτόζης με τη συγκέντρωση γαλακτόζης παρουσιάζεται παρακάτω:

$$A = 6482,4 \times C_{Gal}$$

Η συγκέντρωση της γαλακτόζης αναφέρεται σε % w/v.



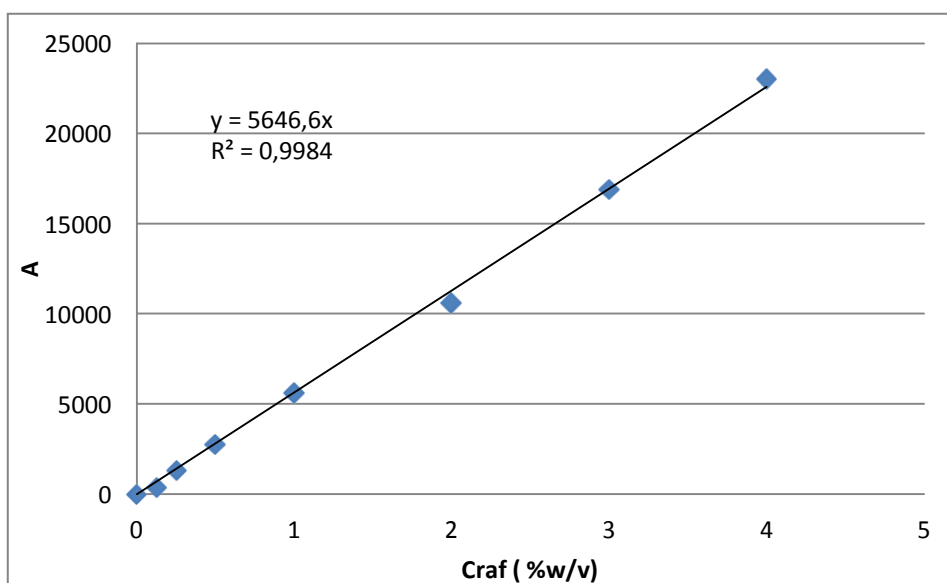
**Διάγραμμα 5.** Καμπύλη αναφοράς λακτόζης (lac).

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που συνδέει το εμβαδόν της καμπύλης έκλουσης της λακτόζης με τη συγκέντρωση της λακτόζης παρουσιάζεται παρακάτω:

$$A = 6506,1 \times C_{lac}$$

Η συγκέντρωση της λακτόζης αναφέρεται σε % w/v.





**Διάγραμμα 6.** Καμπύλη αναφοράς ραφινόζης (raf).

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που συνδέει το εμβαδόν της καμπύλης έκλουσης της λακτόζης με τη συγκέντρωση της λακτόζης παρουσιάζεται παρακάτω:

$$A = 5646,6 \times C_{raf}$$

Η συγκέντρωση της λακτόζης αναφέρεται σε % w/v.

Στον πίνακα 10, παρουσιάζονται οι χρόνοι έκλουσης των πρότυπων σακχάρων, όπως αυτοί μετρήθηκαν μέσω της μεθόδου της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

**Πίνακας 10.** Χρόνοι έκλουσης πρότυπων σακχάρων μέσω της μεθόδου της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

Σάκχαρα	Χρόνοι Έκλουσης
Γαλακτόζη (galactose)	5,50
Λακτόζη (lactose)	7,50
Ραφινόζη (raffinose)	9,29

### 5.1.2. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης του όξινου ορού γιαουρτιού

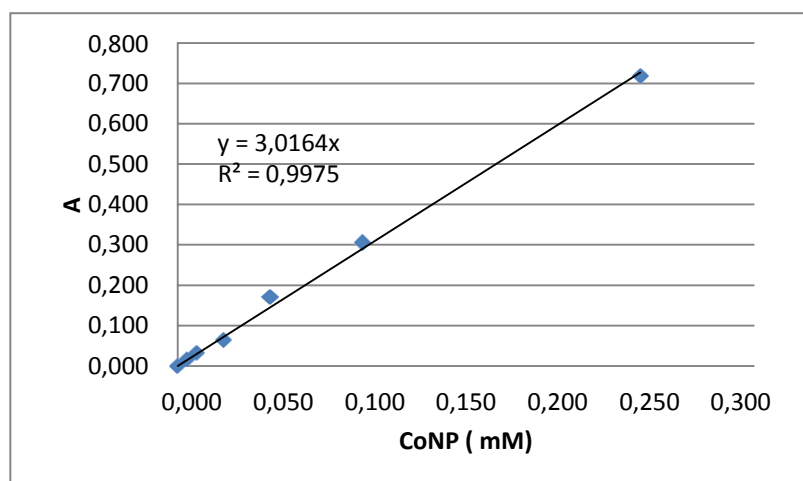
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για του πλήρη χαρακτηρισμό της χημικής σύστασης του ορού και των καμπυλών αναφοράς που κατασκευάστηκαν. Τα παρακάτω αποτελέσματα παρουσιάζουν συνάφεια με τον Πινακά 2 της βιβλιογραφίας, με τιμές ίδιας τάξης μεγέθους (Fischer & Kleinschmidt, 2015). Οι αποκλίσεις οφείλονται αφενός στις διαφορετικές μεθόδους χημικής ανάλυσης που μπορεί να χρησιμοποιήθηκαν και αφετέρου στη διαφορετική προέλευση του όξινου ορού που συγκρίνεται.

**Πίνακας 11.** Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης όξινου ορού.

<b>Ολικά σάκχαρα (% w/v )</b>	2,84 ± 0,36
<b>Λακτόζη (% w/v)</b>	2,83 ± 0,11
<b>Γαλακτόζη (%w/v)</b>	0,70 ± 0,01
<b>Ολικά στερεά (% w/w )</b>	5,13 ± 0,01
<b>Τέφρα (% w/w)</b>	0,71 ± 0,04
<b>Γαλακτικό οξύ (g/L)</b>	1,32 ± 0,05
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mg/L)</b>	94,0 ± 5,07
<b>Cl<sup>-</sup> (% w/v)</b>	0,92 ± 0,13
<b>Πρωτεΐνες (% w/w)</b>	0,35 ± 0,05
<b>Λιπαρά (% w/w)</b>	0,05 ± 0,023

## 5.2. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας του ενζύμου *Ttbgal1* από το μικροοργανισμό *Thermothielavioides terrestris*

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης *Ttbgal1* κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με τη χρήση ορθο-νιτροφαινόλης.



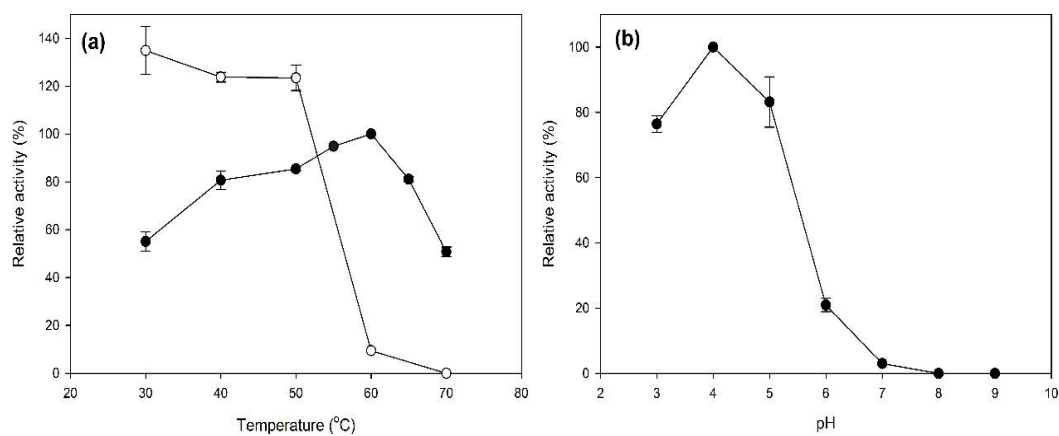
**Διάγραμμα 7.** Καμπύλη αναφοράς οNP.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, που συνδέει την απορρόφηση στα 490 nm (A) με τη συγκέντρωση ορθο-νιτροφαινόλης, είναι η εξής :

$$A = 3,0164 \times C_{oNP}$$

Η συγκέντρωση αναφέρεται σε mM.

Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών δράσης της β-γαλακτοζιδάσης *Ttbgal1*, προηγήθηκε η μελέτη της ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες και τιμές pH, η οποία πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



**Εικόνα 27.** (a) Διάγραμμα σχετικής ενεργότητας συναρτήσεως της θερμοκρασίας, όπου •σχετική ενεργότητα συναρτήσεως της θερμοκρασίας, όπου ◦ σχετική ενεργότητα στην αντίστοιχη θερμοκρασία μετά από επώαση του ενζύμου για 24 h. (b) Διάγραμμα σχετικής ενεργότητας συναρτήσεως του pH.

Με βάση το διάγραμμα (a), η βέλτιστη δραστηριότητα του *TtbGal1* σε εύρος θερμοκρασιών 30-70 °C παρατηρήθηκε στη θερμοκρασία των 60 °C. Το ένζυμο αυτό χαρακτηρίζεται θερμοσταθερό, καθώς πάνω από το 80% της δραστηριότητας του διατηρείται σε εύρος θερμοκρασίας 30-50 °C. Τα παραπάνω έρχονται σε συμφωνία με τις βιβλιογραφικές αναφορές που αναφέρονται στις μυκητιακές β-γαλακτιζιδάσες. Επιπλέον, το *TtbGal1* διατηρεί σχεδόν πλήρως τη δραστηριότητά του μετά από 24ωρη επώαση σε θερμοκρασίες έως 50 °C σε τιμή pH 4,5. Ωστόσο, η δραστηριότητα του μειώνεται σημαντικά μετά από 24h επώασης σε 60 °C ή περισσότερο. Για το λόγο αυτό, ως βέλτιστη θερμοκρασία επιλέχθηκε αυτή των 50 °C. Η βέλτιστη δραστηριότητα του *TtbGal1* σε εύρος pH 3-9 παρατηρήθηκε στην τιμή 4, ενώ η δραστηριότητα του μειώνεται σημαντικά σε τιμή pH υψηλότερη του 6. Τελικά επιλέχθηκε η τιμή pH 4,5 η οποία έρχεται σε συμφωνία με το pH του όξινου ορού.

### 5.3. Αποτελέσματα ενζυμικών αντιδράσεων

Ακολουθεί η αναλυτική παρουσίαση και σχολιασμός των αποτελεσμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων, που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν η επίδραση του ενζυμικού φορτίου και η επίδραση της συγκέντρωσης της λακτόζης στο αντιδρών μείγμα του ορού συναρτήσει του χρόνου ενζυμικής αντίδρασης.

#### 5.3.1. Επίδραση του ενζυμικού φορτίου της β-γαλακτοζιδάσης στην παραγωγή των GOS

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του ενζυμικού φορτίου της β-γαλακτοζιδάσης στην ενζυμική αντίδραση μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS. Σε αρχικό σχεδιασμό, θα χρησιμοποιούνταν οι εξής ενεργότητες του ενζύμου: 1 U/mL, 1,5 U/mL και 2 U/mL. Ωστόσο, επειδή διαπιστώθηκε πως το εύρος των ενεργοτήτων 1-2 U/mL ήταν μικρό,

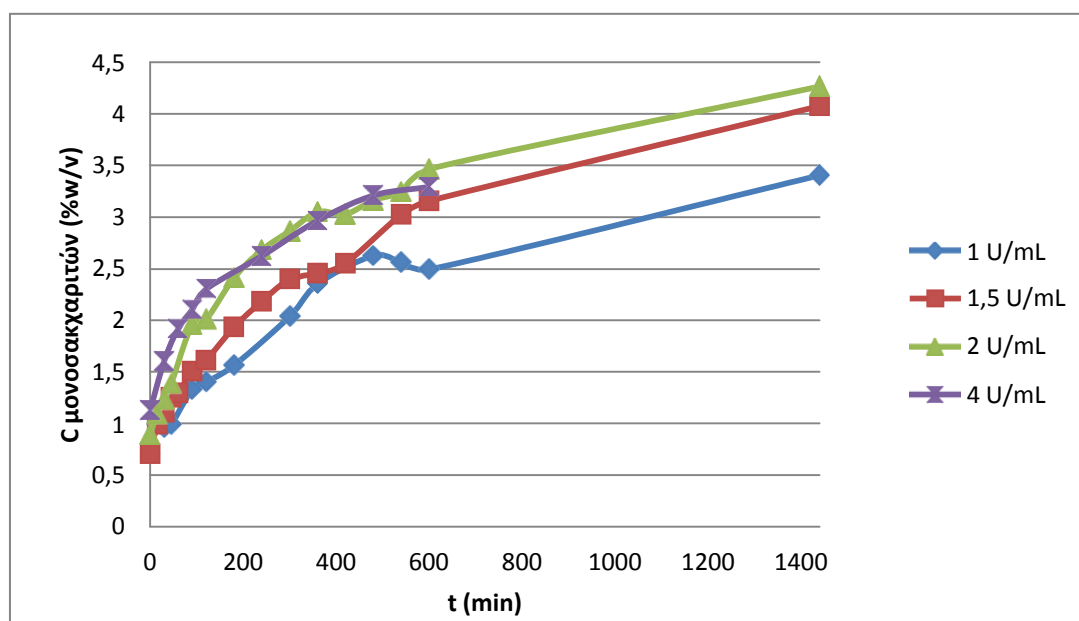
χωρίς να οδηγεί σε μεγάλες διαφοροποιήσεις, το εύρος ενεργοτήτων αυξήθηκε σε 0,5-4 U/mL. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 50 °C και σε τιμή pH 4,5 που είναι και η τιμή pH του όξινου ορού, οι οποίες είναι οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του μελετώμενου ενζύμου, σύμφωνα με την προκαταρκτική μελέτη που παρουσιάστηκε παραπάνω. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αναφορικά με την επίδραση της ενζυμικής ενεργότητας για κάθε τιμή συγκέντρωσης της λακτόζης του υποστρώματος.

### 5.3.1.1 Όξινος ορός με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 2,83% w/v

Το πρώτο πείραμα το οποίο πραγματοποιήθηκε ήταν η ενζυμική αντίδραση όξινου ορού αρχικής περιεκτικότητας λακτόζης 2,83 % w/v .

Μεταβολή συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών

Αρχικά, παρουσιάζεται το διαγράμματα μεταβολής της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών (γλυκόζης και γαλακτόζης αθροιστικά) στο αντιδρών μείγμα, συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης.



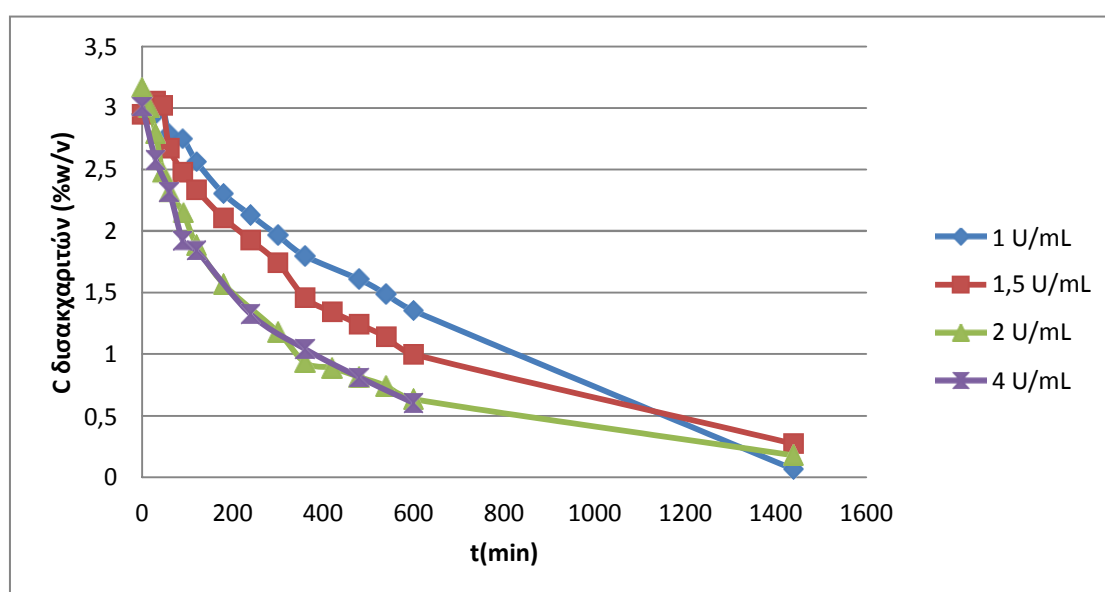
**Διάγραμμα 8.** Μεταβολή συγκέντρωσης μονοσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση όξινου ορού σε λακτόζη 2,83 % w/v.

Στο διάγραμμα 8, στην περίπτωση του όξινου ορού αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης 2,83% w/v και στις 4 ενζυμικές ενεργότητες παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου. Σε μικρούς χρόνους, οι συγκεντρώσεις των μονοσακχαριτών αυξάνονται ταχέως, άρα ευνοείται η αντίδραση της υδρόλυσης της λακτόζης σε μόρια γλυκόζης και γαλακτόζης. Σε μεγαλύτερους χρόνους, άνω των 600 min, η κλίση της καμπύλης των συγκεντρώσεων των μονοσακχαριτών μειώνεται. Συγκεκριμένα, η λακτόζη, με το πέρασμα του χρόνου πέρα από της υδρόλυση της σε μόρια γλυκόζης και γαλακτόζης, ολιγομερίζεται, μέσω της αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης προς την παραγωγή GOS, με αποτέλεσμα η αύξηση της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών να πραγματοποιείται με μειούμενη τάση. Επιπλέον, η υδρόλυσης επιβραδύνεται, καθώς μεγάλο μέρος της αρχικής λακτόζης έχει καταναλωθεί με το πέρασμα του χρόνου. Ωστόσο στο διάγραμμα 8, παρατηρείται πως παρά το γεγονός της χαμηλής συγκέντρωσης λακτόζης

στο υπόστρωμα του ορού, η αύξηση των μονοσακχαριτών, άρα και η υδρόλυση της λακτόζης συνεχίζεται μέχρι το πέρας των 1440 min. Η μέγιστη συγκέντρωση μονοσακχαριτών παρατηρείται στα 2 U/mL και έχει τιμή 4,26 % w/v σε χρόνο 1440 min. Η αύξηση των ενζυμικών ενεργοτήτων προκαλεί ταχύτερη αύξηση των συγκεντρώσεων των μονοσακχαριτών, υψηλότερο ποσοστό υδρόλυσης, άρα και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μονοσακχαριτών στο πέρας της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, 3,4, 4,07 και 4,26% w/v για 0,5, 1 και 2 U/mL αντίστοιχα.

#### Μεταβολή συγκέντρωσης των δισακχαριτών

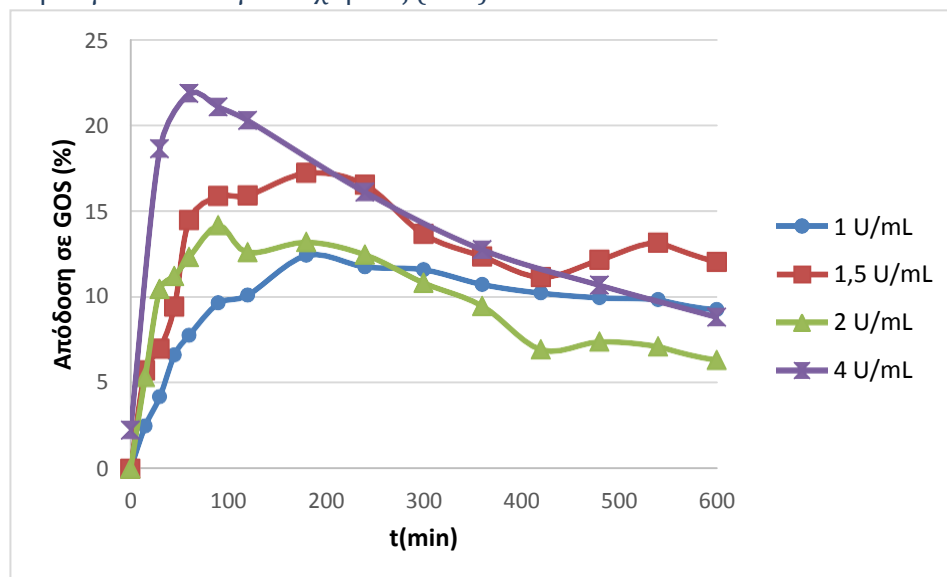
Στην έναρξη της αντίδρασης ο μοναδικός δισακχαρίτης, ο οποίος εντοπίζεται στο αντιδρών μείγμα είναι η λακτόζη, η οποία αποτελεί και το υπόστρωμα της αντίδρασης. Στη πορεία της αντίδρασης η λακτόζη, παράλληλα με την υδρόλυσή της, ολιγομερίζεται, λόγω της δράσης του ενζύμου, σχηματίζοντας GOS.



**Διάγραμμα 9.** Μεταβολή συγκέντρωσης δισακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση όξινου ορού σε λακτόζη 2,83 % w/v.

Για αρχική συγκέντρωση ορού σε λακτόζη 2,83% w/v, παρατηρείται και για τις τέσσερις διαφορετικές ενεργότητες ενζύμου που χρησιμοποιήθηκαν, ταχεία μείωση της λακτόζης στο αντιδρών μείγμα του ορού. Η λακτόζη, είτε υδρολύεται προς το σχηματισμό των μονοσακχαριτών (γλυκόζης και γαλακτόζης), είτε ολιγομερίζεται, μέσω της αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης προς την παραγωγή GOS. Από το διαγράμμα 9 γίνεται αντιληπτό, πως η λακτόζη καταναλώνεται γρηγορότερα σε υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα. Εξαιρέση αποτελεί η καμπύλη των 4 U/mL, που δεν παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση από την καμπύλη των 2 U/mL. Συμπεραίνεται λοιπόν, πως σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος λακτόζης, η βέλτιστη ενεργότητα του ενζύμου έχει τιμή κοντά στα 2 U/mL, δεδομένου ότι μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας δεν οδηγούν σε υψηλότερα ποσοστά υδρόλυσης της λακτόζης. Μετά το πέρας των 1440 min της αντίδρασης, η λακτόζη έχει καταναλωθεί πλήρως και για τις 4 ενζυμικές ενεργότητες.

## Απόδοση σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)



**Διάγραμμα 10.** Μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση όξινου ορού σε λακτόζη 2,83 % w/v.

Στο διάγραμμα 10, παρουσιάζεται η μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS), συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 2,83% w/v για τις 4 διαφορετικές ενεργότητες του ενζύμου. Ως GOS ορίζονται τα παραγόμενα σάκχαρα, πλην της λακτόζης, με βαθμό πολυμερισμού μεγαλύτερο ή ίσου του 2. Ωστόσο, λόγω αδυναμίας διαχωρισμού των παραγόμενων δισακχαριτών διαφορετικών της λακτόζης (π.χ. γαλακτοβιόζη) από την ακολουθούμενη μέθοδο HPLC, στην παρούσα διπλωματική εργασία θεωρήθηκαν ως GOS τα παραγόμενα σάκχαρα με βαθμό πολυμερισμού μεγαλύτερο ή ίσου του 3. Και στις 4 ενεργότητες, παρατηρείται αύξηση της απόδοσης σε GOS στο μείγμα μέχρι την επίτευξη μίας μέγιστης τιμής. Στη συνέχεια, η απόδοση σε GOS στο αντιδρών μείγμα μειώνεται, λόγω της υδρόλυσης τους από το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης. Όσον αναφορά την ενζυμική αντίδραση με ενεργότητα ενζύμου 1 U/mL, η καμπύλη παρουσιάζει μέγιστη απόδοση σε GOS σε χρόνο 180 min και τιμή 12,4%. Με την αύξηση της ενεργότητας στα 1,5 U/mL, η μέγιστη απόδοση αυξάνεται στην τιμή 17,2% στον ίδιο χρόνο. Για ενεργότητα 2 U/mL παρουσιάζεται μέγιστη απόδοση σε GOS σε χρόνο 90 min και τιμή 14,2%. Η αύξηση της ενεργότητας από 1,5 σε 2 U/mL μείωσε τον απαιτούμενο χρόνο για την επίτευξη της μέγιστης απόδοσης σε GOS στον μισό, δεν οδήγησε όμως σε μεγαλύτερα ποσοστά σχηματισμού GOS. Με την αύξηση της ενεργότητας στα 4 U/mL, εμφανίζεται ολικό μέγιστο 21,8% σε χρόνο 60 min. Ο τετραπλασιασμός λοιπόν της ενζυμικής ενεργότητας από το 1 στα 4 U/mL, οδήγησε σε αύξηση της μέγιστης απόδοσης σε GOS κατά 0,75 φορές και υποοκταπλασίασε τον απαιτούμενο χρόνο επίτευξης της μέγιστης απόδοσης. Συμπερασματικά, η 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 της απόδοσης αυτής ή και σε συνδυασμό των δύο παραπάνω.

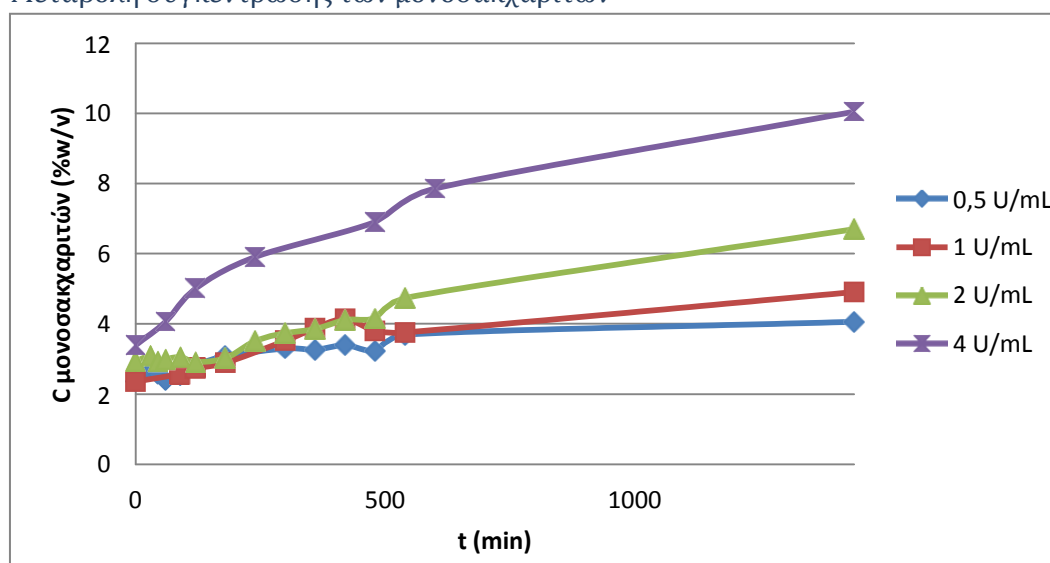
Συνοψίζοντας, από τα παραπάνω διαγράμματα 8, 9 και 10, εξάγουμε τα εξής πορίσματα για την πορεία της ενζυμικής αντίδρασης για το αντιδρών μείγμα αρχικής περιεκτικότητας

σε λακτόζη 2,83% w/v. Με την έναρξη της ενζυμικής αντίδρασης, η συγκέντρωση της λακτόζης μειώνεται, ενώ έχουμε παράλληλα αύξηση της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών και των GOS. Η ενζυμική αντίδραση προκαλεί ταυτόχρονη υδρόλυση αλλά και ολιγομερισμό της λακτόζης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS), μέσω της αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης. Οι αντιδράσεις υδρόλυσης και μεταγαλακτοζυλίωσης λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη παραγωγή μονοσακχαριτών και GOS. Η λακτόζη καταναλώνεται στον άξονα του χρόνου, με αποτέλεσμα τον τερματισμό της αντίδρασης της υδρόλυσης στο πέρας των 1440 min. Ταυτόχρονα, η συγκέντρωση των GOS μειώνεται μετά την επίτευξη της μέγιστης τιμής τους, καθώς το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση υδρολύει τους GOS σε μονοσακχαρίτες.

### 5.3.1.2 Όξινος ορός με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 10% w/v

Με την συμπύκνωση του ορού, επιτυγχάνεται η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της λακτόζης στα 10% w/v. Στο διάγραμμα 11, παρουσιάζονται οι ενζυμικές αντιδράσεις σε υπόστρωμα συμπυκνωμένου όξινου ορού με αρχική συγκέντρωση σε λακτόζη 10% w/v, χρησιμοποιώντας 4 διαφορετικές τιμές ενεργοτήτων, 0,5 U/mL, 1 U/mL, 2 U/mL και 4 U/mL.

Μεταβολή συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών

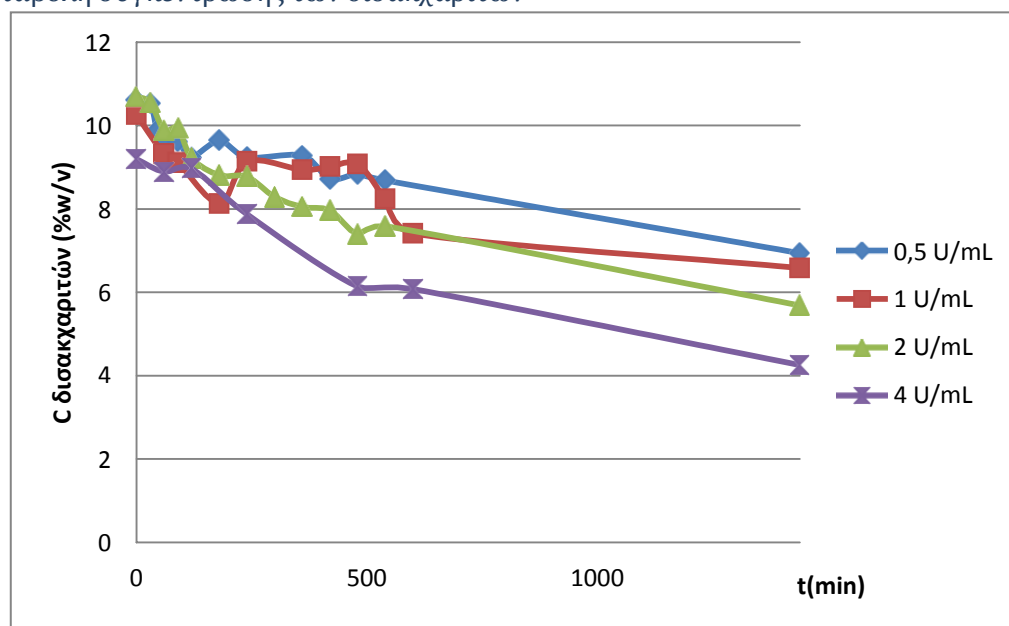


**Διάγραμμα 11.** Μεταβολή συγκέντρωσης μονοσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση όξινου ορού σε λακτόζη 10 % w/v.

Στο διάγραμμα 11, παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών. Για ενεργότητες ενζύμου 0,5 U/mL, 1 U/mL, 2 U/mL και 4 U/mL, η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών φτάνει σε τελικές συγκεντρώσεις 4,06% w/v, 4,90% w/v, 6,70% w/v και 10,1% w/v αντίστοιχα. Η μέγιστη συγκέντρωση μονοσακχαριτών εντοπίζεται στη μεγαλύτερη ενεργότητα του ενζύμου. Η αύξηση λοιπόν του ενζυμικού φορτίου, ευνοεί και σε αυτήν την περίπτωση την αντίδραση της υδρόλυσης της λακτόζης, με αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεων των μονοσακχαριτών στο αντιδρών μείγμα.



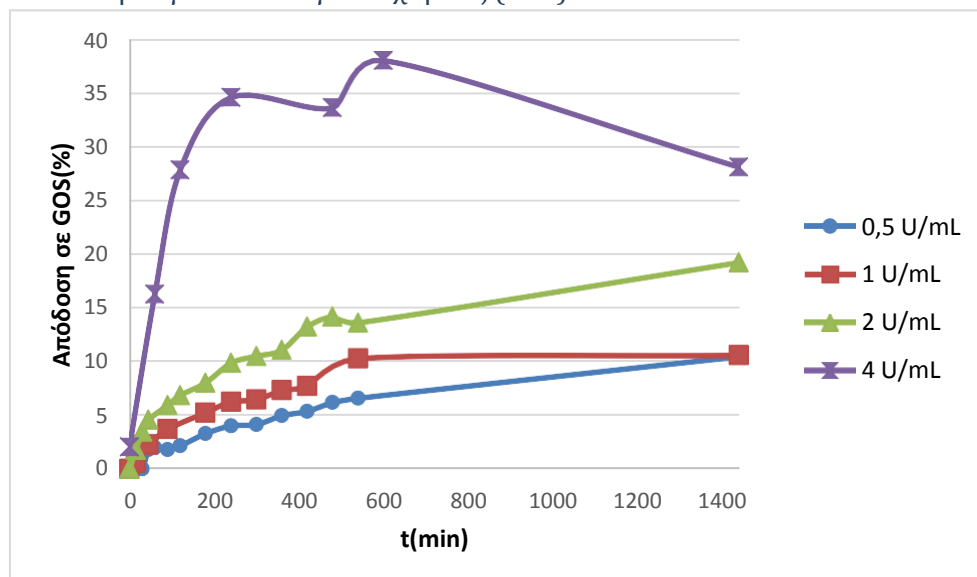
## Μεταβολή συγκέντρωσης των δισακχαριτών



**Διάγραμμα 12.** Μεταβολή συγκέντρωσης δισακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση όξινου ορού σε λακτόζη 10 % w/v.

Στο διάγραμμα 12, αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης 10% w/v στο αντιδρών μείγμα παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης της λακτόζης συναρτήσει του χρόνου. Η λακτόζη είτε υδρολύεται σε γλυκόζη και γαλακτόζη, είτε ολιγομερίζεται για την σύνθεση GOS. Παρατηρείται και για τις 4 ενεργότητες, πως η συγκέντρωση λακτόζης δεν εξαντλείται μετά το πέρας των 1440 min. Συγκεκριμένα, για ενεργότητες του ενζύμου 0,5 και 1 U/mL η απομένουσα συγκέντρωση της λακτόζης παίρνει τιμές 6,93% w/v και 6,58% w/v, αντίστοιχα, ενώ για 2 U/mL η λακτόζη λαμβάνει τελική τιμή 5,69% w/v. Στην μεγαλύτερη ενζυμική ενεργότητα των 4 U/mL, η τελική συγκέντρωση της λακτόζης έχει τιμή 4,25% w/v. Συμπερασματικά, σε υψηλές συγκεντρώσεις λακτόζης στο αντιδρών μείγμα, οι χαμηλές ενεργότητες ενζύμου, οδηγούν σε μη ικανοποιητικό ποσοστό υδρόλυσης ή ολιγομερισμού, ή απαιτούν υψηλότερους χρόνους αντίδρασης για την επίτευξη μεγαλύτερου ποσοστού κατανάλωσης της λακτόζης. Επίσης παρατηρείται ότι με την αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου, η τελική συγκέντρωση λακτόζης μειώνεται. Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί ωστόσο να υποδηλώνουν την ύπαρξη δισακχαριτών GOS στο αντιδρών μείγμα στο πέρας της αντίδρασης, οι οποίοι προσμετρούνται στη συγκέντρωση της λακτόζης.

### Απόδοση σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)



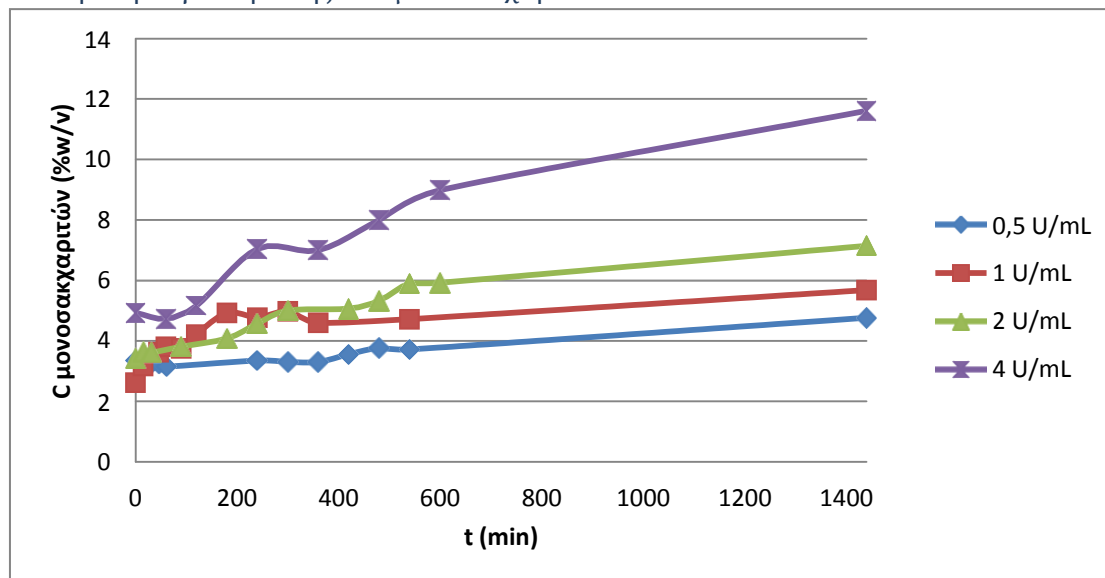
**Διάγραμμα 13.** Μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση όξινου ορού σε λακτόζη 10 % w/v.

Στο διάγραμμα 13, παρουσιάζεται η μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική περιεκτικότητα λακτόζης 10% w/v για τις 4 διαφορετικές ενεργότητες. Για ενεργότητες 0,5 U/mL, 1 U/mL και 2 U/mL τα μέγιστα ποσοστά απόδοσης σε GOS είναι 10,5%, 10,6% και 19,2%, αντίστοιχα σε χρόνο 1440 min. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό, πως το μέγιστο ποσοστό σύνθεσης σε GOS δεν έχει επιτευχθεί μετά το πέρας των 1440 min, καθώς η καμπύλη της απόδοσης σε GOS συναρτήσει του χρόνου εξακολουθεί να είναι αύξουσα. Με την αύξηση της ενεργότητας στα 4 U/mL, παρατηρείται μέγιστη απόδοση σε GOS 38,0% σε χρόνο 600 min. Ο οκταπλασιασμός του ενζυμικού φορτίου από τα 0,5 U/mL στα 4 U/mL, οδήγησε στην αύξηση της μέγιστης απόδοσης σε GOS κατά 2,6 φορές και μείωση του απαιτούμενου χρόνου επίτευξης του ποσοστού αυτού. Η χρήση μεγαλύτερων ενεργοτήτων κρίνεται απαραίτητη, καθώς αφενός οδηγούν σε μεγαλύτερες αποδόσεις σε GOS, αφετέρου μειώνουν τον απαιτούμενο χρόνο επίτευξης της μέγιστης απόδοσης σε GOS. Από τα διαγράμματα 11, 12 και 13 εξάγουμε τα εξής πορίσματα για την πορεία της ενζυμικής αντίδρασης για το αντιδρών μείγμα αρχικής περιεκτικότητας σε λακτόζη 10% w/v. Ο συνδυασμός υψηλής συγκέντρωσης αρχικής λακτόζης στο αντιδρών μείγμα και των χαμηλών ενεργοτήτων του ενζύμου οδηγεί σε χαμηλότερα ποσοστά υδρόλυσης του ενζύμου και κατά επέκταση της απόδοσης των GOS. Παρατηρείται, πως στις τρεις χαμηλότερες ενεργότητες, 0,5 U/mL, 1 U/mL, 1,5 U/mL, οι καμπύλες απόδοσης δεν φτάνουν στην μέγιστη τιμή τους, πριν το τέλος των 1440 min. Με την αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου, τα ποσοστά υδρόλυσης και ολιγομερισμού της λακτόζης αυξάνονται, με αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεων των μονοσακχαριτών και των GOS στο αντιδρών μείγμα.

### 5.3.1.3 Όξινο ορό με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 15% w/v

Με περαιτέρω συμπύκνωση επιτυγχάνεται η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της λακτόζης στα 15% w/v. Χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικές τιμές ενεργοτήτων 0,5 U/mL, 1 U/mL, 2 U/mL και 4 U/mL.

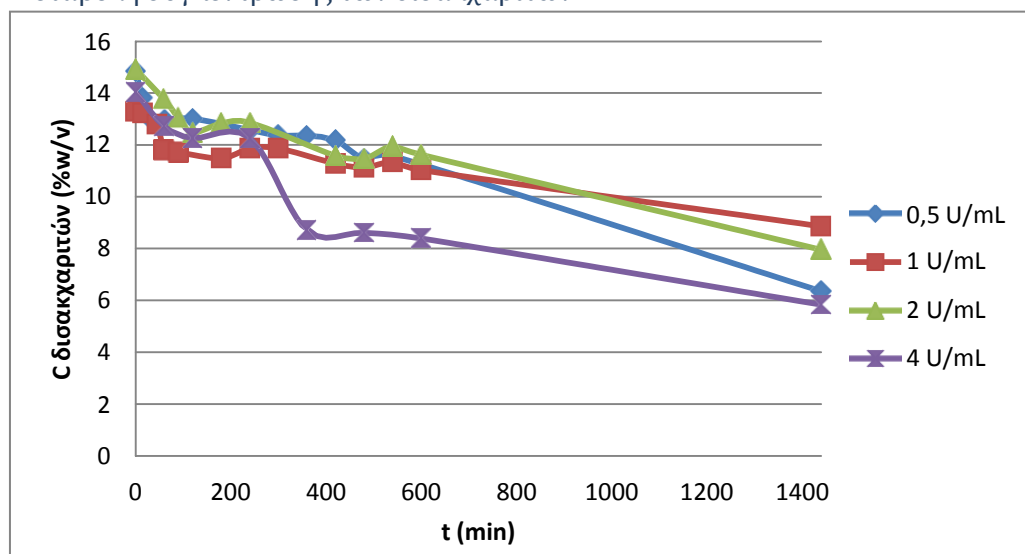
Μεταβολή συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών



**Διάγραμμα 14.** Μεταβολή συγκέντρωσης μονοσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση όξινου ορού σε λακτόζη 15 % w/v.

Στο Διάγραμμα 14, παρατηρείται επίσης αύξηση της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου. Για ενεργότητες 0,5 U/mL, 1 U/mL, 2 U/mL και 4 U/mL του ενζύμου, η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών στο πέρας της αντίδρασης είναι 4,76% w/v, 5,67% w/v, 7,14% w/v και 11,6% w/v αντίστοιχα. Είναι εμφανές και σε αυτή την περίπτωση, πως η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας οδηγεί σε παραγωγή μονοσακχαριτών υψηλότερης συγκέντρωσης.

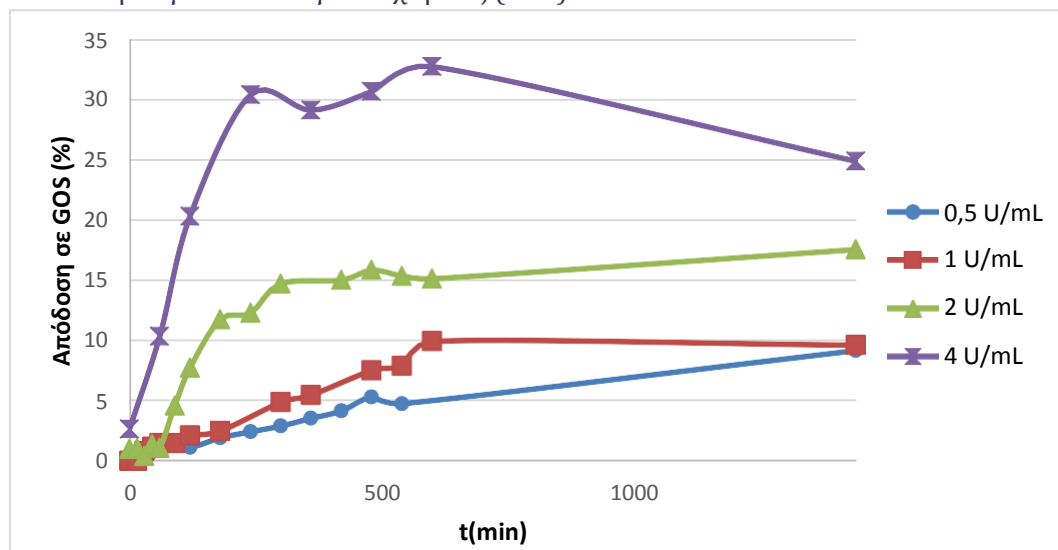
### Μεταβολή συγκέντρωσης των δισακχαριτών



**Διάγραμμα 15.** Μεταβολή συγκέντρωσης δισακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση όξινου ορού σε λακτόζη 15 % w/v.

Στο διάγραμμα 15, για αρχική περιεκτικότητα λακτόζης 15% w/v στο αντιδρών μείγμα παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης της λακτόζης συναρτήσει του χρόνου. Για ενεργότητες 0,5 U/mL, 1 U/mL, 2 U/mL και 4 U/mL του ενζύμου του διαγράμματος 15, η συγκέντρωση λακτόζης που λαμβάνεται στο πέρας της αντίδρασης είναι 6,36% w/v, 8,86% w/v, 7,95% w/v και 5,83% w/v αντίστοιχα. Με βάση τις τελικές συγκεντρώσεις των μονοσακχαριτών, οι οποίες αυξάνονταν με την αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου, αναμενόταν και αντίστοιχη μείωση της συγκέντρωσης των δισακχαριτών στην περίπτωση που υπήρχε μόνο ο δισακχαρίτης της λακτόζης στο αντιδρών μείγμα, όμως κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται. Αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη δισακχαριτών GOS στο αντιδρών μείγμα στο πέρας της αντίδρασης.

### Απόδοση σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)



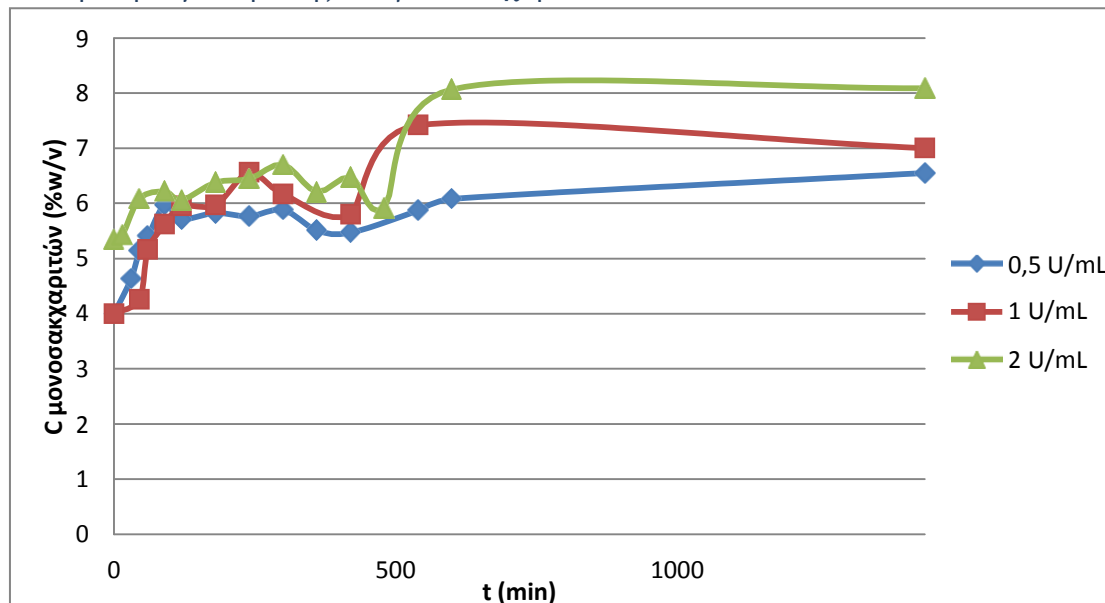
**Διάγραμμα 16.** Μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση όξινου ορού σε λακτόζη 15 % w/v.

Στο παραπάνω διάγραμμα, παρουσιάζεται η μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 15% w/v για τις 4 διαφορετικές ενζυμικές ενεργότητες. Για ενεργότητα 0,5 U/mL η μέγιστη απόδοση σε GOS εντοπίζεται σε χρόνο 1440 min και έχει τιμή 9,15%. Με τον διπλασιασμό της ενεργότητας σε 1 U/mL η μέγιστη απόδοση σε GOS αυξάνεται λαμβάνοντας τιμή 9,91% σε χρόνο 600 min. Με περαιτέρω διπλασιασμό της ενεργότητας στα 2 U/mL η μέγιστη απόδοση σε GOS εντοπίζεται ξανά στα 1440 min και έχει τιμή 17,5%. Η μέγιστη απόδοση σε GOS επιτυγχάνεται στην μεγαλύτερη ενζυμική ενεργότητα, τα 4 U/ mL, σε χρόνο 600 min και τιμή 32,7%. Όπως γίνεται αντιληπτό, η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας προκαλεί αύξηση της απόδοσης σε GOS και στην περίπτωση των 4 U/mL παρουσιάζει και ταυτόχρονη μείωση του απαιτούμενου χρόνου επίτευξης της απόδοσης αυτής. Γίνεται αντιληπτό, πως με εξαίρεση τα 1 U/mL και 4 U/mL, η απόδοση των GOS δεν φτάνει στη μέγιστη τιμή της σε χρόνο 1440 min, γεγονός που υποδηλώνει πως οι υψηλές συγκεντρώσεις λακτόζης στο αντιδρών μείγμα, απαιτούν και αντίστοιχα υψηλότερες ενεργότητες ενζύμου, προκειμένου να επιτευχθούν υψηλά ποσοστά σύνθεσης GOS σε μικρότερους χρόνους.

### 5.3.1.4 Όξινος ορός με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 23% w/v

Με περαιτέρω συμπύκνωση επιτυγχάνεται η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της λακτόζης στα 23% w/v. Χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικές τιμές ενεργοτήτων 0,5 U/mL, 1 U/mL και 2 U/mL.

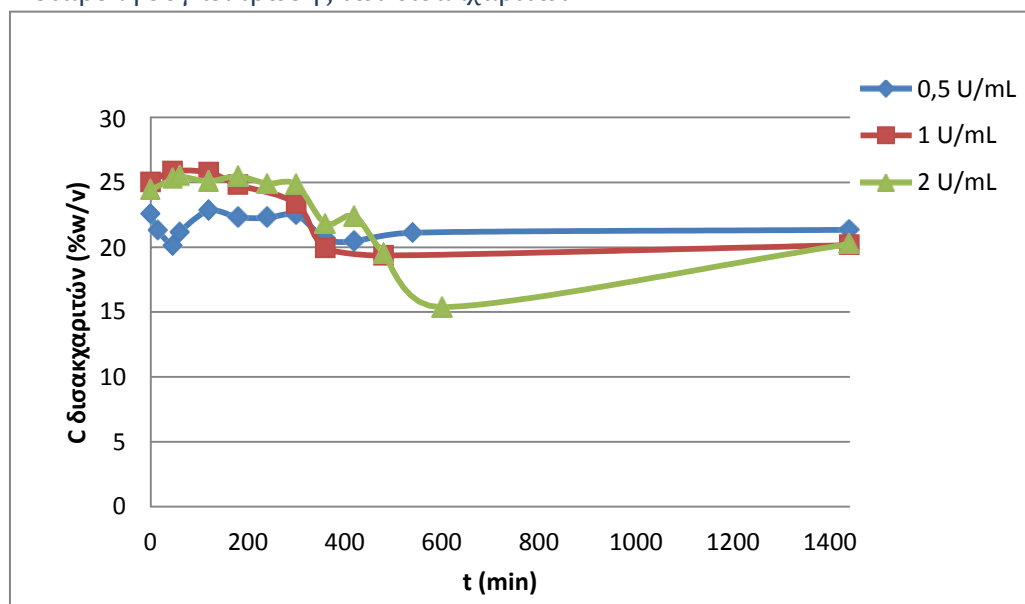
Μεταβολή συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών



**Διάγραμμα 17.** Μεταβολή συγκέντρωσης μονοσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση όξινου ορού σε λακτόζη 23% w/v.

Στο διάγραμμα 17, παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών στον άξονα του χρόνου. Για ενεργότητες 0,5 U/mL, 1 U/mL και 2 U/mL η τελική συγκέντρωση των μονοσακχαριτών φτάνει στα 6,55% w/v, 7,00% w/v και 8,08% w/v, αντίστοιχα. Είναι εμφανές και σε αυτή την περίπτωση, πως η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε παραγωγή μονοσακχαριτών υψηλότερης συγκέντρωσης.

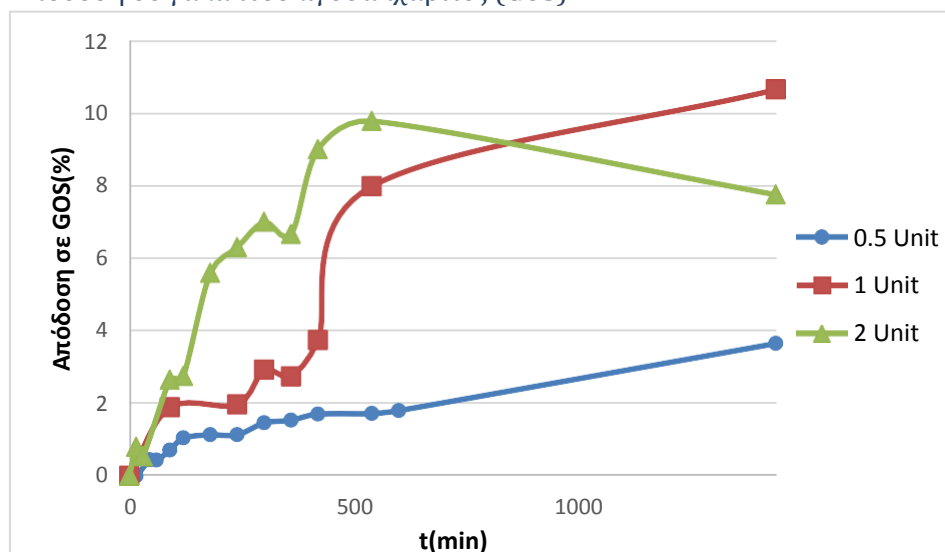
## Μεταβολή συγκέντρωσης των δισακχαριτών



**Διάγραμμα 18.** Μεταβολή συγκέντρωσης δισακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση όξινου ορού σε λακτόζη 23 % w/v.

Στο διάγραμμα 18, για ενζυμικές ενεργότητες 0,5 U/mL και 1 U/mL, η συγκέντρωση της λακτόζης στο αντιδρών μείγμα μειώνεται βραδέως και στη συνέχεια μετά τα 360 min, παραμένει σταθερή μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Η συγκέντρωση της λακτόζης για 2 U/mL παρουσιάζει μείωση μέχρι τα 600 min και έπειτα αύξηση της τάξης του 5% μέχρι την ολοκλήρωση των 1440 min. Με βάση τις τελικές συγκεντρώσεις των μονοσακχαριτών, οι οποίες αυξάνονταν με την αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου, αναμενόταν και αντίστοιχη μείωση της συγκέντρωσης της λακτόζης, με την αύξηση των ενεργοτήτων του ενζύμου. Ωστόσο κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει. Εξήγηση για τα παραπάνω, είναι ο σχηματισμός δισακχαριτών GOS, μέσω της αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης. Η στήλη HPLC διαχωρίζει ανάλογα με τον βαθμό πολυμερισμού των σακχάρων και όχι την κάθε ουσία ξεχωριστά, έτσι ο διαχωρισμός της συγκέντρωσης της λακτόζης με αυτή των δισακχαριτών GOS που έχουν συντεθεί κατά την διάρκεια της αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης δεν είναι διακριτός, με αποτέλεσμα ο κανονικός ρυθμός μείωσης της λακτόζης να μην γίνεται αντιληπτός.

### Απόδοση σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)



**Διάγραμμα 19.** Μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση όξινου ορού σε λακτόζη 23 % w/v.

Στο διάγραμμα 19, παρουσιάζεται η μεταβολή της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 23% w/v για τις 3 διαφορετικές ενζυμικές ενεργότητες. Για ενεργότητα 0,5 U/mL η μέγιστη απόδοση σε GOS εντοπίζεται σε χρόνο 1440 min και έχει τιμή 3,65%. Επιβεβαιώνεται και πάλι, πως η μικρή ενζυμική ενεργότητα, σε υψηλό υπόστρωμα λακτόζης, οδηγεί σε μικρά ποσοστά απόδοσης σε GOS στο αντιδρών μείγμα. Με τον διπλασιασμό της ενεργότητας σε 1 U/mL, η μέγιστη απόδοση σε GOS εντοπίζεται σε χρόνο 1440 min και έχει τιμή 10,64%, η απόδοση δηλαδή σε GOS, αυξήθηκε με τον διπλασιασμό της ενζυμικής ενεργότητας από 1 σε 2 U/mL. Με περαιτέρω διπλασιασμό της ενζυμικής ενεργότητας στα 2 U/mL, η μέγιστη απόδοση σε GOS εντοπίζεται σε χρόνο 540 min και έχει τιμή 9,77%. Στην περίπτωση αυτή, ο διπλασιασμός της ενζυμικής ενεργότητας δεν αύξησε περαιτέρω την απόδοση σε GOS, ωστόσο μείωσε κατά πολύ τον χρόνο επίτευξης του μέγιστου βαθμού απόδοσης, από 1440 σε 540 min.

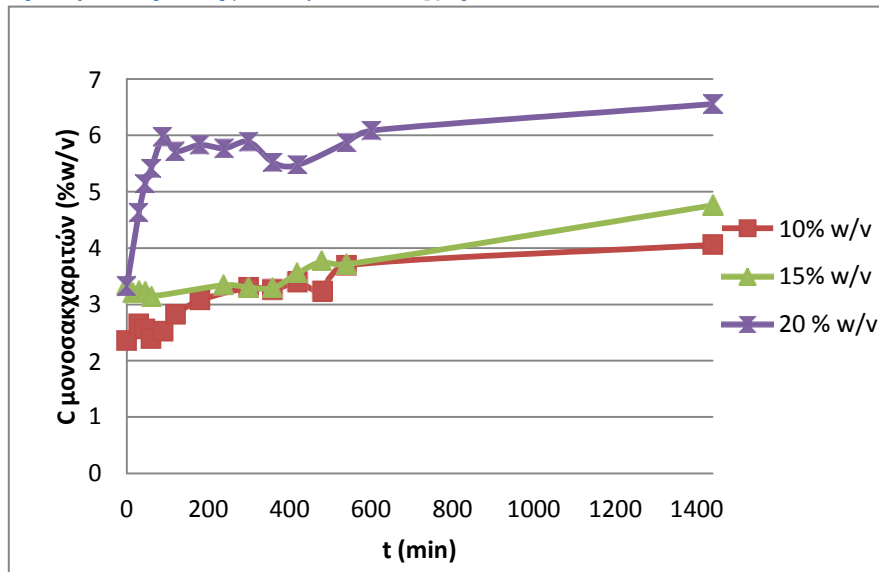
Συνοψίζοντας, στα διαγράμματα 17, 18 και 19, ο συνδυασμός υψηλής συγκέντρωσης αρχικής λακτόζης στο αντιδρών μείγμα και των χαμηλών ενεργοτήτων του ενζύμου οδηγεί σε μη ικανοποιητικά ποσοστά σύνθεσης GOS μέσω της αντίδρασης της μεταγαλακτοζυλίωσης. Κρίνεται λοιπόν αναγκαία, η πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης συγκέντρωσης λακτόζης 23% w/v του αντιδρώντος μείγματος σε υψηλότερες ενζυμικές ενεργότητες.



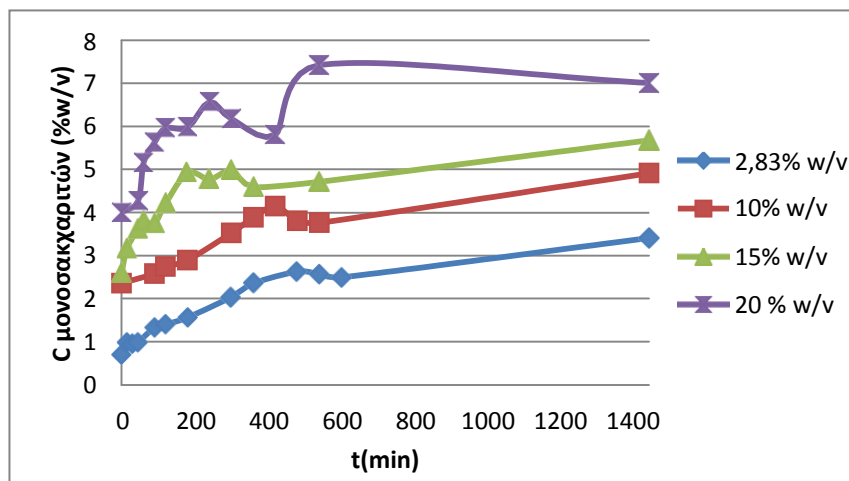
### 5.3.2. Επίδραση της συγκέντρωσης της λακτόζης στην παραγωγή των GOS

Ακολουθεί η ανάλυση των αποτελεσμάτων αναφορικά με την επίδραση της συγκέντρωσης της λακτόζης για κάθε τιμή ενεργότητας του ενζύμου. Στα διαγράμματα 20, 21, 22 και 24 παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών, των δισακχαριτών και των αποδόσεων σε GOS συναρτήσει του χρόνου ενζυμικής αντίδρασης, για κάθε περιεκτικότητα του υποστρώματος σε λακτόζη και για ενζυμικές ενεργότητες 0,5 U/mL, 1 U/mL, 2 U/mL και 4 U/mL.

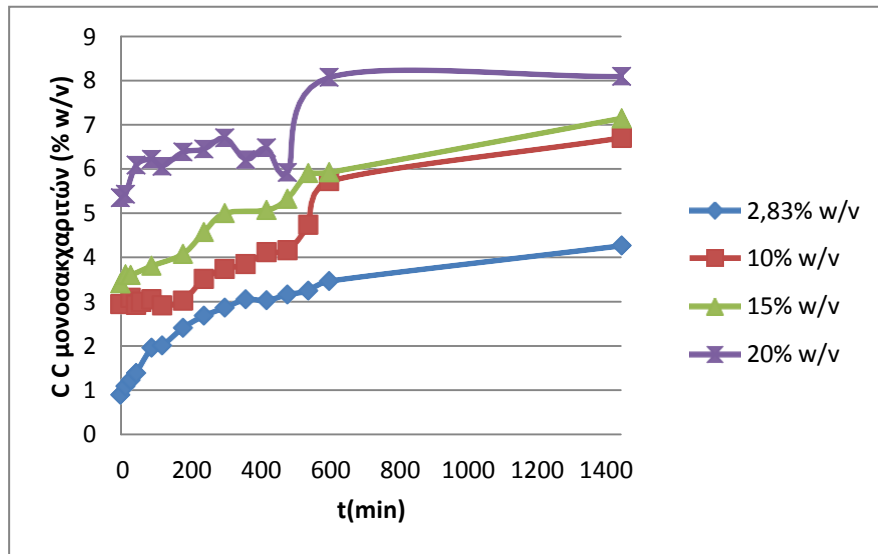
#### Μεταβολή συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών



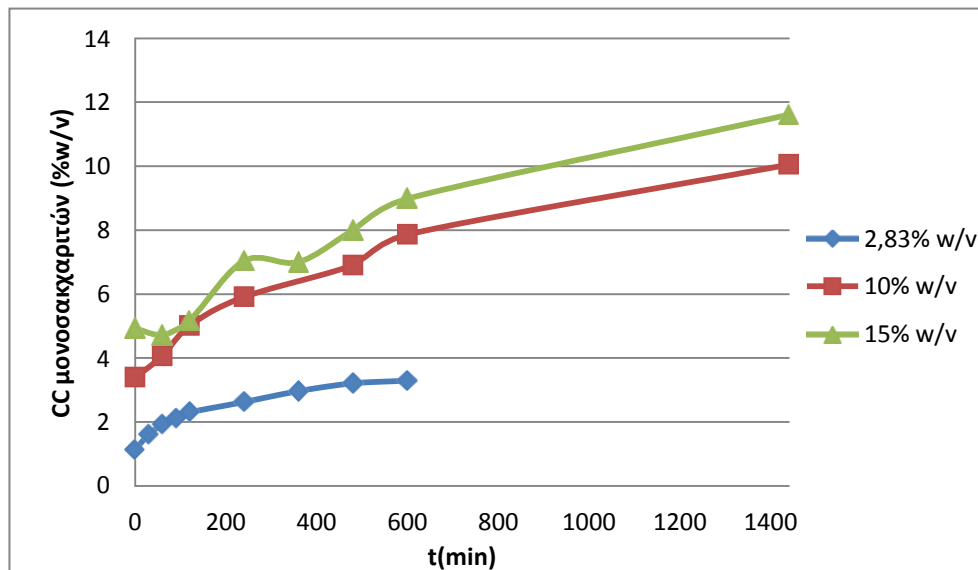
**Διάγραμμα 20.** Μεταβολή της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα **0,5 U/mL**.



**Διάγραμμα 21.** Μεταβολή της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα **1 U/mL**.



**Διάγραμμα 22.** Μεταβολή της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα **2 U/mL**.

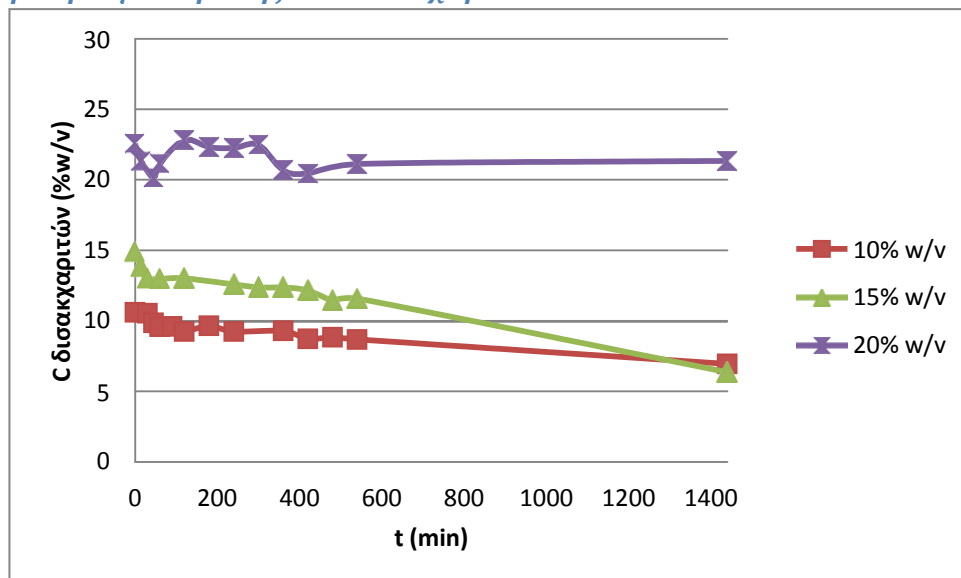


**Διάγραμμα 23.** Μεταβολή της συγκέντρωσης μονοσακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα **4 U/mL**.

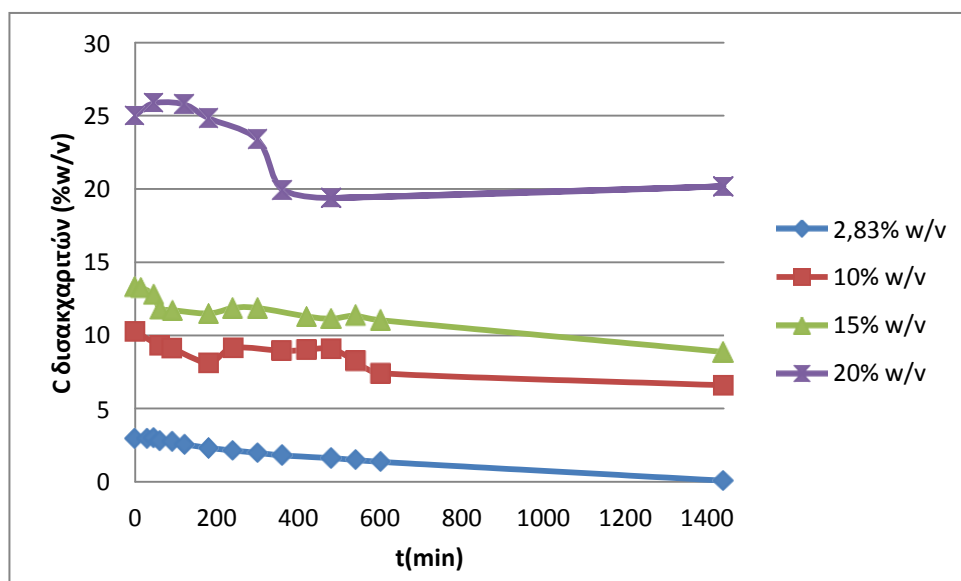
Η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της λακτόζης στο αντιδρών μείγμα οδηγεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μονοσακχαριτών στο πέρας της αντίδρασης, καθώς η υδρόλυση μεγαλύτερης ποσότητας λακτόζης οδηγεί και σε περισσότερα μόρια γλυκόζης και γαλακτόζης στο αντιδρών μείγμα. Επιπλέον, παρατηρείται πως με την αύξηση των ενζυμικών ενεργοτήτων, για κάθε διαφορετική συγκέντρωση λακτόζης του αντιδρώντος μείγματος, οι τελικές συγκεντρώσεις των μονοσακχαριτών αυξάνονται. Οι συγκεντρώσεις των μονοσακχαριτών για συγκεντρώσεις αρχικής λακτόζης 2,83% w/v, 10% w/v και 15% w/v παρουσιάζουν ανοδική τάση μέχρι το πέρας των 1440 min. Για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 23% w/v παρουσιάζεται αύξηση μέχρι τα 90 min, μείωση ή σταθεροποίηση της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών μέχρι τα 420 min και στη συνέχεια ξανά αύξηση έως τα 600 min. Μέχρι τα 1440 min η συγκέντρωση μονοσακχαριτών σε γενικές γραμμές

παραμένει σταθερή. Πιθανή εξήγηση για την μείωση ή σταθεροποίηση της συγκέντρωσης των μονοσακχαριτών το χρονικό διάστημα 240-420 min, είναι η ταυτόχρονη παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων GOS, με αποτέλεσμα η τελική συγκέντρωση μονοσακχαριτών στο μείγμα να μειώνεται. Μεγαλύτερη συγκέντρωση μονοσακχαριτών, λαμβάνεται στο αντιδρών μείγμα συγκέντρωσης λακτόζης 15% w/v και ενεργότητας 4 U/mL και έχει τιμή 11,6% w/v.

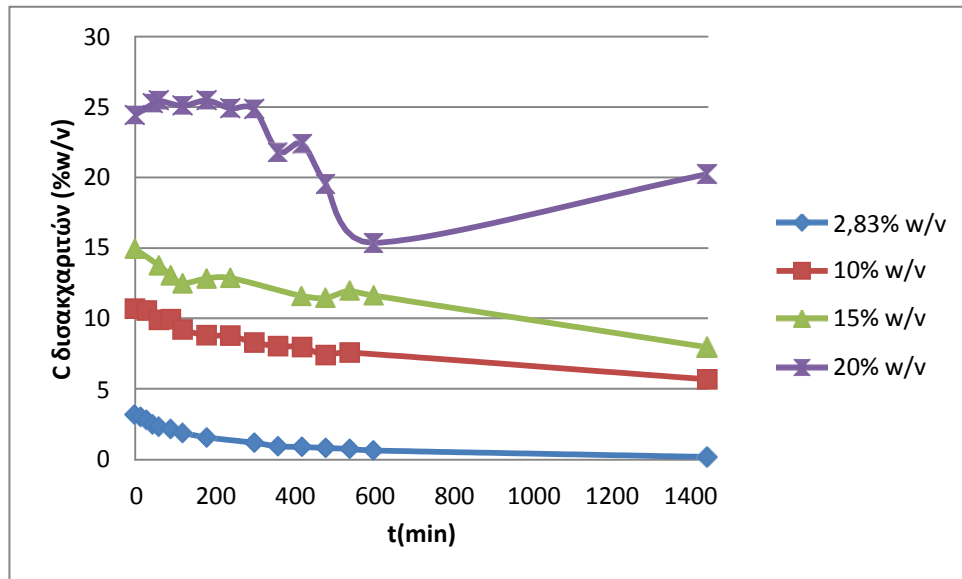
### Μεταβολή συγκέντρωσης των δισακχαριτών



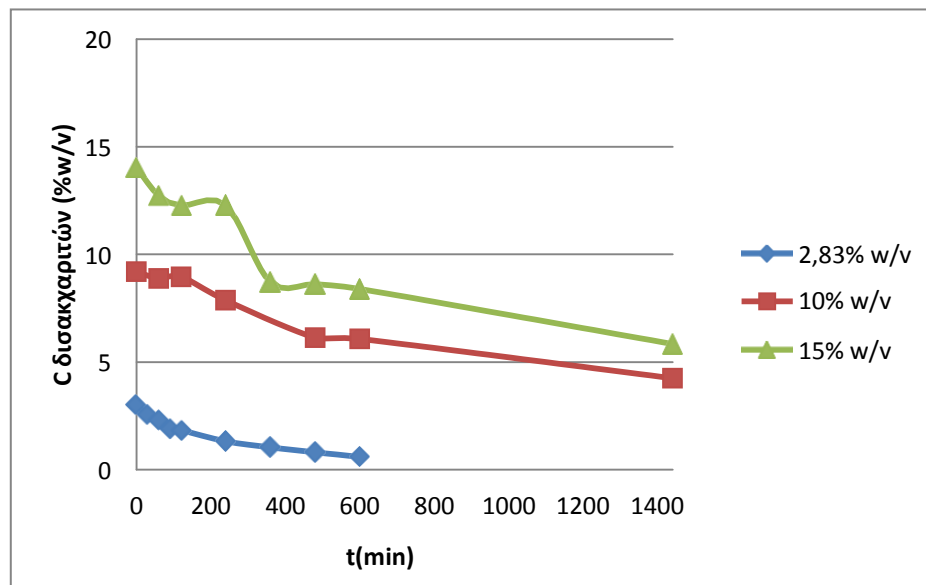
**Διάγραμμα 24.** Μεταβολή της συγκέντρωσης δισακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα **0,5 U/mL**.



**Διάγραμμα 25.** Μεταβολή της συγκέντρωσης δισακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα **1 U/mL**.



**Διάγραμμα 26.** Μεταβολή της συγκέντρωσης δισακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα **2 U/mL**.



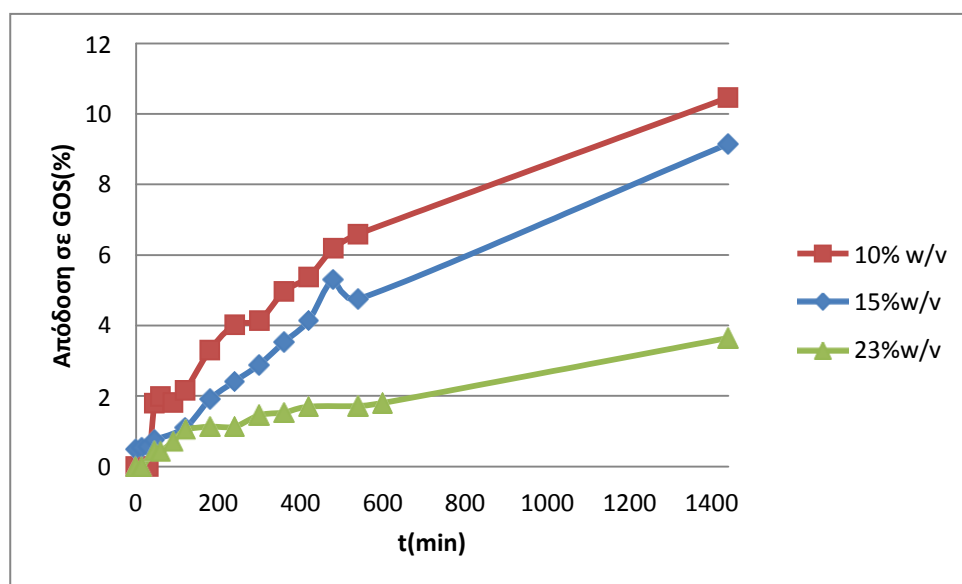
**Διάγραμμα 27.** Μεταβολή της συγκέντρωσης δισακχαριτών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα **4 U/mL**.

Στα διαγράμματα 24, 25, 26 και 27 παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των δισακχαριτών στο αντιδρών μείγμα συναρτήσει του χρόνου για ενεργότητες ενζύμου 0,5 U/mL, 1 U/mL, 2 U/mL και 4 U/mL αντίστοιχα. Με το πέρασμα του χρόνου, η συγκέντρωση των δισακχαριτών μειώνεται, καθώς η λακτόζη, η οποία αποτελεί τον κύριο δισακχαρίτη της αντίδρασης καταναλώνεται. Παρατηρείται, πως για υποστρώματα αρχικής λακτόζης 2,83% w/v στο αρχικό αντιδρών μείγμα, αυτή καταναλώνεται σχεδόν όλη, ανεξαρτήτως ενζυμικής ενεργότητας. Στις συγκεντρώσεις 10% w/v, 15% w/v και 23% w/v, η συγκέντρωση των δισακχαριτών δεν καταναλώνεται πλήρως. Κάτι τέτοιο οδηγεί στο συμπέρασμα πως η

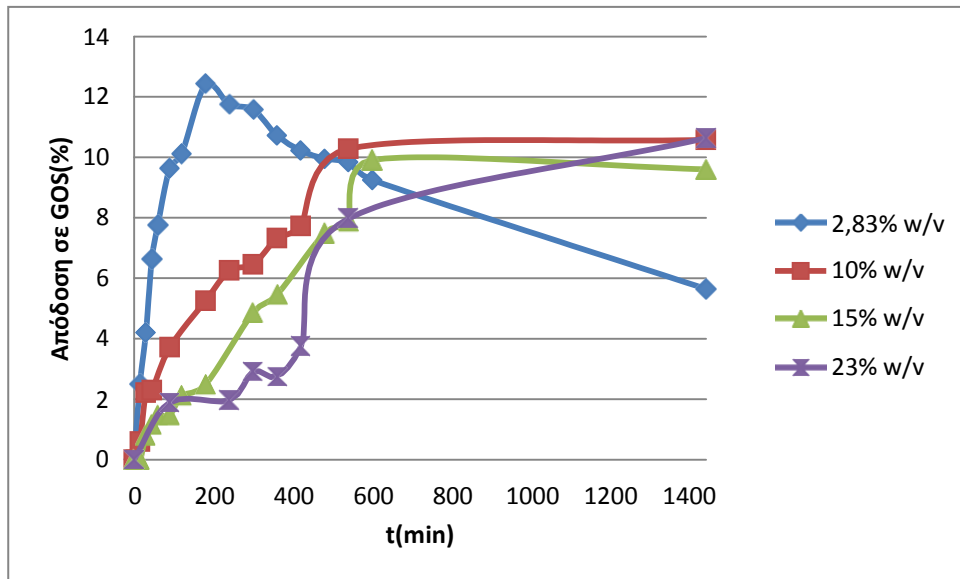
αντίδραση της υδρόλυσης της λακτόζης δεν έχει ολοκληρωθεί στο πέρας των 1440 min ή οι ενζυμικές ενεργότητες για τις δεδομένες συγκεντρώσεις είναι αρκετά χαμηλές, προκειμένου να οδηγήσουν σε υψηλά ποσοστά υδρόλυσης. Ωστόσο, όπως έχει αναφερθεί η β-γαλακτοζιδάση εκτός της υδρόλυσης της λακτόζης, καταλύει και την αντίδραση σχηματισμού δισακχαριτών GOS. Ο διαχωρισμός της συγκέντρωσης της λακτόζης με αυτή των δισακχαριτών GOS που έχουν συντεθεί δεν είναι διακριτός, καθώς το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε εκλύει τα σάκχαρα ομαδοποιημένα, ανάλογα με τον βαθμό πολυμερισμού τους, με αποτέλεσμα η πραγματική μείωση της λακτόζης να μην γίνεται αντιληπτή.

#### **Απόδοση σε γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS)**

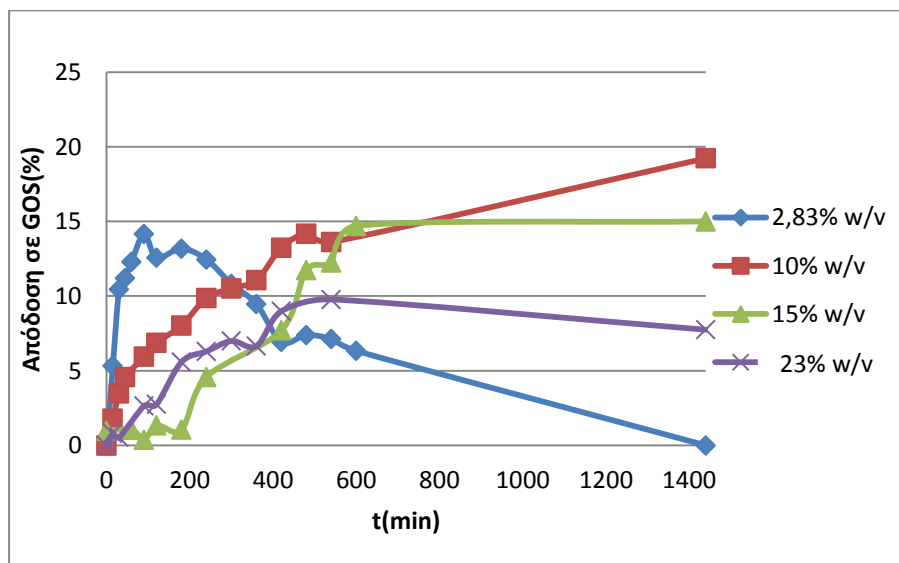
Στα διαγράμματα 27, 28, 29, 30 και 31 παρουσιάζονται ο βαθμός απόδοσης σε GOS στο αντιδρών μείγμα συναρτήσει του χρόνου, για ενεργότητες ενζύμου 0,5 U/mL, 1,2 και 4 U/mL.



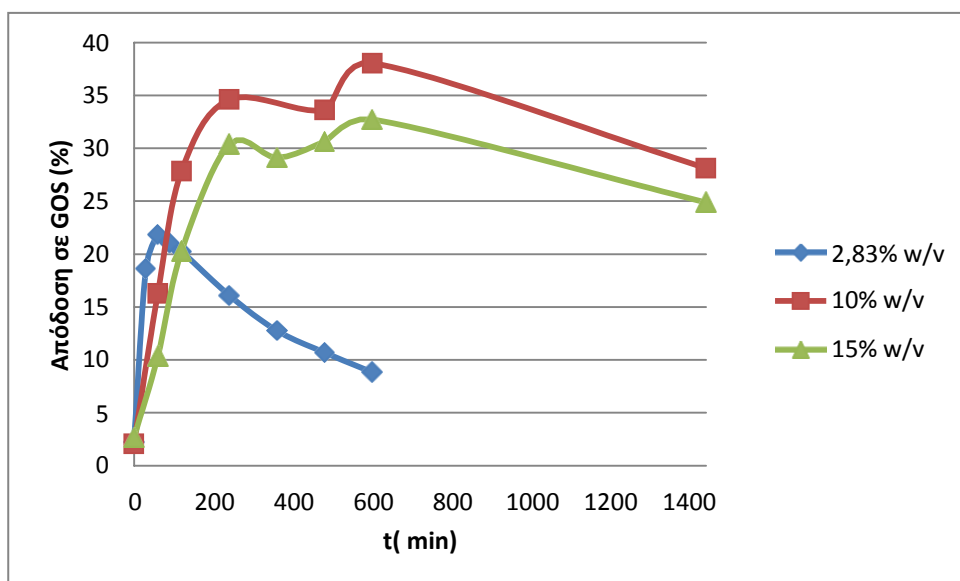
**Διάγραμμα 28.** Μεταβολή της απόδοσης GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα **0,5 U/mL**.



**Διάγραμμα 29.** Μεταβολή της απόδοσης GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα **1 U/mL**.



**Διάγραμμα 30.** Μεταβολή της απόδοσης GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα **2 U/mL**.



**Διάγραμμα 30.** Μεταβολή της απόδοσης GOS συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης για ενζυμική ενεργότητα **4 U/mL**.

Ο βαθμός απόδοσης σε GOS αυξάνεται κατά το πέρας της αντίδρασης. Στις περιπτώσεις που εμφανίζεται μέγιστο κάποια χρονική στιγμή, ακολουθεί η μείωση των αποδόσεων σε GOS, λόγω της περαιτέρω υδρόλυσης των παραγόμενων GOS από το ένζυμο. Από τα διαγράμματα 27, 28, 29, 30 και 31 παρατηρείται ότι ο βαθμός απόδοσης σε GOS δεν μεταβάλλεται αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε λακτόζη, για κάθε τιμή ενεργότητας του ενζύμου. Για ενεργότητα ενζύμου 0,5 U/mL και συγκεντρώσεις 10% w/v, 15% w/v και 20% w/v παρατηρείται μείωση της απόδοσης σε GOS, με την αύξηση της συγκέντρωσης της λακτόζης στο αντιδρών μείγμα. Επίσης παρατηρείται πως η μέγιστη απόδοση σε GOS δεν έχει επέλθει μετά το πέρας της αντίδρασης για κανένα από τα δείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων λακτόζης, καθώς καμία από τις καμπύλες δεν έχει παρουσιάσει ακόμα ολικό μέγιστο. Οι μέγιστοι βαθμοί απόδοσης στα 0,5 U/mL για συγκέντρωση λακτόζης 10% w/v, 15% w/v και 20% w/v παίρνουν τιμές 9,15% w/v, 10,5% w/v, 9,15% w/v και 3,7% w/v αντίστοιχα. Για ενεργότητα 1 U/mL, η μέγιστη απόδοση σε GOS εντοπίζεται στη μικρότερη συγκέντρωση λακτόζης 2,83% w/v στο αντιδρών μείγμα σε χρόνο 180 min και τιμή 12,4%. Η απόδοση σε GOS του αντιδρώντος μείγματος για συγκεντρώσεις λακτόζης 10 % w/v και 15 % w/v ακολουθούν παρόμοια πορεία στον άξονα του χρόνου, με την πρώτη να εμφανίζει υψηλότερες αποδόσεις σε GOS. Για συγκέντρωση λακτόζης 23% w/v του αντιδρώντος μείγματος, οι αποδόσεις σύνθεσης σε GOS είναι αρκετά χαμηλότερες συγκριτικά με τις τιμές αποδόσεων στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις λακτόζης. Για ενζυμική ενεργότητα 2 U/mL, η μέγιστη απόδοση σε GOS παρουσιάζεται για αρχική συγκέντρωση λακτόζης στο αντιδρών μείγμα 10 % w/v σε χρόνο 1440 min και έχει τιμή 19,2%. Για ενζυμική ενεργότητα 4 U/mL, μεγαλύτερη απόδοση σε GOS επιτυγχάνεται σε συγκέντρωση αρχικής λακτόζης 10% w/v σε χρόνο 600 min και έχει τιμή 38,0%, αμέσως μετά σε συγκέντρωση αρχικής λακτόζης 15% w/v σε χρόνο 600 min και έχει τιμή 32,7% .





## Κεφάλαιο 6. Σύνοψη-Συμπεράσματα

---

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η αξιοποίηση της λακτόζης του όξινου ορού γιαουρτιού για την παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS). Η σύνθεση των GOS πραγματοποιήθηκε μέσω της ενζυμικής αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης, με τη χρήση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης *Ttbga1*, προερχόμενο από το ανασυνδυασμένο γονιδίωμα του μικροοργανισμού *Thermothielavioides terrestris*, ετερόλογα εκφρασμένο στη ζύμη *Pichia pastoris*. Αρχικά προσδιορίστηκαν τα συστατικά του όξινου ορού, ακολούθησε ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών δράσης του ενζύμου και τελικά μελετήθηκε η απόδοση της ενζυμικής μετατροπής της λακτόζης του όξινου ορού σε GOS. Από τη χημική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε υπολογίστηκε πως στον όξινο ορό περιέχονται  $2,84 \pm 0,36\%$  w/v ολικά σάκχαρα, λακτόζη ίση με  $2,83 \pm 0,11\%$  w/v και γαλακτόζη ίση με  $0,70 \pm 0,01\%$  w/v. Τα ολικά στερεά υπολογίστηκαν ίσα με  $5,13 \pm 0,01\%$  w/w και η τέφρα ίση με  $0,71 \pm 0,04\%$  w/w. Η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών του ορού υπολογίστηκε με την μέθοδο Kjeldhal και είχε τιμή ίση με  $0,35 \pm 0,05\%$ , ενώ τα λιπαρά του ορού υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Rose-Gottlieb και είχαν τιμή ίση με  $0,05 \pm 0,02\%$  w/v. Η αλατότητα του όξινου ορού προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Mohr και προέκυψε ίση με  $0,92 \pm 0,13\%$  w/v. Τα θειικά ιόντα και το γαλακτικό οξύ βρέθηκαν ίσα με  $94,0 \pm 5,1$  mg/L και  $1,32 \pm 0,06$  g/L αντίστοιχα. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ενζυμική ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης *Ttbga1* σε εύρος θερμοκρασιών 30-70 °C και εύρος pH 3,0-9,0. Το ένζυμο εμφάνισε βέλτιστη δράση σε τιμή pH 4,5 και θερμοκρασία 50 °C. Στις συνθήκες αυτές η ενεργότητα του ενζύμου υπολογίστηκε με τη μέθοδο της ορθο-νιτροφαινυλο-β-D-γαλακτοπυρανόζης (oNPG) και βρέθηκε ίση με 400 U/mL. Ακολούθησαν συνολικά 15 ενζυμικές αντιδράσεις σε ενζυμικές ενεργότητες 0,5-4 U/mL και αρχική συγκέντρωση λακτόζης του ορού 2,83-20% w/v. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στη θερμοκρασία των 50 °C και pH 4,5, τιμή ίδια με αυτή του pH του ορού. Η διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης ήταν 24 h. Η ανάλυση των προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με χρήση ανιχνευτή Δείκτη Διάθλασης (HPLC-RI). Ακολούθησε η αναλυτική παρουσίαση και σχολιασμός των αποτελεσμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν αφορούσαν την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης της λακτόζης στο αντιδρών σύστημα του ορού, καθώς και την επίδραση της ενζυμικής ενεργότητας του *Ttbga1* στο βαθμό απόδοσης της ενζυμικής διεργασίας σε GOS, συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά οι μέγιστες αποδόσεις σε GOS καθώς και οι χρόνοι επίτευξης αυτών, για όλες τις τιμές ενεργότητων και συγκεντρώσεων λακτόζης του αντιδρώντος μείγματος, που εξετάστηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 15 ενζυμικές αντιδράσεις.

**Πίνακας 12.** Σύνοψη αποτελεσμάτων ενζυμικών αντιδράσεων.

Συγκέντρωση λακτόζης (%w/v)	Ενεργότητα ενζύμου (U/mL)	Θερμοκρασία (T°C)	pH	Μέγιστη απόδοση σε GOS (%)	Χρόνος επίτευξης μέγιστης απόδοσης (min)
2,83	1	50	4,5	12,4 ± 0,2	180
	1,5			17,2 ± 1,3	180
	2			14,2 ± 0,4	90
	4			21,8	60
10	0,5			10,5 ± 1,6	1440
	1			10,6 ± 0,3	1440
	2			19,2 ± 0,9	1440
	4			38,0	600
15	0,5			9,15 ± 0,28	1440
	1			9,91 ± 0,01	600
	2			17,5 ± 0,01	1440
	4			32,7	1440
23	0,5			3,72 ± 0,6	1440
	1			10,6 ± 1,3	1440
	2			9,8	540

Όσον αφορά στην επίδραση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης στο βαθμό απόδοσης σε GOS, παρατηρείται πως η αύξηση αυτής οδηγεί είτε σε αντίστοιχη αύξηση του βαθμού απόδοσης σε GOS, είτε στη μείωση του χρόνου επίτευξης του μέγιστου βαθμού απόδοσης αυτού ή στον συνδυασμό των 2 παραπάνω. Η επίδραση της ενεργότητας του ενζύμου είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τον έλεγχο της απόδοσης των GOS που παράγονται, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες βιβλιογραφικές μελέτες (Gonzalez-Delgado et al. 2016).

- Συγκεκριμένα, για συγκέντρωση αρχικής λακτόζης 2,83% w/v, η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας από 1 U/mL σε 1,5 U/mL οδήγησε σε αύξηση της μέγιστης απόδοσης σε GOS από 12,4 ± 0,2% w/v σε 17,2 ± 2,6% w/v σε χρόνο 180min. Η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας από 1,5 U/mL σε 2 U/mL δεν είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της μέγιστης απόδοσης σε GOS, αλλά υποδιπλασίασε τον χρόνο επίτευξης αυτού από 180 min σε 90 min. Επιπλέον, για 4 U/ mL παρατηρήθηκε ταυτόχρονη αύξηση της μέγιστης απόδοσης σε GOS σε τιμή 21,8% w/v και υποτριπλασιασμός του χρόνου επίτευξης της μέγιστης απόδοσης από 180 min σε 60 min.
- Για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 10% w/v, οι μέγιστες αποδόσεις σε GOS για 0,5 U/mL, 1 U/mL και 2 U/mL εντοπίζονται σε χρόνο 1440 min και αυξάνονται αναλογικά με την αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας, λαμβάνοντας τιμές 10,5 ± 1,6 % w/v, 10,6 ± 0,3 % w/v και 19,2 ± 0,9 % w/v αντίστοιχα. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι

δεν έχει επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση σε GOS μέχρι το πέρας των 1440 min. Για αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας στα 4 U/mL, η μέγιστη απόδοση σε GOS λαμβάνει τιμή 38,0% w/v και χρόνο 600 min. Ο οκταπλασιασμός του ενζυμικού φορτίου από τα 0,5 U/mL στα 4 U/mL οδηγεί στην αύξηση της μέγιστης απόδοσης σε GOS κατά 2,6 φορές και μείωση του απαιτούμενου χρόνου επίτευξης του ποσοστού αυτού.

- Για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 15% w/v, οι μέγιστες αποδόσεις σε GOS αυξάνονται, και σε αυτή την περίπτωση, με την αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας. Για ενεργότητες 0,5 U/mL, 1 U/mL, 2 U/mL, 4 U/mL, οι μέγιστες αποδόσεις που λήφθηκαν είχαν τιμές  $9,15 \pm 0,28\%$  w/v,  $9,6 \pm 0,01\%$  w/v,  $17,5 \pm 0,01\%$  w/v και  $32,7\%$  w/v αντίστοιχα. Η αύξηση της ενεργότητας από το 1 U/mL στα 2 U/mL αύξησε την μέγιστη απόδοση σε GOS κατά 0,77 φορές, ενώ η αύξηση της ενεργότητας από 2 U/mL στα 4 U/mL αύξησε τη μέγιστη απόδοση κατά 0,87 φορές. Επιπλέον, παρατηρείται πως στις ενεργότητες, 0,5 U/mL, 2 U/mL και 4 U/mL, οι καμπύλες απόδοσης δεν φτάνουν στην μέγιστη τιμή τους πριν το τέλος των 1440 min. Συμπερασματικά, οι υψηλές συγκεντρώσεις αρχικής λακτόζης στο αντιδρών σύστημα απαιτούν και αντίστοιχα υψηλότερες ενεργότητες ενζύμου, προκειμένου να επιτευχθούν υψηλά ποσοστά σύνθεσης σε GOS. Αναγκαία, λοιπόν, κρίνεται η περαιτέρω διερεύνηση της ενζυμικής αντίδρασης αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης 15% w/v σε μεγαλύτερες ενζυμικές ενεργότητες, προκειμένου να μειωθούν οι χρόνοι επίτευξης της μέγιστης απόδοσης σε GOS.
- Για αρχική συγκέντρωση λακτόζης 23% w/v, για ενζυμικές ενεργότητες 0,5 U/mL, 1 U/mL και 2 U/mL λήφθηκαν τιμές μέγιστων ενζυμικών αποδόσεων  $3,72 \pm 0,6\%$  w/v,  $10,6 \pm 2,3\%$  w/v και  $9,3\%$  w/v αντίστοιχα, τιμές μικρότερες από αυτές που εντοπίστηκαν σε χαμηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις λακτόζης του ορού. Είναι εμφανές και σε αυτή την περίπτωση πως ο συνδυασμός υψηλής συγκέντρωσης αρχικής λακτόζης στο αντιδρών μείγμα και χαμηλών ενεργοτήτων του ενζύμου οδηγούν αντίστοιχα σε χαμηλές αποδόσεις σύνθεσης σε GOS, μέσω της αντίδρασης της μεταγαλακτοζυλίωσης.

Αναφορικά με την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης του όξινου ορού στον βαθμό απόδοσης σε GOS της ενζυμικής διεργασίας, υπό σταθερές συνθήκες ενζυμικής ενεργότητας, θερμοκρασίας και τιμής pH, παρατηρήθηκε ότι ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS επιτυγχάνεται με χρήση ενζυμικής ενεργότητας ίση με 4 U/mL.

Για συγκεντρώσεις αρχικής λακτόζης 2,83% w/v, 10%w/v και 15%w/v οι μέγιστες αποδόσεις σε GOS λαμβάνουν τιμες 21,8%, 38,0% και 32,7% σε χρόνους 60 min, 600 min και 1440min αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε GOS, με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης από 2,83% w/v στα 10% w/v. Ωστόσο, η επιπλέον αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης από 10% w/v στα 15% w/v οδηγεί στην ελάττωση του μέγιστου βαθμού απόδοσης σε τιμή 32,7% w/v και την αύξηση του χρόνου επίτευξης της απόδοσης αυτής στα 1440 min, υποδηλώνοντας πως η περαιτέρω αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της λακτόζης του ορού είτε ευνοεί τις αντιδράσεις υδρόλυσης της λακτόζης έναντι της μεταγαλακτοζυλίωσης, είτε μετατοπίζει τη μέγιστη απόδοση σε GOS σε μεταγενέστερο χρόνο. Η υπέρσχυση της υδρόλυση της

λακτόζης έναντι του ολιγομερισμού της σε υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις λακτόζης του ορού έχει παρατηρηθεί και σε παλαιότερες έρευνες (Torres et al. 2010). Συνεπώς, η επιλογή της κατάλληλης αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης του ορού, προκειμένου να ευνοείται ο ολιγομερισμός της λακτόζης και όχι η υδρόλυση της, αποτελεί κρίσιμο σημείο για την επίτευξη της μέγιστης απόδοσης σε GOS.

Συνοψίζοντας, οι βέλτιστες συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης μετατροπής της λακτόζης προερχόμενη από όξινο ορό σε GOS από το ένζυμο *Tbgal1*, για τις συνθήκες που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, επιτυγχάνονται σε υπόστρωμα όξινου ορού αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης 10% w/v, με ενζυμική ενεργότητα 4 U/mL, σε θερμοκρασία 50 °C και τιμή pH 4,5. Η μέγιστη απόδοση σε GOS βρέθηκε ίση με 38,0% έπειτα από 600 min αντίδρασης.

Ως γενικά συμπεράσματα προκύπτουν τα εξής :

- Η χρήση υψηλών ενεργοτήτων οδηγεί σε μεγαλύτερες αποδόσεις GOS, ενώ παράλληλα μειώνει το χρόνο επίτευξης του βαθμού απόδοσης αυτού.
- Η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων αρχικής λακτόζης, δεν οδηγεί πάντα σε υψηλά ποσοστά απόδοσης σε GOS. Οι υψηλές συγκεντρώσεις αρχικής λακτόζης στο αντιδρών σύστημα απαιτούν υψηλότερες ενεργότητες ενζύμου, προκειμένου να επιτευχθούν υψηλά ποσοστά σύνθεσης σε GOS.

Συμπερασματικά, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η β-γαλακτοζιδάση *Tbgal1* φαίνεται να αποτελεί ένα σημαντικό βιοτεχνολογικό εργαλείο, για την αξιοποίηση του όξινου ορού προς παραγωγή γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS). Συγκριτικά με τα ένζυμα από μικροοργανισμούς, που έχουν χρησιμοποιηθεί σε παλαιότερες διπλωματικές εργασίες του εργαστηρίου Τροφίμων, τον *A. oryzae* (Γαλάνη, 2016) και τον *K.lactis* (Τσίκα, 2019), το ένζυμο *Tbgal1* έδωσε παραπλήσιες αποδόσεις με το ένζυμο προερχόμενο από τον μικροοργανισμό *K.lactis*. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζεται ένας συγκριτικός πίνακας των μέγιστων αποδόσεων σε GOS για τις τρεις διαφορετικές προελεύσεις του ενζύμου.

**Πίνακας 13.** Συγκριτικός πίνακας αποδόσεων σε GOS.

Προέλευση ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης	<i>K.lactis</i>	<i>A.oryzae</i>	<i>Thermothielavioides terrestris</i> (ετερόλογα εκφρασμένο στη ζύμη <i>Pichia pastoris</i> )
Δραστικότητα Ενζύμου (U/mL)	0,052	9,6	4
pH	7	4,5	4,5
Θερμοκρασία Αντίδρασης (T°C)	37	45	50
Αρχική Συγκέντρωση λακτόζης (%w/v)	14	14	10
Μέγιστη % απόδοση σε GOS	37,0 ± 1,06	23,1 ± 0,25	38,0
Χρόνος επίτευξης (min)	120	360	600

Όσον αναφορά την β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *A. oryzae*, ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS, επιτεύχθηκε σε όξινο ορό αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης 14% w/v, θερμοκρασία 45°C, ενζυμική ενεργότητα 9,6 U/mL, τιμή pH υποστρώματος 4,5 και είχε τιμή 23,1 ± 0,25% (Γαλάνη, 2016). Για την χρήση της β-γαλακτοζιδάσης από τον μικροοργανισμό *K. lactis*, ο μέγιστος βαθμός απόδοσης σε GOS επιτεύχθηκε σε όξινο ορό αρχικής συγκέντρωσης λακτόζης 14% w/v, θερμοκρασία 37°C, ενεργότητα ενζύμου ίση με 0,052 U/mL, τιμή pH υποστρώματος 7 και είχε τιμή 37,0 ± 1,06% (Τσίκα, 2019). Το ένζυμο *Ttbgal1* επιτυγχάνει μέγιστη απόδοση σε GOS ίση με 38,0% έπειτα από 600 min αντίδρασης, σε αρχική συγκέντρωση λακτόζης 10% w/v, με ενζυμική ενεργότητα 4 U/mL, σε θερμοκρασία 50 °C και τιμή pH 4,5.

Το *Ttbgal1* συγκρίθηκε με τα παραπάνω 2 ένζυμα. Συγκεκριμένα:

- Σε σύγκριση με το ένζυμο από τον μικροοργανισμό *K.lactis*, το *Ttbgal1* παρουσιάζει παραπλήσια μέγιστη απόδοση σε GOS, σε μικρότερη αρχική συγκέντρωση λακτόζης και βέλτιστο pH ίδιο με το pH του ορού. Ωστόσο, έγινε χρήση οκταπλάσιας ενζυμικής δραστικότητας και ο χρόνος επίτευξης της μέγιστης απόδοσης σε GOS ήταν πενταπλάσιος.
- Σε σύγκριση με το ένζυμο από τον *A.oryzae*, το *Ttbgal1* παρουσιάζει μεγαλύτερη μέγιστη απόδοση σε GOS, σε μικρότερη αρχική συγκέντρωση λακτόζης και σε μικρότερη ενζυμική δραστικότητα. Ωστόσο, ο χρόνος επίτευξης της μέγιστης απόδοσης σε GOS του *Ttbgal1* επιτεύχθηκε 4 ώρες αργότερα.

## Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Ως συνέχεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, κρίνεται σκόπιμη η περαιτέρω διερεύνηση υψηλότερων ενζυμικών ενεργοτήτων του ενζύμου *Ttbgal1*. Ενδιαφέρον επίσης θα παρουσίαζε η ανάλυση δειγμάτων σε σύστημα χρωματογραφίας ανιοεναλλαγής (HPLC-PAD), με στόχο τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση της κάθε ουσίας ξεχωριστά και όχι ομαδοποιημένα ανάλογα με το μοριακό της βάρος. Πρόκληση επίσης αποτελεί η δοκιμή της αντίδρασης μεταγαλακτοζυλίωσης σε διαφορετικά υποστρώματα λακτόζης, όπως ο όξινος ορός αιγοπρόβειας προέλευσης, είτε το τυρόγαλα. Επιπλέον, πεδίο έρευνας θα μπορούσε να αποτελέσει η αναζήτηση εναλλακτικών λακτασών με επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως η ενζυμική δράση σε χαμηλές τιμές pH και η υψηλή θερμοσταθερότητα. Μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, η μελέτη του φαινομένου της κρυστάλλωσης της λακτόζης. Το φαινόμενο αυτό εξαρτάται από την θερμοκρασία και τη συγκέντρωση των συστατικών στο μείγμα. Η ανάπτυξη κρυσταλλικών δομών κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, λειτουργεί ως εμπόδιο στη δράση του ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης, επομένως έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η περαιτέρω διερεύνηση του.

# Βιβλιογραφία

---

- Albayrak, N., & Yang, S.-T. (2002). Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(1), 8–19. <https://doi.org/10.1002/bit.1195>
- Anisha, G. S. (2017).  $\beta$ -Galactosidases. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 395–421). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00017-8>
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 411–421. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00003-8)
- Bong, D. D., & Moraru, C. I. (2014). Use of micellar casein concentrate for Greek-style yogurt manufacturing: Effects on processing and product properties. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1259–1269. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7488>
- Boon, M. A., Janssen, A. E. M., & van 't Riet, K. (2000). Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4), 271–281. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00167-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00167-2)
- Buckholz, R. G., & Gleeson, M. A. G. (1991). Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous Proteins. *Bio/Technology*, 9(11), 1067–1072. <https://doi.org/10.1038/nbt1191-1067>
- Bultema, J. B., Dijkhuizen, L., & van Leeuwen, S. S. (2017). Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the  $\beta$ -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. *Food Chemistry*, 225, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.030>
- Cardelle-Cobas, A., Villamiel, M., Olano, A., & Corzo, N. (2008). Study of galacto-oligosaccharide formation from lactose using Pectinex Ultra SP-L: Galacto-

- oligosaccharide synthesis using Pectinex Ultra SP-L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(6), 954–961. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3173>
- Carlini, M., Castellucci, S., & Moneti, M. (2015). Biogas Production from Poultry Manure and Cheese Whey Wastewater under Mesophilic Conditions in Batch Reactor. *Energy Procedia*, 82, 811–818. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.11.817>
- Chen, C.-S., Hsu, C.-K., & Chiang, B.-H. (2002). Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. *Process Biochemistry*, 38(5), 801–808. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00232-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00232-7)
- Choi, J. J., Oh, E.-J., Lee, Y.-J., Suh, D. S., Lee, J. H., Lee, S.-W., Shin, H.-T., & Kwon, S.-T. (2003). Enhanced expression of the gene for  $\beta$ -glycosidase of *Thermus caldophilus* GK24 and synthesis of galacto-oligosaccharides by the enzyme. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38(2), 131. <https://doi.org/10.1042/BA20020119>
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Depeint, F., Tzortzis, G., Vulevic, J., l'Anson, K., & Gibson, G. R. (2008). Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(3), 785–791. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.3.785>
- Eskandarloo, H., & Abbaspourrad, A. (2018a). Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using  $\beta$ -galactosidase immobilized on functionalized glass beads. *Food Chemistry*, 251, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.068>
- Eskandarloo, H., & Abbaspourrad, A. (2018b). Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using  $\beta$ -galactosidase immobilized on functionalized glass beads. *Food Chemistry*, 251, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.068>



- Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2015a). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*, 48, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.003>
- Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2015b). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*, 48, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.003>
- Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2021). Synthesis of galactooligosaccharides by *Cryptococcus laurentii* and *Aspergillus oryzae* using different kinds of acid whey. *International Dairy Journal*, 112, 104867. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104867>
- Fox, P. F. (2001). Milk proteins as food ingredients. *International Journal of Dairy Technology*, 54(2), 41–55. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2001.00014.x>
- Gänzle, M. G. (2019). Lactose—A conditional prebiotic? In *Lactose* (pp. 155–173). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811720-0.00004-0>
- González-Delgado, I., López-Muñoz, M.-J., Morales, G., & Segura, Y. (2016). Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *International Dairy Journal*, 61, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.06.007>
- Gopal, P. K., Sullivan, P. A., & Smart, J. B. (2001). Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *International Dairy Journal*, 11(1–2), 19–25. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00026-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00026-7)
- Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28(3), 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.002>

- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2016). Effects of hydrocolloids and processing conditions on acid whey production with reference to Greek yogurt. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 61–76. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.013>
- Harju, M., Kallioinen, H., & Tossavainen, O. (2012). Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*, 22(2), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.09.011>
- Illanes, A. (2016). Lactose. In *Lactose-Derived Prebiotics* (pp. 1–33). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00001-9>
- Iwasaki, K., Nakajima, M., & Nakao, S. (1996). Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymic batch reaction using  $\beta$ -galactosidase. *Process Biochemistry*, 31(1), 69–76. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)00067-0](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)00067-0)
- Jelen, P. (2002). WHEY PROCESSING | Utilization and Products. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 2739–2745). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00511-3>
- Ji, E.-S., Park, N.-H., & Oh, D.-K. (2005). Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 759–764. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-5487-8>
- Kaur, R., Panwar, D., & Panesar, P. S. (2020). Biotechnological approach for valorization of whey for value-added products. In *Food Industry Wastes* (pp. 275–302). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817121-9.00013-9>
- Lee, M.-N. H., B. (2002). Purification and characterization of a recombinant  $\beta$ -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4), 439–445. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0911-6>

- López Leiva, M. H., & Guzman, M. (1995). Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. *Process Biochemistry*, *30*(8), 757–762. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(95\)00006-2](https://doi.org/10.1016/0032-9592(95)00006-2)
- Machado, J. J. B., Coutinho, J. A., & Macedo, E. A. (2000). Solid–liquid equilibrium of  $\alpha$ -lactose in ethanol/water. *Fluid Phase Equilibria*, *173*(1), 121–134. [https://doi.org/10.1016/S0378-3812\(00\)00388-5](https://doi.org/10.1016/S0378-3812(00)00388-5)
- Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Parmar, S. C., & Aparnathi, K. D. (2016). Whey and its Utilization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *5*(8), 134–155. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.508.016>
- Mahoney, R. R. (1998). Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. *Food Chemistry*, *63*(2), 147–154. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00020-X)
- Maischberger, T., Mierau, I., Peterbauer, C. K., Hugenholtz, J., & Haltrich, D. (2010). High-Level Expression of *Lactobacillus*  $\beta$ -Galactosidases in *Lactococcus lactis* Using the Food-Grade, Nisin-Controlled Expression System NICE. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(4), 2279–2287. <https://doi.org/10.1021/jf902895g>
- Maitin, V., & Rastall, R. A. (2004). Enzyme glycation influences product yields during oligosaccharide synthesis by reverse hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *30*(5–6), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.05.004>
- Mano, M. C. R., Paulino, B. N., & Pastore, G. M. (2019). Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. *Food Research International*, *124*, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.019>
- Martin, J. K., Luthra, M. G., Wells, M. A., Watts, R. P., & Hanahan, D. J. (1975). Phospholipase A2 as a probe of phospholipid distribution in erythrocyte membranes. Factors influencing the apparent specificity of the reaction. *Biochemistry*, *14*(25), 5400–5408. <https://doi.org/10.1021/bi00696a003>

- Mistry, V. V., Kosikowski, F. V., & Bellamy, W. D. (1987). Improvement of Lactic Acid Production in Ultrafiltered Milk by the Addition of Nutrients. *Journal of Dairy Science*, *70*(11), 2220–2225. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80281-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80281-3)
- Mozaffar, Z., Nakanishi, K., & Matsuno, R. (1986). Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose using immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *25*(3). <https://doi.org/10.1007/BF00253653>
- Ndaba, B., Chiyanzu, I., & Marx, S. (2015). n-Butanol derived from biochemical and chemical routes: A review. *Biotechnology Reports*, *8*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.001>
- Neri, D. F. M., Balcão, V. M., Costa, R. S., Rocha, I. C. A. P., Ferreira, E. M. F. C., Torres, D. P. M., Rodrigues, L. R. M., Carvalho, L. B., & Teixeira, 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*(1), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.068>
- Nishanthi, M., Chandrapala, J., & Vasiljevic, T. (2017). Compositional and structural properties of whey proteins of sweet, acid and salty whey concentrates and their respective spray dried powders. *International Dairy Journal*, *74*, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.01.002>
- Ohtsuka, K., Tanoh, A., Ozawa, O., Kanematsu, T., Uchida, T., & Shinke, R. (1990). Purification and properties of a  $\beta$ -galactosidase with high galactosyl transfer activity from *Cryptococcus laurentii* OKN-4. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *70*(5), 301–307. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90138-M](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90138-M)
- Onishi, N., Kira, I., & Yokozeki, K. (1996). Galacto-oligosaccharide production from lactose by *Sirobasidium magnum* CBS6803. *Letters in Applied Microbiology*, *23*(4), 253–256. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb00077.x>

- Osman, A. (2016). Synthesis of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides. In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics* (pp. 135–154). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00009-5>
- Osman, A., Tzortzis, G., Rastall, R. A., & Charalampopoulos, D. (2010). A comprehensive investigation of the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides by whole cells of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Journal of Biotechnology*, *150*(1), 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.08.008>
- Osman, A., Tzortzis, G., Rastall, R. A., & Charalampopoulos, D. (2012). BbgIV Is an Important *Bifidobacterium*  $\beta$ -Galactosidase for the Synthesis of Prebiotic Galactooligosaccharides at High Temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(3), 740–748. <https://doi.org/10.1021/jf204719w>
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, *105*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>
- Panesar, P. S., Kaur, R., Singh, R. S., & Kennedy, J. F. (2018). Biocatalytic strategies in the production of galacto-oligosaccharides and its global status. *International Journal of Biological Macromolecules*, *111*, 667–679. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.062>
- Panesar, P. S., & Kennedy, J. F. (2012). Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Critical Reviews in Biotechnology*, *32*(4), 327–348. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.640624>
- Panesar, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F., & Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *81*(4), 530–543. <https://doi.org/10.1002/jctb.1453>

- Parker, A. M., & Watson, R. R. (2017). Lactose Intolerance. In *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease* (pp. 205–211). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809762-5.00016-4>
- Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P., & Mattanovich, D. (2005). Recombinant Protein Production in Yeasts. *Molecular Biotechnology*, 31(3), 245–260. <https://doi.org/10.1385/MB:31:3:245>
- Rabiu, B. A., Jay, A. J., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2001). Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by  $\beta$ -Galactosidases from *Bifidobacterium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2526–2530. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2526-2530.2001>
- Rastall, R. A. (2012). Galacto-Oligosaccharides as Prebiotic Food Ingredients. In G. R. Gibson & R. A. Rastall (Eds.), *Prebiotics: Development & Application* (pp. 101–109). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470023150.ch4>
- Richmond, M. L., Gray, J. I., & Stine, C. M. (1981). Beta-Galactosidase: Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns, and Immobilization. *Journal of Dairy Science*, 64(9), 1759–1771. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(81\)82764-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(81)82764-6)
- Sabater, C., Fara, A., Palacios, J., Corzo, N., Requena, T., Montilla, A., & Zárata, G. (2019). Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides from lactose and lactulose by dairy propionibacteria. *Food Microbiology*, 77, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.014>
- Sako, T., Matsumoto, K., & Tanaka, R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 9(1), 69–80. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00046-1)
- Sanz, M. L., Côté, G. L., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2006). Influence of Glycosidic Linkages and Molecular Weight on the Fermentation of Maltose-Based Oligosaccharides by

- Human Gut Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9779–9784.  
<https://doi.org/10.1021/jf061894v>
- Smithers, G. W. (2015). Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.011>
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113–128.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.004>
- Tamime, A. (2002). Fermented milks: A historical food with modern applications—a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(S4), S2–S15.  
<https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601657>
- Tunick, M. H., Van Hekken, D. L., Molina-Corral, F. J., Tomasula, P. M., Call, J., Luchansky, J., & Gardea, A. A. (2008). Queso Chihuahua: Manufacturing procedures, composition, protein profiles, and microbiology. *International Journal of Dairy Technology*, 61(1), 62–69. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2008.00359.x>
- Yanahira, S., Suguri, T., Yakabe, T., Ikeuchi, Y., Hanagata, G., & Deya, E. (1992). Formation of oligosaccharides from lactitol by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -d-galactosidase. *Carbohydrate Research*, 232(1), 151–159. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)91002-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)91002-4)
- Yañez-Ñeco, C. V., Cervantes, F. V., Amaya-Delgado, L., Ballesteros, A. O., Plou, F. J., & Arrizon, J. (2021). Synthesis of  $\beta(1 \rightarrow 3)$  and  $\beta(1 \rightarrow 6)$  galactooligosaccharides from lactose and whey using a recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Pantoea anthophila*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 49, 14–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.10.004>
- Yang, S. T., & Silva, E. M. (1995). Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2541–2562.  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76884-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76884-9)

Yildiz, F. (2009). *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420082081>

Yin, J., Li, G., Ren, X., & Herrler, G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 335–347. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.012>

Zhang, Z., O’Hara, I. M., Mundree, S., Gao, B., Ball, A. S., Zhu, N., Bai, Z., & Jin, B. (2016). Biofuels from food processing wastes. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.010>

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

Ζαφείρη Ε. (2020), Ενζυμική επεξεργασία τυρογαλακτος για παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, , 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